

„Induktion von Apoptose und Signal-
transduktion in leukämischen Zellen
unter Tyrosinkinase-Inhibitor-
Behandlung“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Marie-Christine Wagner Geb. Blum
geb. am 11.1.1.1981 in Koblenz

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Fischer
Prof. Dr. Lars Bullinger

eingereicht am: 19.04.2012
verteidigt am: 02.11.2012

Für meine Familie

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.“

Galileo Galilei (1564-1642)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Vorwort	IX
Teil I	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Chronische myeloische Leukämie (CML)	3
1.2 JAK2V617F positive myeloproliferative Neoplasien	5
1.3 Akute myeloische Leukämie	7
1.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren	9
1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung der CML	9
1.4.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung von Philadelphia-Chromosom negativen myeloproliferativen Neoplasien	12
1.4.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie	12
1.4.4 Aktuelle Herausforderungen in der Tyrosinkinase-Inhibitor-Therapie	13
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	15
2 Material	16
2.1 Antikörper	16
2.2 Chemikalien und Reaktionskits	17
2.3 Geräte	17
2.4 Größenstandards	18
2.5 Oligonukleotide	18
3 Methoden	19
3.1 Molekularbiologische Methoden	19
3.1.1 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen	19
3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	19
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Konstrukt-Expression	20
3.1.5 Sequenzierung	21
3.2 Proteinbiochemische Methoden	21
3.2.1 Proteinextraktion	21

3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	22
3.2.3	SDS-PAGE	22
3.2.4	Western Blot	24
3.2.4.1	Protein-Transfer	24
3.2.4.2	Immundetektion	24
3.2.4.3	Dehybridisierung von Nitrocellulose-Membranen.....	25
3.3	Zellbiologische Methoden	25
3.3.1	Allgemeine Methoden	25
3.3.1.1	Zelllinien und Kultivierung.....	25
3.3.1.2	Auftauen von Zellen	27
3.3.1.3	Mediumwechsel und Passagieren.....	27
3.3.1.4	Einfrieren von Zellen	27
3.3.1.5	Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut.....	27
3.3.1.6	Bestimmung der Zellzahl.....	28
3.3.1.7	Bestimmung der Zellgröße und des zellulären Volumens.....	28
3.3.1.8	Berechnung der intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration.....	29
3.3.2	Behandlung der Zellen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	29
3.3.2.1	Dauerbehandlungen.....	29
3.3.2.2	Auswaschen von Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	30
3.3.2.3	Repetitives <i>Wash Out</i>	30
3.3.2.4	<i>Wash Out</i> mit Mediumtransfer	31
3.3.3	Durchfluss-Zytometrie	32
3.3.3.1	Intrazelluläre Messung von phosphorylierten Proteinen	32
3.3.3.2	Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid.....	33
3.3.3.3	AnnexinV-Färbung.....	34
3.3.3.4	Färbung der aktivierten Caspase3.....	35
3.3.3.5	Oberflächenfärbung von Transporterproteinen	36
3.3.3.6	Auswertung der Durchfluss-Zytometrie Daten	36
3.4	Tyrosinkinase-Inhibitor-Messungen mittels <i>high-performance liquid chromatography</i> (HPLC)	37
3.4.1	HPLC-Messung von Imatinib und Midostaurin in Zellkulturüberständen.....	37
3.4.2	LC-MS/MS-Messung von Dasatinib und Nilotinib	38
3.4.3	Intrazelluläre Messung von Tyrosinkinase-Inhibitor Konzentrationen mittels HPLC.....	39
3.5	Scintillator-Messungen von ¹⁴C-markiertem Imatinib.....	39
3.5.1	Analyse von ¹⁴ C-Imatinib-Konzentrationen mittels <i>intracellular uptake and retention assay</i> (IUR)	40
3.5.2	Messung der Proben mittels Scintillator.....	40

4	Ergebnisse	41
4.1	Funktionalitätsüberprüfung der verwendeten Zelllinien	41
4.2	Bestimmung der IC₅₀-Konzentration für die Tyrosinkinase-Inhibitoren	44
4.3	Kinetik der Kinaseinhibition und Apoptoseinduktion.....	45
4.3.1	Inhibition von ERK und STAT5 unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Inkubation.....	46
4.3.2	Induktion von Apoptose unter Behandlung mit IC ₅₀ -Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen	49
4.3.3	Aktivierung der Caspase3 in Abhängigkeit von der verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration	50
4.4	Auswirkungen der Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitoren-Konzentrationen	52
4.4.1	Test der Toxizität der verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen auf Wildtyp-Zelllinien.....	52
4.4.2	Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen	54
4.4.3	Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis-Tyrosinkinase-Inhibitoren unter repetitivem <i>Wash Out</i>	55
4.4.4	Signaltransduktion unter repetitivem <i>Wash Out</i>	62
4.5	Repetitives <i>Wash Out</i> mit Zellkulturmedium.....	66
4.5.1	Induktion von Apoptose nach repetitivem <i>Wash Out</i> mit Zellkulturmedium	66
4.5.2	Signaltransduktion von K562 Zellen unter repetitivem <i>Wash Out</i> mit Zellkulturmedium .	71
4.6	Signaltransduktion in der chronisch myeloischen Leukämie unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung	74
4.6.1	Dynamik und Kinetik der BCR-ABL-Signaltransduktion.....	74
4.6.2	Dynamik der Rephosphorylierung von STAT5 und CRKL.....	77
4.7	Quantitativer Tyrosinkinase-Inhibitor Nachweis mittels HPLC sowie LC-MS/MS..	79
4.7.1	Quantitative Bestimmung von Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen in Zellkulturüberständen.....	79
4.7.2	Bestimmung der Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen in Zelllysaten.....	82
4.8	Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitoren bei Transporterprotein exprimierenden Zelllinien.....	84
4.8.1	Verifizierung der Transporterprotein exprimierenden Zelllinien.....	85
4.8.2	Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitor bei ABC-Transporterprotein exprimierenden K562 Zellen	86

4.8.3	Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitor nach Inhibition der ABC-Transporterproteine	87
4.9	Quantitativer Nachweis von ¹⁴C-markiertem Imatinib mittels Szintillator.....	90
4.9.1	Verlauf der ¹⁴ C-Imatinib-Konzentrationen nach <i>Wash Out</i>	91
4.9.2	Dauerinkubation verschiedener ¹⁴ C-Imatinib-Konzentrationen	94
4.9.3	Messung der Effizienz der <i>Wash Out</i> Prozedur	96
5	Diskussion	97
5.1	Kinetik der Apoptoseinduktion	97
5.2	Auswirkungen der Kurzzeit-Inkubation hoher Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen auf Onkogen-transformierten Zellen	100
5.3	Signaltransduktion der Onkogen-transformierten Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Inkubation.....	103
5.4	Quantifizierung der extrazellulären und intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen	107
5.5	Modulation der intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration	111
6	Ausblick	114
	Teil II	116
	Abstract	117
1	Einleitung.....	118
1.1	Signaltransduktion	118
1.2	Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3	119
1.2.1	Genetische Aberrationen des FLT3-Rezeptors und ihre Bedeutung bei leukämischen Erkrankungen	120
1.2.2	Signaltransduktion des mutierten FLT3-Rezeptors	121
1.2.3	Der FLT3-ITD-627E-Rezeptor	123
1.2.4	FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	124
1.3	NFκB-Signaltransduktion	125
1.3.1	NFκB-Signaltransduktion bei akuter myeloischer Leukämie.....	126
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	127
2	Material.....	128
2.1	Antikörper	128
2.2	Chemikalien und Reaktionskits.....	128

2.3	Geräte	129
2.4	Größenstandard.....	129
2.5	Oligonukleotide	130
3	Methoden	130
3.1	Molekularbiologische Methoden	130
3.1.1	Restriktionsverdau	130
3.1.2	RNA-Isolation aus Zellen	131
3.1.3	cDNA-Synthese.....	131
3.1.4	PCR zum Nachweis der FLT3-Expression.....	131
3.1.5	Zielgerichtete Mutagenese	132
3.1.6	Dialyse von Plasmid-DNA	133
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	133
3.2.1	Fraktionierte Proteinisolierung	133
3.3	Zellbiologische Methoden	134
3.3.1	Methylzellulose-Assay	134
3.3.2	IL-3-Entzug	135
3.3.3	Elektroporation von Ba/F3 Zellen	135
3.3.4	siRNA <i>knock down</i>	135
3.3.5	Oberflächenfärbung von FLT3.....	136
3.4	Arbeiten mit Bakterien.....	136
3.4.1	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock.....	136
3.4.2	Kultivierung und Konservierung von Bakterien	137
3.4.3	Isolierung von Plasmid-DNA (Mini Präparation)	137
4	Ergebnisse	138
4.1	Generierung der Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie und der FLT3-ITD-627E Kinase- Dead-Mutante	138
4.1.1	Überprüfung des IL-3-unabhängigen Wachstums	142
4.1.2	Methylzellulose-Assay der generierten Zelllinien.....	146
4.1.3	Analyse der Signaltransduktion in den generierten Zelllinien	148
4.1.4	Untersuchung der Sensitivität gegenüber Midostaurin.....	153
4.2	Untersuchung der NFκB-Aktivierung in FLT3-ITD und FLT3-ITD-627E Zelllinien ...	154
4.2.1	Behandlung der Zelllinien mit dem IKKβ-Inhibitor V	155
4.2.2	Untersuchung der Translokation von NFκB in den Zellkern	157
4.2.3	siRNA <i>knock down</i> von p65.....	162

5	Diskussion	167
5.1	Charakterisierung der Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD-627E und Ba/F3-FLT3-EKA.....	167
5.2	Rolle der Aktivierung des NFκB-Signalweges in Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen	173
6	Ausblick	180
7	Zusammenfassung/ Summary	181
8	Literatur	183
	Danksagung	205
	Lebenslauf und Publikationen	208
	Erklärung	210

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
c-ABL	<i>cellular Abelson leukemia virus</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CPM	<i>counts per minute</i>
CPS	<i>counts per second</i>
EKA	FLT3-ITD-627E-K644A
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetin-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotide
DPM	<i>disintegration per minute</i>
E	Glutaminsäure
ET	Essentielle Thrombozythämie
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FLT3	<i>fms like tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
h	<i>hour</i>
HD	Hochdosis
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
I	Isoleucin
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

IL-3	Interleukin 3
IUR	<i>intracellular uptake and retention</i>
ITD	<i>internal tandem duplication</i>
JAK2	Januskinase 2
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LC	<i>liquid chromatography</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
NLS	<i>nuclear localisation sequence</i>
P	Phenylalanin
p	Signifikanzwert des t-Tests
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDA	Photodioden Array
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Konzentration
PI	Propidiumiodid
PMF	Primäre Myelofibrose
Primer	Oligonukleotide
PV	Polyzythämia Vera
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
S.	Seite
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>silencing RNA</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
WT	Wildtyp

Vorwort

Blut besteht aus Plasma, Ionen und Plasmaproteinen, sowie aus zellulären Bestandteilen. Die im Blut enthaltenden Zellen lassen sich in Erythrozyten, Leukozyten sowie Thrombozyten unterteilen. Die Blutzellen werden im Knochenmark als Progenitoren aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Dieser Vorgang wird auch als Hämatopoese bezeichnet. Die Progenitoren differenzieren im Laufe ihrer Entwicklung zu Zellen der myeloischen oder lymphatischen Reihe. Die Vorläuferzellen der lymphatischen Linie reifen zu B- oder T- Lymphozyten heran. Die myeloische Reihe bringt Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten hervor. Die Teilung der Stammzellen sowie die Differenzierung der Zellreihen unterliegen einer strengen Kontrolle, die das ungebremste Wachstum der Zellen verhindern soll. Bei der Entstehung von Leukämien erlangen Stammzellen oder frühe Progenitoren durch genetische und epigenetische Veränderungen einen Proliferationsvorteil sowie zum Teil einen Differenzierungsverlust. Das Resultat solcher Veränderungen ist das ungehemmte klonale Wachstum hämatopoetischer Zellen. Durch die starke Expansion des malignen Klons kommt es letztlich zur Verdrängung der gesunden Hämatopoese. Die Verdrängung der Hämatopoese aus dem Knochenmark ist ein lebensbedrohlicher Zustand, da die Hauptfunktion der zellulären Blutbestandteile in der Immunabwehr, dem Sauerstofftransport und der Blutgerinnung besteht. Der Verlust der gesunden Hämatopoese kann daher zu Infektionen, Blutungen und Leistungsschwäche führen. Leukämien werden unterschieden in akute und chronische Leukämien. Chronische Leukämien weisen vorwiegend eine ungebremste Proliferation von differenzierten Blutzellen auf. Chronische Leukämien sind über Jahre hinweg häufig symptomarm, sie können sich jedoch irgendwann zu akuten Erkrankungen weiterentwickeln. Akute Leukämien haben zusätzlich einen Differenzierungsblock, es werden unreife hämatopoetische Zellen, Blasten genannt, gebildet. Der Verlauf einer akuten Leukämie führt unbehandelt innerhalb von mehreren Tagen oder Wochen zum Tod. Je nach Linienzugehörigkeit der jeweiligen Leukämie können ferner jeweils lymphatische oder myeloische Leukämien unterschieden werden.

