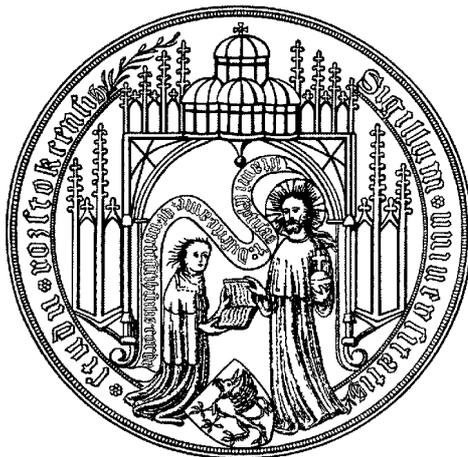


Untersuchungen zur Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges in der akuten lymphatischen Leukämie



Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Catrin Schult, geb. am 16.03.1980 in Wismar
aus Schwaan

Schwaan, 02.02.2012

Gutachter:

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. med. Christian Junghanß
Zentrum für Innere Medizin Klinik III -
Hämatologie, Onkologie, Palliativmedizin
Universitätsmedizin Rostock

- 2. Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Schröder
Institut für Biowissenschaften
Abteilung Genetik
Universität Rostock

Tag der Einreichung: 03.02.2012

Datum der Verteidigung: 15.10.2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	ix
1. Einleitung.....	1
1.1 Akute lymphatische Leukämien.....	1
1.1.1 Subgruppen der ALL.....	1
1.1.2 Genetische Veränderungen bei der ALL.....	2
1.1.3 Therapie und Prognose	4
1.2 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg	5
1.2.1 Aufbau und Funktion der PI3K.....	5
1.2.2 Die Proteinkinase Akt und ihre Substrate.....	7
1.2.3 Fehlregulationen des PI3K/Akt-Signalweges in Tumoren.....	11
1.3 Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges.....	14
1.3.1 Ly294002.....	14
1.3.2 RAD001.....	14
1.3.3 NVP-BEZ235.....	15
1.3.4 Sorafenib.....	16
1.4 Zielstellung.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1 Zellbiologische Methoden	18
2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien.....	18
2.1.2 Einstellung der Zellzahl und Bestimmung der Vitalität.....	18
2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	19
2.1.4 Isolierung von humanen mononukleären Zellen des Blutes.....	19
2.1.5 Behandlung der ALL-Zellen mit Kinaseinhibitoren und Zytostatika.....	19
2.1.6 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels WST-1.....	20
2.2 Durchflusszytometrie.....	21
2.2.1 Analyse von Oberflächenantigenen zur Bestimmung des Blastenanteils.....	21
2.2.2 Nachweis von Apoptose und Nekrose.....	21
2.2.3 Zellzyklusanalyse.....	22
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.3.1 DNA-Extraktion.....	23
2.3.2 RNA-Extraktion.....	24
2.3.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen.....	24
2.3.4 Reverse Transkription.....	24
2.3.5 Qualitative Polymerasekettenreaktion.....	25
2.3.6 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.3.7 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	27
2.3.8 DNA-Sequenzierung.....	28
2.3.9 Genexpressionsanalyse.....	28
2.3.10 Real-time PCR.....	31

2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	33
2.4.1	<i>Herstellung von Proteinextrakten.....</i>	33
2.4.2	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....</i>	33
2.4.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....</i>	33
2.4.4	<i>VEGFA-Nachweis mittels ELISA.....</i>	36
2.4.5	<i>Immunfluoreszenz.....</i>	37
2.5	Statistik.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1	Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges in der ALL.....	39
3.1.1	<i>Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges in ALL-Zelllinien.....</i>	39
3.1.2	<i>Mutationsanalyse des PTEN-Gens in ALL-Zelllinien.....</i>	40
3.1.3	<i>Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges in de novo ALL-Zellen.....</i>	43
3.2	Untersuchungen zur Wirksamkeit des PI3K-Inhibitors Ly294002.....	44
3.3	Untersuchungen zur Wirksamkeit des RAD001 in ALL-Zellen.....	45
3.3.1	<i>Einfluss des RAD001 auf die Vitalität.....</i>	45
3.3.2	<i>Einfluss des RAD001 auf den Zellzyklus.....</i>	46
3.3.3	<i>Einfluss des RAD001 auf Apoptose und Nekrose.....</i>	48
3.3.4	<i>Einfluss des RAD001 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges.....</i>	49
3.4	Untersuchungen zur Wirksamkeit des BEZ235 in ALL-Zellen.....	51
3.4.1	<i>Einfluss des BEZ235 auf die Vitalität.....</i>	51
3.4.2	<i>Einfluss des BEZ235 auf den Zellzyklus.....</i>	51
3.4.3	<i>Einfluss des BEZ235 auf Apoptose und Nekrose.....</i>	53
3.4.4	<i>Einfluss des BEZ235 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges.....</i>	54
3.5	BEZ235 in der Kombination mit konventionellen Zytostatika.....	56
3.5.1	<i>Kombination des BEZ235 mit AraC.....</i>	56
3.5.2	<i>Kombination des BEZ235 mit Doxorubicin.....</i>	57
3.5.3	<i>Kombination des BEZ235 mit Dexamethason.....</i>	59
3.6	Untersuchungen zur Wirksamkeit des Sorafenib in ALL-Zelllinien.....	60
3.6.1	<i>Einfluss des Sorafenibs auf die Vitalität.....</i>	60
3.6.2	<i>Einfluss des Sorafenibs auf den Zellzyklus.....</i>	61
3.6.3	<i>Einfluss des Sorafenibs auf Apoptose und Nekrose.....</i>	62
3.6.4	<i>Einfluss des Sorafenibs auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges.....</i>	64
3.6.5	<i>Einfluss des Sorafenibs auf die Aktivität des Wnt-Signalweges.....</i>	66
3.7	Sorafenib in der Kombination mit konventionellen Zytostatika.....	68
3.7.1	<i>Kombination des Sorafenibs mit AraC.....</i>	68
3.7.2	<i>Kombination des Sorafenibs mit Doxorubicin.....</i>	69
3.7.3	<i>Kombination des Sorafenibs mit Dexamethason.....</i>	71
3.8	Veränderung der Genexpression nach Sorafenibbehandlung.....	72
3.8.1	<i>Die Erstellung eines Genexpressionsprofils.....</i>	72
3.8.2	<i>Einfluss des Sorafenibs auf die VEGFA-mRNA-Expression.....</i>	77
3.8.3	<i>Einfluss des Sorafenibs auf die VEGFA-Proteinexpression.....</i>	78

4.	Diskussion.....	80
4.1	Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bei der ALL.....	80
4.2	Die Bedeutung der PI3K- und mTOR-Inhibition in ALL-Zellen.....	83
4.3	Effekte des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf ALL-Zellen.....	86
4.4	Differentielle Genexpression durch Sorafenib.....	89
4.5	Wirkung von Kinaseinhibitoren in der Kombination mit Chemotherapeutika.....	96
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	100
6.	Literaturverzeichnis.....	102
7.	Anhang.....	126
7.1	Material.....	126
7.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>126</i>
7.1.2	<i>Kits und Fertiglösungen.....</i>	<i>127</i>
7.1.3	<i>Nährmedien und Antibiotika.....</i>	<i>127</i>
7.1.4	<i>Enzyme.....</i>	<i>128</i>
7.1.5	<i>Antikörper.....</i>	<i>128</i>
7.1.6	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>129</i>
7.1.7	<i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>131</i>
7.1.8	<i>Ergänzende Abbildungen.....</i>	<i>134</i>
8.	Selbstständigkeitserklärung.....	140
9.	Danksagung.....	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der PI3K-Isoformen der Klasse I	6
Abbildung 2: Übersicht zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges.....	8
Abbildung 3: Strukturformel des Inhibitors Ly294002.....	14
Abbildung 4: Strukturformel des Inhibitors RAD001.....	15
Abbildung 5: Strukturformel des Inhibitors BEZ235.....	15
Abbildung 6: Strukturformel des Inhibitors Sorafenib.....	16
Abbildung 7: Analyse von apoptotischen und nekrotischen Zellen.....	22
Abbildung 8: Ermittlung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie.....	23
Abbildung 9: Analyse zur PI3K/Akt-Aktivierung in ALL-Zelllinien mittels Western Blot.....	39
Abbildung 10: PTEN-Expression in den ALL- und NHL-Zelllinien.....	40
Abbildung 11: PCR-Produkte der PTEN-Exone.....	41
Abbildung 12: Sequenzierungsausschnitt von Exon 7 des PTEN-Gens.....	42
Abbildung 13: Einfluss des Ly294002 auf die Zellproliferation und Apoptose.....	44
Abbildung 14: Einfluss des Ly294002 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges.....	45
Abbildung 15: Proliferation und metabolische Aktivität nach RAD001-Behandlung.....	46
Abbildung 16: Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit RAD001.....	47
Abbildung 17: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach RAD001-Behandlung.....	48
Abbildung 18: Viabilität der B- und T-ALL-Zelllinien nach RAD001-Behandlung.....	49
Abbildung 19: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach RAD001-Behandlung	49
Abbildung 20: Untersuchungen zur PI3K/Akt-Inhibition nach RAD001-Behandlung.....	50
Abbildung 21: Proliferation und metabolische Aktivität nach BEZ235-Behandlung.....	51
Abbildung 22: Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit BEZ235.....	52
Abbildung 23: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach BEZ235-Behandlung.....	53
Abbildung 24: Viabilität der B- und T-ALL-Zellen nach BEZ235-Behandlung.....	54
Abbildung 25: Untersuchungen zur Akt-Inhibition mittels BEZ235.....	54
Abbildung 26: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach BEZ235-Behandlung.....	55
Abbildung 27: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und AraC.....	56
Abbildung 28: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und Doxorubicin.....	58
Abbildung 29: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und Dexamethason.....	59
Abbildung 30: Proliferation und metabolische Aktivität nach Sorafenib-Behandlung	60
Abbildung 31: Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit Sorafenib.....	61
Abbildung 32: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach Sorafenib-Behandlung.....	62
Abbildung 33: Viabilität der B- und T-ALL-Zelllinien nach Sorafenib-Behandlung	63
Abbildung 34: Apoptosenachweis mittels Western Blot.....	64
Abbildung 35: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach Sorafenib-Behandlung	65
Abbildung 36: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach Sorafenib-Behandlung	65

Abbildung 37: Untersuchungen zur Aktivität des Wnt-Signalweges.....	66
Abbildung 38: Immunhistologischer Nachweis von β -Catenin nach Sorafenib-Behandlung	67
Abbildung 39: Kombinationswirkungsanalyse von Sorafenib und AraC.....	68
Abbildung 40: Kombinationswirkungsanalyse von Sorafenib und Doxorubicin.....	70
Abbildung 41: Kombinationsanalyse von Sorafenib und Dexamethason.....	71
Abbildung 42: Genclusteranalyse nach Sorafenib-Behandlung in ALL-Zellen.....	73
Abbildung 43: VEGFA-mRNA-Expression nach Sorafenib-Behandlung	77
Abbildung 44: VEGFA-Proteinexpression nach Sorafenib-Behandlung.....	78
Abbildung 45: Untersuchung zur ERK-Expression nach der Behandlung mit BEZ235	134
Abbildung 46: BEZ235 in der Kombination mit AraC.	134
Abbildung 47: BEZ235 in der Kombination mit Doxorubicin.	135
Abbildung 48: BEZ235 in der Kombination mit Dexamethason.....	136
Abbildung 49: Untersuchung zur ERK-Expression nach der Behandlung mit Sorafenib.....	137
Abbildung 50: Sorafenib in der Kombination mit AraC.....	137
Abbildung 51: Sorafenib in der Kombination mit Doxorubicin.....	138
Abbildung 52: Sorafenib in der Kombination mit Dexamethason.....	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunologische Subtypen bei der ALL.....	2
Tabelle 2: Zytogenetische Aberrationen bei der adulten ALL.....	3
Tabelle 3: Kulturbedingungen der Zelllinien.....	18
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Substanzen.....	20
Tabelle 5: PTEN-Primersequenzen	25
Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.....	26
Tabelle 7: PCR-Programm der Exone 1-3, 5-9.....	26
Tabelle 8: PCR-Programm des Exons 4.....	27
Tabelle 9: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes.....	32
Tabelle 10: Real-time PCR-Programm.....	32
Tabelle 11: Verwendete Primär-Antikörper.....	35
Tabelle 12: Verwendete Sekundär-Antikörper.....	36
Tabelle 13: Patientencharakteristika.....	43
Tabelle 14: Gene mit einer erhöhten Expression nach Sorafenib-Behandlung.....	74
Tabelle 15: Gene mit einer verminderten Expression nach Sorafenib-Behandlung.....	75
Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Zelllinien.....	133

Abkürzungsverzeichnis

4EBP-1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
AraC	Cytarabin
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BAX	BCL-2 associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BEZ	NVP-BEZ235
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Komplementäre DNA
C/EBP	cAMP response element binding protein
CK2	Casein kinase 2
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CREB	CAAT enhancer binding protein
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
DDB1	DNA damage-binding protein 1
Dexa	Dexamethason
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
Doxo	Doxorubicin
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
eIF4E	Eukaryotic initiation factor 4E
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase

FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLT-3	Fms-like tyrosine kinase receptor-3
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GADD45	Growth arrest and DNA damage inducible gene 45
Gly	Glycin
GPCR	G protein-coupled receptors
GTP	Guanosintriphosphat
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
IgM	Immunglobulin M
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
HSA	Humanes Serumalbumin
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MLL	Mixed-lineage leukemia
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NfκB	Nuclear factor kappa B
nt	Nukleotide
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Serin
Sora	Sorafenib
SRC	Sarcoma tyrosine kinase
SSC	Side Scatter
ssRNA	Einsträngige RNA
STAT	Signal transduction and activator of transcription
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris buffered saline with Triton X
TCF	T-cell transcription factor

TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSC1	Tuberous sclerosis protein 1
TSC2	Tuberous sclerosis protein 2
Tyr	Tyrosin
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGFR	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5) biphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphat
PRAS40	Prolin-rich Akt substrate of 40 kDa
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog deleted on chromosome 10
RET	Rearranged during transfection
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

1. Einleitung

1.1 Akute lymphatische Leukämien

Leukämien sind Erkrankungen des blutbildenden Systems, die durch eine monoklonale Proliferation hämatopoetischer Zellen gekennzeichnet sind. Sie werden nach ihrem klinischen Verlauf in eine akute und eine chronische Form unterteilt. Zusätzlich unterscheidet man je nach beteiligtem Zelltyp zwischen myeloischen und lymphatischen Leukämien. Akute Formen der Leukämien stellen lebensbedrohliche Erkrankungen dar, die unbehandelt schon nach wenigen Wochen zum Tode führen. Sie treten in allen Altersstufen auf, wobei im Kindesalter die akute lymphatische Leukämie (ALL) die häufigste Form ist. Erwachsene erkranken hauptsächlich an akuten myeloischen Leukämien (AML) [1].

Die ALL ist gekennzeichnet durch eine maligne Transformation hämatopoetischer Vorläuferzellen, die B- oder T-lymphatische Eigenschaften zeigen. Die Ursache für die Erkrankung ist nach wie vor weitgehend ungeklärt. Risikofaktoren für die Entstehung der ALL sind Knochenmarkschädigungen, die beispielsweise durch Benzole, ionisierende Strahlen oder Zytostatika hervorgerufen werden können. Patienten mit genetischen Veränderungen wie der Trisomie 21, dem Klinefelter Syndrom oder der Neurofibromatose weisen ebenfalls ein erhöhtes Risiko auf, eine ALL zu entwickeln.

Die Erkrankung lässt eine zweigipfelige Alterskurve erkennen. Kinder unter 5 Jahren zeigen eine Inzidenz mit etwa 5,3 Fällen pro 100.000 Einwohner. Ältere Kinder und junge Erwachsene haben ein geringeres Risiko an einer ALL zu erkranken. Nach dem 35. Lebensjahr steigt die Inzidenz erneut an, sodass ein zweiter Häufigkeitsgipfel bei Patienten über 80 Jahre beobachtet werden kann. Hier liegt die Inzidenz bei 2,3 Fällen pro 100.000 Einwohnern, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Die Gesamtinzidenz der ALL liegt bei 1,1 Fällen pro 100.000 Einwohner im Jahr [2].

1.1.1 Subgruppen der ALL

Der Reifungsgrad und die Art der lymphatischen Linie wird mit Hilfe der Immunphänotypisierung bestimmt. Hierbei werden charakteristische Oberflächen- und zytoplasmatische Antigene analysiert, die eine Einteilung der ALL in ihre Subtypen erlaubt. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Einteilung sowie die Häufigkeit der ALL-Subtypen und zeigt die charakteristischen Marker, die bei der Immunphänotypisierung nachweisbar sind. Mit einer Inzidenz von ca. 74 % stellt die B-Linien ALL, die häufigste Form dieser Erkrankung dar. Je nach Differenzierungsgrad wird die B-ALL als pro-, common-, prä- und reifzellige B-ALL klassifiziert. Die T-ALL stellt mit 26 % eine seltenere Form der ALL dar und wird in eine frühe-, thymische- und reife-T-ALL unterteilt [2].

Tabelle 1: Immunologische Subtypen bei der ALL (modifiziert nach [2])

Subtyp	Inzidenz	Charakteristische Marker
<i>B-Vorläufer-ALL</i>	70 %	HLA-DR ⁺ , TdT ⁺ , CD19 ⁺ u./o. CD79a ⁺ u./o. CD22 ⁺
Pro-B-ALL	11 %	CD10 ⁻ , keine zusätzlichen Marker
common-ALL (c-ALL)	50 %	CD10 ⁺
Prä-B-ALL	9 %	CD10 ^{+/-} , cyIgM ⁺
<i>Reife-B-ALL</i>	4 %	sIgM ⁺ , CD10 ^{+/-}
<i>T-Linien-ALL</i>	26 %	cy oder sCD3 ⁺ , CD7 ⁺
Frühe-T-ALL	6 %	CD2 ⁻ , sCD3 ⁻ , CD1a ⁻
Thymische-T-ALL	13 %	CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , CD1a ⁺ , sCD3 ^{+/-}
Reife-T-ALL	7 %	CD2 ⁺ , CD5 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD1a ⁻

s = surface; cy = intrazytoplasmatisch

1.1.2 Genetische Veränderungen bei der ALL

Die verschiedenen Reifungsgrade der ALL sind häufig mit chromosomalen Aberrationen und Mutationen assoziiert. Bei etwa 80 % der erwachsenen Patienten mit einer ALL treten genetische Veränderungen auf [3]. Insbesondere werden numerische und strukturelle chromosomale Aberrationen bei der ALL nachgewiesen. Oft wird ein Austausch von Chromosomenabschnitten (Translokationen) beobachtet, der zur Bildung von Fusionsgenen oder Genen mit dysregulierter Expression führt. Des Weiteren können Chromosomenabschnitte fehlen, verdoppelt oder in falscher Orientierung im Chromosom auftreten. Die betroffenen Gene sind oft an der Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen beteiligt und tragen zur Fehlregulation von Signalwegen und somit zur malignen Transformation der Zellen bei. Vielfach werden auch numerische Chromosomenanomalien beobachtet. Dabei kann die Anzahl der Chromosomen gegenüber dem normalen Chromosomensatz sowohl erhöht (Hyperdiploidie) als auch verringert (Hypodiploidie) sein [4, 5].

Die Häufigkeiten der genetischen Veränderungen sind bei Kindern und erwachsenen ALL-Patienten unterschiedlich. So werden bei Kleinkindern oft chromosomale Translokationen am *MLL (mixed lineage leukemia)*-Gen beobachtet. Mittlerweile sind über 50 Translokationen unter der Beteiligung des *MLL*-Gens beschrieben, die mit einer ALL assoziiert sind. Bei Kindern unter zwölf Monaten mit einer ALL-Erkrankung treten diese Aberrationen in 80 % der Fälle auf und haben eine ungünstige Prognose [6, 7].

Bei Erwachsenen tritt am häufigsten die Translokation t(9;22) (q34;q11) auf, die bei etwa 25-30 % der B-Vorläufer-ALL nachweisbar ist [8]. Durch die reziproke Translokation je eines langen Armes der Chromosomen 9 und 22 entsteht das Fusionsgen *bcr-abl*. Dieses wird in das Fusionsprotein

BCR-ABL translatiert, welches eine höhere Tyrosinkinaseaktivität aufweist als die ursprüngliche Abelson (ABL) Kinase. Das verkürzte Chromosom 22 wird auch als Philadelphia-Chromosom (Ph⁺) bezeichnet [9]. Durch die permanent erhöhte Tyrosinkinaseaktivität werden zahlreiche Signaltransduktionswege moduliert, die das Wachstum und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen beeinflussen. Zu diesen fehlregulierten Signalwegen gehört u.a. die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, die durch Aktivierung von mitogenen Signalen eine Proliferation der Zellen hervorruft. Ebenfalls werden die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Kaskade und die *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Proteine durch Phosphorylierung aktiviert, so dass die Proliferation und das Überleben der Zelle gefördert wird [10]. ALL-Patienten mit einer Philadelphia-Translokation haben eine besonders ungünstige Prognose [3].

Neben der t(9;22) werden häufig auch die Translokationen t(4;11), t(8;14), t(10;14) sowie t(1;9) beobachtet [8]. Zytogenetische Aberrationen am Chromosom 8 werden oft im Bereich des *MYC*-Gens diagnostiziert und führen zur Fehlregulation des Transkriptionsfaktors c-Myc. Diese Translokationen werden bei Burkitt-Lymphom-Patienten nachgewiesen und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Diese Erkrankung zählt zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen und wird bei leukämischer Ausschwemmung der reifzelligen B-ALL zugeordnet [11].

Bei der T-ALL werden vielfach Aberrationen mit dem Genlocus des T-Zellrezeptors (TCR) 14q11 diagnostiziert.

Häufige Translokationen, die insbesondere bei der adulten ALL vorkommen, sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zytogenetische Aberrationen bei der adulten ALL (modifiziert nach [8])

ALL-Subtyp	Translokation	Fusionsgen	Häufigkeit
Prä-B-ALL, c-ALL	t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	25-30%
Pro-B-ALL	t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	6%
Reife B-ALL	t(8;14)(q24;q32)	IgH-MYC	5%
Prä-B-ALL	t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	3%
T-Linien ALL	t(10;14)(q24,q11)	HOX11-TCR	3%

Neben den chromosomalen Veränderungen werden oft auch Mutationen verschiedener Transkriptionsfaktoren, Rezeptoren, Onkogene oder Tumorsuppressorgene mit der Pathogenese der ALL assoziiert. Bei etwa 50 % der T-ALL Patienten sind aktivierende Mutationen im *Notch1*-Gen nachweisbar und führen zur konstitutiven Aktivierung des Notchrezeptors und lösen eine Transformation von T-Vorläuferzellen aus. Die prognostische Bedeutung dieser Mutation ist noch unklar und wird in einigen Studien kontrovers diskutiert [12-15].

ALL-Patienten mit einem unauffälligen Karyotyp können ebenfalls ein verändertes Genexpressionsprofil aufweisen. So wurden sowohl bei T-ALL-Patienten als auch bei Patienten mit einer

B-Vorläufer-ALL hohe *Brain and acute leukemia cytoplasmic (BAALC)*-Genexpressionswerte nachgewiesen. Diese Patienten sind häufig resistent gegenüber Chemotherapeutika und zeigen eine deutlich reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren *BAALC*-Genexpressionslevel [16, 17].

Mutationen oder Deletionen der IKAROS-Familie im Zinkfinger-1-Gen (*IKZF1*) können ebenfalls eine Ursache für die Blockierung der Lymphozytenentwicklung darstellen. Die Deletionen des *IKZF1*-Gens werden hauptsächlich bei Ph⁺-ALL-Patienten diagnostiziert und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.

Darüber hinaus können auch epigenetische Veränderungen die Entstehung der ALL begünstigen. Acetylierungen der Histone an Lysinseitenketten bzw. Methylierungen von CpG-reichen DNA-Abschnitten modifizieren die Chromatinstruktur und beeinflussen dadurch die Aktivität von Genen. So werden oft Hypomethylierungen von Onkogenen oder Hypermethylierungen von Tumorsuppressorgenen beobachtet.

1.1.3 Therapie und Prognose

Die ALL ist aufgrund ihrer verschiedenen Subtypen und molekularen Veränderungen eine heterogene Erkrankung und kann nicht einheitlich behandelt werden. Die Therapie der ALL beruhte über Jahrzehnte allein auf der Gabe konventioneller Chemotherapeutika. In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Kombinationstherapien unter Verwendung verschiedener Substanzen entwickelt. Zu den wesentlichen Medikamenten zählen Glucocorticoide (Prednisolon oder Dexamethason), Anthrazykline (Doxorubicin und Daunorubicin), Antimetabolite (AraC und 6-Mercaptopurin) sowie die Asparaginase. Dadurch konnte insbesondere im Kindesalter die Prognose der ALL deutlich verbessert werden. So lag die Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeit vor 1980 noch unter 10 %. Gegenwärtig können über 80 % der Kinder mit einer ALL-Erkrankung geheilt werden [18].

Bei Erwachsenen ist die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich geringer. Das Gesamtüberleben liegt zwischen 27-54 % [19]. Insbesondere Patienten mit einer hohen Leukämiezellzahl bei Diagnosestellung, einem Philadelphia-Chromosom oder einem komplexen Karyotyp (> 5 chromosomale Aberrationen) sind mit alleiniger konventioneller Chemotherapie oft nicht langfristig heilbar. Bisher erhöhte sich bei diesen Hochrisikopatienten die Überlebenswahrscheinlichkeit nur nach einer allogenen Stammzelltransplantation [3].

Das Langzeitüberleben der ALL-Patienten ist noch unbefriedigend. Eine Einteilung der Patienten in Risikogruppen und eine Zuordnung in Studien mit spezifischen Behandlungsprotokollen ermöglicht es, die Therapie der ALL zu optimieren. In aktuellen Studien werden insbesondere auch neue Therapieformen untersucht, die eine zielgerichtete Behandlung mit einschließen.

So wurde ein wesentlicher Fortschritt in der Behandlung *BCR-ABL* positiver ALL-Patienten mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib und seinen Derivaten Dasatinib und Nilotinib erzielt. Diese

Hemmstoffe blockieren die Aktivität der aberranten Tyrosinkinase BCR-ABL und verhindern dadurch die Übertragung eines Phosphatrestes auf nachgeschaltete Substrate [20].

Die Identifikation neuer Schlüsselmoleküle und die Entwicklung spezifischer Hemmstoffe sind wichtige Elemente, um die Therapie der ALL weiter zu optimieren. In verschiedenen Studien wurden bereits zahlreiche Mutationen von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und Apoptoseregulatoren identifiziert, die verschiedene Signalwege in der Zelle verändern und die Leukämogenese beeinflussen [21-25]. Einige Studien konnten zeigen, dass der PI3K/Akt-Signalweg in akuten Leukämien aberrant aktiviert ist und das Überleben der malignen Zellen fördert [26-29].

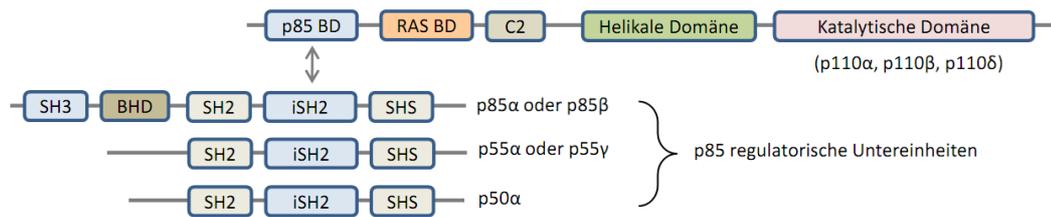
1.2 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg

Tumorerkrankungen sind oft durch fehlregulierte Signaltransduktionswege gekennzeichnet, die das Wachstum von Tumorzellen begünstigen. Eine Schlüsselrolle in der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse in der Zelle nimmt der PI3K/Akt-Signalweg ein. Die Aktivierung des Signalweges führt zur Proliferation, steigert das Überleben der Zelle und ist an der Differenzierung, Migration und Zelladhäsion maßgeblich beteiligt.

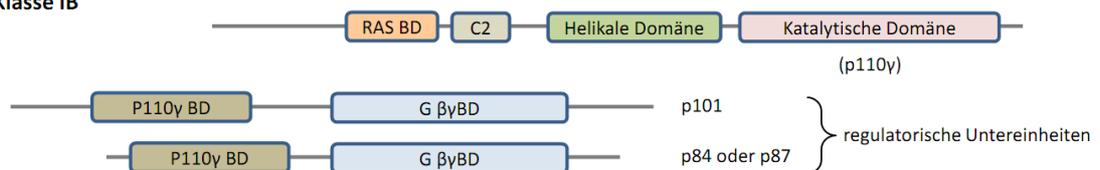
1.2.1 Aufbau und Funktion der PI3K

Im physiologischen Zustand der Zelle wird die Signalkaskade durch Wachstumsfaktoren und Chemokine gesteuert. Diese binden an Rezeptortyrosinkinasen bzw. G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) und aktivieren die PI3K. Die PI3K sind Lipidkinasen und bilden eine große Proteinfamilie, die aufgrund ihrer Struktur, Substratspezifität und ihres Aktivierungsmechanismus in drei Klassen unterteilt werden. Sie phosphorylieren den Inositolring von Inositolphospholipiden in der Plasmamembran, wobei drei verschiedene Produkte entstehen können. Die Klasse I stellt die am besten charakterisierte Form dar und unterteilt sich nochmals in Typ IA und Typ IB [30-32]. Eine Übersicht zum Aufbau der PI3K-Isoformen ist in der Abbildung 1 dargestellt.

PI3K- Klasse IA



PI3K- Klasse IB

**Abbildung 1: Aufbau der PI3K-Isoformen der Klasse I (modifiziert nach [31])**

Die Klasse IA besteht aus einer katalytischen Untereinheit (p110 α , p110 β oder p110 δ) und einer regulatorischen Untereinheit (p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ oder p50 α). Die drei Isoformen der p110-katalytischen Untereinheit sind sehr homolog und bestehen aus fünf Domänen. Eine Verbindung zwischen der p110-Untereinheit mit der regulatorischen Untereinheit erfolgt zwischen der p85-Bindedomäne und der iSH2-Domäne und führt zur Hemmung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Die Klasse IB besteht aus der p110 γ -katalytischen Untereinheit und der regulatorischen Untereinheit p101, p85 oder p87. Die Mitglieder der PI3K-Klasse IB können von GPCR aktiviert werden, in dem sie über ihre G $\beta\gamma$ -Bindedomäne mit der G $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen interagieren.

Die Kinasen der Klasse IA sind Heterodimere und bestehen aus einer p85-regulatorischen (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β oder p55 γ) und einer p110-katalytischen (p110 α , p110 β oder p110 δ) Untereinheit. Die p85-Einheit wird von drei verschiedenen Genen (*PIK3R1*, *PIK3R2* und *PIK3R3*) kodiert, wobei von *PIK3R1* drei zusätzliche Spleißvarianten (p85 α , p55 α , p50 α) bekannt sind [33]. Dabei werden die p85 α - und p85 β -Einheiten ubiquitär exprimiert, die Expression der anderen Isoformen ist auf spezifische Gewebe wie Muskel, Gehirn und Leber begrenzt. Die p110-Untereinheit wird von den Genen *PIK3CA*, *PIK3CB* oder *PIK3CD* kodiert. Während die p110 α und p110 β ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression der p110 δ auf das Immunsystem beschränkt [34]. Die unterschiedlichen Isoformen der regulatorischen Untereinheit können mit jeder der katalytischen Untereinheit interagieren und das Heterodimer der PI3K IA bilden. Die Anbindung zwischen der katalytischen und der regulatorischen Einheit erfolgt über die p85-Domäne in der p110-Untereinheit und der inter-*Src*-Homologie-2-Domäne (iSH2) der p85-Einheit [31].

Die Aktivierung der PI3K IA erfolgt über Rezeptortyrosinkinasen, GPCR oder Onkogene. Nach Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase wird die PI3K an die Zellmembran rekrutiert. Dabei

erfolgt die Bindung der PI3K an die phosphorylierte zytoplasmatische Domäne des Rezeptors über die SH2-Domäne der p85-Untereinheit oder durch ein Adaptorprotein (z.B. Insulinrezeptor-substrat-1, IRS-1). Die PI3K kann auch indirekt über die p110-Untereinheit durch das Onkogen Ras aktiviert werden [31].

Die PI3K IB ist ebenfalls ein Heterodimer und besteht aus der katalytischen Untereinheit p110 γ und den regulatorischen Untereinheiten p101, p84 oder p87. Da die regulatorische Domäne keine SH2-Domäne besitzt, kann keine direkte Bindung an Phosphotyrosinmotive des aktivierten Rezeptors erfolgen. Die Aktivierung der PI3K erfolgt ausschließlich durch die Interaktion zwischen G-Proteinen und GPCR über die G $\beta\gamma$ -Domäne der regulatorischen Untereinheit [35]. Die Klasse IB der PI3K wird insbesondere in Leukozyten, im Herz, im Pankreas, in der Leber und im Skelettmuskel exprimiert [36-38].

Die Lipidkinasen der Klasse IA stellen die wichtigsten Enzyme dieser Familie dar und generieren Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) als sekundären Botenstoff. Dieser Botenstoff dient als Andockstelle für Proteine mit PH2 (Pleckstrin-Homologie)-Domänen und rekrutiert die Proteine Akt und PDK1 (*Phosphatidylinositol dependent kinase 1*) an die Zellmembran. Beide Proteine haben eine PH2-Domäne und werden durch die Generierung von PIP3 in räumliche Nähe zueinander gebracht [31].

1.2.2 Die Proteinkinase Akt und ihre Substrate

Die Serin-Threonin-Kinase Akt ist das humane Homolog zum viralen Onkogen *v-akt* und wird aufgrund der Ähnlichkeit zur Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC) auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet [39]. In Säugetieren wurden drei Akt-Gene (*Akt-1*, *Akt-2* und *Akt-3*) identifiziert, wobei die Expression der verschiedenen Proteine in Geweben variieren kann. *Akt-1* und *Akt-2* wurden in nahezu allen Geweben nachgewiesen. Die Expression von *Akt-3* ist dagegen auf einige Gewebearten begrenzt. *Akt-3* wird insbesondere im Hirn, in der Lunge, im Herz und in der Niere stark exprimiert [40]

Akt ist ein wichtiges Effektorprotein in dieser Signalkaskade und wird an der Zellmembran abhängig von der Isoform durch die PDK1 an der Aminosäure Threonin 308 (*Akt-1*), 309 (*Akt-2*) bzw. 305 (*Akt-3*) phosphoryliert. Zur vollständigen Aktivierung ist zusätzlich die Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 473 (*Akt-1*), 474 (*Akt-2*) bzw. 472 (*Akt-3*) notwendig. Diese erfolgt durch die PDK2, eine Gruppe von verschiedenen Kinasen, die Akt phosphorylieren können. Zu ihnen gehören die *Integrin linked kinase* (ILK), *Mammalian target-of-rapamycin complex 2* (mTORC2), Proteinkinase C β 2, *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) und *ataxia telangiectasia mutated* (ATM). Die Phosphorylierung an der Position Serin kann auch über eine Autophosphorylierung von Akt erfolgen [41].

Nach ihrer Aktivierung reguliert die Akt-Kinase durch Übertragung von Phosphatgruppen die Aktivität von verschiedenen Proteinen, die einen Einfluss auf das Wachstum und die Proliferation von Zellen haben, den Zellmetabolismus beeinflussen sowie das Überleben der Zelle fördern. Mittlerweile sind mehr als 100 Substrate von Akt identifiziert, die durch das Sequenzmotiv RXXRXS/T-B (R= Arginin, X = beliebige Aminosäure, S= Serin, T = Threonin und B = Aminosäure mit hydrophoben Resten) charakterisiert sind [39, 42]. Die Substrate werden an Serin- bzw. Threoninresten phosphoryliert und werden dadurch aktiviert oder gehemmt. Das Netzwerk des PI3K/Akt-Signalweges ist in der Abbildung 2 dargestellt. Im Folgenden werden einige bedeutende Substrate von Akt erläutert, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

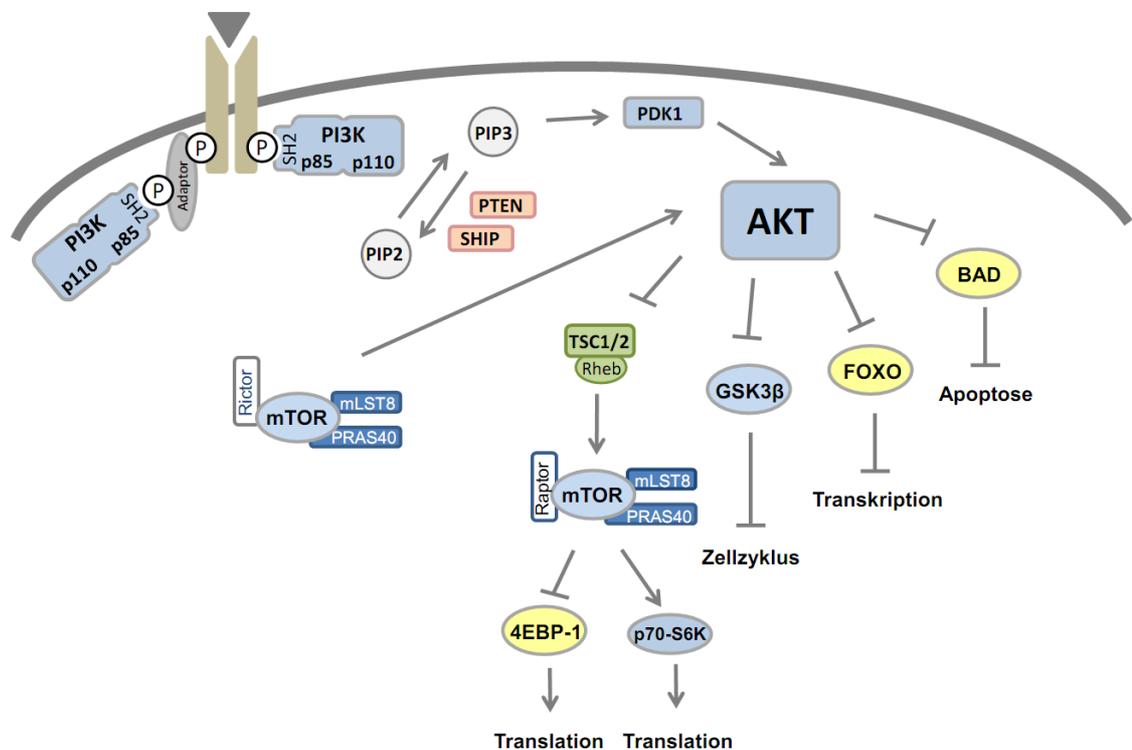


Abbildung 2: Übersicht zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Wachstumsfaktoren aktivieren Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität und führen zur Auto-phosphorylierung von Tyrosinresten. Die PI3K bindet über ihre SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit an phosphorylierte Tyrosinreste der Rezeptoren oder Adapterproteine und katalysiert die Reaktion von PIP2 zu PIP3. Der generierte Botenstoff PIP3 dient als Andockstelle für die Kinasen PDK1 und Akt. Dadurch werden die beiden Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht, so dass Akt anschließend am Threonin 308 phosphoryliert werden kann. Zur vollständigen Aktivierung der Kinaseaktivität wird Akt zusätzlich am Serin 473 durch den mTORC2-Komplex (bestehend aus mTOR, Rictor, mLST8, PRAS40) phosphoryliert. Daraufhin überträgt die aktivierte Kinase Phosphatreste auf nachgeschaltete Effektorproteine, die in ihrer Wirkung entweder aktiviert oder gehemmt werden. Die Phosphatasen PTEN und SHIP stellen Negativregulatoren des Signalweges dar, indem sie PIP3 dephosphorylieren und eine Aktivierung von Akt verhindern.

Forkhead-Transkriptionsfaktoren

Die Forkhead-Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der Forkhead-Proteine und sind durch ein spezifisches DNA-Bindemotiv gekennzeichnet, das als Forkhead-Box bezeichnet wird [43]. Proteine mit der Forkhead-Box werden in allen Eukaryoten ubiquitär exprimiert und bestehen aus mindestens 39 Mitgliedern, die in 19 Subgruppen unterteilt werden [44]. Forkhead-Transkriptionsfaktoren mit der Forkheadbox O (FoxO) sind direkte Substrate von Akt und weisen drei Phosphorylierungsstellen auf. Beim Menschen wurden bisher vier FoxO-Proteine (FoxO1, FoxO3A, FoxO4 und FoxO6) identifiziert. Während FoxO3A stark im Hirn, Herz, Milz und in der Niere exprimiert wird, scheint die Expression von FoxO1, FoxO4 und FoxO6 gewebespezifisch zu sein. So wurde eine hohe Expression von FoxO1 im Fettgewebe beobachtet, FoxO4 wird dagegen stark im Skelettmuskel exprimiert und FoxO6 ist hauptsächlich im adulten Hirn nachweisbar [45]. Eine Phosphorylierung von Akt führt zum Export der Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern ins Zytoplasma durch die Anbindung der FoxO-Proteine an das 14-3-3-Chaperon und Exportin α /CRM1 [46]. Im Zytoplasma sind die FoxO-Transkriptionsfaktoren nicht stabil und werden über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut [47].

FoxO-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression zahlreicher Gene, die am Zellzyklus, an der Apoptose und bei DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind. Zu ihren Zielgenen gehören die proapoptotischen Gene *Bim*, *Noxo*, *Fas-Ligand*, *Trail* und *Bcl-6* [48]. Eine Überexpression der FoxO-Transkriptionsfaktoren führt zur Induktion des CDK-Inhibitors p27 und verhindert den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus [49]. Ebenso können FoxO-Proteine als Repressoren fungieren und die Expression von Zellzyklus-Aktivatoren regulieren. So konnte gezeigt werden, dass sie die Transkription von Cyclin D1 und Cyclin D2 reprimieren und dadurch einen G0/G1-Zellzyklusarrest auslösen [50]. Im Fall einer DNA-Schädigung fördern sie die Langlebigkeit der Zelle und induzieren die Transkription der DNA-Reparaturgene *GADD45* (*Growth arrest- and DNA damage-inducible protein 45*) und *DDB1* (*DNA damage-binding protein 1*). Des Weiteren schützen sie die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies, indem sie die Transkription der Gene für die *MnSOD* (Mangansuperoxid-Dismutase) und der *Katalase* nach oxidativem Stress einleiten [48]. Außerdem wird ihnen eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen zugeschrieben [51, 52].

Bei einigen Tumorerkrankungen wurde beobachtet, dass genetische Veränderungen oder posttranslationale Modifikationen zum Verlust der FoxO-Funktion führen. So konnten bei AML- und Rhabdomyosarkom-Patienten chromosomale Translokationen zwischen den *FoxO1*, *FoxO3A* und *FoxO4* und den *MLL*- bzw. dem *PAX3/7*-Genen nachgewiesen werden, die einen Bruch in der DNA-Bindedomäne der FoxO-Transkriptionsfaktoren erzeugten [53-55].

mTOR

Die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist ebenfalls ein bedeutendes Substrat von Akt und spielt bei der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation eine entscheidende Rolle. Die Aktivierung von Akt führt zunächst zur Phosphorylierung des *tuberous sclerosis protein 1/2* (TSC1/TSC2)-Komplexes. Dadurch wird das GTPase-aktive Protein TSC2 in seiner Funktion gehemmt und die GTP-Hydrolyse des Proteins Rheb verhindert. Somit liegt Rheb in seiner GTP-gebundenen Form vor und kann an die Kinasedomäne von mTOR binden und diese aktivieren [56]. TSC2 kann ebenfalls durch die Kinase ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren phosphoryliert werden und mTOR aktivieren. Somit stellt der TSC1/TSC2-Komplex ein Schnittpunkt zum Ras/Raf/Mek/ERK Signalweg dar [27].

Die Proteinkinase mTOR liegt in zwei Komplexen (mTORC1 und mTORC2) vor. Beide Komplexe setzen sich neben mTOR aus den Proteinen PRAS40 (*Prolin-rich Akt substrate of 40 kDa*) und mLST8 zusammen. Im mTORC1-Komplex ist das Protein Raptor mit mTOR verbunden und ist gegenüber dem Inhibitor Rapamycin sensitiv. Der mTORC2-Komplex ist zusätzlich aus den Proteinen Rictor und Sim1 aufgebaut und wird nicht durch Rapamycin gehemmt [57].

Zwei gut charakterisierte Effektoren, die vom mTORC1-Komplex reguliert werden und eine entscheidende Rolle bei der Proteinsynthese spielen, sind die p70-S6-Kinase (p70-S6K) und das an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindende-Protein-1 (4EBP-1). Die aktivierte p70-S6-Kinase phosphoryliert das ribosomale Protein S6 und induziert die Translation von mRNA-Molekülen, die für ribosomale Proteine kodieren. Phosphoryliertes 4EBP-1 dissoziiert vom eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) ab und hebt somit die Hemmung auf den Translationsinitiationskomplex auf. Dieser Komplex fördert die Anbindung der Ribosomen an die mRNA und leitet die Proteinsynthese ein [58].

Der aktivierte mTORC2-Komplex phosphoryliert Akt an der Aminosäure Ser473 und unterstützt zusätzlich die Phosphorylierung an der Aminosäure Thr308. Dabei wird die Stabilität der Kinase aufrechterhalten und das Überleben der Zelle gefördert.

Die Glycogensynthetase Kinase 3

Ein weiteres Substrat von Akt ist die Glycogensynthetase Kinase 3 (GSK3). Sie gilt als Schlüsselenzym im Glycogenmetabolismus und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusregulation und Proliferation. Von dem Enzym sind zwei Isoformen (GSK3 α und GSK3 β) bekannt, wobei GSK3 β häufig mit Tumoren assoziiert wird [59-61]. In ruhenden Zellen ist die Kinase aktiv und reguliert die Stabilität zahlreicher Transkriptionsfaktoren. Zu ihren Substraten zählen *Activator protein 1* (AP-1), *nuclear factor kappa B* (Nf κ B), c-Myc, β -Catenin, *cAMP response element binding protein* (C/EBP) und *CAAT enhancer binding protein* (CREB) [62-67]. Häufig werden ihre Zielproteine, die das Überleben der Zelle begünstigen, durch die Phosphorylierung für den Proteinabbau markiert und anschließend über das Proteasom degradiert.

GSK3 β stellt eine Schnittstelle zwischen dem PI3K/Akt- und dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg dar. Durch Akt wird die Serin-Threonin-Kinase GSK3 β an der hochkonservierten N-terminalen Regulationsseite am Serin (Aminosäure 9) phosphoryliert und inaktiviert. Dies hat zur Folge, dass β -Catenin akkumuliert, in den Zellkern wandert und dort mit den Transkriptionsfaktoren LEF/TCF als Transkriptionsaktivator fungiert. Hierbei werden Gene angeschaltet, die zur Aufrechterhaltung des Stammzellniveaus beitragen [68].

Eine Fehlregulation von GSK3 β wird häufig beim Pankreaskarzinom, Melanom, Colonkarzinom und hepatozellulärem Karzinom sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen beispielsweise Alzheimer, beobachtet [69-73].

BAD

Ein weiteres nachgeschaltetes Substrat von Akt ist das pro-apoptotische Protein BAD (*BCL-2 antagonist of cell death*). Dies gehört zur BCL-2-Proteinfamilie und wird durch Phosphorylierung am Serin (Position 136) inhibiert [73]. Phosphoryliertes BAD führt zur Anbindung des 14-3-3-Proteins und begünstigt das Überleben der Zelle [74]. Im aktiven Zustand bildet BAD einen Proteinkomplex, bestehend aus den anti-apoptotischen Proteinen BCL-2 und BCL-XL. Dadurch liegt das pro-apoptotische Protein BAX (*Bcl-2 associated X protein*) ungebunden im Cytoplasma vor und bewirkt die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Das Cytochrom c verbindet sich mit dem *Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) und bildet das Apoptosom. Dieser Proteinkomplex leitet die autolytische Spaltung der Caspase 9 ein und aktiviert die Caspase-Kaskade [73].

1.2.3 Fehlregulationen des PI3K/Akt-Signalweges in Tumoren

Die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges kann durch verschiedene Faktoren reguliert werden. Hierbei spielen Phosphatasen eine entscheidende Rolle, die zu einer Dephosphorylierung von Proteinen führen und dadurch die Aktivität der Signalmoleküle beeinflussen.

Eine bedeutende Rolle in der PI3K/Akt-Signalkaskade spielt das Tumorsuppressorgen PTEN (*Phosphatase und Tensin Homolog deleted on chromosome 10*). Das Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 im Bereich q23.31 lokalisiert [75]. PTEN ist ein Protein, das sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern verschiedene Funktionen ausüben kann. Membrangebundenes PTEN fungiert als Phosphatase. Das Enzym entfernt das 3-Phosphat am Phosphatidylinositoltriphosphat und bildet das Phosphatidylinositolbisphosphat [76]. Auf diese Weise wird die Aktivität von Akt kontrolliert und die Zellproliferation und Apoptose reguliert. Zusätzlich kann die Phosphatase weitere Signalmoleküle dephosphorylieren. Zu ihren Substraten gehören Proteine, die an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten phosphoryliert sind. Neben PIP3 wurde auch der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 2 sowie die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K als ihr Substrat identifiziert [77, 78]. Im Zellkern erhöht das Tumorsuppressorgen die

Chromosomenstabilität und verhindert DNA-Doppelstrangbrüche. Zusätzlich ist PTEN an der Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt [79].

Die PTEN-Expression wird durch eine Vielzahl von Mechanismen beeinflusst. Dazu gehören transkriptionale und posttranskriptionale Regulationen, Protein-Protein-Interaktionen oder posttranslationale Modifikationen. Die Stabilität und Aktivität des Proteins wird durch Phosphorylierung in der Phosphatase-Domäne des Enzyms reduziert. Durch seine Phosphataseaktivität ist PTEN auch in der Lage sich selbst zu dephosphorylieren [80].

