

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik

Klinikum rechts der Isar

Untersuchungen zum Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Expression von Chemoresistenz-assoziierten ABC-Transportern und Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber Zytostatika

Florian Michael Schertl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. T. Licht
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster (schriftliche Beurteilung)
2. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 13.10.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.01.2013 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die akute myeloische Leukämie (AML).....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie der AML.....	1
1.1.2	Klinik und Diagnose der AML.....	1
1.1.3	Ätiologie und Pathophysiologie der AML.....	3
1.1.4	Therapie und Prognose der AML.....	4
1.2	Resistenzmechanismen von Malignomen.....	6
1.3	Ablauf der Apoptose	8
1.4	ABC-Transporter	9
1.4.1	Klinische Relevanz von ABC-Transportern.....	9
1.4.2	Klinische Studien mit P-Glykoprotein-Inhibitoren	10
1.4.3	Aufbau von ABC-Transportern.....	11
1.4.4	Physiologische Funktion von ABC-Transportern	13
1.4.5	Regulierung der Expression von ABC-Transportern und Entstehung von Chemoresistenz	14
1.5	Resistenz gegen Nukleosidanaloga.....	15
1.6	Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi).....	17
1.6.1	Histondeacetylasen (HDACs) und Krebs.....	17
1.6.2	HDACi in klinischen Studien.....	17
1.6.3	Einteilung der HDACi.....	18
1.6.4	Wirkmechanismen von HDACi	18
1.6.5	HDACi in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.....	19
1.7	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien und Additiva	22

2.1.2	Zelllinien	23
2.1.3	Puffer	24
2.1.4	Gele	24
2.1.5	Reagenzien und Markierungssubstrate.....	25
2.1.6	Zytostatika und Histondeacetylase-Inhibitoren.....	27
2.1.7	Geräte	28
2.1.8	Verbrauchsmaterial	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Kulturbedingungen.....	31
2.2.2	Semiquantitative Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	31
2.2.3	Gelelektrophorese.....	34
2.2.4	Akkumulations-Assay	35
2.2.5	Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$).....	35
2.2.6	Annexin V Assay	36
2.2.7	TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling).....	36
2.2.8	Trypanblau-Färbung	37
2.2.9	MTS-Assay.....	37
2.2.10	Zellzyklus-Analyse.....	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	PBA induziert die mRNA Expression Chemoresistenz-assoziiertes ABC-Transporter	39
3.2	Transportaktivität von P-Glykoprotein wird durch Behandlung mit PBA beeinflusst.....	40
3.3	PBA moduliert die Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika.....	41
3.3.1	Zytotoxizität von HDACi als Monotherapie	41
3.3.2	Zelllinie KG-1a	42
3.3.3	Zelllinie CMK	43

3.3.4	Vergleich der Methoden zur Apoptosemessung	44
3.3.5	PBA-vermittelte Chemoresistenz ist funktionell reversibel.....	45
3.4	HDACi induzieren die mRNA Expression der Cytidineaminase	45
3.5	Veränderte Zellzyklusverteilung unter PBA Behandlung	46
3.6	Abbildungen.....	47
4	Diskussion	71
4.1	Modulation der Genexpression von ABC-Transportern durch HDACi.....	71
4.2	Einfluss von HDACi auf die Chemoresistenz maligner Zellen	73
4.2.1	Zelllinie KG-1a	73
4.2.2	Zelllinie CMK	75
4.2.3	Strategien zur Bewältigung der sog. „Multidrug resistance“	76
5	Zusammenfassung und Ausblick	77
6	Literaturverzeichnis	78
6.1	Artikelverzeichnis.....	78
6.2	Bücherverzeichnis	92
6.3	Internetverzeichnis, Websites	92
7	Anhang.....	93
8	Danksagung	107
9	Tabellarischer Lebenslauf	108
10	Bisherige Veröffentlichungen.....	108
11	Eidstattliche Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxy-Geldanamycin
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
Ara-C	Cytosinarabinosid
ATP	Adosintriphosphat
Bcl-2	B-Zell-Lymphom/Leukämie-2 Gen
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BSA	Bovine serum albumin
BSEP	Bile Salt Export Pump
bzw.	beziehungsweise
CDA	Cytidineaminase
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cGMP	zyklisches 3,5-Guanosinmonophosphat
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
CO ₂	Kohlendioxid
CsA	Cyclosporin A
dCK	Deoxycytidin-Kinase
dCMPD	Deoxycytidylat-Deaminase
ddC	2',3'-Dideoxycytidin
DIOC ₆ (3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Transmembranpotential
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAB	French-American-British
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
GSH	Glutathion
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
hENT1	Human equilibrative nucleoside transporter 1
M	molar
MDR	Multidrug resistance
MDR1	Multidrug resistance 1
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mM	millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium)
PBA	Natrium 4-Phenylbutyrat
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Pgp	P-Glykoprotein
PMEA	9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin
PMS	Phenazin-Methosulfat
PN-I	Pyrimidin-Nukleotidase I
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
s.	siehe
sog.	so genannt
SPGP	Sister of P-glycoprotein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling
U	Units (Einheiten)
u.a.	unter anderem
u.v.m.	und viele mehr
v.a.	vor allem
Ver	Verapamil
Vgl.	Vergleich
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

1.1.1 Definition und Epidemiologie der AML

Akute myeloische Leukämien (AML) sind charakterisiert durch die maligne Transformation von primitiven hämatopoetischen Stammzellen oder myeloiden Vorläuferzellen mit anschließender klonaler Proliferation und Akkumulation leukämischer Blasten im Knochenmark (Kebriaei et al. 2008). Die malignen Zellen sind durch fehlende Ausreifung gekennzeichnet (Wouters et al. 2009).

Die jährliche altersbereinigte Inzidenz der AML betrug in den U.S.A. für den Zeitraum 2001 bis 2005 3,6 pro 100.000 Einwohner, in England für das Jahr 2006 etwas über 4 pro 100.000 Einwohner und veränderte sich in den beiden Ländern während des Zeitraumes 1996 bis 2005 (U.S.A.) bzw. 1997 bis 2006 (England) trotz leichter Schwankungen nur unwesentlich (Office for National Statistics 2008, Ries et al. 2008). In Anbetracht der geringen Neuerkrankungsraten erscheint die Mortalität mit ca. 2,8 pro 100.000 Einwohner und Jahr (in den U.S.A.) sehr hoch (Ries et al. 2008). Die relative 5-Jahresüberlebensrate ist mit 21,9% (U.S.A.) dementsprechend klein und sinkt mit zunehmendem Patientenalter; so liegt sie bei älteren Patienten (Alter über 65 Jahre) bei nur ca. 5% (U.S.A.) (Ries et al. 2008). Damit ist die AML die zweithäufigste Leukämie mit der schlechtesten Prognose aller Leukämien. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt in den U.S.A. bei 67 Jahren, wobei Männer etwas häufiger erkranken als Frauen (Ries et al. 2008).

1.1.2 Klinik und Diagnose der AML

Die klinische Symptomatik der AML ist meist zurückzuführen auf eine Knochenmarkinsuffizienz; seltener treten Beschwerden infolge Infiltration extramedullärer Organe durch leukämische Zellen oder Zirkulationsstörung aufgrund sehr hoher Leukozytenzahlen im peripheren Blut auf (Fritsch et al. 2006). Infolge der Knochenmarkinsuffizienz kann es zu den Symptomen einer Anämie, wie Schwäche, Müdigkeit, Blässe und Belastungsdyspnoe, zu Infektionen aufgrund der Leukopenie und zu spontanen Blutungen, die durch die Thrombopenie bedingt sind und sich in Form von Petechien, Zahnfleisch-, Nasen- und Netzhautblutungen manifestieren können, kommen (Kebriaei et al. 2008). Zudem treten gelegentlich B-Symptome, also Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber, dem jedoch meist In-

fektionen zugrunde liegen, auf (Fritsch et al. 2006). Hepatosplenomegalie, generalisierte Lymphadenopathie sowie leukämische Infiltrationen von ZNS, Hoden, Knochen und Haut sind seltene Komplikationen der AML (Kebriaei et al. 2008). Nur etwa die Hälfte der Patienten weist im Blutbild erhöhte Leukozytenzahlen auf (Kroschinsky et al. 2007). In ca. 10% der Fälle ist jedoch eine Hyperleukozytose mit über 100.000 Leukozyten pro μ l peripheren Blutes zu verzeichnen, die schnell zum Tod führen kann und daher einer raschen Behandlung bedarf (Marbello et al. 2008). Dabei verursacht die Leukostase Mikrozirkulationsstörungen, die vor allem lebensbedrohliche Schäden des ZNS (Hirnblutungen) und der Lunge (Ateminsuffizienz) hervorrufen können (Blum und Porcu 2007). Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) entwickeln häufiger Koagulopathien, die zu gefährlichen Blutungen (insbesondere intrazerebral) und Thrombosen führen können und die Hauptursache für frühe Todesfälle bei dieser Form der AML darstellen (Tallman et al. 2007).

Um die Diagnose AML stellen zu können, muss entweder eine leukämische Infiltration des

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML

AML mit spezifischen genetischen Abnormalitäten

AML mit Translokation t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)

AML mit abnormen Eosinophilen im Knochenmark und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBF β /MYH11)

Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) und Varianten

AML mit 11q23 (MLL) Abnormalitäten

AML mit multilineärer Dysplasie

AML mit vorangegangenem myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder myelodysplastischer/myeloproliferativer Erkrankung (MPD)

AML ohne vorangegangenem MDS/MPD

AML und myelodysplastische Syndrome, therapie-assoziiert

AML assoziiert mit alkylierenden Substanzen/Radiotherapie

AML assoziiert mit Topoisomerase II-Inhibitoren

Andere

AML, nicht anderweitig kategorisiert

AML mit minimaler Differenzierung (entsprechend M0 der FAB-Klassifikation)

AML ohne Ausreifung (entsprechend M1 der FAB-Klassifikation)

AML mit Ausreifung (entsprechend M2 der FAB-Klassifikation)

Akute myelomonozytäre Leukämie (entsprechend M4 der FAB-Klassifikation)

Akute monoblastische/monozytäre Leukämie (entsprechend M5 der FAB-Klassifikation)

Akute Erythroleukämie (entsprechend M6 der FAB-Klassifikation)

Akute megakaryozytäre Leukämie (entsprechend M7 der FAB-Klassifikation)

Akute Basophilenleukämie

Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Myeloisches Sarkom

Knochenmarks oder eine von mehreren bestimmten AML-definierenden zytogenetischen Abnormalitäten nachgewiesen werden (Harris et al. 1999). Nach der älteren French-American-British (FAB) Klassifikation wird die AML durch einen Blastenanteil im Knochenmark oder Blut von 30% und mehr definiert; in der neueren Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (s. Tabelle 1) ist für die Diagnose bereits ein Blastenanteil von 20% ausreichend (Vardiman et al. 2002). Die Abgrenzung zur akuten lymphoblastischen Leukämie wird durch zytochemische und immunphänotypische Verfahren gewährleistet, anhand derer der myeloide Ursprung der malignen Zellen feststellbar ist. Allerdings weisen die leukämischen Blasten in 10-20% der Patienten Charakteristika sowohl von lymphoiden als auch myeloiden Zellen auf (Kebriaei et al. 2008).

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie der AML

Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML sind die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, chemischen Karzinogenen, wie Benzol und Herbizide, sowie Chemotherapeutika, unter diesen v.a. alkylierende Substanzen und Topoisomerase II-Inhibitoren (Epidodophyllotoxine und Anthrazykline) (Deschler und Lübbert 2006). Hämatologische Erkrankungen wie das Myelodysplastische Syndrom oder die erworbene aplastische Anämie, und einige genetische Störungen, z.B. Trisomie 21, Klinefelter-Syndrom und Fanconi-Anämie prädisponieren ebenfalls für die Entstehung einer AML (Fritsch et al. 2006, Christ et al. 2007). In der Mehrzahl der Fälle ist jedoch keine eindeutige Ursache für die Erkrankung feststellbar (Deschler und Lübbert 2006).

Die AML entsteht durch die maligne Transformation einer myeloiden Vorläuferzelle, die entweder eine hämatopoetische Stammzelle mit dem Potenzial zur unbegrenzten Selbsterneuerung oder eine etwas differenziertere Vorläuferzelle, die aufgrund der Transformation Stammzelleigenschaften erwirbt, verkörpert (Kebriaei et al. 2008). Diese Transformation ist höchstwahrscheinlich ein Prozess, in dem es zur Kumulation mehrerer verschiedener leukämogener Ereignisse kommt (Christ et al. 2007).

Die 2002 von Gilliland und Griffin aufgestellte "2-hit"-Hypothese für die AML besagt, dass es zur Krankheitsentstehung des gemeinsamen Auftretens von Mutationen aus zwei komplementären Mutationsklassen bedarf (Gilliland und Griffin 2002). Klasse-I-Mutationen führen über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen zu vermehrter Proliferation und einem Überlebensvorteil der transformierten Zellen. Beispiele hierfür sind aktivierende Mutation der Tyrosinkinase FLT3, RAS und KIT sowie die Translokationen, aus denen die Fusionsproteine BCR-Abl und TEL-PDGFR resultieren (Kebriaei et al. 2008). Die zweite Klasse von

Mutationen hemmt die hämatopoetische Differenzierung und verleiht den transformierten Zellen wahrscheinlich das Potenzial zur unbegrenzten Selbsterneuerung (Gilliland und Griffin 2002). Dieser Gruppe gehören Translokationen an, die hämatopoetische Transkriptionsfaktoren wie den sog. „Core binding factor“ (CBF), den Retinsäure-Rezeptor α (RAR α), Mitglieder der Homeobox (HOX)-Familie oder das MLL-Protein betreffen (Kebriaei et al. 2008). Die Beobachtung, dass Mutationen einer Klasse sehr selten gemeinsam in einem Patienten auftreten, aber häufig in Verbindung mit einer Mutation der jeweils anderen Klasse vorkommen, stützt die "2-hit"-Hypothese für die AML (Gilliland und Griffin 2002).

Die als Folge von Klasse-II-Mutationen auftretenden Fusionsproteine AML1/ETO und CBF β /MYH11, die Teile des CBF beinhalten, sowie PML/RAR α und PLZF/RAR α reprimieren die Zielgene von CBF bzw. RAR α durch aberrante Rekrutierung eines Repressorkomplexes, der u.a. Histondeacetylasen enthält (Glaser 2007, Kebriaei et al. 2008). Der Einsatz von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) in der Behandlung von AMLs mit diesen Translokationen könnte daher eine nützliche Therapieoption darstellen. In-Vitro Studien belegen, dass HDACi in der Lage sind, durch Verminderung der transkriptionellen Repression Differenzierung und Apoptose besonders in leukämischen Blasten mit den erwähnten Fusionsproteinen zu fördern (Jing et al. 2002, Liu et al. 2007).

1.1.4 Therapie und Prognose der AML

Die Behandlung der AML besteht aus einer Induktionstherapie mit dem Ziel der schnellen Reduktion der leukämischen Zellpopulation und Wiederherstellung der normalen Knochenmarksfunktion, sowie einer nachfolgenden Postremissionstherapie, mit der die Eradikation residueller Leukämiezellen und damit Heilung erreicht werden soll. Für die Postremissionstherapie bestehen grundsätzlich drei Therapiealternativen: Konsolidierungstherapie, allogene und autologe Stammzelltransplantation. Die Wahl des Behandlungsschemas richtet sich nach dem Alter, dem Allgemeinzustand, zytogenetischen und genetischen Prognosefaktoren des Patienten.

Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, erhalten außerhalb von klinischen Studien als Induktionstherapie fast ausschließlich ein oder zwei Zyklen der sog. „7 + 3“-Kombination, die eine dreitägige Gabe von Daunorubicin oder Idarubicin sowie eine zeitgleich beginnende siebentägige Verabreichung von Cytarabin (Ara-C) umfasst (Kebriaei et al. 2008). Eine Postremissionstherapie, die aus mehreren Zyklen Konsolidierungstherapie mit mittel- oder hochdosiertem Ara-C besteht, erzielt bei diesen Patienten gute Ergebnisse, sofern bestimmte Kriterien für ein gutes Ansprechen erfüllt sind (Bloomfield et al. 1998, Paschka et

al. 2006). Die Prognose dieser Patienten ist mit einer Rezidivrate von ca. 30-35% innerhalb von 5 Jahren besonders günstig (Paschka et al. 2006). Patienten unter 60 Jahren mit ungünstigen Prognosefaktoren profitieren nur ungenügend von der Konsolidierungstherapie mit Ara-C und sollten in klinischen Studien behandelt werden oder eine allogene Stammzelltransplantation erhalten (Estey und Döhner 2006). Mittel- bzw. hochdosiertes Ara-C oder experimentelle Therapieansätze sind für Patienten empfehlenswert, deren AML einen Karyotyp mit intermediärer Prognose aufzeigt (Kebriaei et al. 2008).

Bei über 60-jährigen Patienten können aggressive Behandlungsschemas, wie „7 + 3“ oder die hochdosierte Gabe von Ara-C, aufgrund der erhöhten therapieassoziierten Morbidität und Mortalität häufig nicht angewandt werden (Craig und Schiller 2008). Deshalb sollten ältere Patienten in schlechtem Allgemeinzustand oder mit eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion sowohl für die Induktionstherapie als auch die Postremissionstherapie in klinischen Studien behandelt werden, soweit dies möglich ist (Kebriaei et al. 2008). Falls diese Patienten für eine Studienteilnahme nicht in Frage kommen, ist eine Palliativbetreuung anzustreben (Estey und Döhner 2006). Patienten in gutem Allgemeinzustand und mit guter Leber- und Nierenfunktion kann sowohl eine Standardtherapie (z.B. „7 + 3“-Schema) als auch eine experimentelle Behandlung als Induktionstherapie angeboten werden, während die Postremissionstherapie dieser Patienten in Studien stattfinden sollte (Kebriaei et al. 2008).

Die Behandlung des Rezidivs besteht bei jüngeren Patienten vor allem in der allogenen (bzw. bei fehlendem Stammzellspender autologen) Stammzelltransplantation oder – falls diese nicht möglich ist – in experimentellen Therapieprotokollen (Craddock et al. 2005). Das Rezidiv in Patienten, die über 60 Jahre alt sind, kann mit Gemtuzumab-Ozogamicin, im Rahmen klinischer Studien oder nach einer langen Remission mit der Wiederholung des vorangegangenen Schemas zur Induktionstherapie behandelt werden (Craig und Schiller 2008). Inzwischen ist es möglich, im Rahmen klinischer Studien auch bei älteren Patienten in guter körperlicher Verfassung eine allogene Stammzelltransplantation nach nicht-myeloblatter Konditionierung durchzuführen (Kebriaei et al. 2008). Dennoch haben ältere Patienten nach wie vor eine deutlich schlechtere Prognose als jüngere (Craig und Schiller 2008).

Einen Sonderfall unter den AMLs stellt bezüglich ihrer Behandlung und Prognose die akute Promyelozytenleukämie (APL) mit den Fusionsproteinen PML/RAR α oder PLZF/RAR α dar. Die Standard-Induktionstherapie der APL beinhaltet die drei- bis viermalige Gabe von Idarubicin alle zwei Tage zusammen mit der täglichen Verabreichung von all-trans-Retinsäure (ATRA) bis zum Erreichen der kompletten Remission (Sanz et al. 2004). Älteren Patienten, die bei diesem Therapieschema eine höhere Mortalität aufweisen, kann als Alternative die

weniger toxische Kombination Arsentrioxid/ATRA angeboten werden (Kebriaei et al. 2008). Um einer möglicherweise auftretenden Koagulopathie vorzubeugen, sollte ATRA möglichst frühzeitig verabreicht werden und Thrombozytenwerte sowie Serum-Fibrinogen oberhalb bestimmter Grenzwerte gehalten werden (Tallman et al. 2007). Als Postremissionstherapie der APL werden üblicherweise 3 Zyklen einer Konsolidierungstherapie mit Idarubicin und ATRA verabreicht (Kebriaei et al. 2008). Ein Rezidiv der APL sollte mit Arsentrioxid oder Gemtuzumab-Ozogamicin und anschließender autologer (bei kompletter molekularer Remission) oder allogener (bei minimal residueller Erkrankung) Stammzelltransplantation behandelt werden (Tallman 2007). Auf diese Weise kann ein rezidivfreies 5-Jahresüberleben von etwa 75% erreicht werden, womit die APL die günstigste Prognose aller Formen der AML besitzt (Ravandi et al. 2009).

In der Therapie der AML spielt also die Behandlung, die im Rahmen klinischer Studien stattfindet, eine bedeutende Rolle. Histondeacetylase-Inhibitoren gehören zu den Medikamenten, die derzeit in diesen Studien untersucht werden und die aufgrund ihrer geringen Toxizität vor allem in der Behandlung älterer Patienten eine sinnvolle Alternative darstellen (Bellos und Mahlkecht 2008).

1.2 Resistenzmechanismen von Malignomen

Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika – ob primär vorhanden oder während der Therapie erworben – ist ein ubiquitäres und eines der größten, immer noch ungelösten Probleme der Onkologie. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen Mechanismen gegeben, die zur Chemoresistenz von Tumoren führen können (Aufbau und Inhalt orientieren sich an der Übersichtsarbeit von Gottesman et al. aus dem Jahr 2002):

■ Verminderung der Medikamentenmenge, die den Tumor erreicht:

- Geringe Absorption bei oraler Aufnahme von Medikamenten
- Verstärkter Metabolismus von Medikamenten
- Erhöhte Ausscheidung von Medikamenten mit der Folge erniedrigter Blutkonzentrationen
- Verminderte Diffusion der Medikamente aus dem Blut in den Tumor

- Abnorme Vaskularisation. Sie führt zu vermindertem Blutfluss innerhalb des Tumors, geringerem Druckgradienten zwischen Gefäßlumen und interstitiellem Tumorgewebe sowie lokaler Hypoxie, die darüber hinaus Tumorigenese und Tumorprogression durch Induktion von „hypoxia-inducible factors“ fördert (Jain 2001, Rankin und Giaccia 2008)
- Tumorgeometrie und extrazelluläre Matrix (Green et al. 1999, Pluen et al. 2001)

■ **Herabgesetzte Sensibilität gegenüber Medikamenten durch genetische und epigenetische Veränderungen der Krebszellen:**

- Veränderung der zellulären Angriffspunkte eines Medikamentes
- Verstärkte Reparatur eines Medikamenten-induzierten Schadens (v.a. DNA-Schäden)
- Aktivierung von Enzymaktivitäten, die bestimmte Medikamente oder Klassen von Medikamenten spezifisch abbauen (z.B. Cytidineaminase) (Galmarini et al. 2001)
- Zelluläre „Multidrug resistance“, d.h. mangelnde Sensibilität gegenüber einer Vielzahl strukturell und mechanistisch nicht verwandter zytotoxischer Substanzen, vermittelt durch:
 - verringerte Medikamentenaufnahme in die Tumorzelle; dies betrifft v.a. wasserlösliche Medikamente, die durch Endozytose aufgenommen werden oder über Transporter und Carrier, deren physiologische Aufgabe in der Versorgung der Zelle mit Nährstoffen liegt, ins Zytosol gelangen (Liang et al. 2004)
 - Aktivierung von zellulären Entgiftungssystemen, z.B. des Cytochrom P450-Enzymsystems (McFadyen et al. 2001)
 - Gestörter Ablauf der Apoptose, z.B. durch im Rahmen der malignen Transformation mutiertes oder nicht-funktionales p53 (Lowe et al. 1993), Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie (Frenzel et al. 2009) oder Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus, wie Inaktivierung von Checkpoints, wodurch die medikamentöse Einleitung der Apoptose verhindert wird (Schmidt und Bastians 2007)
 - Vermehrte Expression von ATP-abhängigen Efflux-Pumpen (v.a. ABC-Transporter), die Medikamente aus dem Hyaloplasma über Membranen hinweg entweder in den Extrazellularraum oder intrazelluläre Kompartimente transportieren und somit die zytosolische Konzentration der Medikamente vermindern (Dean et al. 2001)

1.3 Ablauf der Apoptose

Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Testverfahren wird hier kurz der Verlauf der Apoptose umrissen.

Apoptose kann von Signalen aus der extrazellulären Mikroumgebung (extrinsisch) sowie Signalen aus subzellulären Kompartimenten wie dem Zellkern oder dem Zytosol (intrinsisch) initiiert werden. Der extrinsische Weg wird durch Aktivierung von membranständigen Rezeptoren vermittelt. Dies geschieht im Fall der sog. „Todesrezeptoren“ (z.B. Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1) durch Bindung von Liganden, bei sog. „dependence receptors“ durch die Abwesenheit ihrer Liganden und führt jeweils zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10 (Galluzzi et al. 2007). Der intrinsische Weg, der u.a. von den konventionellen Chemotherapeutika ausgelöst wird, ist gekennzeichnet durch die Permeabilisierung mitochondrialer Membranen (Kroemer et al. 2007, Ashkenazi 2008). Einerseits hat dies den (messbaren) Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\Psi_m$) zur Folge, andererseits die Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum des Mitochondriums ins Zytosol und den Zellkern (Galluzzi et al. 2007). Ein Teil der freigesetzten Proteine (z.B. Cytochrom c) führt im Zytosol zur Aktivierung der Initiatorcaspase 9, ein anderer Teil (z.B. Endonuklease G) fördert unabhängig von Caspasen die Chromatinkondensierung im Zellkern (Kroemer et al. 2007). Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ ist eng gekoppelt mit der darauffolgenden Externalisierung von Phosphatidylserin (Ferraro-Peyret et al. 2002). Das Präsentieren von Phosphatidylserin an die Zellumgebung dient der Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten (van Engeland et al. 1998).

Extrinsischer und intrinsischer Weg münden in eine gemeinsame letzte Phase der Apoptose, die durch die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 charakterisiert ist und zur DNA-Fragmentierung durch Desoxyribonukleasen führt, was den Tod der Zelle besiegelt (Galluzzi et al. 2007, Huerta et al. 2007, Nagata 2005). Eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Pfad besteht allerdings bereits zu einem früheren Zeitpunkt: die über extrazelluläre Signale aktivierte Initiatorcaspase 8 induziert u.a. auch die Permeabilisierung mitochondrialer Membranen und alle damit verbundenen Folgereaktionen, wie Verlust von $\Delta\Psi_m$ und Externalisierung von Phosphatidylserin (Kroemer et al. 2007). Die beiden zuletzt genannten Phänomene finden also, ebenso wie die DNA-Fragmentierung sowohl bei intrinsisch als auch bei extrinsisch ausgelöster Apoptose statt und eignen sich daher als Parameter zur Erfassung der Apoptose unabhängig von der Natur des initialen Stimulus.

1.4 ABC-Transporter

1.4.1 Klinische Relevanz von ABC-Transportern

Einige ATP-binding cassette (ABC)-Transporter besitzen – wie bereits unter 1.2 erwähnt – die Fähigkeit, malignen Zellen eine Kreuzresistenz gegen viele Zytostatika bzw. pleiotrope Chemoresistenz oder sog. „Multidrug resistance“ zu verleihen. Hierbei kann es aufgrund der breiten Substratspezifität der Transporter auch zu Resistenzen gegen Chemotherapeutika kommen, mit denen die Malignome vorher nie Kontakt hatten; in der klinischen Situation kann dies zu einem fehlenden Ansprechen auf eine Zweit- bzw. Drittlinien-Chemotherapie führen. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Chemoresistenz-assoziierten ABC-Transporter, ihre Substrate, zu denen auch viele Chemotherapeutika zählen, und ihre Organverteilung im menschlichen Körper (eine umfassendere Übersicht von ABC-Transportern befindet sich im Anhang). Die zugrundeliegenden Daten wurden in vitro erzeugt, entweder durch Selektion von Zellen mittels stufenweiser Erhöhung von Zytostatika-Konzentrationen oder durch Überexpression nach Transfektion einzelner Efflux-Pumpen-Gene. Untersuchungen zum Einfluss der Expression von ABC-Transportern in Malignomen auf klinische Parameter stellten sich als eine schwierigere Aufgabe dar und ergaben nicht immer die erwartete Konsistenz. Im Folgenden sind die Erkenntnisse aus diesen klinischen Studien zusammengefasst: P-Glykoprotein, in den 1970er Jahren entdeckt, war der erste im Zusammenhang mit „Multidrug resistance“ beschriebene ABC-Transporter (Szakács et al. 2006). Frühe Studien konnten eine starke Expression von Pgp in Karzinomen des Kolon, der Nieren, der Nebennieren und der Leber, zeigen. Ursächlich dafür ist, dass Pgp in diesen ex- und sekretorischen Organen auch physiologischerweise in hohen Konzentrationen vorliegt (Lage 2008). Eine Metaanalyse von 1997 kam zu dem Ergebnis, dass Pgp in 41% der Mammakarzinome exprimiert wird, diese Expression mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Therapieversagen einhergeht und nach einer Chemotherapie ansteigt (Trock et al. 1997). Immunhistochemische Analysen von Weichteil- und Osteosarkomen legten eine starke Assoziation zwischen der Menge an Pgp-Protein und rezidivfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben dar; dies konnte allerdings mit anderen Methoden nicht bestätigt werden (Gottesman et al. 2002). Die einheitlichsten Daten über die Verbindung von Pgp-Expression und klinischem Ergebnis liegen zur akuten myeloischen Leukämie vor. Hier korrelierte die Expressierung von Pgp mit einer verminderten Rate kompletter Remissionen und einer schlechteren Prognose und während bei Erstdiagnose ca. ein Drittel der Patienten Pgp in ihren leukämischen Zellen exprimierten, waren es bei einem Rezidiv über 50% (Leith et al. 1999, Michieli et al. 1999, Han et al. 2000,

van der Kolk et al. 2000, Szakács et al. 2006). Weniger gut etabliert ist die Rolle von BCRP in klinischer „Multidrug resistance“ von Malignomen. BCRP wurde in verschiedenen soliden Tumoren nachgewiesen, besonders häufig in Malignomen des Gastrointestinaltraktes, des Endometriums, der Lunge, und in Melanomen (Diestra et al. 2002). Zur Fragestellung des Zusammenhangs von BCRP-Expression und Prognose von Tumorpatienten existieren widersprüchliche Publikationen (Robey et al. 2007). Eindeutige, aber bisher nicht bestätigte Ergebnisse liegen lediglich zur Tumorentität des oralen Plattenepithelkarzinoms vor: es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expressierung von BCRP und dem Verlust der Zelldifferenzierung sowie einer verringerten Überlebenszeit (Friedrich et al. 2004). Des Weiteren wurde BCRP auch in AML-Zellen nachgewiesen; eine Rolle bei der Resistenz dieser Zellen konnte jedoch nur in einem Teil der Veröffentlichungen belegt werden (Abbott et al. 2002, Benderra et al. 2004, Uggla et al. 2005). Eine mögliche Erklärung dafür lieferten vor kurzem Ho et al., die eine Assoziation der Pgp- und BCRP-Expression mit dem Ansprechen auf Chemotherapie lediglich in der Subpopulation der CD34⁺ CD38⁻ AML-Zellen, den sog. leukämischen Stammzellen, nachweisen konnten, nicht jedoch in den differenzierteren Zellen oder in der Gesamtpopulation (Ho et al. 2008). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass nur der durch Pgp und/oder BCRP vermittelte Schutz einer kleinen Gruppe von leukämischen Stammzellen – nicht jedoch der aller leukämischen Blasten – vor Zytostatika einen entscheidenden Prognosefaktor darstellt. Neben der Pgp- und BCRP-Expressierung scheinen in der AML auch die ABCA3- und die MRP8-Expression die Prognose zu beeinflussen. In zwei vor kurzem veröffentlichten Studien korrelierten diese jeweils mit einer reduzierten Gesamtüberlebenszeit der Patienten (Chapuy et al. 2008, Guo et al. 2009). Die Datenlage zum Einfluss der restlichen ABC-Transporter auf den klinischen Verlauf onkologischer Patienten kann in folgenden Zusammenhängen, die jeweils nur durch eine einzige Studie belegt sind, resümiert werden: MRP3-Expression und ungünstige Prognose bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie, MRP4-Expression und schlechtes klinisches Ergebnis bei Neuroblastompatienten sowie ABCB5-Expression und Tumorprogression von Melanomen (Steinbach et al. 2003, Norris et al. 2005, Schatton et al. 2008). Untersuchungen zur Beziehung von MRP1-Expression zu klinischen Endpunkten ergaben inkonsistente Ergebnisse (Szakács et al. 2006).

1.4.2 Klinische Studien mit P-Glykoprotein-Inhibitoren

Seit Anfang der 1980er Jahre wurde nach Substanzen gesucht, die eine durch P-Glykoprotein vermittelte „Multidrug resistance“ aufheben können (Gottesman et al. 2002). Klinische Studien dazu vermochten jedoch bisher keine durchschlagenden Erfolge zu melden. Die Gründe

dafür sind vielfältig: die Pgp-Expression und die Aktivität alternativer MDR-Mechanismen des Tumors wurden vor den Behandlungen zumeist nicht analysiert; manche Pgp-Inhibitoren führten zudem in den erforderlichen Dosen zu toxischen Nebenwirkungen; außerdem resultierten unvorhersehbare pharmakokinetische Interaktionen zwischen Inhibitoren und Chemotherapeutika in Unter- bzw. Überdosierungen der Chemotherapeutika (Lage 2008). Dennoch konnten 4 von 6 randomisierten Studien mit den Inhibitoren Cyclosporin A oder Quinin einen klinischen Nutzen der Pgp-Inhibition in Patienten mit AML oder Hochrisiko-MDS zeigen (Solary et al. 1996, Wattel et al. 1998, Liu Yin et al. 2001, List et al. 2001, Matsouka et al. 2006, Li et al. 2008). Die klinische Untersuchung neuerer Pgp-Inhibitoren mit geringeren pharmakokinetischen Wechselwirkungen, wie Tariquidar oder Zosuquidar, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.4.3 Aufbau von ABC-Transportern

Alle ABC-Transporter weisen Ähnlichkeiten im Hinblick auf Sequenz und Struktur auf: sie besitzen eine ATP-bindende Region, die aus etwa 90-110 Aminosäuren besteht und zwei Walker Motive (Walker A und B), eine zwischen den Walker Motiven liegende sog. „linker“ Region (auch Dodecapeptid- oder C-Region genannt) und einige zusätzliche homologe Regionen beinhaltet (Gottesman und Ambudkar 2001). Üblicherweise bilden zwei dieser ABC-Domänen zusammen mit zwei bis drei Transmembranregionen, die zumeist aus insgesamt 12 bis 17 Transmembranhelices bestehen, einen ABC-Transporter (Lage 2008). In den meisten Prokaryoten wird diese Kombination durch vier einzelne Untereinheiten erreicht, in Eukaryoten sind gewöhnlich alle funktionellen Domänen in einer einzigen Polypeptidkette zusammengefasst. Manche Transporter werden dagegen von Hetero- oder Homodimeren gebildet, darunter vermutlich auch ABCG2 (Gottesman und Ambudkar 2001, Ozvegy et al. 2001).

Die beiden ABC-Regionen bilden zusammen zwei funktionelle Einheiten, die pro transportierter Substanz zwei Moleküle ATP hydrolysieren (Ambudkar et al. 2003). Experimentelle Daten zur Funktion von P-Glykoprotein lassen vermuten, dass eine ATP-Hydrolyse zu Konformationsänderung und daraus resultierender Substanztranslokation führt, die zweite ATP-Hydrolyse der Wiederherstellung des für Substrate hochaffinen Ausgangszustandes dient (Ambudkar et al. 2003). Es wird angenommen, dass die Transmembrandomänen die Substratbindung und damit die Spezifität für bestimmte Substanzen vermitteln (Lage 2008). Der Transport erfolgt über biologische Membranen der Zelle, entweder in Zellen bzw. Zellorganellen hinein oder aus diesen heraus. Hydrophobe Substrate werden wahrscheinlich direkt in der Membran gebunden und daraufhin transportiert (Gottesman und Ambudkar 2001).