Die Regulation von Zellwachstum und Differenzierung in den Zellen wird gesteuert durch die Phosphorylierung von Proteinen an zentralen Serin-, Threonin- sowie Tyrosin-Resten, was zur Aktivierung der Proteine führt. Es sind aber auch inaktivierende Phosphorylierungen bekannt. Der Übertrag von Phosphat-Resten auf Tyrosin-Reste von Proteinen wird vermittelt durch Tyrosinkinase. Sind Tyrosinkinase von Fehlregulationen oder genetischen Mutationen betroffen, kann es zu Defekten in der Zelldifferenzierung und zu unkontrolliertem Wachstum kommen. Die konstitutive Aktivierung

der Kinasen kann durch Selbstregulationsmechanismen der Zelle nicht mehr kontrolliert werden. Als Konsequenz sind neben der Kinase auch die der Kinase nachgeschalteten Signalmoleküle dauerhaft aktiv. Weiterhin kommt es zu qualitativen Änderungen der Signaltransduktion, welche zur Aktivierung neuer Signalwege führen. Diese Aktivierungen resultieren in der Expression von Zielgenen, die der Zelle Wachstum, Überleben und den Schutz vor Apoptose sichern. Je mehr über die Aktivierungsmuster einer entarteten Zelle bekannt ist, desto zielgerichteter kann eine Therapie angewandt werden und desto mehr Angriffspunkte für eine Therapie bieten sich. Weiterhin wird ständig versucht die vorhandenen Therapieoptionen für Patienten zu verbessern und die zielgerichtete Therapie zu optimieren. Es ist dabei wichtig das Verständnis der Wechselwirkung zwischen Kinaseinhibition und dem klinischen Erfolg zu verbessern. **Teil I** der vorliegenden Arbeit widmet sich diesem translationalem Aspekt. Anhand von verschiedenen zellulären Rekonstitutionsmodellen leukämischer Erkrankungen wurde die Wechselwirkung zwischen Kinaseinhibition und der Apoptoseinduktion nach Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung näher untersucht.

Neben der Weiterentwicklung von Therapieoptionen ist es ebenso notwendig das biologische Grundlagenverständnis der jeweiligen Erkrankungen zu erweitern. Die genaue Charakterisierung von aberrant aktivierten Signaltransduktionswegen stellt daher ein wichtiges wissenschaftliches Bestätigungsfeld dar. In **Teil II** der vorliegenden Arbeit sollen die pathophysiologischen Grundlagen von FLT3 internen Tandem Duplikationen der Tyrosinkinase-Domäne¹ näher charakterisiert werden. Dazu wurde die hämatopoetische Zelllinie Ba/F3 mit dem Onkogen transfiziert. Diese Zellen wurden anschließend auf die transformierenden Eigenschaften sowie auf eine mögliche Aktivierung der NFκB Signaltransduktion hin untersucht.



Teil I

Abstract

Clinical development of imatinib in CML established continuous drug exposure as a paradigm for successful tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy. However, recently, it has been suggested that transient potent target inhibition of BCR-ABL by high-dose TKI (HD-TKI) pulse exposure is sufficient to commit cells to apoptosis. To dissect the molecular mechanisms involved, a panel of hematopoietic cell lines expressing *BCR-ABL*, *JAK2-V617F* and *FLT3-ITD* was employed, respectively. Interestingly, similar kinetics of caspase3 activation using HD and standard doses of TKI was observed, suggesting TKI incubation time as the most important determining factor of apoptosis induction. Cells could be rescued from apoptosis upon HD-TKI pulse exposure by repetitive drug wash out, correlating with rephosphorylation of key signaling nodes ERK and STAT5. Similarly, overexpression of ABC drug transporters protected cells from apoptosis. Inhibition of ABCB1 restored sensitivity to HD-TKI pulse exposure. Comprehensive mechanistic exploration identified a novel mechanism of prolonged intracellular TKI activity upon HD-TKI pulse exposure in all cellular models which closely correlated with apoptotic responses. Detailed signaling analysis of BCR-ABL expressing cells revealed discrepancies in the dynamics and kinetics of CRKL-, STAT5- as well as BCR-ABL- (Y412, Y177) phosphorylation. This demonstrates that STAT5 and BCR-ABL (Y412) are good predictors of cellular survival during TKI exposure.

Taken together, these data provide evidence that intracellular drug kinetics crucially determines biological TKI activity. These studies lead to refinement of our current thinking on critical requirements of TKI dose and duration of target inhibition essential for biological activity of TKIs.

In der klinischen Entwicklung von Imatinib hat sich eine kontinuierliche Exposition mit der Substanz als Paradigma für eine erfolgreiche Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) etabliert. Dennoch wurde kürzlich gezeigt, dass eine transiente potente Kinaseinhibition von BCR-ABL durch Kurzzeit-Exposition mit Hochdosis TKI (HD-TKI) ausreichend ist, um in den Zellen Apoptose auszulösen. Um den zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus zu analysieren, wurde ein entsprechendes Panel von hämatopoetischen Zelllinien, welche *BCR-ABL*, *JAK2-V617F* und *FLT3-ITD* exprimieren verwendet. Interessanterweise wurde bei HD und Standard Konzentrationen von TKI eine vergleichbare Kinetik der Caspase3 Aktivierung beobachtet, was die TKI-Inkubationszeit als determinierenden Faktor der Apoptoseinduktion nahelegt. Nach der Kurzzeit-Inkubation von HD-TKI konnten die Zellen durch repetitives *Wash Out* vor der Apoptoseinduktion gerettet werden, was gut mit der Rephosphorylierung der Signalmoleküle ERK und STAT5 korrelierte. Ebenso schützte die Überexpression von ABC-Transporterproteinen vor Apoptose. Die Inhibition von ABCB1 konnte die Sensitivität gegenüber der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation wieder herstellen. Vergleichende mechanistische Untersuchungen in allen untersuchten Zellmodellen identifizierten einen neuen Mechanismus der verlängerten intrazellulären TKI Aktivität nach der HD-TKI Kurzzeit-Exposition, der gut mit der apoptotischen Antwort korrelierte. Detaillierte Analysen der BCR-ABL Signaltransduktion zeigten eine Diskrepanz in der Dynamik und Kinetik der CRKL-, STAT5- sowie der BCR-ABL- (Y177, Y412) Phosphorylierung. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass STAT5 und BCR-ABL (Y412) gute prädiktive Marker für das zelluläre Überleben nach TKI-Exposition sind.

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass die intrazelluläre TKI Kinetik die biologische TKI Aktivität bestimmt. Diese Untersuchungen erweitern unser derzeitiges Wissen zu den essentiellen Voraussetzungen von TKI Dosis und Dauer der Kinaseinhibition, bei der Induktion einer biologischen Antwort auf TKI Aktivität.

1 Einleitung

1.1 Chronische myeloische Leukämie (CML)

Im Jahre 1951 fasste William Dameshek eine Gruppe von hämatologischen Erkrankungen unter dem Oberbegriff „myeloproliferative Syndrome“ zusammen (Dameshek, 1951). Diese Gruppe kann heute in zwei Subgruppen unterteilt werden, zum einen die Philadelphia-Chromosom negativen Erkrankungen und zum anderen die Philadelphia-Chromosom positive chronisch myeloische Leukämie (**CML**). Die CML weist eine Inzidenz von 1-2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner jährlich auf und tritt in allen Altersdekaden auf (Rohrbacher and Hasford, 2009). In der westlichen Welt liegt der Anteil der CML bei 15–20% aller Leukämie-Fälle. Beim Verlauf der Erkrankung können drei Phasen unterschieden werden. Während der chronischen Phase ist das klinische Bild durch Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust und Leistungsabfall charakterisiert. Diese Phase dauert meist mehrere Jahre an und die Diagnose ist häufig ein Zufallsbefund im Rahmen einer allgemeinen Routineuntersuchung. Während der akzelerierten Phase der Erkrankung ist ein erhöhter Anteil an unreifen myeloischen Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark festzustellen. In der Blastenkrise kommt es zum Bild einer akuten Leukämie mit einem sprunghaften Anstieg des Blastenanteils in Blut und Knochenmark, ebenso kommt es nicht selten zu leukämischen Organinfiltrationen (Hoelzer and Seipelt, 1998). In dieser Phase beträgt das mediane Überleben der Patienten trotz intensiver Therapie nur etwa 3-9 Monate (Sawyers et al., 2002). Der Übergang zur Blastenkrise ist verbunden mit der Akquisition von sekundären molekularen und chromosomalen Veränderungen, die zu BCR-ABL-unabhängigem Zellwachstum führen (Shet et al. , 2002).

Die molekulare Ursache der CML wurde bereits in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts von Dr. Janet Rowley in Philadelphia erkannt. Die reziproke Translokation der beiden langen Arme der Chromosome 9 und 22 lässt ein verkürztes Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom, entstehen. Diese Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ kann bei mehr als 95% der CML-Patienten nachgewiesen werden (Faderl et al., 1999). Das Resultat der chromosomalen Aberration ist die Entstehung eines chimären Proteins, dass sich aus der *cellular Abelson leukemia virus* (**c-ABL**) Kinase und dem *breakpoint cluster region* (**BCR**) Protein zusammensetzt und als BCR-ABL bezeichnet wird (Shtivelman et al. , 1985). Je nach Bruchpunkt innerhalb der BCR-Sequenz können drei Translokations-Produkte entstehen, die nach ihrem Molekulargewicht benannt werden: BCR-ABLp185, BCR-ABLp210 und BCR-ABLp230. Der Translokationspartner c-ABL ist sowohl im Zytoplasma als auch im

Nukleus lokalisiert, da das Protein eine *nuclear localisation sequence (NLS)* besitzt (Wen et al., 1996). C-ABL ist eine *non-receptor*-Tyrosinkinase, der eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion sowie der Regulation des Zellwachstums zukommt (Ponticelli et al., 1982). Die Aktivität des Proteins ist daher streng reguliert. Als weitere funktionelle Domänen besitzt c-ABL eine SH3 Domäne zur Interaktion mit Proteinen sowie eine Phosphotyrosin-Bindedomäne SH2 und eine DNA- bzw. Aktin-Bindedomäne (Zhao et al., 2002). BCR ist ein zytoplasmatisches Protein mit einer Serin/Threonin-Kinase-Funktion (Maru and Witte, 1991). Weiterhin besitzt das Protein eine Domäne mit *guanine exchange factor* Funktion und eine GTPase Aktivität für Rac (Deininger et al., 2000). Diese beiden Domänen gehen jedoch bei der Translokation mit ABL verloren und sind daher nicht entscheidend für das transformierende Potential von BCR-ABL. Für die Transformation des Fusionsproteins sind die Tyrosinkinase-Domäne von c-ABL und die Oligomerisierungs-Domäne von BCR entscheidend, da letztere dem BCR-ABL-Protein die Möglichkeit verleiht Tetramere auszubilden. Die Tyrosinkinase-Domänen gelangen dadurch in räumliche Nähe und sind in der Lage sich gegenseitig zu aktivieren (Zhao et al., 2002). Außerdem interagieren Bereiche des BCR-Proteins mit der SH2-Domäne von ABL, wodurch die negative regulatorische Funktion dieser ABL-Domäne aufgehoben wird (Pendergast et al., 1991). Eine Übersicht über die Domänenstruktur von c-ABL, BCR und BCR-ABL gibt Abbildung 1.