PTEN-Dysregulationen werden häufig in Tumoren identifiziert und führen zu einer aberranten Akt-Aktivität. Der Funktionsverlust von PTEN kann auf Mutationen, Deletionen oder Proteininstabilität beruhen. Die Mutationen können bereits in den Keimzellen vorliegen und sind bei autosomal-dominant vererbten Hamartomen nachweisbar [81].

Neben Keimzellmutationen können auch somatische Mutationen den Inaktivierungsmechanismus von PTEN begünstigen. Insbesondere spielt hierbei die Haploinsuffizienz von PTEN eine Rolle. Dabei führt der Verlust eines PTEN-Allels zur Unterdrückung des zweiten Allels und induziert den Funktionsverlust des Proteins [82].

Die Tumorsuppressorfunktion von PTEN wird hauptsächlich durch zwei Mutationen (C124S und G129E) in der Phosphatasedomäne unterdrückt. Diese genetischen Veränderungen führen zur Reduktion der Lipid- und Proteinphosphataseaktivität. Insgesamt wurden ca. 55 % der PTEN-Mutationen in der Phosphatasedomäne und ca. 40 % der PTEN-Mutationen in der C2-Domäne des Proteins nachgewiesen [82].

Tumore und Zelllinien mit einem funktionslosem PTEN sind durch eine aberrante Akt-Aktivierung gekennzeichnet. In heterozygoten Mäusen mit nur einem funktionierenden PTEN-Allel sowie ein gewebespezifischer homozygoter Verlust von PTEN weisen häufig maligne Neoplasien auf. So konnte gezeigt werden, dass PTEN eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Stammzellpools spielt und die Entwicklung von Leukämien verhindert [83, 84]. Bei T-ALL Patienten ist eine PTEN-Inaktivierung ein häufiges Ereignis [29]. Dabei ist eine verminderte PTEN-Expression oft mit einer Phosphorylierung des Proteins verbunden [85]. Mutationen im Gen des Transmembranrezeptores *Notch1* führen ebenfalls zur verminderten PTEN-Expression und sind in mindestens 50 % der T-ALL-Patienten nachweisbar [86, 87].

Ein weiterer Negativregulator des PI3K/Akt-Signalweges ist die Phosphatase SHIP (*SH2 domain containing inositol 5-phosphatase*). Dieses Enzym dephosphoryliert PIP3 am 5-Phosphat des Inositolringes und bildet das Phosphatidylinositolbisphosphat. SHIP-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Akt-Aktivität und können myeloproliferative Syndrome entwickeln [88]. Obwohl PTEN und SHIP die PIP3-Level in der Zelle reduzieren, scheint das Tumorsuppressorgen PTEN eine übergeordnete Rolle in diesem Signalweg zu spielen.

Eine erhöhte PI3K-Aktivität kann auch durch somatische Mutationen in der katalytischen Untereinheit der PI3K (p110 α) induziert werden. In verschiedenen Studien wurden drei häufige Punktmutationen im *PIK3A*-Gen identifiziert. Zwei befinden sich in der helikalen Domäne (E542K und E545K) und eine in der Kinase-Domäne (H1047R) des Proteins [89]. Diese Mutationen wurden insbesondere im Prostata-, Endometrium- und Colonkarzinom sowie beim Mammakarzinom nachgewiesen [82, 90-92]. Dagegen sind sie im hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe eher selten [82].

Im Effektorprotein Akt wurde bisher nur von einer aktivierenden Mutation (E17K) berichtet. Sie wurde in der PH-Domäne des Proteins identifiziert und führt zu einer Wachstumsfaktor-unabhängigen Membrantranslokation [93]. Bislang wurde die Mutation nur in einigen Tumorentitäten nachgewiesen und scheint eine untergeordnete Bedeutung in der Tumorentstehung zu haben [94-96].

1.3 Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges

Aufgrund seiner Dysregulation bei verschiedenen Tumoren scheint die Blockade des PI3K/Akt-Signalweges ein möglicher Therapieansatz zu sein. Mittlerweile befinden sich mehr als 100 Substanzen in der präklinischen Entwicklung, die den PI3K/Akt-Signalweg hemmen [80]. Eine zunehmende Anzahl dieser Inhibitoren wird inzwischen in klinischen Studien untersucht. Hierbei handelt es sich insbesondere um Substanzen, die gezielt die Kinasen PI3K, Akt und mTOR blockieren [97]. Die Wirkungsweisen dieser neuen Inhibitoren sind vielfältig. Einige dieser Hemmstoffe wurden so entwickelt, dass gleichzeitig auch mehrere Effektorinasen blockiert werden. Im Folgenden werden die vier Inhibitoren vorgestellt, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.3.1 Ly294002

Ly294002 ist ein Quercetin-Analog (Abbildung 3) und gehört zu den PI3K-Inhibitoren der ersten Generation. Die Substanz hemmt reversibel alle Isoformen der PI3K-Familie durch Blockierung der ATP-Bindungstasche [98-100]. Inzwischen zeigten einige Studien, dass Ly294002 auch weitere Kinasen inhibiert, darunter die *DNA-dependent Proteine kinase* (DNA-PK), *casein kinase 2* (CK2), Pim-1 und mTOR [101-103]. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (2 h) und hohen Toxizität in präklinischen Studien wurde diese Substanz nicht zur Therapie zugelassen und findet hauptsächlich Anwendung in der experimentellen Forschung [104].

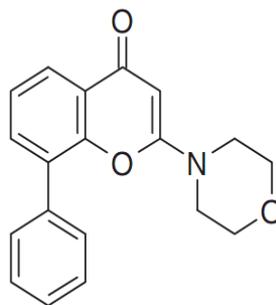


Abbildung 3: Strukturformel des Inhibitors Ly294002

1.3.2 RAD001

Der Inhibitor RAD001 (Everolimus, Afinitor®) gehört zu den Rapamycin-Derivaten und wurde von Novartis entwickelt. Die Strukturformel der Substanz ist in der Abbildung 4 dargestellt. RAD001 bindet mit hoher Affinität an das *FK506-Binding Protein-12* (FKB-12) und interagiert zusammen als Komplex mit der FRB-Domäne des mTOR-Proteins. Dadurch wird Raptor von mTOR abgelöst und die Aktivität des mTORC1-Komplexes unterdrückt [105]. Die Hemmung der mTOR-Kinase führt zu

einer verminderten Translation von Genen, die das Wachstum und die Angiogenese von Tumorzellen beeinflussen. Der Inhibitor zeigt ebenfalls eine immunsuppressive Wirkung und wird nach Organtransplantationen verwendet. Seit 2009 ist RAD001 auch für die Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms zugelassen [106, 107]. Der Inhibitor befindet sich derzeit in Phase II/III-Studien bei verschiedenen soliden Tumorerkrankungen und wird sowohl als Monotherapie als auch in der Kombination mit Chemotherapeutika untersucht [97, 108, 109].

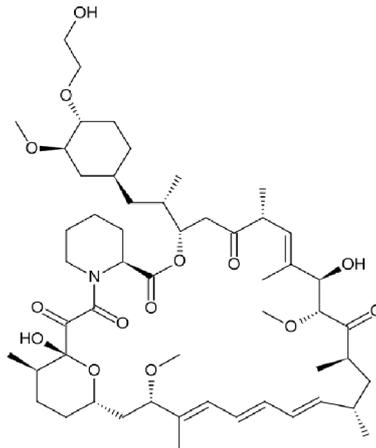


Abbildung 4: Strukturformel des Inhibitors RAD001

1.3.3 NVP-BEZ235

NVP-BEZ235 (BEZ235) gehört zur dritten Generation der PI3K-Inhibitoren und wurde ebenfalls von Novartis entwickelt. BEZ235 ist ein Imidazoquinolin-Derivat (Abbildung 5) und hemmt die Aktivität der katalytischen PI3K-Untereinheiten ($p110\alpha$, β , γ und δ) und mTOR durch Blockierung der ATP-Bindungstasche [110]. In präklinischen Untersuchungen zeigte die Substanz antiproliferative Effekte und reduzierte die Tumorgröße in Xenograft-Mäusen [111-114]. Inzwischen wird BEZ235 in einigen klinischen Studien (Phase I/II) bei Patienten mit soliden Tumoren untersucht.

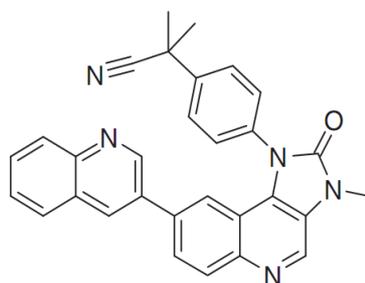


Abbildung 5: Strukturformel des Inhibitors BEZ235

1.3.4 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®) gehört zur Familie der Bis-Aryl-Harnstoffverbindungen (Abbildung 6) und wurde von Bayer Healthcare durch Modifikation eines Raf-Kinaseinhibitors entwickelt. Neben der Hemmung von verschiedenen Raf-Isoformen (Raf-1, B-Raf und mutiertes B-Raf V599E), haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass die Substanz auch die Aktivität anderer Tyrosinkinase blockiert. Zu ihren Zielstrukturen gehören die Rezeptoren *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR), *platelet-derived growth factor* (PDGFR), *fibroblast growth factor receptor* (FGFR-1), c-Kit, *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT-3) und *rearranged during transfection* (RET). Diese Tyrosinkinase sind in Tumorzellen häufig konstitutiv aktiviert und stellen somit Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie dar [115]. Mittlerweile ist Sorafenib zur Therapie bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom zugelassen, bei denen eine vorherige Interferon-alpha- oder Interleukin-2-basierte Therapie versagt hat. Ebenso wird Sorafenib zur Behandlung des metastasierenden Leberzellkarzinoms eingesetzt [116, 117]. Gegenwärtig wird die Wirksamkeit von Sorafenib in der akuten myeloischen Leukämie in klinischen Studien untersucht. Inwiefern Sorafenib einen Therapieerfolg bei der ALL hat, ist derzeit noch unklar.

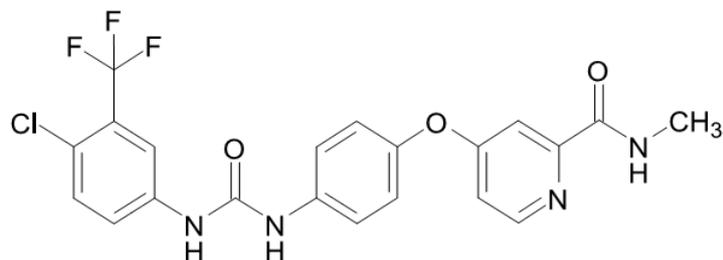


Abbildung 6: Strukturformel des Inhibitors Sorafenib

1.4 Zielstellung

Die Identifikation und Untersuchung fehlregulierter Signalwege ist für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte für die ALL von großer Bedeutung. Einige Studien haben gezeigt, dass der PI3K/Akt-Signalweg in der AML aberrant aktiviert ist und eine prognostische Bedeutung haben könnte. Für die ALL existieren bisher nur wenig Daten über die Rolle der PI3K/Akt-Signalkaskade. Die vorliegende Promotionsarbeit verfolgte daher das Ziel, diesen Signalweg näher zu untersuchen. Dazu sollte die Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges in verschiedenen ALL-Zelllinien und *de novo* ALL-Zellen analysiert werden. Der Nachweis der Proteinaktivität erfolgte mittels spezifischer Antikörper, die entweder die phosphorylierte Form oder die gesamte Form des Proteins erkennen. Ferner sollte das Tumorsuppressorgen PTEN auf Mutationen untersucht werden. Hierfür wurde eine PCR-Methode zur Amplifikation des Gens etabliert, um die einzelnen Exone zu sequenzieren.

Durch anschließende funktionelle Untersuchungen mit Hilfe verschiedener Kinaseinhibitoren (Ly294002, RAD001, BEZ235 und Sorafenib) sollte die biologische Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges bei der ALL analysiert werden. Ziel war es, die Aktivität der Schlüsselmoleküle PI3K, Akt und mTOR zu blockieren und deren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der malignen Zellen zu untersuchen. Außerdem sollte nach der Behandlung mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib ein Genexpressionsprofil erstellt werden, um Gene zu identifizieren, die durch die Kinaseinhibition in ihrer Transkription beeinflusst werden. Diese Gene könnten dann mögliche Angriffspunkte für gezielte Therapien darstellen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die kombinierte Anwendung der Kinaseinhibitoren BEZ235 bzw. Sorafenib mit konventionellen Chemotherapeutika. Die Substanzen wurden dabei sowohl simultan als auch sequenziell appliziert. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob durch die Kombination eine Wirkungssteigerung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen erreicht werden kann und Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationszeiten feststellbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Leukämiezelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (DSMZ) bezogen. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank durchgeführt. Alle Zellen wachsen in Suspension und wurden nach Angaben der DSMZ in ihrem Medium mit FKS und dem Zusatz von 1 % Penicillin und Streptomycin kultiviert. Hierfür wurden Zellkulturflaschen mit 25 cm²- bzw. 75 cm²-Wachstumsfläche verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank unter einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Je nach Verdopplungszeit wurden die Zellen zwei- bis dreimal wöchentlich gesplittet. Die Kulturbedingungen zu den verwendeten Zelllinien sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Eine detaillierte Übersicht zu den Zelllinien ist im Anhang (Abschnitt 7.1.7 Tabelle 16) dargestellt.

Tabelle 3: Kulturbedingungen der Zelllinien

Zelllinie	Typ	Zellkulturmedium	Verdopplungszeit
SEM	Vorläufer-B-ALL	90 % IMDM + 10 % FKS	30 h
REH	Vorläufer-B-ALL	90 % RPMI + 10 % FKS	50-70 h
RS4;11	Vorläufer-B-ALL	90% MEM α + 10 % FKS	50 h
Jurkat	T-ALL	90 % RPMI + 10 % FKS	25-30 h
MOLT4	T-ALL	80 % RPMI + 20 % FKS	40 h
DOGKIT	Burkitt-Lymphom	90 % RPMI + 10 % FKS	40-50 h
DOGUM	B-Zell-NHL	80 % RPMI + 20 % FKS	50-100 h
GUMBUS	Burkitt-Lymphom	90 % RPMI + 10 % FKS	48 h

2.1.2 Einstellung der Zellzahl und Bestimmung der Vitalität

Mittels Neubauerzählkammer und Trypanblau wurde die Anzahl und die Vitalität der Zellen im Lichtmikroskop bestimmt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff der nur von toten Zellen aufgenommen wird. Das Zytoplasma und der Zellkern toter Zellen sind blau gefärbt, während lebende Zellen im Lichtmikroskop leuchtend hell erscheinen. Für die Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen entsprechend mit Trypanblau (0,04 % in PBS) verdünnt und 10 μ l Zellsuspension in die Neubauerzählkammer pipettiert. Anschließend wurden die Zellen am Lichtmikroskop gezählt und die Zellzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Von jeder Zelllinie wurden Kryokonserven im flüssigen Stickstoff angelegt. Dazu wurden Aliquots à 1 ml mit jeweils 1×10^6 Zellen in einem PBS und 18 % (v/v) DMSO/HSA-Gemisch angesetzt und anschließend im Kryoröhrchen bei -80 °C in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox schonend $1\text{ °C}/\text{min}$ langsam eingefroren. Nach etwa 24 h erfolgte eine Umlagerung der Zellen in den Stickstofftank.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C langsam erwärmt. Um das zelltoxische Einfriermedium DMSO vollständig zu entfernen, wurde die Zellsuspension zweimal mit 10-20 ml angewärmtem Medium bei 180 g für 5 min bei 20 °C gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Beurteilung der Vitalität durch die Zellzahlbestimmung mit Trypanblau. Die Zellen wurden im entsprechendem Medium aufgenommen und eine Zellkultur in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen angesetzt.

2.1.4 Isolierung von humanen mononukleären Zellen des Blutes

Die Verwendung von *de novo*-Material erfolgte nach schriftlichen Einverständnis der Patienten bzw. aus Überschussmaterial von Routineuntersuchungen. Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut oder Knochenmark von Patienten mit akuter Leukämie wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Dazu wurde das Blut bzw. das Knochenmark mit einem Volumen kaltem PBS gemischt und vorsichtig auf ein Volumen Biocoll überschichtet. Der Blut-Biocoll Ansatz wurde anschließend bei 1.200 g für 12 min bei 4 °C ungebremst zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurden die mononukleären Zellen vorsichtig abpipettiert und zweimal in PBS bei 180 g für 10 min bei 4 °C gewaschen. Um vorhandene Erythrozyten zu entfernen, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dazu wurde das Zellpellet mit $0,25\text{ M NH}_4\text{Cl}$ gelöst und für 10 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend bei 200 g für 12 min bei 4 °C zentrifugiert und zusätzlich zweimal in 10-20 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden aus etwa 5×10^5 Zellen der Anteil der Blastenpopulation mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.2.1) bestimmt. Mindestens 5×10^6 Zellen wurden in 50-100 μl RIPA -Puffer lysiert. Das Lysat wurde bis zur Proteinbestimmung (siehe Abschnitt 2.4.2) bei -20 °C gelagert.

2.1.5 Behandlung der ALL-Zellen mit Kinaseinhibitoren und Zytostatika

Für die Versuche wurden die B-ALL-Zelllinien (SEM und RS4;11) und T-ALL-Zelllinien (Jurkat und MOLT4) in ihrem Kompletmedium mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen und einem Volumen von 1,5 ml pro Ansatz in eine 24-Loch-Zellkulturplatte eingesät. Dabei wurden die Inhibitoren bzw. Zytostatika in verschiedenen Konzentration zu den Zellen ins Medium hinzugefügt. Die Tabelle 4

gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen sowie die angewendeten Konzentrationen.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Substanzen

Substanz	Wirkstoffklasse/-mechanismus	Konzentration
AraC	Zytostatikum/Antimetabolit	0,05-2,5 μ M
Doxorubicin	Zytostatikum/Interkalation	25 nM
Dexamethason	Glucocorticoid	0,1-10 μ M
Ly294002	PI3K-Inhibitor	5-25 μ M
RAD001	mTOR-Inhibitor	1-100 nM
BEZ235	PI3K- und mTOR-Inhibitor	1-100 nM
Sorafenib	Multikinaseinhibitor (u.a. VEGFR, FLT3, c-Raf, c-Kit)	0,73-7,3 μ M

Die Inhibitoren Ly294002, RAD001, BEZ235 und Sorafenib sind nicht wasserlöslich und wurden in DMSO gelöst. Um eventuelle Nebenwirkungen dieses Lösungsmittels auszuschließen, wurden parallel zur Behandlung, Kontrollansätze mit der entsprechenden DMSO-Menge angesetzt. Die Behandlung der Zellen erfolgte entweder einzeln mit einer Substanz oder durch die Kombination zweier Substanzen (Inhibitor und Zytostatikum). Bei den Kombinationsexperimenten wurden die Inhibitoren entweder gleichzeitig, 24 h vor oder 24 h nach der Behandlung mit dem Zytostatikum dem Medium hinzugefügt. Die behandelten Zellen wurden anschließend nach Standardbedingungen im Brutschrank für 0,5-72 h kultiviert.

2.1.6 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels WST-1

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem WST-1-Assay (Roche) analysiert. Das schwach rot gefärbte und wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-1 (*water soluble tetrazolium*) wird bei einer intakten Atmungskette der Zellen durch Succinatdehydrogenasen in dunkelrotes Formazansalz enzymatisch umgesetzt. Die Farbveränderung ist ein Maß für den Anteil metabolisch aktiver Mitochondrien und korreliert mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen. Der Test wurde in einer 96-Mikrotiterplatte in Triplikaten angesetzt und insgesamt in mindestens drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Dafür wurden 5×10^4 Zellen/Loch in 150 μ l Medium nach der Behandlung mit den Substanzen ausgesät. Nach 24, 48 und 72 h wurden 15 μ l WST-1 zu jedem Ansatz dazu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 h im Brutschrank wurde der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen. Als Blindwert wurde reines Medium mit WST-1 verwendet. Dieser wurde von dem Mittelwert der Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben abgezogen.

2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellsuspensionen zur quantitativen Bestimmung von Oberflächen- bzw. intrazellulären Molekülen mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Charakterisierung der Blastenpopulation, zum Nachweis von Apoptose und Nekrose sowie zur Zellzyklusanalyse angewendet. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACSCalibur von Becton Dickinson vorgenommen. Die Steuerung und Auswertung der Messung erfolgte mit der Software CellQuest Pro 4.0.2.

2.2.1 Analyse von Oberflächenantigenen zur Bestimmung des Blastenanteils

Nach Isolierung mononukleärer Zellen aus *de novo*-Material von ALL-Patienten wurde die Reinheit der Probe (Blastenanteil) durchflusszytometrisch bestimmt. Je Ansatz wurden 1×10^5 Zellen in einem Volumen von 100 μ l PBS mit jeweils 10 μ l Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Kompensation der Messung wurden die Antikörper CD45-FITC und CD3-PE verwendet. Parallel wurden die Isotypkontrollen (IgG1-FITC und IgG1-PE) mitgeführt, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen. Der prozentuale Blastenanteil wurde anhand des individuellen charakteristischen Markerprofils durch Analyse der Oberflächenmoleküle CD2, CD5, CD7, CD19 und CD34 mit spezifischen Antikörpern ermittelt. Die verwendeten Antikörper sind im Anhang (Abschnitt 7.1.5) tabellarisch zusammengefasst.

2.2.2 Nachweis von Apoptose und Nekrose

Die Detektion von Apoptose und Nekrose erfolgte mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI). Annexin-V ist ein Kalzium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist. Vitale Zellen tragen die Phosphatidylserine an der Innenseite der Zellmembran. Bei Beginn der Apoptose translozieren die Zellen ihre Phosphatidylserine zur äußeren Seite der Lipidschicht. Annexin-V wird deshalb als Indikator für den Nachweis frühapoptotischer Zellen genutzt. Da spätapoptotische und nekrotische Zellen eine permeable Zellmembran aufweisen, kann Annexin-V in die Zelle eindringen und ebenfalls an die Phosphatidylserine binden. Um eine Unterscheidung zwischen frühapoptotischen bzw. spätapoptotischen und nekrotischen Zellen vorzunehmen, wurden die Zellen zusätzlich mit PI gefärbt. Dieser fluoreszierender Farbstoff kann nur durch eine defekte Zellmembran diffundieren und sich in die DNA einlagern. Frühapoptotische Zellen sind noch durch eine intakte Zellmembran gekennzeichnet und werden nur mit Annexin-V angefärbt. Spätapoptotische und nekrotische Zellen können sowohl Annexin-V als auch PI aufnehmen [118].

Für die Analyse wurden die Zellen einmal in 2 ml PBS gewaschen und im Anschluss in 100 μ l Bindungspuffer (1x) aufgenommen. Dieser Puffer enthält eine ausreichende Konzentration von Kalziumionen, so dass die Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserine stabilisiert wird. Pro Ansatz wurde die Zellsuspension mit 5 μ l Annexin-V-FITC für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 μ l Bindungspuffer (1x) zur Zellsuspension pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen mit 0,6 μ g/ml PI gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte anhand eines Dot-Plots und ist in der Abbildung 7 dargestellt.

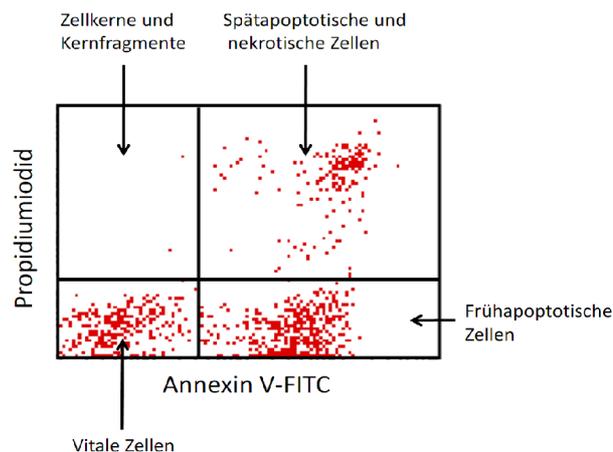


Abbildung 7: Analyse von apoptotischen und nekrotischen Zellen

Die Analyse der apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte durch die Anfärbung mit Annexin-V-FITC und PI. Frühapoptotische Zellen sind Annexin-V-FITC⁺ und PI⁻. Spätapoptotische und nekrotische Zellen sind Annexin-V-FITC⁺ und PI⁺.

2.2.3 Zellzyklusanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Inhibitoren auf den Verlauf der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs Propidiumiodid (PI) wurde der DNA-Gehalt der Zellen analysiert. Die Zuordnung der Zellzyklusphasen erfolgt durch die Intensität des Fluoreszenzsignals, welches sich proportional zum DNA-Gehalt der Zelle verhält. Nicht-proliferierende Zellen verbleiben in der G0/G1-Phase und weisen einen einfachen DNA-Gehalt auf, während Zellen mit einer doppelten DNA-Menge, sich der G2/M-Phase zuordnen lassen. Befinden sich Zellen in der DNA-Synthesephase (S-Phase) liegt ein ein- bis zweifacher DNA-Gehalt vor. In der Abbildung 8 ist die Analyse der Zellzyklusphasen dargestellt.

Zur Zellzyklusanalyse wurden mindestens 1×10^6 Zellen abzentrifugiert und zweimal in PBS gewaschen. Das Pellet wurde vorsichtig in eiskaltem 70 %-igem Ethanol gelöst und bei -20 °C eingefroren. Die ethanolfixierten Zellen wurden frühestens nach 24 h in kaltem PBS gewaschen und

mit 500 µl RNase (1 mg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in je 2 ml PBS gewaschen und das Zellpellet in 500 µl PI (50 µg/ml) gelöst. Danach wurde die PI-Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer gemessen.

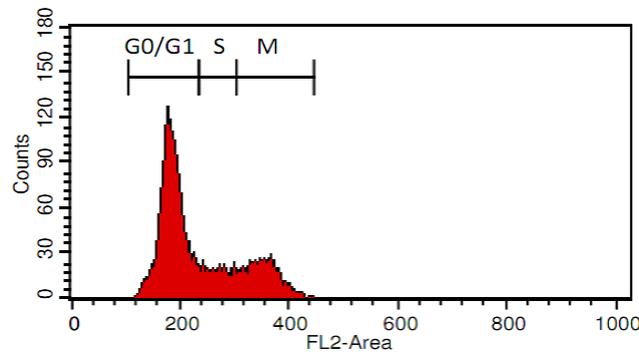


Abbildung 8: Ermittlung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusphasen wurden über den DNA-Gehalt der Zellen mittels Propidiumiodid bestimmt. Die Darstellung der PI-Fluoreszenzintensität erfolgte über das FL2-Area Histogramm. Hierbei wird der vordere Peak der G0/G1-Phase (einfacher DNA-Gehalt) und der hintere Peak der M-Phase (doppelter DNA-Gehalt) zugeordnet. Dazwischen befindet sich die S-Phase, der Abschnitt, bei dem die DNA-Replikation in der Zelle stattfindet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem NucleoBond® CB 100 Kit von Macherey und Nagel. Die Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden in 5 ml G2-Puffer lysiert zusätzlich mit 100 µl Proteinase K behandelt. Um den Abbau von Proteinen und RNA zu beschleunigen, wurde das Gemisch für 60 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der DNA über eine Anionenaustauschsäule. Hierbei wurde die DNA zunächst an die Säule gebunden und mit Hilfe von Waschpuffern von degradiertem RNA, Proteinen und Puffersubstanzen getrennt. Danach wurde die DNA mit 5 ml N5-Puffer eluiert und anschließend mit 3,5 ml Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet getrocknet und je nach Größe in 50-200 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.2 RNA-Extraktion

Zur Isolierung der RNA wurde das Rneasy® Mini-Kit von Qiagen verwendet. Die Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen mit 350 µl RLT-Mercapto-ethanol-Puffer aufgebrochen, so dass die RNA freigesetzt wurde. Das Homogenat wurde filtriert, mit dem gleichen Volumen Ethanol gemischt und auf die Silica-Membransäule pipettiert. Die RNA und andere Zellbestandteile wurden so selektiv an die Membran gebunden. Mehrere Wasch-schritte ermöglichten ein Aufreinigen der RNA, wobei unspezifische Moleküle entfernt wurden.

Durch eine zusätzliche DNase I Behandlung wurden eventuelle genomische DNA-Kontaminationen ausgeschlossen. Die RNA wurde schließlich mit 20-40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80 °C eingefroren.

2.3.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte am Nanodrop® ND 1000 Spektralphotometer. Dazu wurden 1-2 µl Nukleinsäure direkt auf die Messoberfläche des Spektralphotometers pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Ein Extinktionswert von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über den Quotienten von A260/A280 kontrolliert. Dieser sollte bei einer proteinfreien Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.3.4 Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurde das Reverse Transcription System® Kit der Firma Invitrogen verwendet. Mit Hilfe der reversen Transkriptase wird das RNA-Template in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert und ein RNA-DNA-Hybridmolekül gebildet. Durch die zusätzliche RNase H-Aktivität des Enzyms wird die RNA abgebaut und die verbleibende cDNA wird in doppelsträngige cDNA synthetisiert. Je Probe wurden 1 µg RNA, 1 µl Oligo-dT-Primer (3 µg) und nukleasefreies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 27 µl auf Eis zusammenpipettiert und für 10 min bei 70 °C auf dem Thermoblock denaturiert. Die Synthese der cDNA erfolgte durch die Zugabe der folgenden Komponenten: 5x Puffer (Endkonzentration 1x), 0,1 mM DTT, 0,2 mM dNTP und 200 Units Superscript II Enzym mit anschließender Inkubation bei 42 °C für 60 min auf dem Heizblock. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.5 Qualitative Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um Nukleinsäurefragmente *in vitro* gezielt zu amplifizieren. Dazu werden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die jeweils zu einem Strang am 3`-Ende der DNA-Zielsequenz komplementär sind. Zusätzlich werden vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie ein Puffer benötigt [119]. Durch mehrere Zyklen von Denaturierung des Produktes, Primer-Hybridisierung und Elongation kann die Synthese des DNA-Abschnittes erfolgen.

Die qualitative PCR wurde zur Amplifikation der PTEN-Exone 1-9 durchgeführt. In der Tabelle 5 sind die Primersequenzen und Größen der PCR-Produkte zusammengefasst.

Tabelle 5: PTEN-Primersequenzen

PTEN-Primer	Sequenz	Produktlänge
Exon 1 F Exon 1 R	5`-CCA TTT CCA TCC TGC AGA AG -3` 5`-GTC TAC TCC CAC GTT CTA AG -3`	229 bp
Exon 2 F Exon 2 R	5` -TGA CCA CCT TTT ATT ACT CC- 3` 5`-AGT ATC TTT TTC TGT GGC TTA- 3`	313 bp
Exon 3 F Exon 3 R	5`-ATA GAA GGG GTA TTT GTT GGA -3` 5`-ACC TCA CTC TAA CAA GCA GAT A -3`	293 bp
Exon 4 F Exon 4 R	5`-TTC AGG CAA TGT TTG TTA -3` 5`-CTC GAT AAT CTG GAT GAC TCA -3`	225 bp
Exon 5 F Exon 5 R	5`-GCA ACA TTT CTA AAG TTA CCT A -3` 5`-TCT GTT TTC CAA TAA ATT CTC -3`	386 bp
Exon 6 F Exon 6 R	5`-TAC GAC CCA GTT ACC ATA G -3` 5`-CTT CTT TAG CCC AAT GAG -3`	412 bp
Exon 7 F Exon 7 R	5`-CAG ATA CAG AAT CCA TAT TTC G -3` 5`-CTC ACC AAT GCC AGA GTA AG -3`	427 bp
Exon 8 F Exon 8 R	5`-CTC AGA TTG CCT TAT AAT AGT C -3` 5`-TCA TGT TAC TGC TAC GTA AAC -3`	558 bp
Exon 9 F Exon 9 R	5`-GTT CAT CTG CAA AAT GGA -3` 5`-TGG TAA TCT GAC ACA ATG TCC TA -3`	396 bp

Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Die PCR-Bedingungen wurden für jedes Primerpaar durch Veränderung der Annealingtemperatur, der Zugabe von Magnesiumchlorid und der Länge der PCR-Zyklen optimiert. Um DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jedem PCR-Durchlauf zusätzlich Wasser statt DNA eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in der Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Komponenten	Menge
10 x Puffer	2,5 µl
100 mM dNTPs	2,5 µl
5-50 pM Primer F	0,5 µl
5-50 pM Primer R	0,5 µl
25 mM MgCl ₂	0-2 µl
2,5 Unit Taq-Polymerase	0,5 µl
50-100 ng DNA	1-2 µl
Wasser	ad 25 µl

Die PCR-Reaktionen wurden an dem PCR-Cycler C1000 von Biorad durchgeführt. In der Tabelle 7 sind die Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der Exone 1-3, sowie 5-9 dargestellt. Zur Produktbildung von Exon 4 wurde eine *touch-down*-PCR (zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur) etabliert. Die PCR-Bedingungen sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 7: PCR-Programm der Exone 1-3, 5-9

Exon	Start	Zyklus			Zyklenanzahl	Ende
		Denaturierung	Annealing	Extension		
1	95°C (40 s)	94°C (60 s)	62°C (60 s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
2	95°C (40 s)	94°C (60 s)	52°C (60 s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
3	95°C (180 s)	94°C (30 s)	54°C (30s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
5	95°C (180 s)	94°C (60 s)	48°C (60 s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
6	95°C (40 s)	94°C (60 s)	52°C (60 s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
7	95°C (60 s)	94°C (40 s)	52°C (40 s)	72°C (60 s)	35	72°C (300 s)
8	95°C (40 s)	94°C (30 s)	56°C (30 s)	72°C (30 s)	30	72°C (300 s)
9	98°C (120 s)	94°C (20 s)	61°C (20 s)	68°C (30 s)	29	68°C (600 s)

Tabelle 8: PCR-Programm des Exons 4

Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
95 °C	300 s	1
95 °C	30 s	12 x
<i>touchdown</i> von 60 °C -50 °C	60 s	
72 °C	60 s	
95 °C	45 s	25 x
50 °C	45 s	
75 °C	60 s	
72 °C	360 s	1
4 °C	∞	

2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung und Identifizierung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. Dabei ist das Laufverhalten der Nukleinsäurefragmente abhängig von ihrer Größe, wobei kleinere Fragmente im elektrischen Feld schneller wandern als größere Fragmente. Zusätzlich wird die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente durch die Agarosekonzentration beeinflusst. In dieser Arbeit diente die Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der PCR-Produkte. Dafür wurden 2,5 %-ige Gele (w/v) verwendet.

Zur Herstellung eines Gels wurde die Agarose im 0,5 x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurden 0,2 µg/ml Ethidiumbromid dazu pipettiert. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar macht. Die Agaroselösung wurde leicht geschwenkt und in eine Gelgießvorrichtung mit entsprechenden Kämmen gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren wurden die Geltaschen jeweils mit 10 µl PCR-Produkt und 5 µl Probenpuffer beladen. Als Längenstandard diente die Basenpaarleiter Low Range von Fermentas. Die Elektrophorese wurde bei ca. 100 V (5-10 V/ cm²) in 0,5 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Visualisierung und Dokumentation der PCR-Produkte erfolgte mit dem E.A.S.Y.win32 System, bestehend aus einem UV-Transilluminator und einer CCD-Kamera von Herolab.

2.3.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung der PCR-Fragmente wurde das MinElute[®] PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Das Reinigen der Fragmente erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde 1 Volumen PCR-Produkt mit 5 Volumen PB-Puffer gemischt und auf eine Silicasäule pipettiert. Während die DNA-Fragmente an die Membran binden, wurden überschüssige Komponenten der PCR mit dem

PE-Waschpuffer abzentrifugiert. Anschließend wurde das gereinigte PCR-Produkt mit 10 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von LGC Genomics nach der Technik des Kettenabbruchs (Sanger-Methode) durchgeführt. Bei dieser Methode wird der gewünschte DNA-Abschnitt zunächst denaturiert und mit einem Primer (Vorwärts bzw. Rückwärts) der an den Einzelstrang bindet, versetzt. In vier parallelen Ansätzen wird neben den vier dNTPs (dATP, dTTP, dCTP und dGTP) jeweils ein Didesoxynukleotid (ddNTP) zugefügt. Von einem Einzelstrang ausgehend wird der komplementäre Strang synthetisiert. Erfolgt der Einbau eines ddNTPs, wird die Synthese abgebrochen, da durch die fehlende 3'OH-Gruppe die Anlagerung eines neuen Nukleotids verhindert wird [120]. Bei diesem Prozess entsteht ein Satz an Fragmenten, die sich hinsichtlich ihrer Länge um jeweils eine Base voneinander unterscheiden. Die verschiedenen ddNTPs sind durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert und können mit Hilfe eines Lasers detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA der ALL-Zelllinien auf Mutation im *PTEN*-Gen untersucht. Die Sequenzierung wurde für die Exone 1-9 durchgeführt. Für jede Probe wurden zwei Sequenzierungsansätze vorbereitet, um den gewünschten DNA-Abschnitt eines Exons von beiden Seiten ausgehend, sequenzieren zu können. Für eine Sequenzierungsreaktion wurden 10 ng aufgereinigtes PCR-Produkt und der jeweilige Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und an LGC Genomics gesendet.

Nach Zustellung der Rohdaten durch LGC Genomics erfolgte die Beurteilung der Sequenzierungsreaktion mit dem Programm Finch TV 1.4.0 (Geospiza). Zum Sequenzvergleich wurde das Programm BLASTN vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, Washington, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angewendet. Als Referenz diente die humane *PTEN* Nukleotidsequenz (NG_007466).

2.3.9 Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalyse wurden die Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips® von Affymetrix verwendet. Auf diesem DNA-Hybridisierungsarray sind über 47.400 Transkripte vorhanden, die parallel in einem Versuchsansatz analysiert werden können.

Ein Array setzt sich aus einer Vielzahl von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden zusammen. Die Oligonukleotide bestehen aus einer 25 bp langen Sequenz (Sonde), die an definierten Positionen des Genchips immobilisiert wurden und in *Sondensets* zusammengefasst sind. Ein Sondenset repräsentiert ein Transkript und setzt sich aus elf verschiedenen Sondenpaaren zusammen. Diese bestehen jeweils aus einer *perfect match Zelle* (PM) und einer *mismatch Zelle* (MM). Während bei einer PM-Zelle die Basenabfolge komplett komplementär zur hybridisierten RNA ist, wurde bei der MM-Zelle an Position 13 des Oligonukleotids ein Basenaustausch induziert.

Das als *mismatch* bezeichnete Oligonukleotid dient als interne Kontrolle und ermöglicht es, unspezifische Interaktionen (Kreuzhybridisierungen) und Hintergrundsignale zu eliminieren.

Bevor die Hybridisierung einer Probe erfolgte, wurde die RNA in mehreren Schritten amplifiziert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Die Analyse der Genexpression unterteilte sich in drei Abschnitte:

I) Präparation der RNA

Die Genexpressionsanalyse wurde an den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat 24 h nach der Behandlung mit Sorafenib durchgeführt. Als Kontrolle wurden DMSO-behandelte Zellen mitgeführt. Nach der Inkubation mit Sorafenib wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im RLT-Mercaptoethanolpuffer lysiert (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Präparation und die Hybridisierung der RNA wurde nach der Anleitung „GeneChip Expression 3`Amplifikation One-Cycle Target Labeling and Control reagents“ des Herstellers in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. rer. nat. Dirk Kozcan am Institut für Immunologie der Universität Rostock durchgeführt.

Aus 5 µg RNA und unter Verwendung eines T7-(dT)₂₄ Primer sowie der Superscript II Reversen Transkriptase wurde zunächst ein komplementärer DNA-Einzelstrang (Erst-Strang-Synthese) gebildet. Danach erfolgte ein enzymatischer Abbau des RNA-Strangs durch die RNase H. Anschließend wurde der DNA-Doppelstrang (Zweit-Strang-Synthese) mit Hilfe der *E. coli* DNA Polymerase I synthetisiert. Um eine markierte RNA zu erhalten, wurde aus der vorliegenden cDNA eine *in vitro* Transkription mittels Biotin-gekoppelter Nukleotide (Biotin-16-UTP) durchgeführt. Anschließend wurde die neu-synthetisierte komplementäre RNA (cRNA) durch eine Nukleinsäurefällung mit 80 %-igem Ethanol von überschüssigen Nukleotiden aus der Reaktion befreit und danach für die Hybridisierung fragmentiert.

II) Hybridisierung und Anfärbung der RNA

Die Hybridisierung erfolgte im GeneChip[®] Hybridisierungssofen mit einem speziellen Puffersystem bei einer Temperatur von 45 °C. Anschließend wurden die beladenen Genchips mit Hilfe einer automatisierten Station (Affymetrix GeneChip[®] Fluidics Station 450) gewaschen und angefärbt. Hierbei wurde die biotin-gekoppelte RNA mit einer spezifischen Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (SAPE) beladen. Zur Signalverstärkung wurde der Genchip zusätzlich mit einem anti-Streptavidin-Antikörper (Ziege) und einem sekundären Biotin-gekoppelten anti-Ziegen-Antikörper markiert. Nach der erneuten Zugabe der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung erfolgte die Signalerfassung mit dem GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, St. Clara, CA) bei einer Auflösung von 1,56 Micron.

III) Datenanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Math. Änne Glass (Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung, Universität Rostock) und Frau

Dipl. Bioinf. Sonja Boldt (Institut für Systembiologie und Bioinformatik, Universität Rostock). Die Genexpressions- (*signals*) und Detektionssignale (*calls*) aller 47.400 Transkripte wurden mit der Affymetrix Microarray Software (MAS 5.0) ermittelt. Dabei werden die Detektionssignale entsprechend ihrer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität als eindeutig nachweisbar (*present*), nicht eindeutig nachweisbar (*marginal*) und nicht nachweisbar (*absent*) eingeordnet.

a) Qualitätskontrolle der Daten

Anschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle der Daten. Zur Absicherung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden jeweils die Expressions- und Detektionssignale aus den drei Replikaten der Kontrolle (D1, D2, D3) mit den drei Replikaten der behandelten Zellen (S1, S2, S3) in neun Kreuzvergleichen (S1-D1, S1-D2, S1-D3, S2-D1, S2-D2, S2-D3, S3-D1, S3-D2 und S3-D3) untersucht. Hierbei sollten die Expressionsänderungen in mindestens sechs von neun Kreuzvergleichen konform sein.

Transkripte mit einem *absent*-Signal in allen drei Replikaten oder Transkripte ohne Gensymbol-annotation (nach HG-U133Plus2.na27 Affymetrix annotation file) wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Zu allen Genen wurden die Spezifität und Sensitivität der dazugehörigen Transkriptsonden aus der Datenbank GeneAnnot des Weizmann Institutes (<http://www.genecards.weizmann.ac.il/geneannot/index.shtml>) abgefragt, um die Eindeutigkeit der Zuordnung zwischen Sonde und repräsentiertem Gen bewerten zu können. Zusätzlich wurde die Qualität der Replikate mittels Bestimmtheitsmaßes (R^2) bewertet. Das Bestimmtheitsmaß ist ein Maß für die Variabilität der Einzelsignalwerte im Vergleich zweier Arrays und kann paarweise für ein Replikatarray ermittelt werden. Die Übereinstimmung zweier Replikate wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,98 angenommen und entspricht einer Übereinstimmung der Signalwerte zweier Replikate zu 98 %.

b) Differentielle Expressionsanalyse

Zur Identifikation differentiell exprimierter Gene wurde der t-Test (Bonferroni-adjustiert auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ für die Anzahl der berücksichtigten Transkripte) für drei Replikate der behandelten Zellen gegen drei Replikate der unbehandelten Zellen pro Transkript durchgeführt. Dabei wurden p-Werte $< \alpha_{\text{adjustiert}}$ als signifikant angenommen und nur Gene mit einer Spezifität und Sensitivität von 1 nach der Bewertung mit GeneAnnot berücksichtigt. Die anschließende Genannotation zur biologischen Funktion signifikant-regulierter Gene erfolgte mit Hilfe der Datenbank DAVID (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov/conversion.jsp>).

c) Erstellung von Heatmaps zur Darstellung signifikant differentieller Gene

Mit dem Softwarepaket R, Version 2.8.1 (<http://www.r-project.org>) wurden die Genexpressionsdaten über den average-linkage-Algorithmus in Genclustern zusammengefasst und in Rot-Grün-Heatmaps dargestellt. In der Clusteranalyse wurden die Genexpressionssignale aller Replikate der

signifikant regulierten Gene verwendet. Per Clusteralgorithmus wurden innerhalb der Zelllinien sowohl die Kontroll- als auch die Behandlungsreplikate zusammengefasst und beide Cluster deutlich voneinander abgegrenzt. In den Heatmaps wurden die Unterschiede der Genexpressionssignale (grün: < 5000, rot: > 8000, schwarz: 5000- 8000) zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen entsprechend der Cluster-Zuordnung farblich dargestellt.

2.3.10 Real-time PCR

Die real-time PCR ist eine erweiterte PCR-Technik, bei der schon während der Reaktion die Amplifikate erfasst und quantifiziert werden können. Diese Methode erlaubt die direkte Detektion des PCR-Produktes während des Beginns der exponentiellen Reaktionsphase. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür Sequenz-spezifische Oligonukleotide (TaqManTM-Sonden) verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind und den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ausnutzen. Die Sonde bindet zwischen den Primern innerhalb der Zielsequenz und ist an dem 5'-Ende mit einem Donor-Fluorochrom (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) markiert.

Durch eine Lichtquelle wird der Reporter angeregt. Dieser überträgt anschließend einen Teil der Energie an den Quencher ab. Während der Synthesephase wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase vom 5'-Ende abgebaut. Hierbei werden Quencher und Reporter räumlich voneinander getrennt, so dass der Energietransfer nicht mehr erfolgen kann. Dies führt zur Zunahme des Donor-Fluoreszenzsignals. Das Signal korreliert dabei quantitativ mit der Menge des PCR-Produktes und wird über die verwendete Software 7000 SDS 1.2.3 dokumentiert. Abhängig von der Menge der Ziel-DNA übersteigen in einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produktes, die Signale des Hintergrundes. Diese Schwelle wird von der Software erkannt und als *cycle threshold* (Ct-Wert) bezeichnet. Der Ct-Wert wird als Ausgangspunkt für die Quantifizierung der ursprünglichen Ziel-DNA-Menge genutzt. Er ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Zielsequenzen in der Probe; das heißt je höher die ursprüngliche Konzentration der Ziel-DNA in der Probe, desto niedriger ist der entsprechende Ct-Wert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Quantifizierung der PCR-Produkte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Bei dieser Methode wird zunächst der Ct-Wert des Zielgens gegen den Ct-Wert der endogenen Referenz normalisiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{endogene Kontrolle}}$). Diese Berechnung wird sowohl bei einer unbehandelten als auch bei einer behandelten Probe durchgeführt. Anschließend wird die Differenz aus den erhaltenen Werten gebildet ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{behandelt}} - \Delta\text{Ct}_{\text{unbehandelt}}$). Um die n-fache Expression zwischen der behandelten und nichtbehandelten Probe darzustellen, wird das Ergebnis in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Zur Berechnung wurde das Programm REST-384[®] Version 2 (Relative Expression Software Tool, <http://www.gene-quantification.de/download>) verwendet.

Die quantitative real-time PCR wurde zur Validierung der Array-Experimente genutzt. In diesem Zusammenhang wurde die mRNA-Expression von VEGFA nach der Behandlung mit Sorafenib in den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat untersucht. Als endogene Kontrolle wurde die Glucuronidase verwendet. Die real-time PCR wurde im 96-Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Je Ansatz wurden 4 µl cDNA einer Probe in die Platte vorgelegt und 16 µl Mastermix hinzugefügt. Die Bestandteile des Reaktionsansatzes für die Amplifikation der VEGFA- bzw. der Glucuronidase-cDNA sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes

Zielsequenz	Komponenten	Volumen
VEGFA	2 x Mastermix	10 µl
	20 x Taqman Genexpressionsmastermix	1 µl
	Wasser	5 µl
	<i>Gesamtvolumen</i>	16 µl
Glucuronidase	2 x Mastermix	10 µl
	Sonde Gluc	1 µl
	Primer F	1 µl
	Primer R	1 µl
	Wasser	3 µl
	<i>Gesamtvolumen</i>	16 µl

Die Reaktion wurde an einem ABI PRISM SDS 7000 Gerät der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das verwendete PCR-Programm ist in der Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Real-time PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	1 min	

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und das Pellet je nach Größe in 50-100 μ l RIPA-Puffer gelöst. Um einen Abbau der Proteine bzw. eine Dephosphorylierung zu verhindern, wurden dem Lysepuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren zugefügt. Die Lysate wurden anschließend für 20 min auf Eis inkubiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um einen vollständigen Aufschluss der Zellen zu erreichen, wurde eine zusätzliche Behandlung mit Ultraschall (zweimal mit jeweils 8 Pulsen) durchgeführt. Das Abtrennen der Proteine vom Zelldebris erfolgte durch eine Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 10 min. Der Proteinüberstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, wobei 8 μ l für die Bestimmung des Proteingehalts nach dem Protokoll von Bradford verwendet wurden [121]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Farbumschlag der Substanz Coomassie-Blue G-250 von rotbraun nach blau als Folge der Proteinbindung. Der negativ-geladene Farbstoff bindet positiv-geladene Argininy- und Lysinreste, dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Mit Hilfe von Proteinstandards, hergestellt aus einer BSA-Stammlösung mit bekannter Konzentration (1 μ g/ml-25 μ g/ml), wurde eine Eichkurve erstellt und somit die Proteinkonzentration des Lysats ermittelt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden von einer Probe mehrere Verdünnungen mit Aqua dest. in einem Volumen von 800 μ l angesetzt (bzw. 800 μ l Standard), mit 200 μ l Bradfordreagenz gemischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden aus jedem Ansatz jeweils dreimal 200 μ l Bradford-Proteinlösung in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 595 nm an einem Photometer gemessen. Aus den Extinktionswerten der Triplets wurde das arithmetische Mittel bestimmt und unter Beachtung der Verdünnung, der Probenmenge und mit Hilfe der mitgeführten Proteinstandards, die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

Zum Schluss wurde das Proteinlysate mit dem gleichen Volumen von 2 x Probenpuffer und 5 % β -Mercaptoethanol gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Hierbei werden Proteine zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Durch spezifische Antikörper werden die

Proteine gebunden und mit Hilfe einer Lichtreaktion sichtbar gemacht. Das Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wird durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ermöglicht. Hierbei passieren die Proteine zunächst das Sammelgel und werden zu einer scharfen Bande gebündelt, so dass sie gleichzeitig in das anschließende Trenngel einwandern können (nach Laemmli, 1970).

Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protean® Tetra-Gelelektrophoresekammer (Biorad) durchgeführt. Das Trenngel wurde nach dem Auspolymerisieren mit einem Sammelgel überschichtet, in die mit Elektrophoresepuffer (1x) gefüllte Kammer eingespannt und anschließend mit den Proteinlysaten (25 µg) beladen. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard (Precision Plus Kaleidoscope™, Biorad) aufgetragen. Das Einlaufen der Proteine ins Sammelgel erfolgte pro Gel bei 20-25 mA und 120 V. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel wurde bei 30-35 mA und 160 V durchgeführt.

Nach vollendeter Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran durch einen Semi-Dry-Blot. Dazu wurde die Membran in Methanol äquilibriert und anschließend mit Whatman®-Filterpapieren und den entsprechenden Transferpuffern (Anode I-, Anode II- bzw. Kathodenpuffer) benetzt. Das Gel wurde über die PVDF-Membran platziert und zwischen den Whatman-Filterpapieren eingebettet. Um einen kontinuierlichen Übertrag der Proteine zu gewährleisten, wurden Luftblasen und überschüssiger Transferpuffer zwischen den einzelnen Schichten des Blots entfernt.

Die Proteinübertragung erfolgte bei 1 mA/cm² Gel und 10 W für 1 h. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an positiv-geladene Aminogruppen bindet und genutzt wird, um den kompletten Transfer der Proteine und einen gleichmäßigen Proteinauftrag nachzuweisen. Das angefärbte Proteinbandenmuster wurde zusätzlich genutzt, um die Membran an definierten Bereichen zu schneiden, so dass gleichzeitig verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewicht detektiert werden können. Die Membran wurde für etwa 5 min in Ponceau S gefärbt und danach mit Aqua dest. gespült. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch dreimaliges Waschen in Anode II-Puffer.

Vor der Immunreaktion wurden unspezifische Proteinbindestellen für 1 h mit 5 %-iger (w/v) Magermilch bzw. 5 % iger (w/v) BSA-TBST-Lösung abgeblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem verdünnten Primär-Antikörper in 1 %-iger (w/v) Magermilch- bzw. 1 %-iger (w/v) BSA-TBST-Lösung im Kühlschrank über Nacht oder für 1 h bei Raumtemperatur durch Schwenken auf dem Schüttler inkubiert. In der Tabelle 11 sind die verwendeten Primär-Antikörper dargestellt. Die Angaben zum Hersteller und Klon sind im Anhang (Abschnitt 7.1.5) tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 11: Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Größe	Wirt	Verdünnung
p-Akt (Thr308)	60 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
p-Akt (Ser473)	60 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
Akt	60 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
p-FoxO3a	90 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % BSA-Lösung
FoxO3a	90 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % BSA-Lösung
p-p70 S6K (Thr389)	70 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % BSA-Lösung
p70 S6K	70 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % BSA-Lösung
p-4EBP1 (Ser65)	15-20 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
p-4EBP1 (Th70)	15-20 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
4EBP1	15-20 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
PTEN	54 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
p-GSK3β (Ser9)	46 kDa	Maus	1:500 in 1 % MM-Lösung
GSK3β	46 Da	Maus	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	17, 19 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Caspase-3	17, 19,35 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Cleaved Caspase-7 (Asp198)	20 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Caspase-7 (Asp198)	20, 35 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Cleaved PARP (Asp214)	20 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
PARP	116, 89,116 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
Cyclin D3	31 kDa	Maus	1:1000 in 1 % MM-Lösung
p27 Kip1	27 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
p15 INK4B	15 kDa	Kaninchen	1:1000 in 1 % MM-Lösung
CDK4	30 kDa	Maus	1:500 in 1 % MM-Lösung
VEGFA	15-43 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung
β-Catenin	92 kDa	Kaninchen	1:500 in 1 % MM-Lösung

Abkürzungen: MM: Magermilch, BSA: bovines Serumalbumin

Nach der Inkubation des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min in 1 x TBST-Puffer gewaschen. Dann folgte die Inkubation des sekundären Antikörpers. Dieser wurde ebenfalls in 1 %-iger Magermilch- bzw. 1 %-iger BSA-TBST-Lösung (w/v) verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt. Die verwendeten Sekundär-Antikörper sind in der Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Verwendete Sekundär-Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen	Ziege	1:5000	Cell Signaling
Anti-Maus	Ziege	1:5000	Cell Signaling

Anschließend wurde die Membran dreimal im TBST-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte über die Meerrettich-Peroxidase. Dieses Enzym ist an den sekundären Antikörper gekoppelt und wird durch Zugabe des Substrates Wasserstoffperoxid in das Phthalazin-Derivat Luminol oxidiert, was zu einer Chemilumineszenz führt. Für diese Reaktion wurde die Membran für 5 min mit der Substratlösung inkubiert. Anschließend wurden die Blots mit der Kodak-Imager-Station 440 detektiert.

2.4.4 VEGFA-Nachweis mittels ELISA

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren zur Quantifizierung von Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test zum Nachweis von VEGFA aus Zellkulturüberständen durchgeführt. Hierzu wurde der humane VEGFA-ELISA von der Firma Abnova verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf die Verwendung von zwei Antikörpern, die ein Protein spezifisch an zwei verschiedenen Epitopen binden und einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex bilden.

Hierbei lag ein spezifischer VEGFA-Antikörper auf einer 96-Mikrotiterplatte immobilisiert vor, der nach Inkubation mit der Probe spezifisch das VEGFA bindet. Dazu wurde die Probe 1:2 mit einem Probenpuffer verdünnt und in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden nicht gebundene Proteine durch mehrere Waschschrte entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit einem Biotin-markierten sekundären Antikörper für 1 h. Hierbei wurde das VEGFA an einem anderen Epitop spezifisch von dem sekundären Antikörper gebunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden ungebundene Antikörper durch mehrere Waschschrte entfernt. Anschließend erfolgte die Detektion unter Bildung eines Farbumschlages durch eine Enzymreaktion mit Hilfe eines Streptavidin-HRP-Konjugates und einer Substratlösung. Der Farbumschlag wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge bei 620 nm gemessen. Die VEGFA-Konzentration in der Probe wurde anhand einer Eichreihe, die aus Proben mit bekannter VEGFA-Konzentrationen (15,6 pg/ml-1000,0 pg/ml) erstellt wurde, ermittelt.

2.4.5 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode zur Darstellung von Proteinen in Zellen und Gewebeschnitten durch eine spezifische Antikörperfärbung. Der Antikörper ist entweder direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt oder wird in einem nachfolgenden Schritt über einen zweiten Antikörper mit Fluoreszenz markiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation des β -Catenins mit Hilfe der Immunfluoreszenz in ALL-Zellen untersucht. Vor der Färbung wurden die Zellen mittels Zytospin-Zentrifugation auf eine definierte Fläche eines Objektträgers gebracht. Dafür wurden 400 μ l Zellsuspension ($12,5 \times 10^4$ /ml) in den Trichter des Zytospins pipettiert und bei 100 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min in Methanol fixiert und danach für 1 h bei Raumtemperatur mit 1 %-iger (w/v) BSA-PBS-Puffer blockiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit dem Kaninchen anti- β -Catenin-Antikörper (1:100 in 1 %-iger BSA-PBS-Puffer) für 30 min inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal mit PBS-Tween-Puffer (0,05 % Tween 20, PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen 1:400) für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger dreimal mit PBS-Tween-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI, dazu wurden die Zellen mit DAPI-Vectashield-Medium eingedeckelt. Die gefärbten Zellen wurden mit dem Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit der Software Spectral Imaging (Case Data Manager 5.5) von Visitron Systems aufgenommen.

2.5 Statistik

Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm Excel 2007 von Microsoft Office. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiparametrigem t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Die Bewertung der Kombinationsanalysen erfolgte nach dem Konzept der unabhängigen Wirkung. Diese Methode wird auch als Bliss-Analyse bezeichnet [122-124]. Bei dieser Berechnung wird davon ausgegangen, dass die Einzelstoffe unabhängige und verschiedene Wirkungsmechanismen aufweisen und in der Mischung einen gemeinsamen Effekt auslösen. Bei dieser Analyse wird ein Mischeffekt (Erwartungswert) berechnet, der sich aus den Effekten der Einzelwirkungen ergibt und mit den beobachteten Effekten verglichen wird. Eine Wirkungsverstärkung (Synergismus) liegt vor, wenn der beobachtete Kombinationseffekt größer als der Erwartungswert ist. Als antagonistisch wird der Effekt bezeichnet, wenn die Gesamtwirkung schwächer als der Erwartungswert ist [123, 124].

Als Grundlage für die Berechnung wurden die Zellzahlen der Einzelsubstanzen ins Verhältnis zu der Zellzahl der unbehandelten Probe gesetzt. Der Erwartungswert (EW) des Kombinationseffektes wurde aus dem Produkt der Einzelsubstanzeffekte von der Summe der Einzelsubstanzeffekte subtrahiert $[EW = (a + b) - (a \cdot b)]$ und anschließend mit dem beobachteten Kombinationseffekt verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges in der ALL

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges wurde an dem Schlüsselprotein Akt in ALL- und hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphom(NHL)-Zellen untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate verschiedener Zelllinien und *de novo*-Zellen mittels Western Blot analysiert. Die Aktivierung des Signalweges wurde über die Expression der phosphorylierten Formen von Akt an den Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 bestimmt. Als Kontrolle wurde das Gesamt-Akt-Protein mitgeführt. Zusätzlich wurde bei den Zelllinien das distal von Akt gelegene Substrat FoxO3A untersucht. Hierbei wurde die Phosphorylierungsstelle Threonin 32 analysiert.

3.1.1 Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges in ALL-Zelllinien

Eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges wurde in allen untersuchten ALL-Zelllinien nachgewiesen. Dabei war die Expression der Proteine und die Phosphorylierung unterschiedlich stark. In der Abbildung 9 ist ein repräsentativer Western Blot dargestellt.

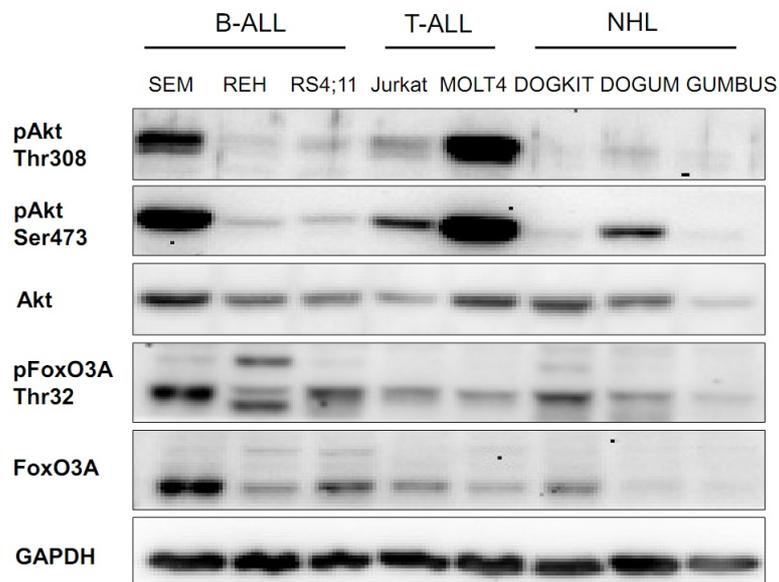


Abbildung 9: Analyse zur PI3K/Akt-Aktivierung in ALL-Zelllinien mittels Western Blot

Dargestellt ist die Proteinexpression von pAkt (Thr308 und Ser473), Gesamt-Akt, pFoxO3A (Thr32) und Gesamt-FoxO3A in den ALL- und NHL-Zelllinien mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Die Zelllinien SEM (B-ALL), MOLT4 und Jurkat (beide T-ALL) sowie DOGUM (NHL) zeigten eine starke Akt-Aktivierung, die über die zwei Phosphorylierungsstellen (Thr 308 und Ser 473)

nachweisbar war. Dagegen lagen bei den Zelllinien REH und RS4;11 (B-ALL) nur schwache Proteinbanden des phosphorylierten Akt-Proteins vor. Bei den Zelllinien DOGKIT und GUMBUS wurde keine Phosphorylierung von Akt nachgewiesen. Die phosphorylierte Form von FoxO3A wurde in allen untersuchten Zelllinien detektiert. Bei den REH Zellen zeigten sich neben der phosphorylierten Form von FoxO3A, zwei zusätzliche Proteinbanden. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Untersuchungen zur Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der Pathogenese der ALL, Zelllinien mit einer starken bis mittleren Aktivierung von Akt ausgewählt. Folglich wurden für die *in vitro*-Versuche mit verschiedenen Substanzen die Zellen SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 verwendet.

3.1.2 Mutationsanalyse des PTEN-Gens in ALL-Zelllinien

PTEN ist ein Negativregulator des PI3K/Akt-Signalweges und ist häufig in Tumoren mutiert oder deletiert. In der vorliegenden Arbeit wurde PTEN in den ALL-Zelllinien auf Veränderungen im Gen und im Protein untersucht.

Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot in drei unabhängigen Versuchen analysiert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Western Blots sind in der Abbildung 10 dargestellt. In den B-ALL sowie in den NHL-Zelllinien konnte PTEN detektiert werden. Im Gegensatz zu den B-ALL-Zellen, die eine starke PTEN-Expression zeigten, wurde in den NHL-Zelllinien DOGKIT, DOGUM und GUMBUS eine geringere PTEN-Proteinexpression nachgewiesen. Die T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 zeigen keine PTEN-Expression. Ein Mangel des Regulatorproteins konnte somit bestätigt werden.

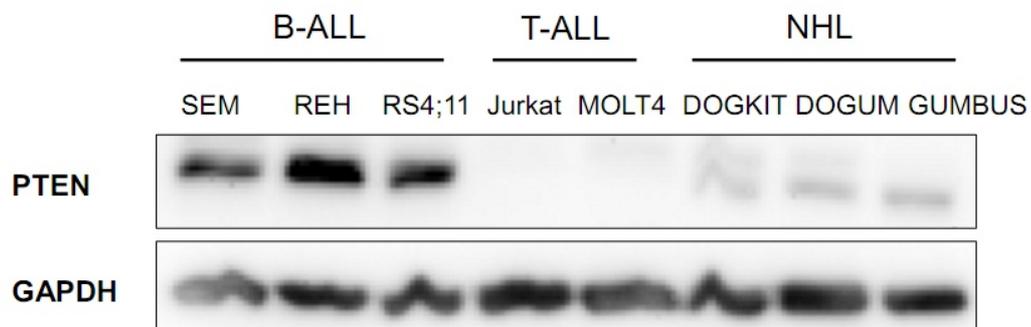


Abbildung 10: PTEN-Expression in den ALL- und NHL-Zelllinien

Dargestellt ist die Proteinexpression von PTEN in den ALL- und NHL-Zelllinien mittels Western Blot. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Für die Mutationsanalyse des *PTEN*-Gens wurde die DNA aus den ALL- und NHL-Zelllinien extrahiert und die neun Exone mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurde für jedes Exon eine optimale PCR-Bedingung etabliert, so dass nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde. Die verschiedenen PCR-Bedingungen sind im Abschnitt 2.3.5 zusammengefasst. Die Amplifikate der Exone 1-9 wurden mittels Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und sind in der Abbildung 11 dargestellt. Das PCR-Produkt von Exon 7 der Zelllinie Jurkat bestand aus zwei verschiedenen großen Fragmenten, die sich nur durch einige Basenpaare unterschieden und oberhalb der erwarteten Bandengröße lagen. Eine weitere Auftrennung dieser beiden Fragmente ist nicht gelungen, so dass kein Ausschneiden der Banden möglich war. Alle anderen Fragmente zeigten keine Unterschiede im Bandenmuster und wurden im Anschluss an die PCR aufgereinigt und sequenziert.

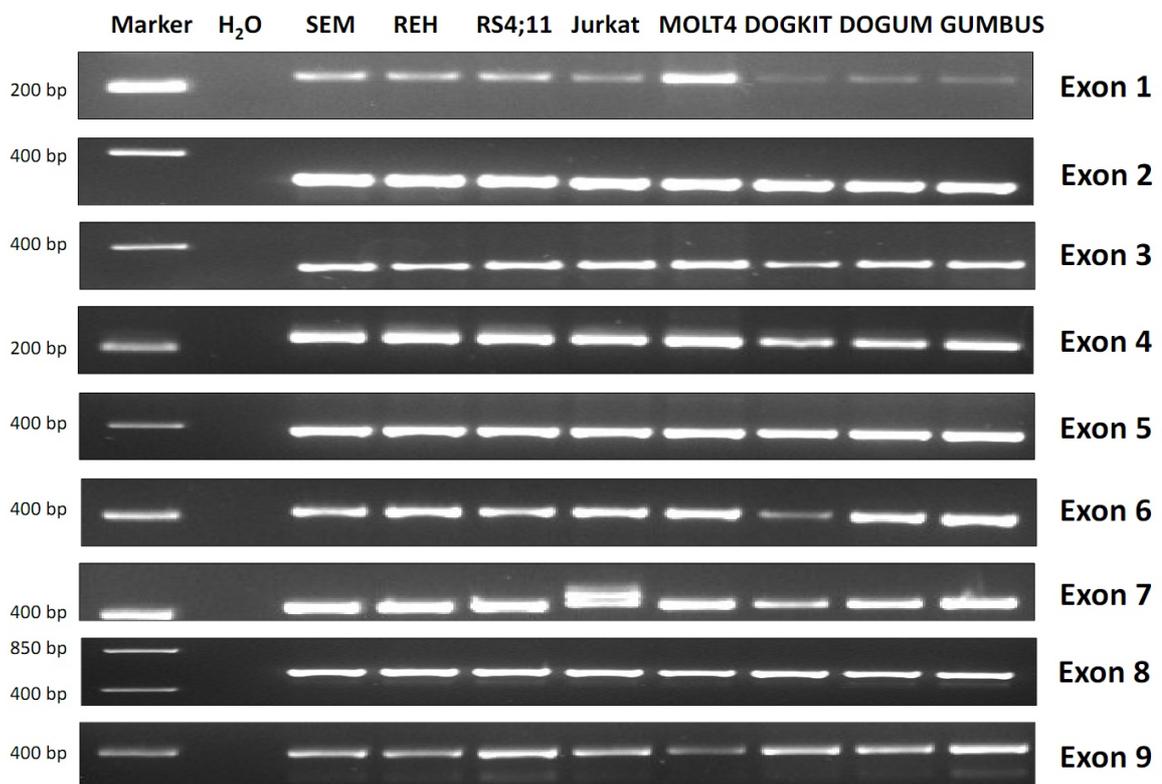


Abbildung 11: PCR-Produkte der *PTEN*-Exone.

Dargestellt sind die Amplifikate der *PTEN* Exone 1-9 der ALL- und NHL-Zelllinien mittels Agarosegelelektrophorese.

Anhand der Sequenzanalyse wurde eine Mutation in der Zelllinie MOLT4 identifiziert. Bei dieser Sequenzveränderung lag ein Verlust eines Adenins im Exon 7 an der Position g99.580 der genomischen DNA vor. In der Abbildung 12 ist ein Ausschnitt des Exon 7 im Bereich der genetischen Veränderung der Zelllinie MOLT4 dargestellt. Im Vergleich wurde dazu die Zelllinie SEM gegenübergestellt. Weitere Mutationen wurden nicht identifiziert.

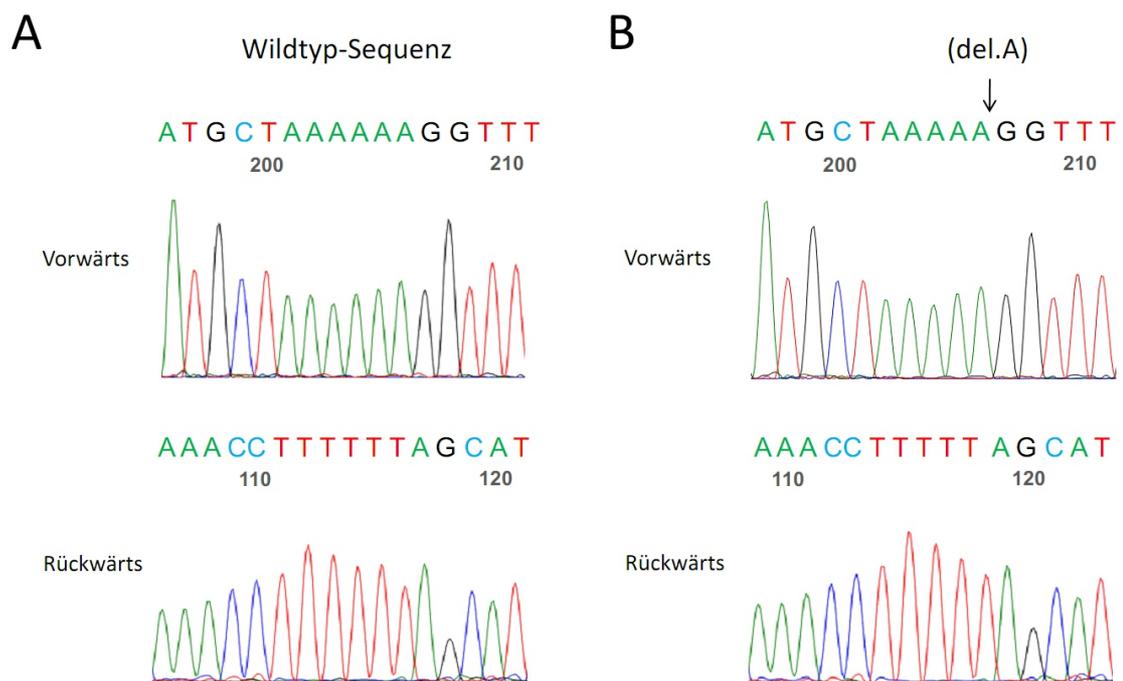


Abbildung 12: Sequenzierungsausschnitt von Exon 7 des PTEN-Gens

Alle vier Ausschnitte stellen Sequenzen von Exon 7 des PTEN-Gens dar. A: Wildtypsequenz am Beispiel der Zelllinie SEM in Vorwärts-Leserichtung bzw. in Rückwärts-komplementärer Leserichtung B: Verlust eines Adenin in MOLT4 in Vorwärts-Leserichtung bzw. in Rückwärts-komplementärer Leserichtung.

3.1.3 Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges in de novo ALL-Zellen

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges wurde zusätzlich in den mononukleären Zellen von ALL- und NHL-Patienten mittels Western Blot untersucht. Die Patientendaten und Ergebnisse bezüglich der Phosphorylierung von Akt (Thr308 und Ser473) sowie zum PTEN-Status sind in der Tabelle 13 zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit wurden Proteinlysate von 14 Patienten analysiert. Insgesamt wurde bei neun Patienten (6/9 B-ALL, 1/3 T-ALL, 1/1 Burkitt Lymphom und 1/1 Sézary-Syndrom) mindestens eine phosphorylierte Form von Akt (pAkt Thr308 und/oder pAkt Ser473) mittels Western Blot detektiert. Dies entspricht 64,3 % der untersuchten Proben. Bei fünf dieser Patientenproben waren beide Phosphorylierungen von Akt nachweisbar. In vier weiteren Proteinlysaten wurde nur eine Phosphorylierung detektiert. Zusätzlich wurde die Expression des Tumorsuppressors PTEN untersucht. In elf Patienten konnte das PTEN-Protein mittels Western Blot als starkes Signal detektiert werden. In der Patientenprobe P173 war das Protein nur schwach nachweisbar.

Tabelle 13: Patientencharakteristika

Pat.Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Blasten	pAkt(Thr/Ser)	PTEN
P129	37	w	c-ALL	66 %	+/+	+
P142	40	w	c-ALL	94 %	-/-	+
P152	70	w	pro-B-ALL	81 %	+/-	+
P163	20	w	c-ALL	62 %	+/+	n.b.
P164	1	m	c-ALL	88 %	+/+	n.b.
P169	63	m	pro-B-ALL	44 %	-/-	+
P171	31	m	c-ALL	63 %	-/-	+
P168	73	m	c-ALL	80 %	+/+	+
P34	51	m	Burkitt-Lymphom	n.b.	-/+	+
P97	26	m	T-ALL	71 %	-/-	+
P167	43	m	T-ALL	75 %	+/+	+
P149	74	w	Sézary-Syndrom	81 %	-/+	+
P173	9	w	T-ALL	95 %	-/-	(+)
P178	63	m	c-ALL	99 %	-/+	+

w: weiblich; m: männlich; +: Expression, (+): schwache Expression; -: keine Expression; n.b.: nicht bestimmt

3.2 Untersuchungen zur Wirksamkeit des PI3K-Inhibitors Ly294002

Der Einfluss von Kinaseinhibitoren auf die Zellproliferation von ALL-Zellen wurde zunächst mit dem bekannten PI3K-Inhibitor Ly294002 in SEM-Zellen untersucht. Für die Analyse wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen dieser Substanz inkubiert. Antiproliferative Effekte wurden mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors beobachtet. Das Zellwachstum war mit 12,5 μM und 25 μM Ly294002 gehemmt. Ein Anstieg der Apoptose- und Nekroseraten wurde mit 25 μM Ly294002 nach 72-stündiger Inkubation induziert. Nach 96 h lag die Apoptoserate bei 19 % und die Nekroserate bei 23 %. Die Ergebnisse sind der Abbildung 13 zusammengefasst.

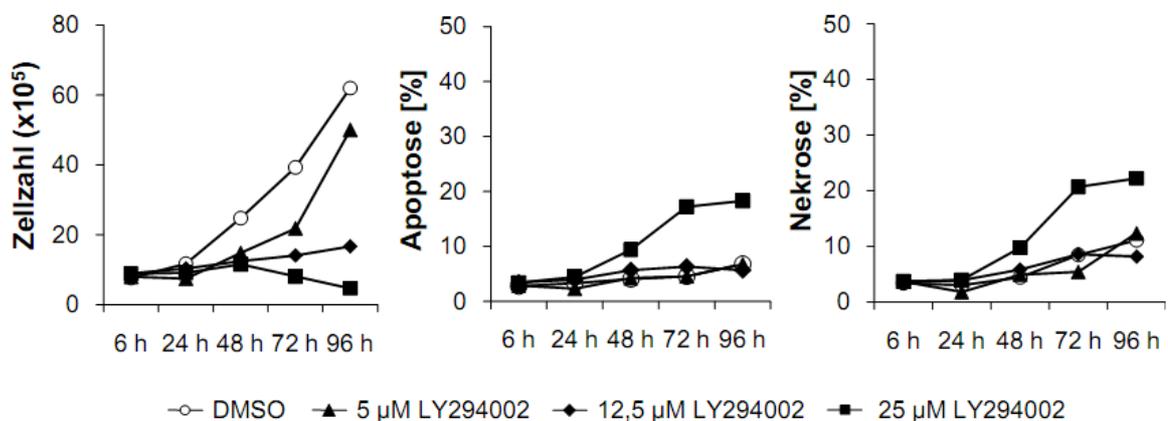


Abbildung 13: Einfluss des Ly294002 auf die Zellproliferation und Apoptose

Die B-ALL Zelllinie SEM wurde mit Ly294002 (5 μM , 12,5 μM und 25 μM) behandelt. Dargestellt ist der Einfluss auf die Zellzahl, Apoptose und Nekrose in einem Zeitraum von 6-96 h nach Gabe des Ly294002. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO behandelt. Die Zellzahl wurde mikroskopisch und die Apoptose- und Nekroseraten durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Hemmung der PI3K wurde mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 dargestellt. Die phosphorylierten Akt-Formen (pAkt Thr308 und pAkt Ser473) waren nach einer Inkubationszeit von 0,5 h mit 25 μM Ly294002 nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig wurde eine verminderte Proteinmenge von pFoxO3A (Thr32) detektiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h wurde eine Zunahme von pAkt (Thr308 und Ser473) und pFoxO3A (Thr32) in den behandelten Zellen beobachtet. Als Ladungskontrolle wurde das Haushaltsgen α -Tubulin verwendet. Zusätzlich wurde die Proteinexpression der Gesamtformen von Akt und FoxO3A untersucht.

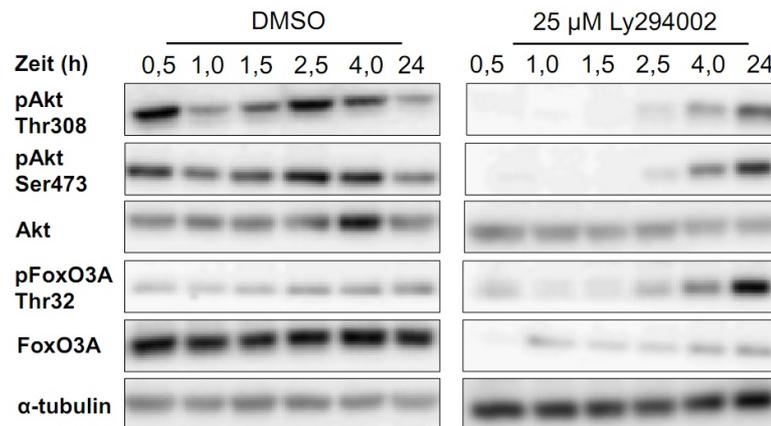


Abbildung 14: Einfluss des Ly294002 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot 0,5-24 h nach der Behandlung mit 25 μ M Ly294002 in der Zelllinie SEM. Untersucht wurde die Proteinexpression von pAkt (Thr308, Ser473), Gesamt-Akt, pFoxO3A (Thr32) und Gesamt-FoxO3A. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin mitgeführt.

3.3 Untersuchungen zur Wirksamkeit des RAD001 in ALL-Zellen

Der Wirkmechanismus des mTOR-Inhibitors RAD001 wurde an den B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 sowie an den T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 untersucht. Die Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM RAD001 behandelt und in einem Zeitintervall bis 72 h untersucht.

3.3.1 Einfluss des RAD001 auf die Vitalität

In allen Zelllinien konnte nach einer Inkubationszeit von 72 h mit RAD001 eine Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Die unbehandelten Zellen proliferierten innerhalb des untersuchten Zeitraums. Im Gegensatz dazu wurde ein vermindertes Zellwachstum in den mit RAD001-behandelten Zellen beobachtet. Die Ergebnisse der B- und T-ALL-Zelllinien sind in der Abbildung 15 zusammengefasst.

In der Zelllinie SEM wurde das Wachstum der Zellen mit 10 nM und 100 nM RAD001 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Am stärksten wurde die Proliferation mit 100 nM RAD001 gehemmt. Eine Inkubation mit 100 nM verminderte nach 72 h die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle im Durchschnitt um 65 % und reduzierte die metabolische Aktivität im Durchschnitt um 29 %. Das Wachstum der Zellen und die metabolische Aktivität wurde mit 1 nM RAD001 nicht signifikant beeinflusst. Bei den RS4;11-Zellen reduzierte sich die Zellzahl in den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zwischen 22 % - 30 %. Eine Behandlung mit 10 nM und 100 nM RAD001 verminderte die metabolische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich um

49 %. Die beobachteten Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten RS4;11-Zellen waren nicht signifikant.

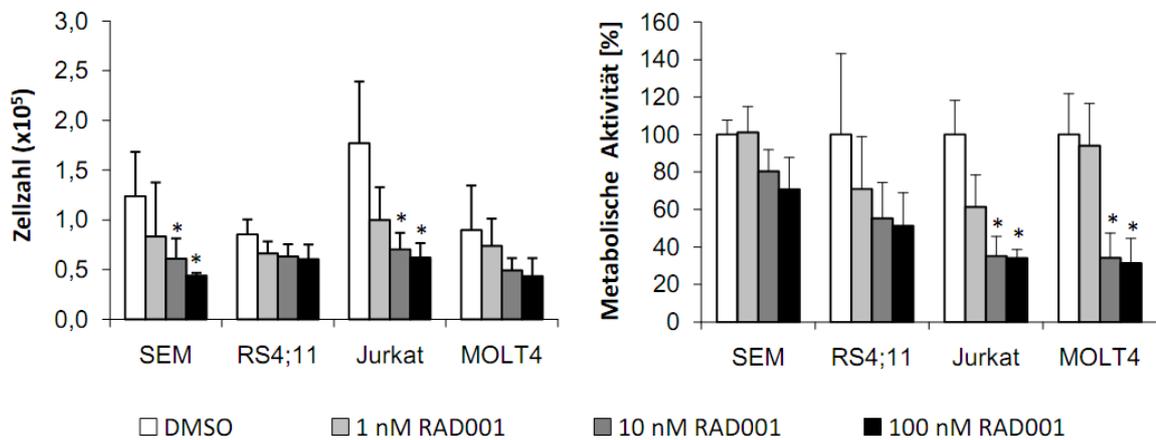


Abbildung 15: Proliferation und metabolische Aktivität nach RAD001-Behandlung

Die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit den angegebenen RAD001-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzahl und der metabolischen Aktivität mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Bei den T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 wurde die metabolische Aktivität mit 10 nM und 100 nM RAD001 signifikant gesenkt, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen nachweisbar war. Bei den Jurkat-Zellen wurde ebenfalls eine Reduktion der Zellproliferation und der metabolischen Aktivität mit 1 nM RAD001 beobachtet. Im Gegensatz zu den MOLT4-Zellen, verringerte sich bei Jurkat mit 1 nM RAD001 die Zellzahl im Durchschnitt um bis zu 44 % und die metabolische Aktivität im Durchschnitt um bis zu 39 %.

3.3.2 Einfluss des RAD001 auf den Zellzyklus

Zusätzlich wurde der Einfluss von RAD001 auf den Zellzyklus an den T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 untersucht. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie durch die Bestimmung des DNA-Gehalts mit Propidiumiodid. In der Abbildung 16 ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase dargestellt. Eine Inkubation mit 10 nM und 100 nM RAD001 führte bei beiden Zelllinien zu einem signifikanten G0/G1-Zellzyklusarrest. In den behandelten Zellen war eine höhere Zellfraktion mit einem einfachen DNA-Gehalt nachweisbar als in der Kontrolle. Bei den behandelten Jurkat-Zellen befanden sich nach 72 h Inkubation mit RAD001 bis zu 72 % der Zellen (1 nM: 60 %, 10 nM: 69 % und 100 nM: 72 %) in der G0/G1-Phase. Dagegen wurden in der Kontrolle nur 57 % der Zellen in der G0/G1-Phase detektiert.

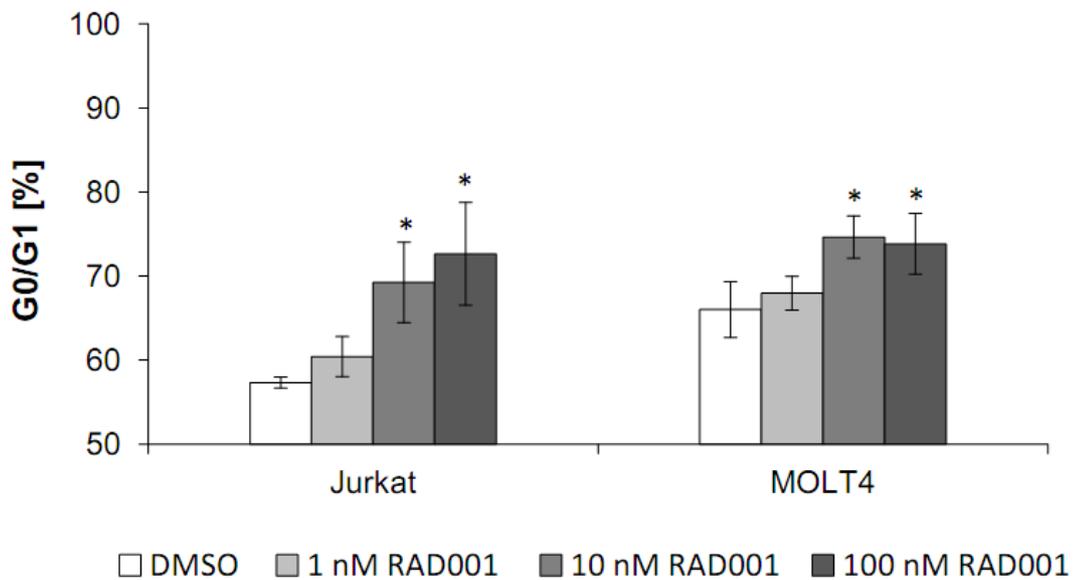


Abbildung 16: Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit RAD001

Die ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit den angegebenen RAD001-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellen in der G0/G1-Phase mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Expression der zellzyklusspezifischen Proteine Cyclin D3, CDK4, p15^{INK4B} und p27^{Kip1} 4 h und 24 h nach der RAD001-Behandlung in SEM und Jurkat-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Western Blot-Experimente sind in der Abbildung 17 dargestellt. Die Zellzyklusregulatoren Cyclin D3 und CDK4 werden beim Übergang zur S-Phase hochreguliert und liegen in reduzierter Form bei einem G0/G1-Zellzyklusarrest vor. Die Expression und Aktivität der beiden Proteine wird durch das CDK4-Inhibitorprotein p15^{INK4B} beeinflusst. Gleichzeitig wurde das Proteinlevel des CDK2-Inhibitorproteins p27^{Kip1} untersucht.

In SEM-Zellen wurde eine Zunahme der CDK-Inhibitorproteine p15^{INK4B} und p27^{Kip1} 24 h nach der Behandlung mit RAD001 detektiert. Parallel wurde dazu eine Abnahme der CDK4-Proteinmenge beobachtet.

In den Lysaten der Jurkat-Zellen waren ebenfalls die Proteinlevel von p27^{Kip1} und p15^{INK4B} nach der Behandlung mit RAD001 erhöht. Ebenso wurde eine Reduktion des CDK4-Proteins in den behandelten Zellen beobachtet.

Die Expression von Cyclin D3 wurde in den SEM- und Jurkat-Zellen durch die Behandlung mit RAD001 nicht beeinflusst.

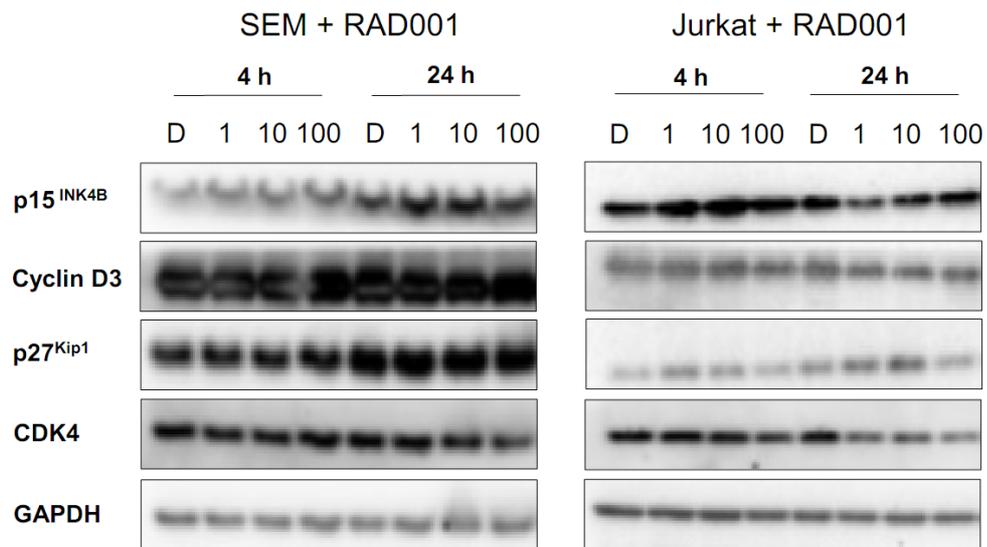


Abbildung 17: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach RAD001-Behandlung.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Inkubation mit RAD001 der Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von Cyclin D3, CDK4, p27^{Kip1} und p15^{INK4B}. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

3.3.3 Einfluss des RAD001 auf Apoptose und Nekrose

Zusätzlich wurde die Wirksamkeit des mTOR-Inhibitors auf die Induktion von Apoptose und Nekrose untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach der Inkubation mit RAD001 zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie analysiert. In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse nach 72-stündiger Inkubation mit RAD001 dargestellt. Bei den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat wurden keine Unterschiede in den Apoptose- und Nekroseraten zwischen behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet. Dagegen hatte sich die Viabilität der MOLT4-Zellen, die mit 10 nM und 100 nM RAD001 inkubiert wurden, reduziert. Hier lag der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen nach 72 h in der Kontrolle im Durchschnitt bei 14,9 % (Apoptoserate: 7,1 % und Nekroserate: 7,8 %) und bei den mit 100 nM behandelten Zellen im Durchschnitt bei 33,7 % (Apoptoserate: 14,3 % und Nekroserate: 19,4 %). Der Anstieg der Nekroserate bei 100 nM RAD001 war im Vergleich zu den unbehandelten MOLT4-Zellen signifikant.

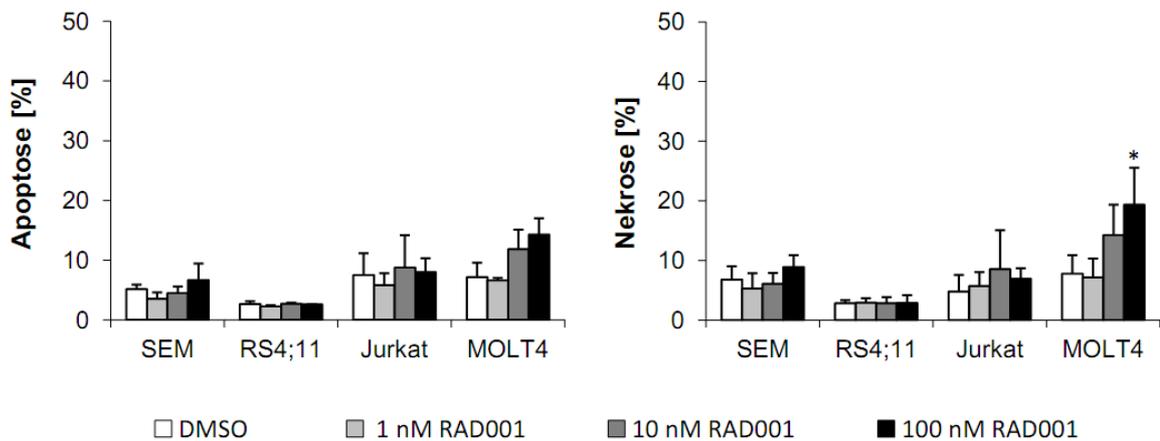


Abbildung 18: Viabilität der B- und T-ALL-Zelllinien nach RAD001-Behandlung

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit den angegebenen RAD001-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte apoptotischer Zellen sowie nekrotischer Zellen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

3.3.4 Einfluss des RAD001 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges

Die Inhibition von mTOR wurde mittels Western Blot untersucht. Hierzu wurden Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsformen in den Zellen SEM und Jurkat nach 4- und 24-stündiger Inkubation mit RAD001 analysiert. In den Abbildungen 19 und 20 ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus drei unabhängigen Versuchen der beiden Zelllinien dargestellt.

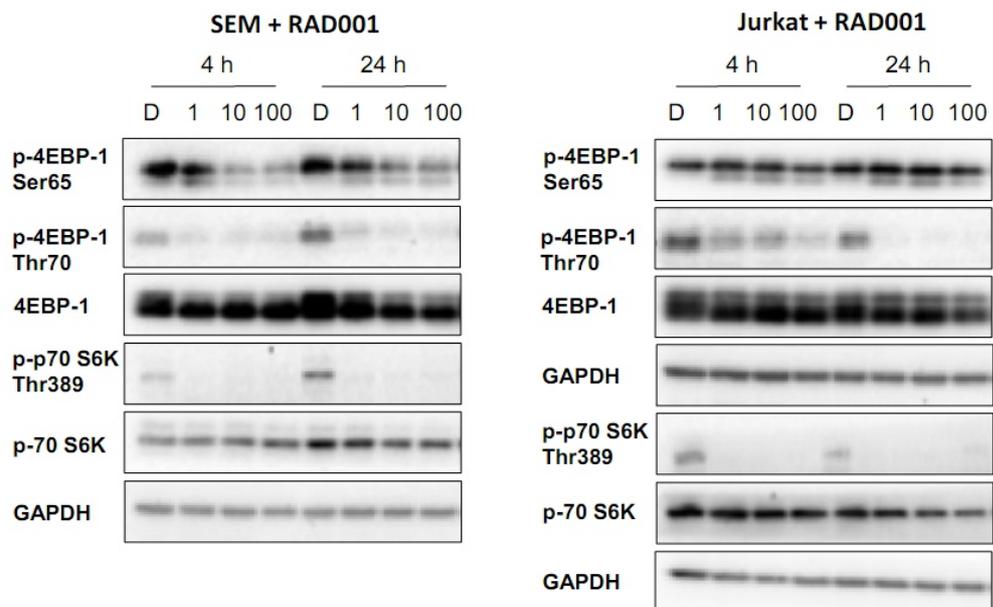


Abbildung 19: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach RAD001-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Behandlung mit RAD001 in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von p-4EBP-1 (Ser65, Thr70), Gesamt-4EBP-1 sowie p-p70 S6K (Thr389) und Gesamt-p70S6K. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Eine Hemmung von mTOR wurde in beiden Zelllinien durch die Abnahme der Phosphorylierung der Proteine p-4EPB-1 (Ser65,Thr70) und p-p70-S6K (Thr389) nachgewiesen. Mit steigender Konzentration von RAD001 wurde in den SEM und Jurkat-Zellen die Expression von p-4EPB-1 an beiden Phosphorylierungsstellen deutlich reduziert. Die Phosphorylierung der p70-S6K war in beiden Zelllinien nach der Behandlung mit RAD001 nicht mehr nachweisbar.

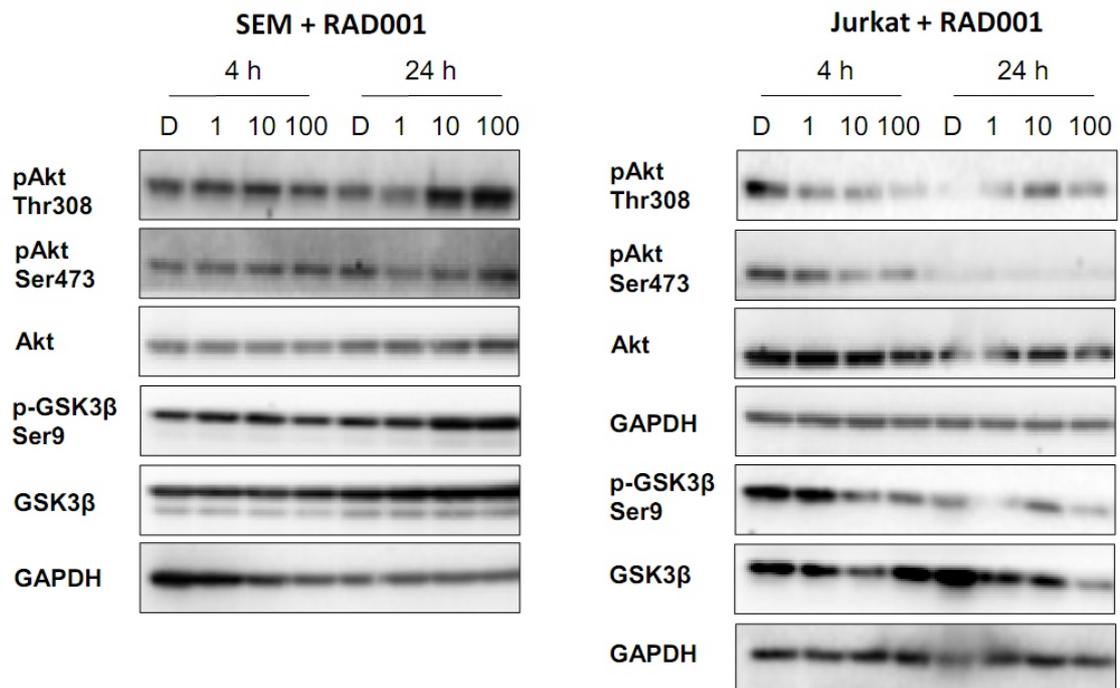


Abbildung 20: Untersuchungen zur PI3K/Akt-Inhibition nach RAD001-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Behandlung mit RAD001 in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von pAkt (Thr308 und Ser473), Gesamt-Akt, pGSK3β (Ser9) und Gesamt-GSK3β. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Zusätzlich wurde die Aktivität von Akt analysiert (Abbildung 20). Hierzu wurde der Phosphorylierungsstatus von Akt und GSK3β untersucht. In den Lysaten der SEM-Zellen wurde eine Zunahme von pAkt (Thr308 und Ser473) nach 24 h mit 10 nM und 100 nM RAD001 nachgewiesen. Die Aktivierung von Akt durch RAD001 führte gleichzeitig zum Anstieg der Phosphorylierung von GSK3β. Im Gegensatz dazu wurde in den Lysaten der Jurkat-Zellen eine Hemmung von Akt durch die Abnahme der Phosphorylierung 4 h nach der Behandlung mit RAD001 nachgewiesen. Gleichzeitig wurde in den behandelten Zellen eine Reduktion der phosphorylierten Form von GSK3β (Ser9) beobachtet.

3.4 Untersuchungen zur Wirksamkeit des BEZ235 in ALL-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass eine Inhibition von PI3K oder mTOR die Proliferation der ALL-Zellen beeinflusst. Im Folgenden wurde untersucht, ob eine duale Inhibition der Kinasen zu verstärkten antiproliferativen Effekten führt. Für die Analysen wurde der duale Inhibitor BEZ235 in einem Konzentrationsbereich von 1 nM - 100 nM über einen Zeitraum von 72 h untersucht.

3.4.1 Einfluss des BEZ235 auf die Vitalität

Das Zellwachstum und die metabolische Aktivität wurden 72 h nach der Behandlung mit 10 nM und 100 nM BEZ235 in den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat signifikant reduziert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 dargestellt. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mit 10 nM BEZ235 im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um bis zu 39 % in SEM, 45 % in RS4;11 und 51 % in Jurkat gesenkt. Die MOLT4-Zellen waren gegenüber 10 nM BEZ235 weniger sensitiv. Hier lag der Anteil der metabolisch aktiven Zellen im Mittel bei 79 %. Eine Erhöhung der BEZ235-Konzentration auf 100 nM führte zur Reduktion der metabolischen Aktivität um 77 %.