Tabelle 2: Wichtige Chemoresistenz-assoziierte ABC-Transporter, ihre Substrate und Lokalisation im menschlichen Körper

Name und Synonyme	Substrate/Resistenzprofil		Organ	Referenzen ^a
	Chemotherapeutika	andere		
ABCB1, MDR1, PGP,	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Actinomycin D, Bisan-tren, Mitoxantron, Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposid, Teniposid, Irinotecan, SN-38 (zytotoxischer Metabolit von Irinotecan), Topotecan, Methotrexat, Imatinib (STI 571), Romidepsin (FK228)	neutrale und kationische organi-sche Verbindungen: Colchicin, Atorvastatin, Digoxin, Losartan, Amprenavir, Saquinavir, Erythro-mycin, Levofloxacin, Ivermectin, Cimetidin, Lansoprazol, Amitrip-tylin, Domperidon, Loperamid, Ondansetron, Vecuronium, Dexa-methason, Morphin, Phenytoin, Tacrolimus, u.v.m.	Gastrointesti-naltrakt, Leber, Niere, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke, Lun-ge, Blut-Hoden-Schranke, adul-te Stammzellen, u.a.	1–7
ABCG2, BCRP, MXR, ABCP	Doxorubicin*, Daunorubicin*, Epirubicin*, Bisan-tren, Mitoxan-tron, Etoposid, Teniposid, Irino-tecan, SN-38, Topotecan, Diflomotecan, Methotrexat [†] , Methotrexat -di ⁺ - und trigluta-mat ⁺ , Imatinib (STI 571), Flavopi-ridol, Gefitinib, Erlotinib, Cladri-bin, Clofarabin, Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Raltitrexed, (6-Thioguanin ?, Gemcitabin ?, 5-Fluoruracil ?)	Sulfatierte Östrogene, Flavonoide, Riboflavin, Triglutamat, Protopor-phyrin IX, Pheophorbid a, cGMP, Prazosin, Zidovudin, Lamivudin, Abacavir, Nelfinavir, PMEPA, Pyri-methamin*, Sulfasalazin, Cipro-floxacin, Nitrofurantoin, Dipyrid-amol, Leflunomid, Olmesartan, Pitavastatin, Glibenclamid, u.v.m.	Gastrointestinal-trakt, Leber, Niere, Plazenta, Brustdrüse, Blut-Hirn-Schranke, Lun-ge, Prostata, Endothel von Venen und Kapillaren	1, 2, 8–15
ABCC1, MRP1	Doxorubicin, Daunorubicin, Epi-rubicin, Mitoxantron, Vincristin, Vinblastin, Etoposid, Irinotecan, SN-38, Methotrexat, Imatinib, Cyclophosphamid, Arsenik, Romidepsin (FK228)	glukuronidierte & sulfatierte orga-nische Anionen, z.B. glukuroni-dierte/sulfatierte Östrogene, Biliru-bin, Glutathion, Leukotrien C4, Colchicin, Saquinavir, Grepaf-floxacin, u.v.m.	alle Organe	1, 2, 15–18
ABCC2, MRP2, cMOAT	Doxorubicin, Epirubicin, Vincristin, Vinblastin, Mitoxantron, Pac-litaxel, Docetaxel, Etoposid, Irino-tecan, SN-38, Topotecan, Methotrexat, Cisplatin, Arsenik	organische Anionen, Glutathion, glukuronidierte/sulfatierte Östro-gene, sulfatierte Gallensäuren, Bi-lirubin-Glukuronide, Cysteinyl-Leukotriene, Saquinavir, Ceftri-axon, Grepafloxacin, Rifampicin, GSH-Ethacrynsäure, Pravastatin, Temocapril, Diclofenac, Acetaminophen, u.v.m.	Leber, Niere, Gastrointestinal-trakt, Gehirn, Bronchi, Pla-zenta	1, 2, 4, 15, 16, 19
ABCC3, MRP3	Etoposid, Teniposid, Methotrexat, (Vincristin ?)	Glukuronat- und Glutathion-Kon-jugate, z.B. glukuronidierte Östro-gene, Bilirubin-Glukuronide, Leu-kotrien C ₄ , Gallensäuren, Mor-phin-Glukuronide, konjugiertes Acetaminophen, u.v.m.	Leber, Niere, Pankreas, Milz, Nebenniere, Gastrointesti-naltrakt, Plazen-ta, Tonsillen	1, 2, 15, 20

^a (1) Gottesman et al. 2002; (2) Szakács et al. 2006; (3) Zhou 2008; (4) Dietrich et al. 2003; (5) Bessho et al. 2009; (6) Haslam et al. 2008; (7) Glaser 2007; (8) Krishnamurthy und Schuetz 2006; (9) Bram et al. 2006; (10) Robey et al. 2007; (11) de Wolf et al. 2008; (12) Cusatis und Sparreboom 2008; (13) Yuan et al. 2008; (14) Yuan et al. 2009; (15) Gradhand und Kim 2008; (16) Seo et al. 2007; (17) Xiao et al. 2005; (18) Zhou et al. 2008; (19) Nies und Keppler 2007; (20) Borst et al. 2007

*diese Substanzen können nur von mutiertem ABCG2 transportiert werden (Glycin oder Threonin anstelle von Arginin an Position 482 des ABCG2-Proteins)

[†]Methotrexat kann nur von Wildtyp-Protein (mit Arginin an Position 482) transportiert werden

Fortsetzung von Tabelle 2

Name und Synonyme	Substrate/Resistenzprofil		Organ	Referenzen ^a
	Chemotherapeutika	andere		
ABCC4, MRP4	Irinotecan, SN-38, Topotecan, Rubitecan, Methotrexat, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Cladribin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, (Vincristin ?)	cAMP, cGMP, organische Anionen, Gallensäuren, glukuronidierte Östrogene, Dehydroepiandrosteron-Sulfat, Harnsäure, Folsäure, Leucovorin, Prostaglandine, Zidovudin, Abacavir, PMEA, Adefovir dipivoxil, Ganciclovir, p-Amin Hippursäure, Resveratrol, Hydrochlorothiazid, Furosemid, u.v.m.	Leber, Niere, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Blut-Hirn-Schranke, Lunge, Ovar, Hoden, Prostata, Lymphozyten, Thrombozyten	1, 2, 15, 18, 20–23
ABCC5, MRP5	Methotrexat, Methotrexat-diglutamat, Pemetrexed, Raltitrexed, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, 5-Fluoruracil, Cladribin, (Cisplatin ?, Oxaliplatin ?, Cytarabin ?, Gemcitabin ?)	cAMP, cGMP, organische Anionen, Folsäure, Zidovudin, Abacavir, Alaninyl-d4TMP, PMEA, Adefovir dipivoxil, Quercetin, Resveratrol, Cadmiumchlorid, Kaliumantimonyltartrat	Leber, Blut-Hirn-Schranke, Gehirn, Herz, Muskeln, Blutgefäße, Urogenitaltrakt, Plazenta	1, 2, 15, 18, 20, 24–26
ABCC6, MRP6	Doxorubicin, Daunorubicin, Actinomycin D, Etoposid, Teniposid, Cisplatin	Glutathion-Konjugate von N-Ethylmaleimid und Dinitrophenol, Leukotrien C ₄ , BQ123 (= Endothelin-Rezeptorantagonist)	Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Gehirn, Lunge, Haut, Gefäße, Herz, u.v.m.	1, 2, 27, 28
ABCC10, MRP7	Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Paclitaxel, Docetaxel, Cytarabin, Gemcitabin, 5-Azacytidin, Etoposid B	Glukuronidierte Östrogene, Leukotrien C ₄ , PMEA, Zalcitabin (= ddC)	Pankreas, Leber, Niere, Lunge, Milz, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Plazenta, Ovar, Hoden, Prostata, Kolon, Herz, Muskeln, Leukozyten, u.v.m.	5, 26, 29
ABCC11, MRP8	Methotrexat, 5-Fluoruracil, Cytarabin	cAMP, cGMP, glukuronidierte/sulfatierte Östrogene, Dehydroepiandrosteron-Sulfat, Gallensäuren, S-(2,4-dinitrophenyl)-GSH, Folsäure, Leukotrien C ₄ , PMEA, Zalcitabin (= ddC)	Leber, zentrales und peripheres Nervensystem, Plazenta, Brustdrüse, Hoden, u.v.m.	26, 30, 31

^a (1) Gottesman et al. 2002; (2) Szakács et al. 2006; (5) Bessho et al. 2009; (15) Gradhand und Kim 2008; (18) Zhou et al. 2008; (20) Borst et al. 2007; (21) Leggas et al. 2004; (22) Tian et al. 2005; (23) Tian et al. 2006; (24) Oguri et al. 2006; (25) Hagmann et al. 2009; (26) Kruh et al. 2007; (27) Belinsky et al. 2002; (28) Beck et al. 2005; (29) Hopper-Borge et al. 2009; (30) Toyoda et al. 2008; (31) Guo et al. 2009

1.4.4 Physiologische Funktion von ABC-Transportern

In der Literatur sind bisher etwa 1.100 unterschiedliche Mitglieder der Familie der ABC-Transporter beschrieben, die sieben verschiedenen Unterfamilien (ABCA bis ABCG) zugeordnet werden können (Gottesman und Ambudkar 2001). Diese Transporter wurden in allen bekannten Organismen gefunden. Der Mensch besitzt nach bisherigen Erkenntnissen 49 ver-

schiedene (Huls et al. 2009). Die meisten ABC-Pumpen vermitteln direkt den Transport von unterschiedlichsten Substanzen, wie Zucker, Aminosäuren, Glykane, Cholesterin, Phospholipide, Peptide, Proteine, Antibiotika, Xenobiotika und Toxine (Gottesman und Ambudkar 2001). Andere wiederum sind Teile von regulierten Ionenkanälen, wie der CFTR Chloridkanal oder der Sulfonylharnstoffrezeptor (Dean et al. 2001). Neben ihrer Rolle in malignen Zellen, kommen ABC-Transportern wichtige physiologische Aufgaben zu. Darauf deuten sowohl ihre weit verbreitete Expression in normalen Geweben hin, als auch eine Reihe von Krankheiten, die mit Defekten dieser Proteine assoziiert sind. So werden das ZNS, die Hoden, der heranwachsende Fetus und hämatopoetische Stammzellen durch die Expression von ABC-Transportern an den jeweiligen Endothelschranken vor im Blut zirkulierenden zellschädigenden Agenzien geschützt (Szakács et al. 2006). Der Phänotyp von undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen der sog. "Side Population" wird sogar - zumindest teilweise - durch die Funktion von ABCG2 und P-Glykoprotein definiert (Scharenberg et al. 2002). Neben dem Schutz einzelner wichtiger Organe sorgen ABC-Transporter in Leber, Niere und Gastrointestinaltrakt auch für die Ausscheidung von Toxinen in Galle, Urin und Faeces und vermindern dadurch deren Konzentration im gesamten Organismus (Gottesman et al. 2002). Das lässt auch einen Einfluss dieser Pumpen auf die Pharmakokinetik von Medikamenten annehmen. Studien konnten diese Annahme für P-Glykoprotein, ABCG2 und – zumindest in Mäusen und Ratten – MRP2 bestätigen (Kruijtzter et al. 2002, Dietrich et al. 2003, Stewart et al. 2004). Weitere Belege für die enorme Bedeutung der ABC-Transporter hinsichtlich der normalen Physiologie des menschlichen Organismus liefern jene 16 bisher bekannte Erbkrankheiten, denen Defekte einzelner Efflux-Pumpen zu Grunde liegen (Huls et al. 2009). Berühmtestes Beispiel ist die Mukoviszidose. Sie resultiert aus Mutationen des CFTR-Gens, das auch unter dem Namen ABCC7 bekannt ist (Gottesman und Ambudkar 2001).

1.4.5 Regulierung der Expression von ABC-Transportern und Entstehung von Chemoresistenz

Die Expression von ABC-Transporter kann durch eine Vielzahl von chemischen (v.a. Xenobiotika) und physikalischen (oxidativer Stress, Röntgenstrahlung, UV-Strahlung, Hitzeschock) Einflüssen induziert werden; dies ist ein natürlicher Schutzmechanismus des Organismus und einzelner Zellen vor zytotoxischen Verbindungen, der in Tumorzellen die Entwicklung einer Resistenz gegen Chemotherapeutika fördern kann (Zhou 2008, Toyoda et al. 2008). Als eine weitere Möglichkeit, Chemoresistenz zu erwerben, gilt die Amplifikation von ABC-Transportergenen (Kuo 2009). Demgegenüber besteht die primäre Resistenz bereits

bei der Tumorentstehung und kommt u.a. in Malignomen vor, deren Ursprungsorgane physiologischerweise ABC-Transporter überexprimieren. Beispiele dafür sind Kolon-, Nieren-, Nebennieren- und hepatozelluläre Karzinome, die hohe intrinsische Pgp-Konzentrationen aufweisen (Lage 2008).

1.5 Resistenz gegen Nukleosidanaloga

Nukleosidanaloga sind eine wichtige Gruppe von Antimetaboliten, die sowohl in der Therapie hämatologischer als auch solider Malignome eingesetzt werden. Sie ähneln physiologischen Nukleosiden nicht nur strukturell, sondern auch in der Art und Weise ihrer Aufnahme in die Zelle und ihres intrazellulären Metabolismus; schließlich werden sie in die DNA eingebaut, was zur Inhibition der DNA-Synthese mit Abbruch des neu synthetisierten DNA-Stranges führt (Galmarini et al. 2001). Manche Nukleosidanaloga inhibieren zusätzlich Enzyme, die bei der Produktion von Nukleotiden oder der RNA-Synthese eine wichtige Rolle spielen (Galmarini et al. 2001). Letztlich können alle genannten Effekte zum Zelltod führen. Zu den Nukleosidanaloga zählen u.a. Cytarabin, Gemcitabin, Fludarabin, Cladribin und 6-Mercaptopurin.

Wie bei der Anwendung von Chemotherapeutika anderer Klassen ist auch bei der Therapie mit dieser Medikamentenklasse die Entstehung einer Chemoresistenz des Malignoms ein großes und häufig auftretendes Problem. Die Mechanismen dieser Resistenzentwicklung werden hier im Folgenden anhand der beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nukleosidanaloga Cytarabin und Gemcitabin besprochen. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 1 der intrazelluläre Metabolismus von Nukleosidanaloga dargestellt. Abgesehen von allgemeinen Resistenzmechanismen, wie gestörter Ablauf der Apoptose, resultiert Resistenz gegen Nukleosidanaloga zumeist aus einer Verminderung der intrazellulären Konzentration der aktiven 5'-Triphosphat-Derivate (Galmarini et al. 2001). Dies kann durch verringerte Aufnahme in die Zelle, herabgesetzter Aktivierung durch Kinasen, verstärkten Abbau zu nicht-toxischen Metaboliten oder aktiven Transport aus der Zelle heraus geschehen. So wurde eine Assoziation zwischen verminderter Expression des Nukleosidtransporters Human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), über den Nukleosidanaloga in die Zelle gelangen, und einer Resistenz gegen Cytarabin und Gemcitabin nachgewiesen (Zhang et al. 2007). Zudem konnte als Ursache einer Resistenz gegen die beiden o.g. Nukleosidanaloga eine herabgesetzte Aktivität der Deoxycytidin-Kinase, sowie erhöhte Aktivitäten der Pyrimidin-Nukleotidase I und der Cytidineaminase festgestellt werden (Galmarini et al. 2001, Galmarini et al. 2004,

Fernandez-Calotti et al. 2005). Die Rolle der Deoxycytidylat-Deaminase hinsichtlich einer Resistenz gegen Cytarabin ist unklar; während manche Untersuchungen eine Verbindung mit verminderter Aktivität dieses Enzyms zeigen, lassen andere Studien auf eine Verknüpfung mit vermehrter Enzymaktivität schließen (Schröder et al. 1998). Durch aktiven Efflux können auch ABC-Transporter die intrazelluläre Konzentration von Nucleosidanaloga verringern. Über eine vermehrte Expression von MRP5 und BCRP bei der Resistenzentwicklung gegenüber Nucleosidanaloga wurde zwar berichtet, hinreichend belegt ist sie jedoch nicht (Davidson et al. 2002, Reid et al. 2003, Oguri et al. 2006, Borst et al. 2007, de Wolf et al. 2008). Außerdem wurden in Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Cytarabin bzw. Cytarabin und Gemcitabin erst kürzlich MRP8 bzw. MRP7 beschrieben (Guo et al. 2009, Hopper-Borge et al. 2009).

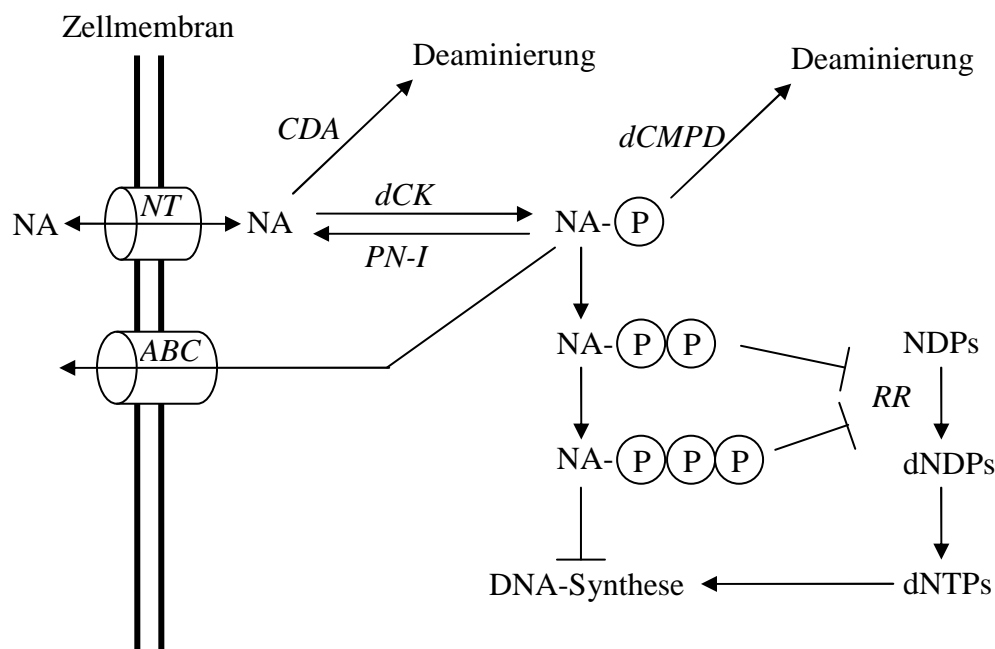


Abbildung 1: Intrazellulärer Metabolismus von Nucleosidanaloga

Nucleosidanaloga (NA) werden über spezifische Nucleosidtransporter (NT), wie hENT1, in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär werden sie durch die Deoxycytidin-Kinase (dCK) und 2 weitere Kinasen zum aktiven, mit der DNA-Synthese interferierenden 5'-triphosphat-Derivat phosphoryliert. Einige Nucleosidanaloga (z.B. Gemcitabin) inhibieren zusätzlich die Ribonucleotid-Reduktase (RR), was über eine gehemmte Umwandlung von Ribonucleotid-Diphosphaten (NDPs) zu Desoxyribonucleotid-Diphosphaten (dNDPs) zu verminderter Bereitstellung von Desoxyribonucleotid-Triphosphaten (dNTPs) für die DNA-Synthese führt. Nucleosidanaloga können durch die Cytidine-Deaminase (CDA) oder die Deoxycytidylat-Deaminase (dCMPD) zu nicht-toxischen Metaboliten abgebaut werden. Die Pyrimidin-Nucleotidase I (PN-I) kann einer Aktivierung der Nucleosidanaloga durch Dephosphorylierung entgegenwirken. Zudem sind ABC-Transporter (ABC), wie MRP7 und MRP8, dazu in der Lage, Nucleosidanaloga (insbesondere in monophosphorylierter Form) aktiv aus der Zelle heraus zu befördern. Modifiziert nach Galmarini et al. 2001 und Guo et al. 2009.

1.6 Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi)

1.6.1 Histondeacetylasen (HDACs) und Krebs

Epigenetische Modifikationen spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung und Entwicklung von Krebs (Weichert 2008). Dazu gehören auch die Acetylierung und Deacetylierung von N-terminalen Lysinresten der Histone durch Histon-Acetyltransferasen und Histondeacetylasen (HDAC) (Walkinshaw und Yang 2008). Ein Überwiegen der HDAC-Aktivität führt zu Histon-Hypoacetylierung und als Folge davon zu Chromatinkondensation und transkriptioneller Repression vieler Gene, u.a. von Tumorsuppressorgenen (Carew et al. 2008). Inzwischen konnten etliche Studien einen Zusammenhang zwischen HDAC-Expression und klinischen Parametern zeigen. So war in einigen verschiedenen Tumorentitäten eine Überexpression von Klasse I HDACs assoziiert mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien und schlechter Prognose, während eine verstärkte Expression von Klasse II HDACs mit verlängerten Überlebenszeiten verbunden war (Osada et al. 2004, Saji et al. 2005, Rikimaru et al. 2007, Marquard et al. 2008, Weichert et al. 2008a, Weichert et al. 2008b, Weichert et al. 2008c, Weichert et al. 2008d). Zudem wurden in den Malignomen im Vergleich zu den korrespondierenden normalen Geweben Klasse I HDACs tendenziell vermehrt, Klasse II HDACs meist vermindert exprimiert (Weichert 2008).

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Modulation der HDAC-Aktivitäten einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung von Tumoren darstellt.

1.6.2 HDACi in klinischen Studien

Derzeit befinden sich mehr als ein Dutzend HDACi, darunter auch Natriumphenylbutyrat, in klinischen Studien der Phasen I-III zur Behandlung verschiedenster solider und hämatologischer Malignome. Dabei werden sie sowohl als Einzelsubstanzen wie auch in Kombination mit etablierten Chemo- bzw. Radiotherapieschemata oder neueren zielgerichteten Medikamenten („targeted drugs“) untersucht (Internetrecherche bei Clinicaltrials.gov, s. Anhang). Im Oktober 2006 wurde Vorinostat (SAHA) als erster Histondeacetylase-Inhibitor für die klinische Anwendung bei Krebspatienten (mit kutanem T-Zell-Lymphom) durch die U.S. Food and Drug Administration zugelassen (Marks und Breslow 2007).

1.6.3 Einteilung der HDACi

Histondeacetylase-Inhibitoren können entsprechend ihrer chemischen Struktur in folgende Gruppen unterteilt werden: Hydroxamsäuren (Vorinostat, Panobinostat, Belinostat, Trichostatin A, Scriptaid), kurzkettige Fettsäuren (Valproinsäure, Natriumbutyrat, Natriumphenylbutyrat = PBA, Phenylacetat, AN-9), Benzamide (MS-275, MGCD0103, CI-994) und zyklische Tetrapeptide (Romidepsin = Depsipeptid = FK228 = FR901228, Trapoxin A, Apicidin) (Walkinson und Yang 2008). Daneben unterscheiden sie sich auch hinsichtlich ihres HDAC-Inhibitor-Profiles. Während die Zielenzyme der Hydroxamsäuren HDACs der Klassen I, II und IV sind, hemmen die Fettsäuren Valproinsäure, Natriumbutyrat und PBA nur Klasse I und IIa (ausgenommen HDAC7) HDACs (Bielliaskas und Pflum 2008, Smith und Workman 2009). Die Benzamide MS-275 und MGCD0103 weisen eine Selektivität für die Klasse I HDACs 1, 2 und 3 auf, das zyklische Tetrapeptid Romidepsin für die HDACs 1 und 2 (Bielliaskas und Pflum 2008). Laufende und zukünftige Studien werden zeigen, ob selektivere HDACi einen therapeutischen Vorteil (z.B. günstigeres Nebenwirkungsprofil) gegenüber den Unspezifischen besitzen und welche HDACi bei bestimmten Tumorentitäten oder molekularen Profilen eines Malignoms die beste Wirkung erzielen.

1.6.4 Wirkmechanismen von HDACi

Die Behandlung mit HDACi führt zu einer Hyperacetylierung von Histonen und anderen Zielproteinen der HDACs, darunter Transkriptionsfaktoren, Chaperone und zytoskelettale Komponenten (Martínez-Iglesias et al. 2008). Die Acetylierung von Lysinresten der Histone führt über die Neutralisierung der positiven Ladung zu einer verminderten Affinität zwischen Histonen und DNA mit der Folge, dass Chromatin in eine gelockerte Form überführt wird und Transkriptionsfaktoren besseren Zugang zu DNA erhalten (Mottet und Castronovo 2008). Insgesamt wird so die Expression von ca. 5 – 20% der Gene verändert, wobei etwa gleich viele Gene induziert wie reprimiert werden (Smith und Workman 2009).

HDACi können in Krebszellen Zellzyklusarrest, Differenzierung, oxidativen Stress und Apoptose induzieren (Carew et al. 2008). Der Zellzyklusarrest wird einerseits durch Induktion von Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen, wie p21 und p57, andererseits durch Reprimierung von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und proliferativen Transkriptionsfaktoren, z.B. c-myc, erzielt (Smith und Workman 2009, Bagui et al. 2009). Zur Differenzierung maligner Zellen tragen die vermehrte Expression von p21, eine verstärkte TGF- β -Signaltransduktion und die Reaktivierung von Genen, die über eine aberrante Rekrutierung von HDACs durch Onkogene stillgelegt wurden, bei (Kim et al. 2006). So werden in der akuten Promyelo-

zytenleukämie (PML) wichtige Gene für die myeloide Differenzierung durch die chimeren Onkoproteine PML-RAR α bzw. PLZF-RAR α reprimiert (Glaser 2007). Die Behandlung mit HDACi führt zu einer Sensibilisierung der PML-Zellen gegenüber Retinoiden, den physiologischen Aktivator der supprimierten Gene, und treibt so in Kombination mit diesen die myeloide Differenzierung voran (Kim et al. 2006). Ein weiterer antitumoraler Effekt von HDACi ist die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies bei gleichzeitiger selektiver Hemmung der Induktion des Antioxidans Thioredoxin (Walkinshaw und Yang 2008). Diese Erzeugung oxidativen Stresses, zusammen mit der Fähigkeit von HDACi, pro-apoptische Proteine wie Bax und Bim zu aktivieren und die Expression anti-apoptischer Gene wie Bcl-2 und XIAP zu vermindern, leitet Apoptose über den intrinsischen Weg ein (Mottet und Castronovo 2008). Darüber hinaus sind HDACi auch in der Lage, den extrinsischen Weg der Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Dies geschieht durch Hochregulierung der Expression sog. Todesrezeptoren, Fas und TRAIL-R2 (DR5) sowie deren Liganden Fas-L, TRAIL und Tumornekrosefaktor (Carew et al. 2008).

Neben diesen direkt zytotoxischen Effekten auf Krebszellen besitzen HDACi das Potential, die Blutversorgung und das metastatische Potential des Tumors sowie die Immunantwort auf den malignen Prozess günstig zu beeinflussen. Über eine Verminderung des Hypoxie-induzierten Anstiegs proangiogener Faktoren wie VEGF und HIF-1 α inhibieren HDACi die Tumorangio-genese (Kim et al. 2001). Maligne Invasion und Metastasenbildung werden gehemmt durch vermehrte Expression interzellulärer Adhäsionsmoleküle, z.B. ICAM-1 und E-Cadherin, als auch von Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen bei gleichzeitig supprimierter Transkription von Matrix-Metalloproteinasen und des – für die metastatische Kolonisation des Zielgewebes wichtigen – Chemokinrezeptors CXCR4 (Martínez-Iglesias et al. 2008). Die Fähigkeit von HDACi, Zellen zu vermehrter Expressierung von HLA- bzw. MHC-Molekülen anzuregen, könnte eine Stimulation der Immunantwort auf den Tumor bewirken (Kim et al. 2006).

1.6.5 HDACi in Kombination mit anderen Chemotherapeutika

Aufgrund der vielfältigen zellulären Mechanismen, die HDACi in Gang setzen, ergeben sich einige aussichtsreiche Kombinationsmöglichkeiten mit anderen Chemotherapeutika (s. Abb. 2). Viele In-vitro Studien zeigten bereits additive oder synergistische antitumorale Effekte solcher Kombinationen (Drummond et al. 2005). Zu den Substanzen bzw. Substanzgruppen, deren Wirkung durch zusätzliche Gabe eines HDACi verstärkt wurde, gehören Standardchemotherapeutika (z.B. Doxorubicin, Etoposid, Topotecan, Chlorambucil, Paclitaxel, Fludarabin, Cytarabin, Gemcitabin, 5-Fluoruracil, Cisplatin und Dexamethason), der DNA-Methyl-

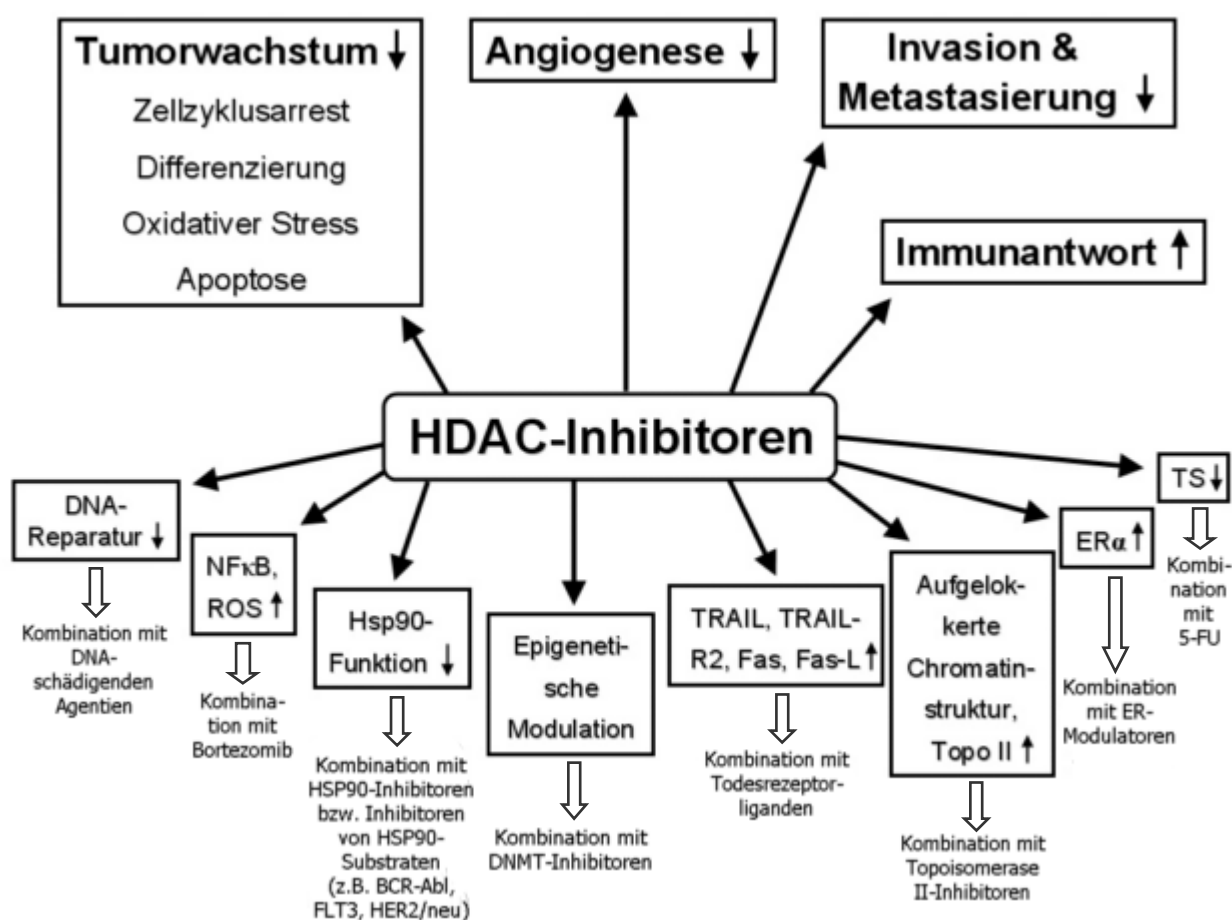


Abbildung 2: Antitumorale Effekte von HDACi und rationale Kombinationsmöglichkeiten

Modifiziert nach Kurz et al. 2001, Kim et al. 2006, Glaser 2007 und Carew et al. 2008

Abkürzungen: NFκB = nukleärer Faktor kappa B, ROS = reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies), HSP90 = Hitzeschock-Protein 90, BCR-Abl = onkogenes Fusionsprotein aus den Proteinen BCR = breakpoint cluster region und Abl = Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1, FLT3 = FMS-like tyrosine kinase 3, HER2/neu = V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, DNMT = DNA-Methyltransferase, TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL-R2 = TRAIL-Rezeptor 2, FAS = Fatty acid synthase, FAS-L = FAS-Ligand, Topo II = Topoisomerase II, ERα = Östrogenrezeptor-α, TS = Thymidylat-Synthase, 5-FU = 5-Fluoruracil

transferase-Inhibitor Decitabin (= 5-Aza-2'-deoxycytidin), Liganden nukleärer Rezeptoren (z.B. Tretinoin und Calcitriol), der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, der monoklonale Antikörper gegen HER2/neu, Trastuzumab, der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, Flavopiridol, der Todesrezeptor-Ligand TRAIL, der HSP90-Antagonist 17-AAG und der Proteasominhibitor Bortezomib (Drummond et al. 2005, Dowdy et al. 2006, Glaser 2007).

Dennoch wurde auch immer wieder von antagonistischen Wirkungen solcher Kombinationen in bestimmten Zellsystemen berichtet. So wurden abhängig von den Behandlungssequenzen die zytotoxischen Effekte der Chemotherapeutika Doxorubicin, Epirubicin, Etoposid, Camptothecin, Paclitaxel, Vincristin, Vinblastin, Methotrexat, Cytarabin und Gemcitabin durch begleitende Gabe eines HDACi vermindert (Frommel et al. 1993, Marchion et al. 2004, Bevins und Zimmer 2005, Tabe et al. 2006, de Ruijter et al. 2006, Kano et al. 2007, Kim et al. 2008b, Shiozawa et al. 2009). Als Ursachen für diese antagonistischen Wirkungen wurden folgende von HDACi ausgelösten Effekte angesehen: Zellzyklusarrest, Differenzierung, veränderte Expression von Zielproteinen der kombinierten Chemotherapeutika und Induktion von P-Glykoprotein (Tabe et al. 2006, de Ruijter et al. 2006, Kano et al. 2007). Letzteres wurde bereits als Folge von Behandlungen mit den HDACi Natriumbutyrat, Valproinsäure, Trichostatin A, Apicidin und Romidepsin (FK228) beobachtet (Eyal et al. 2006, Robey et al. 2006, Tabe et al. 2006, Kim et al. 2008b). Sogar in normalen und malignen peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut von Patienten, die mit Romidepsin behandelt wurden, konnte eine verstärkte Expression von funktionellem Pgp nachgewiesen werden (Robey et al. 2006). Zudem war Romidepsin in der Lage, einen weiteren ABC-Transporter, ABCG2, in Krebszelllinien zu induzieren (Robey et al. 2006).

Da sich jedoch bisherige Untersuchungen überwiegend mit den vielversprechenden, synergistischen Interaktionen von HDACi mit anderen Chemotherapeutika beschäftigten, ist die Datenmenge zu den unerwünschten, antagonistischen Kombinationen mit HDACi begrenzt. Insbesondere die Auswirkungen einer HDACi-Behandlung auf die Genexpression von ABC-Transportern in malignen Zellen und die Chemosensibilität dieser Zellen ist bislang unzureichend erforscht.