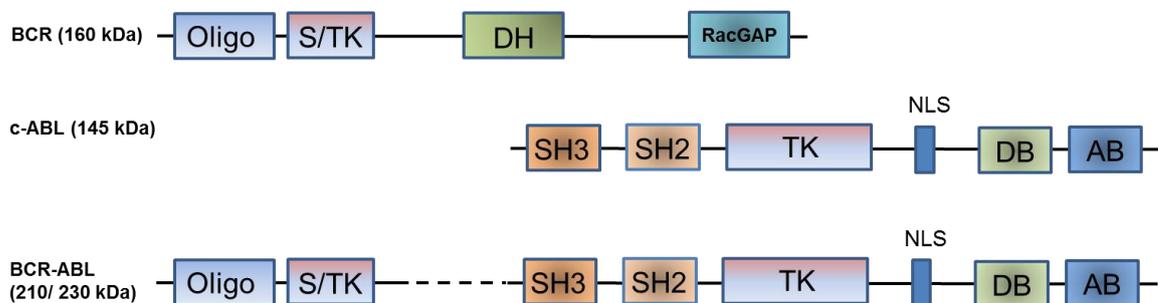


Abbildung 1: Domänenstruktur von c-ABL, BCR und BCR-ABL.

Abbildung in Anlehnung an Zaho *et al.* 2002. BCR weist eine Oligomerisierungs-Domäne (**Oligo**), eine Serin-Threonin-Kinase (**S/TK**), eine Rho-GEF-Domäne (**DH**), sowie eine GTPase-Aktivität für Rac (**RacGAP**) auf. Das c-ABL Protein besitzt zwei SCR-homology-Domänen (**SH2/SH3**), eine Tyrosinkinase-Domäne (**TK**), eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (**NLS**), eine DNA-Binde-Domäne (**DH**) sowie ein Aktin-Bindungsmotiv (**AB**). Das Fusionsprotein wird gebildet aus der fast vollständigen Sequenz von c-ABL und den ersten Exons der BCR-Sequenz.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Expression von BCR-ABL zu einer gesteigerten Proliferation, zu Wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum sowie zu einer Transformation der Zellen führt (Daley and Baltimore, 1988). Es konnte ferner nachgewiesen werden, dass das Fusionsprotein BCR-ABL eine konstitutiv aktiv Tyrosinkinase ist, die zur Aktivierung von RAS/RAF/MEK/ERK, PI3-K/ AKT, STAT5 und NFκB

führt. Diese Aktivierungen vermitteln anti-apoptotische und proliferative Signale und resultieren letztlich in einem veränderten Genexpressionsmuster (Varticovski et al. , 1991; Mandanas et al. , 1993; Shuai et al. , 1996; Reuther et al. , 1998). Eine besondere Rolle in der Signaltransduktion von BCR-ABL kommt dem Adapterprotein CRKL zu. CRKL ist in der Lage direkt an BCR-ABL zu binden und somit Signaltransduktion zu vermitteln (de Jong et al., 1997). In murinen *knock out* Modellen von CRKL konnte gezeigt werden, dass CRKL für die Transformation von BCR-ABL positiven Zellen essentiell ist (Seo et al., 2010). Im Rahmen klinischer Studien wird CRKL als pharmakodynamischer Surrogatmarker für die BCR-ABL Aktivität angewendet (Hamilton et al., 2006). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Transplantation von BCR-ABL positiven Zellen zu einer Erkrankung mit CML-ähnlichem Phänotyp führt (Daley et al., 1990; Li et al., 1999).

1.2 JAK2V617F positive myeloproliferative Neoplasien

Neben der Philadelphia-Chromosom positiven chronisch myeloproliferativen Neoplasie (**MPN**) gruppierte William Dameshek 1951 die Philadelphia-Chromosom negativen MPN. Unter diesem Oberbegriff werden eine Reihe unterschiedlicher Erkrankungen zusammengefasst, darunter auch die drei klassischen Philadelphia-Chromosom negativen MPN, Polyzythämia vera (**PV**), essentielle Thrombozythämie (**ET**) und primäre Myelofibrose (**PMF**) (Dameshek, 1951). Die Inzidenz dieser Gruppe von Neoplasien liegt bei 5-6 pro 100.000 Einwohner jährlich und ist damit insgesamt 2–3-fach höher als die der CML. Das mediane Alter bei Diagnose liegt im 5. bis 6. Lebensjahrzent (Griesshammer et al., 2006). Bei diesen drei Erkrankungen kommt es zu einer malignen Entartung myeloischer Stamm- bzw. Progenitorzellen und in der Folge zu einer autonomen Proliferation einer oder mehrerer myeloischer Zellreihen. Die Zellen sind hierbei morphologisch normal und funktionell (Griesshammer et al., 2006). Die PV ist eine Erkrankung einer hämatopoetischen Stammzelle. Als klinische Charakteristika stehen eine ungehemmte Erythrozytenproduktion mit erhöhten Hämoglobin- und Hämatokrit-Werten im Vordergrund. Die Folge sind eine erhöhte Blutviskosität sowie Mikrozirkulationsstörungen verbunden mit thromboembolischen Komplikationen (Gruppo Italiano Studio, 1995). Die Lebenserwartung von Patienten mit PV unter Therapie ist im Vergleich zur Normal-Bevölkerung leichtgradig eingeschränkt (Rozman et al., 1991). Gefürchtet sind insbesondere thromboembolische Ereignisse und eine zwar seltene aber prognostisch ernste leukämische Transformation (Griesshammer et al., 2006).

Die essentielle Thrombozythämie ist ebenfalls eine Stammzell- bzw. Progenitorzell-Erkrankung, bei der eine autonome Proliferation der Megakaryopoese im Vordergrund steht. Es kommt im Krankheitsverlauf zu einer langsamen jedoch stetigen Erhöhung der Thrombozytenzahl (Griesshammer et al., 2006). Im Knochenmark betroffener Patienten zeigt sich eine wesentliche Vermehrung der Megakaryozyten, die deutlich vergrößert sind (Thiele et al., 1996). Die jährliche Inzidenz der ET liegt bei 2,5 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die Lebenserwartung ist bei Patienten ohne spezielle Risikofaktoren nicht beeinträchtigt, wohingegen Patienten mit vorliegenden Risikofaktoren im Vergleich zur altersgleichen gesunden Bevölkerung eine verringerte Lebenserwartung aufweisen (Passamonti et al., 2004). Die primäre Myelofibrose zeigt im Knochenmark eine starke voranschreitende Vermehrung von faserreichen Bindegeweben, was zur Verdrängung der normalen Hämatopoese führt. Die Blutbildung findet bei Fortschreiten der Fibrose in Milz und Leber statt, was in einer deutlichen Volumenzunahme dieser Organe resultiert (Griesshammer et al., 2006). Unbehandelt führt die PMF bei Patienten in der Hochrisiko-Gruppe innerhalb von 2–3 Jahren zum Tod, unter supportiver Behandlung liegt das Überleben zwischen 1-10 Jahren (Cervantes and Pereira, 2011). Die jährliche Inzidenz der PMF liegt bei ca. 0,5–1,5 Fällen pro 100.000 Einwohner.

Die molekularen Ursachen der chronischen myeloproliferativen Neoplasien waren lange Zeit unbekannt. Im Jahre 2005 publizierten mehrere Arbeitsgruppen eine Punktmutation im *Januskinase 2-Gen (JAK2)* im Zusammenhang mit dem Auftreten von PV, ET und PMF. Die Mutation betrifft das Exon 14 von JAK2, welches für die Pseudokinase-Domäne von JAK2 kodiert. Die Punktmutation resultiert in einer Aminosäuresubstitution von Valin (**V**) zu Phenylalanin (**F**) an der Aminosäureposition 617 (Baxter et al., 2005; Levine et al., 2005; Ugo et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die JAK2V617F-Mutation bei ca. 95% der Patienten mit PV und bei jeweils 50% der Patienten mit ET und PMF zu finden ist (Baxter et al., 2005; Levine et al., 2006). Bislang ist weitgehend unklar wie eine Mutation zu drei verschiedenen Phänotypen führen kann. Es ist jedoch auffällig, dass bei Patienten mit Polyzythämia vera beide JAK2-Allele von der Mutation betroffen sind, wohingegen bei der ET und PMF die Mutation in der Regel heterozygot vorliegt (Pardanani et al., 2008).

Januskinasen gehören zu den Tyrosinkinase und weisen zwei nicht identische Kinase-Domänen auf, von denen jedoch nur eine katalytisch aktiv ist. Die katalytische nicht aktive Pseudokinase-Domäne besitzt eine autoinhibitorische Funktion und verhindert somit die Aktivierung des Proteins (Saharinen et al., 2003). Die JAK2V617F-Mutation ereignet sich in der Pseudokinase-Domäne und alteriert deren autoinhibitorische Funktion. Die Domänen-Struktur von JAK2 ist in Abbildung 2 dargestellt.

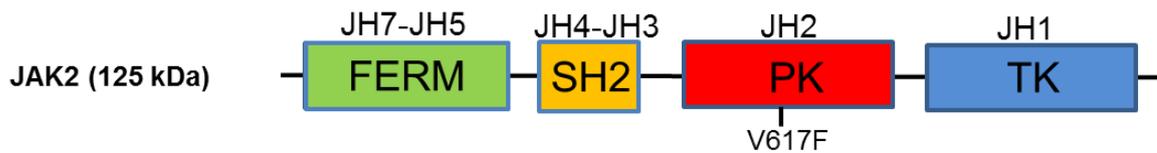


Abbildung 2: Domänenstruktur von JAK2.

JAK2 besteht aus 7 Janus-Homologie-Domänen (**JH**). JH1 repräsentiert die Tyrosinkinase-Domäne des Proteins mit Kinaseaktivität (**TK**). Die Phosphorylierung von konservierten Tyrosin-Resten innerhalb der Domäne führt zu Konformationsänderungen, die die Substrat-Bindung ermöglichen. Der Pseudokinase-Domäne (**PK**) fehlt eine enzymatische Aktivität, ihre Funktion besteht in der Autoregulation der Kinaseaktivität. Die Punktmutation V617F ereignet sich in der JH2-Domäne. Die SH2-Domäne wird gebildet aus JH3-JH4 und dient der Substrat-Interaktion. Die FERM-Domäne besteht aus JH5-JH7 und ist verantwortlich für die Bindung von JAK2 an Zytokin-Rezeptoren.

Die Januskinasen sind beteiligt an der Signaltransduktion von sogenannten Typ II Zytokin-Rezeptoren ohne intrinsische Kinaseaktivität. JAK2 vermittelt dabei unter anderem die Signaltransduktion der Erythropoetin, Thrombopoetin und GM-CSF-Rezeptoren. Die gleichzeitige Expression eines Erythropoetin-Rezeptors (**EPOR**) und der JAK2V617F-Mutation führte *in vitro* zur Zytokinhypersensitivität und klonalem Wachstum der Zellen in Abwesenheit von Zytokinen (Lu et al., 2005). Auf der Ebene der Signaltransduktion resultiert die Punktmutation in einer konstitutiv aktiven Kinase. In der Folge kommt es zur dauerhaften Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege wie beispielsweise PI3K/AKT, STAT5 und RAS/RAF/MEK/ERK (Levine et al., 2005; Ugo et al., 2005). Im Mausmodell wurde durch die Transplantation von JAK2V617F positivem Knochenmark eine myeloproliferative Erkrankung mit kurzer Latenz induziert, wobei es je nach JAK2V617F-Mutationslast zur Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen kam (Ugo et al., 2005; Bumm et al., 2006; Wernig et al., 2006; Tiedt et al., 2008).

1.3 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (**AML**) ist eine klonale Erkrankung einer transformierten myeloischen Vorläuferzelle, welche die Fähigkeit zur Differenzierung und Proliferationshemmung verloren hat. Die daraus hervorgehenden Zellen werden auch als myeloische Blasten bezeichnet. Die jährliche Inzidenz liegt bei ca. 1-2 Einwohner pro 100.000, wobei das mediane Alter der AML-Patienten bei 65 Jahren liegt (Schoch et al., 2001). Unbehandelt verläuft eine AML innerhalb von Tagen bis Wochen tödlich. Das Langzeit-Überleben ist stark vom Alter abhängig. Die Gruppe der unter 60-jährigen zeigt ein Langzeit-Überleben mit großen Unterschieden von 25 bis 70%. Über 60 Jahre weisen nur noch 5-15% der Patienten ein Langzeitüberleben auf (Lipka et al., 2008a). Die AML ist aus biologischer und klinischer Sicht eine heterogene Erkrankung.