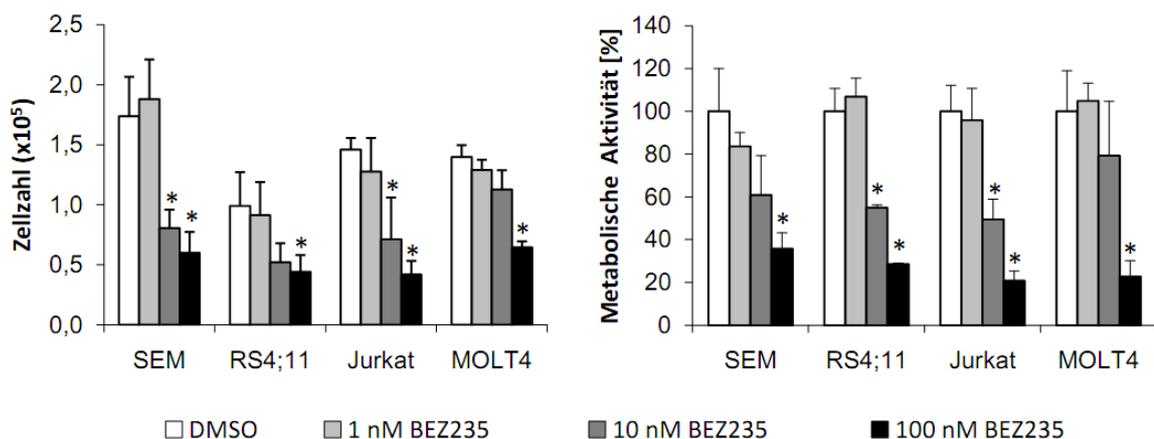


Abbildung 21: Proliferation und metabolische Aktivität nach BEZ235-Behandlung

Die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit den angegebenen BEZ235-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

3.4.2 Einfluss des BEZ235 auf den Zellzyklus

Neben dem WST-1-Test und der Ermittlung der Zellzahl wurde nach der Behandlung mit BEZ235 eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 22 zusammengefasst. Signifikante Veränderungen im Zellzyklusverlauf wurden nach der BEZ235-Behandlung in den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat nachgewiesen. Mit steigender BEZ235-Konzentration nahm der Anteil der Zellen in der S- und M-Phase ab, so dass sich gleichzeitig der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase erhöhte. In den SEM-Zellen wurde der stärkste G0/G1-Zellzyklusarrest mit 100 nM

BEZ235 erreicht. Im Durchschnitt verblieben nach der BEZ235-Behandlung 90 % (vs. 63 % DMSO) der SEM-Zellen, 84 % (vs. 65 % DMSO) der RS4;11-Zellen und 78 % (vs. 57 % DMSO) der Jurkat-Zellen in der G0/G1-Phase.

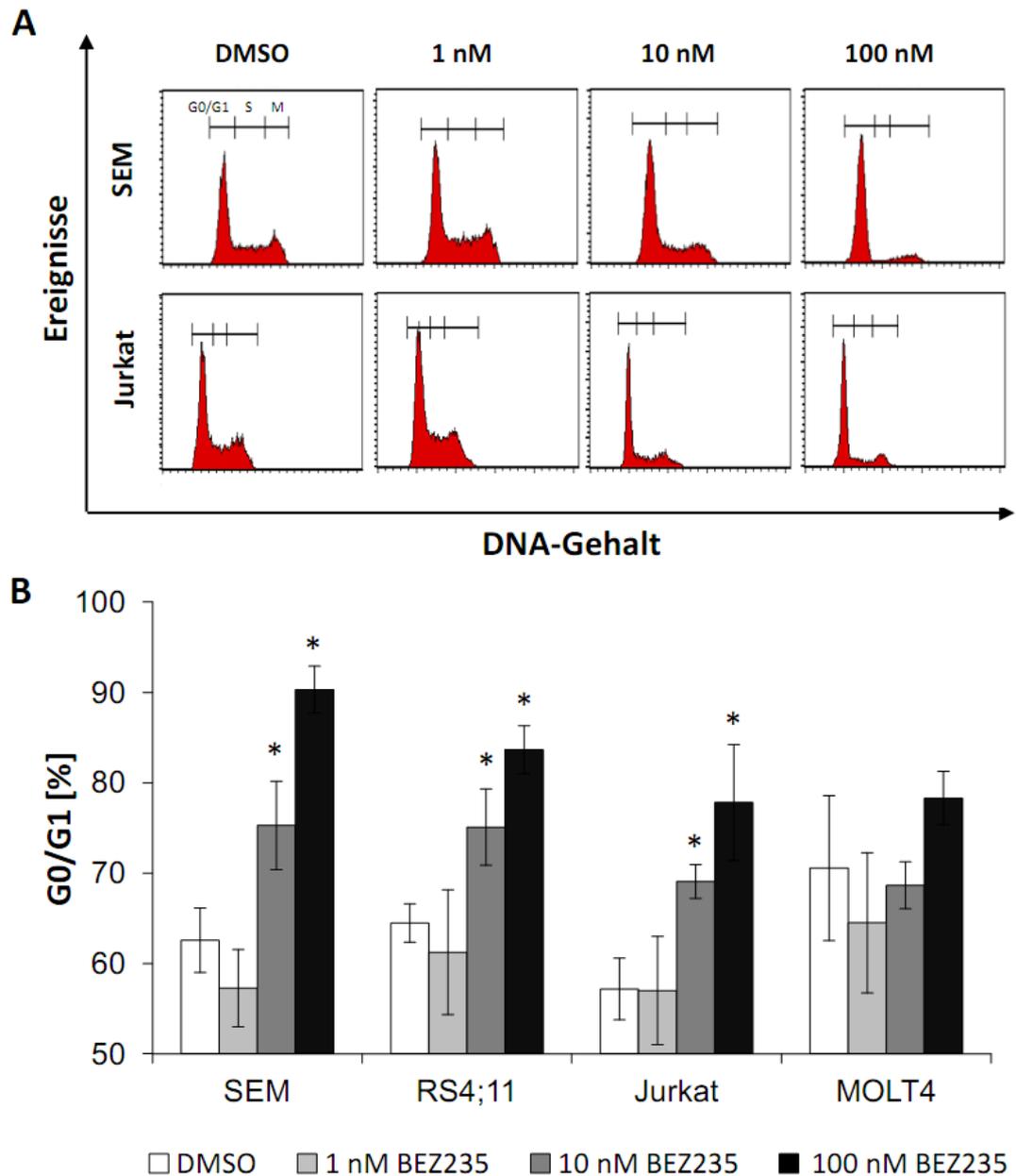


Abbildung 22: Zellyklusanalyse nach Inkubation mit BEZ235

(A) Dargestellt ist die PI-Fluoreszenzintensität nach 72-stündiger Inkubationszeit mit BEZ235 in SEM und Jurkat-Zellen. Die Verteilung der Zellklusphasen wurde über die Histogrammstatistik ermittelt.

(B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase aus drei unabhängigen Versuchen 72 h nach der Behandlung mit BEZ235. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Mittels Western Blot wurde der G0/G1-Zellzyklusarrest durch die Analyse der Expression von verschiedenen Zellzyklusregulatorproteinen bestätigt. Die Proteinlevel von CDK4 und Cyclin D3 waren in SEM-Zellen die mit 10 nM und 100 nM, sowie in Jurkat-Zellen, die mit 100 nM BEZ235 inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Proteinexpression des CDK2-Inhibitors p27^{KIP1} in Jurkat-Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in beiden Zelllinien eine Abnahme des CDK4-Inhibitorproteins p15^{INK4B} nachgewiesen.

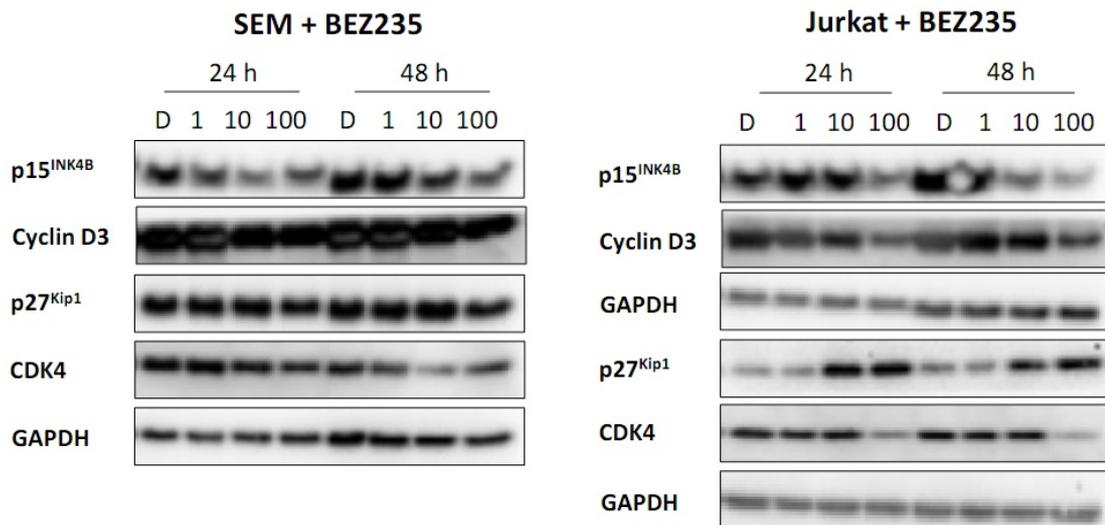


Abbildung 23: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach BEZ235-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Behandlung mit BEZ235 in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von Cyclin D3, CDK4, p27^{KIP1} und p15^{INK4B}. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

3.4.3 Einfluss des BEZ235 auf Apoptose und Nekrose

Neben den Untersuchungen zur Proliferation wurde der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen nach der Behandlung mit BEZ235 bestimmt. In der Abbildung 24 sind die Apoptose- und Nekroseraten aus drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst. In den B-Vorläuferleukämiezelllinien SEM und RS4;11 wurden keine Veränderungen zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen in den Apoptose- und Nekroseraten ermittelt. Dagegen lagen in den mit BEZ235 behandelten T-ALL-Zellen Jurkat und MOLT4 leicht erhöhte Apoptose- bzw. Nekrosewerte vor. Eine Behandlung mit 100 nM BEZ235 führte zum Anstieg der Apoptose- und Nekroseraten auf durchschnittlich 24 %. Dagegen waren in der Kontrolle insgesamt 13 % der Zellen apoptotisch und nekrotisch. In MOLT4-Zellen lag bei 100 nM BEZ235 der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen im Mittel bei 28 %, während in den unbehandelten Zellen nur etwa 12 % apoptotische und nekrotische Eigenschaften zeigten.

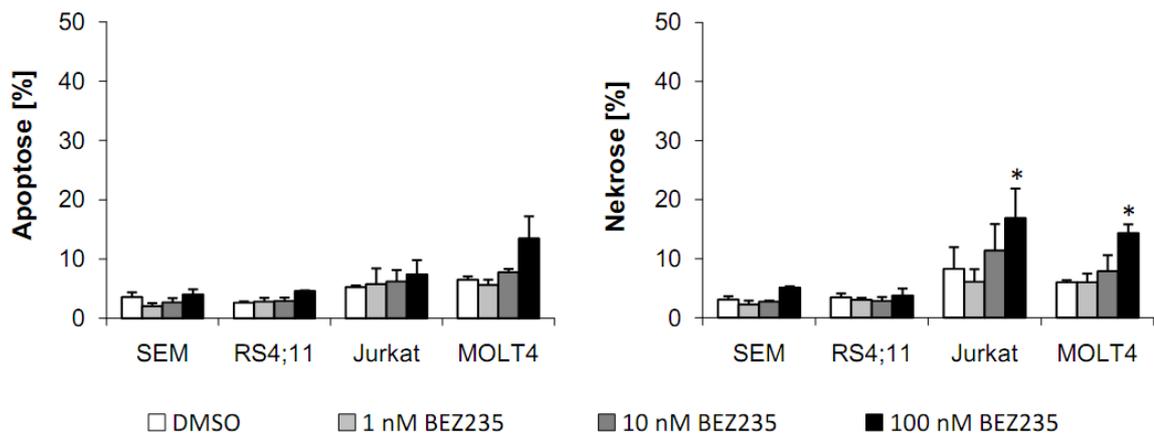


Abbildung 24: Viabilität der B- und T-ALL-Zellen nach BEZ235-Behandlung

Die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit 1 nM, 10 nM bzw. 100 nM BEZ235 inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

3.4.4 Einfluss des BEZ235 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges

Die Inhibition von PI3K und mTOR wurde mittels Western Blot untersucht. Hierzu wurde die Expression der phosphorylierten Formen von Akt, FoxO3A, 4EBP-1, p70-S6K untersucht. In den Abbildungen 25 und 26 ist jeweils ein repräsentativer Western Blot von SEM und Jurkat dargestellt.

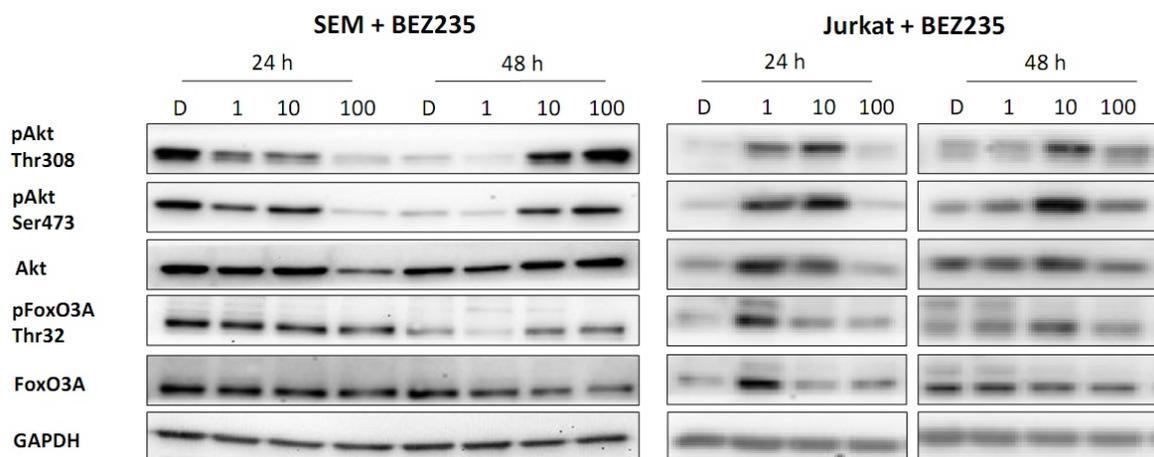


Abbildung 25: Untersuchungen zur Akt-Inhibition mittels BEZ235

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Behandlung mit BEZ235 in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von pAkt (Thr308 und Ser473), Gesamt-Akt sowie pFoxO3A (Thr32) und Gesamt-FoxO3A. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Nach 24 h wurde mit steigender BEZ235-Konzentration eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung (Thr308 und Ser473) in der Zelllinie SEM detektiert. Ebenso wurde eine geringe Abnahme von pFoxO3A (Thr32) nachgewiesen. Die Hemmung von Akt blieb nicht konstant, nach 48 h wurde eine Zunahme der phosphorylierten Formen von Akt in den Zellen, die mit 10 nM und 100 nM BEZ235 behandelt wurden, beobachtet. Gleichzeitig wurden erhöhte Level von pFoxO3A (Thr32) in den Zelllysaten detektiert.

In den Lysaten der Jurkat-Zellen wurde nach einer 24-stündigen Behandlung mit 1 nM und 10 nM eine Zunahme der pAkt und pFoxO3A Expression detektiert. Eine geringe Akt-Aktivität lag in den Kontrollzellen sowie in den mit 100 nM BEZ235-behandelten Zellen vor. Nach 48 h erhöhte sich die Expression von pAkt in den mit 100 nM behandelten Zellen, jedoch war die Aktivität von Akt bei 10 nM am größten.

Im Gegensatz zur PI3K-Inhibition war die Hemmung von mTOR im untersuchten Zeitraum konstant (Abbildung 26). Mit steigender BEZ235-Konzentration wurden sowohl reduzierte Level von p-p70 S6K (Ser65) als auch von p-4EBP-1 (Ser65, Thr70) in SEM und Jurkat-Zellen nachgewiesen.



Abbildung 26: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach BEZ235-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Behandlung mit BEZ235 in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Proteinexpression von p-p70 S6K (Thr389), Gesamt p70 S6K, p-4EBP-1 (Ser65, Thr70) sowie Gesamt-4EBP1. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

3.5 BEZ235 in der Kombination mit konventionellen Zytostatika

Im Folgenden wurde überprüft, ob eine Kombination von BEZ235 mit den Zytostatika AraC, Doxorubicin oder Dexamethason, welche als Standardtherapie bei der ALL verwendet werden, synergistische Effekte auslöst. Hierzu wurden die Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 mit 10 nM BEZ235 behandelt. Die Zytostatika wurden entweder zeitgleich, 24 h vor bzw. 24 h nach der BEZ235-Gabe den Zellen zugesetzt. Die Bewertung der Kombinationsexperimente erfolgte mit Hilfe der Bliss-Analyse (Abschnitt 2.5) unter Berücksichtigung der Zellzahlen 72 h nach der Inkubation. Zusätzlich wurden bei allen Kombinationsexperimenten neben der Zellzahl auch die metabolische Aktivität, sowie die Apoptose- und Nekroseraten bestimmt. Diese Daten sind zur Übersicht im Anhang als ergänzende Abbildungen im Abschnitt 7.1.8 (Abb. 48-49) zusammengefasst.

3.5.1 Kombination des BEZ235 mit AraC

Bei allen Zelllinien wurde durch die Gabe beider Substanzen eine synergistische Wirkung nachgewiesen, da die Proliferationshemmung bei allen untersuchten Kombinationsansätzen über der zu erwartenden Proliferationshemmung (Erwartungswert) lag. Die beobachteten Effekte der verschiedenen Kombinationsansätze mit den Erwartungswerten des Kombinationseffektes sind in der Abbildung 27 dargestellt.

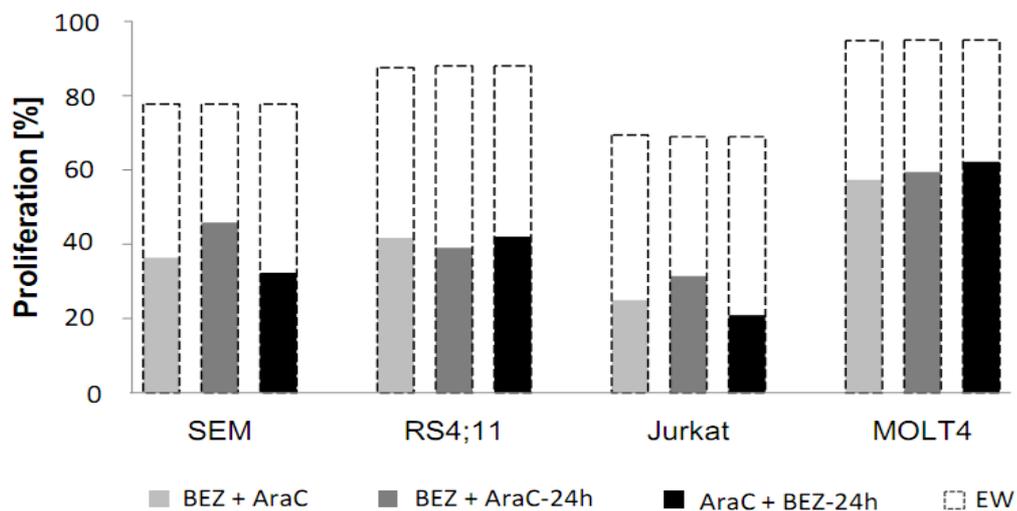


Abbildung 27: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und AraC

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 2,5 μ M AraC (RS4;11), 0,125 μ M AraC (SEM), 0,05 μ M AraC (Jurkat und MOLT4) sowie mit 10 nM BEZ235 allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit AraC (BEZ + AraC-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit AraC (AraC + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen im Vergleich zum Erwartungswert (EW). Die beobachteten Proliferationseffekte der Kombinationen wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

Bei den Zelllinien SEM und Jurkat lag eine stärkere Proliferationshemmung vor, wenn beide Substanzen simultan appliziert wurden oder AraC 24 h vor der Inkubation mit BEZ35 den Zellen zugefügt wurde. In der Kombination zwischen BEZ235 und AraC wurde die Proliferation bei den Jurkat-Zellen am stärksten gehemmt. Die Proliferation der verschiedenen Kombinationsansätze reduzierte sich im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich um bis zu 79 % (BEZ235+AraC: 75 %, BEZ235+AraC 24h: 69 % und AraC+BEZ23524 h: 79 %). Dagegen verminderte sich die Zellzahl durchschnittlich um 47 % bei der Einzelbehandlung mit BEZ235 und durchschnittlich um 65 % bei der Einzelbehandlung mit AraC. Somit wurde durch die Gabe beider Substanzen eine Steigerung der Proliferationshemmung um bis zu 32 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von BEZ235 bzw. eine Erhöhung um 14 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von AraC erreicht. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen und im Vergleich zu den Einzelbehandlungen wurden nicht nachgewiesen.

Bei den Zelllinien RS4;11 und MOLT4 wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen beobachtet.

3.5.2 Kombination des BEZ235 mit Doxorubicin

Eine gesteigerte Proliferationshemmung wurde durch die Kombination von BEZ235 mit Doxorubicin im Vergleich zu den Einzeleffekten beider Substanzen in allen Zellen beobachtet. Hierbei wurde die Zellproliferation um bis zu 60 % vermindert. In der Abbildung 28 sind die beobachteten Effekte der verschiedenen Kombinationsansätze mit den Erwartungswerten des Kombinationseffektes dargestellt.

In allen Zelllinien wurde eine Wirkungsverstärkung durch die Kombination gegenüber der Einzelsubstanzen nachgewiesen. Die experimentell ermittelten Effekte der Kombinationen sind um bis zu 50 % größer als die der berechneten Kombinationseffekte.

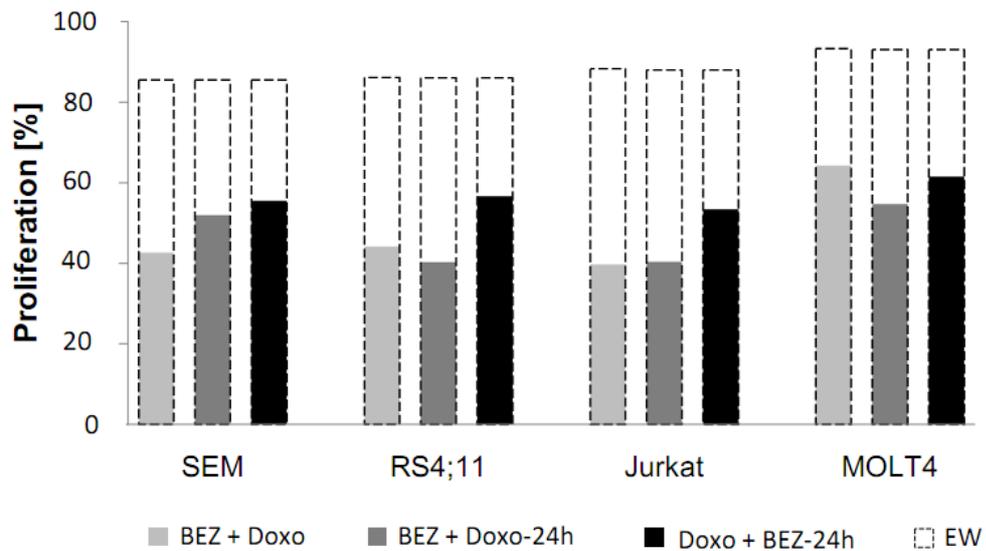


Abbildung 28: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und Doxorubicin

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 25 nM Doxo sowie mit 10 nM BEZ235 allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Doxo (BEZ + Doxo-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Doxo (Doxo + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen in den ALL-Zelllinien im Vergleich zum Erwartungswert (EW). Die beobachteten Proliferationseffekte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

Doxo: Doxorubicin

Insbesondere bei den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat wurde bei der zeitgleichen Inkubation beider Substanzen sowie bei der verzögerten Gabe des Doxorubicins die Zellproliferation am stärksten gehemmt. So nahm die Proliferation bei den Kombinationsansätzen der Jurkat-Zellen durchschnittlich um bis zu 60 % (BEZ235+Doxo: 60 %, BEZ235+Doxo 24h: 60 % und Doxo+BEZ235 24h: 47 %) und bei den Einzelbehandlungen durchschnittlich um bis zu 47 % (BEZ235: 47 % und Doxo: 25 %) ab. Die beobachteten Unterschiede waren bei keiner Zelllinie zwischen den Kombinationsansätzen und den Einzelbehandlungen mit BEZ235 und Doxorubicin signifikant.

3.5.3 Kombination des BEZ235 mit Dexamethason

Der Einfluss von Dexamethason auf die Proliferation war bei den B- und T-ALL-Zelllinien unterschiedlich, so dass verschiedene Konzentrationen für die Kombinationsversuche verwendet wurden. Die SEM-Zellen wurden mit 1 μM und die RS4;11-Zellen wurden mit 0,1 μM Dexamethason inkubiert. Die Dexamethason-resistenten Zelllinien Jurkat und MOLT4 wurden mit 10 μM Dexamethason behandelt. Die Gabe von BEZ235 und Dexamethason führte bei allen Zelllinien zu einer Wirkungsverstärkung im Vergleich zur einzelnen Gabe einer Substanz. In der Abbildung 29 sind die beobachteten Effekte der Kombinationsexperimente mit den Erwartungswerten des Kombinationseffektes dargestellt. Mit Hilfe der Bliss-Analyse konnte gezeigt werden, dass die experimentell ermittelte Proliferationshemmung um bis zu 68 % stärker gegenüber der erwarteten Proliferationshemmung war.

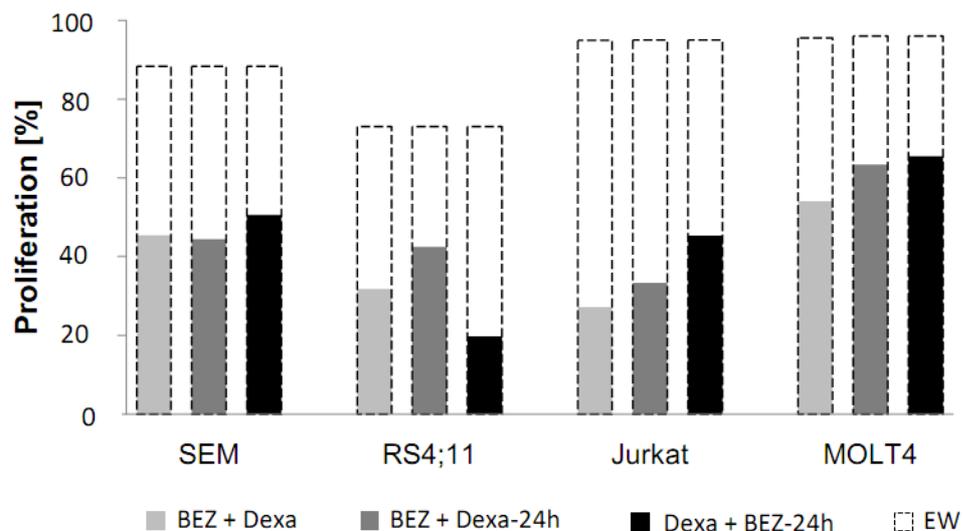


Abbildung 29: Kombinationswirkungsanalyse von BEZ235 und Dexamethason

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 0,1 μM Dexa (RS4;11), 1 μM Dexa (SEM), 10 μM Dexa (Jurkat und MOLT4) sowie mit 10 nM BEZ235 allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Dexa (BEZ + Dexa-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Dexa (Dexa + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen in den ALL-Zelllinien im Vergleich zum Erwartungswert (EW). Die beobachteten Proliferationseffekte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

Dexa: Dexamethason

Die stärkste Proliferationshemmung wurde in den Jurkat-Zellen beobachtet, wenn beide Substanzen simultan appliziert wurden. Hierbei war die simultane Gabe beider Substanzen mit einer signifikant stärkeren Proliferationshemmung verbunden, im Vergleich zu einer 24-stündigen

Vorinkubation mit Dexamethason. Die gleiche Tendenz wurde auch in den Zellen SEM und MOLT4 beobachtet, jedoch waren hier die beobachteten Effekte nicht signifikant. Bei RS4;11 scheint die Vorbehandlung mit Dexamethason die Proliferation der Zellen stärker zu hemmen, als eine Vorinkubation mit BEZ235 bzw. eine zeitgleiche Inkubation mit BEZ235.

3.6 Untersuchungen zur Wirksamkeit des Sorafenib in ALL-Zelllinien

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich das Wachstumsverhalten der ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 sowie die Expression von Signalmolekülen durch die Behandlung mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib beeinflussen lässt. Hierzu wurden die Zellzahl, die metabolische Aktivität sowie die Apoptose- und Nekroseraten in den Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde ein Genexpressionsprofil erstellt. Für die Analysen wurde Sorafenib in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,73 μM und 7,3 μM über einen Zeitraum von 72 h untersucht.

3.6.1 Einfluss des Sorafenibs auf die Vitalität

Die Behandlung mit Sorafenib führte nach 72 h mit steigender Konzentration zur Reduktion der Zellproliferation und zur Verminderung der metabolischen Aktivität in den untersuchten ALL-Zelllinien. Das Wachstum der Zellen wurde mit 3,65 μM und 7,3 μM Sorafenib in allen Zelllinien signifikant reduziert. Die Zelllinie SEM reagierte auf Sorafenib am empfindlichsten. Dabei reduzierte sich die Zellzahl mit 0,73 μM Sorafenib im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um 62 %. Die metabolische Aktivität wurde in allen Zellen mit 3,65 μM Sorafenib um bis zu 50 % reduziert. In der Abbildung 30 sind die Ergebnisse als Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Versuchen nach der Behandlung mit Sorafenib dargestellt.

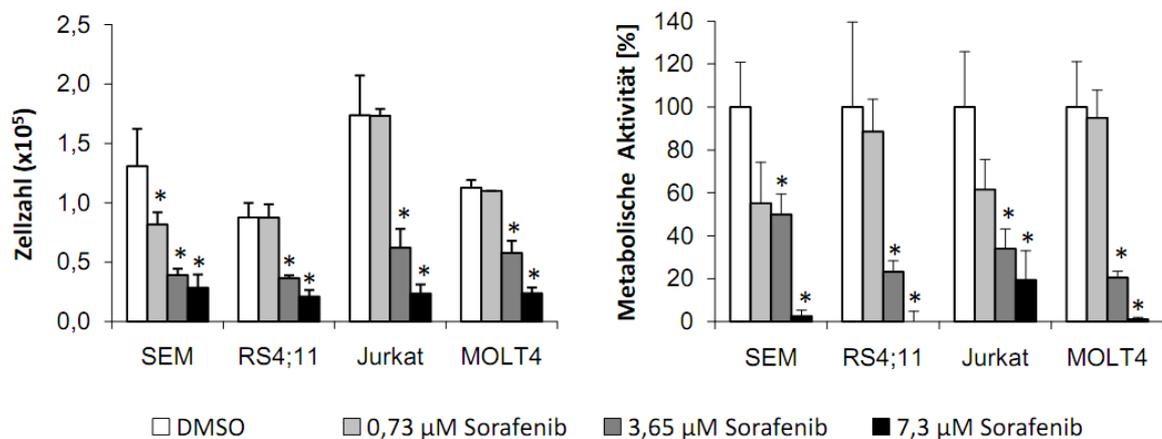


Abbildung 30: Proliferation und metabolische Aktivität nach Sorafenib-Behandlung

Die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit den angegebenen Sorafenib-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

3.6.2 Einfluss des Sorafenibs auf den Zellzyklus

Die Reduktion der Zellproliferation ist auf einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase zurückzuführen und wurde durch Bestimmung des DNA-Gehalts mittels PI an den Zellen SEM und Jurkat nachgewiesen (Abbildung 31).

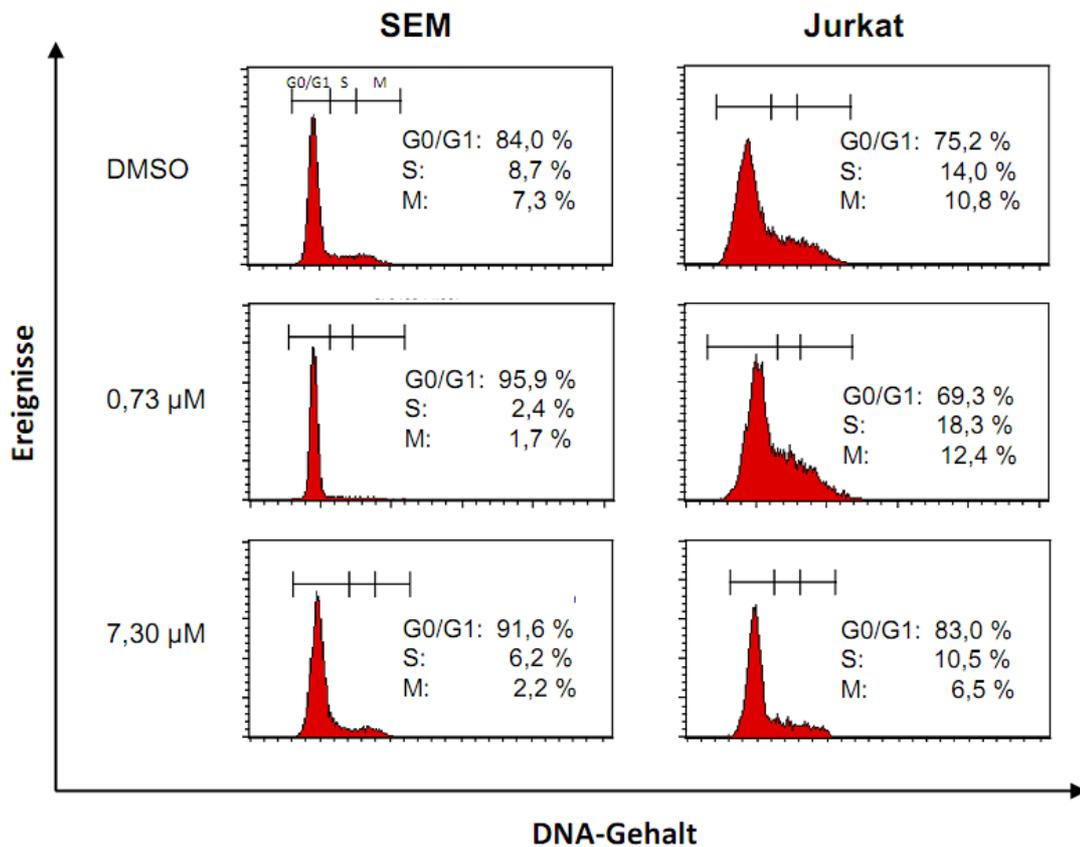


Abbildung 31: Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit Sorafenib

(A) Dargestellt ist die PI-Fluoreszenzintensität nach 72-stündiger Inkubationszeit mit Sorafenib in SEM und Jurkat-Zellen. Die Verteilung der Zellzyklusphasen wurde über die Histogrammstatistik ermittelt.

Bei beiden Zelllinien wurde mit steigender Sorafenib-Konzentration eine Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase beobachtet, während sich gleichzeitig der Anteil der Zellen in der M- und S-Phase reduzierte. In den SEM-Zellen wurde der stärkste G0/G1-Zellzyklusarrest nach 72-stündiger Behandlung mit 0,73 µM Sorafenib erreicht. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich 95 % der Zellen in der G0/G1-Phase. Dagegen wurden in der Kontrolle 84 % der Zellen in der G0/G1-Phase detektiert.

Mittels Western Blot wurde der G0/G1-Zellzyklusarrest anhand der veränderten Expression verschiedener Zellzyklusregulatorproteinen 24 h nach der Behandlung mit Sorafenib bestätigt. Die Ergebnisse der Western Blot-Experimente sind in der Abbildung 32 dargestellt.

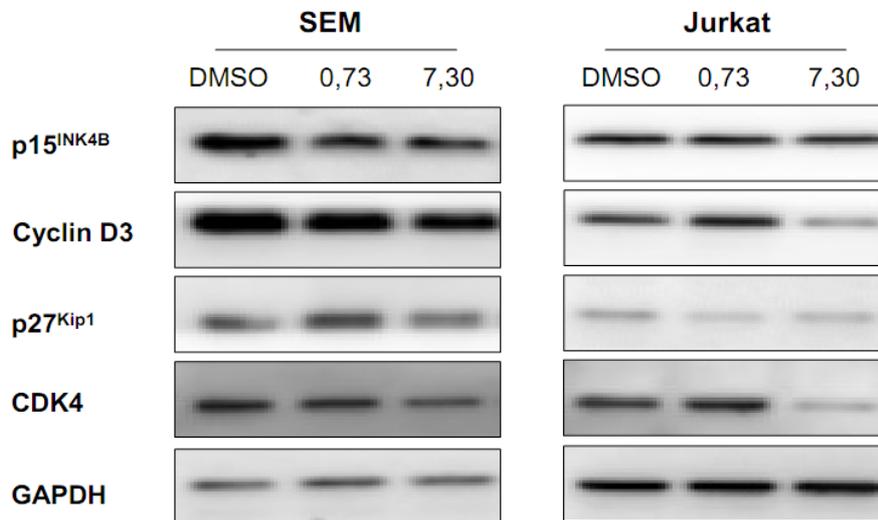


Abbildung 32: Expression zellzyklusspezifischer Proteine nach Sorafenib-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot 24 h nach der Behandlung mit Sorafenib in den Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Expression von Cyclin D3, CDK4, p27^{Kip1} und p15^{INK4B}. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Hierbei zeigte sich, dass eine Behandlung mit 0,73 μM und 7,3 μM bei SEM sowie mit 7,3 μM Sorafenib bei Jurkat zur Reduktion der Proteinlevel von CDK4 und Cyclin D3 führte. Zusätzlich wurde bei den SEM-Zellen eine verminderte Proteinmenge des CDK-Inhibitorproteins p15^{INK4B} beobachtet. Bei der Zelllinie Jurkat wurde durch die Behandlung mit Sorafenib eine Abnahme des CDK2-Inhibitorproteins p27^{KIP1} nachgewiesen.

3.6.3 Einfluss des Sorafenibs auf Apoptose und Nekrose

Mit steigender Sorafenibkonzentration wurde eine Zunahme der Apoptose- und Nekroseraten beobachtet. Signifikante Unterschiede wurden im Vergleich zur Kontrolle bei allen Zelllinien nach 72-stündiger Inkubation mit 7,3 μM Sorafenib ermittelt. Die Ergebnisse der Apoptose- und Nekroseraten sind in der Abbildung 33 zusammengefasst. Zu diesem Zeitpunkt waren im Durchschnitt 30,8 % der SEM, 26,8 % der RS4;11, 28,8 % der Jurkat und 11,3 % der MOLT4-Zellen apoptotisch, die mit 7,3 μM Sorafenib behandelt wurden. Spätapoptotische und nekrotische Eigenschaften zeigten durchschnittlich 56,6 % der SEM, 64,1 % der RS4;11, 60,5 % der Jurkat und 75,6 % der MOLT4-Zellen.

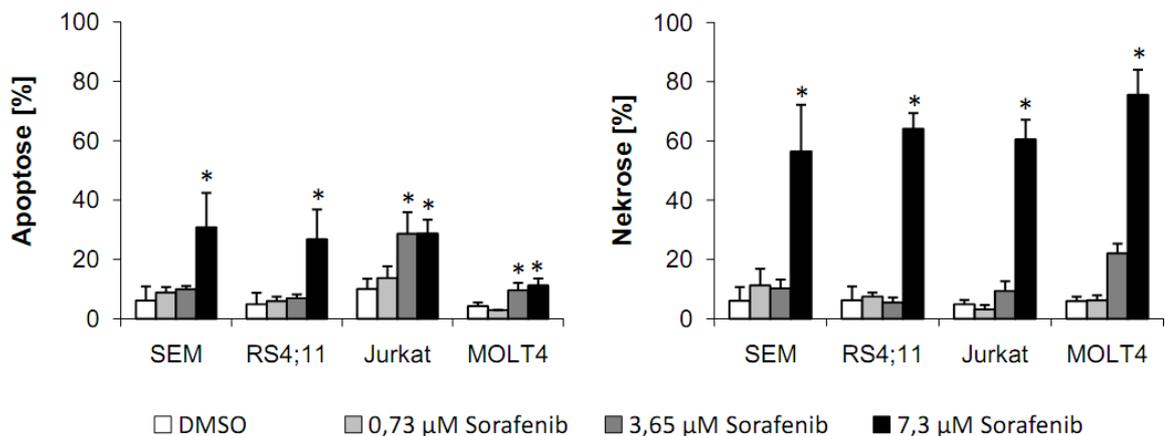


Abbildung 33: Viabilität der B- und T-ALL-Zelllinien nach Sorafenib-Behandlung

Die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 wurden für 72 h mit den angegebenen Sorafenib-Konzentrationen behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Der Apoptosemechanismus wurde durch den Nachweis apoptose-spezifischer Proteine mittels Western Blot näher untersucht. Die Ergebnisse der Western Blots sind in der Abbildung 34 zusammengefasst. Eine Behandlung mit 7,3 µM Sorafenib führte zur lysosomalen Spaltung der Effektorcaspasen 3 und 7, welche mit einer verminderten Expression der Caspasen 3 und 7 sowie mit einer erhöhten Expression ihrer Spaltprodukte verbunden war. Insbesondere wurde in der Zelllinie Jurkat eine gesteigerte Expression des Spaltproduktes der Caspase 3 detektiert. Zusätzlich wurde der proteolytische Abbau der Poly-(ADP)-Polymerase (PARP) beobachtet.

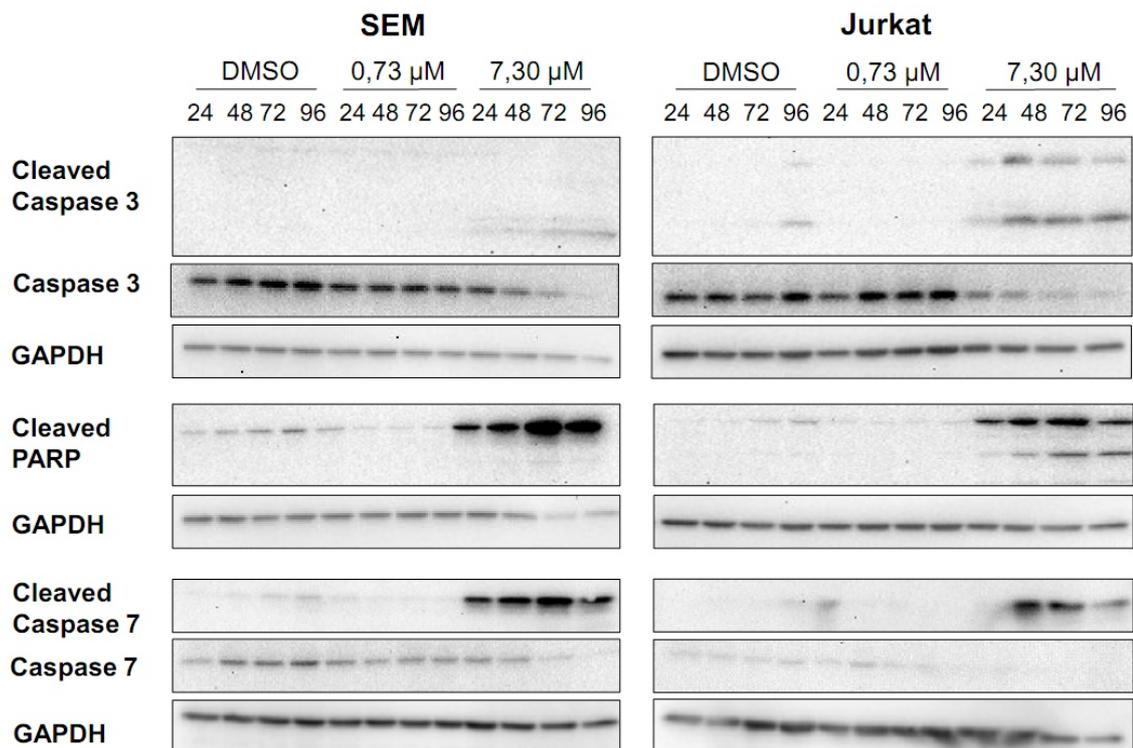


Abbildung 34: Apoptosenachweis mittels Western Blot

Dargestellt ist ein Western Blot der Zelllinien SEM und Jurkat nach der Behandlung mit Sorafenib. Untersucht wurde die Expression von den Spaltprodukten der apoptosespezifischen Proteine Caspase 3, 7 und PARP. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

3.6.4 Einfluss des Sorafenibs auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges

Signalwege in der Zelle sind häufig miteinander vernetzt, sodass Kinaseinhibitoren die Aktivität von verschiedenen Proteinen beeinflussen können. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf die Expression von Schlüsselmolekülen des PI3K/Akt-Signalweges untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 35 dargestellt.

Bereits nach einer 30-minütigen Sorafenib-Inkubation reduzierten sich die beiden Phosphorylierungsformen von Akt in SEM, RS4;11 und Jurkat-Zellen. Während in dem untersuchten Zeitraum von 4 h bei den SEM und RS4;11-Zellen pAkt (Thr308, Ser473) nicht mehr nachweisbar waren, führte die Sorafenib-Behandlung in den Jurkat-Zellen zu einer geringeren Hemmung des Akt-Proteins. Gleichzeitig wurde in allen Zellen eine Abnahme der Phosphorylierung an der Aminosäure Thr32 des Transkriptionsfaktors FoxO3A detektiert.

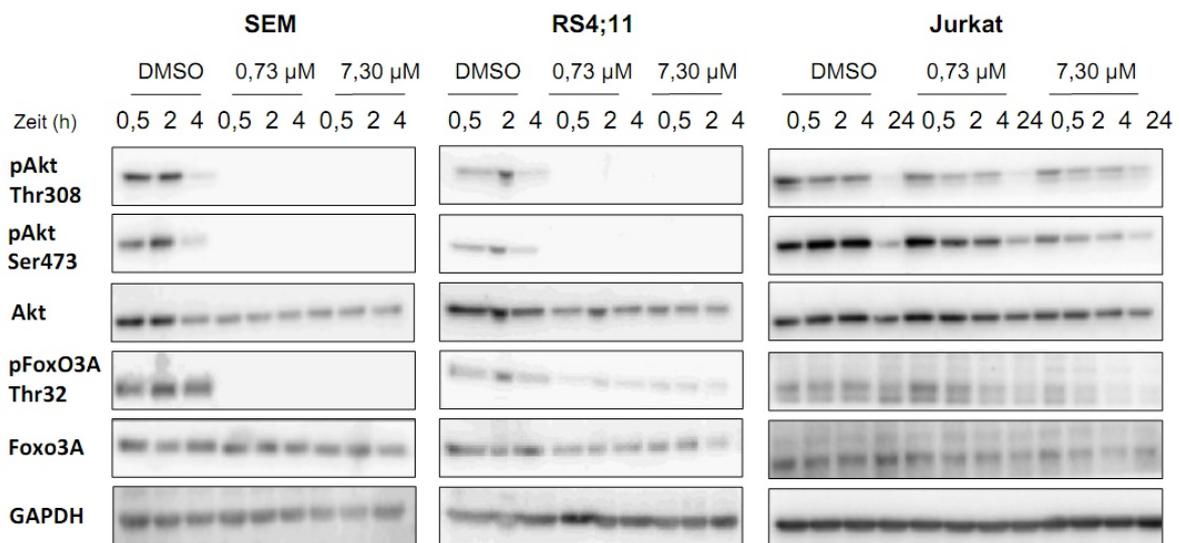


Abbildung 35: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach Sorafenib-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat nach der Behandlung mit Sorafenib. Untersucht wurde die Proteinexpression von pAkt (Thr308, Ser473), Gesamt-Akt, pFoxO3A (Thr32), Gesamt-FoxO3A. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Zusätzlich wurde die Aktivität von mTOR nach der Behandlung mit Sorafenib untersucht. Dazu wurde die Phosphorylierung des nachgeschalteten und von mTOR-regulierten Substrates 4EBP-1 mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 36 dargestellt. Durch die Behandlung mit 0,73 μ M und 7,3 μ M Sorafenib reduzierte sich die Expression von p-4EBP-1 an beiden Phosphorylierungsstellen (Ser65 und Thr70) in SEM-Zellen. In den Jurkat-Zellen wurde die Phosphorylierung nur an der Aminosäure Ser 65 reduziert, keine Veränderung erfolgte in der Expression von p-4EBP-1 an der Aminosäure Thr70.