1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von HDACi auf die Expression von Chemosensistenz-assoziierten ABC-Transportergenen und die Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber Chemotherapeutika zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Additiva

Bromphenolblau	<i>Fluka</i> (Buchs, Schweiz)
BSA	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
destilliertes Wasser	<i>Delta Pharma GmbH</i> (Pfullingen, Deutschland)
DMEM mit Phenolrot	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
FBS	<i>PAA Laboratories GmbH</i> (Pasching, Deutschland)
Glycerin	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
L-Glutamin	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

Natrium-Pyruvat	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10.000 µg/ml)	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
PBS	<i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland)
RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan (Tris)	<i>OMNI Life Science</i> (Bremen, Deutschland)
Trypsin, 2,5% (10x)	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

2.1.2 Zelllinien

CMK (humane akute megakaryo- zytäre Leukämie-Zelllinie)	<i>DSMZ</i> (Braunschweig, Deutschland)
K-562 (humane Zelllinie etabliert aus einem malignen Pleuraerguss einer CML in der Blastenkrise)	<i>DSMZ</i> (Braunschweig, Deutschland)
KB-3-1 (humane Zervixkarzinom- Zelllinie)	Von <i>Dr. Michael M. Gottesman, Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, NIH, Bethesda (Maryland, USA)</i> zur Verfügung gestellt

KB-8-5 (mit 10 ng/ml Colchicin selektierte KB-3-1 Zelllinie)	Von <i>Dr. Michael M. Gottesman, Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, NIH, Bethesda (Maryland, USA)</i> zur Verfügung gestellt
KG-1a (humane akute myeloische Leukämie-Zelllinie)	DSMZ (Braunschweig, Deutschland)

2.1.3 Puffer

PBS/BSA-Puffer

50ml PBS

5ml BSA

auf 500ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt

50x TAE-Puffer

121g Tris

28,5ml Essigsäure

25ml EDTA (1M)

auf 500ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt

6x Gel Ladepuffer

30% Glycerin

0,05% Bromphenolblau

in RNase und DNase freiem Wasser

2.1.4 Gele

1% Agarose-Gel

1,7g Agarose NEE0 (von *Roth*, Karlsruhe, Deutschland)

in 200ml 1x TAE Puffer aufgekocht, danach

3,5µl der Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) (von *Roth*, Karlsruhe, Deutschland)
hinzugegeben

2.1.5 Reagenzien und Markierungssubstrate

RNA-Isolierung

Absolutely RNA [®] Miniprep Kit	<i>Stratagene</i> (La Jolla, CA, USA)
SmartSpec Plus Spektrophotometer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> (München, Deutschland)

cDNA-Synthese

SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
--	---

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

AmpliTaq DNA Polymerase mit 10x PCR-Puffer (enthält 15mM MgCl ₂)	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, CA, USA)
10mM dNTP Mix mit dTTP	<i>Applied Biosystems</i> (Foster City, CA, USA)
UltraPure RNase, DNase free water	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)

100bp-Marker-Mix für Gelelektrophorese

50µg	100bp DNA Ladder (von <i>Invitrogen</i> , Karlsruhe, Deutschland)
166µl	6x Gel Ladepuffer
733µl	RNase und DNase freies Wasser

Akkumulations-Assay

DMEM ohne Phenolrot	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
BODIPY [®] FL Paclitaxel	<i>Molecular Probes</i> (Eugene, USA)

Rhodamin 123	<i>Calbiochem/Merck Biosciences</i> (Darmstadt, Deutschland)
Cyclosporin A	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Verapamil	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

Trypanblau-Färbung

0,4%-ige Trypanblau-Lösung	<i>Gibco/Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)
----------------------------	--

MTS-Assay

MTS/PMS-Lösung	<i>Promega</i> (Mannheim, Deutschland)
----------------	--

Annexin V Assay

Annexinpuffer	<i>BD Pharmingen</i> (Heidelberg, Deutschland)
Annexin V-FITC	<i>CALTAG Laboratories</i> (Hamburg, Deutschland)
50g/ml Propidiumjodid	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

TUNEL

APO-Direct Kit™	<i>BD Biosciences</i> (Heidelberg, Deutschland)
-----------------	--

Färbelösung setzte sich pro Testansatz aus folgenden Substanzen zusammen:

- 10µl Reaction Buffer
- 0,75µl TdT Enzym
- 8µl FITC-dUTP
- 32µl destilliertes Wasser

$\Delta\Psi_m$ -Assay (Messung des mitochondrialen Membranpotentials)

DiOC ₆ (3)	<i>Molecular Probes</i> (Eugene, USA)
50µg/ml Propidiumjodid	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

Zellzyklus-Analyse

Propidiumjodid-Färbelösung wurde aus folgenden Substanzen zusammengesetzt:

5ml PBS (1x)

5ml RNase (Konzentration: 200µg/ml)

10µl Propidiumjodid (Konzentration: 5mg/ml)

2.1.6 Zytostatika und Histondeacetylase-Inhibitoren

Natrium 4-Phenylbutyrat	<i>Alexis Biochemicals</i> (Grünberg, Deutschland)
2',3'-Dideoxycytidin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
5-Fluoruracil	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Colchicin	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Cytosinarabinosid	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Daunorubicin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

Doxorubicin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Etoposid	<i>Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KgaA</i> (München, Deutschland)
Gemcitabin	<i>Eli Lilly Regional Operations Ges.m.b.H</i> (Wien, Österreich)
Mitoxantron	<i>Baxter Oncology GmbH</i> (Halle/Westfalen, Deutschland)
Paclitaxel	<i>Molecular Probes</i> (Eugene, USA)
Topotecan	<i>GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG</i> (München, Deutschland)
Valproinsäure	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)
Vinblastin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)

2.1.7 Geräte

Brutschrank	<i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Cryostorage System	<i>tec-lab</i> (Königstein, Deutschland)
Eppendorf-Pipetten	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)

Durchflusszytometer EPICS XL	<i>Beckman Coulter</i> (Krefeld, Deutschland)
Gefrierfach	
• -20°C	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, Deutschland)
• -86°C VIP™ SERIES	<i>SANYO</i> (München, Deutschland)
Gelelektrophorese System Horizon® 11.14	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Kühlschrank	<i>Liebherr</i> (Ochsenhausen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	<i>Zeiss</i> (Jena, Deutschland)
Molecular Imager Gel Doc XR System	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> (München, Deutschland)
MyCycler Personal Thermal Cycler	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> (München, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	<i>Paul Marienfeld GmbH & Co. KG</i> (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipetboy	<i>INTEGRA BIOSCIENCE</i> (Fernwald, Deutschland)
Power Pack P2	<i>Biometra</i> (Göttingen, Deutschland)
Sterilbank	<i>HERAEUS</i> (Hanau, Deutschland)

ELx800 Universal Microplate Reader (Software: kc junior)	<i>BioTek</i> (Bad Friedrichshall, Deutschland)
Vortex REAX top	<i>Heidolph</i> (Schwabach, Deutschland)
Waagen	
• Analysewaage (Modell Kern 770)	<i>Kern & Sohn GmbH</i> (Balingen-Frommern, Deutschland)
• Präzisionswaage (Modell Kern PLJ 2100-LM)	<i>Kern & Sohn GmbH</i> (Balingen-Frommern, Deutschland)
Wasserbad Typ 1003	<i>Gesellschaft für Labortechnik GmbH</i> (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen	
• Centrifuge 5415 D	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
• Megafuge	<i>HERAEUS</i> (Hanau, Deutschland)

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Aqua DeltaSelect	<i>DeltaSelect GmbH</i> (Dreieich, Deutschland)
Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Probenröhrchen	<i>Becton-Dickinson</i> (Heidelberg, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen (50ml)	<i>Becton-Dickinson</i> (Heidelberg, Deutschland)
Serologische Pipetten	<i>Falcon</i> (Heidelberg, Deutschland)
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)
6-Well-Platten	} <i>Nunc GmbH & Co. KG</i> (Wiesbaden, Deutschland)
12-Well-Platten	
96-Well-Platten	
Gewebekulturflaschen	<i>Greiner</i> (Frickenhausen, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen

Die Zelllinien CMK, K-562 und KG-1a wurden in RPMI 1640 Medium mit 10%-igem Anteil an FBS gehalten. KB-3-1 und KB-8-5 Zellen wurden in DMEM kultiviert, versetzt mit 10% FBS und 1 mM Natrium-Pyruvat.

Allen Medien wurden 2 mM L-Glutamin und 1 % der Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt. Die Inkubationstemperatur lag bei 37°C, der CO₂-Anteil bei 5%; die Luftfeuchtigkeit betrug 100%.

2.2.2 Semiquantitative Reverse Transcriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Die Vorbereitung der Zellen und die Isolierung von RNA erfolgten unter Verwendung des Absolutely RNA[®] Miniprep Kit (*Stratagene*) nach Angaben des Herstellers. Zur Vorbereitung der Zellen auf die RNA-Isolierung wurde jeweils eine Zellsuspension mit ca. 1×10^6 Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 5 Minuten lang bei 1.400 rpm zentrifugiert und die Zellen nach Verwerfen des Überstandes in der Restflüssigkeit resuspendiert sowie in ein Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einer Mikrozentrifuge wiederum 5 Minuten

bei ca. 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand mittels Eppendorf-Pipette komplett entfernt und das Zellpellet in einer Mischung aus 350µl Lysepuffer und 2,5µl β-Mercaptoethanol gelöst. Bis zur RNA-Isolierung wurde dieses Gemisch bei -80°C aufbewahrt.

Zur RNA-Isolierung wurde jeweils das gesamte Zelllysate in ein mit einem Filter versehenes und in einem Auffanggefäß platziertes Reaktionsgefäß gegeben und bei 13.000 rpm in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Gefäß wurde verworfen, das Filtrat mit 350µl 70%-igem Ethanol versetzt, ca. 5 Sekunden lang gemischt, in ein mit einer RNA-bindenden Fasermatrix ausgestattetes Reaktionsgefäß, das ebenfalls von einem Auffanggefäß umgeben ist, transferiert und 60 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Filtrat entfernt, das Reaktionsgefäß mit 600µl Niedrig-Salz-Puffer gewaschen und wiederum 60 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dem Verwerfen des Filtrats und einer nochmaligen 2-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm folgte die Zugabe der DNase-Lösung, die zuvor durch vorsichtiges Vermengen von 50µl DNase-haltigem Puffer mit 5µl RNase-freier DNase I hergestellt worden war, direkt auf die Fasermatrix. Dieser Ansatz wurde 15 Minuten lang bei 37°C in CO₂-freier Atmosphäre inkubiert und im Anschluß daran 3 mal gewaschen: zuerst mit 600µl Hoch-Salz-Puffer, dann mit 600µl und 300µl Niedrig-Salz-Puffer. Dem letzten Waschschritt folgte zum Trocknen der Fasermatrix eine Zentrifugation für die Dauer von 2 Minuten bei 13.000 rpm. Das Auffanggefäß wurde verworfen, das Reaktionsgefäß (inklusive der Fasermatrix) in ein größeres Reaktionsgefäß (1,5ml) transferiert. Nach Zugabe von 50µl Elutionspuffer auf die Fasermatrix wurde der Ansatz 2 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin 1 Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die eluierte RNA wurde bis zur cDNA-Synthese bei -80°C gelagert.

Nach spektrophotometrischer Quantifizierung der isolierten RNA (Messung der optischen Dichte bei 250nm) wurden für die cDNA-Synthese ca. 50ng dieser RNA, 1µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Konzentration 500µg/ml) und 1µl dNTP Mix (Konzentration 10mM) in ein PCR-Tube auf Eis pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde dann 5 Minuten lang auf 65°C erhitzt und nachfolgend für die Dauer von 1 Minute auf Eis gestellt. Nun wurden 2µl 10x First-Strand-Puffer, 4µl MgCl₂ (Konzentration 25mM), 2µl DTT (Konzentration 0,1M) und 1µl RNaseOUTTM (Konzentration 40 U/ml) zugegeben, mit Hilfe einer Pipette vorsichtig gemischt und danach kurz zentrifugiert. Es folgten eine 2-minütige Inkubation bei 42°C und die Zugabe von 1µl SuperScript II RT (Konzentration 200 U/ml), die behutsam mit dem restlichen Inhalt vermischt wurde. Nach weiteren 50 Minuten bei 42°C und einer anschließenden Erhitzung auf 70°C für die Dauer von 15 Minuten wurden die Ansätze mit der

jetzt enthaltenen cDNA entweder sofort für eine PCR eingesetzt oder davor bei -20°C gelagert.

Für die Durchführung der PCR wurden jeweils $2\mu\text{l}$ 10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl_2), $3,2\mu\text{l}$ dNTP Mix mit dTTP (Konzentration 10mM), je $0,4\mu\text{l}$ Primer 1 und Primer 2 (Konzentration der Primer $20\mu\text{M}$), $0,4\mu\text{l}$ AmpliTaq DNA Polymerase, $3,6\mu\text{l}$ RNase- und DNase-freies Wasser und $10\mu\text{l}$ des cDNA-Ansatzes in ein PCR-Tube zusammengefügt und anschließend im Cycler amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Tabelle 4 enthält die Anzahl, Tabelle 5 den Ablauf der Amplifizierungszyklen.

Tabelle 3: Sequenzen der eingesetzten Primer

Gen	Primersequenz
β -Aktin	for 5'-ATG TTT GAG ATC TTC AAC AC-3' rev 5'-CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG-3'
ABCB1	for 5'-TTC AAA CTT GTC ACA ATG CAG ACA GCA GGA-3' rev 5'-GGT TGC AGG CCT CCA TTT ATA ATG GCA CAA-3'
ABCG2	for 5'-AGA TGG GTT TCC AAG CGT TCA T-3' rev 5'-CCA GTC CCA GTA CGA CTG TGA CA-3'
ABCC1	for 5'-TAC CTC CTG TGG CTG AAT CTG G-3' rev 5'-CCG ATT GTC TTT GCT CTT CAT G-3'
ABCC3	for 5'-ATC AGA CAG AGA TTC GAG AGA AGG-3' rev 5'-CTC AGC TGT CTC ATA AAC TGC TTC-3'
ABCC4	for 5'-CCA TTG AAG ATC TTC CTG G-3' rev 5'-GGT GTT CAA TCT GTG TGC-3'
ABCC5	for 5'-GAG AAT GGG GAT AAC TTC TCA GTG-3' rev 5'-TCT CCC TAA AAG TGA AAC ACA CAA-3'
ABCC6	for 5'-CGA GAG GAA AAA GGG AGT TCA GT-3' rev 5'-TCC TCA TCC ACT CCT TTT CAA GC-3'
ABCC10	for 5'-CTG AAC TCA GAC CGG GTG C-3' rev 5'-GGG ACC TCC GAG TGA G-3'
ABCC11	for 5'-TAC AGA TGT GGT GGA AAA CGG TGG-3' rev 5'-CTC CAT GAA GTC TCC ACA TCT CCT-3'
Cytidineaminase	for 5'-GGA GGC CAA GAA GTC AG-3' rev 5'-GAC GGC CTT CTG GAT AG-3'
Pyrimidin-Nukleotidase I	for 5'-AAT CGG CGA TGT ACT AGA G-3' rev 5'-CAT CTG CCA TTC TTA AGT CTC-3'
Deoxycytidin-Kinase	for 5'-ATG GCC ACC CCG CCC AAG-3' rev 5'-TCA CAA AGT ACT CAA AAA CTC-3'
Deoxycytidylat-Deaminase	for 5'-AAT GGG TGC AGT GAT GAC-3' rev 5'-CTT AGC GCA TTC ATT ACA AG-3'
Human equilibrative nucleoside transporter 1	for 5'-GCT GGG TCT GAC CGT TGT AT-3' rev 5'-CTG TAC AGG GTG CAT GAT GG-3'

Tabelle 4: Anzahl der Amplifizierungszyklen

Gen	Anzahl an Zyklen
β-Aktin	24
ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC3-6, ABCC10-11	35
Cytidineaminase	35
Pyrimidin-Nukleotidase I	28
Deoxycytidin-Kinase	28
Deoxycytidylat-Deaminase	26
Human equilibrative nucleoside transporter 1	28

Tabelle 5: Ablauf der Amplifizierungszyklen

Initiale Denaturierung	96°C: 2 Minuten 92°C: 4 Minuten
Je Zyklus:	
Denaturierung	94°C: 1 Minute
Annealing	56°C: 1 Minute
Elongation	72°C: 2 Minuten
Terminale Elongation	72°C: 8 Minuten

2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Länge und zur visuellen Abschätzung der einzelnen DNA-Mengen wurde eine horizontale Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung durchgeführt.

Das 1%-ige Agarose-Gel (s. Material) wurde, nach Aufkochen und anschließendem Abkühlen auf 50°C, in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel mit einer 2-3mm großen Schicht 1xTAE Laufpuffer überzogen. Den 20µl Gesamtvolumen des PCR-Produktes wurden noch 4µl 6-fach Ladepuffer mit Bromphenolblau beigefügt und 10µl dieses Gemisches, sowie 10µl des 100bp-Marker-Mix in die Geltaschen gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 30 Minuten bei konstanter elektrischer Spannung von 100V. Analyse und Dokumentation der unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden erfolgte an dem Molecular Imager Gel Doc XR System (*Bio-Rad Laboratories GmbH*).

2.2.4 Akkumulations-Assay

Um die Transportfunktion von Zellen zu bestimmen, wurden Akkumulations-Assays durchgeführt. Dabei wird der intrazelluläre Gehalt an fluoreszierenden Substanzen gemessen. Dieser wird durch die Aktivität von Transportern, welche die fluoreszierenden Verbindungen aus der Zelle pumpen, vermindert. Die Spezifität für das Transport-Protein wurde durch Zugabe von Inhibitoren in Parallelansätzen überprüft.

Als fluoreszierende Substrate wurden Rhodamin 123 und BODIPY[®] FL Paclitaxel, als Inhibitoren Verapamil und Cyclosporin A verwendet. Für den Akkumulations-Assay wurden jeweils 250.000 Zellen in ein Probenröhrchen überführt und 4ml der Substratlösung hinzugefügt. Die Substratlösung bestand aus Rhodamin 123 oder BODIPY[®] FL Paclitaxel, DMEM ohne Phenolrot, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 1 % der Penicillin/Streptomycin-Lösung. Zusätzlich wurde zu jeder Probe ein Parallelansatz mit Zugabe eines Inhibitors mitgeführt. Die Zellen wurden in ihren Lösungen lichtgeschützt bei 37°C im Wasserbad für die in den Abbildungen angegebenen Zeiträume inkubiert, dann 3 Minuten bei 1.500 Upm zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 300 µl verworfen. Bis zur anschließenden Messung wurden die Probenröhrchen auf Eis gelegt. Es folgte die Bestimmung der Zell-Fluoreszenz bei 520nm (FL1-Detektor) am Durchflusszytometer, wobei ca. 10.000 Zellen je Probe gemessen wurden.

2.2.5 Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$)

Der Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆(3) ist ein membranpermeables Molekül, das sich aufgrund seiner positiven Ladung nur in Mitochondrien viabler Zellen mit vorhandenem Transmembranpotential anreichert (Bedner et al. 1999).

Für den Ansatz zur Messung von $\Delta\Psi_m$ wurden jeweils 500.000 Zellen in 0,5ml Medium in ein Probenröhrchen überführt, und 4µl der DiOC₆(3)-Arbeitslösung (Konzentration: 5,7µg/ml) hinzugegeben, um eine Farbstoffkonzentration von ca. 45ng/ml zu erhalten. Nach kräftigem Mischen wurden die Ansätze für 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C im Wasserbad inkubiert, danach 5 Minuten bei 1.400 Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Daraufhin wurde den Zellen jeweils 0,5ml PBS/BSA-Puffer und 10µl der PI-Arbeitslösung (Konzentration: 50µg/ml) zugegeben, das Gemisch nochmals kräftig gemixt und für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach nochmaligem Mischen wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 520nm (FL1-Detektor) am Durchflusszytometer bestimmt. Zur Auswertung wurden aufgrund der besseren Abgrenzbarkeit der Peaks nur diejenigen Zellen herangezogen, deren Zellmembran impermeabel für Propidiumjodid war.

2.2.6 Annexin V Assay

Das mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC konjugierte Protein Annexin V bindet hochaffin an Phosphatidylserin, das apoptotische Zellen auf ihrer Zellmembranaussenseite exponieren (Bedner et al. 1999).

Für die Annexin V-Färbung wurden jeweils 500.000 Zellen in ein Probenröhrchen überführt, 5 Minuten lang bei 1.400 Upm abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes mit PBS resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Zellen für die Dauer von 5 Minuten bei 1.400 Upm. Anschließend wurde der Überstand wiederum abgekippt und den Zellen 500µl Annexinpuffer, 5µl Annexin V-FITC – Lösung des Herstellers sowie 10µl PI-Arbeitslösung (Konzentration 50µg/ml) zugegeben. Nach kräftigem Mischen wurden die Ansätze für 15 Minuten bei einer Temperatur von 4°C im Kühlschrank inkubiert, nochmals gemixt und sodann am Durchflusszytometer gemessen. Auch in diesem Test wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 520nm mit dem FL1-Detektor bestimmt. Zur Auswertung wurden alle Zellen unabhängig von ihrer Propidiumjodid-Aufnahme herangezogen.

2.2.7 TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling)

Bei diesem Test werden DNA-Fragmente mit Hilfe des Enzyms „terminale Desoxyribonucleotidyltransferase“, welches das FITC-konjugierte dUTP an 3'-OH-Enden der DNA hinzufügt, angefärbt (Darzynkiewicz et al. 1997).

Zum TUNEL-Assay wurden jeweils ca. 1×10^6 Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt, 5 Minuten lang bei 1.400 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 500µl PBS resuspendiert. Dazu wurden 5ml 1%-ige Paraformaldehyd-Lösung gegeben und der Ansatz 15 Minuten lang auf Eis belassen. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit je 5ml PBS abermals in 500µl PBS resuspendiert, mit 5ml eisgekühltem 70%-igem Ethanol fixiert und entweder für mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt oder – wenn die Färbung nicht mehr am gleichen Tag stattfand – bei -20°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes zweimal mit 1ml Wasch-Puffer A gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 50µl Färbelösung resuspendiert und mindestens 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Zellsuspension 1ml Wasch-Puffer B beigegeben, der sich daraus ergebende Ansatz 5 Minuten lang bei 1.400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen nochmals mit 1ml Wasch-Puffer B gewaschen und zentrifugiert. Nach Resuspendierung der Zellen in 500µl PI/RNase-Lösung folgte die abschließende 30-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur, bevor die Fluoreszenz

der Zellen bei 520nm (FL1-Detektor) durchflusszytometrisch bestimmt wurde. Zur Auswertung wurden nur diejenigen Zellen herangezogen, die sich im Zellzyklus befanden (Ausschluss des Zelldetritus).

2.2.8 Trypanblau-Färbung

Der kationische Farbstoff Trypanblau dringt in sterbende bzw. tote Zellen ein, deren Plasmamembran beschädigt ist, nicht jedoch in viable Zellen mit intakter Plasmamembran (Darzynkiewicz et al. 1997).

Zur Trypanblau-Färbung wurden nach kräftigem Mischen jeweils ca. 0,5ml Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen in Reaktionsgefäße überführt, 50µl hieraus in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert, dort mit 50µl der 0,4%-igen Trypanblau-Lösung versetzt und gründlich durchgemengt. Das Gemisch wurde anschließend in eine Neubauer Zählkammer eingebracht und die Anzahl lebender, d.h. ungefärbter Zellen unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt und die Zahl viabler Zellen pro Milliliter Zellsuspension errechnet.

2.2.9 MTS-Assay

Der MTS-Assay beruht auf der Reduktion eines farblosen Tetrazolium-Salzes durch die Dehydrogenase-Aktivität viabler Zellen zum intensiv gefärbten Formazan, das bei 490nm photometrisch bestimmt werden kann (Leverone et al. 1996, Goodwin et al. 1995).

Zur Messung der Zellviabilität mittels MTS-Assay wurden jeweils 75µl Zellsuspension, die 25.000 Zellen und PBA beinhaltet, in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Nach der Inkubation dieses Ansatzes für einen Tag bei einer Temperatur von 37°C wurden die in den Abbildungen angegebenen Zytostatika und – um die Konzentration aufrechtzuerhalten – PBA mit einem Volumen von 50µl hinzugefügt. In diesem PBA-Zytostatika-Gemisch wurden die Zellen weitere 3 Tage bei einer Temperatur von 37°C inkubiert und anschließend 25µl der MTS/PMS-Lösung in jedes Well gegeben. Die Messung der optischen Dichte bei 490nm folgte 1 bis 4 Stunden später am ELISA Reader (ELx800 Universal Microplate Reader von *BioTek*).

2.2.10 Zellzyklus-Analyse

Um den zellulären DNA-Gehalt, anhand dessen die Zellzyklusverteilung ermittelt werden kann, zu erfassen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Färbung der Zellen mit

dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid durchgeführt. Dazu wurden ca. 300.000 Zellen pro Ansatz in ein Probenröhrchen überführt, 5 Minuten bei 1.400 Upm zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei gleichen Bedingungen und Verwerfen des Überstandes, wurde unter ständigem Mischen 1ml eisgekühlten, 70%-igen Ethanol langsam zugegeben, um die Zellen zu permeabilisieren. Nachdem die Ansätze mindestens 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C oder bis zu eine Woche bei -20°C aufbewahrt wurden, wurden sie erneut 5 Minuten lang bei 1.400 Upm zentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 100µl verworfen, 500µl der Propidiumjodid-Färbelösung hinzugefügt und alles gut gemischt. Es folgte eine mindestens 30-minütige Inkubation der Zellen in dieser Lösung unter Lichtschutz und – nach nochmaligem kräftigem Vermischen – die durchflusszytometrische Bestimmung der Zellfluoreszenz bei 580nm (FL2-Detektor) noch am gleichen Tag. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm ModFitLT™ 3.0 der Firma *Verity Software House* (Topsham, USA).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) in Leukämiezellen die Expression verschiedener Chemoresistenz-assoziiierter ABC-Transporter auf mRNA-Ebene beeinflussen und die Akkumulationseigenschaften dieser Zellen modifizieren. Nachfolgende Experimente analysierten die Auswirkung einer HDACi-Behandlung auf die Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber Zytostatika. Abschließend wurde geprüft, ob HDACi auch die Expression von Resistenzgenen, die nicht der Familie der ABC-Transporter-Gene angehören, beeinflussen können.

3.1 PBA induziert die mRNA Expression Chemoresistenz-assoziiierter ABC-Transporter

Um den Einfluss einer Behandlung von Leukämiezellen mit dem HDACi PBA auf die Genexpression von Chemoresistenz-assoziierten ABC-Transportern zu erfassen, wurden die Zellen der Linien CMK und KG-1a für 4 Tage mit PBA inkubiert und nach 1 bzw. 4 Tagen mittels semiquantitativer PCR auf Veränderungen der mRNA-Menge folgender ABC-Transportergene untersucht: MDR1, ABCG2, MRP1, MRP3, MRP4, MRP5, MRP6, MRP7 und MRP8 (s. Abb. 3). Während PBA das MDR1- und MRP7-Gen bei CMK Zellen bereits nach 24 Stunden gering induzierte, war bei KG-1a Zellen keine Induktion des MDR1-Gens und eine Herabregulierung des MRP7-Gens nach 24 Stunden mit anschließender Hochregulierung dieses Gens nach 96 Stunden Inkubation mit PBA festzustellen. Die ABCG2- und MRP8-mRNAs wurden in beiden Zelllinien sowohl durch eine eintägige als auch durch eine viertägige PBA-Behandlung deutlich vermehrt, die MRP5-mRNA hingegen wurde im Laufe der Behandlung lediglich in KG-1a Zellen und dort nur marginal verstärkt exprimiert. Die Expression der restlichen untersuchten Transportergene blieb im Wesentlichen von PBA unbeeinflusst.

Zusammenfassend ergeben sich daraus folgende Effekte der PBA-Behandlung: in CMK Zellen wurden die Gene ABCG2, MRP8 und – schwächer – MDR1 und MRP7 induziert; KG-1a

Zellen exprimierten ebenfalls ABCG2 und MRP8, sowie – in geringerem Ausmaß – MRP5 verstärkt.

3.2 Transportaktivität von P-Glykoprotein wird durch Behandlung mit PBA beeinflusst

Im Folgenden wurde untersucht, ob PBA neben seinem Einfluss auf die Genexpression auch eine Veränderung der Transportfunktion der Leukämiezellen bewirkt. Eine Vermehrung der Menge an MDR1-mRNA muss nicht zwingend eine gleichsinnige Veränderung an funktionsfähigem P-Glykoprotein bedingen (Yagüe et al. 2003). Im Hinblick auf eine Resistenz gegen Chemotherapeutika ist aber die Pumpfunktion von essentieller Bedeutung. Um die Transportaktivität von P-Glykoprotein zu überprüfen, wurden Akkumulations-Assays durchgeführt (s. Material und Methoden).

Zur Bestätigung der These, dass die Akkumulation des Pgp-Substrates BODIPY[®] FL Paclitaxel mit dem Niveau an exprimiertem P-Glykoprotein korreliert, wurden die humanen Zervixkarzinom-Zelllinien KB-3-1 und KB-8-5 benutzt. KB-8-5 Zellen wurden durch Kultivierung von KB-3-1 Zellen mit 10 ng/ml Colchicin erzeugt (Akiyama et al. 1985). Dadurch wurden Zellen selektiert, die den Phänotyp einer sog. „multidrug resistance“ v.a. aufgrund eines erhöhten Levels an P-Glykoprotein in den Zellmembranen aufwiesen. Die MDR1-mRNA Expression von KB-8-5 Zellen beträgt etwa das 40-fache der parentalen Zellen (Fojo et al. 1987). Damit verbunden ist eine im Vergleich mit KB-3-1 Zellen verminderte Akkumulation von Pgp-Substraten wie Colchicin, Vinblastin oder Daunorubicin sowie eine gesteigerte Resistenz gegen diese. Durch Zusatz des Pgp-Inhibitors Verapamil sind diese Effekte zumindest teilweise reversibel (Fojo et al. 1985). Abbildung 4 zeigt die Akkumulation des Pgp-Substrates BODIPY[®] FL Paclitaxel in KB-3-1 und KB-8-5 Zellen. Wie zu erwarten, ist hier die im Vergleich zu den KB-8-5 sehr viel höhere intrazelluläre Substratanreicherung in den KB-3-1 Zellen zu sehen. Die Pgp-Inhibition mit Cyclosporin A veränderte die Akkumulation in KB-3-1 Zellen nur unwesentlich, erhöhte allerdings die Fluoreszenzstärke der KB-8-5 Zellen auf Werte, die mit denjenigen der KB-3-1 vergleichbar sind. Bei der anschließenden Überprüfung der Leukämie-Zelllinien CMK und KG-1a auf ihre Akkumulationseigenschaften zeigten die CMK-Zellen nach einer eintägigen Behandlung mit Natrium-

phenylbutyrat eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen verminderte Akkumulation der Pgp-Substrate BODIPY[®] FL Paclitaxel sowie Rhodamin 123 (s. Abb. 5, 6). Die intrazelluläre Substratanreicherung dieser Substanzen konnte sowohl mit Verapamil als auch mit Cyclosporin A, beides Inhibitoren von Pgp und anderen ABC-Transportern, in behandelten wie unbehandelten Zellen erheblich gesteigert werden.

Trotz fehlenden Nachweises einer Induktion von MDR1 durch PBA in der semiquantitativen PCR war auch bei KG-1a Zellen eine gering verminderte Akkumulation von BODIPY[®] FL Paclitaxel in den mit PBA behandelten Zellen – verglichen mit unbehandelten Zellen – festzustellen (s. Abb. 6). Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt als bei den CMK Zellen. Die Zugabe des Pgp-Inhibitors Cyclosporin A führte unabhängig von der PBA-Behandlung wiederum zu einer massiven Zunahme der Fluoreszenzwerte der Zellen.

Dies spricht dafür, dass die Transportaktivität, die in beiden Zelllinien bereits bei unbehandelten Zellen deutlich vorhanden ist, durch PBA-Behandlung weiter zunimmt.

3.3 PBA moduliert die Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika

Die vorangegangenen Ergebnisse führten zu der Fragestellung, ob die Modulation der Genexpression der ABC-Transporter durch PBA-Behandlung auch eine erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika nach sich zieht. Um dem nachzugehen, wurde der Einfluss von PBA auf das Apoptoseverhalten von Zellen der Linien KG-1a und CMK untersucht. Dazu wurden drei Verfahren verwendet, die verschiedene Ereignisse zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Ablauf der Apoptose erfassen: Messung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), Annexin V-Test und TUNEL-Assay (Näheres dazu siehe Einleitung). Zusätzlich wurden mit KG-1a Zellen Trypanblau-Färbungen und MTS-Assays durchgeführt.

3.3.1 Zytotoxizität von HDACi als Monotherapie

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wirken HDACi zytotoxisch, insbesondere auf maligne Zellen. Um eine Modulation der Chemoresistenz durch Behandlung mit PBA aufzuzeigen, war es nötig, geeignete Konzentrationen an PBA zu finden, die eine vermehrte Expression der ABC-Transporter hervorrufen, aber keine hohen Apoptoseraten verursachen. Hierzu wurden

CMK und KG-1a Zellen für 1 bzw. 4 Tage mit 1 mM, 2 mM, 3 mM und 6 mM PBA behandelt und anhand des Annexin V-Tests untersucht. KG-1a Zellen reagierten weniger sensitiv auf PBA als CMK Zellen (s. Abb. 8). Während die 4-tägige Behandlung mit 3 mM PBA den Anteil Annexin V-positiver KG-1a Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle lediglich um 2 % (5 % vs. 3 %) erhöhte, zeigten CMK Zellen bei gleicher HDACi-Konzentration eine Steigerung des apoptotischen Zellanteils um 7 % (15 % vs. 8 %).

Diese Daten ermöglichten es, die optimalen PBA-Konzentrationen für Versuche zur Interaktion der Kombination von PBA und Chemotherapeutika zu bestimmen: für die Zelllinie KG-1a war dies 3 mM, für die Zelllinie CMK 2 mM. Diese Konzentrationen verursachten nach 4-tägiger Exposition nur eine geringe Vermehrung (2 %) der Annexin V-positiven Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. In weiteren Vorversuchen mit verschiedenen Behandlungsschemata, in denen PBA mit Chemotherapeutika kombiniert wurde, erwies sich folgender Ablauf der Experimente als geeignet: Behandlung der Zelllinien mit bzw. ohne PBA für einen Tag sowie den darauffolgenden Zusatz der Zytostatika an Tag 2 für weitere 2 (für die $\Delta\Psi_m$ -Messung) bzw. 3 (für Annexin V-Test und TUNEL-Assay) Tage. Abbildung 9 veranschaulicht das Behandlungsschema, mit dem gearbeitet wurde.

3.3.2 Zelllinie KG-1a

Die Ergebnisse aus den Experimenten mit der Zelllinie KG-1a sind in den Abbildungen 10-14 dargestellt. Die Behandlung mit PBA verlieh den KG-1a Zellen eine Resistenz gegen alle eingesetzten Zytostatika. Darin stimmten die drei Methoden zur Messung der Apoptose überein. Den größten Einfluss auf das Apoptoseverhalten der KG-1a Zellen übte PBA in der Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) aus: die Annexin V-positive Zellfraktion sank um 42 %, die Rate an Zellen mit zerstörtem $\Delta\Psi_m$ nahm um 63 % ab und der Anteil an TUNEL-positiven Zellen verringerte sich um 41 %. Etwas schwächer war die durch PBA-Behandlung induzierte Resistenz der Zellen gegen Etoposid, Gemcitabin und Cytosinarabinosid (Ara-C): hier kam es zu Minderungen in den Apoptoseraten um 29 - 32 % im Annexin V-Test, 19 - 30 % in der $\Delta\Psi_m$ -Messung und 16 - 32 % im TUNEL-Assay. Die Sensitivität der Zellen gegenüber Vinblastin, Colchicin, Paclitaxel, Daunorubicin, Mitoxantron und Topotecan wurde durch PBA nur moderat vermindert: es zeigte sich eine Verringerung des apoptotischen Zellanteils um 6 - 19 % im Annexin V-Test, 8 - 19 % in der $\Delta\Psi_m$ -Messung und 4 - 34 % im TUNEL-Assay. 2',3'-Dideoxycytidin (ddC) induzierte auch in höheren Dosierungen nur geringe Raten an Annexin V-positiven und $\Delta\Psi_m$ -negativen Zellen; eine Vermehrung von DNA-Strangbrüchen im TUNEL-Assay (Daten nicht gezeigt) war nicht zu erfassen. So war

eine moderate Resistenzentwicklung durch PBA-Behandlung auch nur im Annexin V- und $\Delta\Psi_m$ -Test nachzuweisen, nicht jedoch im TUNEL-Assay.

In allen oben aufgeführten Versuchen wurde eine durch PBA verursachte Hemmung der Zellproliferation beobachtet. Um festzustellen, wie hoch die absoluten Zahlen lebender Zellen am Ende der Kombinationsversuche war, wurde ein weiteres Experiment mit einem Versuchsaufbau analog zu den Vorherigen und mit 4 ausgewählten Zytostatika durchgeführt. Am Tag 3 (s. Abb. 9) wurden die Trypanblau-negativen Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Als Zytostatika wurden Etoposid, Mitoxantron, Topotecan und 5-Fluoruracil benutzt. Zunächst bestätigte sich die Beobachtung, dass PBA eine proliferationshemmende Wirkung auf KG-1a Zellen ausübt: die PBA-Behandlung verringerte die Zahl der Trypanblau-negativen Zellen um etwa die Hälfte (ca. 1.148.000 vs. 598.000 Zellen/ml). Bei den Kombinationen von PBA mit den Zytostatika Etoposid, Topotecan und 5-FU führte eine Vorbehandlung mit PBA zu einer Vermehrung der Anzahl intakter Zellen (s. Abb. 13). Entsprechend den Apoptose-Tests war hier der Effekt bei 5-FU am stärksten ausgeprägt (ca. 238.000 vs. 110.000 Zellen/ml). Die Viabilität der mit Mitoxantron behandelten Zellen konnte PBA nicht in dieser Weise beeinflussen.

Schließlich wurden mit nahezu allen in den Apoptosetests verwendeten Zytostatika und einem Versuchsaufbau analog zu dem in den Apoptosetests benutzten auch MTS-Assays durchgeführt. Eine geringe Induktion der Resistenz durch Behandlung mit PBA war jedoch lediglich gegen 5-FU und Mitoxantron und nur bei sehr hohen Konzentrationen dieser Substanzen festzustellen (s. Abb. 14).