Das Auftreten von chromosomalen Aberrationen bestimmt den Verlauf der AML. Bei ca. 45% der Patienten lässt sich keine chromosomale Aberration nachweisen. Diese Patienten werden klassischerweise der intermediären Risikogruppe zugeordnet (Lipka et al., 2008a). Diese Gruppe ist auf molekularer Ebene sehr heterogen. Bei 70–90% aller Patienten kann eine verstärkte Oberflächen-Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase *fms-like tyrosine kinase 3* (**FLT3**) nachgewiesen werden. In der normalen Hämatopoese ist die FLT3-Expression auf unreife hämatopoetische Stammzellen und Progenitoren limitiert. Mutationen des *FLT3*-Gens sind assoziiert mit dem Auftreten verschiedener hämatologischer Erkrankungen (Rosnet et al., 1996).

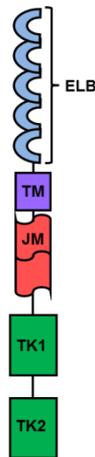


Abbildung 3: Domänenstruktur des FLT3-Rezeptors.

Der FLT3-Rezeptor besitzt extrazellulär 5 Liganden-Bindungs-Domänen (**ELB**), gefolgt von einer Transmembran-Domäne (**TM**). Intrazellulär schließt sich die juxtamembranäre Domäne (**JM**) an, die die Aktivität der beiden folgenden Tyrosinkinase-Domänen (**TK 1 + 2**) reguliert. Die beiden Kinase-Domänen sind über ein Kinase-Insert verbunden.

In der AML können 2 Klassen von FLT3-Mutationen unterschieden werden. Zum einen finden sich Punktmutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors und zum anderen kommt es zu sogenannten internen Tandem Duplikationen (**ITD**) innerhalb der Juxtamembran-Domäne. Interne Tandem Duplikationen wurden 1996 zum ersten Mal von Nakao *et al.* beschrieben und kommen bei 20–45% der AML-Patienten vor (Nakao et al., 1996). Das Vorliegen einer FLT3-ITD ist ein schlechter prognostischer Marker für das Gesamtüberleben der AML-Patienten (Abu-Duhier et al., 2000; Kayser et al., 2009). Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass Interne Tandem Duplikationen nicht ausschließlich in der Juxtamembran-Domäne vorkommen. Etwa 29% aller internen Tandem Duplikationen integrieren in die Tyrosinkinase-Domäne 1 des Rezeptors (Breitenbuecher et al., 2009b), was aus klinischer Sicht mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist (Kayser et al., 2009). Alle diese FLT3-Mutationen resultieren in einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors sowie in der Aktivierung

der nachgeschalteten Signaltransduktionswege wie beispielsweise RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT und STAT5. Die Expression einer FLT3-ITD führt *in vitro* zu Wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum sowie zur Koloniebildung in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002). Die Transplantation von FLT3-ITD positiven Knochenmarkszellen resultiert im Mausmodell in einer fatalen myeloproliferativen Erkrankung mit leukämischem Phänotyp (Kelly et al., 2002; Grundler et al., 2005).

1.4 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Mutationen von Tyrosinkinasen führen häufig zu einer konstitutiv aktiven Kinase, was in der dauerhaften Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege resultiert. Die Hemmung dieser Kinasen führt zur Unterbrechung der pathologischen Signaltransduktion und bietet damit die molekulare Grundlage für eine zielgerichtete Therapie (Alves and Hiddemann, 1997). Bernard Weinstein stellte 2002 das Prinzip der *oncogene addiction* von Tumoren auf. Er postulierte, dass die Tumorzellen trotz einer Vielzahl an genetischen Veränderungen von einem einzigen onkogenen Signal abhängig werden können. Die Inhibition dieses Signals resultiert dann in der Induktion von Zelltod, Apoptose (Weinstein, 2002).

Die Substanzen, die zur Inhibition der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinasen eingesetzt werden, werden als Tyrosinkinase-Inhibitoren (**TKI**) bezeichnet. Tyrosinkinase-Inhibitoren konkurrieren mit Adenosin-Triphosphat (**ATP**) um die Bindung an die Kinase-Domäne der Proteine (Okram et al., 2006). Die Bindung des Inhibitors an die Kinase unterbricht die Aktivierung dieser sowie die Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege. Innerhalb kurzer Zeit haben Tyrosinkinase-Inhibitoren Eingang in die Behandlung vieler maligner Erkrankungen gefunden. Das Paradebeispiel der erfolgreichen Behandlung mit TKI ist die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie mit Imatinib.

1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung der CML

Die molekulare Ursache der chronisch myeloischen Leukämie ist das Fusionsprotein BCR-ABL, das durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib gehemmt werden kann (Druker et al., 1996). Imatinib ist ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat, das an der Kinase-Domäne bindet. Die Interaktionsfläche liegt dabei an der ATP-Bindungsseite, was dazu führt, dass die ABL-Kinase im inaktiven Zustand gehalten wird und nicht in den aktiven Zustand wechseln kann (Schindler et al., 2000). Imatinib besitzt im humanen

Serum eine Halbwertszeit von 18 Stunden und weist aktive Metabolite auf. *In vitro* hemmt Imatinib die Proliferation von BCR-ABL positiven Zellen und führt zur Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle, zur Induktion von Apoptose, zur Inhibition der Koloniebildung sowie zur Erhöhung der genetischen Stabilität (Druker et al., 1996; Deininger et al., 1997; Gambacorti-Passerini et al., 1997; Jonuleit et al., 1998, 2000). Imatinib wurde daher ab 1998 im Rahmen von klinischen Studien zur Behandlung von CML-Patienten eingesetzt. Unter Imatinib-Therapie erreichen nahezu alle CML-Patienten, die sich in der chronischen Phase befinden, eine komplette hämatologische Remission (Druker and Lydon, 2000). Bei etwa 80% der Patienten tritt eine komplette zytogenetische Remission ein. Dies bedeutet, dass das Philadelphia-Chromosom in der G-Bänderungs-Analyse nicht mehr detektierbar ist. Seit der Zulassung von Imatinib in Deutschland 2002 gilt diese Substanz als Therapiestandard und weist eine gute 7-Jahres-Überlebensrate von 86% auf (Hehlmann et al., 2007). Einige Patienten zeigen jedoch kein Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie auf. Eine Ursache für das Versagen der Imatinib-Therapie sind Punktmutationen in der ATP-Bindungs tasche von BCR-ABL, die in 40–90% der Imatinib-resistenten Patienten nachgewiesen werden können (Gorre et al. , 2001; Corbin et al. , 2003; Gambacorti-Passerini et al. , 2003).

Die Entwicklung einer alternativen Therapie für die Imatinib-resistenten Patienten ist somit von großer Bedeutung. Die zweite Generation von Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde entwickelt, um eine effizientere und selektivere Bindung an BCR-ABL zu erreichen und auch BCR-ABL-Mutationen abzudecken. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation, zu denen Dasatinib und Nilotinib zählen, sind wirksam gegenüber vielen BCR-ABL Punktmutationen wie sie unter Imatinib entstehen können (O'Hare et al., 2005; Kantarjian et al., 2006; Talpaz et al., 2006).

Dasatinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der eigentlich als Inhibitor für SRC-Kinasen entwickelt wurde, jedoch auch hochpotent BCR-ABL inhibiert (Lombardo et al., 2004). Dasatinib zeigt dabei eine 300-fach niedrigere IC_{50} -Konzentration auf BCR-ABL positiven Zellen als Imatinib, was vermutlich in der grundlegend anderen chemischen Struktur von Dasatinib begründet ist. Eine Übersicht über die chemischen Strukturen der verschiedenen BCR-ABL Inhibitoren ist in Abbildung 4 zu finden. Im Gegensatz zu Imatinib bindet Dasatinib auch an die aktive Konformation von BCR-ABL (Tokarski et al., 2006). Dasatinib besitzt im menschlichen Serum eine Halbwertszeit von 3–4 Stunden und weist keine aktiven Metaboliten auf (Kamath et al., 2008). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von BCR-ABL positiven Zellen mit Dasatinib zur Inhibition der Phosphorylierung von BCR-ABL führt, verbunden mit der Inhibition der Zellproliferation sowie der Induktion von Apoptose. Dasatinib ist wirksam gegenüber

einer Vielzahl von BCR-ABL-Mutationen, die unter Imatinib-Therapie auftreten (O'Hare et al., 2005). In klinischen Studien induziert Dasatinib eine anhaltende zytogenetische und hämatologische Remissionen bei BCR-ABL positiven CML-Patienten (Kantarjian et al., 2010).

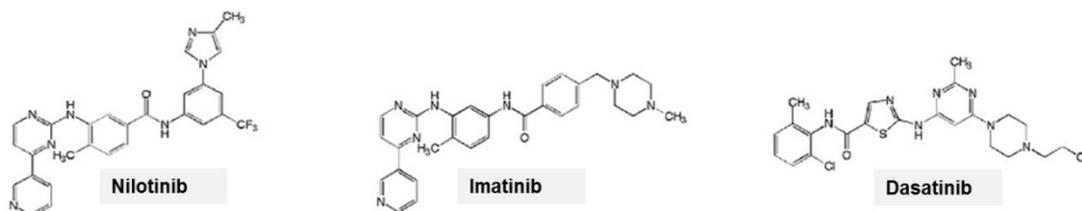


Abbildung 4: Chemische Strukturen von Nilotinib, Imatinib und Dasatinib.

Nilotinib wurde mittels rationalem Substanz-Design als Imatinib-Derivat entworfen. Dasatinib zeigt keine strukturelle Ähnlichkeit mit Imatinib, da es ursprünglich als SRC-Inhibitor entwickelt wurde. Die Abbildung wurde modifiziert nach O'Hare *et al.*, 2005.

Nilotinib ist ein Imatinib-Derivat, das die inaktive Form von BCR-ABL-Wildtyp und punktmutierte BCR-ABL-Varianten bindet. Der Inhibitor weist gegenüber Imatinib eine 20-fach erniedrigte IC_{50} -Konzentration in Bezug auf Proliferations-Inhibition bzw. eine 30-fach erniedrigte Konzentration für die BCR-ABL-Inhibition auf (O'Hare et al., 2005; Weisberg et al., 2005). Die Halbwertszeit von Nilotinib im humanen Serum liegt bei 17 Stunden und eine Vielzahl von zum Teil aktiven Metaboliten können im Serum detektiert werden. In *in vitro* Modellen führt Nilotinib zu einer Reduktion der BCR-ABL-Phosphorylierung, der Proliferation sowie zur Induktion von Apoptose (O'Hare et al., 2005). Weiterhin ist Nilotinib wirksam gegenüber 32 BCR-ABL-Mutationen, die unter Imatinib-Behandlung auftreten können (Weisberg et al., 2005). Im Vergleich zu Imatinib-behandelten Patienten führt Nilotinib zu deutlich höheren Raten von kompletten molekularem Ansprechen und zu einem verzögerten Progress der Erkrankung (Kantarjian et al., 2011). In klinischen Studien an Patienten mit Imatinib-Versagen führte Nilotinib in 55% der Patienten zu einer hämatologischen Antwort und in 31% der Patienten zu einer dauerhaften sowie kompletten hämatologischen Antwort (le Coutre et al., 2011).

1.4.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung von Philadelphia-Chromosom negativen myeloproliferativen Neoplasien

Philadelphia-Chromosom negative myeloproliferative Neoplasien weisen häufig aktivierende Mutationen im *JAK2*-Gen auf (Baxter et al., 2005; Levine et al., 2005; Ugo et al., 2005). *JAK2* stellt daher eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren dar. Eine Vielzahl von *JAK*-Inhibitoren wurden in den vergangenen Jahren in *in vitro* Modellen getestet. Derzeit befinden sich zwei Inhibitoren in der fortgeschrittenen klinischen Entwicklung in Phase III Studien: INC018424 und TG1012209.

Der *JAK1/2* Inhibitor INCB018424 zeigte in präklinischen Tests neben einer Hemmung der Proliferation, auch eine Unterdrückung der klonalen Koloniebildung von *JAK2V617F* positiven Zellen. Im Mausmodell führte die Gabe des Inhibitors zu einer deutlichen Milz-Reduktion sowie einem verlängertem Überleben der Tiere (Quintás-Cardama et al., 2010). Ein weiterer *JAK2* Inhibitor, TG101209, zeigte im *JAK2V617F*-Zellkulturmodell einen Wachstums-Arrest der Zellen, Induktion von Apoptose sowie die Inhibition von *JAK2V617F*-Phosphorylierung (Pardanani et al., 2007). Im Mausmodell resultierte die Gabe des Inhibitors in einer Reduktion der extramedulären Hämatopoese sowie der Verbesserung der Blutparameter (Wernig et al., 2008b). In den klinischen Studien von TG101209 und INCB018424 führte die Gabe zu einer deutlichen und anhaltenden Reduktion der Milz der Patienten. Insgesamt konnte eine Verbesserung der allgemeinen Krankheitssymptome festgestellt werden. INCB018424 ist daher mittlerweile in den USA zur Behandlung zugelassen. Bezüglich der *JAK2V617F*-Mutationslast zeigte TG10209 nur eine sehr moderate Wirkung, während unter Einnahme von INCB018424 eine 48%ige Reduktion festgestellt werden konnte. Es kommt trotz dem weiteren Vorhandensein von *JAK2V6717F* zu einer Besserung der allgemeinen Symptomatik der Patienten (Verstovsek et al., 2010; Pardanani et al., 2011).