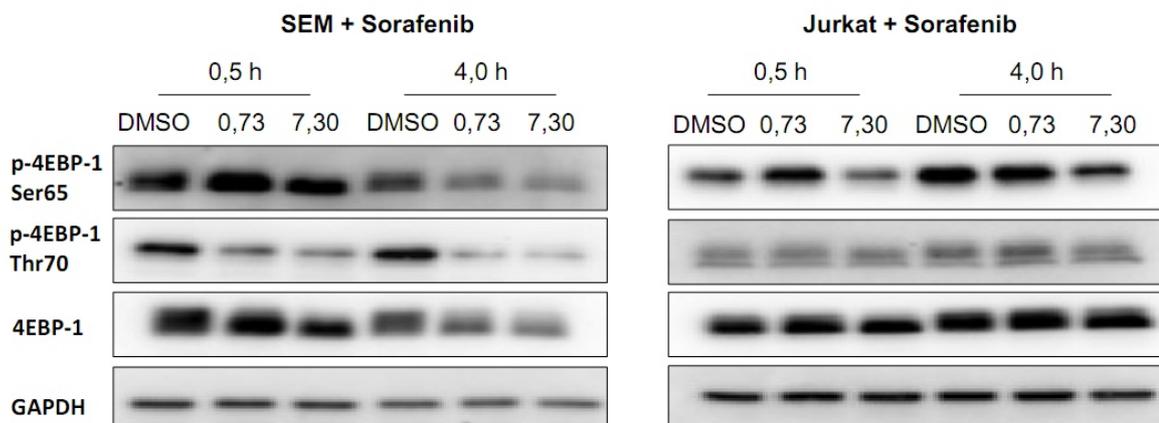


Abbildung 36: Untersuchungen zur mTOR-Inhibition nach Sorafenib-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Zelllinien SEM und Jurkat nach der Behandlung mit Sorafenib. Untersucht wurde die Expression von p-4-EBP-1 (Ser65, Thr70) Gesamt-4EBP-1. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

3.6.5 Einfluss des Sorafenibs auf die Aktivität des Wnt-Signalweges

Im Abschnitt 3.6.4 wurde gezeigt, dass Sorafenib durch Abnahme der Phosphorylierung von Akt, FoxO3A und 4EBP-1 den PI3K/Akt-Signalweg inhibiert. Die Proteinkinase GSK3 β ist ein weiteres Protein, dass durch die Kinase Akt phosphoryliert und dadurch in ihrer Aktivität gehemmt wird. Ferner stellt sie einen Schnittpunkt zum Wnt/ β -Catenin-Signalweg dar. Die Aktivität des Wnt-Signalweges wird maßgeblich durch den Transkriptionsaktivator β -Catenin bestimmt. Eine Phosphorylierung von β -Catenin durch die Proteinkinase GSK3 β führt zur einer Ubiquitinylierung des Proteins und einem darauf folgendem Abbau durch das Proteasom. Erfolgt keine Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β , kann der Transkriptionsaktivator in den Zellkern transportiert werden und zusammen mit den Transkriptionsfaktoren LEF bzw. TCF eine Reihe von Genen aktivieren.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern Sorafenib die Aktivität des Wnt-Signalweges in ALL-Zellen beeinflusst. Hierzu wurde die Aktivität des Schlüsselproteins GSK3 β sowie die Expression von β -Catenin mittels Western Blot untersucht (Abbildung 37).

Eine Behandlung mit Sorafenib führte zur Reduktion der phosphorylierten Form von GSK3 β an der Aminosäure Serin 9 in SEM und Jurkat-Zellen nach einer Sorafenib-Inkubation von 4 h und 24 h. In den Jurkat-Zellen verminderte sich die Expression von pGSK3 β mit 7,3 μ M Sorafenib. Dagegen wurde in den Lysaten der SEM-Zellen eine starke Abnahme von pGSK3 β nach einer Inkubation mit 0,73 μ M und 7,3 μ M Sorafenib nachgewiesen.

Die β -Catenin Expression reduzierte sich in SEM-Zellen nach 24 h bei einer Sorafenibkonzentration von 7,3 μ M nur geringfügig. Eine Veränderung in der β -Catenin-Proteinexpression war in den Jurkat-Zellen nicht nachweisbar.

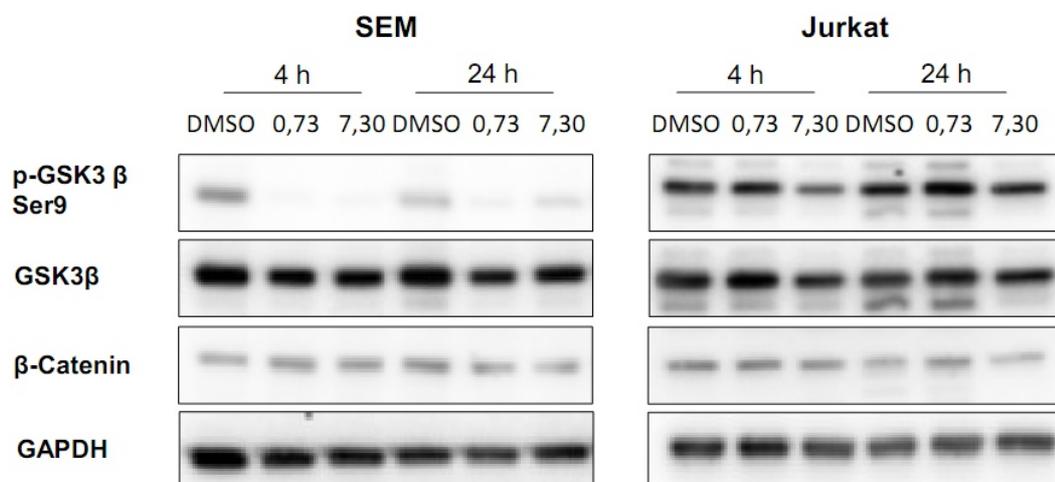


Abbildung 37: Untersuchungen zur Aktivität des Wnt-Signalweges

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Zelllinien SEM und Jurkat nach der Behandlung mit Sorafenib. Untersucht wurde die Aktivität von GSK3 β und die Proteinexpression von β -Catenin. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

Zusätzlich wurde die Lokalisation von β -Catenin in der Zelle mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 38).

Vor der Behandlung war das β -Catenin an der Zellmembran, im Cytoplasma und im Zellkern nachweisbar. Durch die Inkubation mit 7,3 μ M Sorafenib reduzierte sich die β -Catenin Proteinmenge in den SEM-Zellen sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma. Somit wurden die Ergebnisse des Western Blots bestätigt.

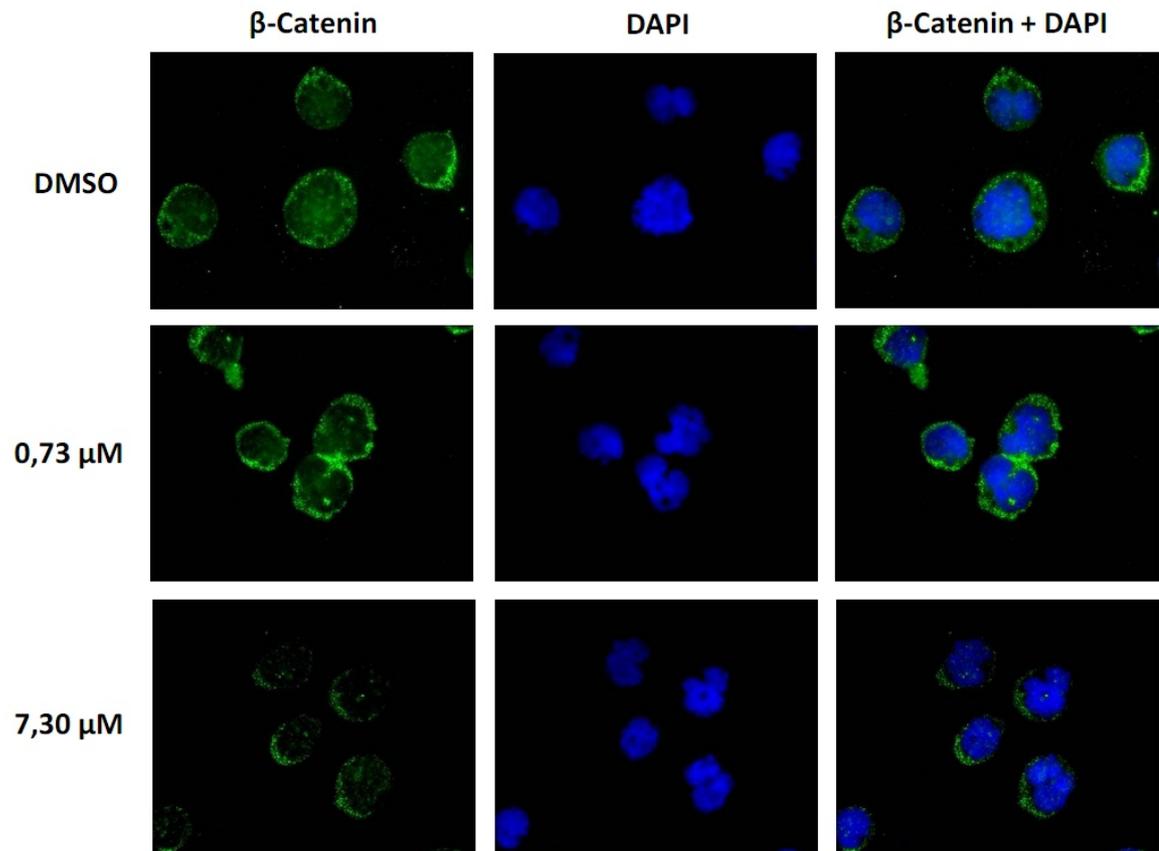


Abbildung 38: Immunhistologischer Nachweis von β -Catenin nach Sorafenib-Behandlung

Dargestellt ist β -Catenin 24 h nach der Behandlung mit Sorafenib (0,73 μ M und 7,3 μ M) in SEM-Zellen. DMSO-behandelte Zellen dienen als Kontrolle. Der Nachweis von β -Catenin erfolgte über die indirekte Immunfluoreszenz mit einem sekundären FITC-markierten Antikörper (grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.7 Sorafenib in der Kombination mit konventionellen Zytostatika

In den folgenden Versuchen wurde Sorafenib mit den Zytostatika AraC, Doxorubicin oder Dexamethason kombiniert und die Wirkungseffekte mit den Einzelbehandlungen der Substanzen verglichen. Hierzu wurden die Zelllinien SEM, RS4;11, Jurkat und MOLT4 mit 3,65 μM Sorafenib behandelt. Die Zytostatika wurden entweder zeitgleich, 24 h vor bzw. 24 h nach der Gabe von Sorafenib den Zellen zugesetzt. Die Bewertung der Kombinationsanalysen erfolgte nach dem Konzept der unabhängigen Wirkung (Bliss-Analyse). Zusätzlich wurden bei allen Kombinationsexperimenten neben der Zellzahl auch die metabolische Aktivität, sowie die Apoptose- und Nekroseraten bestimmt. Diese Daten sind zur Übersicht im Anhang als ergänzende Abbildungen im Abschnitt 7.1.8 (Abb.50-52) zusammengefasst.

3.7.1 Kombination des Sorafenibs mit AraC

In der Abbildung 39 sind die experimentell ermittelten Proliferationseffekte der Kombinationsansätze mit den Erwartungswerten der Kombinationen dargestellt. In allen Zelllinien wurde eine Wirkungsverstärkung durch die Kombination gegenüber den Einzelsubstanzen nachgewiesen, da die beobachtete Proliferationshemmung im Vergleich zu den berechneten Erwartungswerten größer war.

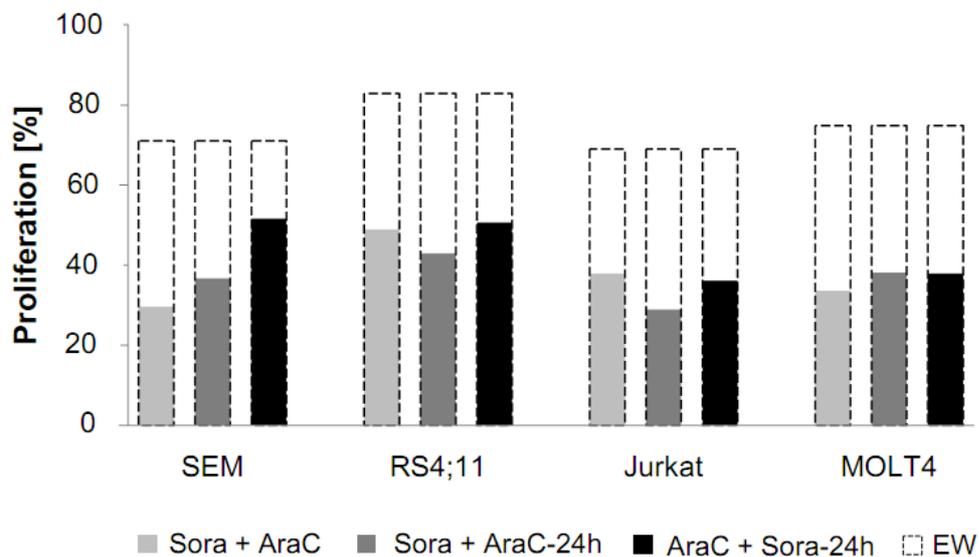


Abbildung 39: Kombinationswirkungsanalyse von Sorafenib und AraC

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 2,5 μM AraC (RS4;11), 0,125 μM AraC (SEM), 0,05 μM AraC (Jurkat und MOLT4) sowie mit 3,65 μM Sora allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sora entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit AraC (Sora + AraC-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit AraC (AraC + Sora-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen in den ALL-Zelllinien im Vergleich zum Erwartungswert. Die beobachteten Proliferationsseffekte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

EW: Erwartungswert; Sora: Sorafenib

Bei den SEM-Zellen führte die zeitgleiche Gabe von Sorafenib und AraC zur stärksten Proliferationshemmung. Die Zellzahl reduzierte sich im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich um 70 %, während sich bei einer verzögerten Gabe von Sorafenib 24 h nach Inkubation mit AraC die Zellzahl durchschnittlich nur um 48 % verringerte. Die Inkubation mit Sorafenib allein ergab eine Verminderung der Zellzahl um durchschnittlich 63 % und die alleinige Gabe von AraC führte zu einer Reduzierung der Zellzahl um durchschnittlich 46 %. Somit wurde durch die simultane Gabe beider Substanzen eine Steigerung der Proliferationshemmung um bis zu 7 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von Sorafenib bzw. eine Erhöhung um 24 Prozentpunkte auf den Einzeleffekt von AraC erreicht.

Eine verzögerte Gabe des AraCs führte bei den Jurkat-Zellen zur stärksten Proliferationshemmung. Hier reduzierte sich die Zellzahl durchschnittlich um 71 %. Die Inkubation mit Sorafenib allein verminderte die Zellzahl durchschnittlich um 58 % und die alleinige Gabe von AraC führte zu einer Reduzierung der Zellzahl um durchschnittlich 53 %. Somit wurde durch die Gabe beider Substanzen eine Steigerung der Proliferationshemmung um bis zu 13 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von Sorafenib bzw. um 18 Prozentpunkte auf den Einzeleffekt von AraC erreicht. Ein Unterschied zwischen der zeitgleichen Inkubation beider Substanzen und der späteren Gabe von Sorafenib wurde nicht beobachtet.

Bei den Zelllinien RS4;11 und MOLT4 waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen sehr gering. So reduzierte sich bei der Zelllinie MOLT4 im Vergleich zur Kontrolle die Zellproliferation durchschnittlich um bis zu 66 % bei der zeitgleichen Gabe, um bis zu jeweils 62 % wenn AraC 24 h nach der Gabe von Sorafenib den Zellen zugefügt wurde bzw. wenn die Zellen 24 h nach der Gabe von AraC mit dem Sorafenib inkubiert wurden.

Signifikante Unterschiede bezüglich des Wachstums zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen wurden bei keiner Zelllinie ermittelt.

3.7.2 *Kombination des Sorafenibs mit Doxorubicin*

In allen untersuchten Zelllinien wurde durch die Kombination eine Wirkungsverstärkung nachgewiesen, da die Proliferationshemmung im Vergleich zu den berechneten Erwartungswerten größer war. In der Abbildung 40 sind die experimentell ermittelten Proliferationswirkungen der Kombinationsansätze mit den Erwartungswerten der Kombinationen dargestellt.

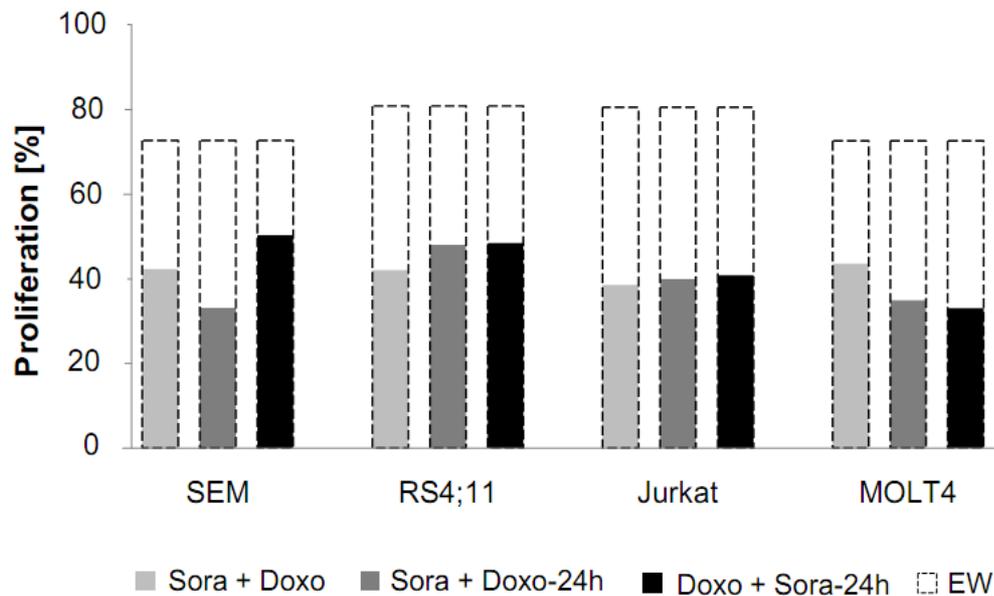


Abbildung 40: Kombinationswirkungsanalyse von Sorafenib und Doxorubicin

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 25 nM Doxo sowie mit 10 nM Sora allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sora entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Doxo (Sora + Doxo-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Doxo (Doxo + Sora-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen in den ALL-Zelllinien im Vergleich zum Erwartungswert. Die beobachteten Proliferationsseffekte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

Doxo: Doxorubicin; EW: Erwartungswert; Sora: Sorafenib

Bei der Kombination zwischen Sorafenib und Doxorubicin wurde die Proliferation in der Zelllinie MOLT4 am stärksten reduziert, wenn Doxorubicin 24 h vor der Inkubation mit dem Sorafenib behandelt wurde. Eine späte Gabe des Sorafenib verminderte die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich um 67 %. Die Inkubation mit Sorafenib allein ergab eine Verminderung der Zellzahl um durchschnittlich 54 % und die alleinige Gabe von Doxorubicin führte zu einer Reduzierung der Zellzahl um durchschnittlich 51 %. Somit wurde durch die Gabe beider Substanzen eine Steigerung der Proliferationshemmung um bis zu 13 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von Sorafenib bzw. um 16 Prozentpunkte auf den Einzeleffekt von Doxorubicin erreicht. Wurden die Zellen simultan mit Doxorubicin und Sorafenib behandelt, reduzierte sich die Zellzahl im Durchschnitt um 65 %. Eine geringere Proliferationshemmung wurde bei der simultanen Gabe von Sorafenib und Doxorubicin beobachtet. Hier reduzierte sich die Zellzahl gegenüber den unbehandelten Zellen durchschnittlich um 56 %. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen waren nicht signifikant.

Im Gegensatz zu den MOLT4-Zellen führte die spätere Gabe des Doxorubicins zur stärksten Proliferationshemmung bei den SEM-Zellen. Die Zellzahl reduzierte sich im Vergleich zur Kontrolle

im Durchschnitt um 67 %, während sich bei der Gabe von Sorafenib 24 h nach Inkubation mit Doxorubicin die Zellzahl nur um durchschnittlich 50 % verminderte.

Bei den Zelllinien RS4;11 und Jurkat wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationsansätzen beobachtet. Bei der Zelllinie Jurkat reduzierte sich die Zellproliferation im Durchschnitt um bis zu 61 % bei der zeitgleichen Gabe, um bis zu 60 % wenn Doxorubicin 24 h nach der Gabe von Sorafenib den Zellen zugefügt wurde bzw. um 59 % wenn die Zellen 24 h nach der Gabe von Doxorubicin mit dem Sorafenib inkubiert wurden.

3.7.3 Kombination des Sorafenibs mit Dexamethason

In der Abbildung 41 sind die beobachteten Effekte der Kombinationsansätze mit den Erwartungswerten des Kombinationseffektes dargestellt. Da die Hemmung der Proliferation im Vergleich zu den berechneten Erwartungswerten größer ist, liegt eine synergistische Wirkung vor. Die Wirkungsverstärkung der Kombination gegenüber den Einzelsubstanzen wurde in allen Zelllinien nachgewiesen.

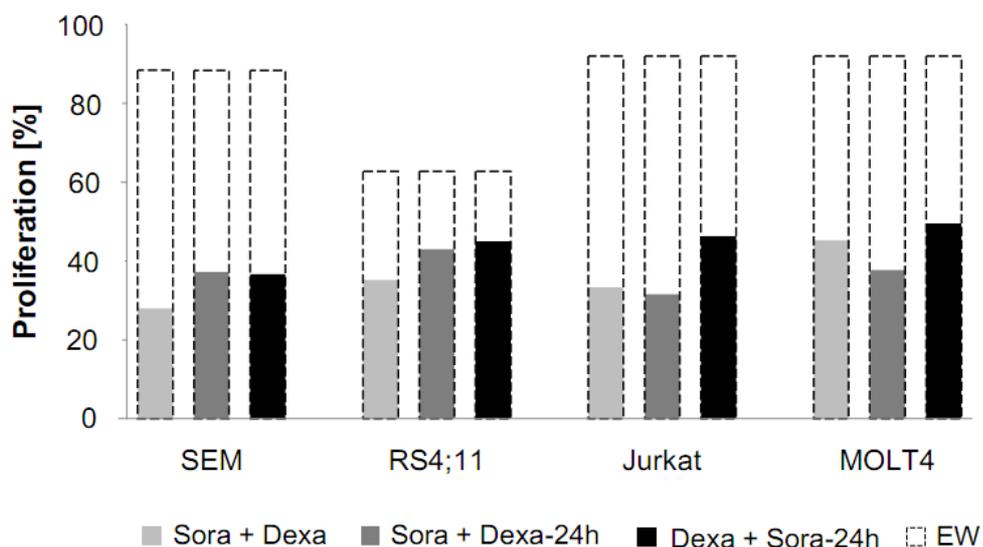


Abbildung 41: Kombinationsanalyse von Sorafenib und Dexamethason

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 0,1 μM Dexa (RS4;11), 1 μM Dexa (SEM), 10 μM Dexa (Jurkat und MOLT4) sowie mit 3,65 μM Sora allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sora entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Dexa (Sora + Dexa-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Dexa (Dexa + Sora-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die beobachteten Proliferationseffekte aus drei unabhängigen Kombinationsversuchen in den ALL-Zelllinien im Vergleich zum Erwartungswert. Die beobachteten Proliferationsseffekte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Probe (= 100 %) gesetzt.

Dexa: Dexamethason; EW: Erwartungswert; Sora: Sorafenib

Die simultane Gabe beider Substanzen führte bei den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat zur stärksten Proliferationshemmung. So reduzierte sich die Zellzahl bei SEM im Durchschnitt um 72 %, wenn Sorafenib und Dexamethason gleichzeitig appliziert wurden, während sich bei der Gabe von Sorafenib 24 h nach Inkubation mit Dexamethason die Zellzahl nur um bis zu 63 % verringerte. Die Inkubation mit Sorafenib allein ergab eine Verminderung der Zellzahl im Durchschnitt um 63 % und die alleinige Gabe von Dexamethason führte zu einer Reduzierung der Zellzahl um 18 %. Somit wurde durch die Gabe beider Substanzen eine Steigerung der Proliferationshemmung um bis zu 9 Prozentpunkte bezogen auf den Einzeleffekt von Sorafenib bzw. eine Erhöhung um 54 Prozentpunkte auf den Einzeleffekt von Dexamethason erreicht. Bei der zeitversetzten Gabe von Sorafenib bzw. Dexamethason reduzierte sich die Zellzahl um jeweils 63 %. Signifikante Unterschiede zwischen den Kombinationsansätzen wurden nicht beobachtet.

3.8 Veränderung der Genexpression nach Sorafenibbehandlung

3.8.1 Die Erstellung eines Genexpressionsprofils

Für die ALL-Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat wurde nach 24-stündiger Behandlung mit 7,3 μM Sorafenib ein Genexpressionsprofil erstellt. Von jeder Zelllinie wurden drei Versuche durchgeführt, sodass insgesamt Daten von 18 Arrays analysiert wurden. Nach Abschluss der Qualitätskontrolle verblieben 18.254 Transkripte. Hierbei wurden 134 Gene identifiziert, die in mindestens einer Zelllinie eine signifikante Veränderung zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen aufwiesen. Um die Effekte zwischen behandelten und unbehandelten Zellen darzustellen, wurde eine Veränderung in der Genexpression mindestens um den Faktor 2 vorausgesetzt.

So wurden nach einer 24-stündigen Inkubation mit Sorafenib 45 Gene identifiziert, die zu einer bis zu 15-fach erhöhten Genexpression führten. Eine verminderte Genexpression wurde in 29 Genen ermittelt. Die Genexpression in den behandelten Zellen hat sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen teilweise um einen Faktor von 30,5 reduziert. Die 74 signifikant differenziell exprimierten Transkripte mit einer Veränderung mindestens um den Faktor 2 sind in der Abbildung 42 als Rot-Grün-Heatmaps dargestellt.

Die Heatmaps zeigen die Expressionssignale sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat aus drei unabhängigen Versuchen. Durch den Clusteralgorithmus wurden einerseits die Unterschiede in der Genexpression zwischen der Kontrolle und den mit Sorafenib-behandelten Zellen illustriert, andererseits wird auch die Gleichheit der Replikate innerhalb einer Probe demonstriert. Ebenso konnte mit Hilfe der Heatmaps gezeigt werden, dass die beobachteten Genexpressionsveränderungen in allen Zelllinien im Wesentlichen übereinstimmen. In den Tabellen 14 und 15 sind jeweils 25 Gene in absteigender Reihenfolge gelistet, die nach 24-stündiger Sorafenib-Inkubation, in mindestens einer Zelllinie eine signifikant erhöhte bzw. verminderte Genexpression aufweisen.

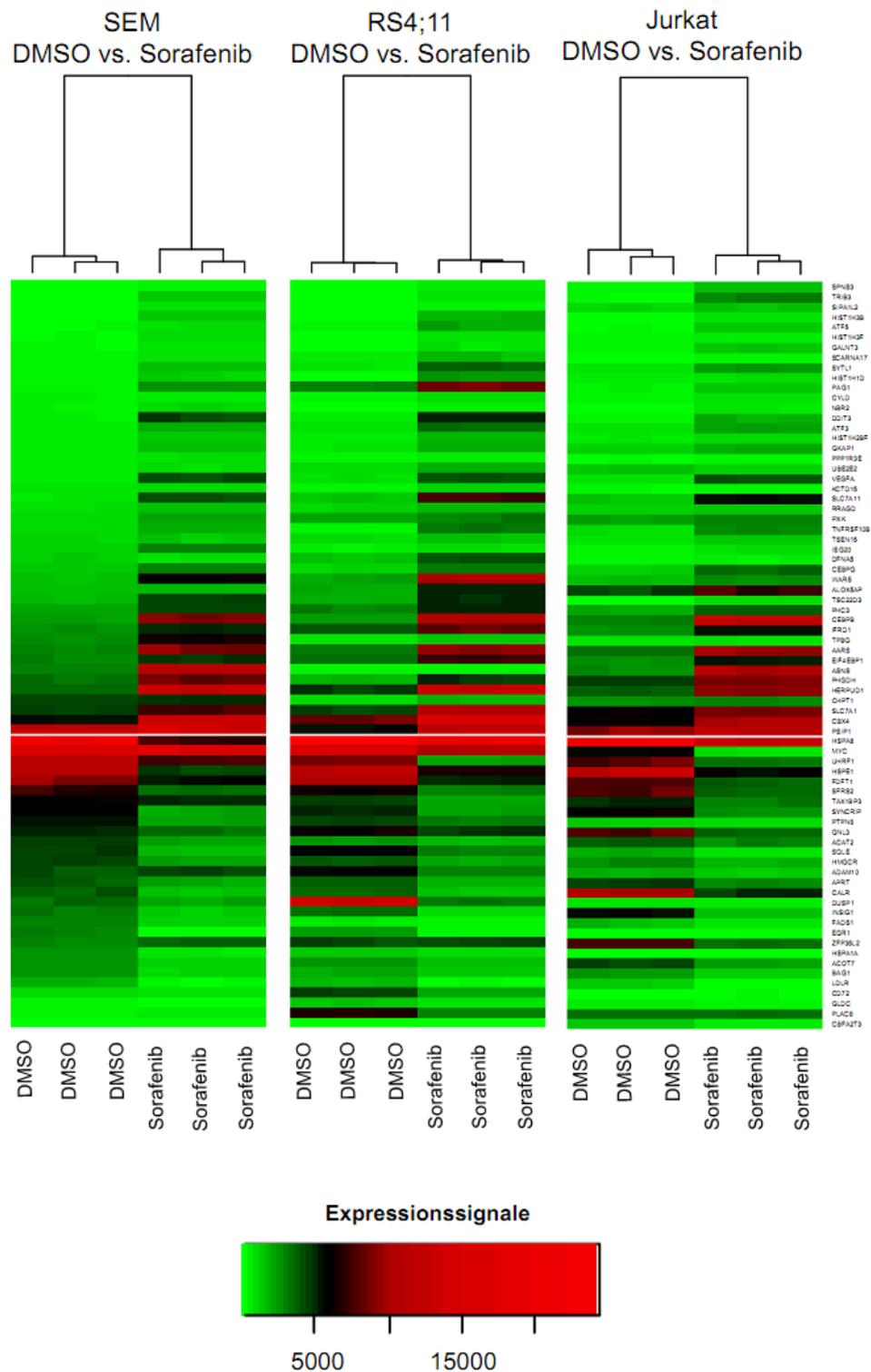


Abbildung 42: Genclusteranalyse nach Sorafenib-Behandlung in ALL-Zellen

Dargestellt sind die Expressionssignale von unbehandelten (DMSO) und mit Sorafenib (7,3 μM) behandelten ALL-Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat mittels Rot-Grün-Heatmaps. Die Clusteranalyse wurde zwischen behandelten und unbehandelten Proben pro Zelllinie durchgeführt. Niedrige Expressionssignale sind grün (< 5.000) und hohe Expressionssignale sind rot (> 10.000) gekennzeichnet.

Tabelle 14: Gene mit einer erhöhten Expression nach Sorafenib-Behandlung

#	Gensymbol	Sondenset ID	Genname	Ratio		
				SEM	RS4;11	Jurkat
1	<i>HIST1H1D</i>	214537_at	histone cluster 1, H1d	4,2	15,1	1,7
2	<i>HIST1H3F</i>	208506_at	histone cluster 1, H3f	4,2	11,6	1,6
3	<i>TNFRSF10B</i>	209295_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	2,0	9,9	3,5
4	<i>DDIT3</i>	209383_at	DNA-damage-inducible transcript 3	10,6	9,5	6,7
5	<i>HIST1H3B</i>	208576_s_at	histone cluster 1, H3b	8,4	20,9	4,0
6	<i>TRIB3</i>	1555788_a_at	tribbles homolog 3 (Drosophila)	8,4	8,1	16,9
7	<i>PAG1</i>	227354_at	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1	7,6	2,9	3,7
8	<i>ATF5</i>	204999_s_at	activating transcription factor 5	4,7	5,4	6,7
9	<i>SLC7A11</i>	217678_at	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	6,3	5,5	4,1
10	<i>SPNS3</i>	235900_at	spinster homolog 3 (Drosophila)	9,7	10,1	6,0
11	<i>SYTL1</i>	227134_at	synaptotagmin-like 1	5,7	5,9	3,6
12	<i>VEGFA</i>	210512_s_at	vascular endothelial growth factor A	7,2	5,1	5,3
13	<i>GALNT3</i>	203397_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	2,8	4,6	5,0
14	<i>TSC22D3</i>	208763_s_at	TSC22 domain family, member 3	2,7	2,5	4,9
15	<i>CEBPB</i>	212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	4,1	4,7	4,4
16	<i>SIPA1L2</i>	225056_at	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	4,7	13,2	1,5
17	<i>WARS</i>	200629_at	tryptophanyl-tRNA synthetase	4,2	4,7	1,7
18	<i>ATF3</i>	202672_s_at	activating transcription factor 3	4,0	4,7	3,2
19	<i>HIST1H2BF</i>	208490_x_at	histone cluster 1, H2bf	2,7	3,9	1,6
20	<i>ASNS</i>	205047_s_at	asparagine synthetase	3,8	-1,3	4,1
21	<i>HERPUD1</i>	217168_s_at	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	3,7	2,8	2,5
22	<i>KCTD15</i>	222664_at	potassium channel tetramerisation domain containing 15	1,5	3,4	1,6
23	<i>AARS</i>	201000_at	alanyl-tRNA synthetase	3,1	3,0	2,9
24	<i>CEBPG</i>	225527_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	2,2	3,0	3,0
25	<i>SCARNA17</i>	240830_at	small Cajal body-specific RNA 17	3,0	2,9	3,1

In absteigender Reihenfolge der signifikanten Ratio-Zahlenwerte sind 25 Gene gelistet, die in mindestens einer Zelllinie nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib eine signifikante Reduktion in der Genexpression zeigten. Die Signifikanz ist durch eine fette Markierung der Ratio-Zahlenwerte dargestellt und wurde mit $p < 4,94 \times 10^{-6}$ angenommen. Die Ratio gibt die Genexpressionsveränderungen zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an, wobei eine erhöhte Genexpression durch eine positive Ratio und eine verminderte Genexpression durch eine negative Ratio präsentiert wird.

Tabelle 15: Gene mit einer verminderten Expression nach Sorafenib-Behandlung

#	Gensymbol	Probeset ID	Genname	Ratio		
				SEM	RS4;11	Jurkat
1	<i>EGR1</i>	201694_s_at	early growth response 1	-30,5	-9,1	0,1
2	<i>LDLR</i>	202068_s_at	low density lipoprotein receptor	-8,9	-8,9	-7,9
3	<i>MYC</i>	202431_s_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	0,6	-1,4	-7,7
4	<i>DUSP1</i>	201041_s_at	dual specificity phosphatase 1	-1,6	-4,5	-1,4
5	<i>HSPA1A</i>	200799_at	heat shock 70kDa protein 1A /// heat shock 70kDa protein 1B	-4,1	-1,4	2,2
6	<i>UHRF1</i>	225655_at	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	-1,5	-4,0	-2,5
7	<i>INSIG1</i>	201627_s_at	insulin induced gene 1	-2,6	-3,7	-3,9
8	<i>HSPA8</i>	208687_x_at	heat shock 70kDa protein 8	-3,0	-1,3	-1,8
9	<i>CBFA2T3</i>	208056_s_at	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3	0,1	-1,1	-3,0
10	<i>FADS1</i>	208962_s_at	fatty acid desaturase 1 /// fatty acid desaturase 3	-2,8	-1,8	-2,2
11	<i>HSPE1</i>	205133_s_at	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	-2,7	-1,8	-2,2
12	<i>CALR</i>	212953_x_at	calreticulin	-2,7	-2,5	-2,1
13	<i>PTPN6</i>	206687_s_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-2,5	-1,5	-1,2
14	<i>PLAC8</i>	219014_at	placenta-specific 8	1,8	-2,4	0,8
15	<i>SYNCRIP</i>	209025_s_at	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	-2,8	-2,3	-2,5
16	<i>ZFP36L2</i>	201368_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	1,3	0,4	-2,3
17	<i>GNL3</i>	217850_at	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	-1,5	-1,4	-2,2
18	<i>GLDC</i>	204836_at	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	-2,7	-2,2	-2,0
19	<i>ACOT7</i>	208002_s_at	acyl-CoA thioesterase 7	-2,2	-1,7	-1,9
20	<i>CD72</i>	215925_s_at	CD72 molecule	-1,5	-2,1	0,9
21	<i>TAX1BP3</i>	209154_at	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	-1,2	-2,1	-1,6
22	<i>FDFT1</i>	210950_s_at	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	-1,7	-2,1	-2,2
23	<i>SFRS2</i>	200753_x_at	splicing factor, arginine/serine-rich 2	-2,1	-2,1	-2,3
24	<i>ACAT2</i>	209608_s_at	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	-2,1	-1,5	-1,4
25	<i>HMGCR</i>	202539_s_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	-2,4	-2,1	-1,6

In absteigender Reihenfolge der signifikanten Ratio-Zahlenwerte sind 25 Gene gelistet, die in mindestens einer Zelllinie nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib eine signifikante Reduktion in der Genexpression zeigten. Die Signifikanz ist durch eine fette Markierung der Ratio-Zahlenwerte dargestellt und wurde mit $p < 4,94 \times 10^{-6}$ angenommen. Die Ratio gibt die Genexpressionsveränderungen zwischen unbehandelten und behandelten Zellen an, wobei eine erhöhte Genexpression durch eine positive Ratio und eine verminderte Genexpression durch eine negative Ratio präsentiert wird.

Eine Annotation der differenziell exprimierten Transkripte mit Hilfe der Datenbank DAVID ermöglichte es, den Genen zelluläre und biologische Prozesse sowie molekulare Funktionen zuzuordnen. So wurden Gene mit einer erhöhten Expression identifiziert, die für Proteine kodieren, die insbesondere DNA-Bindungseigenschaften besitzen und an der Transkription beteiligt sind. Zu dieser Gruppe zählen verschiedene Histoncluster-Gene (*Hist1H1D*, *HIST1H3F*, *HIST1H3B* und *HIST1H2BF*), *DDIT3*, *CEBPB*, *ATF3*, *ATF5*, *TRIB3*, *TSC22D3* und *CEBPG*. Aus dieser Gruppe waren die Histoncluster-Gene am stärksten nach einer Sorafenib-Behandlung exprimiert. In den Zelllinien RS4;11 wurde für *HIST1H1D* eine bis zu 15,1-fach erhöhte und in SEM-Zellen für *HIST1H3B* eine bis zu 8,4-fach erhöhte, signifikante Expression ermittelt. Des Weiteren wurden Gene identifiziert, die für Regulatorproteine der Zellproliferation und Apoptose kodieren. Zu diesen Genen zählen *VEGFA*, *WARS*, *TNFRSF10B*, *DDIT3* und *ATF5*. Aus dieser Gengruppe waren *TNFRSF10B* und *DDIT3* am stärksten exprimiert. So wurden für das *DDIT3*-Transkript in den behandelten SEM-Zellen eine bis zu 10,6-fach, in den behandelten RS4;11-Zellen eine bis zu 9,5-fach und in den behandelten Jurkat-Zellen eine bis zu 6,7-fach erhöhte Expression ermittelt. Ebenso wurden einige Gene aktiviert, die an Transportprozessen in der Zelle beteiligt sind. Dazu zählten die Transkripte *SPNS3*, *SYTL1*, *SLC7A11* und *KCTD15*. In dieser Gruppe wurde für das Transkript *SLC7A11* eine 6,3-fache signifikante Erhöhung in den behandelten SEM-Zellen, eine 5,5-fache Erhöhung in den behandelten RS4;11-Zellen, sowie eine 6,3-fache signifikante Erhöhung in den behandelten Jurkat-Zellen detektiert.

Zu den signifikant veränderten Transkripten mit einer verminderten Expression wurden Gene identifiziert, die für Proteine kodieren, die an Transkriptionsprozessen beteiligt sind. Zu diesen Genen zählen *EGR1*, *MYC*, *UHRF1*, *CBFA2T3*, *CALR* und *ZFP36L2*. Es stellte sich heraus, dass eine Behandlung mit Sorafenib die Expression der *EGR1*-mRNA in SEM um bis Faktor 30,5 und in RS4;11 um bis zu Faktor 9,1 reduzierte. Dagegen hat sich die Expression von *EGR1* in den Jurkat-Zellen nicht verändert. Andererseits wurde die Expression der Gene *MYC*, *CBFA2T3* und *ZFP36L2* nur in den Jurkat-Zellen signifikant reduziert. So wurde in Jurkat eine Verminderung um bis zu Faktor 7,7 des *MYC* Gens beobachtet. In SEM und RS4;11-Zellen war die Expression um weniger als den Faktor 2 verändert. Eine Reduktion in der Genexpression um den Faktor 2 wurde in allen behandelten Zellen für das Transkript *CALR* ermittelt.

Zusätzlich wurde eine weitere große Gruppe von Genen identifiziert, deren Proteine an verschiedenen metabolischen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. In diese Gengruppe wurden folgende Transkripte zugeordnet: *LDLR*, *INSIG1*, *FADS1*, *GLDC*, *FDFT1*, *ACAT2* und *HMGCR*. Am stärksten wurde die Expression des *LDLR*-Gens vermindert. In SEM und RS4;11 wurde eine bis zu einen Faktor von 8,9 und in Jurkat-Zellen bis zu einen Faktor von 7,9 verringerte Expression nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib detektiert.

Ebenso wurde eine Gruppe von Genen inaktiviert, die für Proteine der zellulären Stressantwort kodieren. Zu diesen Genen gehören *DUSP1* und drei verschiedene Transkripte der Hitzeschockproteine *HSPA1A*, *HSPA8* und *HSPE1*. Die Expression der Hitzeschockproteine wurde in den SEM-Zellen am stärksten reduziert.

Als negativ-regulierte Gene wurden auch Transkripte mit RNA-Prozessierungseigenschaften identifiziert, dazu zählen *SYNCRIP* und *SFRS2*.

Die Transkripte *PTPN6* und *TAX1BP3* sind in den Zelllinien SEM bzw. RS4;11 signifikant um bis zu einem Faktor von 2,5 reduziert. Ihre Proteinprodukte werden mit Signaltransduktionsprozessen in der Zelle assoziiert. Für die Transkripte *PLAC8* und *ACOT7* ist keine Zuordnung in eine Gruppe erfolgt, da in der Datenbank DAVID keine Annotation für diese Transkripte hinterlegt wurde.

3.8.2 Einfluss des Sorafenibs auf die VEGFA-mRNA-Expression

Eine Bestätigung der im Microarray identifizierten differentiellen Genexpression erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit für das *VEGFA* mittels quantitativer real-time PCR in den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat. Die *VEGFA*-Expression wurde im zeitlichen Verlauf (0,5-48 h) nach der Zugabe des Multikinaseinhibitors untersucht. Hierzu wurde die mRNA aus den behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit einem spezifischen *VEGFA*-Primerpaar wurde aus der cDNA ein spezifisches *VEGFA*-Transkript erzeugt. Parallel erfolgte die Amplifikation eines Haushaltsgens, um die relative Genexpression des *VEGFA* zu ermitteln. Die Ergebnisse der relativen *VEGFA*-Genexpression sind in der Abbildung 43 dargestellt.

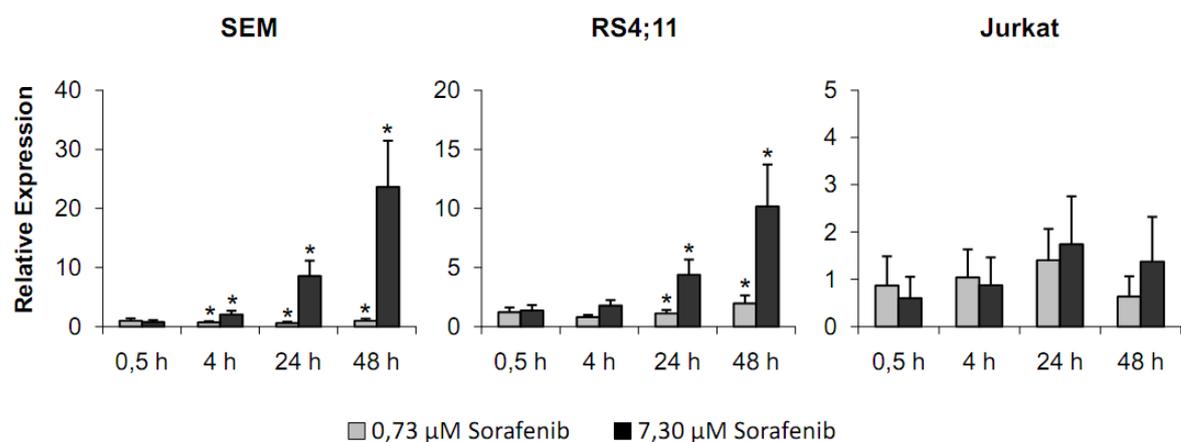


Abbildung 43: VEGFA-mRNA-Expression nach Sorafenib-Behandlung

Dargestellt ist die relative *VEGFA*-mRNA-Expression nach Sorafenib-Behandlung in ALL-Zelllinien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen. Eine höhere *VEGFA*-Expression liegt in den Proben vor, wenn der ermittelte Wert über 1 liegt. Eine niedrige *VEGFA*-Expression liegt in den Proben vor, wenn der ermittelte Wert unter 1 liegt. Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet.

In allen Zelllinien wurde eine erhöhte *VEGFA*-Expression nach 24-stündiger Inkubation mit 7,3 μM Sorafenib nachgewiesen. Die relative *VEGFA*-Expression war in den B-ALL-Zellen höher als in der T-ALL-Zelllinie Jurkat. So wurde nach 48 h mit 7,3 μM Sorafenib-Behandlung in den SEM-Zellen eine 23-fach und in den RS4;11-Zellen eine 10-fach erhöhte *VEGFA*-Expression ermittelt. In den B-ALL-Zellen waren die beobachteten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bei einer Inkubation mit 0,73 μM und 7,3 μM Sorafenib signifikant.

In den Jurkat-Zellen wurden nach der Behandlung mit Sorafenib bis zu doppelt so hohe *VEGFA*-Expressionswerte erreicht, jedoch waren die beobachteten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert. Unterschiede in der *VEGFA*-Expression zwischen beiden Sorafenib-Konzentrationen wurden nicht ermittelt.

3.8.3 Einfluss des Sorafenibs auf die *VEGFA*-Proteinexpression

Zusätzlich wurde die *VEGFA*-Proteinexpression in den ALL-Zellen nach 24- und 48-stündiger Sorafenib-Inkubation untersucht. Hierzu wurden die Zelllysate mittels Western Blot analysiert und die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf das Vorhandensein von *VEGFA* überprüft. Die Ergebnisse aus beiden Untersuchungen sind in der Abbildung 44 zusammengefasst.

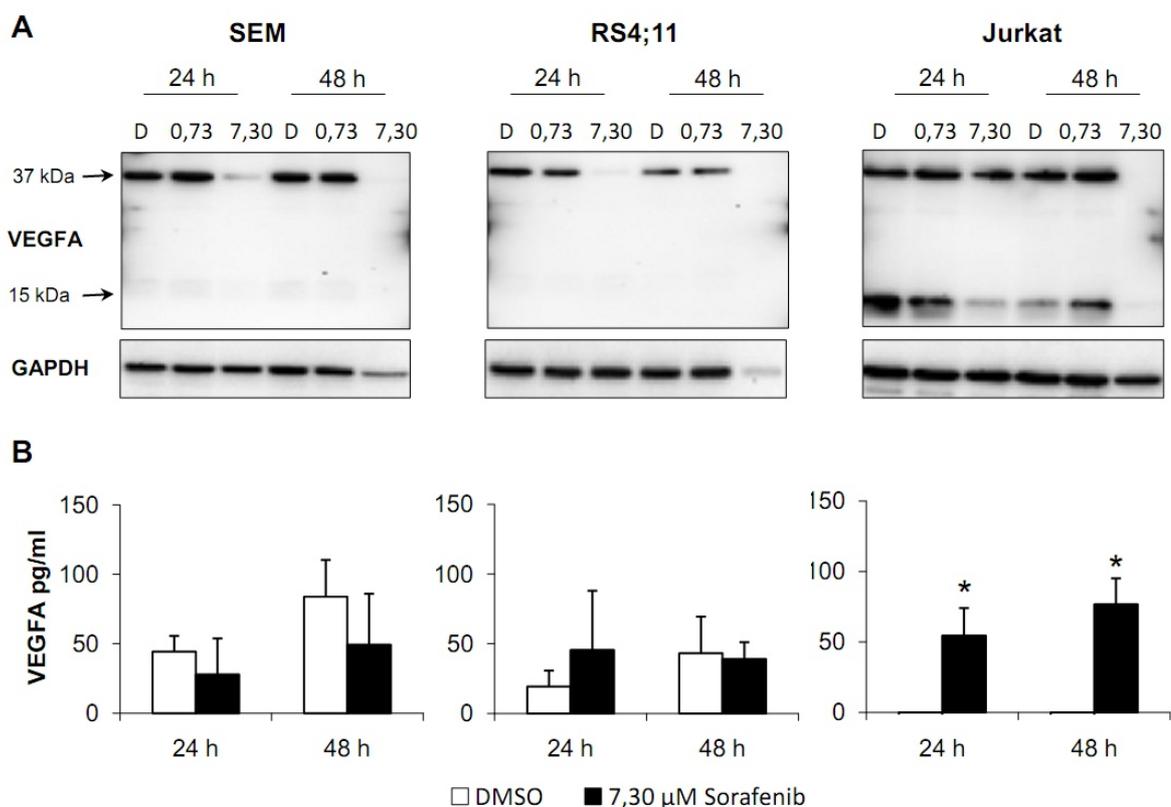


Abbildung 44: *VEGFA*-Proteinexpression nach Sorafenib-Behandlung

(A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat nach der Behandlung mit Sorafenib. Untersucht wurde die Proteinexpression von *VEGFA* (37 kDa, 15 kDa). Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt. (B) Dargestellt ist die *VEGFA*-Proteinkonzentration aus den Zellkulturüberständen nach Sorafenib-Behandlung in ALL-Zelllinien. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

VEGFA ist ein Protein, von dem verschiedene Isoformen existieren. Die verschiedenen Varianten können in der Zelle exprimiert werden und unterscheiden sich häufig in ihrem Molekulargewicht. In allen Zelllinien wurde eine starke Proteinbande bei ca. 37 kDa detektiert. In den Proteinlysaten der Jurkat-Zellen wurde zusätzlich eine zweite Bande bei ca. 15 kDa nachgewiesen. Die Behandlung mit 7,3 μ M Sorafenib führte in allen Zelllinien zur Reduktion der VEGFA-Proteinlevel. Nach 48-stündiger Inkubation waren VEGFA-Proteinlevel in keiner Zelllinie mehr nachweisbar. In den Zellkulturüberständen der mit Sorafenib behandelten B-ALL Zelllinie SEM wurden nach 24 h und 48 h leicht verringerte VEGFA-Proteinkonzentrationen ermittelt. Die durchschnittliche VEGFA-Konzentration lag nach 48 h im Medium der Kontrolle bei 84 pg/ml und im Medium der behandelten Zellen bei 49,3 pg/ml. Die beobachteten Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Bei RS4;11 wurde nach 24-stündiger Sorafenib-Inkubation ein erhöhter VEGFA-Anteil im Zellkulturüberstand der behandelten Zellen gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war die VEGFA-Konzentration im Medium der behandelten Zellen doppelt so hoch wie bei den unbehandelten Zellen. Die beobachteten Unterschiede waren nicht signifikant. Nach 48 h erhöhte sich die VEGFA-Konzentration in dem Medium der Kontrollzellen, sodass etwa gleiche VEGFA-Mengen von behandelten und unbehandelten Zellen sezerniert wurden. Eine signifikante Zunahme der VEGFA-Konzentration wurde in den Zellkulturüberständen der Jurkat-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit Sorafenib ermittelt. Die behandelten Zellen haben nach 24 h im Durchschnitt 54,6 pg/ml VEGFA sezerniert. Nach 48-stündiger Sorafenib-Inkubation erhöhte sich der VEGFA-Anteil in den Zellkulturüberständen erneut und lag im Durchschnitt bei 76,6 pg/ml. Im Gegensatz dazu, war im Medium der unbehandelten Jurkat-Zellen kein VEGFA nachweisbar.