3.3.3 Zelllinie CMK

Die 3 bereits an KG-1a Zellen angewandten Verfahren zur Messung der Apoptose wurden auch mit CMK Zellen durchgeführt (s. Abb. 15-17).

PBA war in der Lage, CMK Zellen eine Resistenz gegen Daunorubicin, Doxorubicin und Topotecan, sowie gegen 5-Fluoruracil zu verleihen. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Stärke der erworbenen Resistenz bezüglich der verwendeten Methoden. So ergaben sich beispielsweise für die Substanzen 5-FU und Topotecan folgende Mittelwerte und Standardabweichungen der in den verschiedenen Methoden gemessenen Apoptoseminderungen durch PBA: $15,67 \pm 11,55$ % (5-FU) und $17,67 \pm 8,33$ % (Topotecan).

Die Toxizität von Mitoxantron konnte PBA in CMK Zellen nicht modulieren. Darin stimmten der TUNEL-Assay und die $\Delta\Psi_m$ -Messung überein. Lediglich in dem gezeigten Annexin V-

Test war eine marginal verstärkte – und in weiteren Versuchen nicht reproduzierbare – Resistenzentwicklung durch PBA-Behandlung gegen Mitoxantron festzustellen.

Weniger eindeutige Resultate ergaben die Versuche mit den übrigen Zytostatika. So konnte eine verminderte Sensibilität der mit PBA behandelten CMK Zellen gegenüber Colchicin nur im TUNEL-Assay und in der $\Delta\Psi_m$ -Messung erfasst werden; im Annexin V-Test konnte die vergleichsweise geringe Wirkung nicht gezeigt werden. Gegen Vinblastin und Paclitaxel, sowie gegen Gemcitabin und Cytarabin konnte eine durch PBA gesteigerte Resistenz lediglich im TUNEL-Assay festgestellt werden, nicht jedoch in den beiden anderen Methoden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit Etoposid und ddC beobachtet. Allerdings waren die mit dem TUNEL-Assay erfassten Effekte bei diesen beiden Substanzen nicht eindeutig reproduzierbar.

3.3.4 Vergleich der Methoden zur Apoptosemessung

Um den Zusammenhang der Messergebnisse aus den verschiedenen Methoden zur Feststellung des Apoptoseanteils zu untersuchen, wurden die in den einzelnen Testverfahren ermittelten Werte in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und jeweils lineare Trendlinien für die Messpunkte unbehandelter und mit PBA behandelter Zellen erstellt (s. Abb. 18). Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse des $\Delta\Psi_m$ -Tests (gemessen am Tag 3 des Behandlungsschemas) und des Annexin V-Assays (gemessen am Tag 4 des Behandlungsschemas) sowohl bei KG-1a (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,87$ [ohne PBA] bzw. $0,85$ [mit PBA]) als auch bei CMK Zellen (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,62$ [ohne PBA] bzw. $0,85$ [mit PBA]) einen hohen linearen Zusammenhang aufwiesen. Zudem waren die in diesen beiden Methoden ermittelten Prozentsätze apoptotischer Zellen häufig ähnlich hoch, was die enge Verknüpfung der frühen apoptotischen Ereignisse, Verlust von $\Delta\Psi_m$ und Externalisierung von Phosphatidylserin, unterstreicht. Der lineare Zusammenhang zwischen den Messwerten des Annexin V-Tests (gemessen am Tag 4 des Behandlungsschemas) und des TUNEL-Assays (gemessen am Tag 4 des Behandlungsschemas) war dagegen in beiden Zelllinien deutlich geringer als der zwischen den Resultaten des Annexin V-Tests und der $\Delta\Psi_m$ -Messung Beobachtete (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,65$ [KG-1a Zellen ohne PBA] bzw. $0,67$ [KG-1a Zellen mit PBA]). Ausserdem befanden sich – insbesondere bei Versuchen mit KG-1a Zellen – die im TUNEL-Assay gemessenen Prozentwerte apoptotischer Zellen zumeist unterhalb der im Annexin V-Test Ermittelten. Anhand dieser Daten läßt sich die Abfolge der gemessenen Ereignisse innerhalb des Apoptoseprozesses (zunächst Verlust von $\Delta\Psi_m$ und Externalisierung von Phosphatidylserin, später DNA-Fragmentierung) nachvollziehen (s. Einleitung).

3.3.5 PBA-vermittelte Chemoresistenz ist funktionell reversibel

Um festzustellen, ob die durch PBA erzeugte Resistenz reversibel ist, wurde das in den oben genannten Experimenten angewandte Behandlungsprotokoll (s. Abb. 9) in folgender Weise erweitert: Am Tag 4 des Experiments wurden die Zellen nach Messung der Apoptose (Annexin V-Methode) mit PBS gewaschen, auf eine Konzentration von 200.000 (Trypanblau-negativen) Zellen pro Milliliter Medium eingestellt und zusammen mit den Zytostatika, denen sie bereits zuvor in gleicher Konzentration ausgesetzt waren, inkubiert. Die Zellen, die bis zum Tag 4 mit PBA behandelt wurden, wurden in 2 Gruppen aufgeteilt: zu einer Gruppe wurde am Tag 4 wieder PBA hinzugefügt, die andere erhielt keine weitere PBA-Behandlung. Es folgten weitere Annexin V-Teste an den Tagen 5, 6, 7, 8 und 9 (s. Abb. 19). Die mit 5-FU behandelten Zellen konnten aufgrund der schon bis zum Tag 8 eingetretenen hohen Apoptoseraten am Tag 9 nicht mehr gemessen werden. Der Versuch wurde mit KG-1a Zellen und den Substanzen Etoposid, Mitoxantron, Topotecan und 5-Fluoruracil durchgeführt. Vergleicht man die Apoptoseraten der Zellen, die weiterhin mit PBA behandelt wurden, mit denjenigen, denen PBA entzogen wurde, erkennt man eine mit zunehmender Dauer fortschreitende Abnahme der induzierten Resistenz gegen die Substanzen Etoposid, Topotecan und – weniger ausgeprägt – gegen Mitoxantron (aber nicht 5-FU) als Folge des PBA-Entzuges (s. Abb. 20). So blieb beispielsweise die apoptotische Zellfraktion der fortlaufend mit Topotecan und PBA behandelten Zellen in etwa konstant (Tag 4: 48%, Tag 7: 47%, Tag 9: 51%), während diese bei den Zellen ohne fortgeführte PBA-Behandlung (nur Topotecan) deutlich anstieg (Tag 4: 48%, Tag 7: 56%, Tag 9: 69%).

Diese Effekte waren bei der Kombinationsbehandlung mit 5-FU nicht zu beobachten. Hier kam es zur Minderung der induzierten Resistenz sowohl bei den durchgehend mit PBA behandelten Zellen, als auch bei denjenigen, denen PBA entzogen wurde (s. Abb. 20).

3.4 HDACi induzieren die mRNA

Expression der Cytidineaminase

Die unter 3.3.2 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass infolge der Inkubation mit PBA die Sensibilität von KG-1a Zellen u.a. auch gegenüber Cytarabin und Gemcitabin abnahm. Eine Beteiligung von MRP5 und BCRP bei der Resistenzentwicklung gegenüber Nukleosidanaloga wurde und wird zwar diskutiert, hinreichend belegt ist sie jedoch nicht (Davidson et al. 2002,

Reid et al. 2003, Oguri et al. 2006, Borst et al. 2007, de Wolf et al. 2008). Zudem wurden im Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Cytarabin bzw. Cytarabin und Gemcitabin erst kürzlich MRP8 bzw. MRP7 beschrieben (Guo et al. 2009, Hopper-Borge et al. 2009).

Darüber hinaus existieren aber noch Gene für metabolisierende Enzyme und Nucleosidtransporter, deren Assoziation mit Resistenz gegen die beiden oben genannten strukturell ähnlichen Pyrimidin-Analoga bereits nachgewiesen wurde (Galmarini et al. 2001). Um eine Modulation der Expression einiger dieser Gene unter Behandlung mit HDACi zu überprüfen, wurden KG-1a, CMK und K-562 Zellen für einen Tag mit bzw. ohne PBA oder VPA inkubiert und daraufhin die mRNA-Menge der Gene mittels semiquantitativer PCR bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Induktion des Cytidineaminase-Gens durch Exposition mit PBA in allen 3 Zelllinien, mit VPA in CMK und K-562 Zellen (s. Abb. 21). Die Expression der Gene für Pyrimidin-Nucleotidase I, Deoxycytidin-Kinase, Deoxycytidylat-Deaminase und Human equilibrative nucleoside transporter 1 blieb dagegen in allen 3 Zelllinien von den Behandlungen unbeeinflusst (s. Abb. 21).

3.5 Veränderte Zellzyklusverteilung unter PBA Behandlung

Ein in der Literatur häufig beschriebener Effekt von Histoneacetylase-Inhibitoren ist die Induktion eines Zellzyklusarrestes, vorzugsweise am G1/S-Kontrollpunkt (Carew et al. 2008). Solch ein Zellzyklusarrest kann die Toxizität Zellzyklus-spezifischer Medikamente, deren Effekte sich v.a. in der S- und/oder G2/M-Phase manifestieren (z.B. Topoisomerase-Inhibitoren) verringern (Hsu et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob auch der HDACi PBA in Leukämiezelllinien einen G1-Zellzyklusarrest, der zur PBA-induzierten Resistenz beitragen könnte, auslösen kann. Die eintägige Behandlung der KG-1a Zellen mit PBA führte zu einem schwachen Anstieg der G0/G1-Zellfraktion (von 50% auf 57%) bei gleichzeitiger geringer Abnahme des sich in der G2/M-Phase befindenden Zellanteils (von 19% auf 14%), während die S-Phasen-Zellfraktion (31% ohne bzw. 29% mit PBA) kaum beeinflusst wurde. Der von PBA hervorgerufene G0/G1-Arrest war in CMK Zellen stärker ausgeprägt (37% ohne bzw. 57% mit PBA in G0/G1-Phase), wobei hier der G2/M-Zellanteil konstant blieb (bei 23%) und die S-Phasen-Zellfraktion deutlich vermindert wurde (von 40% auf 21%) (s. Abb. 22).

3.6 Abbildungen

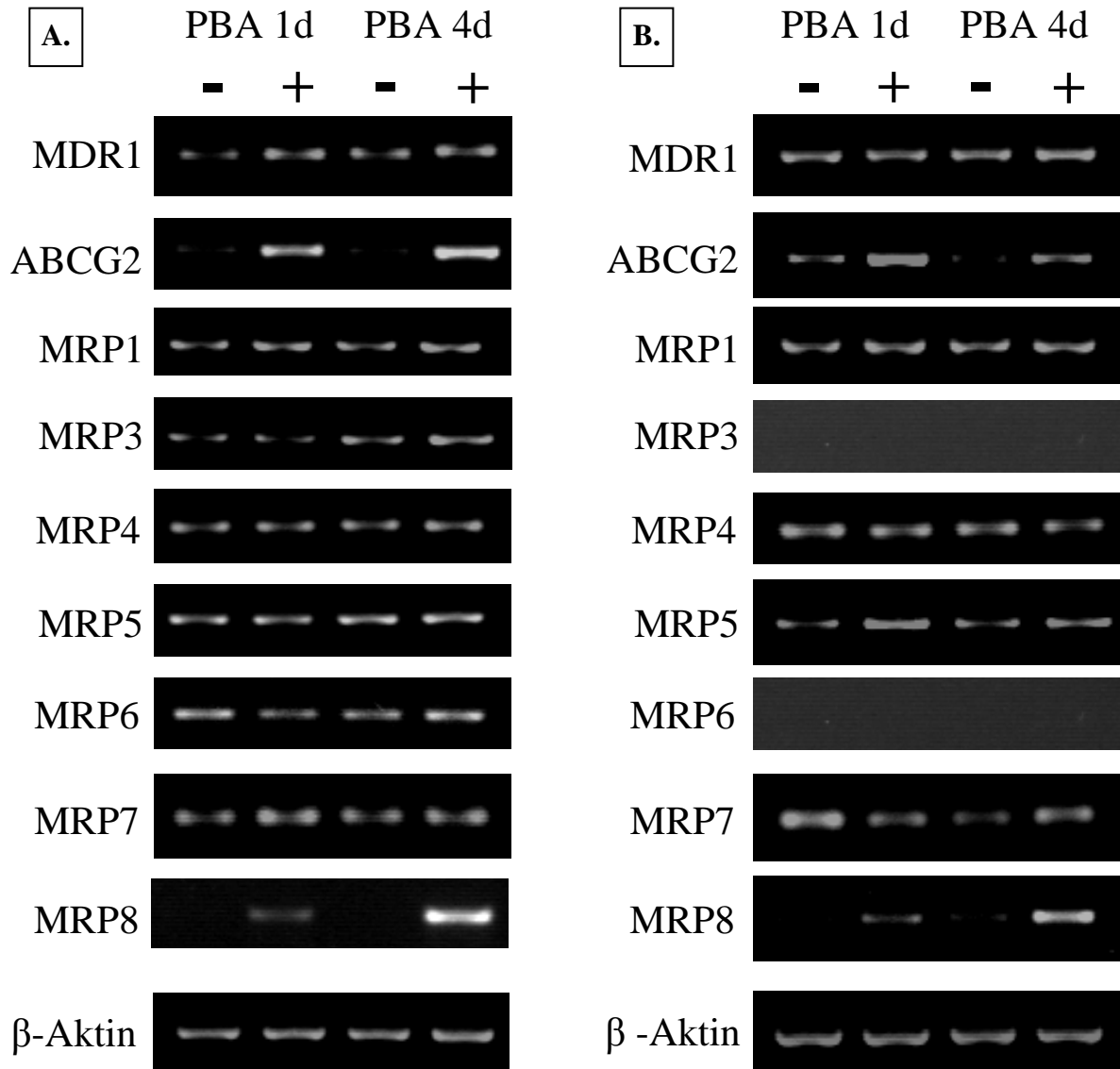


Abbildung 3: Modulation der mRNA-Expression Chemoresistenz-assoziiierter ABC-Transporter durch PBA

Die Zellen wurden mit oder ohne 3 mM PBA inkubiert. Nach 1 bzw. 4 Tagen wurden die Zellen mittels semiquantitativer PCR auf die Expression der angegebenen ABC-Transportergene hin untersucht. (A) CMK Zellen. (B) KG-1a Zellen.

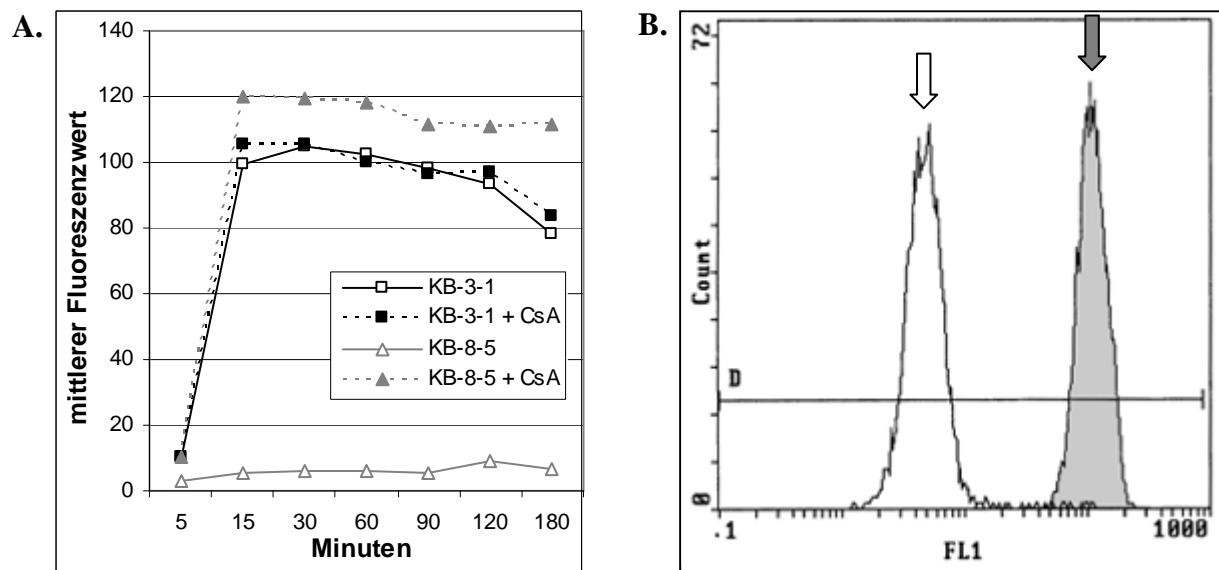


Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Akkumulation von BODIPY[®] FL Paclitaxel in KB-3-1 und KB-8-5 Zellen (A). Vergleich mit einem Rohdaten-Diagramm (B)

Die Zellen wurden für die angegebene Zeit entweder mit 10 ng/ml BODIPY[®] FL Paclitaxel alleine (durchgezogene Linien) oder zusätzlich mit 5 μ M CsA (gestrichelte Linien) inkubiert. (B) Die zwei Rohdaten-Graphen des 30 Minuten-Wertes der Zelllinie KB-8-5 wurden nachträglich übereinandergelegt. Der mittlere Fluoreszenzwert aller im Gate D befindlichen Zellen wurde für den jeweiligen Graphen ermittelt und in das Diagramm A übertragen. Der weiße Peak beinhaltet Zellen ohne CsA-Zusatz, der grau unterlegte Zellen mit CsA-Zusatz. Vgl. dazu die entsprechenden Werte der KB-8-5 in A (s. Pfeile).

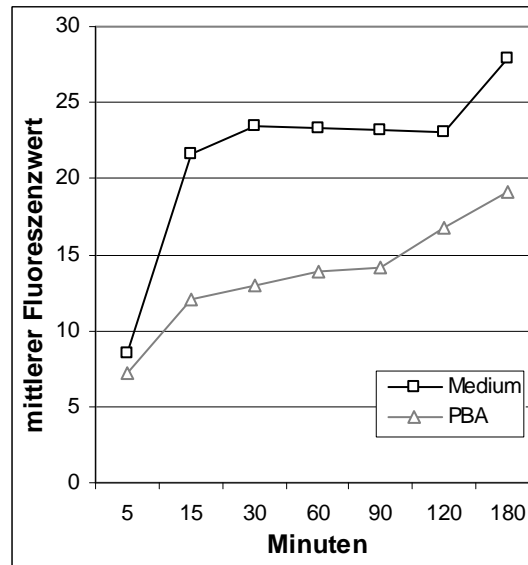


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Akkumulation von BODIPY® FL Paclitaxel in CMK Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne 3 mM PBA kultiviert. Anschließend wurden sie für die angegebene Zeit mit 30 ng/ml BODIPY® FL Paclitaxel inkubiert und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt.

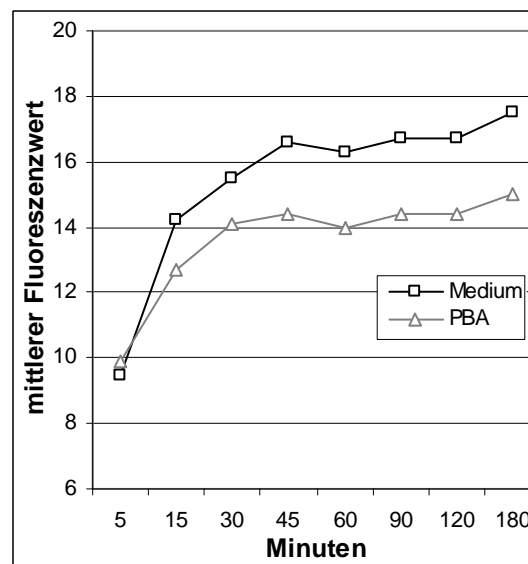


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Akkumulation von Rhodamin 123 in CMK Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne 3 mM PBA kultiviert. Anschließend wurden sie für die angegebene Zeit mit 100 ng/ml Rhodamin 123 inkubiert und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt.

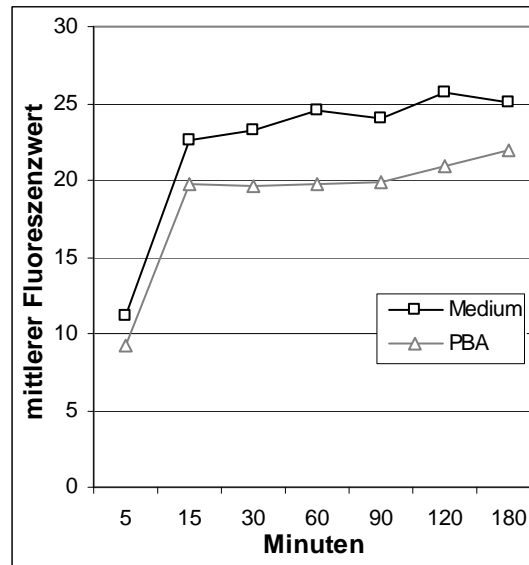


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Akkumulation von BODIPY[®] FL Paclitaxel in KG-1a Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden mit oder ohne 3 mM PBA kultiviert. Anschließend wurden sie für die angegebene Zeit mit 10 ng/ml BODIPY[®] FL Paclitaxel inkubiert und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt.

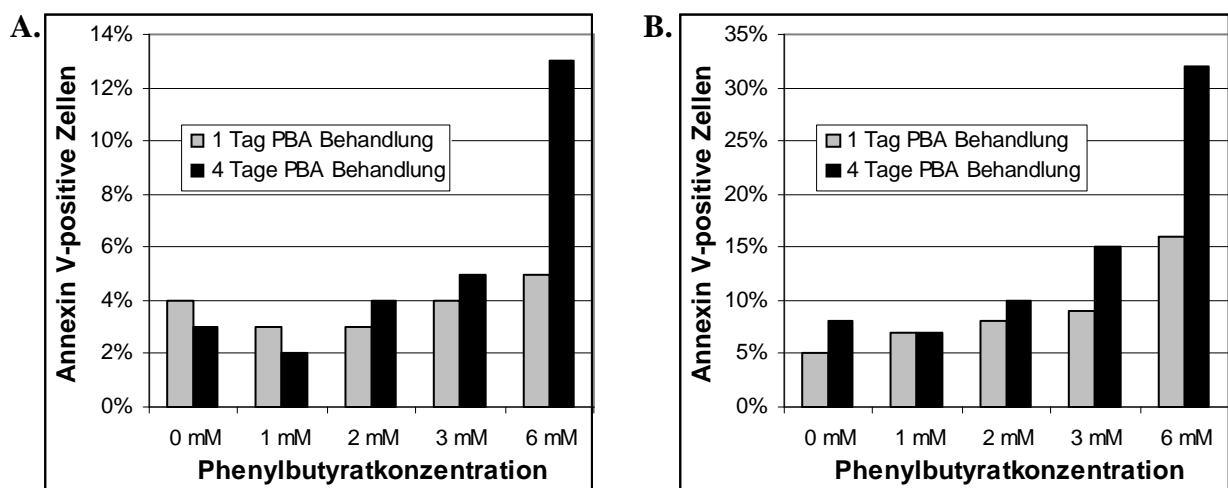


Abbildung 8: Apoptose-Induktion von PBA in KG-1a (A) und CMK (B) Zellen

Die Zellen wurden für 1 bzw. 4 Tage (graue bzw. schwarze Balken) mit den angegebenen PBA-Konzentrationen behandelt, wobei die Angabe „0mM“ unbehandelten Zellen entspricht. Danach wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt.

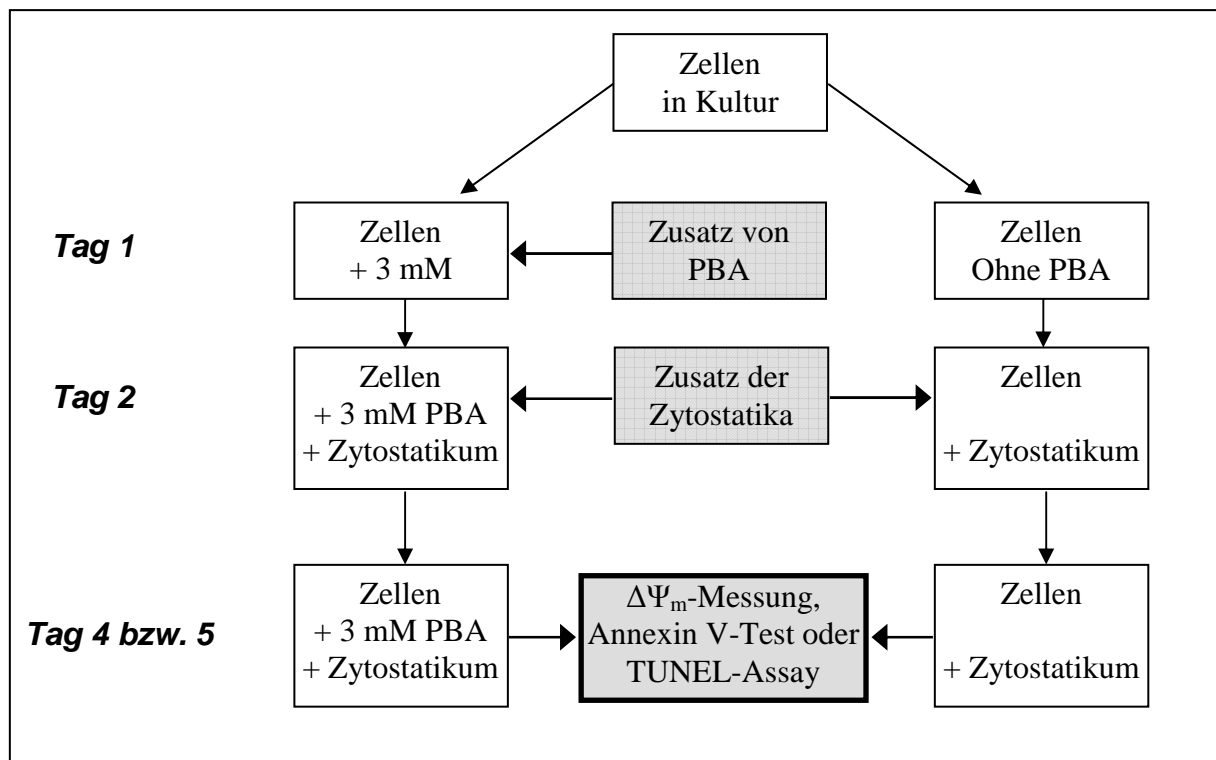
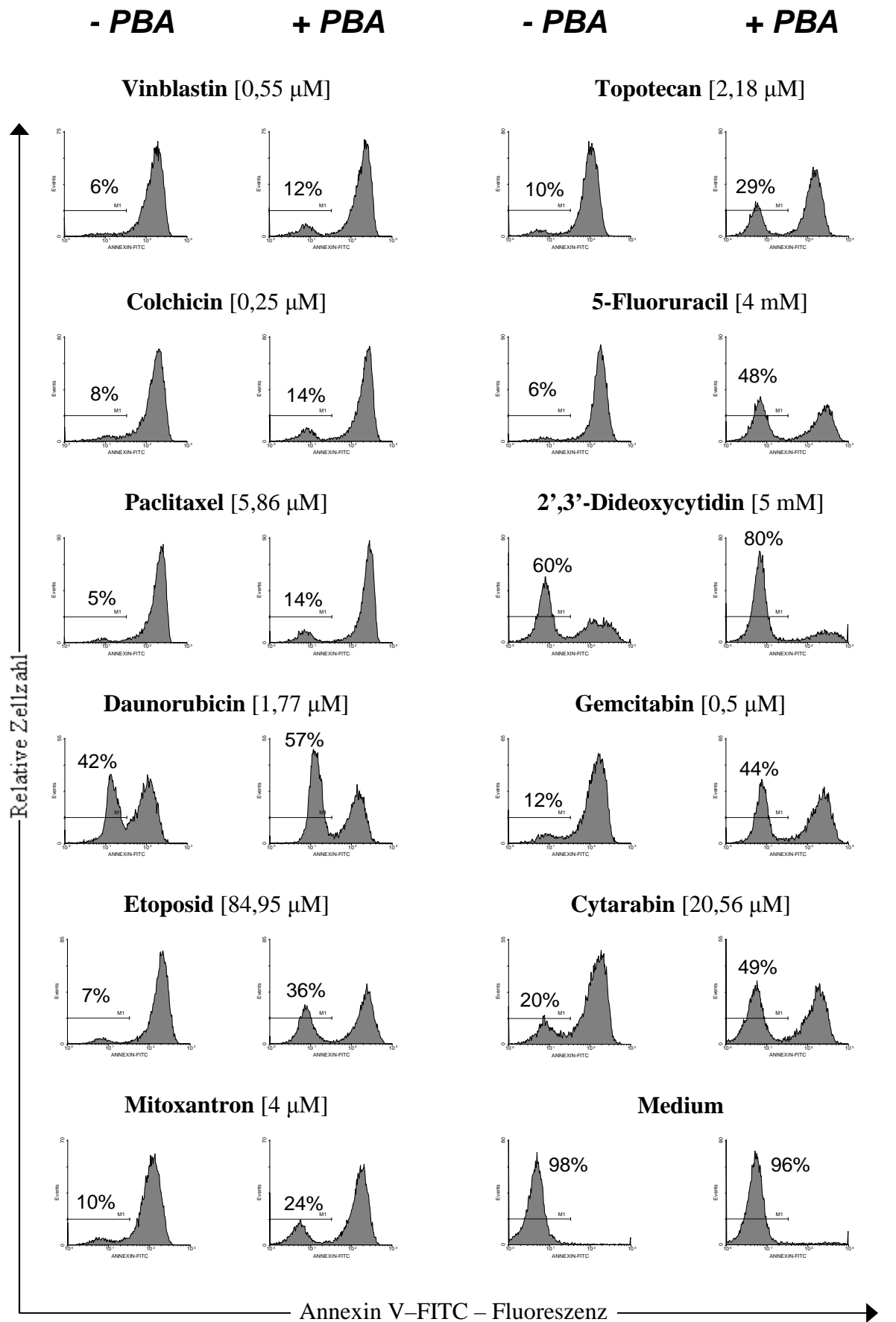


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Zellbehandlung zur Bestimmung der Chemoresistenz



Relative Zellzahl

Annexin V-FITC – Fluoreszenz

Legende auf nächster Seite ↓

Abbildung 10: Auswirkungen der Behandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von KG-1a Zellen im Annexin V-Assay

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der Annexin V-negativen Zellen ist angegeben.

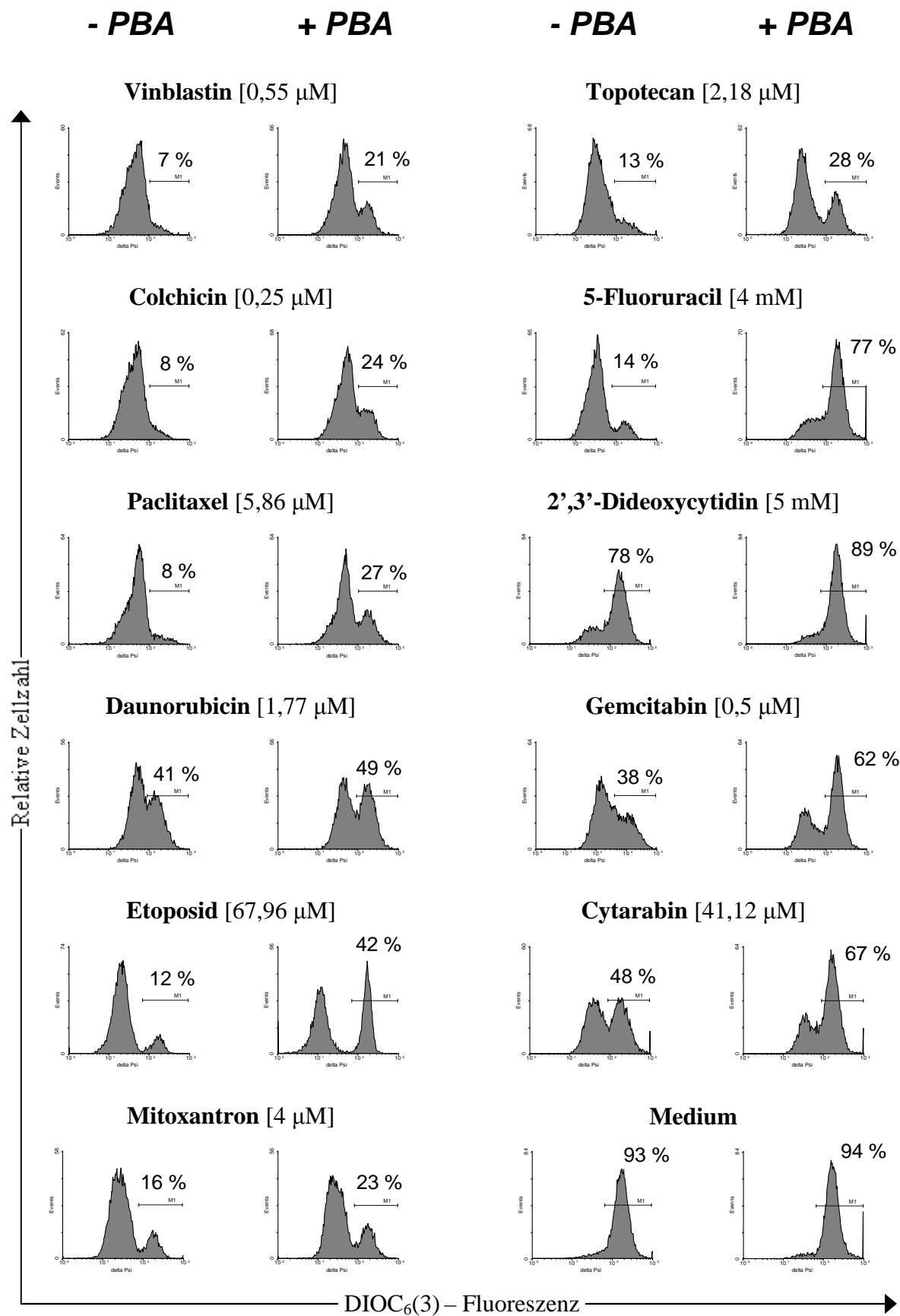
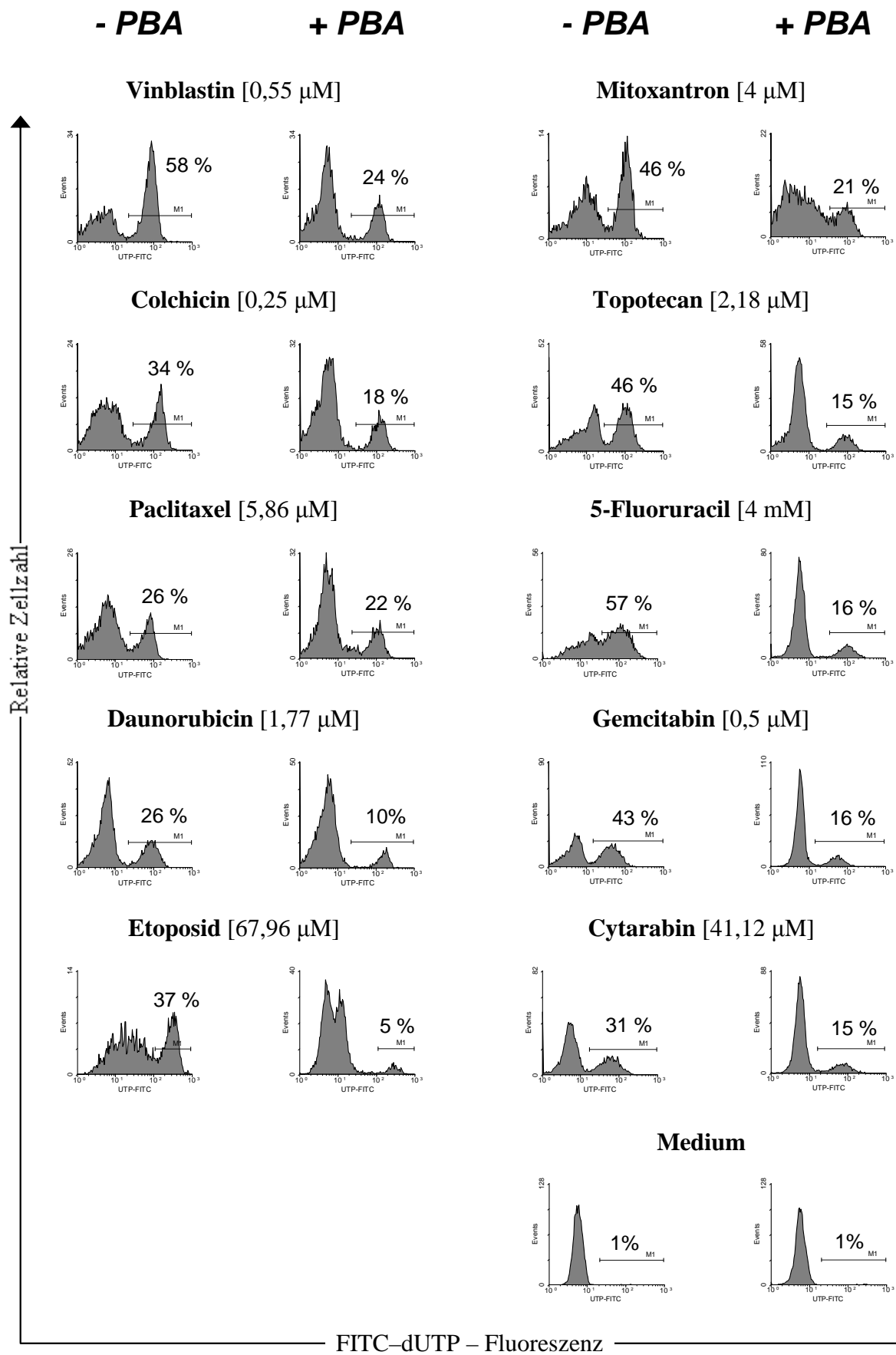


Abbildung 11: Auswirkungen der Vorbehandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von KG-1a Zellen in der $\Delta\Psi_m$ -Messung

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen mit $\text{DIOC}_6(3)$ angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der Zellen mit positivem $\Delta\Psi_m$ ist angegeben.