1.4.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie

Das Auftreten einer *FLT3*-ITD führt zu einem verminderten krankheitsfreien Überleben und Gesamtüberleben der AML-Patienten. *FLT3*-ITD-Mutationen können bereits in leukämischen Stammzellen nachgewiesen werden (Levis et al., 2005), was die Rolle als frühe und treibende Mutation in der Pathogenese der AML betont. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche *FLT3*-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* getestet. Es

konnte dabei sowohl im Zellkulturmodell, im primären Patienten-Material und im Mausmodell gezeigt werden, dass die FLT3-Inhibition zur Induktion von Apoptose in FLT3-ITD positiven Zellen führt (Kelly et al., 2002; Levis et al., 2002; Weisberg et al., 2002). Eine Vielzahl klinischer Studien konnte aufgrund der Basis von vielversprechenden präklinischen Daten initiiert werden. Midostaurin ist ein Staurosporin-Derivat und wurde ursprünglich als Inhibitor für die Proteinkinase C entwickelt, stellte sich aber als potenter FLT3-Inhibitor heraus (Weisberg et al., 2002). Im *in vitro* Modell zeigte Midostaurin sowohl in FLT3-ITD positiven wie auch in negativen Zellen Proliferationshemmung und Induktion von Apoptose. Auch im Mausmodell konnte die Wirksamkeit des Inhibitors nachgewiesen werden. In einem Transplantationsmodell verhinderte die Gabe von Midostaurin kurz nach Transplantation von FLT3-ITD positiven Zellen das Auftreten eines AML-Phänotyps (Weisberg et al., 2002). In einer klinischen Phase II Studie, wurden 35 Patienten mit mutiertem FLT3-Rezeptor eingeschlossen. Hierbei zeigten 62% der Patienten eine mindestens 50%ige Reduktion der leukämischen Blasten im peripheren Blut und 11% der Patienten eine 50%ige Reduktion der Blasten im Knochenmark (Fischer et al., 2010). Die Effekte waren jedoch nur kurzfristig. In einer Phase III Studie wird derzeit die sequenzielle Gabe von Chemotherapie und Midostaurin geprüft (Stone et al., 2011). Unter Therapie mit Midostaurin kann es zum Auftreten einer FLT3-Punktmutation an Aminosäureposition 647 kommen, die zur sekundären Resistenz gegenüber dem Inhibitor führt, indem die Bindung des Inhibitors verhindert wird (Heidel et al., 2006). In einem *in vitro* Modell konnten weitere Punktmutationen nachgewiesen werden, die neben der Resistenz gegenüber Midostaurin, auch Resistenz gegenüber weiteren FLT3-Inhibitoren zeigen (Cools et al., 2004).

1.4.4 Aktuelle Herausforderungen in der Tyrosinkinase-Inhibitor-Therapie

Tyrosinkinase-Inhibitoren werden heutzutage zur Behandlung einer Reihe von malignen Erkrankungen eingesetzt. Die klinische Entwicklung der Tyrosinkinase-Inhibitoren wird dabei auf der Basis von pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der entsprechenden Substanzen gesteuert. Die meisten Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden dabei so entwickelt, dass sie die ATP-Bindungsstelle in der Kinase, in der aktiven Form der Kinase inhibieren (Liu and Gray, 2006; Okram et al., 2006). Dabei sollte die entsprechende Tyrosinkinase möglichst spezifisch inhibiert werden und nur ein begrenztes Spektrum anderer Kinasen inhibiert werden (Quintás-Cardama et al., 2007). Ferner muss diese Inhibition anhaltend genug für eine therapeutische Wirkung sein und die Substanz muss neben guten Absorptionsparametern auch eine

gute Löslichkeit aufweisen, um die Bioverfügbarkeit zu gewährleisten (Okram et al., 2006). Um in der Praxis das Ziel einer dauerhaften Kinaseinhibition zu erreichen, werden für die klinische Entwicklung vorwiegend Substanzen ausgewählt, die eine lange Plasma-Halbwertszeit aufweisen. Neben Imatinib, mit einer Halbwertszeit von 18 Stunden, weisen viele andere klinisch effektive Inhibitoren lange Halbwertszeiten in Patienten auf: Nilotinib 15 Stunden, Erlotinib 36 Stunden, Gefitinib 48 Stunden, Sorafenib 25-48 Stunden. Die Inhibitoren erreichen daher eine dauerhafte Inhibition der jeweiligen onkogenen Kinase (Druker et al., 2001; Cohen et al., 2004; Johnson et al., 2005; Weisberg et al., 2005; Kane et al., 2006). Diese Eckpfeiler der Inhibitor-Entwicklung basieren vorwiegend auf theoretischen Überlegungen und auf Erfahrungen, die im Rahmen der Entwicklung von Imatinib gemacht wurden.

Imatinib führt bei einer Konzentration von 1 μM nach 20-stündiger Inkubation zur Induktion von Apoptose in BCR-ABL positiven Zellen (le Coutre et al., 1999). In klinischen Studien wurde ebenfalls ein starker Zusammenhang zwischen den Serum Talspiegeln von Imatinib und der klinischen Antwort nachgewiesen (Picard et al., 2007; Larson et al., 2008). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine potente BCR-ABL-Inhibition, welche über die Phosphorylierung des Surrogat-Parameters CRKL bestimmt wurde, gut mit der klinischen Aktivität von Imatinib korreliert (Druker et al., 2001). Aufgrund der Erfahrungen mit Imatinib ist es allgemein akzeptiert, dass die onkogene Kinase kontinuierlich inhibiert werden muss, damit Tyrosinkinase-Inhibitoren klinisch und im zellulären Rekonstitutionsmodell wirksam sind. Diese anerkannte Annahme geriet jedoch in den letzten Jahren ins Wanken. Im Rahmen einer klinischen Studie wurden zwei Dosierungen von Dasatinib, einem Zweitgenerations-Inhibitor für BCR-ABL in der CML, miteinander verglichen. Der eine Arm der Patienten erhielt einmal täglich 100 mg Dasatinib, der andere zweimal täglich 70 mg. Für Dasatinib ist bekannt, dass die Halbwertszeit im Serum bei 3-4 Stunden liegt und keine aktiven Metabolite entstehen (Kamath et al., 2008). Beide Behandlungsregime der Studie erreichten dennoch die gleiche klinische Aktivität (Shah et al., 2008a). Anhand der Phosphorylierung des Surrogat-Parameters CRKL wurde nachgewiesen, dass bei einmal täglicher Gabe von Dasatinib, die Inhibition von BCR-ABL nur transient ist. Dennoch resultierte die einmal tägliche Gabe von hohen Dosen Dasatinib in guter klinischer Wirksamkeit, was zu einer Veränderung der Standard-Dosierung des Inhibitors führte (Shah et al., 2010). Weiterführende Analysen der Kinaseinhibition *in vitro* und *ex vivo* in BCR-ABL positiven Zellen konnte zeigen, dass eine Exposition der Zellen mit einer Hochdosis an Inhibitor Apoptose bereits nach Inkubationszeiten von 20 Minuten bis zu 4 Stunden auslösen kann (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Von den Autoren der Arbeiten wurde postuliert, dass die Tiefe der Kinaseinhibi-

tion und damit die Potenz des verwendeten Inhibitors die entscheidenden Parameter für die Effizienz eines Inhibitors darstellten. Die allgemein akzeptierte Annahme der kontinuierlichen Inhibition als einzige Möglichkeit zum klinischen Erfolg geriet durch diese Arbeiten ins Wanken.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die von Shah *et al.* veröffentlichten Daten deuten an, dass die kurzzeitige Inhibition der BCR-ABL Kinase durch hohe Konzentrationen Dasatinib zur Induktion von Apoptose führen kann (Shah *et al.*, 2008b), was dem bisher allgemein akzeptierten Prinzip der kontinuierlichen Kinaseinhibition zur Induktion von Apoptose widerspricht. Durch diese Daten angeregt, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit vier grundsätzliche Punkte der Inhibition onkogener Kinasen durch Tyrosinkinase-Inhibitoren untersucht werden:

- 1) Bestimmung der determinierenden Parameter für die Apoptosekinetik
- 2) Analyse der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen TKI-Konzentrationen in verschiedenen zellulären Rekonstitutionsmodellen
- 3) Untersuchung des molekularen Mechanismus der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen TKI-Konzentrationen
- 4) Charakterisierung prädiktiver Signaltransduktionsmarker für das Überleben von Zellen unter TKI-Exposition

Die Datenerhebung erfolgte dabei zunächst in murinen Ba/F3-BCR-ABLp210-Zellen, als Modell für eine chronische myeloische Leukämie. Für die Inhibition von BCR-ABL standen die Tyrosinkinase-Inhibitoren Dasatinib, Imatinib und Nilotinib zur Verfügung. Die entscheidenden Experimente wurden anschließend in humanen BCR-ABL positiven K562-Zellen sowie an primärem humanen Material verifiziert. Die relevanten Erkenntnisse aus dem BCR-ABL-System sollten im Anschluss auf weitere Onkogen-abhängige Modelle übertragen werden. Dazu wurden das murine Ba/F3-FLT3-ITD sowie das Ba/F3-EPOR-JAK2V617F Modell-System gewählt. Die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen wurden mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Midostaurin behandelt, während Ba/F3-EPOR-JAK2V617F Zellen mit dem Jak Inhibitor I inkubiert wurden.

2 Material

2.1 Antikörper

Im Folgenden werden die für die Western Blot Analysen und für die FACS-Messungen verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 1: Für Western Blot verwendete Antikörper.

Antigen	Epitop	Firma	Kat-Nr.	AK-Lösung	Verdünnung	Größe [kDa]
4G10	Y	Upstate	05-1050	5% TM	1:1000	
β -Actin			A5441-2	5% TM	1:10000	42
c-ABL		Cell Signaling	2865	5% BSA	1:1000	c-Abl:135 Bcr-Abl: 210
p-c-ABL	Y412	Cell Signaling	9427	5% BSA	1:1000	c-Abl:135 Bcr-Abl: 210
p-BCR	Y177	Cell Signaling	3901	5% BSA	1:1000	Bcr:160 Bcr-Abl: 210
Caspase3		Santa Cruz	7148	5% TM	1:200	32
aktivierte Caspase3	Asp175	Cell Signaling	9664	5% TM	1:500	17, 19
p-CRKL	Y207	Cell Signaling	3181	5% BSA	1:1000	39
CRKL		Santa Cruz	319	5% BSA	1:200	36
p-ERK 1/2	T202/ Y204	Cell Siganling	9106	5% BSA	1:2000	42, 44
ERK1/2		Cell Signaling	9102	5% BSA	1:2000	42, 44
GAPDH			H86504M	5% TM	1:1000	36
p-STAT5	Y694/Y699	Upstate	495	5% TM	1:1000	92, 94
STAT5 A		Santa Cruz	1081	5% TM	1:100	92
p-Tyr 100	Y	Cell Signaling	5465	5% TM	1:1000	

Tabelle 2: Für FACS-Analysen verwendete Antikörper.

Antigen	Epitop	Konjugat	Firma	Kat-Nr.	Verdünnung
ABCB1		FITC	Becton & Dickinson	557002	1:10
ABCG2		PE	Becton & Dickinson	56118	1:10
Annexin V		PE	Becton & Dickinson	5165875	1:20
aktivierte Caspase3	Asp715	Alexa488	Cell Siganling	9669	1:50
p-CRKL	Y207	PE	Becton & Dickinson	560789	1:10
p-ERK1/2	T202/Y204	PE	Becton & Dickinson	612566	1:10
p-STAT5	Y694	Alexa647	Becton & Dickinson	612599	1:10

2.2 Chemikalien und Reaktionskits

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Herkunft der verwendeten Chemikalien und Reaktionskits.