4. Diskussion

Der Signalweg über die PI3K/Akt-Kaskade nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation lebensnotwendiger Vorgänge in der Zelle ein. Er ist neben dem JAK/STAT-, dem Wnt/ β -Catenin- und dem Notch-Signalweg auch für die Hämatopoese bedeutsam. Fehlregulationen dieser Netzwerke verändern die Entwicklung und Differenzierung der Blutzellen und können die Entstehung von Leukämien begünstigen. Einige Studien belegen, dass der PI3K/Akt-Signalweg in Leukämien konstitutiv aktiviert ist und das Überleben der Zellen fördert. Auch Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika werden durch PI3K/Akt-Dysregulationen hervorgerufen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der ALL. Hierbei wurden Schlüsselproteine dieser Signalkaskade sowohl an etablierten ALL-Zelllinien als auch an *de novo* ALL-Zellen analysiert. Ferner wurde in verschiedenen Experimenten die Wirksamkeit neuer Inhibitoren geprüft, indem das Wachstumsverhalten sowie Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression der ALL-Zellen untersucht wurden. In den folgenden Abschnitten werden die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen.

4.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bei der ALL

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene B- und T-ALL-Zelllinien, NHL-Zelllinien sowie *de novo* ALL-Zellen im Hinblick auf die PI3K/Akt-Aktivierung mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere in den T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 sowie in der B-ALL-Zelllinie SEM eine starke Aktivierung von Akt vorlag, da hier beide Phosphorylierungsstellen von Akt (Thr308 und Ser473) nachweisbar waren. In der Zelllinie DOGUM wurde nur ein starkes Akt-Phosphorylierungssignal für Serin 473 detektiert, dagegen war die Akt-Phosphorylierung von Threonin 308 sehr gering.

Parallel zu den Untersuchungen der Akt-Kinaseaktivität, erfolgte ein Phosphorylierungsnachweis eines Akt-Substrates. Hierzu wurde der Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors FoxO3A analysiert. Die Expression war in den Lysaten der Zelllinien unterschiedlich stark und korrelierte nicht mit der Phosphorylierung von Akt. So wurde bei den RS4;11- und DOGKIT-Zellen eine stärkere FoxO3A-Phosphorylierungsbande detektiert als bei Jurkat und MOLT4-Zellen, obwohl die beiden T-ALL-Zelllinien eine vermehrte Akt-Phosphorylierung zeigten. Durch den Phosphorylierungsstatus wird die Aktivität und die Stabilität des FoxO3A Proteins bestimmt. Im phosphorylierten Zustand wird der Transkriptionsfaktor aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma degradiert [125]. So könnte die reduzierte FoxO3A-Proteinmenge in den Zelllinien Jurkat und MOLT4 auf einen Abbau des Proteins hindeuten.

Neben den Zelllinien wurde die pAkt-Proteinexpression auch in *de novo* ALL-Zellen untersucht. In mehr als der Hälfte der Patientenproben konnte eine Aktivierung von Akt nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der PI3K/Akt-Signalweg an der Pathogenese der ALL beteiligt sein könnte. Inwiefern eine aberrante Akt-Aktivierung den Reifungsgrad der ALL beeinflusst, konnte aufgrund der niedrigen Patientenzahl nicht analysiert werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Zelllinien und *de novo* Zellen gehen einher mit vorherigen Studien, die eine konstitutive Akt-Aktivierung in ALL-Zellen zeigten [126, 127]. Während für die T-Linien-ALL mittlerweile viele Studien zur aberranten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durchgeführt wurden, liegen nur wenig Daten für B-Linien-ALL vor [128-130]. Einige Studien zeigten, dass eine aberrante BCR-ABL-Kinase-Aktivität zur Dysregulation des PI3K/Akt-Signalweges führt. Hierzu wurden verschiedene Mechanismen in der Arbeit von Kharas et al. beschrieben [131]. Das onkogene Fusionsprotein BCR-ABL kann die PI3K einerseits über die Adapterproteine Grb2-Gab2 oder Crkl-c-Cbl aktivieren. Ebenso ist eine Phosphorylierung der PI3K durch die Src-Kinase, IRS-1 und Ras möglich, die zuvor von der aberranten BCR-ABL-Kinase aktiviert wurden [131]. Da die untersuchten B-ALL-Zellen keine t(9;22)-Translokation aufweisen, kann eine Aktivierung über das Fusionsprotein BCR-ABL ausgeschlossen werden. In den Zelllinien SEM und RS4;11 liegt jedoch eine Translokation der Chromosomen 4 und 11 vor, die zu dem Fusionsprodukt MLL-AF4 führt. Patienten mit *MLL*-Aberrationen weisen häufig Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne des FLT3-Rezeptors auf, die zur Ligand-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors führen und in der Folge verschiedene Signalproteine in der Zelle anschalten, einschließlich der PI3K. [132, 133]. Inwiefern *FLT3*-Mutationen in den Zelllinien SEM und RS4;11 vorliegen, wird gegenwärtig in einer anderen Studie der Arbeitsgruppe untersucht.

Fehlregulationen des PI3K/Akt-Signalweges in B-Zellen können auch durch konstitutive B-Zellrezeptor (BCR)-Aktivierungen erfolgen [134, 135]. In der kürzlich erschienenen Arbeit von Suljagic et al. wurde demonstriert, dass die Phosphatase PHLPP1 an der Regulation des PI3K/Akt-Signalweges in B-Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Proteinexpression von PHLPP1 die Dephosphorylierung von Akt verhindert und für das Überleben der Zellen förderlich ist. Dagegen führte eine Überexpression des PHLPP1-Proteins zur Unterdrückung der Akt-Aktivität und zur Hemmung der Zellproliferation [136]. Möglicherweise könnte auch eine geringere Phosphataseaktivität von PHLPP1 in B-ALL-Zellen die Aktivität von Akt beeinflussen. Hierzu wurden bisher noch keine Untersuchungen durchgeführt.

In T-ALL-Zellen ist der PI3K/Akt-Signalweg häufig aufgrund von PTEN-Deletionen angeschaltet. Diese Phosphatase ist ein Negativregulator des PI3K/Akt-Signalweges, indem sie das Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat dephosphoryliert und so die Aktivierung von Akt verhindert. In der vorliegenden Arbeit wurde die PTEN-Expression in verschiedenen ALL-Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurden die neun Exone von PTEN aller verwendeten Zelllinien sequenziert. Keine PTEN-Proteinexpression wurde in den T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 nachgewiesen. Der Verlust des PTEN-Proteins wurde bereits in einigen Studien beschrieben [85, 137]. Ebenso wurden in den Jurkat-Zellen zwei unterschiedlich große Banden des Exon 7 im Agarosegel nachgewiesen.

Beide Produkte lagen sehr dicht aneinander und waren einige Basenpaare größer als das zu erwartende Amplifikat. Auf eine Klonierung und anschließende Sequenzierung der beiden PCR-Produkte wurde verzichtet, da Shan et al. in ihrer Arbeit berichteten, dass beide PTEN-Allele in Jurkat-Zellen mutiert vorlagen. Bei ihren Untersuchungen identifizierten sie zwei verschiedene Mutationen im Exon 7. Beide Mutationen waren durch Insertionen gekennzeichnet und enthielten ein Stop-Codon, das zum vorzeitigem Abbruch der Translation des Proteins führt [138]. In der Zelllinie MOLT4 wurde mittels Sequenzierung eine Adenin-Deletion (800delA) im Exon 7 nachgewiesen. Diese Mutation wurde ebenfalls in der Literatur von Ikediobi et al. in MOLT4-Zellen beschrieben [139]. Der Verlust des Adenins führt zur Verschiebung des Leserasters und induziert einen vorzeitigen Abbruch der Translation [140]. Das Exon 7 liegt in der C2-Domäne und gehört zur C-terminalen Region des Proteins. In diesem Bereich erfolgen verschiedene posttranslationale Modifikationen die zur Stabilität und Aktivität von PTEN beitragen [141-143]. Mutationen im Exon 7 sind häufig in T-ALL-Zellen und mit einer fehlenden PTEN-Proteinexpression assoziiert [29, 85].

Bei den B-ALL- und NHL-Zelllinien war das Tumorsuppressorgen PTEN nachweisbar, wobei die Proteinmenge in den NHL-Zelllinien sehr gering war. Die PTEN-Expression wird durch eine Vielzahl von Mechanismen beeinflusst. Dazu gehören transkriptionale und posttranskriptionale Regulationen, Protein-Proteininteraktionen sowie posttranslationale Modifikationen [87, 144]. Die Phosphorylierung von Aminosäuren am C-Terminus erhöht die Stabilität und verändert die Konformation des Proteins. Dadurch wird die Anbindung von PTEN an die Membran reduziert und die Aktivität der Phosphatase gehemmt [145]. Eine Monoubiquitinierung von PTEN führt zum Transport in den Zellkern und erhöht die Chromosomenstabilität [146, 147]. Eine Markierung mit mehreren Ubiquitinmolekülen erfolgt durch die Ubiquitinligase NEDD4 und induziert den proteasomalen Abbau von PTEN [148]. Inwiefern in den untersuchten Zelllinien ein aktives Protein vorliegt, ist gegenwärtig unklar und muss in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

Mutationen im Gen des Transmembranrezeptors *Notch1* können ebenso die Expression von PTEN beeinflussen. Diese Mutationen wurden in über 50 % der T-ALL Patienten nachgewiesen und führen zur Liganden-unabhängigen Aktivierung des Notch-Signalweges [86, 149, 150]. Notch1 wirkt im Nukleus mit den Proteinen CSL und MAML1 als Coaktivator und induziert die Transkription von HES und MYC. Beide Proteine binden an die PTEN-Promotorregion und beeinflussen die Expression des Proteins. HES fungiert als Transkriptionsrepressor und MYC ist ein schwacher Transkriptionsaktivator von PTEN [87]. Notch1-Mutationen wurden bisher nur in T-ALL-Zellen identifiziert. Die Rolle des Notch-Signalweges in malignen B-Zellen wird kontrovers diskutiert. In einigen Studien wird Notch als Onkogen beschrieben, weil hohe Expressionen des Notchrezeptors und seiner Liganden die Proliferation in Hodgkin-Lymphomen und im multiplen Myelom steigern [151, 152]. Rosati et al. zeigten, dass ein konstitutiv aktivierter Notch-Signalweg in B-CLL-Zellen das Überleben der malignen Zellen fördert [153]. Im Gegensatz dazu, wurde in anderen Arbeiten Notch1 als Tumorsuppressor diskutiert [154, 155]. Zweidler-McKay et al.

zeigten, dass die Aktivierung von Notch1 in malignen B-Zellen das Zellwachstum inhibiert und Apoptose induziert [154]. Ebenso konnten Nefedova et al. nachweisen, dass Notch1 in humanen Myelomzellen zum Wachstumsstopp führt [155]. Dagegen scheinen in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomzellen Modulationen des Notch-Signalweges die Apoptose nicht zu beeinflussen [156].

Die vorliegenden Ergebnisse und die zitierten Studien deuten darauf hin, dass der PI3K/Akt-Signalweg in der ALL häufig aktiviert ist und eine Rolle in der Leukämogenese spielt. Mutationen und chromosomale Aberrationen sind häufige Prozesse in der ALL und mit einer veränderten Genexpression verbunden, die zur Dysregulationen in der Signalkaskade führen kann. Während in der T-ALL der Verlust von PTEN die häufigste Ursache für die aberrante Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges darstellt, sind die Ursachen für PI3K/Akt Dysregulationen in der B-ALL noch unklar.

4.2 Die Bedeutung der PI3K- und mTOR-Inhibition in ALL-Zellen

Darüber hinaus wurde in einem weiteren Teilbereich der Arbeit untersucht, inwiefern Schlüsselmoleküle des PI3K/Akt-Signalweges therapeutische Zielgene in der ALL darstellen. Es wurden vier verschiedene Inhibitoren analysiert, die teilweise noch in präklinischen Studien untersucht werden. Die Substanzen unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur und weisen unterschiedliche Inhibitionskonzepte auf.

In ersten Versuchen wurden die Kinasen PI3K und mTOR einzeln mit spezifischen Inhibitoren gehemmt. Anschließend erfolgten Untersuchungen zur dualen Inhibition beider Kinasen. Um zu beurteilen, ob eine Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges in der ALL eine funktionale Bedeutung hat, wurde zuerst die Wirkung des bekannten PI3K-Inhibitors Ly294002 an der Zelllinie SEM untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Ly294002-Konzentration die Zellproliferation abnahm. Ferner wurde ein Anstieg der Apoptose- und Nekroserate beobachtet. Ly294002 ist ein PI3K-Inhibitor der alle PI3K-Isoformen der Klasse I blockiert und seit vielen Jahren zur Untersuchung der PI3K/Akt-Aktivität verwendet wird. Er zeigte antiproliferative Effekte in verschiedenen Tumorzellen, darunter auch in AML-Zellen. [157-160]. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Ly294002 die Aktivität der PI3K in B-ALL-Zellen beeinflusst. Eine Hemmung der PI3K wurde bereits nach 30-minütiger Inkubation beobachtet. Jedoch war die Inhibition der PI3K sehr kurz, da sich die Phosphorylierungen von Akt und FoxO3A nach 4 h wieder erhöhten. Nach 24-stündiger Inkubation waren die Signale für pAkt und pFoxO3A sogar stärker als in der Kontrolle. Die anschließende Reaktivierung von Akt wurde auch in der Arbeit von Werzowa et al. diskutiert. Sie begründen den Anstieg der Expression von pAkt mit der kurzen Halbwertszeit des Inhibitors [161]. Die reversible Hemmung hat dennoch einen Einfluss auf das Zellwachstum gezeigt. Es ist bekannt, dass Ly294002 neben der PI3K auch weitere Kinasen inhibiert, sodass die Signalübertragung in der Zelle stark verändert wird. So wurde beschrieben, dass auch die Kinasen

mTOR, CDK2, Pim 1 und GSK3 α und GSK3 β in ihrer Aktivität gehemmt werden [101, 102, 99]. Dadurch ist eine Beurteilung der Ergebnisse schwierig. Dennoch konnte mit Ly294002 gezeigt werden, dass die PI3K/Akt-Aktivität in ALL-Zellen beeinflusst werden kann.

Der mTOR-Inhibitor RAD001 zeigte ebenfalls antiproliferative Effekte bei den B- und T-ALL-Zellen, wobei eine stärkere Wirkung des Hemmstoffes bei den T-ALL-Zellen beobachtet wurde. Im Gegensatz zu den B-ALL-Zellen wurde bei den T-ALL-Zellen Jurkat und MOLT4 ein Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase sowie eine verminderte Cyclin D3- und CDK4-Expression nachgewiesen. Eine Induktion der Apoptose ist durch die Behandlung von RAD001 nicht eingetreten.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls nach einer mTOR-Hemmung einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase beobachten und wenig apoptotische Zellen nachweisen konnten [162-164].

In jüngster Zeit wurden Hemmstoffe entwickelt, die gleichzeitig zwei oder mehrere Kinasen blockieren. Dadurch könnte die Wirksamkeit der Inhibitoren erhöht werden und mögliche Rückkopplungsreaktionen durch Reaktivierung gehemmter Kinasen vermieden werden, die insbesondere nach einer Inhibition von mTOR zu beobachten sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine mTOR-Hemmung durch RAD001 die Aktivität von Akt erhöht. Eine zusätzliche PI3K-Inhibition könnte diesen Effekt reduzieren oder sogar verhindern.

Eine Behandlung mit dem dualen PI3K- und mTOR-Inhibitor BEZ235 in B- und T-ALL-Zellen führte zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation und der metabolischen Aktivität. Die antiproliferativen Effekte wurden mit Konzentrationen induziert, die zwischen den erreichten Plasmaspiegelkonzentrationen liegen, die in Untersuchungen mit Xenograft-Mäusen erreicht wurden [110]. Diese Konzentrationsangaben dienen als Richtwert für die *in vitro*-Versuche, da pharmakokinetische BEZ235-Studien am Menschen bisher noch nicht publiziert wurden.

Die Behandlung mit BEZ235 führte durch Hemmung der zellzyklusregulatorischen Proteine Cyclin D3 und CDK4 zu einem G0/G1-Zellzyklusarrest. Jedoch wurde der Eintritt in die S-Phase nicht durch den cyclinabhängigen Kinaseinhibitor p15^{INK4B} blockiert, da sich bei beiden Zelllinien die Proteinmenge von p15^{INK4B} reduzierte. Neben p15^{INK4B} wird der Cyclin D-CDK4-Komplex noch von weiteren CDK4-Inhibitorproteinen reguliert. Zu diesen Proteinen gehören p16^{INK4}, p18^{INK4} und p19^{INK4} [165]. Inwiefern sich die Expression dieser Proteine durch die Behandlung mit BEZ235 veränderte, muss in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

Der Proteinanteil von p27^{KIP1} wurde nur in den Jurkat-Zellen durch eine Behandlung mit BEZ235 erhöht. Das Protein p27^{KIP1} inhibiert zusammen mit p21^{KIP1} den Cyclin E-CDK2-Komplex und verhindert ebenfalls den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus [166]. Die Expression von p27^{KIP1} wird durch die FoxO-Transkriptionsfaktoren positiv reguliert, wobei die Transkription ihrer Zielgene im phosphoryliertem Zustand blockiert wird [48]. Eine Behandlung mit BEZ235 führte zur reversiblen Hemmung von Akt in Abhängigkeit von der Konzentration und der Zeit. Dadurch

wurde auch die Phosphorylierung und Aktivität von FoxO3A verändert und die Expression von p27^{KIP1} beeinflusst. Ebenso wird die Aktivität und Stabilität von p27^{KIP1} auch über den Phosphorylierungsstatus bestimmt. Im phosphoryliertem Zustand wird der CDK-Inhibitor ebenfalls wie FoxO aus dem Zellkern exportiert und degradiert. Neben Akt kann die Phosphorylierung von p27^{KIP1} auch durch die Tyrosinkinase SRC oder ERK erfolgen [167, 168]. Eine Erhöhung des ERK-Phosphorylierungsstatus wurde in der Zelllinie SEM nach der Behandlung mit BEZ235 nachgewiesen und könnte somit ursächlich für die Abnahme der p27^{KIP1}-Expression sein (Daten zum ERK-Phosphorylierungsstatus sind im Anhang, Abschnitt 7.1.8, Abbildung 45 dargestellt). Diese Annahme steht im Einklang mit den Ergebnissen von Roccorado et al. die in ihrer Arbeit ebenfalls ein Zunahme der ERK-Phosphorylierung nach einer BEZ235-Inkubation beobachteten [169]. ERK ist eine Schlüsselkomponente des Raf/MEK/ERK-Signalweges und vermittelt Wachstums- und Proliferationssignale. Eine ERK-Aktivierung kann beispielsweise durch das Insulinrezeptorsubstrat (IRS-1) nach einer mTOR-Inhibition auftreten und könnte die Induktion von Apoptose verhindern [170, 171]. Bei den Jurkat-Zellen wurde nach der Behandlung mit BEZ235 erhöhte Apoptoseraten beobachtet und keine ERK-Aktivierung nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, warum bei diesen Zellen keine Zunahme der ERK-Phosphorylierung erfolgte.

Die antiproliferative Wirkung von BEZ235 *in vitro* wurde inzwischen schon an verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Wachstumshemmende Effekte wurden in Prostatakarzinom-, Glioblastom-, Multiplen Myelom- und Lymphom-Zelllinien nachgewiesen [110-112, 172]. Dabei wurde Apoptose nur mit Konzentrationen über 100 nM sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Signalweg durch Aktivierung der Caspasen 9, 8, 3 und PARP induziert [111, 169].

In der vorliegenden Arbeit wurden BEZ235-Konzentrationen zwischen 1 nM und 100 nM verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die mTOR-Substrate p70-S6K und 4EBP-1 bei den SEM und Jurkat-Zellen in ihrer Phosphorylierung vollständig reduziert wurden. Dagegen war die Inhibition von Akt nicht stabil. So wurde nach einer Hemmung von Akt eine Zunahme der Akt-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Zeit und Konzentration beobachtet. Obwohl in der Studie von Maira et al. mittels Enzymaktivitätsassays dokumentiert wurde, dass die PI3K-Kinaseaktivität bei einer kleineren BEZ235-Konzentration (IC₅₀: 4 nM) blockiert wird als die mTOR-Kinaseaktivität (IC₅₀: 20 nM), wurde in der vorliegenden Arbeit eine stabile mTOR-Hemmung, jedoch keine dauerhafte Akt-Inhibition nachgewiesen [110]. Die Untersuchungen zur Kinaseaktivität wurden mit einem rekombinanten Substrat, dem Enzym und dem Inhibitor durchgeführt und können sich demzufolge von den Beobachtungen in viablen Zellen unterscheiden. Die Aktivität der Akt-Kinase kann einerseits durch den mTORC2-Komplex und andererseits durch die p-p70-S6K beeinflusst werden. Während der mTORC2-Komplex Akt direkt phosphorylieren kann, besteht über die phosphorylierte Form der p70-S6K einen Rückkopplungsmechanismus bei dem IRS-1 und die Aktivität der PI3K blockiert werden [173].

Diese Rückkopplungsreaktion wird insbesondere bei mTORC1-Inhibitionen beobachtet [174, 175]. Insofern könnte eine duale Inhibition von mTORC1 und IGF-1 die Reaktivierung von Akt verhindern. Baumann et al. führten solche Kombinationsexperimente mit RAD001 und NVP-AEW541 (IGF1-R-Inhibitor) durch und konnten zeigen, dass durch die duale Inhibition eine gesteigerte Reduktion der Zellproliferation zu beobachten war. Gleichzeitig konnten sie nachweisen, dass durch die Kombination eine stärkere Dephosphorylierung der mTOR-Substrate erfolgte. In den vorliegenden Untersuchungen kann eine Phosphorylierung von Akt über mTORC2 ausgeschlossen werden, da in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, dass BEZ235 sowohl den mTORC1- als auch den mTORC2-Komplex hemmt [110, 169].

Die reversible Hemmung von Akt wurde in anderen Arbeiten nicht gezeigt, da oft nur ein Zeitpunkt bzw. höhere Konzentrationen von BEZ235 untersucht wurden [169, 176, 177]. In der Studie von Baumann et al. wurden Multiple Myelom-Zellen mit 1 μ M BEZ235 behandelt und der Phosphorylierungsstatus von Akt in einem Zeitintervall von 4-16 h analysiert [111]. Chiarini et al. behandelten verschiedene T-ALL-Zelllinien mit 200 nM und untersuchten die phosphorylierten Formen von Akt, 4EBP-1, p70-S6K und S6RP in einem Zeitintervall von 1-6 h. Hierbei konnten sie beobachten, dass die Hemmung von Akt in diesem Zeitraum stabil blieb [177]. Offensichtlich wird die Aktivität von PI3K und mTOR mit höheren BEZ235-Konzentrationen effektiver blockiert und Rückkopplungsreaktionen vermieden, die eine Aktivierung von Akt auslösen. Inwiefern hohe Konzentrationen in der Therapie verwendet werden können, ist zu diesem Zeitpunkt noch unklar, da bisher keine Pharmakokinetikuntersuchungen von BEZ235 vorliegen.

4.3 Effekte des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf ALL-Zellen

Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben wurde, scheinen die Raf/MEK/ERK- und PI3K/Akt-Signalwege miteinander verknüpft zu sein und können sich gegenseitig über Rückkopplungsreaktionen regulieren. Neben den Untersuchungen zum Wachstumsverhalten wurde zusätzlich der Einfluss von Sorafenib auf den PI3K/Akt- und den Wnt/ β -Catenin-Signalweg analysiert sowie ein Genexpressionsprofil der ALL-Zelllinien erstellt.

Sorafenib reduzierte in allen untersuchten Zelllinien das Wachstum und die metabolische Aktivität. Ferner wurde ein hoher Anstieg der Apoptose- und Nekroseraten beobachtet. Der Nachweis von Apoptose erfolgte über zwei verschiedene Methoden. Zum einen wurden frühapoptotische Zellen durch das Anfärben der Phosphatidylserine mit Annexin-V-FITC identifiziert. Diese Methode hat den Vorteil, dass der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen erfasst wird. Zum anderen wurden spezifische Antikörper verwendet, die einen Nachweis von proapoptotischen Proteinen ermöglichen. So konnte gezeigt werden, dass Sorafenib an der Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 beteiligt ist und die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase induzierte. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 erfolgt durch ihre eigene Spaltung und wird durch Initiatorcaspasen ausgelöst [178]. Die apoptoseinduzierende Wirkung des Sorafenibs wurde bereits an verschiedenen Tumoren untersucht. In AML-Zellen konnte gezeigt

werden, dass Sorafenib den Apoptosevorgang über den intrinsischen Weg aktiviert und die Expression der proapoptotischen Proteine Bim, BAD, Bax und Bak stimuliert [179]. In anderen Arbeiten wurde über eine Abnahme des Proteins Mcl-1 berichtet sowie die Ausschüttung von Cytochrom c beobachtet [180, 181]. Der Austritt von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird durch die proapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie BAD, Bax und Bim gesteuert [182]. Mcl-1 gehört ebenfalls zur Bcl-2-Familie und spielt eine entscheidende Rolle im Überleben von hämatopoetischen Zellen [183]. In der Studie von Rahmani et al. wurde ebenfalls eine Abnahme der Mcl-1-Proteinexpression nach einer Sorafenib-Behandlung nachgewiesen, jedoch erfolgte diese unabhängig von einer ERK- und mTOR- Inhibition [181].

Die beobachteten antiproliferativen Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit mit Konzentrationen erreicht, die im Bereich der Plasmaspiegelkonzentrationen (2,3 mg/l bis 10,0 mg/l) liegen, die nach der oralen Gabe von zweimal täglich 400 mg Sorafenib gemessen wurden [184]. Dieser Bereich liegt jedoch oberhalb der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC50) für Raf, VEGFR, PDGFR, c-Kit und FLT-3 die in der Studie von Wilhelm et al. mittels Enzymkinaseassays ermittelt wurden [185]. Während die Effekte von Sorafenib auf die Ras/Raf/MEK/ERK-Signalkaskade mittlerweile schon sehr gut untersucht wurden, ist der Einfluss von Sorafenib auf den PI3K/Akt-Signalweg noch unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Behandlung mit Sorafenib in ALL-Zellen sowohl die Akt- als auch die mTOR-Aktivität reduzierte. Insbesondere wurde eine vollständige Abnahme der pAkt-Proteins in den Zelllinien SEM und RS4;11 beobachtet. Dagegen erfolgte in den Jurkat-Zellen eine deutlich schwächere Akt-Hemmung. Zusätzlich wurde in der B-ALL-Zelllinie SEM gleichzeitig eine pERK-Reduktion nachgewiesen (dargestellt im Anhang unter 7.1.8, Abbildung 49). Da in den unbehandelten Jurkat-Zellen kein pERK-Protein nachweisbar war, könnten die beobachteten inhibitorischen Effekte in diesen Zellen auch unabhängig von ERK sein. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Sorafenib den Phosphorylierungsstatus von Akt nicht verändert [184, 186, 187]. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Arbeiten nachgewiesen, dass die Behandlung mit Sorafenib zu einer verminderten pAkt-Expression führte [188-190]. In zwei verschiedenen Arbeiten wurde festgestellt, dass Sorafenib die Aktivität von Akt und STAT3 (*phosphorylated signaltransducers and activators of transcription 3*) unabhängig von ERK reduziert [188, 189]. Dagegen war eine Abnahme von phosphoryliertem Akt und STAT3 in Neuroblastomzellen mit einer Inhibition von ERK assoziiert [190]. Um die reduzierte Akt-Aktivität zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit parallel zur pAkt-Proteinmenge der Phosphorylierungsstatus einiger Effektorproteine des PI3K/Akt-Signalweges untersucht. Die Behandlung mit Sorafenib führte ebenfalls zur Inhibition von mTOR, da sich der Phosphorylierungsstatus von 4EBP-1 reduzierte. Außerdem wurde eine verminderte Phosphorylierung von FoxO3A und GSK3 β beobachtet. Der dephosphorylierte Transkriptionsfaktor FoxO3A wird aus dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert und aktiviert die Transkription von proapoptotischen Genen und Zellzyklusinhibitorproteinen [113, 191, 192]. Zu seinen Zielgenen gehören *Bim-1*, *Bcl-6*, *Trail*, *p27KIP1* und *GADD45* [45, 48]. In der

vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Sorafenib den Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase erhöht. Gleichzeitig wurde eine verminderte Proteinmenge von Cyclin D3 und CDK4 beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression des CDK2-Inhibitorproteins p27^{KIP1} in den behandelten Jurkat-Zellen niedriger und in SEM-Zellen unverändert. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Expression von p27^{KIP1} auch unabhängig von den FoxO-Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Schmidt et al. [50].

Inwiefern Sorafenib eine Akt-Hemmung in den ALL-Zellen induziert, ist weiterhin unklar. Möglicherweise kann die Akt-Aktivität durch das Blockieren von stromaufwärts gelegenen Rezeptortyrosinkinasen wie VEGFR oder FLT3 beeinflusst werden. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden von allen Blutendothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert [193, 194]. Sie binden mit hoher Affinität VEGFA und stimulieren über die Signalwege PI3K/Akt, Phospholipase C- γ und Raf/MEK/ERK die Zellmigration, das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen [195]. Erhöhte VEGFR-Expressionen wurden in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, beispielsweise in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen, CLL, ALL und AML detektiert [196-200]. Demzufolge ist eine Hemmung von pAkt über die Blockierung von VEGFR in ALL-Zellen sehr wahrscheinlich.

Ebenso ist eine Hemmung von FLT3 durch Sorafenib in ALL-Zellen möglich. Der FLT3-Rezeptor wird hauptsächlich auf frühen myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen sowie auf leukämischen Blasten von Patienten mit akuter lymphatischer oder akuter myeloischer Leukämie exprimiert. Im *FLT3*-Gen sind zwei Mutationen bekannt, die zu einer Ligand-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors führen und die Signalkaskaden PI3K und Ras aktivieren [201]. Die *internal tandem duplication* (ITD)-Mutation in der Juxtamembrandomäne des Rezeptors stellt die häufigste Mutation dar und ist bei etwa 25 % der AML-Patienten und etwa 1 % der ALL-Patienten nachweisbar. Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors werden oft bei Patienten mit einem hyperdiploiden Chromosomensatz sowie bei MLL-Aberrationen beobachtet und sind häufiger in ALL-Patienten [202]. Die B-Vorläufer-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 tragen das MLL-AF4-Fusionsgen, so dass eine dysregulierte FLT3-Aktivierung möglich wäre. Ebenso konnten Chen et al. zeigen, dass eine Behandlung mit dem spezifischen FLT3-Inhibitor GTP14564 die Aktivität von mTOR in FLT3-positiven AML-Zellen negativ beeinflusst. Gleichzeitig beobachteten sie eine geringe Abnahme von pAkt [203]. Auch in der Arbeit von Katsumi et al. wurde der Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg nach einer FLT3-Inhibition untersucht. Eine Behandlung mit dem spezifischen FLT3-Inhibitor FI-700 führte ebenfalls zur Dephosphorylierung des Akt-Proteins in FLT3-positiven AML-Zellen [204].

4.4 Differentielle Genexpression durch Sorafenib

Nach 24-stündiger Inkubation mit Sorafenib wurde ein gemeinsames Genexpressionsprofil von den ALL-Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat erstellt. Hierbei zeigte sich, dass zu den aktivierten Genen verschiedene Transkriptionsfaktoren (*ATF5*, *ATF3*, *CEBPB* und *CEBPG*) und zahlreiche Histonclustergene gehörten. Transkriptionsfaktoren werden oft nach DNA-Schäden aktiviert, um die Expression ihrer Zielgene zu verstärken. Einige Transkriptionsfaktoren können in bestimmten Fällen auch als Transkriptionsrepressor fungieren und das Ablesen der mRNA unterdrücken. Durch Stressbedingungen in der Zelle, beispielsweise DNA-Schädigung, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, wird die Prozessierung von Proteinen unterbrochen, so dass im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine akkumulieren. Dieser Prozess wird auch als ER-Stress bezeichnet und führt zur Aktivierung eines Signalsystems, das als *unfolded protein response* (UPR) bezeichnet wird [205]. Hierbei kommt es zur Synthese spezifischer Proteine, die den Abbau fehlgefalteter Proteine beschleunigen, um die Homöostase des ER wiederherzustellen [206]. Gleichzeitig wird dabei die globale Proteinsynthese in der Zelle unterdrückt [206]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass verschiedene zelluläre Stressbedingungen auch die Expression von *ATF5* verstärken [207]. Darüber hinaus kann ein ständiger ER-Stress zur Aktivierung des Caspase-Systems führen und Apoptose induzieren [208].

Neben der verstärkten *ATF5*-Expression konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Sorafenib die Expression von *DDIT3*, *CEBPB* und *ASNS* erhöhte. Diese Gene sind Zielgene der Transkriptionsfaktoren ATF4 und ATF5, die während der UPR induziert werden [209, 206].

TRIB3 ist ebenfalls ein ER-Stress induzierbares Gen und interagiert mit ATF4 und DDIT3 (CHOP) [210]. So wurde beobachtet, dass eine Überexpression von CHOP die Expression der *TRIB3*-mRNA erhöhte [211]. *TRIB3* wird auch als Pseudokinaseinhibitor von Akt bezeichnet, da es direkt an Akt bindet und die Kinaseaktivität von Akt blockiert [212]. Ebenso konnten Bromati et al. nachweisen, dass die Expression von *TRIB3* mit einer verminderten Akt-Phosphorylierung korreliert [213].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass Sorafenib die *ATF5*-mRNA-Expression sowie die Expression verschiedene Zielgene, die mit der UPR assoziiert werden, in den ALL-Zellen erhöhte. Bisher wurden nur wenige Arbeiten publiziert, in denen berichtet wird, dass nach einer Inhibierung der Ras/MEK/ERK- oder PI3K/Akt-Signalkaskade das ER-Stress-Signalsystem in der Zelle angeschaltet wird [214, 215]. In einer Studie von Zhang et al. wurde gezeigt, dass der Eintritt in die Apoptose durch eine Inhibition von MEK in Magenkarzinomzellen über den ER-Stress gesteuert wurde. Dai et al. haben den Einfluss von Langzeit-ER-Stress auf die Auswirkungen des PI3K/Akt- und MEK/ERK-Signalweges analysiert. In ihren Untersuchungen konnten sie zeigen, dass ein langfristiger ER-Stress zur Akt-Inaktivierung führte und mit einem Zellzyklusarrest verbunden war. Gleichzeitig beobachteten sie dabei eine ERK-Phosphorylierung, die von den Zellen als Schutzmechanismus genutzt werden könnte, um sich an Stresssituationen anzupassen [214].

In einer aktuellen Arbeit von Ghosh et al. konnte gezeigt werden, dass ER-Stress in Prostata- und Leberzellkarzinom-Zellen mit einer Aktivierung der *VEGFA*-Expression verbunden war. In ihren

Untersuchungen stellten sie fest, dass die *VEGFA*-Transkription unabhängig von dem Transkriptionsfaktor HIF1 α erfolgte, aber durch die ER-Stress-Regulatoren IRE1 α , PERK, und ATF6 eingeleitet wurde [216]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein Anstieg der *VEGFA*-mRNA-Expression nachgewiesen, jedoch war diese hier nicht mit einer erhöhten *VEGFA*-Proteinexpression verbunden, wie sie in der Arbeit von Ghosh et al. beschrieben wurde [216]. So wurde in den Proteinlysaten der ALL-Zellen nach einer Behandlung mit Sorafenib eine starke *VEGFA*-Reduktion detektiert. Dagegen wurde in den Zellkulturüberständen der behandelten Jurkat-Zellen ein Anstieg der *VEGFA*-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. In den B-ALL-Zelllinien hat sich die *VEGFA*-Sekretion nicht verändert. Bisher haben verschiedene Arbeiten gezeigt, dass eine erhöhte *VEGFA*-Expression mit einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges korreliert [217, 218]. Ebenso wurde von Tang et al. nachgewiesen, dass eine PI3K-Hemmung mit Ly294002 in Mammakarzinom-Zellen zur Reduktion von VEGF führte [219]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In den Zelllinien SEM und RS4;11 war die verminderte Akt-Phosphorylierung nach einer Behandlung mit Sorafenib ebenfalls mit einer Abnahme des *VEGFA*-Proteins verbunden. Dagegen wurde in den Jurkat-Zellen nur eine schwache Akt-Hemmung nachgewiesen und ein Anstieg der *VEGFA*-Konzentration im Zellkulturüberstand detektiert.

Häufig ist ER-Stress mit oxidativen Stress und der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verbunden. FoxO-Transkriptionsfaktoren werden durch oxidativen Stress aktiviert und induzieren die Expression von Genen, die an DNA-Reparaturmechanismen (*GADD45*), an der Entgiftung von ROS (*FeSOD*, *MnSOD* und *Katalase*) und am Zellzyklusarrest beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierung von FoxO3A durch eine Behandlung mit Sorafenib reduzierte und somit die Aktivität des Transkriptionsfaktors induziert wurde.

ATF3 ist ein weiteres Gen, das durch die Behandlung mit Sorafenib aktiviert wurde. Das Gen kodiert für ein Transkriptionsfaktor, der nach Schädigung der DNA vermehrt abgelesen wird. Die Funktion von *ATF3* wird bisher kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass ein Anstieg der *ATF3*-Expression zur Proliferationshemmung führt und mit der Induktion von Apoptose verbunden ist [220,221]. Andererseits wurde berichtet, dass *ATF3* das Wachstum von Tumorzellen stimuliert und eine antiapoptotische Wirkung hat [222, 223]. Des Weiteren konnte in einem *ATF3*-transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass *ATF3* als Onkogen fungiert und zur Entwicklung von Mammakarzinomen führt [224]. In einer aktuellen Studie von Yan et al. wurde berichtet, dass die *ATF3*-Expression mit der Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalweges korreliert. Anhand ihrer Untersuchungen stellten sie fest, dass eine *ATF3*-Überexpression in Mammakarzinom-Zellen der Maus zum Anstieg der Wnt-Liganden Wnt3, Wnt3a, Wnt5 und Wnt7a führte und mit einer vermehrten β -Catenin-Expression im Zellkern verbunden war [225]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Proteinexpression von β -Catenin nach der Behandlung

von Sorafenib untersucht. Die Aktivität des Proteins wird hauptsächlich durch GSK3 β reguliert. GSK3 β ist ein Effektorprotein von Akt, dessen Kinaseaktivität im phosphorylierten Zustand blockiert ist [39]. Eine Behandlung mit Sorafenib führte zur Dephosphorylierung der Kinase und war mit einer Abnahme des β -Catenin-Proteins in SEM-Zellen assoziiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich der β -Catenin-Anteil im Zellkern reduzierte. Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Beobachtungen von Yan et al. [225].

Zu den erhöhten mRNA-Transkripten nach einer 24-stündigen Inkubation mit Sorafenib gehörten auch die Histonclustergene *HIST1H1D*, *HIST1H3F*, *HIST1H2B* und *HIST1H2F*. Dabei kodieren die Gene *HIST1H1D* für das Histon H1.3, *HIST1H3F* und *HIST1H2B* für das Histon H3.1 sowie *HIST1H2F* für das Histon H2B. Histone sind DNA-bindende Proteine, die am Aufbau des Chromatins beteiligt sind und für eine kondensierte Struktur der DNA im Zellkern sorgen. Insgesamt sind fünf verschiedene Histontypen bekannt. Dabei bilden jeweils zwei Moleküle von H2A, H2B, H3 und H4 einen Nukleosomenkern, um den sich die DNA in ca. zwei großen Windungen legt. Das Histon H1 wird auch als Linkerhiston bezeichnet und befindet sich außerhalb des Nukleosomenkerns. Es überdeckt die Ein- und Austrittsstelle der DNA und stabilisiert das Nukleosom [226]. Die Einbindung der DNA in Nukleosome führt zur Repression der Transkription, da Transkriptions- und Initiationsfaktoren nicht an ihre DNA-Erkennungsmotive binden können. Die Konzentration der Histon-mRNA verändert sich während des Zellzyklus und kann zwischen dem Faktor 30-50 variieren [227]. Dabei ist die Histonsynthese fest an die DNA-Replikation gebunden [228]. Während des Zellzyklus wird die Expression der Histon-mRNA über transkriptionale und posttranskriptionale Prozesse reguliert. So wird beim Übergang von der G1- in die S-Phase die Transkriptionsrate der Histone um den Faktor 3-5 erhöht [229]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Sorafenib mit einem G0/G1-Zellzyklusarrest assoziiert war. Unklar ist, warum die Expression einiger Histontranskripte in den behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen erhöht war. Bei einer Proliferationshemmung treten Modifikationen zwischen Protein-Protein- bzw. zwischen Protein-DNA-Interaktionen an den regulatorischen Elementen der Histonpromotoren auf, die zu einer verminderten Histonsynthese führen [230]. Möglicherweise könnte die Behandlung mit Sorafenib diese Interaktionen verändern und eine gesteigerte Transkriptionsaktivität der Histongene einleiten. Da die Histonmenge neben der gesteigerten Transkription auch durch die Stabilität ihrer mRNA bestimmt wird, könnte ebenso eine verlängerte Halbwertszeit der Histon-mRNA für die erhöhten Histontranskripte ursächlich sein. Die Histon prä-mRNA-Moleküle besitzen an ihrem 3' Ende keinen Poly-A-Schwanz, sondern sind durch eine Haarnadelstruktur gekennzeichnet [229]. Diese wird während der S-Phase durch eine Endonuklease abgespalten. Dadurch wird der Abbau der mRNA verhindert und die Halbwertszeit der Histon-mRNA erhöht [227]. Einen essentiellen Regulator, der an der prä-mRNA-Histon-Prozessierung beteiligt ist, stellt das SLBP-Protein (*Stemloop binding protein*) dar [231]. Das Protein wird in der S-Phase etwa 15 mal höher exprimiert als in der G1-Phase und bindet an die Haarnadelstruktur der Histon-prä-mRNA. Am Ende der S-Phase wird das Protein

phosphoryliert und im Proteasom abgebaut [232, 233]. Eine Behandlung mit Sorafenib könnte den Reifungsprozess der prä-mRNA beeinflussen und zur Stabilisierung der Histon-mRNA beitragen. Diese Hypothese wird gestützt durch die Arbeit von Pirngruber und Johnson, die eine veränderte Histon-Prä-mRNA-Prozessierung am 3'-Terminus bei einem G0/G1-Zellzyklusarrest beobachten konnten [234].

Eine Behandlung mit Sorafenib führte ebenfalls zur verminderten Expression von einigen Genen. Wie bereits diskutiert, sind zelluläre Stressbedingungen mit einer reduzierten RNA-Prozessierung und einer verminderten Proteinsynthese verbunden. Demzufolge wurden Gene identifiziert deren Proteine, am Metabolismus (*LDLR*, *INSIG1*, *FADS1*, *GLDC*, *FDFT1*, *ACAT2* und *HMGCR*), an der Transkription (*EGR1*, *MYC*, *UHRF1*, *CBFA2T3*, *CALR* und *ZFP36L2*), an der mRNA-Prozessierung (*SYNCRIP* und *SFR2*), an der Signaltransduktion (*PTPN6* und *TAX1BP3*) sowie am zellulären Stress (*DUSP1*, *HSPA1A*, *HSPA8* und *HSPE1*) beteiligt sind.

Im Folgenden werden die Transkripte *EGR1*, *MYC*, *CBFA2T3* und *ZFP36L2* diskutiert, diese zeigten entweder in SEM und RS4;11 oder nur in den Jurkat-Zellen ein verändertes Genexpressionsprofil nach der Inkubation mit Sorafenib.

Eine starke Reduktion wurde beim *EGR1*-Transkript in den behandelten B-ALL-Zelllinien beobachtet. *EGR1* ist ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung, dem Wachstum und Überleben verschiedener Zelltypen, einschließlich B- und T-Zellen, spielt [235]. Abhängig vom Stimulus und Zelltyp kann *EGR1* sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirken. Zu seinen Zielgenen gehören *PTEN*, *TGF β* , *Fibronectin*, *Cyclin D2*, *c-Myc*, *Bax* und *p53* [236, 237]. Die *EGR1*-Expression ist in verschiedenen Tumoren, beispielsweise im Mammakarzinom und im Glioblastom, reduziert [238-240]. Im Gegensatz dazu scheint in Prostatakarzinomen *EGR1* als Onkogen zu wirken [241, 242]. Die Expression von *EGR1* wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Stress induziert [243, 244]. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *EGR1* positiv durch ERK, JNK und p38MAPK eingeleitet werden kann [245-248]. In peripheren T-Zellen und Thymozyten wird *EGR1* nach der Stimulierung des T-Zellrezeptors in Abhängigkeit von ERK induziert [249]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass *ERG1* in reifen Thymozyten für das Überleben der Zellen erforderlich ist [235, 250]. Darüber hinaus scheint *ERG1* eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von B-Zellen zu spielen. In der Arbeit von Gururajan et al. konnte gezeigt werden, dass doppelt-negative *EGR1*-transgene Mäusen eine reduzierte B-Lymphopoese aufweisen. Im Vergleich zum Wildtyp wurden in den transgenen Mäusen weniger B-Vorläuferzellen im Knochenmark nachgewiesen [251]. In unreifen B-Zell-Lymphomen ist *EGR1* stark exprimiert und steigert das Überleben der Zellen. Eine Inhibition von ERK und JNK reduziert die Expression von *EGR1* und führt zur verminderten Zellproliferation in B-Zell-Lymphomen [247]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Eine Behandlung mit Sorafenib führte ebenfalls zur Abnahme der *EGR1*-Transkripte in den Zelllinien SEM und RS4;11. Unbehandelte Jurkat-Zellen zeigen keine

Aktivierung von ERK, demzufolge wurde durch Sorafenib die *EGR1*-Expression in Jurkat-Zellen nicht verändert.

Des Weiteren wurde in den RNA-Lysaten der behandelten Jurkat-Zellen eine verminderte *MYC*-Expression nachgewiesen. Der Transkriptionsfaktor reguliert die Synthese zahlreicher Gene, die an der Proliferation, am Wachstum, an der Differenzierung und an der Apoptose beteiligt sind [252]. Ebenso wird ihm eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Ribosomenbiogenese und der Proteinsynthese zugeschrieben [253]. Die Expression von *MYC* wird über den Transkriptionsfaktor Notch1 eingeleitet [254]. Dieser ist in über 50 % der T-ALL-Zellen dereguliert und beeinflusst negativ die Differenzierung von T-Zellen [86]. So wurde auch in den Jurkat-Zellen eine aberrante Aktivierung von Notch1 durch eine interne Tandemduplikation von 47 bp im Exon 28 nachgewiesen [86]. In B-ALL-Zellen wurden bisher keine Mutationen im *Notch1*-Gen identifiziert. Eine Behandlung mit Sorafenib könnte die Notch1-Aktivität negativ durch eine Hemmung von PI3K/Akt beeinflussen und ursächlich für eine verminderte *MYC*-Expression sein. Eine Interaktion zwischen Notch1 und dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wurde in einer Studie von Ma et al. beschrieben. In ihrer Arbeit konnten sie zeigen, dass die mTOR-Aktivität positiv mit der Notch1-Aktivität korreliert [255]. Wang et al. haben ebenfalls von einer Verbindung zwischen dem Notch- und dem PI3K/Akt-Signalweg berichtet [256].

Eine weitere Gruppe von Genen, die nach 24-stündiger Sorafenib-Inkubation vermindert exprimiert wurden, stellten die Transkripte der Hitzeschockproteine *HSPA1A*, *HSPA8* und *HSPE1* dar. Dabei kodieren die Gene *HSPA1A* und *HSPA8* für die Hitzeschockproteine HSP70 und das *HSPE1* für das Hitzeschockprotein HSP10. Hitzeschockproteine gehören zu einer großen Proteinfamilie und sind wichtige Komponenten des Chaperonsystems. Sie unterstützen die Faltung von Proteinen und verhindern die Denaturierung und Aggregation von Proteinen [257, 258]. Außerdem sind sie am Transport von Proteinen durch zelluläre Membranen beteiligt [259]. Normalerweise werden sie bei Hitze und zellulärem Stress beispielsweise unter Sauerstoff- und Nährstoffmangel synthetisiert, um zelluläre Proteine zu stabilisieren und die Zelle vor Apoptose zu schützen [260]. In Tumorzellen wird häufig eine hohe Expression von Hitzeschockproteinen nachgewiesen [261, 262]. So wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass HSP70 den Apoptoseprozess inhibiert und die Proliferation von Tumorzellen fördert [263-265]. Dabei bindet HSP70 an das Protein APF-1 und verhindert dadurch die Ausbildung des funktionstüchtigen Apoptosomen [265]. Ebenso wurde beschrieben, dass HSP70 die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 blockiert [264]. Mitglieder der HSP70- und HSP90-Familie können temporär auch mit verschiedenen Schlüssel molekülen des Zellzyklus-Kontrollsystems, beispielsweise mit p53, CDK4, c-Myc, pRB und p27Kip1, interagieren [266]. Ebenso wurde von einer Interaktion mit verschiedenen Kinasen, beispielsweise mit Raf- und MAP-Kinasen, berichtet [267]. Oft ist eine erhöhte Hitzeschockproteinsynthese mit einer hohen Expression des Onkogens *c-Myc* verbunden [268, 269]. Die Synthese der Hitzeschockproteine wird durch die Transkriptionsfaktoren der Hitzeschock-Faktorprotein-Familie eingeleitet [260]. Während HSP90 konstitutiv in der Zelle

exprimiert wird, um die Faltung neu synthetisierter Proteine zu gewährleisten, wird die Transkription von HSP70 und HSP27 insbesondere bei Stresssituationen aktiviert [270]. In einer Studie von Yeh et al. wurden im Plasma von Patienten mit akuten Leukämien im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte HSP70-Konzentrationen detektiert. Hierbei wurde nachgewiesen, dass sowohl AML- als auch ALL-Patienten mit sehr hohen HSP70-Konzentrationen ein signifikant verkürztes Überleben aufweisen im Vergleich zu Patienten mit geringeren HSP70-Plasmakonzentrationen [271]. Zhou et al. konnten zeigen, dass eine Blockierung der PI3K-Aktivität mit Ly294002 in Nierenkarziomzellen zu einer reduzierten Expression von *HSP70* und *HSP90* führte [272]. Auch eine Hemmung von ERK in Hepatozyten war mit einer verminderten Expression von *HSP70* verbunden [273]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Ebenso wurde nachgewiesen, dass eine hohe Hitzeschockprotein-Expression mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verbunden ist [274, 275]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Sorafenib die Synthese von verschiedenen Hitzeschockproteinen reduzierte. Somit könnte eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verhindert bzw. möglicherweise sogar aufgehoben werden. Ferner wären auch erhöhte antiproliferative Effekte durch eine Kombination von Sorafenib mit Zytostatika denkbar.