Legende auf nächster Seite ↓

Abbildung 12: Auswirkungen der Vorbehandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von KG-1a Zellen im TUNEL-Assay

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit dem APO-DIRECT™ Kit angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der TUNEL-positiven Zellen ist angegeben.

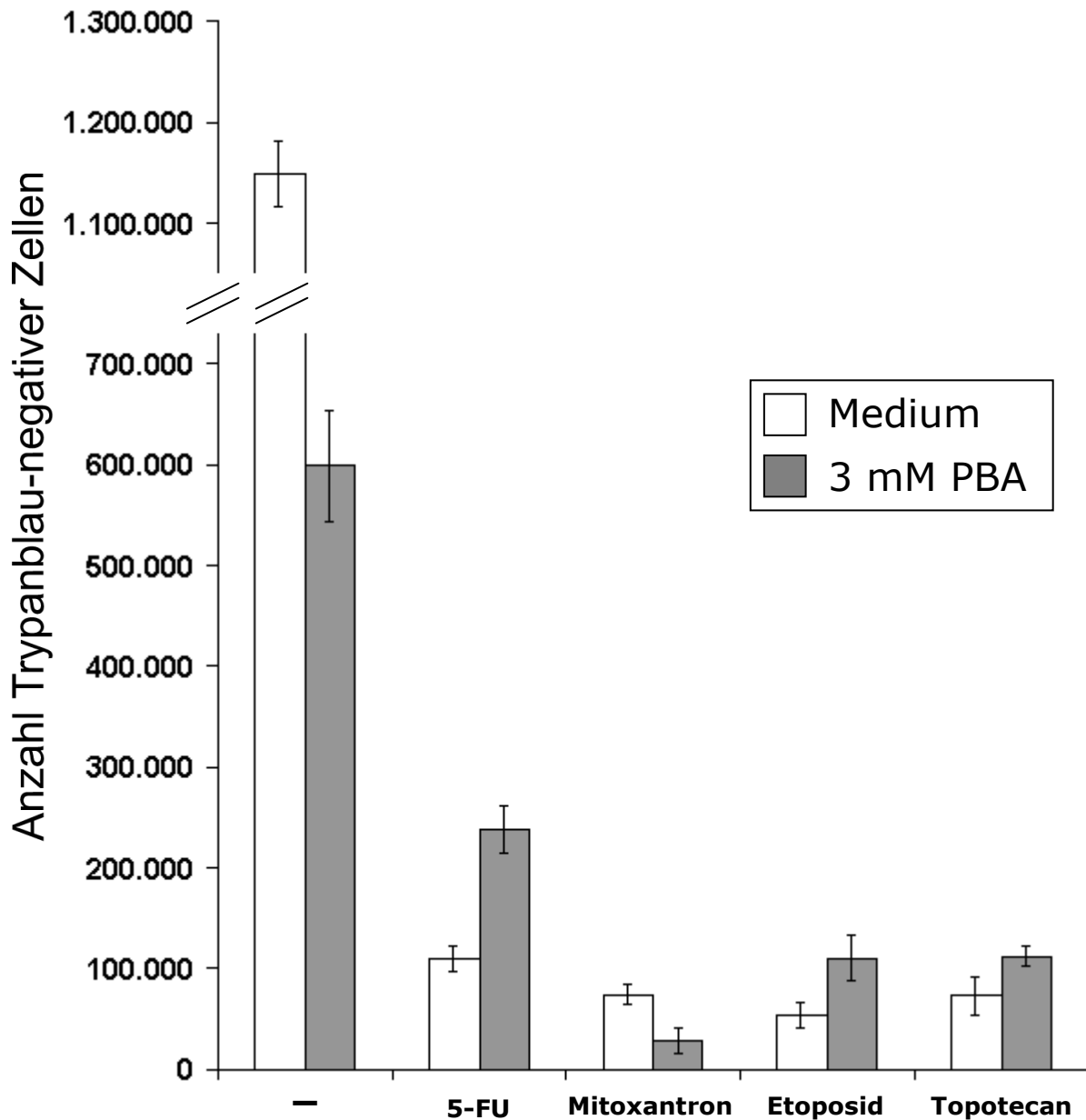
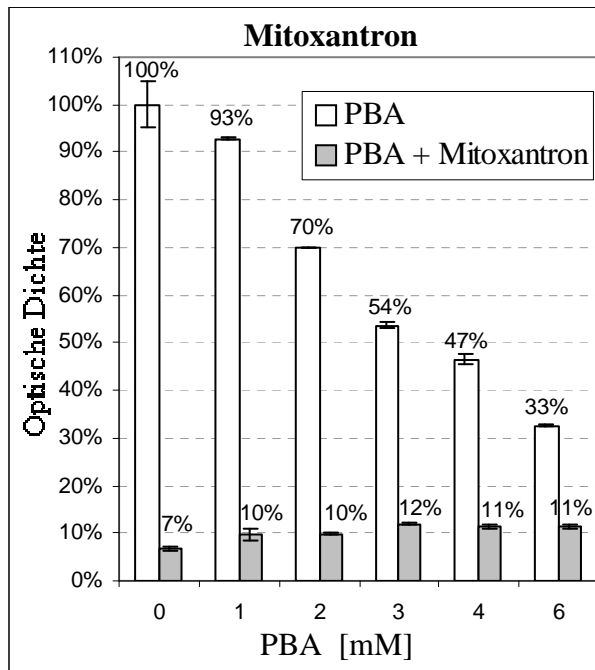


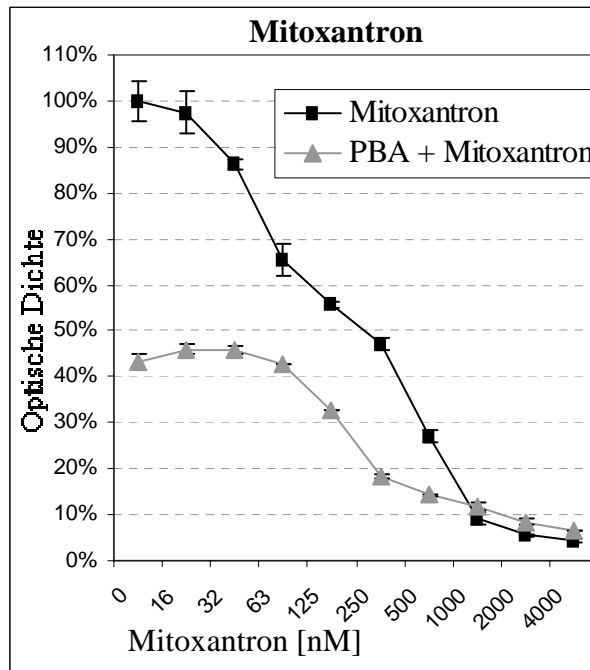
Abbildung 13: Auswirkungen der Behandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von KG-1a Zellen in der Trypanblau-Färbung.

Die Zellen wurden für 1 Tag mit oder ohne 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 2 Tagen erfolgte die Färbung mit Trypanblau und Auszählung der ungefärbten Zellen am Lichtmikroskop. Die Standardabweichungen aus drei aufeinanderfolgenden Auszählungen sind graphisch wiedergegeben.

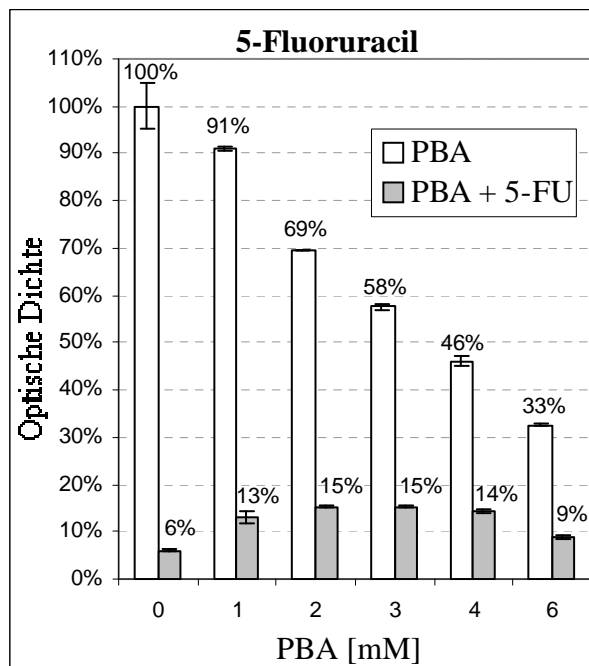
A.



B.



C.



D.

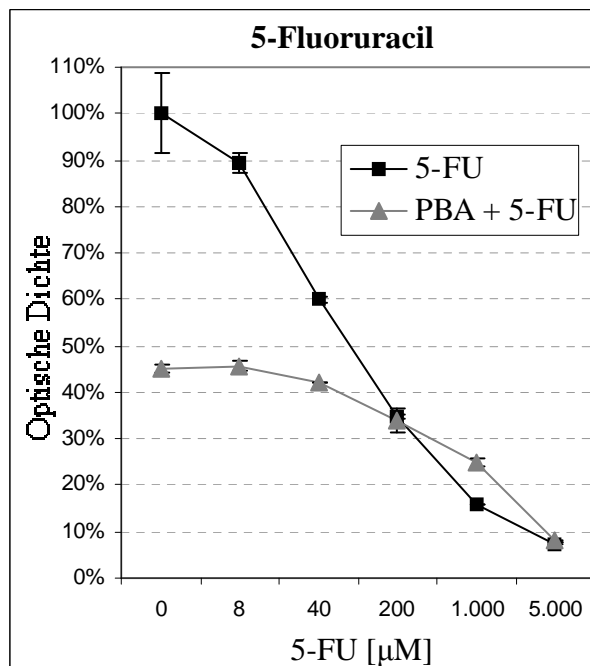
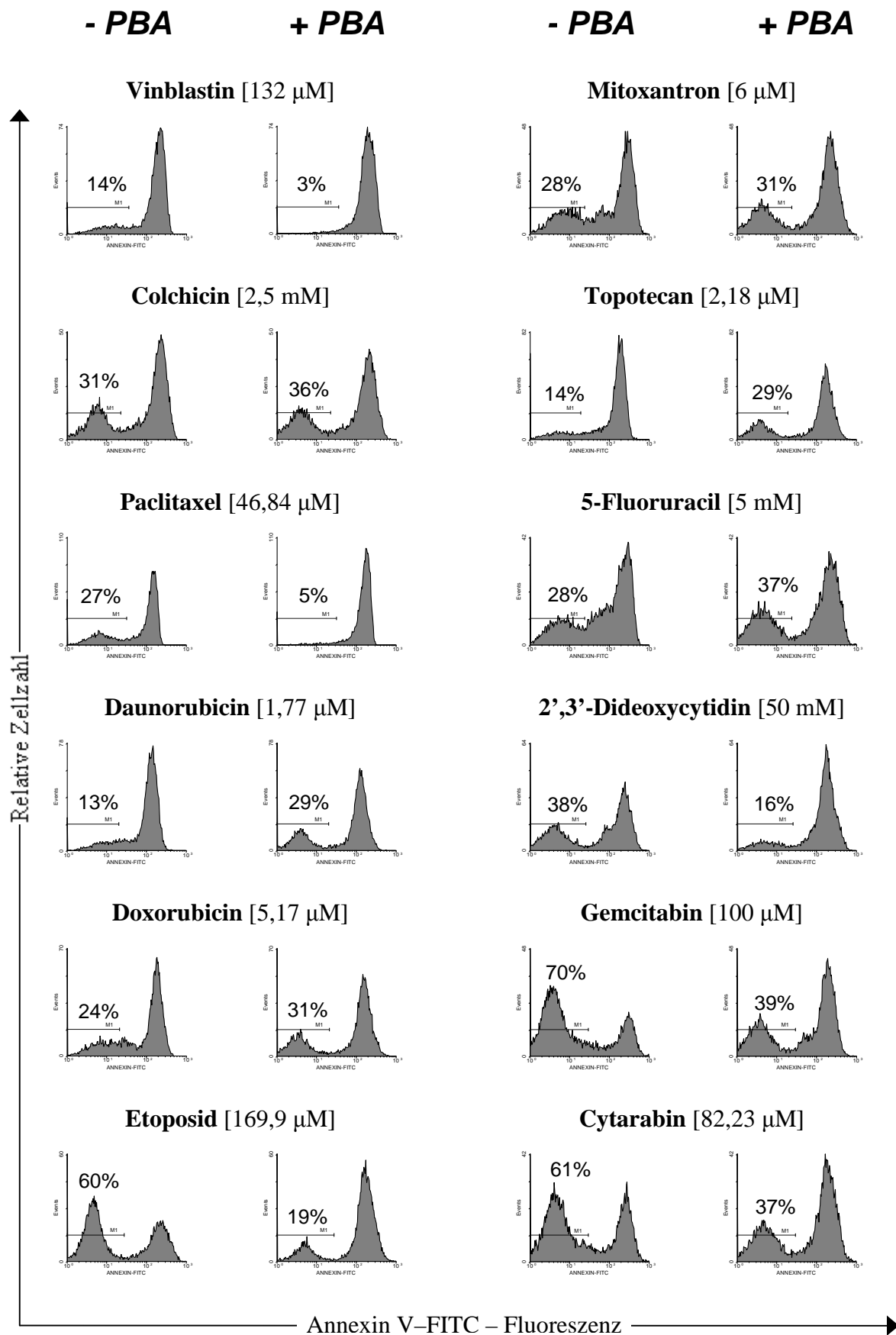


Abbildung 14: Dosisabhängige Modulation der Chemosensibilität von KG-1a Zellen durch PBA-Behandlung im MTS-Assay

Die Zellen wurden für 1 Tag mit den angegebenen Konzentrationen an PBA (3 mM in B und D) inkubiert. Anschließend wurden Mitoxantron (2 µM in A) bzw. 5-FU (5mM in C) in den aufgeführten Dosen hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte die Messung der Zellviabilität anhand des MTS-Assay. In die Grafiken sind die Standardabweichungen aus drei gemessenen Wells einer 96-Well-Platte eingetragen.



Fortsetzung auf nächster Seite ↓

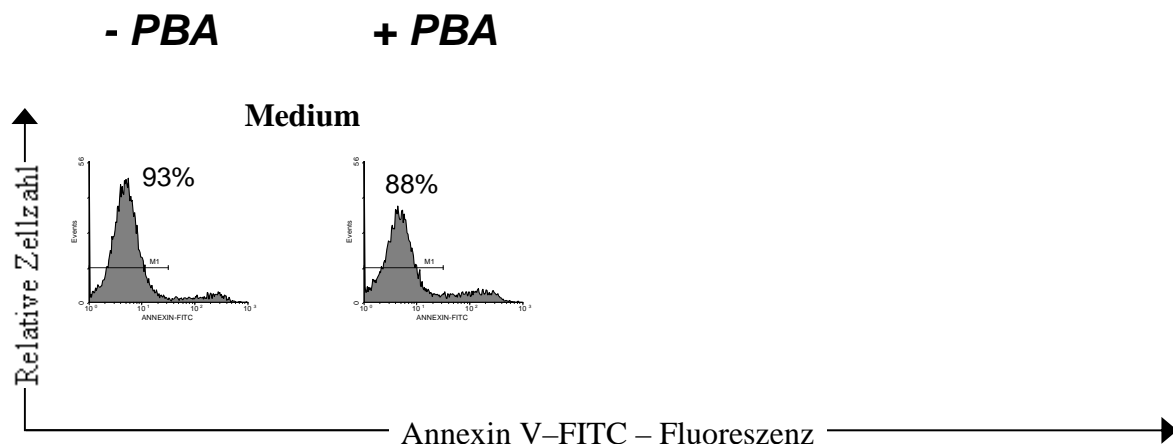
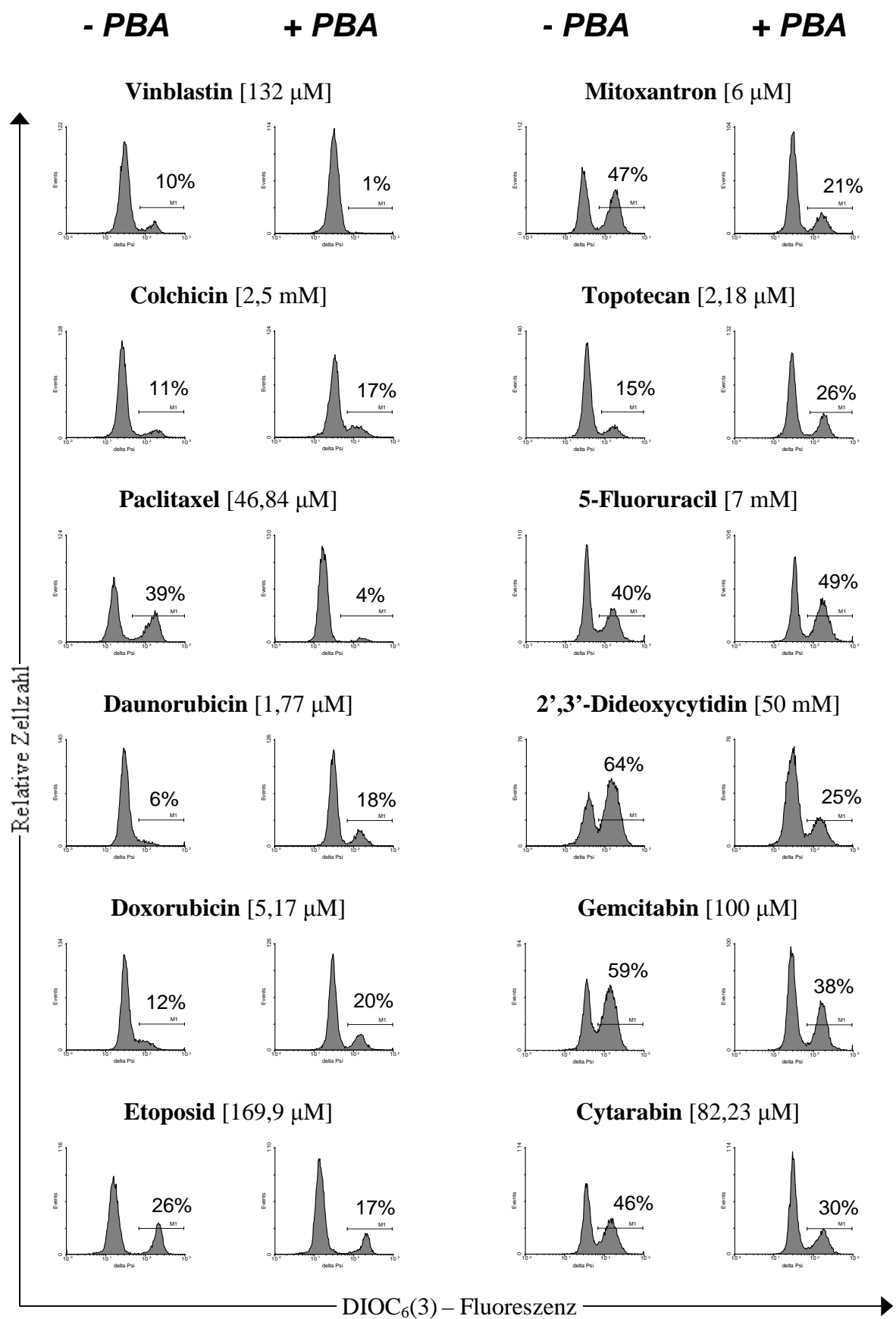


Abbildung 15: Auswirkungen der Vorbehandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von CMK Zellen im Annexin V-Assay

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 2 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit FITC-markiertem Annexin V angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der Annexin V-negativen Zellen ist angegeben.



Fortsetzung auf nächster Seite ↓

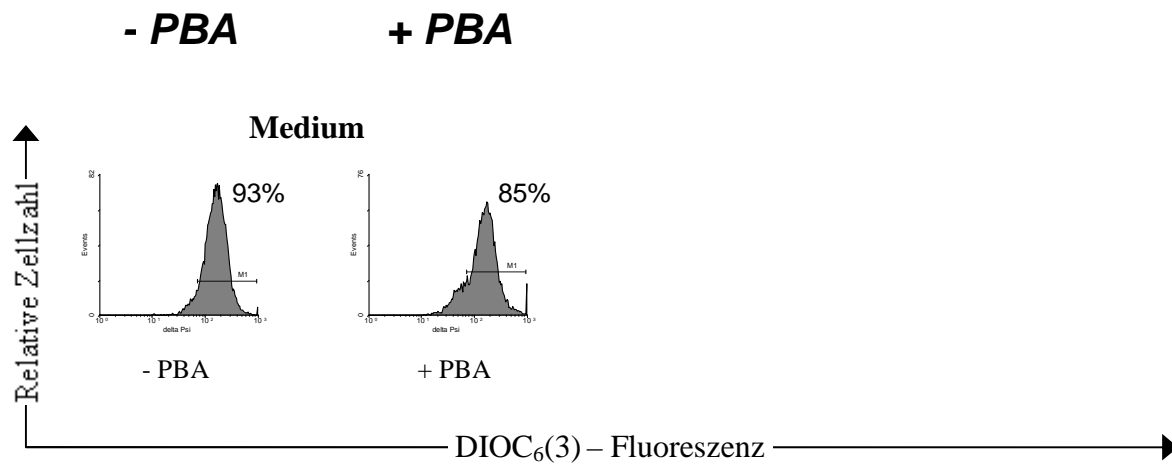
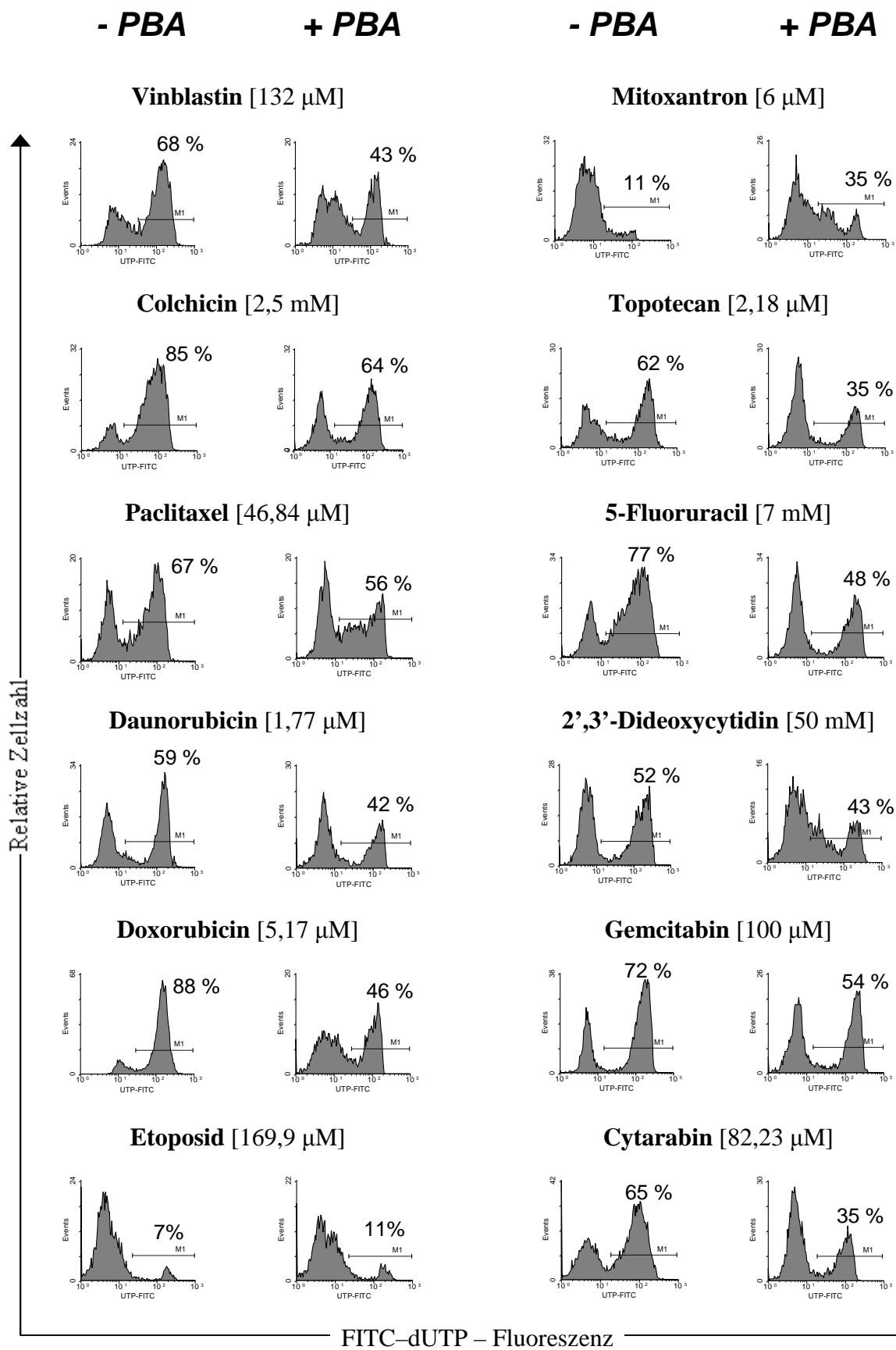


Abbildung 16: Auswirkungen der Vorbehandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von CMK Zellen in der $\Delta\Psi_m$ -Messung

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 2 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen mit DIOC₆(3) angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der Zellen mit positivem $\Delta\Psi_m$ ist angegeben.



Fortsetzung auf nächster Seite ↓

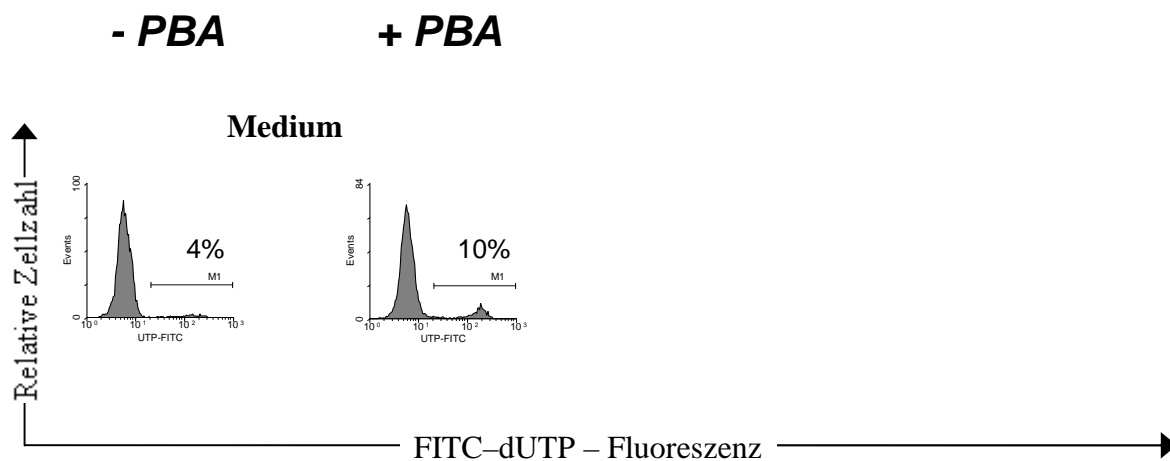


Abbildung 17: Auswirkungen der Vorbehandlung mit PBA auf die Chemosensibilität von CMK Zellen im TUNEL-Assay

Die Zellen wurden für 1 Tag mit (jeweils rechtes Histogramm) oder ohne (jeweils linkes Histogramm) 2 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit dem APO-DIRECT™ Kit angefärbt und ihre Fluoreszenz am Durchflusszytometer bestimmt. Der im angezeigten Intervall der Histogramme liegende Anteil der TUNEL-positiven Zellen ist angegeben.

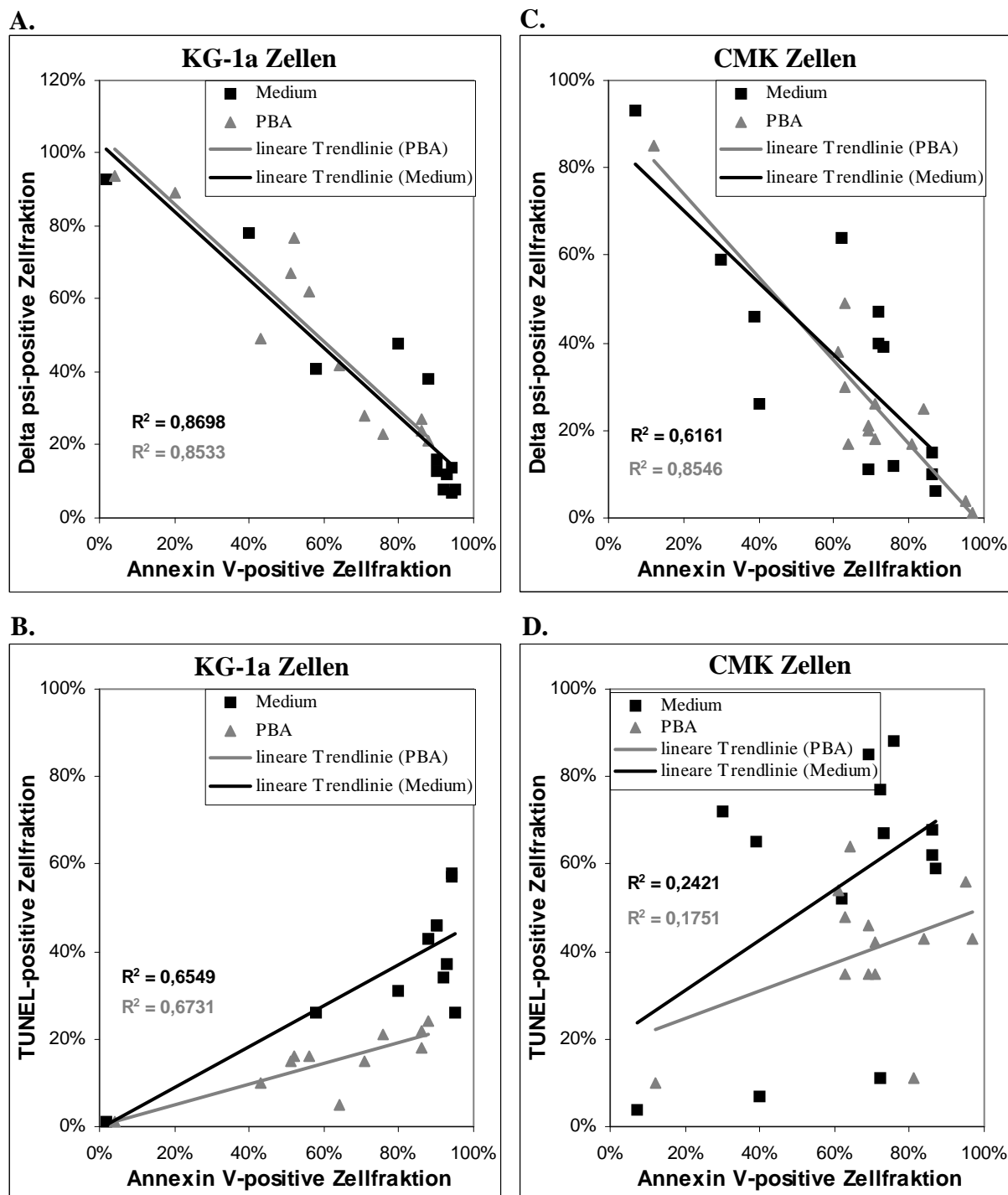


Abbildung 18: Vergleich der Methoden zur Apoptosemessung

In den Diagrammen A bis D sind die in den vorherigen Versuchen zur Chemoresistenz ermittelten Messwerte der verschiedenen Verfahren zur Apoptosemessung gegeneinander aufgetragen. Ein Messpunkt gibt jeweils die in den zwei angegebenen Methoden detektierten Prozentsätze apoptotischer (AnnexinV-positiver, TUNEL-positiver) bzw. nicht-apoptotischer (Delta psi-positiver) Zellen wieder. Die Daten eines Messpunktes wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit gleichen Kulturbedingungen und gleichen Zellbehandlungen ermittelt. Mithilfe des Computerprogramms Microsoft Excel® (Firma: *Microsoft*, Redmont, USA) wurden jeweils für die Messpunkte aller mit PBA behandelten und aller unbehandelten Zellen eine lineare Trendlinie erzeugt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 , das die Höhe des linearen Zusammenhangs zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Apoptose-Tests abbildet, ist für jede Trendlinie angegeben.