Firma (Firmensitz)	Produkt
Becton & Dickinson (Heidelberg)	AnnexinV-Binding-Buffer
Calbiochem (Darmstadt)	Jak Inhibitor I
Fermentas (St-Leon-Roth)	Taq-Polymerase, RNase, MgCl ₂
Invitrogen (Karlsruhe)	DNazol, Natrium-Pyruvat, L-Glutamin, Nicht-Essentielle Aminosäure, Asparagin, PBS,
Novartis (Basel, Schweiz)	Imatinib, ¹⁴ C-Imatinib, Nilotinib, Midostaurin
PAA (Karlsruhe)	FCS, Ficoll
Perkin Elmer (Rodgau)	Luma Safe Plus
Roche (Mannheim)	Complete, dNTPs, PhoStop,
Roth (Karlsruhe)	30%-Acrylamid-Mix, Ammonium-Persulfat, BSA, DMSO, EDTA, EGTA, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Glycerin, HEPES, KHCO ₃ , Methanol, β-Mercaptoethanol, Milchpulver, MgCl, NaCl, NaF, Natriumcitrat, NH ₄ Cl, Paraformaldehyd, SDS, TEMED, Tris, Tween, Triton-x, Ponceau-S
SelleckChem (Houston, USA)	Dasatinib
Sigma-Aldrich (München)	Propidiumiodid
Tocris (Missouri, USA)	PSC-833

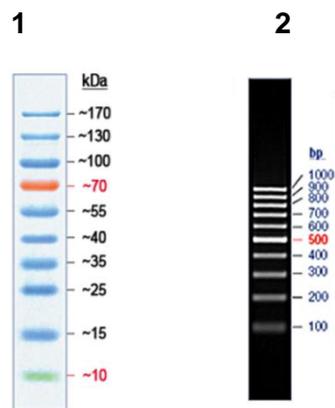
2.3 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Herkunft der verwendeten Geräte.

Firma (Firmensitz)	Produkt
Becton & Dickinson (Heidelberg)	FACS Canto II, FACS Calibur
Binder (Tuttlingen)	Brutschrank
Eppendorf (Hamburg)	Tischzentrifuge
Heraeus (Hanau)	Zentrifuge,
Hund (Wetzlar)	Mikroskop
Perkin Elmer (Rodgau)	TriCarb 1600 TR <i>Liquid Scintillation Analyzer</i>
Thermo Scientific (Braunschweig)	Zellkulturbank

2.4 Größenstandards



- 1) PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas (St. Leon-Roth)
- 2) 100 bp Standard für 2% Gele, Fermentas (St. Leon-Roth)

2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide der Firma MWG Eurofins (Ebersberg) sind in Tabelle 5 dargestellt. Die Sequenzangabe erfolgt immer in 5´-3´-Orientierung.

Tabelle 5: Auflistung der zur PCR eingesetzten Primer.

Bezeichnung	Länge [bp]	Temperatur [°C]	Sequenz [5´-3´]	Verwendung
mEx12_test_F	23	57,3	ctttcttgaagcagcaagcatg	Amplifikation + Sequenzierung JAK2
mEx12_test_R	22	57,3	tagaaaatgcatggcccatgcc	Amplifikation + Sequenzierung JAK2
mEpoR-test_F	19	57,3	agaagagggcagccacgtg	Amplifikation EpoR
mEpoR-test_R	19	57,3	ctagcggtcagtagtgacgc	Amplifikation EpoR

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion von Gesamt-DNA aus Zellkultur-Zellen wurde DNazol nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei werden 1×10^7 Zellen pelletiert und in 2 ml DNazol gelöst. Das in der Lösung enthaltene Guanidin löst dabei die Zellmembran auf, inhibiert RNasen und löst die DNA. Zur Fällung der DNA aus der Lösung wird 100% Ethanol im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Durch die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C wird die DNA pelletiert. Anschließend wird das Pellet in 95% Ethanol resuspendiert und der Ansatz wird erneut bei 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Waschvorgang wird wiederholt, bevor das Pellet getrocknet wird. Das DNA-Pellet wird in 200 µl Aqua dest. aufgenommen und über Nacht bei 37°C unter Schütteln gelöst. Abschließend wird ein RNase-Verdau mit 5 µl RNase (10 mg/ml) für eine Stunde bei 37°C durchgeführt.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA wird eine photometrische Messung durchgeführt. Hierfür wird eine 1:50 Verdünnung der DNA in Wasser hergestellt. Die Extinktion der Probe bei 260 nm und 280 nm wird mit Hilfe des Photometers ermittelt. Auskunft über die Reinheit der DNA gibt der Quotient aus den beiden Extinktionswerten. Der Wert sollte für eine reine DNA-Probe zwischen 1,6 und 1,8 liegen (Sambrook et al., 1989).

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung eines PCR-Erfolgs, eines Restriktionsverdaus oder der Qualität von isolierter DNA wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die zu analysierende Probe wird dafür mit Ladebuffer versetzt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Die Probe wandert im angelegten elektrischen Feld von der Anode zu Kathode. Durch die Quervernetzungen der Agarose im Gel wird die Probe dabei nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Stärke der Quervernetzung wird durch den prozentualen Anteil der Agarose bestimmt und wird in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt. Um die Größe der Probe bestimmen zu können, wird zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen (s. 2.4). Die Visualisierung der DNA im Gel erfolgt durch eine

10-minütige Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff und wird durch UV-Licht sichtbar gemacht.

Ladepuffer	50	%	Glycerin
	1	%	SDS
	125	mM	EDTA
	0,05	%	Bromphenolblau
	0,05	%	Xylencyanol
10x TBE Puffer	900	mM	Tris
	900	mM	Borsäure
	10	mM	EDTA
Agarose-Gel	1/2	%	Agarose
	100	ml	1x TBE Puffer
Laufpuffer	1	x	TBE-Puffer
Färbelösung	1	l	Aqua dest.
	0,2	%	Ethidiumbromid (10 mg/ ml)

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Konstrukt-Expression

Zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche wird eine Polymerase-Kettenreaktion (**PCR**) durchgeführt. Das Grundprinzip dieser Reaktion ist die enzymatische Vermehrung einer definierten DNA-Sequenz. Die PCR kann in drei Phasen unterteilt werden. Es folgen nacheinander Denaturierung der DNA-Stränge, Anlagerung der Oligonukleotide (**Primer**) und Verlängerung der Oligonukleotide. Nach der Denaturierungsphase bei 95°C liegt die DNA einzelsträngig vor. An die einzelsträngige DNA können sich die Oligonukleotide anlagern. Dies geschieht bei einer Temperatur, die bestimmt wird vom Guanin-Cytosin-Gehalt der Nukleotide. Eine hitzestabile Polymerase kann in der anschließenden Elongationsphase bei 72°C, ausgehend vom 3'OH-Ende des Primers, eine Kopie der DNA-Matrizen bzw. cDNA-Matrize herstellen. Die Dauer dieser Phase

richtet sich dabei nach der Größe des zu amplifizierenden Abschnitts. Einer Faustregel nach werden pro kb des Fragments ca. 2 Minuten Elongationszeit angenommen.

Ansatz der JAK2/ EpoR PCR		PCR-Bedingungen		
5 µl	10x Puffer (PCR)	Zyklen	Temperatur	Zeit [Minuten]
3 µl	MgCl ₂			
1,5 µl	dNTP	1	95°C	3
1 µl	Primer F/ R (10 pmol)	38	95°C	1
1 µl	Taq-Polymerase (1U/ µl)	38	58°C	1
X µl	100 ng DNA-Template	38	72°C	1,15
ad 50 µl	Aqua dest.	1	72°C	3

3.1.5 Sequenzierung

Die Basenabfolge eines DNA-Moleküls oder eines PCR-Produkts wird durch Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger bestimmt (Sanger et al., 1992). Bei dieser Methode enthält der Reaktionsansatz neben dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Das Template wird als Einzelstrang amplifiziert. Der Einbau von fluoreszenzmarkierten dNTPs führt zu einer gezielten, aber statistisch verteilten Unterbrechung der Komplementärstrang-Synthese, da die für die Kettenverlängerung notwendige 3'OH-Gruppe der Ribose fehlt. Mittels eines Kapillarelektrophoresegeräts werden die Fragmente der Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der Didesoxynukleotide wird dabei von einem Laser detektiert. Die Fluoreszenzdaten werden anschließend in Sequenzdaten umgesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit notwendigen Sequenzierungsarbeiten werden von der Firma Star Seq (Mainz) durchgeführt.

Ansatz der Sequenzierungsreaktion	
200 ng	PCR-Produkt
1 µl	Primer (10 pmol)
ad 7 µl	Aqua dest.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion

Bevor Zellen proteinbiochemisch auf ihre Aktivierungs- und Phosphorylierungszustände analysiert werden können, ist es erforderlich, die Proteine aus den Zellen zu isolieren. Um Volllysate von Proteinen herzustellen werden 2–4x10⁶ Zellen zweimal in eiskaltem PBS resuspendiert, um FCS-Rückstände des Kulturmediums zu entfernen. Das Zellpellet wird danach in 100 µl Japan-Lyse-Puffer aufgenommen, der zuvor mit

Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt wurde. Unter gelegentlichem vortexen werden die Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C, um Zelltrümmer und Membranbestandteile von Proteinen zu trennen. Das so geklärte Lysat wird entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

Japan-Lyse-Puffer:

50	mM	Hepes pH 7,4
10	%	Glycerol
150	mM	NaCl
1	%	Triton X
1,5	mM	MgCl ₂
5	mM	EGTA

Lagerung bei 4°C

Protease- /

Phosphatase-Inhibitoren:

1	x	Complete
10	mM	NaF
1	x	PhosphoStop

Lagerung der Inhibitoren bei -20°

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Proteinlysaten wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass die verwendete Coomassie-Blau-Lösung in saurer Umgebung mit Proteinen Komplexe bildet, was mit einer Farbänderung der Lösung von rotbraun hinzu blau einhergeht. Dieser Umschlag ist verbunden mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Die kolorimetrische Detektion des Farbumschlages erfolgt mit einem Photometer. Für die exakte Konzentrationsbestimmung des Proteinlysats ist es erforderlich den Messwert an eine mitgeführte Standardreihe anzulehnen.

3.2.3 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht das Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit des anionischen Detergenz Natriumdodecyl-Sulfat (**SDS**). Das stark negativ geladene SDS bindet dabei an die hydrophoben Bereiche der Proteinmoleküle. Die Eigenladung des Proteins ist

somit vernachlässigbar. Das Laufverhalten im elektrischen Feld wird nur noch von der Anzahl der SDS-Moleküle, also der Größe der Proteine bestimmt. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Der gewählte Vernetzungsgrad des Trenngels ist abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proteinlysate mit SDS-Probenpuffer versetzt. Das darin enthaltene SDS, β -Mercaptoethanol sowie das Erhitzen für fünf Minuten bei 95°C denaturiert die Proteine, was zu einer Anlagerung von SDS an die Proteine führt. Die Proben werden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Im Sammelgel wird eine Stromstärke von 80V, im Trenngel von 100–120V angelegt.

SDS Probenpuffer:	8	%	SDS
	250	mM	Tris/HCl pH 6,8
	40	%	Glycerin
	20	%	β -Mercaptoethanol
	0,01	%	Bromphenolblau
Laufpuffer:	25	mM	Tris
	250	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
Sammelgel (5 ml) 5%:	3,4	ml	Aqua dest.
	0,83	ml	30% Acrylamid-Mix
	0,63	ml	1,5 M Tris pH 6,8
	0,05	ml	10% SDS
	0,1	ml	10% Ammoniumpersulfat
	1	%	TEMED
Trenngel (10 ml)	2,7/ 2,3	ml	Aqua dest.
	8%/ 15%:	2,7/ 5	ml
	2,5/ 2,5	ml	1,5 M Tris pH 8,8
	0,1/ 0,1	ml	10% SDS
	0,1/ 0,1	ml	1% Ammoniumpersulfat
	1	%	TEMED

3.2.4 Western Blot

Um durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine immunologisch nachzuweisen und so eine Aussage über die Menge und Modifikationen von Proteinen treffen zu können, ist es notwendig eine Immundetektion durchzuführen. Dabei werden die Proteine auf eine spezielle Membran übertragen und mittels eines spezifischen Antikörpers detektiert.

3.2.4.1 Protein-Transfer

Die Proteine werden beim Transfer vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran überführt. Durch die hydrophoben Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf dieser Nitrocellulose-Membran haften. Der Transfer erfolgt im *Wet-Blot*-System bei 100 V unter Kühlung durch Eis für 1,5 Stunden. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft.