In den behandelten Jurkat-Zellen wurde die Synthese eines weiteren Transkriptes reduziert. CBFA2T3 ist ein transkriptionelles regulatorisches Protein und gehört neben CBFA2T1 und CBFA2T2 zur ETO-Familie. Diese Proteine unterdrücken die Expression von Genen, in dem sie nicht direkt an die DNA, sondern an Transkriptionsfaktoren wie z.B. BCL6, PLZF, Gfi-1 und ZNF652 binden [276]. Interessanterweise sind alle identifizierten Bindungspartner von CBFA2T3 mit der Tumorgenese assoziiert. So führt die Interaktion zwischen CBFA2T3 und ZNF652 zur Blockierung von Genen, die eine Rolle bei der Onkogenese von Brustkrebs spielen [277]. Das BCL6 (*B-cell lymphoma 6 protein*)-Protein ist häufig bei diffusen großzelligen Lymphomen mutiert [278]. Ebenso führt die Translokation t(11;17), bei der der Genlocus von PLZF beteiligt ist, zu einer Promyelozytenleukämie [279]. Das Zinkfingerprotein Gfi-1 (*Growth factor independence 1*) ist neben der Entwicklung von neuroendokrinen Zellen, sensorischen Neuronen, auch an der Differenzierung von B- und T-Zellen beteiligt [280]. Zudem belegen einige Studien, dass CBFA2T3 die Zellproliferation und Differenzierung während der Erythropoese koordiniert [281, 282]. Inwiefern eine Verbindung von CBFA2T3 und Gfi-1 die Lymphopoese beeinflusst, ist gegenwärtig noch unklar.

Des Weiteren wurde eine 2,3-fache Reduktion des *ZFP36L2*-Transkriptes nach der Behandlung mit Sorafenib in den Jurkat-Zellen detektiert. Das Gen kodiert für das Zinkfingerprotein TIS11D und gehört zur TIS11-Proteinfamilie, bestehend aus TIS11, TIS11B und TIS11D. Die Mitglieder dieser Familie binden an Adenin- und Uridin-reichen Sequenzen (ARE) der mRNA und verhindern die Expression ihrer Zielproteine, indem sie die Translation hemmen oder den Abbau der mRNA

fördern [283]. ARE-Sequenzen befinden sich am 3`Ende einiger mRNA-Moleküle, die für Zytokine, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklus- und Apoptoseregulatoren kodieren [284]. Die Expression von TIS11 ist abhängig vom Zelltyp und der Art des Stimulus und kann beispielsweise durch LPS, GM-CSF und TGF- β induziert werden [285, 286]. Ebenso wurde festgestellt, dass eine Behandlung mit Glucocorticoiden zu einer Erhöhung der TSC11-Expression führte und mit dem Abbau von proinflammatorischen Zytokinen verbunden war [287, 288]. In einer Arbeit von King et al. konnte gezeigt werden, dass die Expression und Phosphorylierung von TSC11 abhängig von der Aktivität der p38MAPK war. So wurde nach der Inkubation mit dem p38MAPK-Inhibitor SB203580 eine verminderte TSC11 Expression und Phosphorylierung detektiert [288]. Im Gegensatz dazu führte eine mTOR-Inhibition mit Rapamycin zum Anstieg des TSC11-Proteins in Astrozyten [289].

Zur Expression von TSC11 in Tumoren sind in der Literatur gegensätzliche Angaben publiziert. So wurde gezeigt, dass TSC11 in einer Vielzahl von humanen Tumorzelllinien verstärkt exprimiert wird [290]. Andere Arbeiten berichteten, dass TSC11 als Tumorsuppressor fungiert und in einigen Tumoren in reduzierter Form vorliegt [291-293]. Eine verminderte TSC11-Expression ist beispielsweise in Brustkrebspatienten mit einer schlechten Prognose assoziiert [291]. In einer Studie von Hodson et al. konnte gezeigt werden, dass *ZFP36L1* und *ZFP36L2* doppelt-Knockout-Mäuse eine T-ALL durch die Aktivierung von Notch1 entwickeln [294]. Offenbar wird die Expression von Notch1 durch die beiden RNA-bindenden Proteine reguliert. Durch eine Analyse des *Notch1*-Gens identifizierte die Forschungsgruppe ARE-Bindungsstellen und konnte mit Hilfe eines Luciferase-Assays eine Interaktion von ZFP36L1 (TIS11B) und ZFP36L2 (TIS11D) mit Notch1 bestätigen [294]. In der vorliegenden Arbeit war eine verminderte Expression von *ZFP36L2* mit dem Absterben der T-ALL-Zelllinie Jurkat verbunden. Weiterführende Untersuchungen sind nötig, um zu klären, ob die *ZFP36L2*-Reduktion als Schutzmechanismus fungiert, um das Überleben der T-ALL-Zellen zu steigern.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals die Veränderung der Genexpression nach einer Sorafenibbehandlung in B- und T-ALL-Zellen. Die ermittelten Daten liefern Hinweise, inwiefern die Genexpression durch Sorafenib beeinflusst wird. Jedoch ist eine Interpretation der Daten schwierig, da nur das Transkriptom untersucht wurde. Ferner können die Ergebnisse als Ausgangspunkt für weiterführende experimentelle Untersuchungen genutzt werden, um ein Modell zur Darstellung der Genregulation nach einer Multikinaseinhibition mit Sorafenib zu entwickeln. Allerdings sind dafür weiterführende Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten notwendig, um die Veränderungen der einzelnen Transkripte besser zu beurteilen. Ebenso sollten die beobachteten Veränderungen auf Proteinebene und mit funktionellen Untersuchungen nachgewiesen werden.

4.5 Wirkung von Kinaseinhibitoren in der Kombination mit Chemotherapeutika

In der Behandlung von Tumorerkrankungen werden Substanzen oft nicht als Einzeltherapie eingesetzt, sondern häufig in der Kombination [295, 296]. Hierbei soll durch die Gabe zweier Medikamente eine Wirkungsverstärkung im Vergleich zu den Einzelwirkungen der Medikamente erzeugt werden. Dabei ist das Ziel, die Dosis der Zytostatika möglichst gering zu halten, um einerseits Nebenwirkungen während der Therapie zu reduzieren und andererseits verschiedene zytostatische Ansätze zu nutzen. Hierbei ist die Sequenz der Gaben vom Wirkmechanismus der Zytostatika abhängig. Für BEZ235 sind diesbezüglich noch keine Daten verfügbar, die die bestmögliche Positionierung in der Sequenz festlegen.

In dieser Arbeit wurde erstmalig in präklinischen Untersuchungen die sequenzielle Gabe von BEZ235 bzw. Sorafenib mit verschiedenen Zytostatika an B- und T-ALL-Zellen durchgeführt. Es wurde angenommen, dass eine Vorbehandlung mit AraC den wachstumshemmenden Effekt der Inhibitoren verstärkt. Das Zytostatikum AraC wird nach seiner Phosphorylierung an Stelle des Cytosintriphosphates als falscher Baustein in die DNA eingebaut. Dieser Prozess ist an die DNA-Replikation gekoppelt und erfolgt während der S-Phase im Zellzyklus. Demzufolge sind Zellen, die sich im Ruhezustand befinden relativ unempfindlich gegenüber AraC [297]. Für Doxorubicin sind verschiedene Wirkmechanismen beschrieben, die zur Hemmung der Zellproliferation führen. Zum einen interkaliert das Antracyclin zwischen Basenpaare der DNA/RNA und hemmt dadurch die Replikation und Transkription. Außerdem bindet Doxorubicin an die Topoisomerase II und verursacht Doppel- und Einzelstrang-DNA Brüche [298].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Kombinationsansätze eine synergistische Wirkung aufwiesen. Jedoch wurden keine signifikante Unterschiede zwischen der sequentiellen und simultanen Gabe der Substanzen beobachtet. In der Kombination mit BEZ235 und AraC scheint eine Vorbehandlung mit AraC oder die gleichzeitige Applikation beider Substanzen sich nur in den Zelllinien SEM und Jurkat als vorteilhaft zu erweisen. Hier war die Proliferationshemmung etwas stärker im Vergleich zu einer vorzeitigen BEZ235-Gabe. Jedoch wurden diese Beobachtungen nicht bei der Kombination mit Sorafenib und AraC gemacht. Am stärksten reduzierte sich die Proliferation bei der simultanen Applikation beider Substanzen in der Zelllinie SEM. Ebenso konnte bei SEM, RS4;11 und Jurkat beobachtet werden, dass weniger vitale Zellen bei einer 24-stündigen Vorbehandlung mit Sorafenib nachweisbar waren, als wenn AraC 24 h vor dem Sorafenib appliziert wurde.

Dagegen wurden bei der Kombination mit Doxorubicin und BEZ235 bzw. Sorafenib ähnliche Effekte beobachtet. Eine simultane Applikation von Doxorubicin mit den Inhibitoren BEZ235 bzw. Sorafenib scheint die Proliferation in den Zelllinien SEM, RS4;11 und Jurkat stärker zu beeinflussen, als eine 24-stündige Vorinkubation mit Doxorubicin.

Die Kombination BEZ235 mit AraC oder Doxorubicin wurde auch in anderen präklinischen Studien untersucht. Die beobachteten synergistischen Effekte der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien [111, 177, 299]. Die Arbeitsgruppe von Chiarini et al.

inkubierte die T-ALL-Zelllinien Jurkat, MOLT4 und RPMI-8402 mit verschiedenen BEZ235- und AraC-Konzentrationen zwischen 12,5 und 800 nM für 24 h. In ihren Untersuchungen konnten sie ebenfalls zeigen, dass die Zellen eine synergistische Wirkung aufwiesen [177]. In der Studie von Baumann et al. wurden Multiple Myelom-Zellen mit BEZ235 und Doxorubicin behandelt und additive Effekte nachgewiesen. Dabei applizierten sie die Substanzen nicht simultan, sondern inkubierten die Zellen mit BEZ235 bereits 1 h vor der Doxorubicin Gabe [111]. Jedoch führten sie keinen Vergleich zwischen der simultanen und sequentiellen Gabe beider Substanzen durch.

In verschiedenen klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Sorafenib mit Zytostatika erfolgreich als Kombinationstherapie angewendet wurde. Zu den Studiengruppen zählten Patienten, die am Myelom, nichtkleinzelligem Lungenkarziom, Leberzellkarzinom und Magenkarzinom erkrankt waren [300-304]. Ebenso wurde Sorafenib in einer Phase I/II Studie in der Kombination mit Idarubicin und AraC an 61 AML-Patienten untersucht, die entweder ein Rezidiv entwickelten oder unempfindlich auf die initiale Induktionschemotherapie reagierten [305]. In der Phase I-Studie erhielten die Patienten zunächst intravenöse Gaben des AraCs (1,5 g/m² kontinuierlich über 4 Tage) und des Idarubicins (12 mg/m² einmal täglich für 1 h über 3 Tage), bevor die Therapie mit Sorafenib begonnen wurde. Patienten, die eine komplette Remission erreichten, bekamen im Anschluss im Abstand von 4-6 Wochen fünf Therapiezyklen mit AraC (0,75 g/m² kontinuierlich über 3 Tage), Idarubicin (8 mg/m² einmal täglich für 1 h über 2 Tage) und Sorafenib (zweimal täglich 400 mg) für 28 Tage. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass etwa 75 % der Patienten eine komplette Remission erreichten. Dabei zeigten Patienten mit *FLT3*-Mutationen ein besseres Therapieansprechen als Patienten ohne genetische Veränderungen im *FLT3*-Gen. Insgesamt lag die Überlebenswahrscheinlichkeit der behandelten Patienten nach einem Jahr bei 74 % [305]. Größere Studien an AML-Patienten werden gegenwärtig durchgeführt, in denen Sorafenib als Monotherapie und in der Kombination mit verschiedenen Zytostatika untersucht wird.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht abschließend klären, welche Applikationsform am besten für eine Therapie geeignet ist, da bei den Zelllinien unterschiedliche Wirkungen beobachtet wurden. Die Annahme, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit BEZ235 bzw. Sorafenib zum Zellzyklusarrest führt und die Wirkung von AraC vermindert, konnte nicht bestätigt werden. Ebenso wurde kein Applikationszeitpunkt für Doxorubicin gefunden, bei dem eine Wirkungssteigerung in der Kombination mit BEZ235 bzw. Sorafenib erfolgte. Ein Applikationsregime zwischen Kinaseinhibitoren und Zytostatika wurde bisher nur in wenigen präklinischen Studien untersucht. Levis et al. analysierten die Kombination zwischen AraC und dem *FLT3*-Inhibitor CEP-701 an AML-Zellen und konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit dem Zytostatikum zur Wirkungssteigerung führte. Dagegen wurden durch eine Vorbehandlung mit dem *FLT3*-Inhibitor antagonistische Effekte in den Zellen beobachtet [306]. Ebenso erklärten Zhou et al., dass Chemotherapien weniger wirksam sind, wenn sich die

Zellen nach einer Behandlung mit Inhibitoren im Ruhezustand befinden [307]. Im Gegensatz dazu zeigten Janus et al., dass die apoptotische Wirkung in Rapamcylin vorbehandelten AML-Zellen erhöht wird, wenn AraC 24 h später appliziert wurde [308]. Untersuchungen in T-Zell Lymphomen ergaben, dass eine simultane Behandlung mit RAD001 und Doxorubicin sowie eine Vorbehandlung mit Doxorubicin, synergistische Wirkungen aufwies. Dagegen stellte sich in der gleichen Arbeit eine verzögerte Gabe von Doxorubicin nach RAD001 als antagonistisch heraus [309].

Zusätzlich wurde die Kombination zwischen Dexamethason und BEZ235 bzw. Sorafenib in B- und T-ALL-Zellen untersucht. Dexamethason gehört zur Wirkstoffklasse der Glucocorticoide und wird gewöhnlich mit Zytostatika in der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen kombiniert. Bei refraktären bzw. rezidivierenden Leukämien werden häufig Resistenzen gegenüber Glucocorticoide beobachtet. Die Entwicklung dieser Resistenzen ist bisher kaum erforscht und unterscheidet sich vom Zelltyp und den genetischen Veränderungen in der Zelle [310-313]. Glucocorticoide vermitteln ihre Effekte, indem sie an den Glucocorticoidrezeptor (GR) im Zytoplasma binden. Nach der Aktivierung wird der Rezeptor in den Zellkern transportiert und bindet an spezifische DNA-Sequenzen (GREs, *Glucocorticoid response elements*), wobei er die Transkription von einer Vielzahl von Genen einleiten oder unterdrücken kann [314]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die γ -Isoform des Rezeptors mit der Glucocorticoid- Resistenz in der ALL korreliert und mit einer verminderten Expression verbunden war [315, 316]. Ebenso wird in Glucocorticoid-resistenten Zellen häufig ein fehlregulierter Apoptoseprozess beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des Mcl-1-Proteins mit einer Prednisolon-Resistenz in primären ALL-Zellen assoziiert war [317, 318]. Ebenso wurde beobachtet, dass das BCL-2-Protein Bim eine bedeutende Rolle bei der Therapie mit Glucocorticoiden spielt. Verschiedene Genexpressionsanalysen haben belegt, dass eine Glucocorticoid-Behandlung mit einer erhöhten Bim-Expression assoziiert ist [319,320]. Dagegen zeigten Patienten mit einem schlechteren Therapieansprechen eine verminderte Bim-Expression [321]. In einem ALL-Dexamethason-resistenten Xenograft-Mausmodell konnte die Arbeitsgruppe um Bachmann et al. demonstrieren, dass die Induktion der Bim-Expression nach einer Behandlung mit Dexamethason ausblieb [322]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der proapoptotischen Proteine Puma oder Bim zur Resistenz gegenüber Glucocorticoiden in lymphatischen Zellen führte [323]. Auch eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kann die Glucocorticoid-Resistenz begünstigen. Akt reguliert durch Phosphorylierung zahlreiche Proteine, die am Apoptoseprozess beteiligt sind. Bornhäuser et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung mit niedrig-dosiertem Arsenitrioxid (ATO) die Aktivität von Akt blockiert und Dexamethason-resistente Zellen sensibilisierte. Dieser Effekt wurde durch die erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins BAD und einer verminderten Expression des antiapoptotischen Proteins XIAP ausgelöst [324]. Ebenso wurde berichtet, dass in resistenten ALL-Zellen ein höherer

Glucoseverbrauch vorliegt als in Glucocorticoid-empfindlichen ALL-Zellen [325]. Eine Behandlung mit den Glycolyseinhibitoren 2-DG, LND oder 3-BrPa erhöhte die Sensitivität der Glucocorticoid-unempfindlichen Jurkat und MOLT4-Zellen [325]. Der PI3K/Akt-Signalweg ist an der Glycolyse maßgeblich beteiligt und reguliert durch die Expression der Glucosetransporter GLUT1 und GLUT4 die Glucoseaufnahme [326, 327]. Eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges sollte ebenfalls den Glucoseverbrauch der Tumorzellen reduzieren und die Empfindlichkeit Glucocorticoid-resistenter Zellen gegenüber Dexamethason erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Glucocorticoid-resistenten Zelllinien Jurkat und MOLT4 sowie die Glucocorticoid-sensiblen Zelllinien SEM und RS4;11 in der Kombination mit Dexamethason und BEZ235 bzw. Sorafenib untersucht. In anderen Studien wurde beschrieben, dass die T-ALL-Zelllinien Jurkat und MOLT4 gegenüber Dexamethason resistent sind [310, 328]. Diese Beobachtung wurde zunächst bei einer Behandlung mit hohen Dexamethason-Konzentrationen auch in dieser Arbeit bestätigt. Im Vergleich zu den Einzelbehandlungen wurde durch die Gabe von BEZ235 bzw. Sorafenib und Dexamethason erhöhte antiproliferative Effekte in MOLT4 und Jurkat-Zellen induziert. Die simultane Gabe beider Substanzen führte zu einer stärkeren Wachstumshemmung. Eine verzögerte Applikation von Dexamethason zeigte synergistische Effekte, führte aber im Vergleich zur Vorbehandlung mit Dexamethason bzw. bei einer simultanen Gabe beider Substanzen zu einer geringeren Inhibition der Proliferation. Dies lässt vermuten, dass eine Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges ein wichtiger Prozess darstellt, um resistente Zelle empfindlich gegenüber Dexamethason zu machen. Verschiedene Arbeiten haben bereits vorher gezeigt, dass Glucocorticoid-Resistenzen durch eine mTOR-Inhibitionen überwunden werden können [310, 329]. So wurde beobachtet, dass die Gabe von Rapamycin in Glucocorticoid-resistenten Multiple Myelom und T-ALL-Zellen synergistische Effekte induzierte und eine verstärkte apoptosefördernde Wirkung erzeugte [330-332].

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der PI3K/Akt-Signalweg nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation lebensnotwendiger Vorgänge in der Zelle ein und ist auch für die Hämatopoese bedeutsam. Eine Fehlregulation dieser Signalkaskade verändert die Entwicklung und Differenzierung der Blutzellen und kann die Entstehung von Leukämien begünstigen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle des PI3K/Akt-Signalweges in der ALL. Hierbei wurden Schlüsselproteine dieser Signalkaskade sowohl an etablierten ALL-Zelllinien als auch an *de novo* ALL-Zellen analysiert. Ferner wurde in verschiedenen Experimenten die Wirksamkeit der Inhibitoren Ly294002, RAD001, BEZ235 und Sorafenib, welche verschiedene Schlüsselproteine des Signalweges hemmen, geprüft. Dazu wurden das Wachstumsverhalten sowie Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression der ALL-Zellen untersucht. Hierbei konnte demonstriert werden, dass der PI3K/Akt-Signalweg in den ALL-Zelllinien unterschiedlich aktiviert ist. Mindestens eine phosphorylierte Form von Akt wurde in 64,3 % der *de novo* ALL-Proben detektiert.

Versuche mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem dualen PI3K- und mTOR-Inhibitor BEZ235 in den B- und T-ALL-Zellen führten zu vermindertem Zellwachstum und reduzierter Stoffwechselaktivität. Während beide Substanzen über den Beobachtungszeitraum von 48 h eine stabile mTOR-Inhibition aufwiesen, stieg die Akt-Aktivität nach einer Phase der Inhibition wieder an. Hierbei scheinen Rückkopplungsmechanismen innerhalb des Signalweges eine Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib zur vollständigen Akt-Hemmung, welche mit einem deutlichen Anstieg der Apoptose- und Nekroserate sowie einem reduzierten Wachstumsverhalten verbunden war.

Ferner wurde die Genregulation nach 24-stündiger Sorafenib-Behandlung durch die Erstellung eines Genexpressionsprofils analysiert. Hierbei wurden 74 Gene ermittelt, die in mindestens einer Zelllinie eine signifikant erhöhte bzw. verminderte Genexpression zeigten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch Sorafenib verschiedenste zelluläre Prozesse, u.a. der oxidative Stress und die Apoptose, in den ALL-Zellen beeinflusst werden.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmalig die sequenzielle Gabe von BEZ235 bzw. Sorafenib mit verschiedenen Zytostatika an B- und T-ALL Zellen durchgeführt. Hierbei konnte demonstriert werden, dass eine Kombination der Inhibitoren BEZ235 bzw. Sorafenib mit konventionellen Zytostatika (AraC, Doxorubicin bzw. Dexamethason) eine Wirkungsverstärkung bezüglich der Zelltoxizität auslöst. Diese synergistischen Effekte wurden sowohl an Glucocorticoid-sensiblen Zellen als auch an Glucocorticoid-resistenten Zelllinien beobachtet, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gabesequenzen der Substanzen feststellbar war.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges einen sinnvollen und effektiven Ansatz für die Behandlung der ALL-Zellen darstellt.

Inwiefern die Wirksamkeit der verschiedenen Inhibitoren bei ALL-Patienten auch klinisch gegeben ist, sollte nunmehr in Studien untersucht werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte hierbei Patienten mit Resistenzen gegenüber Glucocorticoiden gewährt werden, die bisher in der Regel eine schlechte Prognose haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass diese Patienten von einer PI3K/Akt-Inhibition besonders profitieren könnten.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C. Pathogenese und Biologie der Leukämien. *Internist*. **2002**; 43:1179-89.
- [2] Hoelzer D, Gokbuget N. Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen. *Der Onkologe* **2006**; 12:983-1002.
- [3] Rowe JM. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. **2010**; 150:389-405.
- [4] Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. **2005**; 23:6306-15.
- [5] Teitell MA, Pandolfi PP. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu Rev Pathol*. **2009**; 4:175-98.
- [6] Pui C, Chessells JM, Camitta B, Baruchel A, Biondi A, Boyett JM et al. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. **2003** 17:700-6.
- [7] Harper DP, Aplan PD. Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res*. **2008**; 68:10024-7.
- [8] Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med*. **2009**; 47:1333-41.
- [9] Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Semin Hematol*. **2003**; 40:4-10.
- [10] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. **2003**; 138:819-30.
- [11] Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis*. **2010**; 45:317-23.
- [12] Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig W, Tolle G et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2006**; 108:1151-7.
- [13] Asnafi V, Buzyn A, Le Noir S, Baleyrier F, Simon A, Beldjord K et al. NOTCH1/FBXW7 mutation identifies a large subgroup with favorable outcome in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): a Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (GRAALL) study. *Blood*. **2009**; 113:3918-24.
- [14] Park M, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R et al. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. **2009**; 145:198-206.

- [15] Mansour MR, Sulis ML, Duke V, Foroni L, Jenkinson S, Koo K et al. Prognostic implications of NOTCH1 and FBXW7 mutations in adults with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALLXII/ECOG E2993 protocol. *J Clin Oncol.* **2009**; 27:4352-6.
- [16] Baldus CD, Martus P, Burmeister T, Schwartz S, Gokbuget N, Bloomfield CD et al. Low ERG and BAALC expression identifies a new subgroup of adult acute T-lymphoblastic leukemia with a highly favorable outcome. *J Clin Oncol.* **2007**; 25:3739-45.
- [17] Kuhn A, Gokbuget N, Stroux A, Burmeister T, Neumann M, Heesch S et al. High BAALC expression predicts chemoresistance in adult B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **2010**; 115:3737-44.
- [18] Pui C, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol.* **2011**; 29:551-65.
- [19] Gokbuget N, Hoelzer D. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* **2009**; 46:64-75.
- [20] Lee HJ, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer.* **2011**; 117:1583-94.
- [21] Benekli M, Baumann H, Wetzler M. Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. *J Clin Oncol.* **2009**; 27:4422-32.
- [22] Mullighan CG. Genomic analysis of acute leukemia. *Int J Lab Hematol.* **2009**; 31:384-97.
- [23] Kennedy JA, Barabe F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. *Leukemia.* **2008**; 22:2029-40.
- [24] Camos M, Colomer D. Molecular biology in acute leukemia. *Clin Transl Oncol.* **2006**; 8:550-9.
- [25] Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia.* **2006**; 20:911-28.
- [26] Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood.* **2006**; 108:2358-65.
- [27] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Cappellini A, Ognibene A et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim Biophys Acta.* **2010**; 1803:991-1002.
- [28] Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* **2010**; 95:819-28.

- [29] Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2009**; 114:647-50.
- [30] Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. **2005**; 4:988-1004.
- [31] Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. **2009**; 8:627-44.
- [32] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. **2009**; 9:550-62.
- [33] Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. **2006**; 7:606-19.
- [34] Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci*. **2009**; 34:115-27.
- [35] Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **2001**; 17:615-75.
- [36] Chang JD, Sukhova GK, Libby P, Schvartz E, Lichtenstein AH, Field SJ et al. Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**; 104:8077-82.
- [37] Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M et al. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. **2004**; 118:375-87.
- [38] Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B et al. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. **2000**; 287:1040-6.
- [39] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. **2007**; 129:1261-74.
- [40] Koseoglu S, Lu Z, Kumar C, Kirschmeier P, Zou J. AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. *Cancer Biol Ther*. **2007**; 6:755-62.
- [41] Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2001**; 2:760-8.
- [42] Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, Hemmings BA, Cohen P. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*. **1996**; 399:333-8.
- [43] Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. **2000**; 14:142-6.

- [44] Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. Fox's in development and disease. *Trends Genet.* **2003**; 19:339-44.
- [45] Fu Z, Tindall DJ. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene.* **2008**; 27:2312-9.
- [46] Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV et al. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol.* **2002**; 156:817-28.
- [47] Aoki M, Jiang H, Vogt PK. Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**; 101:13613-7.
- [48] Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* **2005**; 24:7410-25.
- [49] Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* **2000**; 404:782-7.
- [50] Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJPL, Lam EW et al. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol.* **2002**; 22:7842-52.
- [51] Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell.* **2007**; 1:101-12.
- [52] Tothova Z, Gilliland DG. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell.* **2007**; 1:140-52.
- [53] Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA. AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood.* **1997**; 90:3714-9.
- [54] Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics.* **1998**; 47:187-99.
- [55] Sorensen PHB, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* **2002**; 20:2672-9.
- [56] Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med.* **2006**; 355:1345-56.
- [57] Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell.* **2007**; 12:9-22.
- [58] Yang Q, Guan K. Expanding mTOR signaling. *Cell Res.* **2007**; 17:666-81.
- [59] Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* **1990**; 9:2431-8.
- [60] Mai W, Kawakami K, Shakoory A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K et al. Deregulated GSK3beta sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res.* **2009**; 15:6810-9.

- [61] Shakoory A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD et al. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005**; 334:1365-73.
- [62] de Groot RP, Auwerx J, Bourouis M, Sassone-Corsi P. Negative regulation of Jun/AP-1: conserved function of glycogen synthase kinase 3 and the Drosophila kinase shaggy. *Oncogene.* **1993**; 8:841-7.
- [63] Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K et al. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. *J Biol Chem.* **2004**; 279:49571-4.
- [64] Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* **2004**; 23:2116-25.
- [65] Ciani L, Salinas PC. WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci.* **2005**; 6:351-62.
- [66] Ross SE, Erickson RL, Hemati N, MacDougald OA. Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol.* **1999**; 19:8433-41.
- [67] Gotschel F, Kern C, Lang S, Sparna T, Markmann C, Schwager J et al. Inhibition of GSK3 differentially modulates NF-kappaB, CREB, AP-1 and beta-catenin signaling in hepatocytes, but fails to promote TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* **2008**; 314:1351-66.
- [68] Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* **2010**; 35:161-8.
- [69] Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD. Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12:5074-81.
- [70] Ma C, Wang J, Gao Y, Gao T, Chen G, Bower KA et al. The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res.* **2007**; 67:7756-64.
- [71] Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer.* **2000**; 28:443-53.
- [72] Mai W, Miyashita K, Shakoory A, Zhang B, Yu ZW, Takahashi Y et al. Detection of active fraction of glycogen synthase kinase 3beta in cancer cells by nonradioisotopic in vitro kinase assay. *Oncology.* **2006**; 71:297-305.
- [73] Hernandez F, de Barreda EG, Fuster-Matanzo A, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J. The role of GSK3 in Alzheimer disease. *Brain Res Bull.* **2009**; 80:248-50.
- [74] Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* **1996**; 87:619-28.

- [75] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* **1997**; 15:356-62.
- [76] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* **1998**; 273:13375-8.
- [77] Mounir Z, Krishnamoorthy JL, Robertson GP, Scheuner D, Kaufman RJ, Georgescu M et al. Tumor suppression by PTEN requires the activation of the PKR-eIF2 α phosphorylation pathway. *Sci Signal.* **2009**; 2:ra85.
- [78] He J, de la Monte S, Wands JR. The p85 β regulatory subunit of PI3K serves as a substrate for PTEN protein phosphatase activity during insulin mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* **2010**; 397:513-9.
- [79] Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci.* **2008**; 121:249-53.
- [80] Zhang S, Yu D. PI(3)K apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res.* **2010**; 16:4325-30.
- [81] Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP et al. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J Med Genet.* **1998**; 35:881-5.
- [82] Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* **2009**; 4:127-50.
- [83] Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature.* **2006**; 441:518-22.
- [84] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature.* **2006**; 441:475-82.
- [85] Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M et al. PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest.* **2008**; 118:3762-74.
- [86] Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP4, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science.* **2004**; 306:269-71.
- [87] Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med.* **2007**; 13:1203-10.
- [88] Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ et al. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev.* **1999**; 13:786-91.
- [89] Vogt PK, Kang S, Elsliger M, Gymnopoulos M. Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci.* **2007**; 32:342-9.

- [90] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. **2004**; 304:554.
- [91] Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther*. **2004**; 3:772-5.
- [92] Ligresti G, Militello L, Steelman LS, Cavallaro A, Basile F, Nicoletti F et al. PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*. **2009**; 8:1352-8.
- [93] Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. **2007**; 448:439-44.
- [94] Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, Lamba S, Cardone L, Rodolfo M et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene*. **2008**; 27:5648-50.
- [95] Mahmoud IS, Sughayer MA, Mohammad HA, Awidi AS, EL-Khateeb MS, Ismail SI. The transforming mutation E17K/AKT1 is not a major event in B-cell-derived lymphoid leukaemias. *Br J Cancer*. **2008**; 99:488-90.
- [96] Kim MS, Jeong EG, Yoo NJ, Lee SH. Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer*. **2008**; 98:1533-5.
- [97] Clinical trials: PI3K, Akt and mTOR inhibitors (<http://www.clinicaltrials.gov>, abgerufen am 02.08.2011)
- [98] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*. **1994**; 269:5241-8.
- [99] Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF et al. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*. **2007**; 404:15-21.
- [100] Donahue AC, Kharas MG, Fruman DA. Measuring phosphorylated Akt and other phosphoinositide 3-kinase-regulated phosphoproteins in primary lymphocytes. *Methods Enzymol*. **2007**; 434:131-54.
- [101] Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. **2000**; 351:95-105.
- [102] Jacobs MD, Black J, Futer O, Swenson L, Hare B, Fleming M et al. Pim-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. *J Biol Chem*. **2005**; 280:13728-34.
- [103] Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence JCJ, Abraham RT. Direct of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J*. **1996**; 15:5256-67.
- [104] Kong D, Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci*. **2008**; 99:1734-40.
- [105] Houghton PJ. Everolimus. *Clin Cancer Res*. **2010**; 16:1368-72.

- [106] Patel JK, Kobashigawa JA. Everolimus: an immunosuppressive agent in transplantation. *Expert Opin Pharmacother.* **2006**; 7:1347-55.
- [107] Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet.* **2008**; 372:449-56.
- [108] Javle MM, Shroff RT, Xiong H, Varadhachary GA, Fogelman D, Reddy SA et al. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies. *BMC Cancer.* **2010**; 10:368.
- [109] O'Reilly T, McSheehy PM. Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals. *Transl Oncol.* **2010**; 3:65-79.
- [110] Maira S, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C et al. Identification and characterization of NVP-BE2235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* **2008**; 7:1851-63.
- [111] Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BE2235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp Cell Res.* **2009**; 315:485-97.
- [112] Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira S, Garcia-Echeverria C et al. The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**; 106:268-73.
- [113] Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJA, Valero V, Guzman M et al. NVP-BE2235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res.* **2008**; 68:8022-30.
- [114] Cao P, Maira S, Garcia-Echeverria C, Hedley DW. Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BE2235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *Br J Cancer.* **2009**; 100:1267-76.
- [115] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* **2006**; 5:835-44.
- [116] Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM et al. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12:7271-8.
- [117] Simpson D, Keating GM. Sorafenib: in hepatocellular carcinoma. *Drugs.* **2008**; 68:251-8.
- [118] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* **1998**; 31:1-9.
- [119] Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* **1990**; 262:56-61, 64-5.

- [120] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1977**; 74:5463-7.
- [121] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **1976**; 72:248-54.
- [122] Bliss CI. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol*. **1939**; 26:585-615.
- [123] Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, Petti F, McCormack S, Haley JD et al. Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors. *Mol Cancer Ther*. **2006**; 5:2676-84.
- [124] Grimme HL ARBTFMBWaSM. Combined Effects of Environmental Pollutants in Ecotoxicology: Biometrical Models as Concepts for Prediction and their Experimental Proof. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox*. 12:226-234.
- [125] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. **1999**; 96:857-68.
- [126] Calzavara E, Chiaramonte R, Cesana D, Basile A, Sherbet GV, Comi P. Reciprocal regulation of Notch and PI3K/Akt signalling in T-ALL cells in vitro. *J Cell Biochem*. **2008**; 103:1405-12.
- [127] Zhu N, Gu L, Li F, Zhou M. Inhibition of the Akt/survivin pathway synergizes the antileukemia effect of nutlin-3 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol Cancer Ther*. **2008**; 7:1101-9.
- [128] Bertrand FE, Spengeman JD, Shelton JG, McCubrey JA. Inhibition of PI3K, mTOR and MEK signaling pathways promotes rapid apoptosis in B-lineage ALL in the presence of stromal cell support. *Leukemia*. **2005**; 19:98-102.
- [129] Barragan M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campas C, Castano E, Santidrian AF et al. Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase Cbeta. *J Leukoc Biol*. **2006**; 80:1473-9.
- [130] Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Doring C, Tiacci E et al. High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. **2007**; 21:780-7.
- [131] Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res*. **2005**; 65:2047-53.
- [132] Armstrong SA, Mabon ME, Silverman LB, Li A, Gribben JG, Fox EA et al. FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2004**; 103:3544-6.
- [133] Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R et al. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood*. **2004**; 103:1085-8.
- [134] Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, Keller SA, Cesarman E, Liou HC et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood*. **2001**; 98:3050-7.

- [135] Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. **2010**; 463:88-92.
- [136] Suljagic M, Laurenti L, Tarnani M, Alam M, Malek SN, Efremov DG. Reduced expression of the tumor suppressor PHLPP1 enhances the antiapoptotic B-cell receptor signal in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leukemia*. **2010**; 24:2063-71.
- [137] Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong K, Protopopov A et al. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature*. **2007**; 447:966-71.
- [138] Shan X, Czar MJ, Bunnell SC, Liu P, Liu Y, Schwartzberg PL et al. Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol*. **2000**; 20:6945-57.
- [139] Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, Edkins S, Stevens C, O'Meara S et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. **2006**; 5:2606-12.
- [140] Lin WM, Forgacs E, Warshal DP, Yeh IT, Martin JS, Ashfaq R et al. Loss of heterozygosity and mutational analysis of the PTEN/MMAC1 gene in synchronous endometrial and ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res*. **1998**; 4:2577-83.
- [141] Georgescu MM, Kirsch KH, Kaloudis P, Yang H, Pavletich NP, Hanafusa H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res*. **2000**; 60:7033-8.
- [142] Okahara F, Ikawa H, Kanaho Y, Maehama T. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein. *J Biol Chem*. **2004**; 279:45300-3.
- [143] Leslie NR, Batty IH, Maccario H, Davidson L, Downes CP. Understanding PTEN regulation: PIP2, polarity and protein stability. *Oncogene*. **2008**; 27:5464-76.
- [144] Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci*. **2007**; 120:4071-9.
- [145] Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem*. **2001**; 276:48627-30.
- [146] Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*. **2007**; 128:141-56.
- [147] Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. **2007**; 128:157-70.
- [148] Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. **2007**; 128:129-39.
- [149] Malecki MJ, Sanchez-Irizarry C, Mitchell JL, Histen G, Xu ML, Aster JC et al. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol*. **2006**; 26:4642-51.
- [150] Sulis ML, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, Real PJ et al. NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood*. **2008**; 112:733-40.

- [151] Jundt F, Anagnostopoulos I, Forster R, Mathas S, Stein H, Dorken B. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. **2002**; 99:3398-403.
- [152] Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J et al. Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Blood*. **2004**; 104:3697-704.
- [153] Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. **2009**; 113:856-65.
- [154] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, Rodriguez CG, Karnell FG, Carpenter AC et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies. *Blood*. **2005**; 106:3898-906.
- [155] Nefedova Y, Cheng P, Alsina M, Dalton WS, Gabilovich DI. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood*. **2004**; 103:3503-10.
- [156] Hajdu M, Kopper L, Sebestyen A. Notch-regulation upon Dll4-stimulation of TGF β -induced apoptosis and gene expression in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Scand J Immunol*. **2010**; 71:29-37.
- [157] Semba S, Itoh N, Ito M, Harada M, Yamakawa M. The in vitro and in vivo effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. **2002**; 6:1957-63
- [158] Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, Xie Z, Hu W, Milella M et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia*. **2004**; 18:267-75.
- [159] Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropiani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B et al. A selective inhibitor of the p110 δ isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*. **2006**; 25:6648-59.
- [160] Jiang H, Fan D, Zhou G, Li X, Deng H. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res*. **2010**; 29:34.
- [161] Werzowa J, Cejka D, Fuereder T, Dekrout B, Thallinger C, Pehamberger H et al. Suppression of mTOR complex 2-dependent AKT phosphorylation in melanoma cells by combined treatment with rapamycin and LY294002. *British Journal of Dermatology*. **2009**; 160:955-964.
- [162] Grozinsky-Glasberg S, Rubinfeld H, Nordenberg Y, Gorshtein A, Praiss M, Kandler E et al. The rapamycin-derivative RAD001 (everolimus) inhibits cell viability and interacts with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in human medullary thyroid carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol*. **2010**; 315:87-94.

- [163] Crazzolara R, Cisterne A, Thien M, Hewson J, Baraz R, Bradstock KF et al. Potentiating effects of RAD001 (Everolimus) on vincristine therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2009**; 113:3297-306.
- [164] Hansel DE, Platt E, Orloff M, Harwalker J, Sethu S, Hicks JL et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma. *Am J Pathol*. **2010**; 176:3062-72.
- [165] Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A et al. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat*. **2007**; 10:13-29.
- [166] Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. **2007**; 59:419-26.
- [167] Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. **2008**; 10:e19.
- [168] Kress TR, Raabe T, Feller SM. High Erk activity suppresses expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in colorectal cancer cells. *Cell Commun Signal*. **2010**; 8:1.
- [169] Roccaro AM, Sacco A, Hsu EN, Pitsillides C, Vesole S, Azab AK et al. Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. **2010**; 115:559-69.
- [170] Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. **2008**; 118:3065-74.
- [171] Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y et al. Crosstalk Between the PI3K/mTOR and MEK/ERK Pathways Involved in the Maintenance of Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-Like Cells. *Stem Cells*. **2010**.
- [172] Bhatt AP, Bhende PM, Sin S, Roy D, Dittmer DP, Damania B. Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas. *Blood*. **2010**; 115:4455-63.
- [173] Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Willems L, Bardet V, Park S et al. Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies. *Leukemia*. **2010**; 24:1686-99.
- [174] Martin KA, Merenick BL, Ding M, Fetalvero KM, Rzcudlo EM, Kozul CD et al. Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling. *J Biol Chem*. **2007**; 282:36112-20.
- [175] Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood*. **2008**; 111:379-82.

- [176] Bhende PM, Park SI, Lim MS, Dittmer DP, Damania B. The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma. *Leukemia*. **2010**; 24:1781-4.
- [177] Chiarini F, Grimaldi C, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Ognibene A et al. Activity of the novel dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 against T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. **2010**; 70:8097-107.
- [178] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2008**; 9:231-41.
- [179] Zhang W, Konopleva M, Shi Y, McQueen T, Harris D, Ling X et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst*. **2008**; 100:184-98.
- [180] Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, McQueen T, Evans RL, Bornmann WG et al. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia*. **2008**; 22:808-18.
- [181] Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem*. **2005**; 280:35217-27.
- [182] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2008**; 9:47-59.
- [183] Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*. **2005**; 307:1101-4.
- [184] Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)*. **2005**; 41:773-84.
- [185] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. **2004**; 64:7099-109.
- [186] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. **2006**; 66:11851-8.
- [187] Bonelli MA, Fumarola C, Alfieri RR, La Monica S, Cavazzoni A, Galetti M et al. Synergistic activity of letrozole and sorafenib on breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. **2010**.
- [188] Yang F, Brown C, Buettner R, Hedvat M, Starr R, Scuto A et al. Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3. *Mol Cancer Ther*. **2010**; 9:953-62.
- [189] Ulivi P, Arienti C, Amadori D, Fabbri F, Carloni S, Tesei A et al. Role of RAF/MEK/ERK pathway, p-STAT-3 and Mcl-1 in sorafenib activity in human pancreatic cancer cell lines. *J Cell Physiol*. **2009**; 220:214-21.

- [190] Chai H, Luo AZ, Weerasinghe P, Brown RE. Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line. *Int J Clin Exp Pathol.* **2010**; 3:408-15.
- [191] Van Der Heide LP, Hoekman MFM, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* **2004**; 380:297-309.
- [192] Vogt PK, Jiang H, Aoki M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle.* **2005**; 4:908-13.
- [193] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* **1997**; 18:4-25.
- [194] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* **2000**; 95:952-8.
- [195] Ferrara N, Gerber H, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* **2003**; 9:669-76.
- [196] Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases. Biological and clinical studies. *Leuk Lymphoma.* **1995**; 20:27-38.
- [197] Ridell B, Norrby K. Intratumoral microvascular density in malignant lymphomas of B-cell origin. *APMIS.* **2001**; 109:66-72.
- [198] Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* **1997**; 150:815-21.
- [199] Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* **2000**; 95:309-13.
- [200] Lundberg LG, Lerner R, Sundelin P, Rogers R, Folkman J, Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am J Pathol.* **2000**; 157:15-9.
- [201] Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwable J et al. Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res.* **2005**; 65:9643-50.
- [202] Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Meier M, Beverloo HB, Pieters R. D-HPLC analysis of the entire FLT3 gene in MLL rearranged and hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **2007**; 92:1565-8.
- [203] Chen W, Drakos E, Grammatikakis I, Schlette EJ, Li J, Leventaki V et al. mTOR signaling is activated by FLT3 kinase and promotes survival of FLT3-mutated acute myeloid leukemia cells. *Mol Cancer.* **2010**; 9:292.

- [204] Katsumi A, Kiyoi H, Abe A, Tanizaki R, Iwasaki T, Kobayashi M et al. FLT3/ ITD regulates leukaemia cell adhesion through alpha4beta1 integrin and Pyk2 signalling. *Eur J Haematol.* **2011**; 86:191-8.
- [205] Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis.* **2009**.
- [206] Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol.* **2011**; 4:8.
- [207] Zhou D, Palam LR, Jiang L, Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem.* **2008**; 283:7064-73.
- [208] Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis.* **2006**; 11:5-13.
- [209] Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Harris AL. Role of ATF4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle.* **2009**; 8:3838-47.
- [210] Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J.* **2005**; 24:1243-55.
- [211] Shang Y, Zhong M, Zhang L, Guo Z, Wang Z, Zhang Y et al. Tribble 3, a novel oxidized low-density lipoprotein-inducible gene, is induced via the activating transcription factor 4-C/EBP homologous protein pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **2010**; 37:51-5.
- [212] Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, Nogueira TCA, Leonelli M, Caperuto LC et al. UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2011**; 300:R92-100.
- [213] Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science.* **2003**; 300:1574-7.
- [214] Dai R, Chen R, Li H. Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol.* **2009**; 34:1749-57.
- [215] Zhang LJ, Chen S, Wu P, Hu CS, Thorne RF, Luo CM et al. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **2009**; 274:40-6.
- [216] Ghosh R, Lipson KL, Sargent KE, Mercurio AM, Hunt JS, Ron D et al. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. *PLoS One.* **2010**; 5:e9575.
- [217] Zhang L, Yang N, Katsaros D, Huang W, Park J, Fracchioli S et al. The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **2003**; 63:4225-31.

- [218] Jiang B, Liu L. AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. **2008**; 8:19-26.
- [219] Tang Y, Nakada MT, Rafferty P, Laraio J, McCabe FL, Millar H et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer Res*. **2006**; 4:371-7.
- [220] Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan W, Zhao H et al. ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene*. **2002**; 21:7488-96.
- [221] Turchi L, Aberdam E, Mazure N, Pouyssegur J, Deckert M, Kitajima S et al. Hif-2alpha mediates UV-induced apoptosis through a novel ATF3-dependent death pathway. *Cell Death Differ*. **2008**; 15:1472-80.
- [222] Allan AL, Albanese C, Pestell RG, LaMarre J. Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes. *J Biol Chem*. **2001**; 276:27272-80.
- [223] Liu X, Zhang D, Li Y, Xiong J, He D, Lin T et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate upregulates ATF3 expression and suppresses apoptosis in mouse genital tubercle. *J Occup Health*. **2009**; 51:57-63.
- [224] Wang A, Arantes S, Yan L, Kiguchi K, McArthur MJ, Sahin A et al. The transcription factor ATF3 acts as an oncogene in mouse mammary tumorigenesis. *BMC Cancer*. **2008**; 8:268.
- [225] Yan L, Della Coletta L, Powell KL, Shen J, Thames H, Aldaz CM et al. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway in ATF3-induced mammary tumors. *PLoS One*. **2011**; 6:e16515.
- [226] Wolffe AP. Histones, nucleosomes and the roles of chromatin structure in transcriptional control. *Biochem Soc Trans*. **1997**; 25:354-8.
- [227] Osley MA. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem*. **1991**; 60:827-61.
- [228] van der Meijden CMJ, Lapointe DS, Luong MX, Peric-Hupkes D, Cho B, Stein JL et al. Gene profiling of cell cycle progression through S-phase reveals sequential expression of genes required for DNA replication and nucleosome assembly. *Cancer Res*. **2002**; 62:3233-43.
- [229] Marzluff WF, Pandey NB. Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends Biochem Sci*. **1988**; 13:49-52.
- [230] Stein GS, Stein JL, Van Wijnen AJ, Lian JB. Transcriptional control of cell cycle progression: the histone gene is a paradigm for the G1/S phase and proliferation/differentiation transitions. *Cell Biol Int*. **1996**; 20:41-9.
- [231] Dominski Z, Zheng LX, Sanchez R, Marzluff WF. Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Mol Cell Biol*. **1999**; 19:3561-70.