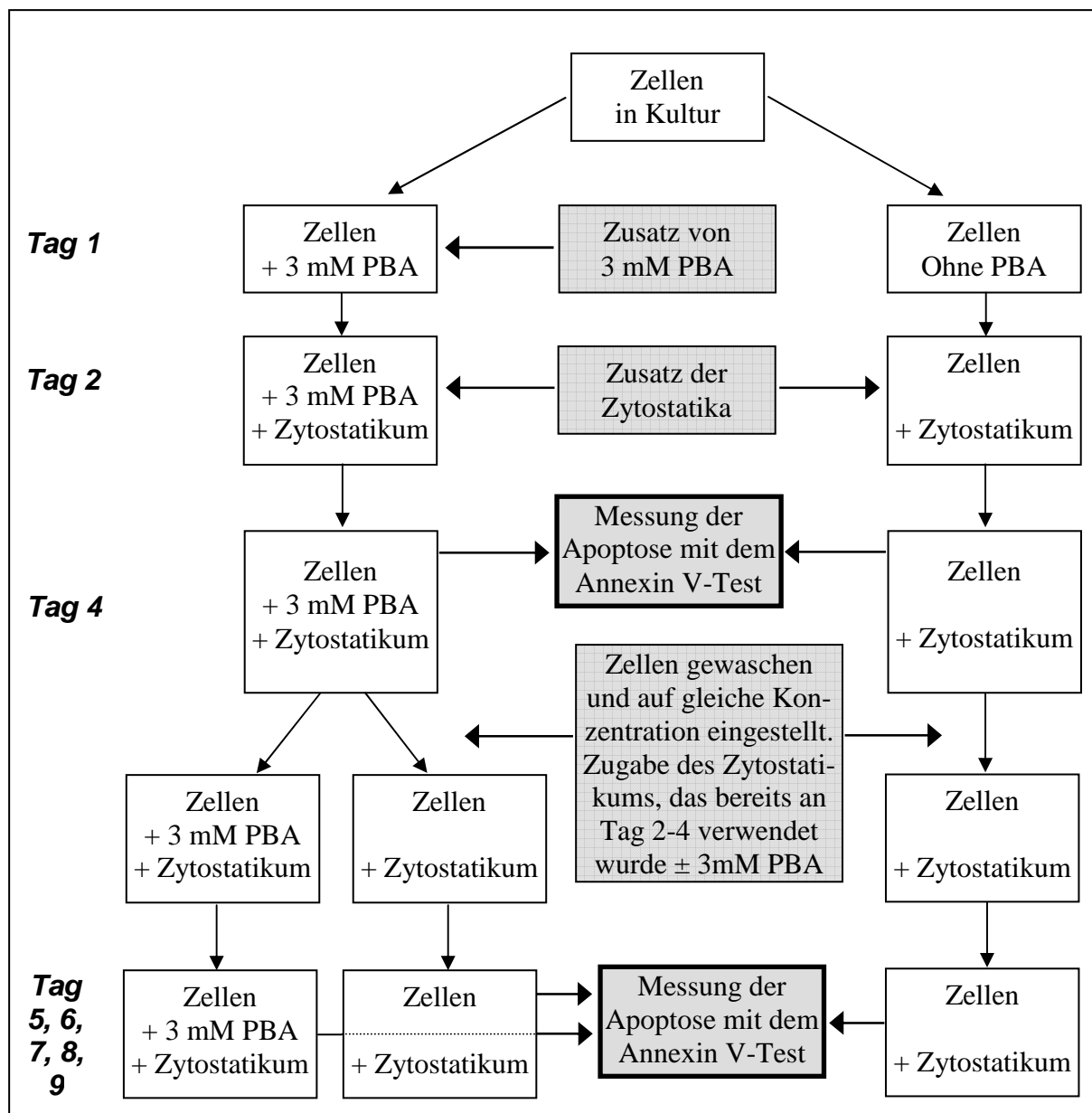


Abbildung 19: Schematischer Ablauf der Zellbehandlung zur Bestimmung der Chemoresistenz nach PBA Entzug

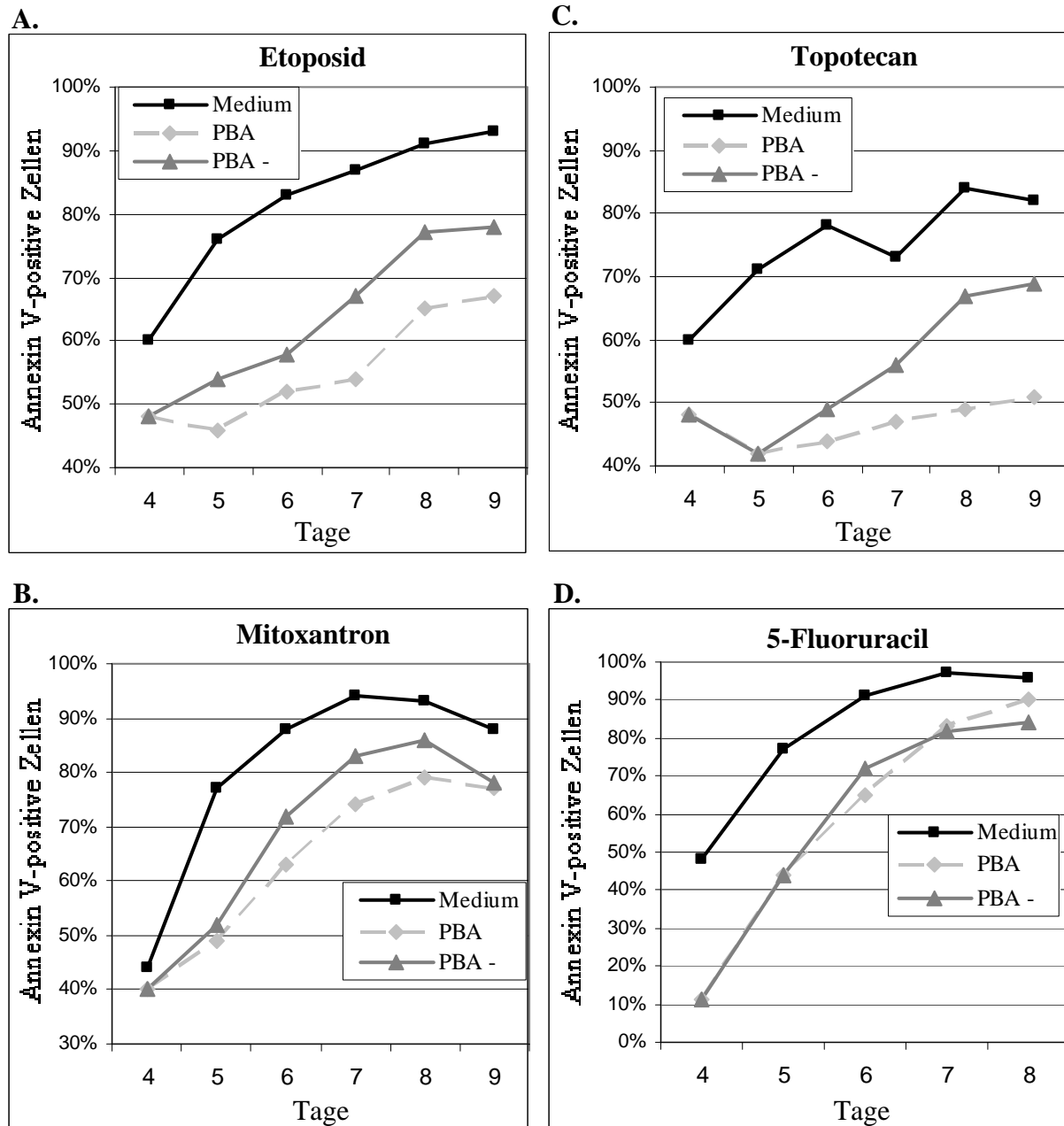


Abbildung 20: Reversibilität der Chemoresistenz von KG-1a Zellen nach Entzug von PBA

Die Zellen wurden für 1 Tag mit oder ohne 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die angegebenen Zytostatika hinzugegeben. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte die erste Annexin V-Messung am Durchflusszytometer. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von ca. 200.000 Zellen/ml Medium in neue Zellkulturflaschen ausgebracht. Den Zellen wurden die Zytostatika hinzugefügt, mit denen sie schon die 3 Tage zuvor behandelt wurden. Die mit PBA behandelten Zellen wurden auf je 2 Flaschen aufgeteilt: eine mit (PBA) und eine ohne (PBA -) 3 mM PBA. Es folgten weitere Annexin V-Messungen an den Tagen 5, 6, 7, 8 und 9. Zytostatika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: (A) 50,97 μ M Etoposid, (B) 2 μ M Mitoxantron, (C) 1,64 μ M Topotecan, (D) 1 mM 5-Fluoruracil.

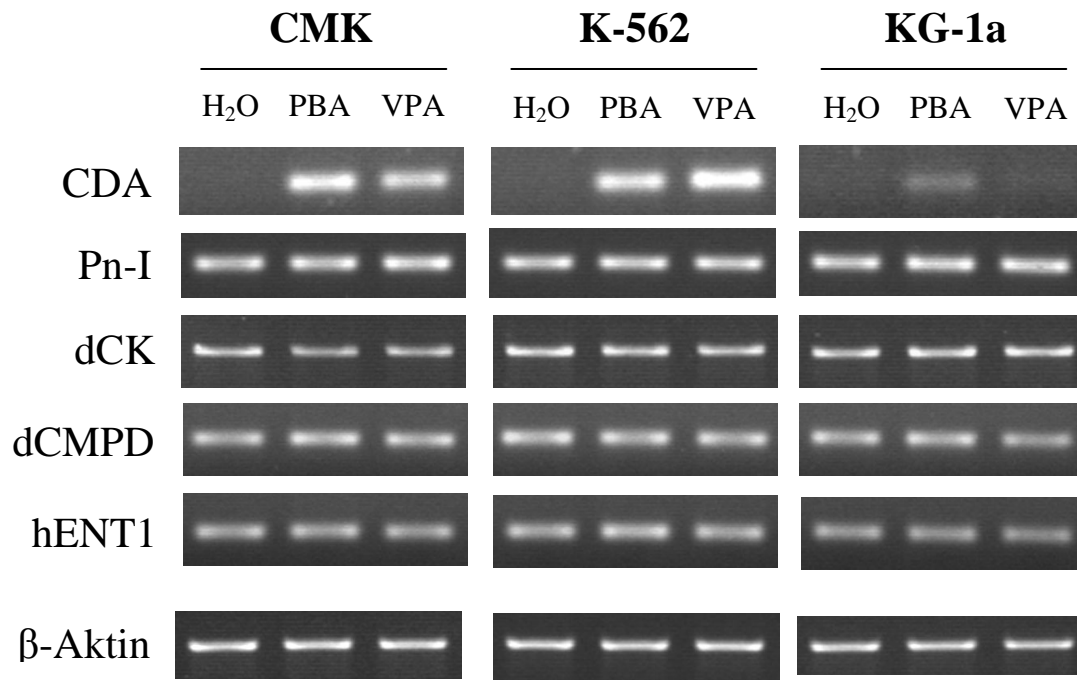


Abbildung 21: mRNA Expression von Genen, die Resistenz gegen Cytarabin und Gemcitabin vermitteln

Die Zellen wurden mit Wasser, 3 mM PBA oder 3mM Valproinsäure inkubiert. Nach 1 Tag wurden die Zellen mittels semiquantitativer PCR auf die Expression der angegebenen Nukleosidanaloga-Resistenzgene hin untersucht. Abkürzungen: CDA = Cytidineaminase, PN-I = Pyrimidin-Nukleotidase I, dCK = Deoxycytidin-Kinase, dCMPD = Deoxycytidylat-Deaminase, hENT1 = Human equilibrative nucleoside transporter 1

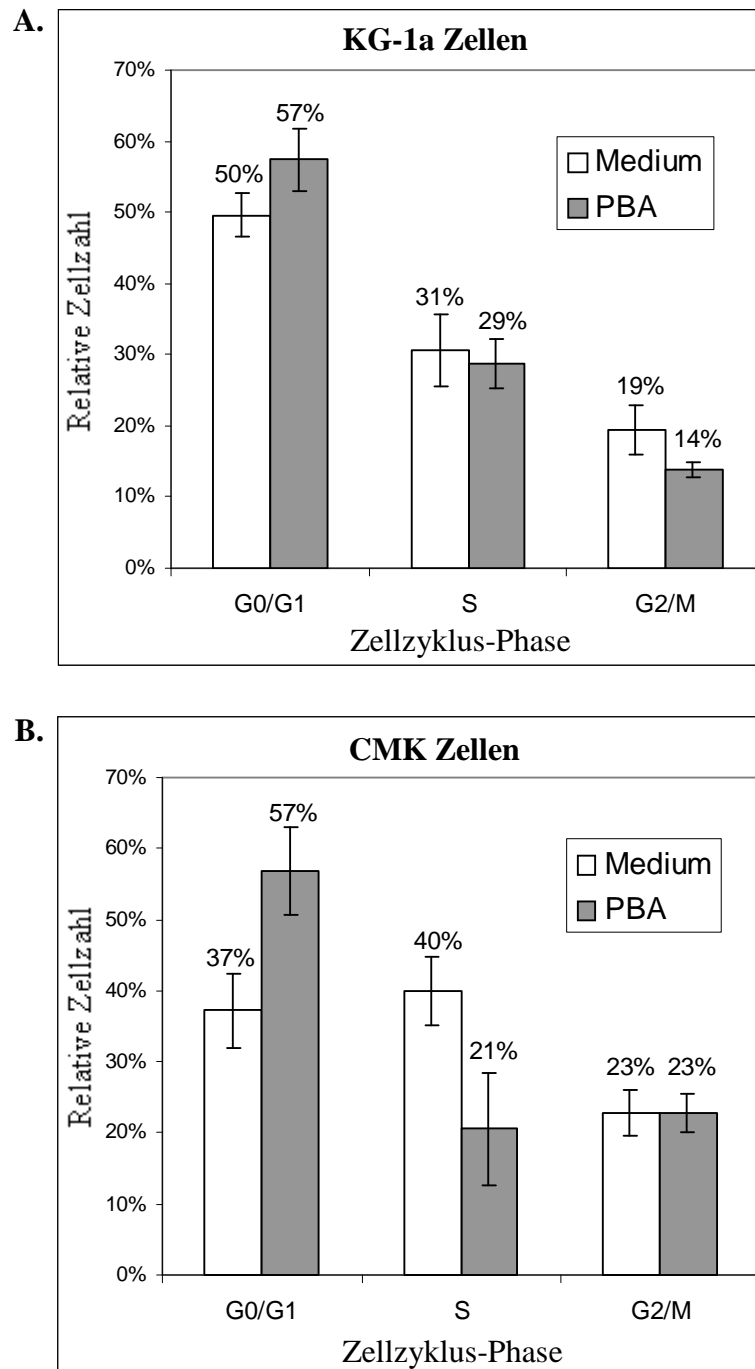


Abbildung 22: Einfluss von PBA auf die Zellzyklusverteilung von KG-1a (A) und CMK (B) Zellen

Die Zellen wurden für 1 Tag mit oder ohne 3 mM PBA inkubiert. Anschließend wurden die mit Ethanol permeabilisierten Zellen mit Propidiumjodid angefärbt und anhand der durchflusszytometrisch bestimmten Fluoreszenz ihr DNA-Gehalt ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm ModFitLT™ 3.0 der Firma Verity Software House (Topsham, USA). Angegebene Prozentwerte entsprechen dem Anteil der Zellen, die sich in der jeweiligen Zellzyklusphase befinden, an der Gesamtpopulation der Zellen. Die Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten sind graphisch wiedergegeben.

4 Diskussion

4.1 Modulation der Genexpression von ABC-Transportern durch HDACi

Bereits im Jahr 1989 wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass ein Histondeacetylase-Inhibitor, in diesem Fall Natriumbutyrat, in der Lage ist, die Expression von P-Glykoprotein in Karzinomzelllinien zu steigern (Mickley et al. 1989). Später konnte aufgezeigt werden, dass dieser Effekt zumindest in einer der untersuchten Kolonkarzinomzelllinien mit einer verringerten Akkumulation der Pgp-Substrate Rhodamin 123 und Vinblastin sowie einer verstärkten Resistenz gegenüber Vinblastin einherging (Frommel et al. 1993). Auch eine Behandlung mit dem HDACi Romidepsin induzierte die Expression von funktionsfähigem Pgp in dieser Zelllinie und zudem in Nierenzellkarzinomzelllinien sowie in einer APL-Zelllinie, die gewöhnlich kein Pgp exprimiert (Robey et al. 2006, Tabe et al. 2006). Diese APL-Zelllinie zeigte nach Inkubation mit Romidepsin eine geringere Sensibilität gegenüber der zytostatischen Wirkung von Doxorubicin, wobei die Effekte von Romidepsin auf Pgp-Expression und Sensibilität dieser Zellen durch zusätzliche Gabe von ATRA erheblich verstärkt wurden (Tabé et al. 2006). Darüber hinaus konnte eine vermehrte MDR1-Expriemierung in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten, die aufgrund eines kutanen T-Zell-Lymphoms oder einer CBF-AML mit Romidepsin behandelt wurden, nachgewiesen werden (Robey et al. 2006, Odenike et al. 2008). In manchen Kolonkarzinom- und Nierenzellkarzinomzelllinien sowie einer Zelllinie eines großzelligen Bronchialkarzinoms wurde zudem ABCG2 nach Behandlung mit Romidepsin verstärkt exprimiert (To et al. 2008). Valproinsäure (VPA), Trichostatin A (TSA) und Apicidin, ebenfalls HDACi, waren in der Lage, die Expression von Pgp in einer Leukämie- (VPA), einer Ratten-Hepatom- (VPA), einer Kolonkarzinom- (VPA und TSA), einer Magenkarzinom- (TSA) und einer Zervixkarzinomzelllinie (Apicidin) zu induzieren, wobei Apicidin den Zellen eine Resistenz gegenüber Paclitaxel verlieh (Eyal et al. 2006, Kim et al. 2008b, Lee et al. 2008). Die Behandlung mit TSA führte außerdem in Luciferase-Reporter-genassays zur Aktivierung des MRP7-Promotors, während sie in einer Karzinomzelllinie eine Verminderung des MRP2-Proteins zur Folge hatte (Stöckel et al. 2000, Kao et al. 2003). Untersuchungen mit Natriumphanylbutyrat (PBA) ergaben, dass PBA in bestimmten Zellsystemen die Expriemierung von MDR1 sowie der nicht mit Chemoresistenz assoziierten ABC-

Transporter BSEP und ALDP steigert (Shack et al. 1996, Kemp und Wanders 2007, Hayashi und Sugiyama 2007). In einer Pgp-überexprimierenden, chemoresistenten Brustkrebs- und einer Kolonkarzinomzelllinie verursachte die 72-stündige Inkubation mit PBA einen deutlichen Anstieg der MDR1-mRNA-Menge, sensibilisierte allerdings paradoxerweise die Zellen gegenüber einer anschließenden Behandlung mit Doxorubicin, anstatt ihnen Resistenz zu verleihen (Shack et al. 1996). Die von PBA ausgelöste Minderung der antioxidativen Kapazität der Zellen lieferte einen möglichen Erklärungsansatz für diese unerwartete Beobachtung (Shack et al. 1996).

Die Modulation der Expressierung anderer Chemoresistenz-assoziiierter ABC-Transporter durch Histondeacetylase-Inhibitoren wurde nach dem Erkenntnisstand des Autors bisher nicht nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Behandlung von Leukämiezelllinien mit Natriumphenylbutyrat (PBA) auf die Genexpression verschiedener Chemoresistenz-assoziiierter ABC-Transporter und die Sensibilität dieser Zellen gegenüber Chemotherapeutika auswirkt. Eine Inkubation mit PBA führte in CMK Zellen zu einer verstärkten Expression von ABCG2- (BCRP-), ABCC11- (MRP8-) sowie – schwächer – MDR1- und ABCC10- (MRP7-) mRNA, in KG-1a Zellen zur Induktion der Gene ABCG2, ABCC11 und in geringerem Ausmaß ABCC5 (MRP5). Darüber hinaus bewirkte eine PBA-Behandlung in KG-1a Zellen eine leicht verminderte Akkumulation des Pgp-Substrates BODIPY[®] FL Paclitaxel; in CMK Zellen war dieser Effekt ausgeprägter und konnte zusätzlich für das Pgp-Substrat Rhodamin 123 nachgewiesen werden. Die in diesen Akkumulations-Assays eingesetzten Pgp-Inhibitoren Verapamil und Cyclosporin A vermehrten die intrazelluläre Anreicherung der beiden Substrate erheblich. Dies belegt, dass die Genexpression funktionell für die Transportaktivität relevant und für Pgp spezifisch ist. Die in KG-1a Zellen beobachtete Diskrepanz zwischen dem Resultat der semiquantitativen PCR, die keinen Einfluss der Behandlung mit PBA auf die Genexpression von MDR1 gezeigt hat, und dem des Akkumulations-Assay, der eine vermehrte Aktivität von Pgp vermuten lässt, ist anhand der zugrunde liegenden Daten nicht erklärbar. Als möglich Ursache dafür könnten von PBA hervorgerufene posttranslationale Modifizierungen oder Veränderungen des intrazellulären Transportes von Pgp eine Rolle spielen. In Bezug auf andere Plasmamembranproteine wurde bereits nachgewiesen, dass PBA deren intrazellulären Transport beeinflussen kann (Prulière-Escabasse et al. 2007). Zudem konnte eine Stabilisierung des p53-Protein durch Behandlung mit dem HDACi TSA gezeigt werden (Peltonen et al. 2005).

4.2 Einfluss von HDACi auf die Chemoresistenz maligner Zellen

In der vorliegenden Arbeit wird nachgewiesen, dass ein HDACi die Wirksamkeit von zytostatischen Chemotherapeutika teilweise antagonisiert. Antagonistische Interaktionen von HDACi wurden bislang in Kombinationen mit den Chemotherapeutika Doxorubicin, Epirubicin, Etoposid, Camptothecin, Paclitaxel, Vincristin, Vinblastin, Methotrexat, Cytarabin und Gemcitabin beobachtet (Frommel et al. 1993, Marchion et al. 2004, Bevins und Zimmer 2005, Tabe et al. 2006, de Ruijter et al. 2006, Kano et al. 2007, Kim et al. 2008b, Shiozawa et al. 2009). Als Resistenzmechanismen wurden Zellzyklusarrest, Differenzierung, veränderte Expression von Zielproteinen der kombinierten Chemotherapeutika oder Induktion von P-Glykoprotein angenommen (Tabe et al. 2006, de Ruijter et al. 2006, Kano et al. 2007). In Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von Pgp durch Behandlung mit HDACi wurden bisher Resistenzentwicklungen gegenüber Doxorubicin, Vinblastin und Paclitaxel beschrieben (Frommel et al. 1993, Tabe et al. 2006, Kim et al. 2008b).

4.2.1 Zelllinie KG-1a

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Apoptose-Tests zeigen, dass eine Vorbehandlung mit PBA eine pleiotrope Zytostatika-Resistenz in Leukämiezelllinien erzeugt. In KG-1a Zellen erstreckt sich die Resistenz auf alle eingesetzten Chemotherapeutika, zu denen Mitosegifte, Antimetabolite, interkalierende Substanzen, Topoisomerase I- und Topoisomerase II-Inhibitoren gehören. Am stärksten verringert die Behandlung mit PBA die Zytotoxizität von 5-Fluoruracil (5-FU), dessen aktiver Metabolit ein Substrat von MRP8 und MRP5 ist (Kruh et al. 2007). Dies passt zu den Daten der semiquantitativen PCR, die in KG-1a Zellen eine erhebliche Induktion der MRP8-Expression sowie eine geringere Induktion der MRP5-Expression durch PBA-Behandlung zeigt. Ob BCRP, dessen mRNA ebenfalls durch PBA deutlich vermehrt wird, bei der Resistenz gegen 5-FU eine Rolle spielt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (de Wolf et al. 2008, Yuan et al. 2009). Nicht auszuschließen ist die Beteiligung von weiteren Resistenzmechanismen gegen 5-FU, z.B. vermehrte Aktivität der Thymidylat-Synthase oder der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase. Desweiteren ist davon auszugehen, dass der G1-Zellzyklusarrest, der unter Behandlung mit PBA auftritt, die Anzahl der Zellen, die der Toxizität von Zellzyklus-spezifischen Medikamenten, wie Mitosegifte, zugänglich sind, reduziert.

Die im Ergebnisteil beschriebene Resistenzentwicklung der KG-1a Zellen gegenüber Gemcitabin kann nicht allein durch die Modulation der Genexpression der ABC-Transporter erklärt werden. Denn die mRNA-Menge des einzigen ABC-Transporters, dessen Überexpression in Verbindung mit verminderter zellulärer Sensibilität gegenüber Gemcitabin und dem strukturell sehr ähnlichen Ara-C beschrieben wurde und bisher ohne Widerspruch blieb, MRP7, ist zum Zeitpunkt der Zugabe der Chemotherapeutika durch die 24-stündige PBA-Behandlung herabreguliert und wird erst später hochreguliert (Hopper-Borge et al. 2009). Die Rolle der anderen ABC-Transporter bei der Resistenzentwicklung gegen Gemcitabin ist nicht abschließend geklärt. In der Arbeit von de Wolf et al. verleiht die Überexpression von BCRP nur einer der zwei untersuchten Zelllinien Resistenz gegen Gemcitabin (de Wolf et al. 2008). Zu der Fragestellung, ob die vermehrte Expressierung von MRP5 die Sensibilität von Zellen gegenüber Gemcitabin und Ara-C vermindert, erschienen sich widersprechende Publikationen (Davidson et al. 2002, Reid et al. 2003, Oguri et al. 2006, Borst et al. 2007). Weitere ABC-Transporter, die laut aktuellen Studien eine Resistenz gegen Ara-C vermitteln können, sind ABCA3 und MRP8, dessen starke Geninduktion durch PBA folglich eine plausible Erklärung für die beobachtete Resistenz der KG-1a Zellen gegen Ara-C darstellt (Chapuy et al. 2008, Guo et al. 2009). Zudem gibt es noch eine Reihe anderer Proteine, deren Assoziation mit verminderter zellulärer Sensibilität gegenüber Gemcitabin und Ara-C gut untersucht und hinreichend belegt ist (Galmarini et al. 2001, Schröder et al. 1998). Um zu klären, ob diese Proteine bei der von PBA modulierten Chemosensibilität der KG-1a Zellen eine Rolle spielen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression dieser Proteine unter HDACi-Behandlung untersucht. Dabei zeigt sich in KG-1a Zellen eine erhebliche Induktion des Cytidineaminase-Gens durch Inkubation mit PBA. Erhöhte Aktivität der Cytidineaminase führte in verschiedenen In vitro-Studien zu einer Resistenz gegenüber Gemcitabin und Ara-C (Neff und Blau 1996, Momparler et al. 1996, Eliopoulos et al. 1998). Eine Beteiligung der Cytidineaminase bei der von PBA verursachten Resistenzentwicklung der KG-1a Zellen gegenüber diesen beiden Pyrimidin-Analoga liegt somit nahe.

Nach dem Wissen des Autors ist die Modulation der Cytidineaminase-Expression durch HDACi in der Literatur bisher ebenso wenig beschrieben wie die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion einer sehr weiten Resistenz durch Ko-Aktivierung mehrerer ABC-Transportergene durch einen einzelnen HDACi. Möglicherweise spielen solche Ko-Aktivierungen resistenzvermittelnder Gene auch bei dem klinischen Problem der „Multidrug resistance“ eine Rolle.

Die Resistenzentwicklung der KG-1a Zellen durch PBA-Behandlung war in den hier gezeigten Zellviabilitäts-Tests, MTS-Assay und Trypanblau-Färbung, entweder gar nicht zu beobachten oder deutlich geringer ausgeprägt als in den Apoptose-Messungen. Dies liegt vermutlich an den wachstumshemmenden Effekten, die PBA auf Tumorzellen ausübt bei gleichzeitiger geringer Zytotoxizität von PBA. In der Trypanblau-Färbung werden die Zellen mit intakter Zellmembran gezählt, der MTS-Assay misst die Dehydrogenase-Aktivität viabler Zellen. Somit korrelieren diese beiden Methoden mit der absoluten Anzahl intakter bzw. stoffwechselaktiver Zellen und erfassen damit im Gegensatz zu den Apoptose-Assays auch die von PBA hervorgerufene Wachstumshemmung.

Über den zeitlichen Verlauf der induzierten Expression von ABC-Transportern und der damit verbundenen Resistenz nach Entzug des HDACi ist bisher nicht viel bekannt. Mickley et al. zeigten, dass die vermehrte Pgp-Expimierung nach Entfernung von Natriumbutyrat eine Halbwertszeit von etwa 24 Stunden aufweist und nach ca. 96 Stunden fast vollständig abgeklungen ist (Mickley et al. 1989). In der Arbeit von Eyal et al. war die Pgp-Funktion bereits 72 Stunden nach Entzug des HDACi Valproinsäure auf dem Niveau, das vor Zugabe des HDACi ermittelt wurde (Eyal et al. 2006). Wie sich eine induzierte Resistenz nach Entnahme des HDACi aus dem Medium der Zellen entwickelt, wurde nicht untersucht. Dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen. In den hier vorgestellten Ergebnissen ist ein Rückgang der von PBA hervorgerufenen Resistenz gegenüber 3 von 4 untersuchten Substanzen bereits 24 bis 48 Stunden nach Entzug von PBA zu beobachten, der sich in den darauffolgenden Tagen noch verstärkt. Diese Resultate legen nahe, dass die von PBA induzierte Resistenz innerhalb weniger Tage funktionell reversibel ist. Lediglich die Sensibilität der Zellen gegenüber 5-FU, dem einzigen hier untersuchten MRP8- bzw. MRP5-Substrat, blieb weitgehend von dem PBA-Entzug unbeeinflusst.

4.2.2 Zelllinie CMK

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit PBA auch CMK Zellen eine verstärkte Resistenz gegenüber mindestens 4 der 12 untersuchten Chemotherapeutika verleiht. Bezüglich einer von PBA verursachten Sensibilitätsminderung der CMK Zellen gegenüber den anderen verwendeten Substanzen ergaben die 3 verschiedenen Methoden zur Apoptose-Messung keine einheitlichen Resultate. Im TUNEL-Assay war häufiger eine vermehrte Resistenz festzustellen, die in den beiden anderen Verfahren zumeist nicht bestätigt werden konnte. Welche Ursachen diesen Beobachtungen zugrunde liegen, bleibt unklar. Das Resistenzmuster, das PBA in CMK Zellen erzeugte, stimmte nicht eindeu-

tig mit den Substratprofilen der ABC-Transporter, die in diesen Zellen induziert wurden, überein. Während beispielsweise die Zytotoxizität mancher Pgp-Substrate durch PBA-Behandlung abnahm, wurde die apoptotische Wirkung anderer Pgp-Substrate durch Zugabe von PBA verstärkt. In der akuten megakaryozytären Leukämie-Zelllinie CMK scheinen unter dem Einfluss von PBA also andere, v.a. proapoptische Mechanismen die Aktivitäten der ABC-Transporter und der Cytidineaminase zu überlagern. Ein Hinweis dafür ist die im Vergleich mit KG-1a Zellen größere Sensibilität der CMK Zellen gegenüber der Zytotoxizität von PBA bei gleichzeitiger stärkerer intrinsischer Resistenz gegenüber den anderen untersuchten Substanzen.

4.2.3 Strategien zur Bewältigung der sog. „Multidrug resistance“

Aufgrund der enormen klinischen Relevanz der „Multidrug resistance“ werden bereits seit über 30 Jahren intensiv Möglichkeiten erforscht, diese Resistenz zu überwinden. Bisher allerdings blieben klinisch einsetzbare Lösungen aus. Einige moderne Ansätze zur Bewältigung der „Multidrug resistance“ sind im Folgenden aufgeführt:

Weiterhin Gegenstand aktueller Forschung sind trotz der bisher fehlenden durchschlagenden klinischen Erfolge der Vorgängersubstanzen neue Pgp-Inhibitoren mit geringeren pharmakokinetischen Wechselwirkungen, die bei den früheren Generationen dieser Substanzen häufig zu toxischen Nebenwirkungen aufgrund von Plasmaspiegelerhöhungen der Chemotherapeutika führten (Szakács et al. 2006). Zudem werden derzeit auch monoklonale Antikörper gegen Pgp und Verfahren zur selektiven transkriptionellen Repression des MDR1-Gens, z.B. RNA-Interferenz oder Ribozym-Technologie, untersucht (Lage 2008). In präklinischen Experimenten wurden diese Methoden bereits erfolgreich eingesetzt, wobei monoklonale Antikörper entweder unkonjugiert als Pgp-Inhibitoren oder auch mit Toxinen konjugiert als Immunotoxin Verwendung fanden (Szakács et al. 2006). Ein weiterer Ansatz, die „Multidrug resistance“ zu umgehen, ist die pharmakologische Modifikation von Chemotherapeutika, um deren Erkennung und Efflux durch ABC-Transporter zu verhindern bzw. zu verringern (Lampidis et al. 1997). Darüber hinaus könnte die Beobachtung, dass Zellen, die gegen bestimmte Substanzen resistent sind oder gar eine „Multidrug resistance“ aufweisen, eine paradoxe bzw. kollaterale Hypersensibilität gegenüber verschiedenen anderen Chemotherapeutika zeigen, in der Klinik genutzt werden. Eine Untersuchung konnte eine solche kollaterale Hypersensibilität bei Lymphozyten von chemotherapeutisch behandelten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie nachweisen (Bosanquet und Bell 1996).

Mittels Transfektion hämatopoetischer Knochenmarkszellen mit dem MDR1-Gen könnte außerdem die Knochenmarkstoxizität der Chemotherapie vermindert und dadurch ggf. höhere Dosen an Zytostatika angewendet werden. Eine Transplantation von so transfizierten Knochenmarkszellen konnte bei Mäusen bereits erfolgreich durchgeführt werden (Licht et al. 2000).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Inhibition von Histondeacetylasen ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz in der Behandlung von Malignomen. Dabei richtet sich das Interesse der Forschung zunehmend auf die Kombination von Histondeacetylase-Inhibitoren und anderen Medikamenten; denn Vieles deutet darauf hin, dass der therapeutische Nutzen solcher Kombinationen den der Einzelsubstanzen deutlich übersteigen kann (Glaser 2007). Ein Großteil der Substanzen, die in Kombination mit HDACi untersucht werden (konventionelle Chemotherapeutika, zielgerichtete Medikamente und DNA-Methyltransferase-Inhibitoren) sind Substrate von ABC-Transportern, deren Überexpression Malignomen sog. „Multidrug resistance“ verleihen kann. In der vorliegenden Arbeit wird anhand semiquantitativer PCR sowie mehrere Apoptose- und Zytotoxizitäts-Assays gezeigt, dass die Behandlung von Leukämiezellen mit dem HDACi Natriumphenylbutyrat die Induktion der Genexpression von verschiedenen ABC-Transportern (BCRP/ABCG2, MRP8, MRP5, P-Glykoprotein/MDR1) sowie der Cytidineaminase, einem Enzym, das Nukleosidanaloga inaktiviert, zur Folge haben und den Zellen eine pleiotrope Resistenz gegen eine Vielzahl konventioneller Chemotherapeutika vermitteln kann. Aufgrund dieser Ergebnisse und anderer Publikationen, die von antagonistischen Interaktionen von HDACi mit Chemotherapeutika berichten, ist bei der Planung künftiger klinischer Studien mit Kombinationen von HDACi und Nukleosidanaloga bzw. Substraten bestimmter ABC-Transporter besondere Vorsicht geboten. Weitere Untersuchungen zur Modulation der Expression von ABC-Transportern und Enzymen, die Nukleosidanaloga verstoffwechseln, durch HDACi in primären Tumorzellen verschiedener Entitäten und Beachtung der geeigneten Reihenfolge der Medikamentenapplikation sollten die Sicherheit und den Erfolg von Kombinationschemotherapien mit HDACi gewährleisten.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Artikelverzeichnis

- Abbott, B.L., Colapietro, A.M., Barnes, Y., Marini, F., Andreeff, M., Sorrentino, B.P. "Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples." *Blood* 100 (2002) 4594-4601
- Akiyama, S., Fojo, A., Hanover, J.A., Pastan, I., Gottesman, M.M. "Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs." *Somat. Cell Mol. Genet.* 11 (1985) 117-126
- Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M. "P-glycoprotein: from genomics to mechanism." *Oncogene* 22 (2003) 7468-7485
- Ashkenazi, A. "Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer." *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (2008) 325-331
- Beck, K., Hayashi, K., Dang, K., Hayashi, M., Boyd, C.D. "Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues." *Histochem. Cell Biol.* 123 (2005) 517-528
- Bedner, E., Li, X., Gorczyca, W., Melamed, M.R., Darzynkiewicz, Z. "Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry." *Cytometry* 35 (1999) 181-195
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G.D. "Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6)." *Cancer Res.* 62 (2002) 6172-6177
- Bellos, F., Mahlknecht, U. "Valproic acid and all-trans retinoic acid: meta-analysis of a palliative treatment regimen in AML and MDS patients." *Onkologie* 31 (2008) 629-633
- Benderra, Z., Faussat, A. M., Sayada, L., Perrot, J. Y., Chaoui, D., Marie, J. P., Legrand, O. "Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias." *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7896-7902
- Bessho, Y., Oguri, T., Ozasa, H., Uemura, T., Sakamoto, H., Miyazaki, M., Maeno, K., Sato, S., Ueda, R. "ABCC10/MRP7 is associated with vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer." *Oncol. Rep.* 21 (2009) 263-268
- Bevins, R.L., Zimmer, S.G. „It's about time: scheduling alters effect of histone deacetylase inhibitors on camptothecin-treated cells." *Cancer Res.* 65 (2005) 6957-6966
- Bieliauskas, A.V., Pflum, M.K. „Isoform-selective histone deacetylase inhibitors." *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1402-1013

- Bloomfield, C.D., Lawrence, D., Byrd, J.C., Carroll, A., Pettenati, M.J., Tantravahi, R., Patil, S.R., Davey, F.R., Berg, D.T., Schiffer, C.A., Arthur, D.C., Mayer, R.J. "Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype." *Cancer Res.* 58 (1998) 4173-4179
- Blum, W., Porcu, P. "Therapeutic apheresis in hyperleukocytosis and hyperviscosity syndrome." *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 350-354
- Borst, P., de Wolf, C., van de Wetering, K. "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5." *Pflugers Arch.* 453 (2007) 661-673
- Bosanquet, A.G., Bell, P.B. "Novel ex vivo analysis of nonclassical, pleiotropic drug resistance and collateral sensitivity induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* 87 (1996) 1962-1971
- Bram, E., Ifergan, I., Shafran, A., Berman, B., Jansen, G., Assaraf, Y.G. "Mutant Gly482 and Thr482 ABCG2 mediate high-level resistance to lipophilic antifolates." *Cancer Chemother. Pharmacol.* 58 (2006) 826-834
- Carew, J.S., Giles, F.J., Nawrocki, S.T. "Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy." *Cancer Lett.* 269 (2008) 7-17
- Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki N, Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., Schweyer, S., Kosari, F., Klapper, W., Truemper, L., Wulf, G.G. "Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration." *Leukemia* 22 (2008) 1576-1786
- Christ, O., Feuring-Buske, M., Hiddemann, W., Buske, C. „Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie.“ *Med. Klin. (Munich)* 102 (2007) 290-295
- Craddock, C., Tauro, S., Moss, P., Grimwade, D. "Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia." *Br. J. Haematol.* 129 (2005) 18-34
- Craig, C.M., Schiller, G.J. "Acute myeloid leukemia in the elderly: conventional and novel treatment approaches." *Blood Rev.* 22 (2008) 221-234
- Cusatis, G., Sparreboom, A. "Pharmacogenomic importance of ABCG2." *Pharmacogenomics* 9 (2008) 1005-1009
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F. "Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis)." *Cytometry* 27 (1997) 1-20
- Davidson, J.D., Ma, L., Iverson, P.W., Lesoon, A., Jin, S., Horwitz, L., Gallery, M., Slapak, C.A. "Human multidrug resistance protein 5 (MRP5) confers resistance to gemcitabine." *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 43 (2002) 3868
- de Ruijter, A.J., Leen, R., Hoebink, J., Caron, H.N., van Kuilenburg, A.B. "Antagonistic effects of sequential administration of BL1521, a histone deacetylase inhibitor, and gemcitabine to neuroblastoma cells." *Cancer Lett.* 233 (2006) 240-246