Ponceau S:	0,5	%	Ponceau
	5	%	Essigsäure
Transfer-Puffer:	25	mM	Tris
	250	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
	20	%	Methanol

3.2.4.2 Immundetektion

Der immunologische Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgt durch enzymgekoppelte Antikörper. Zuvor werden unspezifische Bindungsstellen mit Hilfe einer Blockierungslösung blockiert, die für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert wird. Die Lösung wird durch 1x TBST ersetzt. Es folgt die Inkubation mit den spezifischen primären Antikörpern, die an das gewünschte Zielprotein spezifisch binden. Die verwendeten Verdünnungen und Inkubationszeiten der jeweiligen Antikörper sind Tabelle 1 zu entnehmen. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem und überschüssigem Antikörper wird die Membran dreimal mit 1x TBST gewaschen. Danach folgt der Nachweis des Antikörper-Protein-Komplexes. Dazu wird ein gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Dieser Antikörper ist mit einer *hor*-

seradish peroxidase (**HRP**) gekoppelt, welche die Oxidation von Luminol katalysiert. Die Lichtdetektion erfolgt mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Detektors.

Blockierungslösung:	1	x	TBS
	1	%	Tween
	5	%	Milchpulver
10xTBST:	0,2	M	Tris
	1,4	M	NaCl
	0,1	%	Tween

3.2.4.3 Dehybridisierung von Nitrocellulose-Membranen

Nach erfolgter Detektion ist es möglich weitere Antikörper auf der Membran zu hybridisieren. Dazu müssen zunächst die gebundenen Antikörperkomplexe entfernt werden. Dies wird durch Inkubation der Membran in einer Dehybridisierungslösung bei 54°C für 20 Minuten unter ständigem Schütteln erreicht. Nach der Inkubation wird die Membran dreimal in 1xTBST gewaschen und vor der erneuten Antikörperinkubation eine Stunde mit Blockierungslösung behandelt.

Dehybridisierungs- lösung:	62,5	mM	Tris-HCL pH 6,7
	2	%	SDS
	100	mM	β-Mercaptoethanol

3.3 Zellbiologische Methoden

Die aufgelisteten Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen und den Sicherheitsbestimmungen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.3.1 Allgemeine Methoden

3.3.1.1 Zelllinien und Kultivierung

Die verwendeten Zelllinien und ihre Kulturbedingungen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Alle Zellen werden bei 37°C, 5%iger CO₂-Begasung und 80%iger Luftfeuchte kultiviert. Das Wachstum der parentalen Ba/F3-Zelllinie sowie der Ba/F3-Wildtyp Zelllinien ist abhängig von Interleukin-3 (**IL-3**). Dies wird aus steril filtriertem Zellkulturüberstand der WEHI-3B-Zelllinie gewonnen. Diese Zellen produzieren IL-3 und sezernieren es ins

Medium. Für alle Zelllinien wird 500 ml Medium mit 29 ml Additiva versetzt. Die Additiva werden bei 4°C gelagert.

Additiva:	100 ml	PBS
	100 ml	PBS mit 0,0035% β -Mercaptoethanol
	100 ml	1 M Hepes-Puffer pH 7,2
	100 ml	100 mM Natriumpyruvat
	100 ml	200 mM L-Glutamin
	60 ml	Nicht-essentielle Aminosäuren
	20 ml	Asparagin (10mg/ ml)

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien, Herkunft, Kennzeichen und Kulturbedingungen.

Zelllinie	Herkunft	Kennzeichen	Kulturbedingungen
Ba/F3 parental	<i>Mus musculus</i> Pro-B-Lymphozyten		RPMI1640 + 10% FCS + Additiva + 10% IL-3
Ba/F3-BCR-ABL	<i>Mus musculus</i> Pro-B-Lymphozyten	Transfiziert mit humanem BCR-ABL p210	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva
Ba/F3-FLT3-ITD	<i>Mus musculus</i> Pro-B-Lymphozyten	Transfiziert mit humanem FLT3-ITD(598)-Rezeptor	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva
Ba/F3-JAK2-WT	<i>Mus musculus</i> Pro-B-Lymphozyten	Transfiziert mit murinem Wildtyp-JAK2 und Erythro- poetin-Rezeptor	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva + 10% IL-3 + 2 μ g/ ml Puromycin + 1 mg/ ml G418
Ba/F3-JAK2-VF	<i>Mus musculus</i> Pro-B-Lymphozyten	Transfiziert mit murinem V617F-JAK2 und Erythro- poetin-Rezeptor	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva + 2 μ g/ ml Puromycin + 1 mg/ ml G418
K562	<i>Homo sapiens</i> CML im Blastenschub	BCR-ABL positiv	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva
K562-ABCB1	<i>Homo sapiens</i> CML im Blastenschub	BCR-ABL positiv, trans- fiziert mit humanem ABCB1-Transporter	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva
K562-ABCG2	<i>Homo sapiens</i> CML im Blastenschub	BCR-ABL positiv, trans- fiziert mit humanem ABCG2-Transporter	RPMI1640 + 10% FCS + Additiva
WEHI-3B	<i>Mus Musculus</i> Myelomonozytische Leukämie		IMDM Medium, + 10% FCS + Additiva

3.3.1.2 Auftauen von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen werden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend werden sie in vorgewärmtes Medium überführt und bei 1.400 rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen werden anschließend zweimal in PBS resuspendiert, was dem Entfernen des Dimethylsulfoxids (**DMSO**) dient, welches Bestandteil des Einfriermediums ist. Danach wird das Zellpellet in 25 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und zur Kultivierung im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.3.1.3 Mediumwechsel und Passagieren

Für optimales Wachstum werden die verwendeten Zelllinien jeden zweiten bis dritten Tag bei 1.400 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Mediumüberstand wird abgenommen und das Pellet wird in 25 ml frisches Medium aufgenommen. Haben die Zellen in der Flasche eine gewisse Zellzahl pro ml erreicht, müssen sie passagiert werden. Dazu werden die Zellen sedimentiert und das Pellet wird anschließend in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Je nach Konfluenz wird nur ein Teil dieser Zellsuspension in 25 ml Medium überführt und weiterkultiviert.

3.3.1.4 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung werden die Zellen stufenweise auf -80°C abgekühlt und zur Lagerung in flüssigem Stickstoff überführt. Dem normalen Kulturmedium wird dazu vorher DMSO zugesetzt, um die Bildung von Eiskristallen innerhalb und außerhalb der Zellen zu verhindern. Zum Einfrieren wird genauso verfahren wie zum Passagieren. Das Zellpellet wird jedoch in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt.

Einfriermedium:	70	%	Kulturmedium
	20	%	FCS
	10	%	DMSO

3.3.1.5 Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Vollblut

Als mononukleäre Zellen *peripheral blood mononuclear cells* (**PBMC**) werden Monozyten und Lymphozyten bezeichnet. Ebenso finden sich eventuell vorhandene myeloische Vorläuferzellen und leukämische Blasten in dieser Zellfraktion wieder. Zur Isolation dieser Zellpopulation aus Vollblut wird eine Dichtegradienten-Zentrifugation

durchgeführt. Dafür wird zunächst heparinisiertes Blut 1:2 mit PBS gemischt und im Verhältnis 1:1 vorsichtig auf Ficoll geschichtet. Durch die 20-minütigen Zentrifugation bei 1.400 rpm für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse wird das Blut in die Zellfraktionen aufgeteilt. Die PBMC Fraktion befindet sich an der Interphase zwischen Ficoll und Serum und wird abgenommen. Es folgen zwei Waschschrte mit PBS um Ficollreste sowie Serumreste und Thrombozyten zu entfernen.

Meist ist das Zellpellet aufgrund von Erythrozyten-Verunreinigungen nach dem Waschen noch immer leicht rot, so dass eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt wird. Hierzu wird das Pellet in 15 ml Erylyse-Puffer resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubation werden die Zellen erneut in PBS resuspendiert, um die Pufferrückstände zu entfernen. Nach der Aufreinigung werden die Zellen entweder wie unter 3.3.1.4 beschrieben weggefroren oder zur Kultivierung in RPMI1640 mit 20% FCS und Additiva aufgenommen.

Erylyse-Puffer	0,155 M	NH ₄ Cl
	0,001 M	KHCO ₃
	0,1 M	EDTA

Der pH-Wert wird auf pH7,29 eingestellt und der Puffer wird bei 4°C gelagert.

3.3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Gesamtzellzahl wird mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu werden die Zellen zentrifugiert und in ein definiertes Volumen überführt. Die Zellsuspension wird 1:10 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau erlaubt die Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen, da tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und dunkelblau angefärbt werden. 10 µl dieser Mischung werden in die Zählkammer gegeben. Nach Auszählung der Zellen in einem 4 x 4 Quadrat kann die absolute Zellzahl durch die folgende Formel errechnet werden: Zellen pro ml = bestimmte Zellzahl x 10.000 x Verdünnungsfaktor

3.3.1.7 Bestimmung der Zellgröße und des zellulären Volumens

Um die intrazellulären TKI-Konzentrationen bestimmen zu können, werden Ba/F3-BCR-ABL sowie K562 Zellen im Durchlicht-Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert. Der Zelldurchmesser wird dann mit Hilfe der MetaMorph® Software bestimmt. Der mittlere Durchmesser von 100 Zellen wird verwendet, um das zelluläre Volumen zu errechnen.

Unter der Annahme, dass die gemessenen Zellen sphärisch sind, wird die folgende Formel zur Berechnung verwendet: $V = 4/3 \times \pi \times r^3$

3.3.1.8 Berechnung der intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration

Die Berechnung der intrazellulären Imatinib-Konzentration ($C_{\text{TKI intrazellulär}}$) erfolgte unter der Annahme, dass die TKI-Konzentration in den Zellkulturüberständen ($C_{\text{TKI Überstand}}$), zwei Stunden nach dem Entfernen der Inhibitoren direkt mit den intrazellulären TKI-Konzentrationen korrelieren: $C_{\text{TKI Überstand}} = C_{\text{TKI intrazellulär}} \times V_{\text{Zellen}} \times 1/V_{\text{Überstand}}$

Daher kann die intrazelluläre TKI- Konzentration, wie folgt berechnet werden:

$$C_{\text{TKI intrazellulär}} = C_{\text{TKI Überstand}} \times V_{\text{Überstand}} \times 1/V_{\text{Zellen}}$$

3.3.2 Behandlung der Zellen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren

3.3.2.1 Dauerbehandlungen

Für Dauerbehandlungen werden 5×10^4 Zellen/ ml am Tag des Experiments mit dem TKI in der entsprechenden Konzentration zugesetzt (s. Tabelle 7). Als Kontrolle dient ein Ansatz, der mit dem entsprechenden Volumen des TKI-Lösungsmittels, DMSO, versetzt wird. Die maximale DMSO-Konzentration beträgt 0,35%. Je nach Versuch werden die Ansätze an verschiedenen Zeitpunkten nach der Inkubation lysiert und später mittels Western Blot analysiert oder die Zellen werden nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubationszeit für FACS-Färbungen verwendet.

Tabelle 7: Zur TKI-Behandlung verwendete Zelllinien und TKI-Konzentrationen.

Zelllinie	TKI	Konzentration
Ba/F3-BCR-ABL	Imatinib	0,25 μM 0,5 μM 25 μM
Ba/F3-BCR-ABL	Dasatinib	1 nM 10 nM / 25 nM 100 nM
Ba/F3-BCR-ABL	Nilotinib	25 nM 0,4 μM 1 μM
Ba/F3-FLT3-ITD	Midostaurin	35 nM 100 nM 3,5 μM
Ba/F3-JAK2-V617F	Jak Inhibitor I	1 μM 2 μM 10 μM

3.3.2.2 Auswaschen von Tyrosinkinase-Inhibitoren

Um die Zellen nur für kurze Zeitspannen mit TKI zu exponieren, das Zellverhalten jedoch über einen längeren Zeitverlauf nach der Behandlung zu analysieren, ist es erforderlich, die TKI Behandlung zu beenden.

Zum Auswaschen der Inhibitoren, **Wash Out** genannt, werden 5×10^4 ml behandelte Zellen durch Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Das Medium, welches den TKI enthält wird verworfen. Die sedimentierten Zellen werden anschließend zweimal mit einem dem Kulturmedium äquivalenten Volumen PBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten werden die Zellen bei 1400 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Der Waschüberstand wird jeweils verworfen. Nach den Waschschrritten werden die Zellen in frisches, TKI-freies Zellkulturmedium überführt und im Brutschrank weiter inkubiert. Je nach Versuch verbleiben die Zellen bis zur Analyse im Brutschrank oder die Zellen werden erneut gewaschen (s. 3.3.2.3). Eine schematische Übersicht über den Ablauf des *Wash Out* ist in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 5: Schematischer Ablauf der *Wash Out* Experimente.