- [232] Whitfield ML, Zheng LX, Baldwin A, Ohta T, Hurt MM, Marzluff WF. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol Cell Biol.* **2000**; 20:4188-98.
- [233] Zheng L, Dominski Z, Yang X, Elms P, Raska CS, Borchers CH et al. Phosphorylation of stem-loop binding protein (SLBP) on two threonines triggers degradation of SLBP, the sole cell cycle-regulated factor required for regulation of histone mRNA processing, at the end of S phase. *Mol Cell Biol.* **2003**; 23:1590-601.
- [234] Pirngruber J, Johnsen SA. Induced G1 cell-cycle arrest controls replication-dependent histone mRNA 3' end processing through p21, NPAT and CDK9. *Oncogene.* **2010**; 29:2853-63.
- [235] Carter JH, Lefebvre JM, Wiest DL, Tourtellotte WG. Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. *J Immunol.* **2007**; 178:6796-805.
- [236] Baron V, Adamson ED, Calogero A, Ragona G, Mercola D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.* **2006**; 13:115-24.
- [237] Gitenay D, Baron VT. Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy? *Future Oncol.* **2009**; 5:993-1003.
- [238] Huang RP, Fan Y, de Belle I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D et al. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer.* **1997**; 72:102-9.
- [239] Liu J, Liu Y, Huang R, Yao C, Li S, Yang W et al. Concurrent down-regulation of Egr-1 and gelsolin in the majority of human breast cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics.* **2007**; 4:377-85.
- [240] Calogero A, Arcella A, De Gregorio G, Porcellini A, Mercola D, Liu C et al. The early growth response gene EGR-1 behaves as a suppressor gene that is down-regulated independent of ARF/Mdm2 but not p53 alterations in fresh human gliomas. *Clin Cancer Res.* **2001**; 7:2788-96.
- [241] Salah Z, Maoz M, Pizov G, Bar-Shavit R. Transcriptional regulation of human protease-activated receptor 1: a role for the early growth response-1 protein in prostate cancer. *Cancer Res.* **2007**; 67:9835-43.
- [242] Adamson E, de Belle I, Mittal S, Wang Y, Hayakawa J, Korkmaz K et al. Egr1 signaling in prostate cancer. *Cancer Biol Ther.* **2003**; 2:617-22.
- [243] McMahon SB, Monroe JG. The role of early growth response gene 1 (egr-1) in regulation of the immune response. *J Leukoc Biol.* **1996**; 60:159-66.
- [244] Stuart JR, Kawai H, Tsai KKC, Chuang EY, Yuan Z. c-Abl regulates early growth response protein (EGR1) in response to oxidative stress. *Oncogene.* **2005**; 24:8085-92.

- [245] Harada S, Smith RM, Smith JA, White MF, Jarett L. Insulin-induced egr-1 and c-fos expression in 32D cells requires insulin receptor, Shc, and mitogen-activated protein kinase, but not insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem.* **1996**; 271:30222-6.
- [246] Allen K, Kim ND, Moon J, Copple BL. Upregulation of early growth response factor-1 by bile acids requires mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2010**; 243:63-7.
- [247] Ke J, Gururajan M, Kumar A, Simmons A, Turcios L, Chelvarajan RL et al. The role of MAPKs in B cell receptor-induced down-regulation of Egr-1 in immature B lymphoma cells. *J Biol Chem.* **2006**; 281:39806-18.
- [248] Rolli-Derkinderen M, Machavoine F, Baraban JM, Grolleau A, Beretta L, Dy M. ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. *J Biol Chem.* **2003**; 278:18859-67.
- [249] McNeil LK, Starr TK, Hogquist KA. A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**; 102:13574-9.
- [250] Schnell FJ, Kersh GJ. Control of recent thymic emigrant survival by positive selection signals and early growth response gene 1. *J Immunol.* **2005**; 175:2270-7.
- [251] Gururajan M, Simmons A, Dasu T, Spear BT, Calulot C, Robertson DA et al. Early growth response genes regulate B cell development, proliferation, and immune response. *J Immunol.* **2008**; 181:4590-602.
- [252] Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol.* **1999**; 19:1-11.
- [253] van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer.* **2010**; 10:301-9.
- [254] Palomero T, Ferrando A. Oncogenic NOTCH1 control of MYC and PI3K: challenges and opportunities for anti-NOTCH1 therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemias and lymphomas. *Clin Cancer Res.* **2008**; 14:5314-7.
- [255] Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q et al. Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest.* **2010**; 120:103-14.
- [256] Wang Z, Li Y, Banerjee S, Kong D, Ahmad A, Nogueira V et al. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem.* **2010**; 109:726-36.
- [257] Burston SG, Clarke AR. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem.* **1995**; 29:125-36.
- [258] Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science.* **1999**; 286:1888-93.

- [259] Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci.* **2003**; 28:541-7.
- [260] Santoro MG. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol.* **2000**; 59:55-63.
- [261] Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst.* **2000**; 92:1564-72.
- [262] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* **2005**; 10:86-103.
- [263] Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* **1998**; 17:6124-34.
- [264] Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* **2000**; 2:469-75.
- [265] Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol.* **2000**; 2:476-83.
- [266] Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* **2000**; 33:341-65.
- [267] Song J, Takeda M, Morimoto RI. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol.* **2001**; 3:276-82.
- [268] Zylicz M, King FW, Wawrzynow A. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO J.* **2001**; 20:4634-8.
- [269] Abd el All H, Rey A, Duvillard P. Expression of heat shock protein 70 and c-myc in cervical carcinoma. *Anticancer Res.* **1998**; 18:1533-6.
- [270] Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol.* **2010**; 2010:214074.
- [271] Yeh C, Tseng R, Hannah A, Estrov Z, Estey E, Kantarjian H et al. Clinical correlation of circulating heat shock protein 70 in acute leukemia. *Leuk Res.* **2010**; 34:605-9.
- [272] Zhou J, Schmid T, Frank R, Brune B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J Biol Chem.* **2004**; 279:13506-13.
- [273] Wigmore SJ, Sangster K, McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Fearon KCH et al. De-repression of heat shock transcription factor-1 in interleukin-6- treated hepatocytes is mediated by downregulation of glycogen synthase kinase 3beta and MAPK/ERK-1. *Int J Mol Med.* **2007**; 19:413-20.
- [274] Vargas-Roig LM, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int J Cancer.* **1998**; 79:468-75.

- [275] Fuqua SA, Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Von Hoff DD, Eckardt J, Osborne CK. Heat shock proteins and drug resistance. *Breast Cancer Res Treat.* **1994**; 32:67-71.
- [276] Hug BA, Lazar MA. ETO interacting proteins. *Oncogene.* **2004**; 23:4270-4.
- [277] Kumar R, Manning J, Spendlove HE, Kremmidiotis G, McKirdy R, Lee J et al. ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription. *Mol Cancer Res.* **2006**; 4:655-65.
- [278] Wagner SD, Ahearne M, Ferrigno PK. The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol.* **2011**; 152:3-12.
- [279] Jansen JH, Lowenberg B. Acute promyelocytic leukemia with a PLZF-RARalpha fusion protein. *Semin Hematol.* **2001**; 38:37-41.
- [280] Kazanjian A, Gross EA, Grimes HL. The growth factor independence-1 transcription factor: new functions and new insights. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2006**; 59:85-97.
- [281] Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, Hamlett I, Guyot B, Iborra FJ et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol.* **2005**; 25:10235-50.
- [282] Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* **2006**; 25:357-66.
- [283] Baou M, Jewell A, Murphy JJ. TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *J Biomed Biotechnol.* **2009**; 2009:634520.
- [284] Bakheet T, Williams BRG, Khabar KSA. ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res.* **2006**; 34:D111-4.
- [285] Fairhurst A, Connolly JE, Hintz KA, Goulding NJ, Rassias AJ, Yeager MP et al. Regulation and localization of endogenous human tristetraprolin. *Arthritis Res Ther.* **2003**; 5:R214-25.
- [286] Varnum BC, Lim RW, Kujubu DA, Luner SJ, Kaufman SE, Greenberger JS et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tetradecanoyl phorbol acetate induce a distinct, restricted subset of primary-response TIS genes in both proliferating and terminally differentiated myeloid cells. *Mol Cell Biol.* **1989**; 9:3580-3.
- [287] Smoak K, Cidlowski JA. Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol Cell Biol.* **2006**; 26:9126-35.
- [288] King EM, Kaur M, Gong W, Rider CF, Holden NS, Newton R. Regulation of tristetraprolin expression by interleukin-1 beta and dexamethasone in human pulmonary epithelial cells: roles for nuclear factor-kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* **2009**; 330:575-85.
- [289] Lisi L, Navarra P, Feinstein DL, Dello Russo C. The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes. *J Neuroinflammation.* **2011**; 8:1.

- [290] Carrick DM, Blackshear PJ. Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines. *Arch Biochem Biophys.* **2007**; 462:278-85.
- [291] Brennan SE, Kuwano Y, Alkharouf N, Blackshear PJ, Gorospe M, Wilson GM. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res.* **2009**; 69:5168-76.
- [292] Al-Souhibani N, Al-Ahmadi W, Hesketh JE, Blackshear PJ, Khabar KSA. The RNA-binding zinc-finger protein tristetraprolin regulates AU-rich mRNAs involved in breast cancer-related processes. *Oncogene.* **2010**; 29:4205-15.
- [293] Lee HH, Son YJ, Lee WH, Park YW, Chae SW, Cho WJ et al. Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int J Cancer.* **2010**; 126:1817-27.
- [294] Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM et al. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol.* **2010**; 11:717-24.
- [295] Zahorowska B, Crowe PJ, Yang J. Combined therapies for cancer: a review of EGFR-targeted monotherapy and combination treatment with other drugs. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2009**; 135:1137-48.
- [296] Tortora G, Bianco R, Daniele G, Ciardiello F, McCubrey JA, Ricciardi MR et al. Overcoming resistance to molecularly targeted anticancer therapies: Rational drug combinations based on EGFR and MAPK inhibition for solid tumours and haematologic malignancies. *Drug Resist Updat.* **2007**; 10:81-100.
- [297] Pallavicini MG. Cytosine arabinoside: molecular, pharmacokinetic and cytokinetic considerations. *Pharmacol Ther.* **1984**; 25:207-38.
- [298] Cortes-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol.* **2007**; 7:56-60.
- [299] McMillin DW, Ooi M, Delmore J, Negri J, Hayden P, Mitsiades N et al. Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res.* **2009**; 69:5835-42.
- [300] Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, Liu G, Tuveson DA, Redlinger M et al. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res.* **2008**; 14:4836-42.
- [301] Scagliotti G, Novello S, von Pawel J, Reck M, Pereira JR, Thomas M et al. Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* **2010**; 28:1835-42.
- [302] Richly H, Schultheis B, Adamietz IA, Kupsch P, Grubert M, Hilger RA et al. Combination of sorafenib and doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results from a phase I extension trial. *Eur J Cancer.* **2009**; 45:579-87.

- [303] Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox JJ, Capanu M, Davidenko I, Lacava J et al. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *JAMA*. **2010**; 304:2154-60.
- [304] Sun W, Powell M, O'Dwyer PJ, Catalano P, Ansari RH, Benson AB3. Phase II study of sorafenib in combination with docetaxel and cisplatin in the treatment of metastatic or advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma: ECOG 5203. *J Clin Oncol*. **2010**; 28:2947-51.
- [305] Ravandi F, Cortes JE, Jones D, Faderl S, Garcia-Manero G, Konopleva MY et al. Phase I/II study of combination therapy with sorafenib, idarubicin, and cytarabine in younger patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. **2010**; 28:1856-62.
- [306] Levis M, Pham R, Smith BD, Small D. In vitro studies of a FLT3 inhibitor combined with chemotherapy: sequence of administration is important to achieve synergistic cytotoxic effects. *Blood*. **2004**; 104:1145-50.
- [307] Zhou J, Pan M, Xie Z, Loh S, Bi C, Tai Y et al. Synergistic antileukemic effects between ABT-869 and chemotherapy involve downregulation of cell cycle-regulated genes and c-Mos-mediated MAPK pathway. *Leukemia*. **2008**; 22:138-46.
- [308] Janus A, Linke A, Cebula B, Robak T, Smolewski P. Rapamycin, the mTOR kinase inhibitor, sensitizes acute myeloid leukemia cells, HL-60 cells, to the cytotoxic effect of arabinoside cytarabine. *Anticancer Drugs*. **2009**; 20:693-701.
- [309] Huang JJ, Li ZM, Huang Y, Huang Y, Tian Y, He XX et al. Schedule-dependent inhibition of T-cell lymphoma cells by cotreatment with the mTOR inhibitor everolimus and anticancer drugs. *Invest New Drugs*. **2010**.
- [310] Garza AS, Miller AL, Johnson BH, Thompson EB. Converting cell lines representing hematological malignancies from glucocorticoid-resistant to glucocorticoid-sensitive: signaling pathway interactions. *Leuk Res*. **2009**; 33:717-27.
- [311] Thompson EB, Johnson BH. Regulation of a distinctive set of genes in glucocorticoid-evoked apoptosis in CEM human lymphoid cells. *Recent Prog Horm Res*. **2003**; 58:175-97.
- [312] Tissing WJE, den Boer ML, Meijerink JPP, Menezes RX, Swagemakers S, van der Spek PJ et al. Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. **2007**; 109:3929-35.
- [313] Herr I, Buchler MW, Mattern J. Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. *Results Probl Cell Differ*. **2009**; 49:191-218.
- [314] Geley S, Fiegl M, Hartmann BL, Kofler R. Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. **1996**; 128:1-97.
- [315] Haarman EG, Kaspers GJL, Pieters R, Rottier MMA, Veerman AJP. Glucocorticoid receptor alpha, beta and gamma expression vs in vitro glucocorticoid resistance in childhood leukemia. *Leukemia*. **2004**; 18:530-7.

- [316] Lauten M, Fernandez-Munoz I, Gerdes K, von Neuhoff N, Welte K, Schlegelberger B et al. Kinetics of the in vivo expression of glucocorticoid receptor splice variants during prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. **2009**; 52:459-63.
- [317] Lugthart S, Cheek MH, den Boer ML, Yang W, Holleman A, Cheng C et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. **2005**; 7:375-86.
- [318] Holleman A, den Boer ML, de Menezes RX, Cheek MH, Cheng C, Kazemier KM et al. The expression of 70 apoptosis genes in relation to lineage, genetic subtype, cellular drug resistance, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2006**; 107:769-76.
- [319] Wang Z, Malone MH, He H, McColl KS, Distelhorst CW. Microarray analysis uncovers the induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim in multiple models of glucocorticoid-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **2003**; 278:23861-7.
- [320] Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmuller C et al. Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2006**; 107:2061-9.
- [321] Bhojwani D, Kang H, Menezes RX, Yang W, Sather H, Moskowitz NP et al. Gene expression signatures predictive of early response and outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study [corrected]. *J Clin Oncol*. **2008**; 26:4376-84.
- [322] Bachmann PS, Gorman R, Papa RA, Bardell JE, Ford J, Kees UR et al. Divergent mechanisms of glucocorticoid resistance in experimental models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. **2007**; 67:4482-90.
- [323] Erlacher M, Michalak EM, Kelly PN, Labi V, Niederegger H, Coultas L et al. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood*. **2005**; 106:4131-8.
- [324] Bornhauser BC, Bonapace L, Lindholm D, Martinez R, Cario G, Schrappe M et al. Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway. *Blood*. **2007**; 110:2084-91.
- [325] Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJC et al. Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*. **2009**; 113:2014-21.
- [326] Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JPJ et al. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*. **1999**; 274:20281-6.
- [327] Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M. Akt mediates insulin induction of glucose uptake and up-regulation of GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *FEBS Lett*. **2001**; 494:225-31.

- [328] Beesley AH, Palmer M, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR et al. Authenticity and drug resistance in a panel of acute lymphoblastic leukaemia cell lines. *Br J Cancer*. **2006**; 95:1537-44.
- [329] Wei G, Twomey D, Lamb J, Schlis K, Agarwal J, Stam RW et al. Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell*. **2006**; 10:331-42.
- [330] Stromberg T, Dimberg A, Hammarberg A, Carlson K, Osterborg A, Nilsson K et al. Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood*. **2004**; 103:3138-47.
- [331] Yan H, Frost P, Shi Y, Hoang B, Sharma S, Fisher M et al. Mechanism by which mammalian target of rapamycin inhibitors sensitize multiple myeloma cells to dexamethasone-induced apoptosis. *Cancer Res*. **2006**; 66:2305-13.
- [332] Gu L, Zhou C, Liu H, Gao J, Li Q, Mu D et al. Rapamycin sensitizes T-ALL cells to dexamethasone-induced apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res*. **2010**; 29:150.

7. Anhang

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure	Roth
2-Propanol	JT Baker
Acrylamidlösung 30 %	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
BEZ235	Novartis
Bromphenolblau	Roth
BSA	Serva
Borsäure	Roth
β -Mercaptoethanol	Merck
Complete-Mini EDTA free	Roche
Cytarabin (AraC)	Cell pharm
Dexamethason	Mibe GmbH
Doxorubicin	Cell pharm
DMSO	Sigma Aldrich
dNTP	Pharmacia Biotech
EDTA	Merck
Ethanol	Zentralapotheke Universität Rostock
Ethidiumbromid	Stratagene
Glycerin	Merck
Ly294002	Cell Signaling
Methanol	Labscan Analytical Sciences
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
NVP-BEZ235	Novartis
PBS, Pulver	Biochrom
PhosSTOP	Roche
Propidiumiodid	Sigma Aldrich
RAD001	Novartis

Salzsäure	Zentralapotheke
	Universität Rostock
SDS	Serva
Sorafenib	Bayer Healthcare
TEMED	Sigma
Tris Base	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau	Sigma

7.1.2 Kits und Fertiglösungen

2 x qPCR Master Mix Plus dNTP	Eurogentec
Annexin-V-PE-Apoptosekit	BD Pharmingen
Biocoll	Biochrom
DNA-Längenstandard, Low Range	Fermentas
Genomic DNA Isolation NucleoBond CB 100	Macherey-Nagel
MinElute PCR Purification	Qiagen
Ponceau S	Serva
Proteinstandard, Kaleidoskope	Biorad
Random-Primer	Invitrogen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rotiphorese NF- Acrylamid/ Bis -Lösung	Roth
Stripping Buffer	Thermo Scientific
Taqman Genexpressionassay für VEGFA	Applied Biosystems
VEGFA-ELISA	Abnova
WST-1-Reagenz	Roche

7.1.3 Nährmedien und Antibiotika

alpha-MEM	Biochrom
HSA	Octapharma
Iscove`s MDM mit L-Glutamin	PAA Laboratories
FKS, hitzeinaktiviert	Gibco
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco
RPMI-Medium-1640	Biochrom

7.1.4 Enzyme

Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech
RNA-free DNase Set	Qiagen
Superscript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen Life Technologies
Superscript Choice System	Invitrogen Life Technologies

7.1.5 Antikörper

Western Blot

Antikörper	Klon	Wirt	Hersteller
p-Akt (Thr308)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p-Akt (Ser473)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Akt	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
P-FoxO3a (Thr32)	polyklonal	Kaninchen	Upstate
FoxO3a	polyklonal	Kaninchen	Upstate
p-p70 S6K(Thr389)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p70 S6K	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p-4EBP1 (Ser65)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p-4EBP1 (Th70)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
4EBP1	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
PTEN	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p-GSK3β (Ser9)	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
GSK3β	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Caspase-3	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Cleaved Caspase-7 (Asp198)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Caspase-7 (Asp198)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Cleaved PARP (Asp214)	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
PARP	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
Cyclin D3	polyklonal	Maus	Cell Signaling
p27 Kip1	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
p15 INK4B	polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling
CDK4	polyklonal	Maus	Cell Signaling
GAPDH	monoklonal	Maus	Invitrogen
anti-Maus	polyklonal	Ziege	Zymed
anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	Cell Signaling

Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
IgG1	FITC	X40	BD Biosciences
IgG1	PE	X40	BD Biosciences
CD2	PE	S5.2	BD Biosciences
CD3	PE	SK7	BD Biosciences
CD5	PE	L17F12	BD Biosciences
CD7	PE	M-T701	BD Biosciences
CD19	FITC	4G7	BD Biosciences
CD34	FITC	8G12	BD Biosciences
CD45	FITC	2D1	BD Biosciences

7.1.6 Geräte und VerbrauchsmaterialienGeräte

ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems
Agarosegelkammer	Biorad
BD FACSCalibur	Becton & Dickinson
Brutschrank, BB6220 Cu	Heraeus Instruments
C 1000 Thermal Cycler	Biorad
Elektro-Blotter, Fastblot B34	Biometra
Elektrophoresekammer Mini-Protean Tetra Cell	Biorad
ELISA Reader, Anthos htIII	Anthos Mikrosysteme
Geldokumentationssystem	Herolab
Heizblock, 2099-DA	Liebisch
Image Station 440	Kodak
Kühlschrank	Liebherr
Kühltruhe, -20 °C	Electrolux
Mikroskop, Eclipse E 600	Nikon
Mikroskop, Eclipse TE 200	Nikon
Multipette	Eppendorf
Nanodrop, ND 100	peQlab
Neubauerzählkammer	Blau Brand
PCR Cycler, PTC 200, Peltier Thermal Cycler	MJ Research
pH-Meter	Mettler Toledo
Schüttler	Heidolph Instruments
Sonoplus Homogenisator	Bandelin

Sterile Werkbank, Herasafe	Heraeus Instruments
Stromversorgungsgerät, Powerpac 300	Biorad
Stromversorgungsgerät, Powerpac 3000	Biorad
Vortexer	Uni EQUIP
Wasserbad	GFL
Zentrifuge, Beckman Avanti 30	Beckman
Zentrifuge, Hettich, Rotina 35 R	Hettich
Zentrifuge, Eppendorf 5418	Eppendorf

Materialien

6- und 24-Lochplatten	Nunc
96-Mikrotiterplatten, steril (für Zellkultur)	Greiner Bio-one
96-Mikrotiterplatten, unsteril (für Proteinbestimmung)	Greiner Bio-one
96-Mikrotiterplatten (für PCR)	Applied Biosystems
Chromatographiepapier, 3MM CW	Whatman
Combitips für Multipette	Eppendorf
Einfrierbox	Nalgene
Einweg-Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-one
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Kryoröhrchen	Nunc
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl 1000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl 1000 µl)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen mit Filter (10 µl, 100 µl 1000 µl)	Biozym
PVDF-Membran	Amersham
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ²)	Nunc

7.1.7 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
0,5 x TBE	0,04 M Tris Base 0,04 M Borsäure 0,5 M EDTA (pH 8)
1 x TBST (pH 8,0)	0,15 M Natriumchlorid 0,01 M Tris Base 0,05 vol % Triton X 100
2 x Probenpuffer	0,01 M SDS 22 vol % Glycerin 0,005 M EDTA (pH 8) 25 vol % Sammelgelpuffer 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Anode I-Puffer	0,03 M Tris Base 20 vol % Methanol
Anode II-Puffer	0,3 M Tris Base 20 vol % Methanol
Elektrophoresepuffer	0,075 M Tris Base 0,5 M Glycin 0,01 M SDS
Kathodenpuffer	0,25 M Tris Base 0,04 M 6-Aminohexansäure 20 vol % Methanol
RIPA-Puffer	0,05 M Tris Hcl (pH 7,4) 0,15 M NaCl 0,1 vol % vol SDS 1 vol % NP40
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M Tris Base 0,01 M SDS
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris Base 0,01 SDS

SDS Polyacrylamidgele

Sammelgel	
Aqua dest.	5,1 ml
Sammelgelpuffer	2,1 ml
Acrylamidlösung 30%	1,0 ml
10 % APS	30 µl
TEMED	10 µl

Trenngel	8 %	15 %
Aqua dest.	4,7 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml
Acrylamidlösung 30%	2,7 ml	5,0 ml
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 16: Angaben zu den verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Typ	Herkunft	Medium	Verdopplungszeit	Zytogenetik
SEM	Vorläufer-B-ALL	PBMC eines 5-jährigen Mädchens im Rezidiv	90 % IMDM + 10 % FKS	30 h	Hypodiploid mit 1,5 % Polyploidie t(4;11)(q21;q23), del(7)(p14)
REH	Vorläufer-B-ALL	PBMC eines 15-jährigen Mädchens	90 % RPMI + 10 % FKS	50-70 h	Pseudodiploid del(3)(p22), t(4;12;21;16)(q32;p13;q22;q24.3), inv(12)(p13q22), t(5;12)(q31-q32;p12), der(16)t(16;21)(q24.3;q22) Seitenlinie mit inv(5), der(5)(p15q31), t(12;21), del(12) Fusionsgen TEL-AML1
RS4;11	Vorläufer-B-ALL	KM einer 32-jährigen Frau im Rezidiv	90 % MEMα + 10 % FKS	50 h	Hyperdiploid t(4;11)(q21;q23), i(7q)
Jurkat	T-ALL	PBMC eines 14-jährigen Mädchens	90 % RPMI + 10 % FKS	25-30 h	Hypotetraploid mit 7,8 % Polyploidie add(2)(p21)/del(2)(p23)x2 Seitenlinie mit der(5)t(5;10)(q11;p15), del(9)(p11)
MOLT4	T-ALL	PBMC eines 19-jährigen Mannes	80 % RPMI + 20 % FKS	40 h	Hypertetraploid del(6)(q16)x2, der(7)t(7;7)(p15;q11)x2
DOGKIT	Burkitt-Lymphom	PBMC eines 57-jährigen Mannes im 2. Rezidiv	90 % RPMI + 10 % FKS	40-50 h	Hyperdiploid mit 4 % Polyploidie dup(1)(q21q42), der(2)t(2;14)(q37;q24), t(14;18)(q32;q21), t(8;22)(q24;q11.2), der(14) t(X;14)(p21;p13), t(14;18)(q32;q21), dup(17)(q11q22), der(18) t(14;18)(q32;q21); Seitenlinie mit add(16)(p13); t(8;22) und t(14;18)
DOGUM	B-Zell-NHL (Follikular zentroblastisch)	Pleuraflüssigkeit einer 49-jährigen Frau	80 % RPMI + 20 % FKS	50-100 h	Hypodiploid mit 6 % Polyploidie der(1)t(1;14)(q32;q21.2), t(14;18)(q32;q21), t(2;8)(q14;q24), der(2)t(2;8), dup(4)(p12p15), add(5)(q13), add(6)(p23), der(6;17)(p17;q17), add(10)(p12), del(12)(q21), inv(13)(p12q21), der(15)t(5;15)(q14;q21), add(15)(p11)add(15)(q27), der(18)t(14;18)(q32;q21), add(22)(p11), t(14;18)
GUMBUS	Burkitt-Lymphom	Liquor eines 28-jährigen Mannes im 2. Rezidiv	90 % RPMI + 10 % FKS	48 h	Diploid mit 4 % Polyploidie del(3)(p11p21.2), del(6)(q14q24), t(8;14)(q24;q32)

7.1.8 Ergänzende Abbildungen

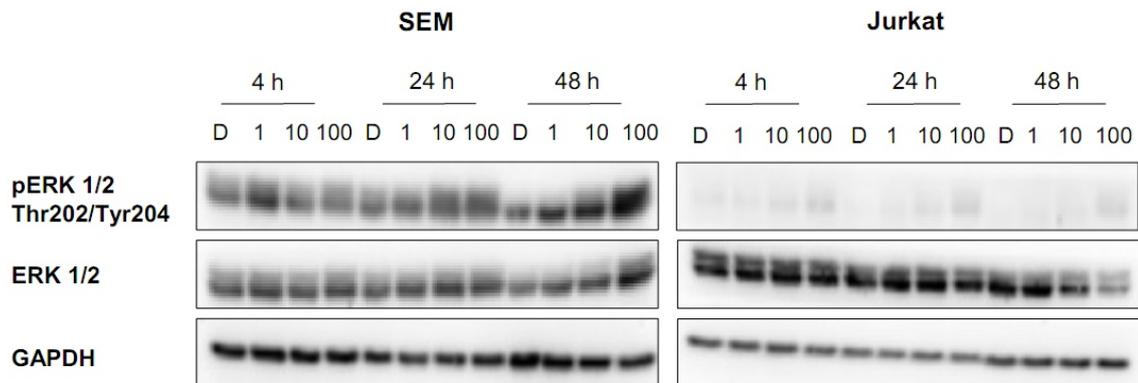


Abbildung 45: Untersuchung zur ERK-Expression nach der Behandlung mit BEZ235

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Inkubation mit DMSO (D) 1, 10 und 100 nM BEZ235 zu verschiedenen Zeitpunkten der Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Expression von pERK und Gesamt-ERK. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

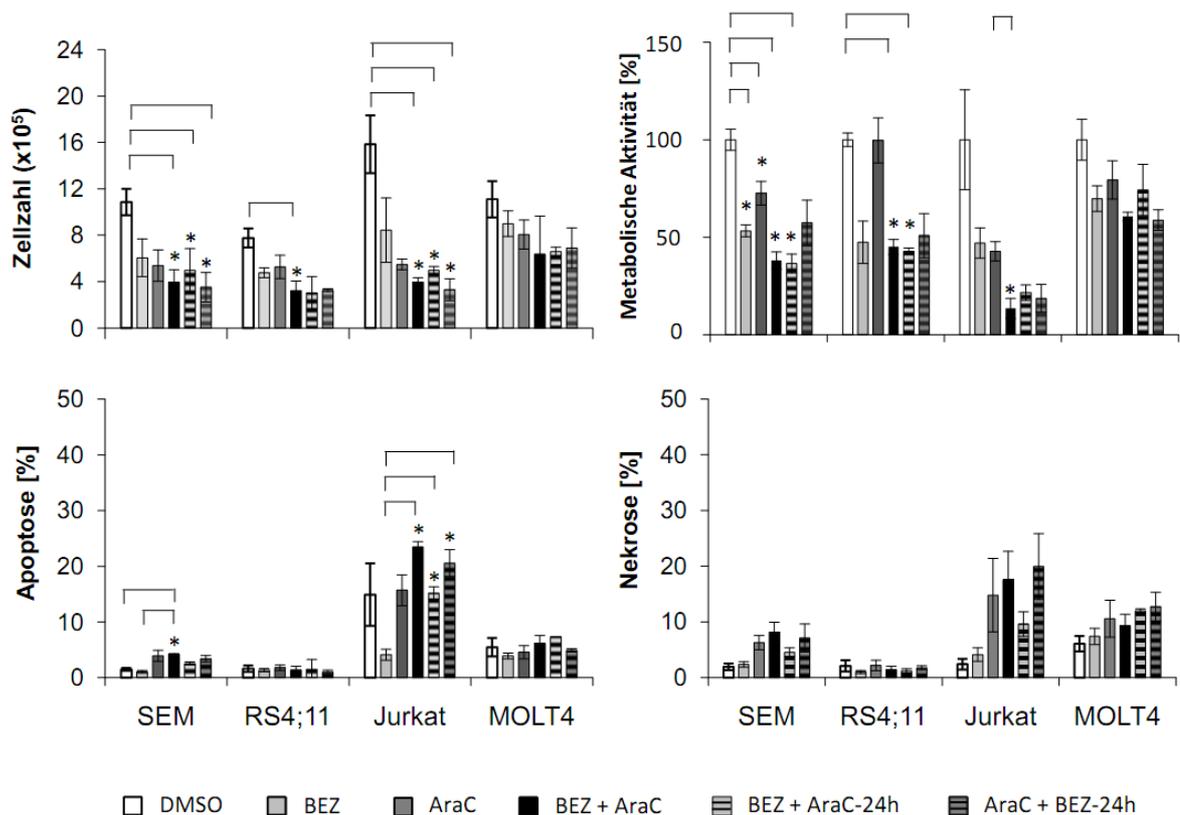


Abbildung 46: BEZ235 in der Kombination mit AraC.

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 2,5 μ M AraC (RS4;11), 0,125 μ M AraC (SEM), 0,05 μ M AraC (Jurkat und MOLT4) sowie mit 10 nM BEZ235 allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit AraC (BEZ + AraC-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit AraC (AraC + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

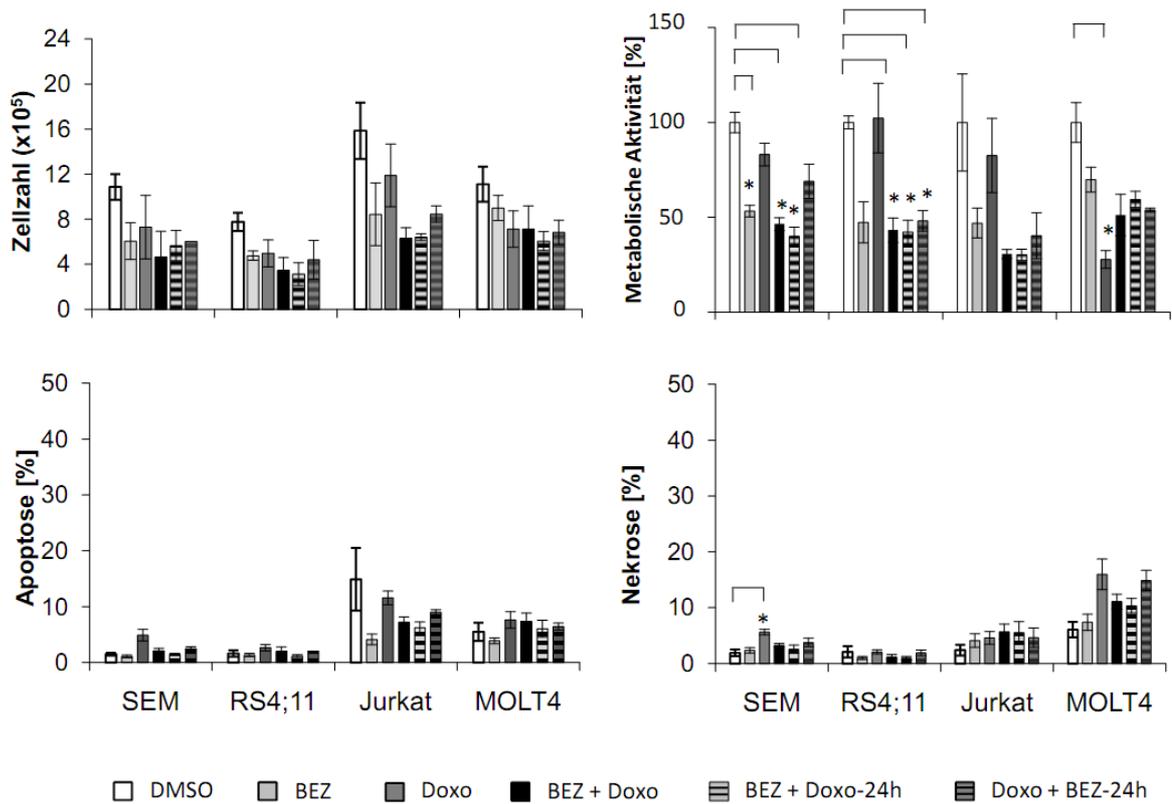


Abbildung 47: BEZ235 in der Kombination mit Doxorubicin.

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 25 nM Doxo sowie mit 10 nM BEZ235 allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor (BEZ + Doxo-24 h) der Inkubation oder 24 h nach der Inkubation mit Doxo (Doxo + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Doxo: Doxorubicin

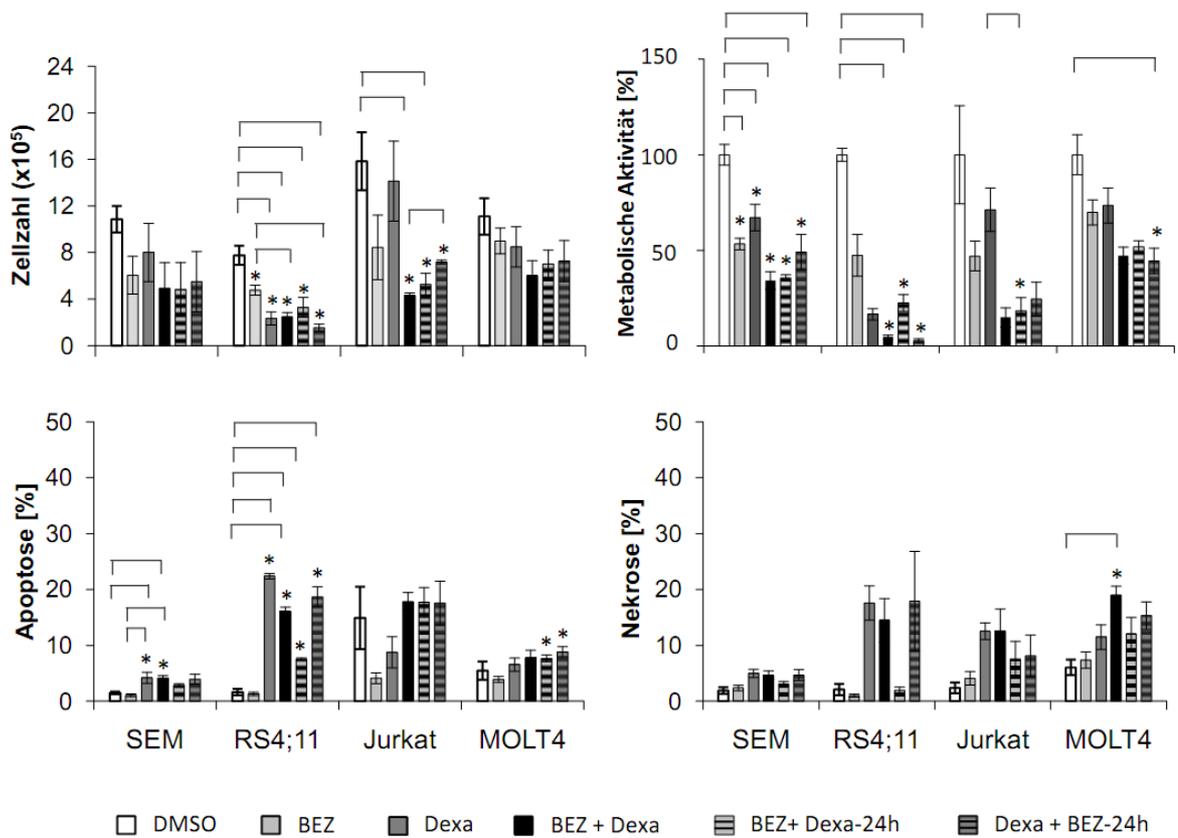


Abbildung 48: BEZ235 in der Kombination mit Dexamethason

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 0,1 μ M Dexa (RS4;11), 1 μ M Dexa (SEM), 10 μ M Dexa (Jurkat und MOLT4) sowie mit 10 nM BEZ235 alleine oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das BEZ235 entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Dexa (BEZ + Dexa-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Dexa (Dexa + BEZ-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Dexa: Dexamethason



Abbildung 49: Untersuchung zur ERK-Expression nach der Behandlung mit Sorafenib.

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach der Inkubation mit DMSO (D) 1, 10 und 100 nM BEZ235 zu verschiedenen Zeitpunkten der Zelllinien SEM und Jurkat. Untersucht wurde die Expression von pERK und Gesamt-ERK. Als Ladungskontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

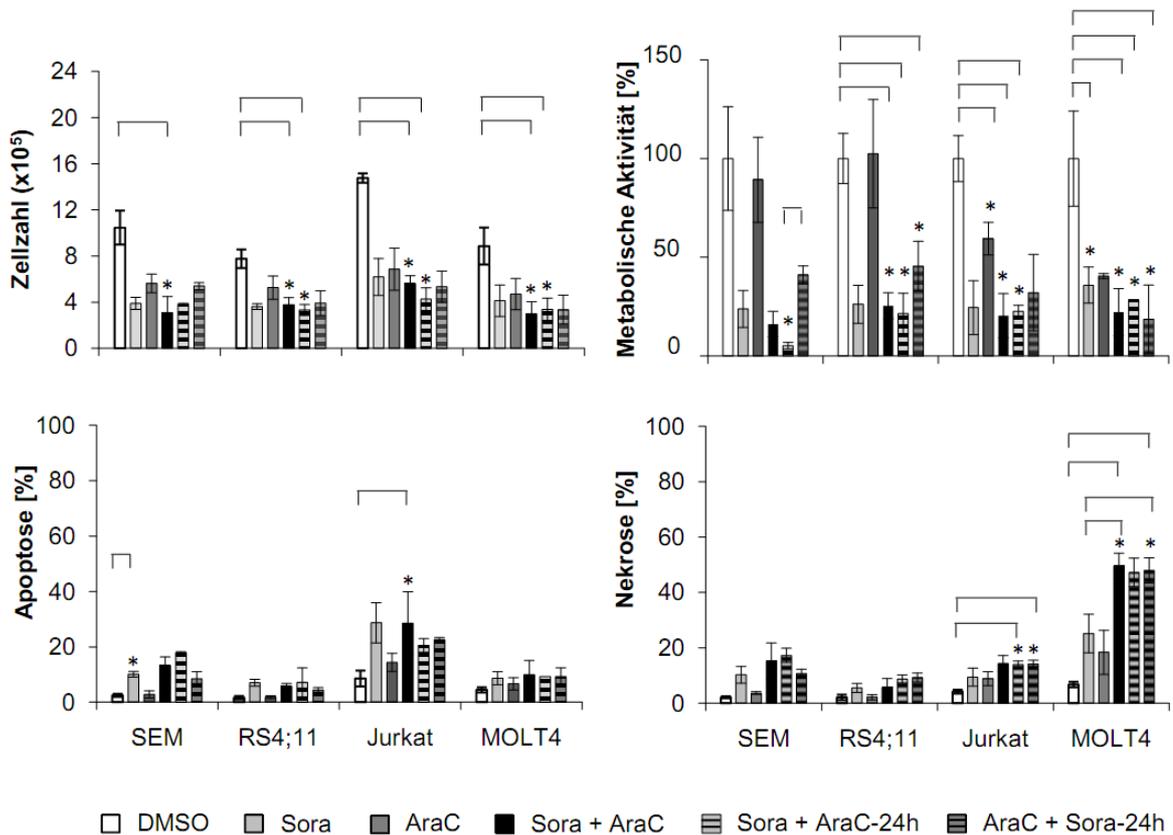


Abbildung 50: Sorafenib in der Kombination mit AraC

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 2,5 μ M AraC (RS4;11), 0,125 μ M AraC (SEM), 0,05 μ M AraC (Jurkat und MOLT4) sowie mit 3,65 μ M Sora allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sorafenib entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit AraC (Sora + AraC-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit AraC (AraC + Sora-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Sora: Sorafenib

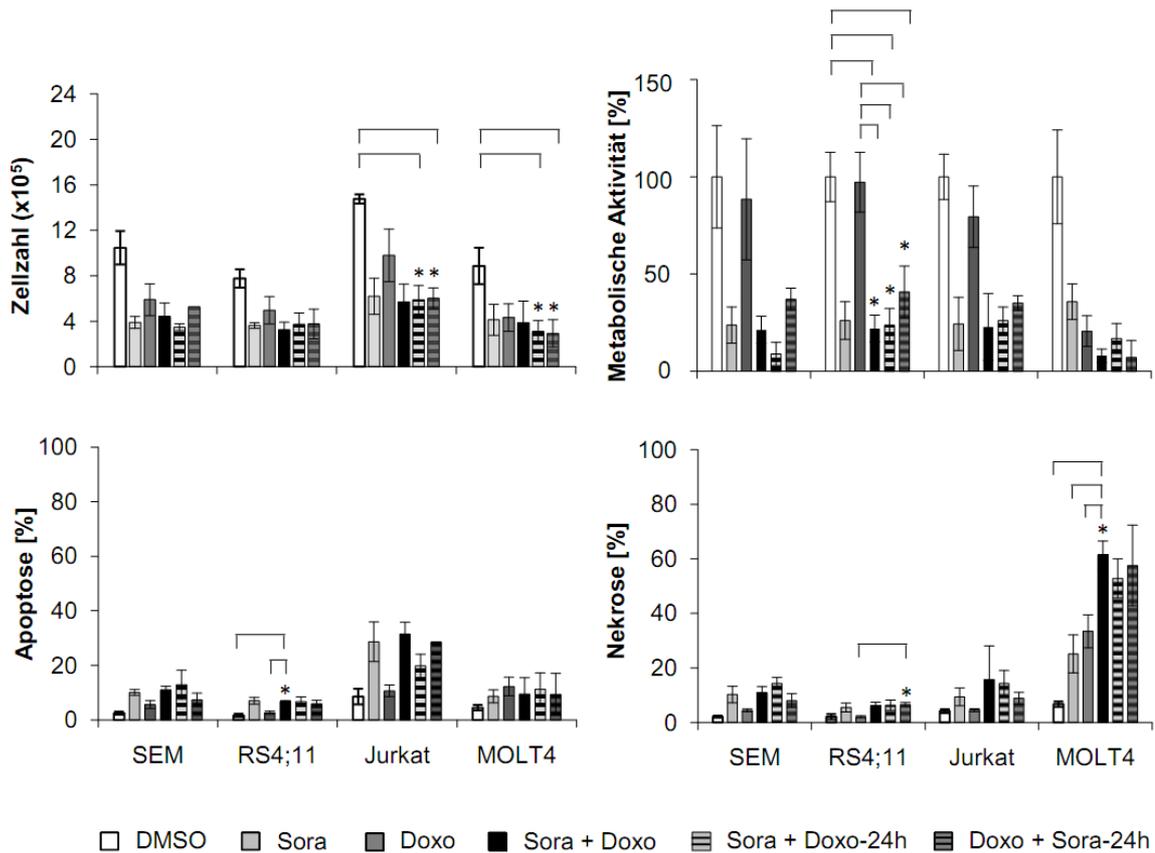


Abbildung 51: Sorafenib in der Kombination mit Doxorubicin

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit 25 nM Doxo sowie mit 3,65 μ M Sora alleine oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sora entweder gleichzeitig, 24 h vor (Sora + Doxo 24-h) der Inkubation oder 24 h nach der Inkubation mit Doxo (Doxo + Sora 24-h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Sora: Sorafenib; Doxo: Doxorubicin

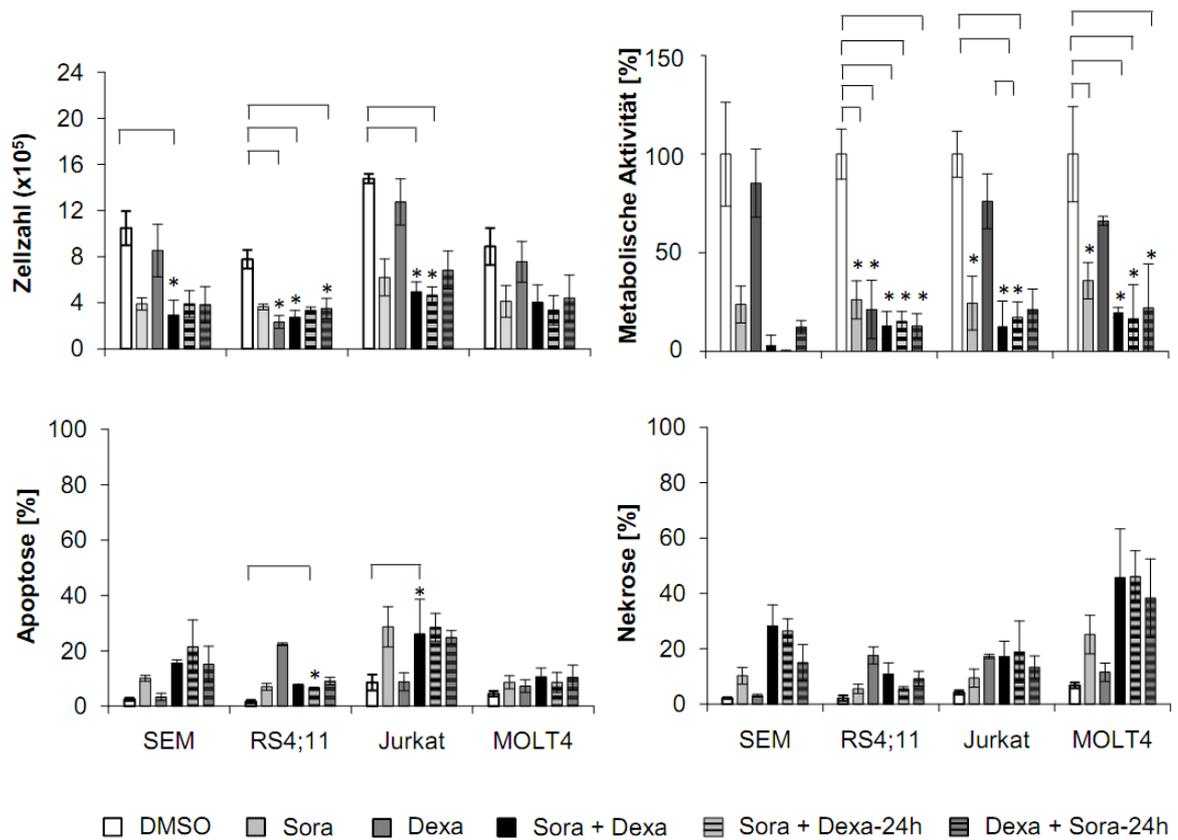


Abbildung 52: Sorafenib in der Kombination mit Dexamethason

Die ALL-Zelllinien wurden für 72 h mit $0,1 \mu\text{M}$ Dexa (RS4;11), $1 \mu\text{M}$ Dexa (SEM), $10 \mu\text{M}$ Dexa (Jurkat und MOLT4) sowie mit $3,65 \mu\text{M}$ Sora allein oder in Kombination behandelt. Dabei wurde das Sora entweder gleichzeitig, 24 h vor der Inkubation mit Dexa (Sora + Dexa-24 h) oder 24 h nach der Inkubation mit Dexa (Dexa + Sora-24 h) den Zellen zugeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ($p < 0,05$) ist mit * gekennzeichnet.

Dexa: Dexamethason

8. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Schwaan, den 02.02.2012

Catrin Schult

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Junghanß für die Bereitstellung des interessanten Themas, für seine hilfreichen Ratschläge und Anregungen sowie für die freundliche Zusammenarbeit, sein Vertrauen und natürlich seinen Optimismus.

Ebenso danke ich Prof. Luca Neri und seinem Team für die gemeinsame Kooperation im Rahmen des Vigoni-Projektes. In diesem Zusammenhang möchte ich mich insbesondere bei Il Presidente, Rucki und TomTom für die schönen Momente und wohl unvergesslichen Erlebnisse während unserer Italien-Safaris bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe "Leukämie und experimentelle Stammzelltransplantation" für das tolle Arbeitsklima und für die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Insbesondere danke ich Anett Sekora, Anne Knüppel, Doreen Killian, Gudrun Knübel und Sandra Lange die mir nicht nur in technischen und methodischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Saskia Krohn für die Einführung in die Zytogenetik sowie für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Immunfluoreszenz bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine ehemaligen Kolleginnen Meike Dahlhaus und Kristin Fischer für die interessanten Diskussionen und Kommentare sowie für die hilfreichen Ratschläge und Anregungen nicht nur innerhalb sondern auch außerhalb des Labors.

Ebenfalls danke ich Dr. Koczan für die Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Microarray-Analysen.

Änne Glass und Sonja Bold danke ich sehr für die hervorragende Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Microarray-Experimente.

Abschließend möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Sie haben mich immer unterstützt und mir dadurch vieles ermöglicht. Ich danke Euch von ganzem Herzen dafür.