- de Wolf, C., Jansen, R., Yamaguchi, H., de Haas, M., van de Wetering, K., Wijnholds, J., Beijnen, J., Borst, P. "Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides." *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 3092-3102
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *Genome Res.* 11 (2001) 1156-1166
- Deschler, B., Lübbert, M. "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." *Cancer* 107 (2006) 2099-2107
- Diestra, J.E., Scheffer, G.L., Català, I., Maliepaard, M., Schellens, J.H., Scheper, R.J., Germà-Lluch, J.R., Izquierdo, M.A. "Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material." *J. Pathol.* 198 (2002) 213-219
- Dietrich, C.G., Geier, A., Oude Elferink, R.P. „ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut." *Gut* 52 (2003) 1788-1795
- Dowdy, S.C., Jiang, S., Zhou, X.C., Hou, X., Jin, F., Podratz, K.C., Jiang, S.W. "Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells." *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 2767-2776
- Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., Benz, C.C. "Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 495-528
- Eliopoulos, N., Cournoyer, D., Momparler, R.L. "Drug resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine, 2',2'-difluorodeoxycytidine, and cytosine arabinoside conferred by retroviral-mediated transfer of human cytidine deaminase cDNA into murine cells." *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42 (1998) 373-378
- Estey, E., Döhner, H. "Acute myeloid leukaemia." *Lancet* 368 (2006) 1894-1907
- Eyal, S., Lamb, J.G., Smith-Yockman, M., Yagen, B., Fibach, E., Alschuler, Y., White, H.S., Bialer, M. "The antiepileptic and anticancer agent, valproic acid, induces P-glycoprotein in human tumour cell lines and in rat liver." *Br. J. Pharmacol.* 149 (2006) 250-260
- Fernandez-Calotti P., Jordheim L.P., Giordano M., Dumontet C., Galmarini C.M. "Substrate cycles and drug resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (araC)." *Leuk. Lymphoma.* 46 (2005) 335-346
- Ferraro-Peyret, C., Quemeneur, L., Flacher, M., Revillard, J.P., Genestier, L. "Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes." *J. Immunol.* 169 (2002) 4805-4810
- Fojo, A., Akiyama, S., Gottesman, M.M., Pastan, I. "Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines." *Cancer Res.* 45 (1985) 3002-3007

- Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., Pastan, I. "Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 265-269
- Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., Frank, M.H. "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." *Cancer Res.* 65 (2005) 4320-4333
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmelewskij, W., Villunger, A. "Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer." *Apoptosis* 14 (2009) 584-596
- Friedrich, R.E., Punke, C., Reymann, A. "Expression of multi-drug resistance genes (mdr1, mrp1, bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma." *In Vivo* 18 (2004) 133-147
- Fritsch, S., Metzeler, K., Hiddemann, W., Buske, C. "Diagnose und Therapie der akuten myeloischen Leukämie." *Dtsch. Med. Wochenschr.* 131 (2006) 2401-2406
- Frommel, T.O., Coon, J.S., Tsuruo, T., Roninson, I.B. "Variable effects of sodium butyrate on the expression and function of the MDR1 (P-glycoprotein) gene in colon carcinoma cell lines." *Int. J. Cancer* 55 (1993) 297-302
- Galluzzi, L., Zamzami, N., de La Motte Rouge, T., Lemaire, C., Brenner, C., Kroemer, G. "Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis." *Apoptosis* 12 (2007) 803-813
- Galmarini C.M., Clarke M.L., Jordheim L., Santos C.L., Cros E., Mackey J.R., Dumontet C. "Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene." *BMC Pharmacol.* 4 (2004) 8
- Galmarini, C.M., Mackey, J.R., Dumontet, C. "Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies." *Leukemia* 15 (2001) 875-890
- Gilliland, D.G., Griffin, J.D. "The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia." *Blood* 100 (2002) 1532-1542
- Glaser, K.B. "HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential." *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 659-671
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S., Marshall, N.J. "Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS." *J. Immunol. Methods* 179 (1995) 95-103
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters." *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 48-58
- Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V. "Overview: ABC transporters and human disease." *J. Bioenerg. Biomembr.* 33 (2001) 453-458
- Gradhand, U., Kim, R.B. "Pharmacogenomics of MRP Transporters (ABCC1-5) and BCRP (ABCG2)." *Drug Metab. Rev.* 40 (2008) 317-354

- Green, S.K., Frankel, A., Kerbel, R.S. „Adhesion-dependent multicellular drug resistance.“ *Anticancer Drug Des.* 14 (1999) 153-168
- Guo, Y., Köck, K., Ritter, C.A., Chen, Z.S., Grube, M., Jedlitschky, G., Illmer, T., Ayres, M., Beck, J.F., Siegmund, W., Ehninger, G., Gandhi, V., Kroemer, H.K., Kruh, G.D., Schaich, M. „Expression of ABC-transporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival.“ *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 1762-1769
- Hagmann, W., Jesnowski, R., Faissner, R., Guo, C., Lohr, J.M. “ATP-Binding Cassette C Transporters in Human Pancreatic Carcinoma Cell Lines. Upregulation in 5-Fluorouracil-Resistant Cells.” *Pancreatology* 9 (2009) 136-144
- Han, K., Kahng, J., Kim, M.; Lim, J., Kim, Y., Cho, B., Kim, H.K., Min, W.S., Kim, C.C., Lee, K.Y., Kim, B.K., Kang, C.S. “Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia.” *Acta Haematol.* 104 (2000) 174-180
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A., Bloomfield, C.D. “World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997.” *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 3835-3849
- Haslam, I.S., Jones, K., Coleman, T., Simmons, N.L. "Induction of P-glycoprotein expression and function in human intestinal epithelial cells (T84).” *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 850-861
- Hayashi, H., Sugiyama, Y. “4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps.” *Hepatology* 45 (2007) 1506-1516
- Ho, M.M., Hogge, D.E., Ling, V. “MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia.” *Exp. Hematol.* 36 (2008) 433-442
- Hopper-Borge, E., Xu, X., Shen, T., Shi, Z., Chen, Z.S., Kruh, G.D. “Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B.” *Cancer Res.* 69 (2009) 178-184
- Hsu J.L., Chiang P.C., Guh J.H. “Tunicamycin induces resistance to camptothecin and etoposide in human hepatocellular carcinoma cells: role of cell-cycle arrest and GRP78.” *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 380 (2009) 373-382
- Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepe, S., Livingston, E.H. “Screening and detection of apoptosis.” *J. Surg. Res.* 139 (2007) 143-156
- Huls, M., Russel, F.G., Masereeuw, R. “The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration.” *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328 (2009) 3-9
- Jain, R.K. “Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy.” *Nat. Med.* 7 (2001) 987-989

- Jing, Y., Xia, L., Waxman, S. "Targeted removal of PML-RARalpha protein is required prior to inhibition of histone deacetylase for overcoming all-trans retinoic acid differentiation resistance in acute promyelocytic leukemia." *Blood* 100 (2002) 1008-1013
- Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Izumi, T., Kobayashi, H., Mano, H., Furukawa, Y. "Cytotoxic effects of histone deacetylase inhibitor FK228 (depsipeptide, formally named FR901228) in combination with conventional anti-leukemia/lymphoma agents against human leukemia/lymphoma cell lines." *Invest. New Drugs* 25 (2007) 31-40
- Kao, H.H., Chang, M.S., Cheng, J.F., Huang, J.D. "Genomic structure, gene expression, and promoter analysis of human multidrug resistance-associated protein 7." *J. Biomed. Sci.* 10 (2003) 98-110
- Kemp, S., Wanders, R.J. „X-linked adrenoleukodystrophy: very long-chain fatty acid metabolism, ABC half-transporters and the complicated route to treatment." *Mol. Genet. Metab.* 90 (2007) 268-276
- Kim, M.S., Kwon, H.J., Lee, Y.M., Baek, J.H., Jang, J.E., Lee, S.W., Moon, E.J., Kim, H.S., Lee, S.K., Chung, H.Y., Kim, C.W., Kim, K.W. „Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes." *Nat. Med.* 7 (2001) 437-443
- Kim, T.Y., Bang, Y.J., Robertson, K.D. „Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy." *Epigenetics* 1 (2006) 14-23
- Kim, W.S., Weickert, C.S., Garner, B. "Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease." *J. Neurochem.* 104 (2008) 1145-1166
- Kim, Y.K., Kim, N.H., Hwang, J.W., Song, Y.J., Park, Y.S., Seo, D.W., Lee, H.Y., Choi, W.S., Han, J.W., Kim, S.N. "Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 (2008) 959-964
- Krishnamurthy, P., Schuetz, J.D. "Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46 (2006) 381-410
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." *Physiol. Rev.* 87 (2007) 99-163
- Kroschinsky, F., Schäkel, U., Ehniger, G. "Leukozytose: Ursachen und Differenzialdiagnostik." *Internist (Berl).* 48 (2007) 1239-1254
- Kruh, G.D., Guo, Y., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Chen, Z.S. „ABCC10, ABCC11, and ABCC12." *Pflugers Arch.* 453 (2007) 675-684
- Kruijtzter, C.M., Beijnen, J.H., Rosing, H., ten Bokkel Huinink, W.W., Schot, M., Jewell, R.C., Paul, E.M., Schellens, J.H. "Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918." *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 2943-2950

- Kuo, M.T. "Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid. Redox. Signal.* 11 (2009) 99-133
- Kurz, E.U., Wilson, S.E., Leader, K.B., Sampey, B.P., Allan, W.P., Yalowich, J.C., Kroll, D.J. "The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces DNA topoisomerase II alpha expression and confers hypersensitivity to etoposide in human leukemic cell lines." *Mol. Cancer Ther.* 1 (2001) 121-131
- La Porta, C. "Cancer Stem Cells: Lessons From Melanoma." *Stem Cell Rev.* (2008)
doi:10.1007/s12015-008-9048-7
- Lage, H. "An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem." *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3145-3167
- Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampé, R., Dietel, M., Schadendorf, D., Sinha, P., Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone." *FEBS Lett.* 503 (2001) 179-184
- Lampidis, T.J., Kolonias, D., Podona, T., Israel, M., Safa, A.R., Lothstein, L., Savaraj, N., Tapiero, H., Priebe, W. "Circumvention of P-GP MDR as a function of anthracycline lipophilicity and charge." *Biochemistry* 36 (1997) 2679-85
- Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E.G., Kim, R.B., Lan, L.B., Schuetz, J.D. "Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein." *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 24-35
- Lee, T.B., Park, J.H., Min, Y.D., Kim, K.J., Choi, C.H. "Epigenetic mechanisms involved in differential MDR1 mRNA expression between gastric and colon cancer cell lines and rationales for clinical chemotherapy." *BMC Gastroenterol.* 8 (2008) 33
- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G.L., Sun, D., Wielinga, P., Du, G., Mercer, K.E., Zhuang, Y., Panetta, J.C., Johnston, B., Scheper, R.J., Stewart, C.F., Schuetz, J.D. "Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy." *Mol. Cell Biol.* 24 (2004) 7612-7621
- Leith, C.P., Kopecky, K.J., Chen, I.M., Eijdens, L., Slovak, M.L., McConnell, T.S., Head, D.R., Weick, J., Grever, M.R., Appelbaum, F.R., Willman, C.L. "Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study." *Blood* 94 (1999) 1086-1099
- Leverone, M.R., Owen, T.C., Tieder, F.S., Stewart, G.J., Lim, D.V. "Resting-cell dehydrogenase assay measuring a novel water soluble formazan detects catabolic differences among cells." *J. Microbiol. Methods* 25 (1996) 49-55
- Li, G.Y., Liu, J.Z., Zhang, B., Wang, L.X., Wang, C.B., Chen, S.G. "Cyclosporine diminishes multidrug resistance in K562/ADM cells and improves complete remission in patients with acute myeloid leukemia." *Biomed. Pharmacother.* (2008)
doi:10.1016/j.biopha.2008.10.008

- Liang, X.J., Shen, D.W., Gottesman, M.M. "A pleiotropic defect reducing drug accumulation in cisplatin-resistant cells." *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1599-1606
- Licht, T., Goldenberg, S.K., Vieira, W.D., Gottesman, M.M., Pastan, I. "Drug selection of MDR1-transduced hematopoietic cells ex vivo increases transgene expression and chemoresistance in reconstituted bone marrow in mice." *Gene Ther.* 7 (2000) 348-358
- List, A.F., Kopecky, K.J., Willman, C.L., Head, D.R., Persons, D.L., Slovak, M.L., Dorr, R., Karanes, C., Hynes, H.E., Doroshow, J.H., Shurafa, M., Appelbaum, F.R. "Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study." *Blood* 98 (2001) 3212-3220
- Liu, S., Klisovic, R.B., Vukosavljevic, T., Yu, J., Paschka, P., Huynh, L., Pang, J., Neviani, P., Liu, Z., Blum, W., Chan, K.K., Perrotti, D., Marcucci, G. "Targeting AML1/ETO-histone deacetylase repressor complex: a novel mechanism for valproic acid-mediated gene expression and cellular differentiation in AML1/ETO-positive acute myeloid leukemia cells." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321 (2007) 953-960
- Liu Yin, J.A., Wheatley, K., Rees, J.K., Burnett, A.K. "Comparison of 'sequential' versus 'standard' chemotherapy as re-induction treatment, with or without cyclosporine, in refractory/relapsed acute myeloid leukaemia (AML): results of the UK Medical Research Council AML-R trial." *Br. J. Haematol.* 113 (2001) 713-726
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Housman, D.E. "p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." *Cell* 74 (1993) 957-967
- Marbello, L., Ricci, F., Nosari, A.M., Turrini, M., Nador, G., Nichelatti, M., Tedeschi, A., Vismara, E., Morra, E. "Outcome of hyperleukocytic adult acute myeloid leukaemia: a single-center retrospective study and review of literature." *Leuk. Res.* 32 (2008) 1221-1227
- Marchion, D.C., Bicaku, E., Daud, A.I., Richon, V., Sullivan, D.M., Munster, P.N. "Sequence-Specific Potentiation of Topoisomerase II Inhibitors by the Histone Deacetylase Inhibitor Suberoylanilide Hydroxamic Acid." *J. Cell. Biochem.* 92 (2004) 223-237
- Marks, P.A., Breslow, R. "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 84-90
- Marquard, L., Gjerdrum, L.M., Christensen, I.J., Jensen, P.B., Sehested, M., Ralfkiaer, E. "Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma" *Histopathology* 53 (2008) 267-277
- Martínez-Iglesias, O., Ruiz-Llorente, L., Sánchez-Martínez, R., García, L., Zambrano, A., Aranda, A. "Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer." *Clin. Transl. Oncol.* 10 (2008) 395-398

- Matsouka, P., Pagoni, M., Zikos, P., Giannakoulas, N., Apostolidis, I., Asprogeraka, T., Arvanitopoulou, E., Spanoudakis, E., Kotsianidis, I., Tsatalas, K., Papaioannou, M., Marinakis, T., Skandali, A., Viniou, N., Yataganas, X., Bakiri, M. "Addition of cyclosporin-A to chemotherapy in secondary (post-MDS) AML in the elderly. A multicenter randomized trial of the Leukemia Working Group of the Hellenic Society of Hematology." *Ann. Hematol.* 85 (2006) 250-256
- McFadyen, M.C., McLeod, H.L., Jackson, F.C., Melvin, W.T., Doehmer, J., Murray, G.I. "Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance." *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 207-212
- Michieli, M., Damiani, D., Ermacora, A., Masolini, P., Raspadori, D., Visani, G., Scheper, R.J., Baccarani, M. "P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance associated protein in de novo acute non-lymphocytic leukaemias: biological and clinical implications." *Br. J. Haematol.* 104 (1999) 328-335
- Mickley, L.A., Bates, S.E., Richert, N.D., Currier, S., Tanaka, S., Foss, F., Rosen, N., Fojo, A.T. "Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents." *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 18031-18040
- Mompalmer, R.L., Eliopoulos, N., Bovenzi, V., Létourneau, S., Greenbaum, M., Cournoyer, D. "Resistance to cytosine arabinoside by retrovirally mediated gene transfer of human cytidine deaminase into murine fibroblast and hematopoietic cells." *Cancer Gene Ther.* 3 (1996) 331-338
- Morita, S.Y., Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Kioka, N., Handa, T., Arai H., Matsuo, M., Ueda, K. "Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4." *Hepatology* 46 (2007) 188-199
- Mottet, D., Castronovo, V. "Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy." *Clin. Exp. Metastasis* 25 (2008) 183-189
- Nagata, S. "DNA degradation in development and programmed cell death." *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 853-875
- Neff, T., Blau, C.A. „Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine." *Exp. Hematol.* 24 (1996) 1340-1346
- Nies, A.T., Keppler, D. "The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2)." *Pflugers Arch.* 453 (2007) 643-659
- Norris, M.D., Smith, J., Tanabe, K., Tobin, P., Flemming, C., Scheffer, G.L., Wielinga, P., Cohn, S.L., London, W.B., Marshall, G.M., Allen, J.D., Haber, M. "Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro." *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 547-553
- Odenike, O.M., Alkan, S., Sher, D., Godwin, J.E., Huo, D., Brandt, S.J., Green, M., Xie, J., Zhang, Y., Vesole, D.H., Stiff, P., Wright, J., Larson, R.A., Stock, W. "Histone deacetylase inhibitor romidepsin has differential activity in core binding factor acute myeloid leukemia." *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 7095-7101

- Office for National Statistics “Cancer statistics – registrations, England, 2006. Series MB1 no. 37.” (<http://www.statistics.gov.uk/statbase/Product.asp?vlnk=8843>), Office for National Statistics, London, 2008
- Oguri, T., Achiwa, H., Sato, S., Bessho, Y., Takano, Y., Miyazaki, M., Muramatsu, H., Maeda, H., Niimi, T., Ueda, R. “The determinants of sensitivity and acquired resistance to gemcitabine differ in non-small cell lung cancer: a role of ABCC5 in gemcitabine sensitivity.” *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1800-1806
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. “Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients.” *Int. J. Cancer* 112 (2004) 26–32
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., Sarkadi, B. “Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 111-117
- Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Mrózek, K., Chen, H., Kittles, R.A., Vukosavljevic, T., Perrotti, D., Vardiman, J.W., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Larson, R.A., Bloomfield, C.D.; Cancer and Leukemia Group B. “Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study.” *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 3904-3911
- Paterson, J.K., Shukla, S., Black, C.M., Tachiwada, T., Garfield, S., Wincovitch, S., Ernst, D.N., Agadir, A., Li, X., Ambudkar, S.V., Szakacs, G., Akiyama, S., Gottesman, M.M. “Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane.” *Biochemistry* 46 (2007) 9443-9452
- Peltonen K., Kiviharju T.M., Järvinen P.M., Ra R., Laiho M. “Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis.” *Pigment Cell Res.* 18 (2005) 196-202
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T.D., Gohongi, T., di Tomaso, E., Brown, E.B., Izumi, Y., Campbell, R.B., Berk, D.A., Jain, R.K. “Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 4628-4633
- Prulière-Escabasse, V., Planès, C., Escudier, E., Fanen, P., Coste, A., Clerici, C. “Modulation of epithelial sodium channel trafficking and function by sodium 4-phenylbutyrate in human nasal epithelial cells.” *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 34048-34057
- Rankin, E.B., Giaccia, A.J. “The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis.” *Cell Death Differ.* 15 (2008) 678-685
- Ravandi, .F, Estey, E., Jones, D., Faderl, S., O'Brien, S., Fiorentino, J., Pierce, S., Blamble, D., Estrov, Z., Wierda, W., Ferrajoli, A., Verstovsek, S., Garcia-Manero, G., Cortes, J., Kantarjian, H. “Effective treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin.” *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 504-510

- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., Borst, P. "Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5." *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 1094-1103
- Ries, L.A.G., Melbert, D., Krapcho, M., Stinchcomb, D.G., Howlader, N., Horner, M.J., Mariotto, A., Miller, B.A., Feuer, E.J., Altekruse, S.F., Lewis, D.R., Clegg, L., Eisner, M.P., Reichman, M., Edwards, B.K. (Hrsg.). "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005." (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/), National Cancer Institute, Bethesda, MD, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2008
- Rikimaru, T., Taketomi, A., Yamashita, Y., Shirabe, K., Hamatsu, T., Shimada, M., Maehara, Y. "Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma." *Oncology* 72 (2007) 69-74
- Robey, R.W., Zhan, Z., Piekarz, R.L., Kayastha, G.L., Fojo, T., Bates, S.E. "Increased MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from patients receiving depsipeptide (FR901228, FK228, NSC630176)." *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1547-1555
- Robey, R.W., Polgar, O., Deeken, J., To, K.W., Bates, S.E. "ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance." *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 39-57
- Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M., Toi, M. "Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer" *Oncogene* 24 (2005) 4531-4539
- Sanz, M.A., Vellenga, E., Rayón, C., Díaz-Mediavilla, J., Rivas, C., Amutio, E., Arias, J., Debén, G., Novo, A., Bergua, J., de la Serna, J., Bueno, J., Negri, S., Beltrán de Heredia, J.M., Martín, G. "All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia." *Blood* 104 (2004) 3490-3493
- Scharenberg, C.W., Harkey, M.A., Torok-Storb, B. "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." *Blood* 99 (2002) 507-512
- Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R.C., Kupper, T.S., Sayegh, M.H., Frank, M.H. "Identification of cells initiating human melanomas." *Nature* 451 (2008) 345-349
- Schmidt, M., Bastians, H. „Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs." *Drug Resist. Updat.* 10 (2007) 162-181
- Schröder, J.K., Seidemann, M., Kirch, H.C., Seeber, S., Schütte, J. "Assessment of resistance induction to cytosine arabinoside following transfer and overexpression of the deoxycytidylate deaminase gene in vitro." *Leuk. Res.* 22 (1998) 619-624

- Seo, T., Urasaki, Y., Ueda, T. "Establishment of an arsenic trioxide-resistant human leukemia cell line that shows multidrug resistance." *Int. J. Hematol.* 85 (2007) 26-31
- Shack, S., Miller, A., Liu, L., Prasanna, P., Thibault, A., Samid, D. "Vulnerability of multidrug-resistant tumor cells to the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate." *Clin. Cancer Res.* 2 (1996) 865-872
- Shiozawa, K., Nakanishi, T., Tan, M., Fang, H.B., Wang, W.C., Edelman, M.J., Carlton, D., Gojo, I., Sausville, E.A., Ross, D.D. "Preclinical studies of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) combined with cytosine arabinoside and etoposide for treatment of acute leukemias." *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 1698-1707
- Smith, A.J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabo, K., Welker, E., Szakacs, G., Varadi, A., Sarkadi, B., Borst, P. "MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping." *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23530-23539
- Smith, K.T., Workman, J.L. "Histone deacetylase inhibitors: anticancer compounds." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 21-25
- Solary, E., Witz, B., Caillot, D., Moreau, P., Desablens, B., Cahn, J.Y., Sadoun, A., Pignon, B., Berthou, C., Maloisel, F., Guyotat, D., Casassus, P., Ifrah, N., Lamy, Y., Audhuy, B., Colombat, P., Harousseau, J.L. "Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study." *Blood* 88 (1996) 1198-1205
- Steinbach, D., Wittig, S., Cario, G., Viehmann, S., Mueller, A., Gruhn, B., Haefer, R., Zintl, F., Sauerbrey, A. "The multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) is associated with a poor outcome in childhood ALL and may account for the worse prognosis in male patients and T-cell immunophenotype." *Blood* 102 (2003) 4493-4498
- Steinbach, D., Gillet, J.P., Sauerbrey, A., Gruhn, B., Dawczynski, K., Bertholet, V., de Longueville, F., Zintl, F., Remacle, J., Efferth, T. "ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia." *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 4357-4363
- Stewart, C.F., Leggas, M., Schuetz, J.D., Panetta, J.C., Cheshire, P.J., Peterson, J., Daw, N., Jenkins, J.J. 3rd, Gilbertson, R., Germain, G.S., Harwood, F.C., Houghton, P.J. "Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice." *Cancer Res.* 64 (2004) 7491-7499
- Stieger, B., Meier, Y., Meier, P.J. "The bile salt export pump." *Pflugers Arch.* 453 (2007) 611-620
- Stöckel, B., König, J., Nies, A.T., Cui, Y., Brom, M., Keppler, D. "Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene." *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 1347-1358

- Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., Gottesman M.M. "Targeting multidrug resistance in cancer." *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 219-234
- Tabe, Y., Konopleva, M., Contractor, R., Munsell, M., Schober, W.D., Jin, L., Tsutsumi-Ishii, Y., Nagaoka, I., Igari, J., Andreeff, M. "Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells." *Blood* 107 (2006) 1546-1554
- Tallman, M.S. "Treatment of relapsed or refractory acute promyelocytic leukemia." *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 20 (2007) 57-65
- Tallman, M.S., Abutalib, S.A., Altman, J.K. "The double hazard of thrombophilia and bleeding in acute promyelocytic leukemia." *Semin. Thromb. Hemost.* 33 (2007) 330-338
- Tian, Q., Zhang, J., Tan, T.M., Chan, E., Duan, W., Chan, S.Y., Boelsterli, U.A., Ho, P.C., Yang, H., Bian, J.S., Huang, M., Zhu, Y.Z., Xiong, W., Li, X., Zhou, S. "Human multidrug resistance associated protein 4 confers resistance to camptothecins." *Pharm. Res.* 22 (2005) 1837-1853
- Tian, Q., Zhang, J., Chan, S.Y., Tan, T.M., Duan, W., Huang, M., Zhu YZ, Chan, E, Yu, Q., Nie, Y.Q., Ho, P.C., Li, Q., Ng, K.Y. Yang, H.Y., Wei, H., Bian, J.S., Zhou, S.F. "Topotecan is a substrate for multidrug resistance associated protein 4." *Curr. Drug Metab.* 7 (2006) 105-118
- To, K.K., Polgar, O., Huff, L.M., Morisaki, K., Bates, S.E. "Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells." *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 151-164
- Toyoda, Y., Hagiya, Y., Adachi, T., Hoshijima, K., Kuo, M.T., Ishikawa, T. "MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions." *Xenobiotica* 38 (2008) 833-862
- Trock, B.J., Leonessa, F., Clarke, R. "Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance." *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 917-931
- Uggla, B., Ståhl, E., Wågsäter, D., Paul, C., Karlsson, M.G., Sirsjö, A., Tidefelt, U. "BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients." *Leuk. Res.* 29 (2005) 141-146
- van der Kolk, D.M., de Vries, E.G., van Putten, W.J., Verdonck, L.F., Ossenkoppele, G.J., Verhoef, G.E., Vellenga, E. "P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia." *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 3205-3214
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P. „Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* 31 (1998) 1-9
- Vardiman, J.W., Harris, N.L., Brunning, R.D. "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." *Blood* 100 (2002) 2292-2302

- Walkinshaw, D.R., Yang, X.J. "Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics." *Curr. Oncol.* 15 (2008) 237-243
- Wattel, E., Solary, E., Hecquet, B., Caillot, D., Ifrah, N., Brion, A., Mahé, B., Milpied, N., Janvier, M., Guerci, A., Rochant, H., Cordonnier, C., Dreyfus, F., Buzyn, A., Hoang-Ngoc, L., Stoppa, A.M., Gratecos, N., Sadoun, A., Stamatoulas, A., Tilly, H., Brice, P., Maloisel, F., Lioure, B., Desablens, B., Pignon, B., Abgrall, J.P., Leporrier, M., Dupriez, B., Guyotat, D., Lepelley, P., Fenaux, P. "Quinine improves the results of intensive chemotherapy in myelodysplastic syndromes expressing P glycoprotein: results of a randomized study." *Br. J. Haematol.* 102 (1998) 1015-1024
- Weichert, W. "HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies." *Cancer Lett.* (2008) doi:10.1016/j.canlet.2008.10.047
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Stephan, C., Jung, K., Fritzsche, F.R., Niesporek, S., Denkert, C., Dietel, M., Kristiansen, G. "Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy" *Br. J. Cancer* 98 (2008) 604–610
- Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M.P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C., Röcken, C. "Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis" *Lancet Oncol.* 9 (2008) 139–148
- Weichert, W., Röske, A., Niesporek, S., Noske, A., Buckendahl, A.C., Dietel, M., Gekeler, V., Boehm, M., Beckers, T., Denkert, C. "Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of Class I histone deacetylases in vitro and in vivo" *Clin. Cancer. Res.* 14 (2008) 1669–1677
- Weichert, W., Denkert, C., Noske, A., Darb-Esfahani, S., Dietel, M., Kalloger, S.E., Huntsman, D.G., Köbel, M. "Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas." *Neoplasia* 10 (2008) 1021–1027
- Wouters, B.J., Löwenberg, B., Delwel, R. "A decade of genome-wide gene expression profiling in acute myeloid leukemia: flashback and prospects." *Blood* 113 (2009) 291-298
- Xiao, J.J., Foraker, A.B., Swaan, P.W., Liu, S., Huang, Y., Dai, Z., Chen, J., Sadée, W., Byrd, J., Marcucci, G., Chan, K.K. "Efflux of depsipeptide FK228 (FR901228, NSC-630176) is mediated by P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313 (2005) 268-276
- Yagüe, E., Armesilla, A.L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C.F., Raguz, S. "P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation." *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10344-10352

- Yuan, J.H., Cheng, J.Q., Jiang, L.Y., Ji, W.D., Guo, L.F., Liu, J.J., Xu, X.Y., He J.S., Wang, X.M., Zhuang, Z.X. "Breast Cancer Resistance Protein Expression and 5-Fluorouracil Resistance." *Biomed. Environ. Sci.* 21 (2008) 290-295
- Yuan, J., Lv, H., Peng, B., Wang, C., Yu, Y., He, Z. "Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer." *Cancer Chemother. Pharmacol.* 63 (2009) 1103-1110
- Zhang J., Visser F., King K.M., Baldwin S.A., Young J.D., Cass C.E. "The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs." *Cancer Metastasis Rev.* 26 (2007) 85-110
- Zhou, S.F. "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition." *Xenobiotica* 38 (2008) 802-832
- Zhou, S.F., Wang, L.L., Di, Y.M., Xue, C.C., Duan, W., Li, C.G., Li, Y. "Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development." *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 1981-2039

6.2 Bücherverzeichnis

Kebriaei, P., de Lima, M., Estey, E.
 "Management of Acute Leukemias."
 In: "Cancer: Principles & Practice of Oncology",
 DeVita, Jr.V.T., Lawrence, T.S., Rosenberg, S.A. (Hrsg.), Lippincott Williams & Wilkins,
 Philadelphia, 2008, 8. Auflage, 2232-2266

6.3 Internetverzeichnis, Websites

The U.S. National Institutes of Health
 ClinicalTrials.gov (<http://clinicaltrials.gov>)
 Suchbegriffe: "hdac inhibitors", "mgcd0103", "phenylbutyrate"
 Zugriff am 30.04.2009

7 Anhang

In Zusammenhang mit Chemoresistenz beschriebene ABC-Transporter, ihre Substrate und Lokalisation im menschlichen Körper

Name und Synonyme	Substrate/Resistenzprofil		Organ	Referenzen ^a
	Chemotherapeutika	andere		
ABCB1, MDR1, PGP,	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Actinomycin D, Bisantrin, Mitoxantron, Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposid, Teniposid, Irinotecan, SN-38 (zytotoxischer Metabolit von Irinotecan), Topotecan, Methotrexat, Imatinib (STI 571), Romidepsin (FK228)	neutrale und kationische organische Verbindungen: Colchicin, Atorvastatin, Celiprolol, Digoxin, Digitoxin, Losartan, Amprenavir, Saquinavir, Erythromycin, Levofloxacin, Ivermectin, Cimetidin, Lansoprazol, Amitriptylin, Domperidon, Loperamid, Ondansetron, Vecuronium, Methylprednisolon, Dexamethason, Morphin, Phenytoin, Tacrolimus, u.v.m.	Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere, Plazenta, Blut-Hirnschranke, Lunge, Blut-Hodenschranke, adulte Stammzellen, bestimmte reife Zellen des Immunsystems	1–3, 12, 26, 40, 41
ABCB2, TAP1	Mitoxantron (als Heterodimer zusammen mit TAP2)	Peptide zur HLA-Klasse-I-Antigenpräsentation (als Heterodimer zusammen mit TAP2)	alle Organe	35, 36
ABCB3, TAP2	Mitoxantron (als Heterodimer zusammen mit TAP1)	Peptide zur HLA-Klasse-I-Antigenpräsentation (als Heterodimer zusammen mit TAP1)	alle Organe	35, 36
ABCB4, MDR3	Daunorubicin, Vinblastin, Paclitaxel	Phosphatidylcholin, Cholesterol, Digoxin, Ivermectin	Leber	1, 2, 14, 15
ABCB5	Doxorubicin, (Camptothecin ?, 5-Fluoruracil ?)	Rhodamin 123	Melanozyten, Zellen des retinalen Pigmentepithels	35, 37, 38
ABCB6, MTABC3	(Camptothecin ?, Cisplatin ?)	Porphyrine, z.B. Pheophorbid a, (Arsenik ?)	Erythrozyten	35, 39
ABCB11, SPGP, BSEP	Vinblastin, (Paclitaxel ?)	Konjugierte und unkonjugierte Gallensäuren, Pravastatin	Leber	1, 2, 29, 30

^a (1) Gottesman et al. 2002; (2) Szakács et al. 2006; (3) Zhou 2008; (12) Dietrich et al. 2003; (14) Smith et al. 2000; (15) Morita et al. 2007; (26) Bessho et al. 2009; (29) Lecureur et al. 2000; (30) Stieger et al. 2007; (35) Lage 2008; (36) Lage et al. 2001; (37) Frank et al. 2005; (38) La Porta 2008; (39) Paterson et al. 2007; (40) Haslam et al. 2008; (41) Glaser 2007

In Zusammenhang mit Chemoresistenz beschriebene ABC-Transporter, ihre Substrate und Lokalisation im menschlichen Körper

Name und Synonyme	Substrate/Resistenzprofil		Organ	Referenzen ^a
	Chemotherapeutika	andere		
ABCG2, BCRP, MXR, ABCP	Doxorubicin*, Daunorubicin*, Epirubicin*, Bisantren, Mitoxantron, Etoposid, Teniposid, Irinotecan, SN-38, Topotecan, Diflomotecan, Methotrexat [†] , Methotrexat -di ⁺ - und triglutamat [†] , Imatinib (STI 571), Flavopiridol, Gefitinib, Erlotinib, Cladribin, Clofarabin, Fludarabin, 6-Mercaptopurin, Raltitrexed, (6-Thioguanin ?), Gemcitabin ?, 5-Fluoruracil ?)	Sulfatierte Östrogene, Flavonoide, Riboflavin, Triglutamat, Protoporphyrin IX, Pheophorbid a, cGMP, Prazosin, Zidovudin, Lamivudin, Abacavir, Nelfinavir, PMEPA, Pyrimethamin*, Sulfasalazin, Ciprofloxacin, Nitrofurantoin, Dipyridamol, Leflunomid, Olmesartan, Pitavastatin, Glibenclamid, u.v.m.	Gastrointestinaltrakt, Leber, Niere, Plazenta, Brustdrüse, Blut-Hirnschranke, Lunge, Prostata, Endothel von Venen und Kapillaren	1, 2, 4–10, 16
ABCC1, MRP1	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Mitoxantron, Vincristin, Vinblastin, Etoposid, Irinotecan, SN-38, Methotrexat, Imatinib, Cyclophosphamid, Arsenik, Romidepsin (FK228)	glukuronidierte und sulfatierte organische Anionen, z.B. glukuronidierte/sulfatierte Östrogene, konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin, Glutathion, Leukotrien C ₄ , Colchicin, Saquinavir, Ritonavir, Difloxacin, Grepafloxacin, u.v.m.	alle Organe	1, 2, 11, 16, 34, 43
ABCC2, MRP2, cMOAT	Doxorubicin, Epirubicin, Vincristin, Vinblastin, Mitoxantron, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposid, Irinotecan, SN-38, Topotecan, Methotrexat, Cisplatin, Arsenik	organische Anionen (v.a. mit Glutathion/Sulfat/Glukuronat konjugierte lipophile Substanzen), Glutathion, glukuronidierte/sulfatierte Östrogene, sulfatierte Gallensäuren, Bilirubin-Glukuronide, Cholezystokinin, Cysteinyl-Leukotriene, Saquinavir, Ceftriaxon, Grepafloxacin, Rifampicin, GSH-Chlorambucil, GSH-Ethacrynsäure, Pravastatin, Temocapril, Diclofenac, Acetaminophen, u.v.m.	Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Bronchi, Plazenta	1, 2, 11–13, 16
ABCC3, MRP3	Etoposid, Teniposid, Methotrexat, (Vincristin ?)	Glukuronat- und Glutathion-Konjugate, z.B. glukuronidierte Östrogene, Bilirubin-Glukuronide, Leukotrien C ₄ , Gallensäuren, Morphin-Glukuronide, konjugiertes Acetaminophen, u.v.m.	Leber, Niere, Pankreas, Milz, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt, Plazenta, Tonsillen	1, 2, 16, 17

^a (1) Gottesman et al. 2002; (2) Szakács et al. 2006; (4) Krishnamurthy und Schuetz 2006; (5) Bram et al. 2006; (6) Robey et al. 2007; (7) de Wolf et al. 2008; (8) Cusatis und Sparreboom 2008; (9) Yuan et al. 2008; (10) Yuan et al. 2009; (11) Seo et al. 2007; (12) Dietrich et al. 2003; (13) Nies und Keppler 2007; (16) Gradhand und Kim 2008; (17) Borst et al. 2007; (34) Zhou et al. 2008; (43) Xiao et al. 2005

*diese Substanzen können nur von mutiertem ABCG2 transportiert werden (Glycin oder Threonin anstelle von Arginin an Position 482 des ABCG2-Proteins)

[†]Methotrexat kann nur von Wildtyp-Protein (mit Arginin an Position 482) transportiert werden

In Zusammenhang mit Chemoresistenz beschriebene ABC-Transporter, ihre Substrate und Lokalisation im menschlichen Körper

Name und Synonyme	Substrate/Resistenzprofil		Organ	Referenzen ^a
	Chemotherapeutika	andere		
ABCC4, MRP4	Irinotecan, SN-38, Topotecan, Rubitecan, Methotrexat, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Cladribin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, (Vincristin ?)	cAMP, cGMP, organische Anionen, Gallensäuren, glukuronidierte Östrogene, Dehydroepiandrosteron-Sulfat, Harnsäure, Folsäure, Leucovorin, Prostaglandine, Zidovudin, Abacavir, PMEAs, Adefovir dipivoxil, Ganciclovir, p-Aminohippursäure, Resveratrol, Hydrochlorothiazid, Furosemid, u.v.m.	Leber, Niere, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Blut-Hirn-Schranke, Lunge, Ovar, Hoden, Prostata, Lymphozyten, Thrombozyten	1, 2, 16–20, 34
ABCC5, MRP5	Methotrexat, Methotrexat-diglutamat, Pemetrexed, Raltitrexed, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, 5-Fluoruracil, Cladribin, (Cisplatin ?, Oxaliplatin ?, Cytarabin ?, Gemcitabin ?)	cAMP, cGMP, organische Anionen, Folsäure, Zidovudin, Abacavir, Alaninyl-d4TMP, PMEAs, Adefovir dipivoxil, Quercetin, Resveratrol, Cadmiumchlorid, Kaliumantimonyltartrat	Leber, Blut-Hirn-Schranke, Gehirn, Herz, Muskeln, Blutgefäße, Urogenitaltrakt, Plazenta	1, 2, 16, 17, 21–23, 34
ABCC6, MRP6	Doxorubicin, Daunorubicin, Actinomycin D, Etoposid, Teniposid, Cisplatin	Glutathion-Konjugate von N-Ethylmaleimid und Dinitrophenol, Leukotrien C ₄ , BQ123 (= Endothelin-Rezeptorantagonist)	Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Gehirn, Lunge, Haut, Gefäße, Herz, u.v.m.	1, 2, 24, 25
ABCC10, MRP7	Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Paclitaxel, Docetaxel, Cytarabin, Gemcitabin, 5-Azacytidin, Etoposid B	Glukuronidierte Östrogene, Leukotrien C ₄ , PMEAs, Zalcitabin (= ddC)	Pankreas, Leber, Niere, Lunge, Milz, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Plazenta, Ovar, Hoden, Prostata, Kolon, Herz, Muskeln, Leukozyten, u.v.m.	23, 26, 27
ABCC11, MRP8	Methotrexat, 5-Fluoruracil, Cytarabin	cAMP, cGMP, glukuronidierte/sulfatierte Östrogene, Dehydroepiandrosteron-Sulfat, Gallensäuren, S-(2,4-dinitrophenyl)-GSH, Folsäure, Leukotrien C ₄ , PMEAs, Zalcitabin (= ddC)	Leber, zentrales und peripheres Nervensystem, Plazenta, Brustdrüse, Hoden, u.v.m.	23, 28, 42
ABCA2	Estramustin, Mitoxantron	Sphingolipide	Gehirn, Monozyten	1, 2, 31
ABCA3	Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron, Vincristin, Etoposid, Cytarabin	Surfactant-Lipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidylglycerol)	Lunge, Gehirn, Schilddrüse, Hoden	31, 32, 33

^a (1) Gottesman et al. 2002; (2) Szakács et al. 2006; (16) Gradhand und Kim 2008; (17) Borst et al. 2007; (18) Leggas et al. 2004; (19) Tian et al. 2005; (20) Tian et al. 2006; (21) Oguri et al. 2006; (22) Hagmann et al. 2009; (23) Kruh et al. 2007; (24) Belinsky et al. 2002; (25) Beck et al. 2005; (26) Bessho et al. 2009; (27) Hopper-Borge et al. 2009; (28) Toyoda et al. 2008; (31) Kim et al. 2008a; (32) Steinbach et al. 2006; (33) Chapuy et al. 2008; (34) Zhou et al. 2008; (42) Guo et al. 2009

ClinicalTrials.gov

Suchbegriff: "hdac inhibitors"

Search of: hdac inhibitors | Open Studies - List Results - ClinicalTrials.gov <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hdac+inhibitors&recr=Open>

ClinicalTrials.gov
A service of the U.S. National Institutes of Health

[Home](#) [Search](#) [Study Topics](#) [Glossary](#)

[List Results](#) [Refine Search](#) [Results by Topic](#) [Results on Map](#) [Search Del](#)

Found 53 studies with search of: hdac inhibitors | Open Studies

[Include studies that are not seeking new volunteers.](#) [+ Display Options](#)

Rank	Status	Study
1	Recruiting	Study of Vorinostat (MK0683) an HDAC Inhibitor, or Placebo in Combination With Bortezomib in Patients With Multiple Myeloma Condition: Multiple Myeloma Interventions: Drug: Comparator: vorinostat (an HDAC inhibitor); Drug: Comparator: bortezomib
2	Recruiting	Study of Vorinostat (MK0683), an HDAC Inhibitor, in Combination With Bortezomib in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma Condition: Relapsed or Refractory Multiple Myeloma Interventions: Drug: Comparator: vorinostat (HDAC inhibitor); Drug: Comparator: bortezomib; Drug: Comparator: dexamethasone
3	Recruiting	HDAC Inhibitor Valproic Acid as an Effective Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia Condition: Chronic Lymphocytic Leukemia Intervention: Drug: Valproic acid & fludarabine
4	Recruiting	HDAC Inhibitor Vorinostat (SAHA) With Capecitabine (Xeloda) Using a New Weekly Dose Regimen for Advanced Breast Cancer Condition: Advanced Breast Cancer Intervention: Drug: Vorinostat
5	Recruiting	Proteasome Inhibitor NPI-0052 and Vorinostat in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer, Pancreatic Cancer, Melanoma or Lymphoma Conditions: Non-Small Cell Lung Cancer; Pancreatic Cancer; Melanoma; Lymphoma Intervention: Drug: NPI-0052 + vorinostat
6	Recruiting	A Study of the Efficacy of MK-0683 in Patients With Polycythaemia Vera and Essential Thrombocythaemia Conditions: Polycythemia Vera; Essential Thrombocythemia Intervention: Drug: HDAC inhibitor (MK-0683)
7	Recruiting	Study of Oral LBH589 in Adult Patients With Refractory/Resistant Cutaneous T-Cell Lymphoma Condition: Cutaneous T-Cell Lymphoma Intervention: Drug: LBH589
8	Recruiting	Trial for Locally Advanced Her2 Positive Breast Cancer Using Paclitaxel, Trastuzumab, Doxorubicin and Cyclophosphamide on a Weekly Basis Condition: Breast Cancer Interventions: Drug: Vorinostat; Drug: Paclitaxel; Drug: Trastuzumab; Drug: Doxorubicin; Drug: Cyclophosphamide; Procedure: Mastectomy or Lumpectomy; Drug: Post surgery therapy (Trastuzumab)
9	Not yet recruiting	Broccoli Sprout Extract in Treating Women With Newly Diagnosed Ductal Carcinoma In Situ and/or Atypical Ductal Hyperplasia Conditions: Breast Cancer; Precancerous/Nonmalignant Condition Interventions: Dietary Supplement: broccoli sprout extract; Other: placebo

1 von 3 30.04.2009 11:26

- 10 **Recruiting** [SB939 in Treating Patients With Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors](#)
 Condition: Unspecified Adult Solid Tumor, Protocol Specific
 Interventions: Drug: HDAC inhibitor SB939; Other: immunoenzyme technique;
 Other: immunohistochemistry staining method;
 Other: immunologic technique; Other: laboratory biomarker analysis;
 Other: liquid chromatography; Other: mass spectrometry;
 Other: pharmacological study
- 11 **Recruiting** [Phase II Trial of SAHA & Tamoxifen for Patients With Breast Cancer](#)
 Condition: Breast Cancer
 Interventions: Drug: suberoylanilide hydroxamic acid; Drug: tamoxifen citrate
- 12 **Recruiting** [5-Azacytidine Valproic Acid and ATRA in AML and High Risk MDS](#)
 Conditions: Acute Myelogenous Leukaemia (AML); Myelodysplastic Syndrome (MDS)
 Intervention: Drug: 5 azacytidine - Valproic acid- Retinoic acid
- 13 **Recruiting** [A Phase III Study of Paclitaxel Plus Carboplatin Plus Vorinostat in Recurrent Ovarian Cancer](#)
 Condition: Ovarian Cancer
 Intervention: Drug: Paclitaxel, Carboplatin and Vorinostat
- 14 **Recruiting** [Belinostat in Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma](#)
 Condition: Peripheral T-Cell Lymphoma
 Intervention: Drug: PXD101
- 15 **Recruiting** [Dose-Escalating Study of LBH589 in Adult Patients With Advanced Solid Tumors](#)
 Conditions: Cancer; Advanced Solid Tumor
 Intervention: Drug: LBH589
- 16 **Not yet recruiting** [A Trial I of Panobinostat Given in Combination With Trastuzumab and Paclitaxel in Adult Female Patients With HER2 Positive Metastatic Breast Cancer](#)
 Conditions: HER2 Positive; Metastatic Breast Cancer
 Intervention: Drug: panobinostat in combination with trastuzumab and paclitaxel
- 17 **Recruiting** [A Phase I Dose Escalation Study of Oral SB939](#)
 Conditions: Solid Tumors; Hematologic Malignancies
 Intervention: Drug: SB939
- 18 **Recruiting** [A Trial of Panobinostat and Trastuzumab for Adult Female Patients With HER2 Positive Metastatic Breast Cancer Whose Disease Has Progressed on or After Trastuzumab](#)
 Condition: Breast Cancer
 Intervention: Drug: LBH589/panobinostat
- 19 **Not yet recruiting** [Vorinostat in Combination With Palliative Radiotherapy for Patients With Non-Small Cell Lung Cancer](#)
 Condition: Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)
 Interventions: Drug: Vorinostat; Radiation: Radiotherapy
- 20 **Recruiting** [Safety Study of Nicotinamide to Treat Alzheimer's Disease](#)
 Condition: Alzheimer's Disease
 Interventions: Drug: Nicotinamide; Drug: Enduramide placebo

◀ Previous Page Studies Shown (1-20) [Next Page \(21-40\)](#) ▶

Save this search by bookmarking this page.
 When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

 [RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days](#)

 [Download Options](#)

[List Results](#)
[Refine Search](#)
[Results by Topic](#)
[Results on Map](#)
[Search Del](#)

 Found 53 studies with search of: **hdac inhibitors | Open Studies**
[Include studies that are not seeking new volunteers.](#)
[+ Display Options](#)

Rank	Status	Study
21	Recruiting	LBH589 Treatment for Refractory Clear Cell Renal Carcinoma Condition: Renal Cell Carcinoma Intervention: Drug: LBH589
22	Not yet recruiting	Depletion of Latent HIV in CD4 Cells Condition: HIV Infections Interventions: Drug: Valproic Acid; Drug: raltegravir
23	Recruiting	Safety Study of the Histone Deacetylase Inhibitor, CHR-3996, in Patients With Advanced Solid Tumours Condition: Solid Tumor Intervention: Drug: CHR-3996
24	Recruiting	Safety and Tolerability of CHR-2845 to Treat Haematological Diseases or Lymphoid Malignancies Conditions: Hematological Disease; Lymphoid Malignancies Intervention: Drug: CHR-2845
25	Recruiting	Phase II Trial of the Histone-Deacetylase Inhibitor ITF2357 Followed by Mechlorethamine in Relapsed/Refractory Hodgkin's Lymphoma Patients Condition: Hodgkin's Lymphoma Intervention: Drug: ITF2357
26	Recruiting	Sorafenib and LBH589 in Hepatocellular Carcinoma (HCC) Condition: Hepatocellular Carcinoma Intervention: Drug: Sorafenib + LBH589
27	Recruiting	Phase VII Study of LBH589 & Erlotinib for Advanced Aerodigestive Tract Cancers Conditions: Lung Cancer; Head and Neck Cancer Interventions: Drug: LBH589; Drug: erlotinib
28	Recruiting	A Safety and Dose-Finding Study of JNJ-26481585 for Patients With Advanced of Refractory Leukemia or Myelodysplastic Syndrome. Conditions: Leukemia, Myeloid, Acute; Precursor Cell Lymphoblastic Leukemia-Lymphoma; Leukemia, Myelogenous, Chronic, BCR-ABL Positive; Myelodysplastic Syndromes; Leukemia, Lymphocytic, Chronic, B-Cell Intervention: Drug: JNJ-26481585.
29	Recruiting	Study of the Safety and Tolerability of PCI-24781 in Patients With Lymphoma Conditions: Lymphoma; Hodgkin Disease; Lymphoma, Non-Hodgkin Intervention: Drug: PCI-24781
30	Not yet recruiting	Safety and Efficacy Studies of Panobinostat and Bicalutamide in Patients With Recurrent Prostate Cancer After Castration Conditions: Prostate Cancer; Prostatic Neoplasms Interventions: Drug: Panobinostat + bicalutamide; Drug: Panobinosts+ bicalutamide; Drug: Panibinostat + bicalutamide
31	Recruiting	Vorinostat and Palliative Radiotherapy Conditions: Pelvic Cancer; Radiotherapy Intervention: Drug: Vorinostat

Search of: hdac inhibitors | Open Studies - List Results - ClinicalTrials.gov <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hdac-inhibitors&recr=Open&pg=2>

- 32 **Recruiting** [Valproic Acid, Temozolomide, and Radiation Therapy in Treating Patients With Glioblastoma Multiforme](#)
 Condition: Brain and Central Nervous System Tumors
 Interventions: Drug: temozolomide; Drug: valproic acid; Procedure: adjuvant therapy; Radiation: radiation therapy
- 33 **Recruiting** [Azacitidine With or Without MS-275 in Treating Patients With Myelodysplastic Syndromes, Chronic Myelomonocytic Leukemia, or Acute Myeloid Leukemia](#)
 Conditions: Leukemia; Myelodysplastic Syndromes
 Interventions: Drug: azacitidine; Drug: entinostat
- 34 **Recruiting** [Vorinostat and Bortezomib as Third-Line Treatment in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer](#)
 Condition: Carcinoma, Non Small Cell Lung
 Interventions: Drug: vorinostat; Drug: bortezomib
- 35 **Recruiting** [PXD101 in Treating Patients With Myelodysplastic Syndromes](#)
 Condition: Myelodysplastic Syndromes
 Intervention: Drug: belinostat
- 36 **Recruiting** [FR901228 in Treating Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma](#)
 Condition: Lymphoma
 Intervention: Drug: romidepsin
- 37 **Recruiting** [Valproic Acid \(Depakote\[Registered Trademark\]\) to Treat Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome \(ALPS\)](#)
 Conditions: ALPS; Hypersplenism; Lymphadenopathy
 Interventions: Drug: Valproic Acid; Procedure: CT Scan; Procedure: Blood Sample
- 38 **Recruiting** [Panobinostat in Treating Patients With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia or Acute Myeloid Leukemia](#)
 Condition: Leukemia
 Interventions: Drug: panobinostat; Genetic: gene expression analysis; Genetic: reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Other: laboratory biomarker analysis
- 39 **Not yet recruiting** [A Phase II Study of MS-275, in Combination With GM-CSF Treating Relapsed and Refractory Myeloid Malignancies](#)
 Conditions: Myelodysplastic Syndrome; Acute Myeloid Leukemia
 Interventions: Drug: MS-275; Drug: GM-CSF
- 40 **Recruiting** [LBH589 and Imatinib in Treating Patients With Previously Treated Chronic Phase Chronic Myelogenous Leukemia](#)
 Condition: Leukemia
 Interventions: Drug: imatinib mesylate; Drug: panobinostat; Genetic: polymerase chain reaction; Genetic: protein expression analysis; Genetic: western blotting; Other: flow cytometry; Other: laboratory biomarker analysis; Other: pharmacological study

[← Previous Page \(1-20\)](#)

Studies Shown (21-40)

[Next Page \(41-53\) →](#)

Save this search by bookmarking this page.

When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

 [RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days](#)

 [Download Options](#)

[U.S. National Library of Medicine](#) [Contact Help Desk](#)
[U.S. National Institutes of Health](#) [U.S. Department of Health & Human Services](#)
[USA.gov](#) [Copyright](#) [Privacy](#) [Accessibility](#) [Freedom of Information Act](#)

Found 53 studies with search of: hdac inhibitors | Open Studies

[Include studies that are not seeking new volunteers.](#)

Rank	Status	Study
41	Recruiting	Hydralazine Valproate for Cervical Cancer Condition: Metastatic Cervical Cancer Interventions: Drug: Hydralazine and magnesium valproate; Drug: Placebo
42	Recruiting	Hydralazine Valproate for Ovarian Cancer Condition: Ovarian Cancer Interventions: Drug: Hydralazine and magnesium valproate; Drug: Placebo
43	Recruiting	Clinical Trial of PXD101 in Patients With T-Cell Lymphomas Conditions: Cutaneous T-Cell Lymphoma; Peripheral T-Cell Lymphoma; Non-Hodgkin's Lymphoma Intervention: Drug: belinostat
44	Recruiting	Vorinostat After Stem Cell Transplant in Treating Patients With High-Risk Lymphoma Conditions: Lymphoma; Small Intestine Cancer Interventions: Drug: vorinostat; Genetic: DNA analysis; Other: immunohistochemistry staining method; Other: immunologic technique; Other: laboratory biomarker analysis
45	Recruiting	Trial of Vorinostat in Combination With Cyclophosphamide, Etoposide, Prednisone and Rituximab for Elderly Patients With Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Conditions: Hodgkin's Disease; Lymphoma Intervention: Drug: rituximab, cyclophosphamide, etoposide, prednisone, vorinostat and QOL questionnaire, peg-filgrastim or filgrastim
46	Recruiting	Study of LBH589 (Panobinostat) to Treat Malignant Brain Tumors Condition: Recurrent Malignant Gliomas Intervention: Drug: Panobinostat
47	Not yet recruiting	Vorinostat in Treating Women With Ductal Carcinoma in Situ of the Breast Condition: Breast Cancer Interventions: Drug: vorinostat; Genetic: protein expression analysis; Other: immunohistochemistry staining method; Other: laboratory biomarker analysis; Procedure: neoadjuvant therapy; Procedure: therapeutic conventional surgery
48	Not yet recruiting	Vorinostat and Pegylated Liposomal Doxorubicin in Relapsed or Refractory Lymphomas Conditions: Relapsed Lymphomas; Refractory Lymphomas Interventions: Drug: Vorinostat; Drug: Pegylated Liposomal Doxorubicin (PLD)
49	Not yet recruiting	Dasatinib (Sprycel™) in Patients With Newly Diagnosed Core Binding Factor (CBF) Acute Myeloid Leukemia (AML) Condition: Acute Myeloid Leukemia (AML) Interventions: Drug: Dasatinib; Drug: daunorubicin; Drug: Cytarabine
50	Recruiting	Clofarabine for Myelodysplastic Syndrome (MDS) Patients Who Failed Vidaza Treatment (tx) Condition: Myelodysplastic Syndromes Interventions: Drug: Clofarabine; Drug: Clofarabine
51	Recruiting	Phase 1b Lymphoma Study of AMG 655 in Combination With Bortezomib or Vorinostat Conditions: Hodgkin's Lymphoma; Low Grade Lymphoma; Lymphoma; Mantle Cell Lymphoma; Non-Hodgkin's Lymphoma;

Search of: hdac inhibitors | Open Studies - List Results - ClinicalTrials.gov <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hdac-inhibitors&recr=Open&pg=3>

Diffuse Large Cell Lymphoma

Interventions: Drug: AMG 655; Other: Vorinostat; Other: Bortezomib

52 **Recruiting** [LBH589 Plus Decitabine for Myelodysplastic Syndromes or Acute Myeloid Leukemia](#)

Conditions: Leukemia, Myeloid, Acute; Myelodysplastic Syndromes

Interventions: Drug: LBH589; Drug: Decitabine

53 **Recruiting** [Valproate and Etoposide for Patients With Neuronal Tumors and Brain Metastases](#)

Conditions: Neuroectodermal Tumor; Brain Metastases

Interventions: Drug: Valproate; Drug: Etoposide

[← Previous Page \(21-40\)](#)

Studies Shown (41-53)

[Next Page →](#)

Save this search by bookmarking this page.

When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

 [RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days](#)

 [Download Options](#)

[U.S. National Library of Medicine - Contact Help Desk](#)
[U.S. National Institutes of Health](#), [U.S. Department of Health & Human Services](#),
[USA.gov](#), [Copyright](#), [Privacy](#), [Accessibility](#), [Freedom of Information Act](#)



ClinicalTrials.gov

Suchbegriff: "mgcd0103"

Search of: mgcd0103 - List Results - ClinicalTrials.gov

http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mgcd0103



List Results

Refine Search

Results by Topic

Results on Map

Search Del

Found 12 studies with search of: mgcd0103

Hide studies that are not seeking new volunteers.

+ Display Options

Rank	Status	Study
1	Terminated	Study to Evaluate Combination Treatment of MGCD0103 and Docetaxel (Taxotere®) for Subjects With Advanced Cancer Tumors Conditions: Breast Cancer; Lung Cancer; Pulmonary Cancer; Non-Small-Cell Lung Carcinoma; Prostate Cancer; Prostatic Cancer; Gastric Cancer; Stomach Cancer Intervention: Drug: MGCD0103 & Docetaxel
2	Terminated	Phase 2 Study of Azacitidine (Vidaza) vs MGCD0103 vs Combination in Elderly Subjects With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia (AML) or Myelodysplastic Syndrome (MDS) Conditions: Acute Myeloid Leukemia (AML); Myelodysplastic Syndrome (MDS) Interventions: Drug: Azacitidine; Drug: MGCD0103; Drug: MGCD0103
3	Completed	A Phase VII Study of MGCD0103 (MG-0103) in Combination With Gemcitabine Condition: Tumors Interventions: Drug: MGCD0103; Drug: Gemcitabine
4	Terminated	MGCD0103 Administered in Combination With Azacitidine (Vidaza®) to Subjects With Relapsed or Refractory Hodgkin or Non-Hodgkin Lymphoma Conditions: Hodgkin Lymphoma; Non-Hodgkin Lymphoma (Follicular or Large Diffuse B-Cell Lymphoma or Mantle Cell Lymphoma) Intervention: Drug: MGCD0103 and Azacitidine
5	Terminated	Study of MGCD0103 (MG-0103) in Patients With Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma Condition: Hodgkin's Lymphoma Intervention: Drug: MGCD0103
6	Completed	A Phase II Study of MGCD0103 (MG-0103) in Patients With Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Condition: Lymphocytic Leukemia, Chronic Intervention: Drug: MGCD-0103
7	Terminated	MGCD0103 in Elderly Patients With Previously Untreated AML/High Risk MDS or Adults With Relapsed/Refractory Disease Conditions: Myelogenous Leukemia, Acute; Myelodysplastic Syndromes Intervention: Drug: MGCD0103
8	Completed	A Phase VII Study of MGCD0103 With Azacitidine in Patients With High-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) or Acute Myelogenous Leukemia Conditions: Myelodysplastic Syndrome; Acute Myelogenous Leukemia Intervention: Drug: MGCD0103
9	Active, not recruiting	Study of MGCD0103 Given Three Times Weekly in Patients With Relapsed and Refractory Lymphoma Condition: Lymphoma Intervention: Drug: MGCD0103
10	Completed	A Phase I Study of MGCD0103 Given Twice Weekly in Patients With Leukemia or Myelodysplastic Syndromes Conditions: Leukemia; Myelodysplastic Syndromes Intervention: Drug: MGCD0103

- 11 **Completed** [A Phase I Study of MGCD0103 Given Three-Times Weekly In Patients With Leukemia Or Myelodysplastic Syndromes](#)
Conditions: Leukemia; Myelodysplastic Syndromes
Intervention: Drug: MGCD0103
- 12 **Completed** [Study of MGCD0103 Given Three-Times Weekly in Patients With Advanced Solid Tumors or Non-Hodgkin's Lymphoma](#)
Conditions: Tumors; Non Hodgkin's Lymphoma
Intervention: Drug: MGCD0103

Save this search by bookmarking this page.

When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

 [RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days.](#)

 [Download Options](#)

[U.S. National Library of Medicine](#), [Contact Help Desk](#)
[U.S. National Institutes of Health](#), [U.S. Department of Health & Human Services](#),
[USA.gov](#), [Copyright](#), [Privacy](#), [Accessibility](#), [Freedom of Information Act](#)



ClinicalTrials.gov

Suchbegriff: "phenylbutyrate"

Search of: phenylbutyrate - List Results - ClinicalTrials.gov

http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=phenylbutyrate


[Home](#) [Search](#) [Study Topics](#) [Glossary](#)

[List Results](#)
[Refine Search](#)
[Results by Topic](#)
[Results on Map](#)
[Search Del](#)

Found 24 studies with search of: phenylbutyrate

[Hide studies that are not seeking new volunteers.](#)
[Display Options](#)

Rank	Status	Study
1	Active, not recruiting	Clinical Trial of Sodium Phenylbutyrate in Children With Spinal Muscular Atrophy Type I Condition: Spinal Muscular Atrophy Type I Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
2	Terminated	Clinical Trial of Sodium Phenylbutyrate in Children With Spinal Muscular Atrophy Types II or III Conditions: Spinal Muscular Atrophy Type II; Spinal Muscular Atrophy Type III Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
3	Completed	Safety and Tolerability Study of Phenylbutyrate in Huntington's Disease (PHEND-HD) Condition: Huntington's Disease Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
4	Completed	Safety Study of Oral Sodium Phenylbutyrate in Subjects With ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) Condition: Amyotrophic Lateral Sclerosis Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
5	Recruiting	Arginine and Buphenyl in Patients With Argininosuccinic Aciduria (ASA), a Urea Cycle Disorder Conditions: Argininosuccinic Aciduria; Amino Acid Metabolism, Inborn Errors; Urea Cycle Disorders Interventions: Drug: Sodium Phenylbutyrate (Buphenyl-TM); Drug: Arginine
6	Recruiting	Mechanism of Fatty Acid-Induced Impairment of Glucose-Simulated Insulin Secretion - Effect of Buphenyl Conditions: Diabetes; Elevated Free Fatty Acids; Insulin Resistance Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
7	Completed	Phenylbutyrate in Treating Patients With Refractory Solid Tumors or Lymphoma Conditions: Lymphoma; Unspecified Adult Solid Tumor, Protocol Specific Interventions: Drug: chemotherapy; Drug: oral sodium phenylbutyrate
8	Recruiting	Study to Evaluate Sodium Phenylbutyrate in Pre-Symptomatic Infants With Spinal Muscular Atrophy Condition: Spinal Muscular Atrophy Intervention: Drug: Sodium phenylbutyrate (NaPB)
9	Completed	Phenylbutyrate to Treat Children With Progressive or Recurrent Brain Tumors Condition: Brain Tumor Intervention: Drug: Phenylbutyrate
10	Active, not recruiting	Phenylbutyrate and Valganciclovir in Treating Patients With Relapsed or Refractory Epstein-Barr Virus-Positive Cancer Conditions: Gastric Cancer; Head and Neck Cancer; Lymphoma; Lymphoproliferative Disorder Interventions: Drug: oral sodium phenylbutyrate; Drug: valganciclovir; Genetic: polymerase chain reaction; Genetic: protein expression analysis; Procedure: biopsy
11	Terminated	Phenylbutyrate/Genistein Duotherapy in Delta F508-Heterozygotes (for Cystic Fibrosis) Condition: Cystic Fibrosis

- Interventions: Drug: Sodium 4-Phenylbutyrate; Drug: Unconjugated Isoflavones 100; Drug: Placebo
- 12 **Completed** [Phenylbutyrate/Genistein Duotherapy in Delta F508-Homozygous\(for Cystic Fibrosis\)](#)
Condition: Cystic Fibrosis
Interventions: Drug: Sodium 4-Phenylbutyrate (4PBA); Drug: Unconjugated Isoflavones 100 (PTI G-4660, 87% Genistein); Drug: Placebo
- 13 **Completed** [Azacitidine Plus Phenylbutyrate in Treating Patients With Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome](#)
Conditions: Leukemia; Myelodysplastic Syndromes; Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases
Interventions: Drug: azacitidine; Drug: sodium phenylbutyrate
- 14 **Completed** [5-Azacytidine and Phenylbutyrate to Treat Severe Thalassemia](#)
Condition: Beta Thalassemia
Intervention: Drug: 5-Azacytidine
- 15 **Active, not recruiting** [Phenylbutyrate in Treating Children With Progressive or Recurrent Cancer of the Central Nervous System](#)
Condition: Brain and Central Nervous System Tumors
Intervention: Drug: sodium phenylbutyrate
- 16 **Completed** [Phase I and Pharmacokinetic Trial of Phenylbutyrate Given as a Continuous Infusion in Pediatric Patients With Refractory Malignancy](#)
Conditions: Brain Neoplasms; Neuroblastoma
Intervention: Drug: phenylbutyrate
- 17 **Completed** [Phenylbutyrate Plus Azacitidine in Treating Patients With Acute Myeloid Leukemia, Myelodysplasia, Non-Hodgkin's Lymphoma, Multiple Myeloma, Non-Small Cell Lung Cancer, or Prostate Cancer](#)
Conditions: Leukemia; Lung Cancer; Lymphoma; Multiple Myeloma and Plasma Cell Neoplasm; Myelodysplastic Syndromes; Prostate Cancer
Interventions: Drug: azacitidine; Drug: sodium phenylbutyrate
- 18 **Completed** [Phenylbutyrate, Dexamethasone, and Sargramostim in Treating Patients With Refractory or Relapsed Acute Myeloid Leukemia](#)
Condition: Leukemia
Interventions: Biological: sargramostim; Drug: dexamethasone; Drug: oral sodium phenylbutyrate
- 19 **Completed** [Fluorouracil, Phenylbutyrate, Indomethacin, and Interferon Gamma in Treating Patients With Advanced Colorectal Cancer](#)
Condition: Colorectal Cancer
Interventions: Biological: recombinant interferon gamma; Drug: fluorouracil; Drug: indomethacin; Drug: sodium phenylbutyrate
- 20 **Completed** [Azacitidine Plus Phenylbutyrate in Treating Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors That Have Not Responded to Previous Treatment](#)
Conditions: Lymphoma; Small Intestine Cancer; Unspecified Adult Solid Tumor, Protocol Specific
Interventions: Drug: azacitidine; Drug: sodium phenylbutyrate

← Previous Page Studies Shown (1-20) Next Page (21-24) →

Save this search by bookmarking this page.
When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

 [RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days](#)

 [Download Options](#)

[List Results](#)

[Refine Search](#)

[Results by Topic](#)

[Results on Map](#)

[Search Details](#)

Found 24 studies with search of: phenylbutyrate

[Hide studies that are not seeking new volunteers.](#)

[+ Display Options](#)

Rank Status Study

- | | | |
|----|------------|---|
| 21 | Recruiting | Dose-Escalation Safety Study of HPN-100 to Treat Urea Cycle Disorders
Condition: Urea Cycle Disorders
Intervention: Drug: HPN-100 |
| 22 | Terminated | Phase II Study of Azacitidine and Phenylbutyrate in Patients With Thalassemia Major
Condition: Thalassemia Major
Interventions: Drug: azacitidine; Drug: phenylbutyrate |
| 23 | Completed | Phenylbutyrate and Trebinoin in Treating Patients With Hematologic Cancer
Conditions: Leukemia; Myelodysplastic Syndromes; Myelodysplastic/Myeloproliferative Diseases
Interventions: Drug: sodium phenylbutyrate; Drug: tretinoin |
| 24 | Completed | Phase II Study of Sodium Phenylbutyrate, Sodium Benzoate, Sodium Phenylacetate, and Dietary Intervention for Urea Cycle Disorders
Condition: Amino Acid Metabolism, Inborn Errors
Interventions: Drug: Sodium Benzoate; Drug: Sodium Phenylacetate; Drug: Sodium Phenylbutyrate; Behavioral: Dietary Intervention |

[← Previous Page \(1-20\)](#)

Studies Shown (21-24)

[Next Page →](#)

Save this search by bookmarking this page.

When you use your bookmark, the search will be performed again on the most recent collection of studies.

[RSS Feed for studies found by your search that were received in the last 14 days](#)

[+ Download Options](#)



8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2005 bis August 2007 in der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Licht danke ich für die interessante Themenstellung, seinen vielfachen hilfreichen Rat sowie die kritische Durchsicht dieses Manuskripts. Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Keller für die Übernahme der Betreuung unserer Arbeitsgruppe nach dem Weggang von Prof. Dr. Thomas Licht.

Bei Prof. Dr. Christian Peschel bedanke ich mich für die Bereitstellung von Labor und Materialien, ohne die ich diese Arbeit nicht durchführen hätte können.

Meinen besonderen Dank möchte ich dem Team unserer Arbeitsgruppe aussprechen. Insbesondere Michaela Wagner und Dipl.-Biol. Stefanie Hauswald, die mich geduldig in die molekularbiologischen Methoden einwiesen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Desweiteren bedanke ich mich bei Madlen Oelsner und allen anderen Mitarbeitern des Labors für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meinen guten Freunden, meiner Familie und ganz besonders meiner lieben Frau Lena sagen. Mit ihrer unerschütterlichen Zuneigung gab Lena mir stets Rückhalt und unterstützte die Fertigstellung dieser Arbeit nicht zuletzt durch aufmunternde Worte und geduldigen Verzicht auf gemeinsame Zeit.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Florian Schertl
Geburtsdatum:	30.03.1982
Geburtsort:	München
1988 – 1992	Grundschule Fahrenzhausen
1992 – 2001	Ignaz-Taschner-Gymnasium Dachau
2001	Abitur
2002 – 2004	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2004	Ärztliche Vorprüfung
2004 – 2008	Medizinstudium an der Technischen Universität München
2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung nach neuer ÄAppO

10 Bisherige Veröffentlichungen

Hauswald, S., Duque-Afonso, J., Wagner, M.M., Schertl, F.M., Lübbert, M., Peschel, C., Keller, U., Licht, T. „Histone Deacetylase Inhibitors Induce a Very Broad, Pleiotropic Anticancer Drug Resistance Phenotype in Acute Myeloid Leukemia Cells by Modulation of Multiple ABC Transporter Genes.” *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3705-3715

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zum Einfluss von Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Expression von Chemoresistenz-assoziierten ABC-Transportern und Sensibilität von Leukämiezellen gegenüber Zytostatika“ in der III. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Thomas Licht ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.