Nach 2-stündiger TKI-Inkubationszeit werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um die Inkubation zu beenden. Die Analyse der Proben erfolgte beispielsweise mittels Apoptose-Assays.

3.3.2.3 Repetitives *Wash Out*

Um zu überprüfen, ob Zellen durch Wiederholen der Waschprozedur vor der Apoptoseinduktion nach TKI-Behandlung geschützt werden können, unterlaufen die Zellen nach dem *Wash Out* (s. 3.3.2.2) und einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank erneut die beschriebene Waschprozedur. Die Proben werden entsprechend der durchlaufenen Waschschrritte **1x** oder **2x** benannt. Nach dem zweiten Mal Waschen werden die Zellen erneut für zwei Stunden zur Inkubation in den Brutschrank gestellt, bevor sie zum dritten Mal gewaschen werden. Diese Proben werden mit **3x** bezeichnet. Eine schematische Übersicht über den Ablauf gibt Abbildung 6. Die Proben werden 24 und 48 Stunden nach Start des Experiments mittels Apoptose-Assays (s. 3.3.3.2, 3.3.3.3, 3.3.3.4) analysiert. Eine weitere Analysemöglichkeit besteht darin, die Zellen zwei Stunden nach den jeweiligen Waschschrritten zu lysieren und für Western Blot Analysen oder für die Durchfluss-Zytometrie einzusetzen.

3.3.2.4 Wash Out mit Mediumtransfer

Zur Beantwortung der Frage, ob TKI behandelte Zellen in der Lage sind intrazellulär retinierten TKI wieder freizusetzen, wird ein *Wash Out* mit Mediumtransfer durchgeführt. Dabei wird das Zellkulturmedium der TKI-behandelten Zellen vor den Waschschrritten auf, bis zu diesem Zeitpunkt unbehandelte Zellen übertragen.

Vor der Durchführung der ersten Waschprozedur werden TKI-exponierte Zellen und Zellkulturmedium durch Zentrifugation voneinander getrennt. Gleichzeitig werden bisher unbehandelte Zellen sedimentiert und das Kulturmedium wird verworfen. Diese unbehandelten Zellen werden nun im Zellkulturmedium der behandelten Zellen inkubiert. Die so behandelten Zellen werden im Folgenden als Probe **S1** bezeichnet. Ebenso wird vor dem zweiten *Wash Out* verfahren: Einmal gewaschene TKI-exponierte Zellen werden nach 2-stündiger Inkubation in TKI-freiem Zellkulturmedium pelletiert. Der Zellkulturüberstand wird erneut auf zuvor unbehandelte Zellen transferriert. Diese Probe erhält die Bezeichnung **S2**. Ebenso wird mit dem Zellkulturüberstand vor Durchführung des dritten *Wash Outs* verfahren, **S3**. Die auf diese Weise gewonnenen Proben werden entweder nach 24 und 48 Stunden nach Start des Experiments in Apoptose-Assays (s. 3.3.3.2, 3.3.3.3 und 3.3.3.4) analysiert oder die Zellen werden zwei Stunden nach den jeweiligen Schritten für Western Blot Analysen aufbereitet. Die Abbildung 6 zeigt den schematischen Verlauf des repetitiven *Wash Outs* mit Mediumtransfer.

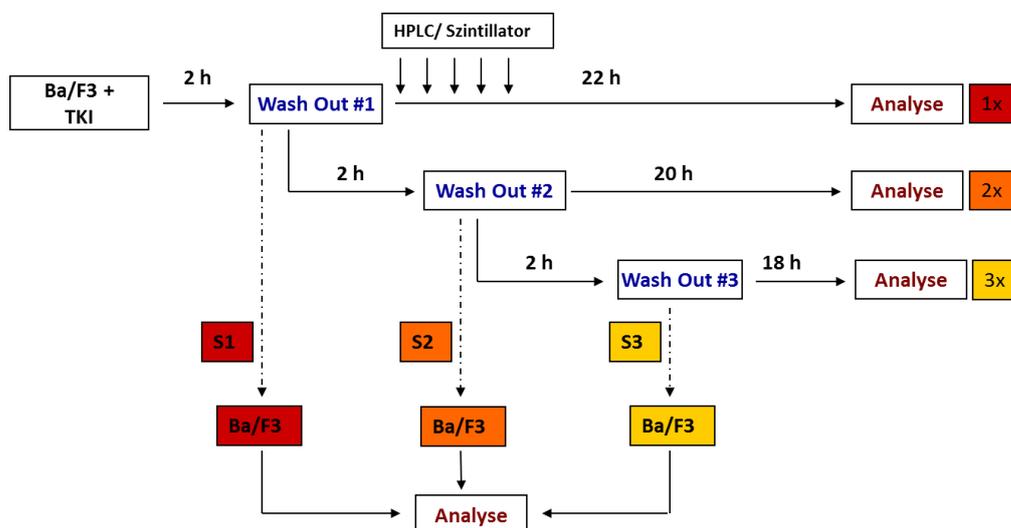


Abbildung 6: Schematischer Ablauf des repetitiven *Wash Outs* mit Mediumtransfer.

Die genaue Durchführung der einzelnen Schritte und die Bezeichnung der Proben sind unter 3.3.2.3 und 3.3.2.4 erklärt. Die für 2 Stunden TKI-behandelten Zellen werden bis zu dreimal einem *Wash Out* unterzogen (**1-3x**), wobei vor jedem Waschschrift das Zellkulturmedium dieser Zellen auf vormals unbehandelte Zellen übertragen wird (**S1-S3**). Die Analyse der Proben erfolgt entweder im Western Blot oder mittels Durchfluss-Zytometrie, HPLC oder Szintillator.

3.3.3 Durchfluss-Zytometrie

Grundlage einer **FACS**-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) ist eine Einzellsuspension, in der die Zellen einzeln einen fokussierten Laserstrahl passieren. Bei der Passage des Laserstrahls wird das von der Zellgranularität erzeugte Streulicht (**SSC**) und das von der Größe erzeugte Fluoreszenzlicht (**FSC**) separat detektiert wird. Mittels dieser Technik lassen sich große Zellzahlen in kurzer Zeit analysieren. Die Analyse findet auf Einzelzellebene statt, wodurch sich auch sehr kleine Zellpopulationen mit bestimmten Eigenschaften identifizieren lassen. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Laser steigt die Anzahl der Parameter, die analysiert werden können.

3.3.3.1 Intrazelluläre Messung von phosphorylierten Proteinen

Der Phosphorylierungszustand von Proteinen gibt entscheidende Informationen über den Aktivitätszustand des Proteins. Um den genauen Aktivitätszustand verschiedener Proteine in einer Zelle zu erhalten, bietet die Durchfluss-Zytometrie den Vorteil mehrere Parameter parallel auf Einzelzellebene verfolgen zu können. Dabei werden die ausgewählten Phosphorylierungsstellen von Proteinen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper markiert. Bei der gleichzeitigen Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome muss vor der Messung die Überlappung der Emissionsspektren kompensiert werden, wenn sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome überlagern. Die verwendeten Einstellungen und Kompensationen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Zur Analyse von phosphorylierten Proteinen in der Zelle ist es entscheidend die Zellen zunächst zu fixieren, um den Phosphorylierungszustand der Zellen zu erhalten. Des Weiteren muss die Plasmamembran der Zellen im Verlauf permeabilisiert werden, um den Antikörpern den Weg in die Zelle zu ermöglichen. Zunächst werden 1×10^6 Zellen im FACS-Röhrchen pelletiert. Die Zellen werden anschließend unter vortexen in 500 μ l 4%igem Paraformaldehyd resuspendiert und anschließend für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und somit fixiert. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen unter vortexen in 500 μ l 90%igem Methanol resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 500 μ l Färbepuffer gewaschen, um Methanolreste zu entfernen. Zur Färbung werden die Zellen in 100 μ l Färbepuffer aufgenommen und die Antikörper in den entsprechenden Verdünnungen (s. Tabelle 2) zugegeben. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde im Dunkeln. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper und unspezifisch gebundenem Antikörper werden die Zellen nach der Färbung erneut zweimal mit 500 μ l Färbepuffer gewaschen. Zur Analyse werden die Zellen in 500 μ l Puffer aufgenommen und am FACS Canto II gemessen.

4%iges Paraformaldehyd			PBS
	4	%	Paraformaldehyd
90%iges Methanol	10	%	PBS
	90	%	Methanol
Färbepuffer			PBS
	0,05	%	BSA

Tabelle 8: FACS-Einstellungen und Kompensationsparameter.

Parameter	Färbung	Volt
FSC-A		168
SSC-A		376
FITC-A	p-CRKL	430
PE-A	p-ERK	419
APC-A	p-STAT5	593

	FITC-A	PE-A	PErCP-A	PE-Cy7-A	APC-A
FITC-A	100%	19,47%	0,49%	0%	0,05%
PE-A	0,15%	100%	23,91%	2,51%	0%
PerCP-A	0%	0%	100%	0%	0%
PE-Cy7-A	0%	0%	0%	100%	0%
APC-A	0%	0%	0%	0%	100%

3.3.3.2 Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid

Ein spätes Charakteristikum von Zelltod ist die Fragmentierung der DNA. Der DNA-Gehalt einer Zelle gibt somit Aufschluss über die Vitalität der Zelle. Während proliferierende Zellen und sich teilende Zellen einen hohen Gehalt an intakter DNA aufweisen, besitzen apoptotische oder nekrotische Zellen keine intakte DNA mehr. Für die Analyse des DNA-Gehalts wird Propidiumiodid (**PI**) verwendet, das in die DNA interkaliert. Die Menge an interkaliertem PI gibt somit Rückschluss auf den DNA-Gehalt der Zellen. Damit das PI membrangängig wird, wird dem verwendeten Färbepuffer Triton-X zugesetzt. Nach der PI-Färbung erfolgt die Analyse mittels FACS-Messung. Hierbei lassen sich die verschiedenen Phasen des Zellzyklus unterscheiden, weshalb die Methode auch Zellzyklus-Analyse genannt wird. In Abbildung 7 ist ein typisches Ergebnis einer PI-Färbung dargestellt. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen war der sogenannte subG1-DNA-Gehalt als Indikator für Zelltod von Interesse.

Zur Färbung mit Propidiumiodid werden 5×10^4 Zellen in einem FACS-Röhrchen pelletiert. Die Zellen werden anschließend in 300 μ L HFS-Puffer resuspendiert. Die Analyse der Proben erfolgt nach einer 10-minütigen Inkubationsdauer am FACS Calibur.

Das Ergebnis dieser Messung wird mit Hilfe der Cell Quest Pro Software als prozentualer Anteil der Zellen in der subG1-Phase angegeben.

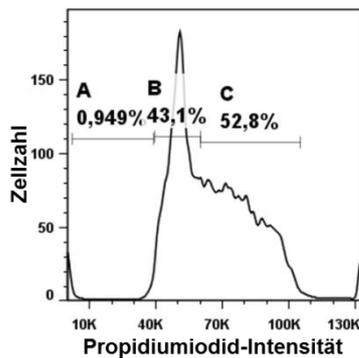


Abbildung 7: Histogramm einer Propidiumiodid-Färbung.

Population **A** zeigt Zellen, welche sich in der subG1-Phase befinden, also tot sind und keine intakte DNA mehr aufweisen. Population **B** repräsentiert Zellen in der G1-Phase. Population **C** zeigt Zellen in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus. Angegeben ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Subpopulation an der Gesamtpopulation. Auf der Abszisse ist die PI-Signalintensität, auf der Ordinate die Zellzahl abgebildet.

HFS-Puffer	75	µM	Propidiumiodid
	3,8	mM	Natriumcitrat
	0,1	%	Triton X100

3.3.3.3 AnnexinV-Färbung

Um Zellen im frühen Stadium der Apoptose von vitalen Zellen diskriminieren zu können, wird eine Oberflächenfärbung mit AnnexinV durchgeführt. Apoptose geht einher mit dem Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran, dabei ist das Phospholipid Phosphatidylserin nicht mehr nur auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, sondern auf deren Außenseite lokalisiert. AnnexinV ist ein Calcium-abhängiges Phospholipid-bindendes-Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Die Bindung des fluorchrom-markierten AnnexinV an die extrazelluläre Seite der Plasmamembran zeigt somit den Verlust der Membranintegrität an und erlaubt die Identifizierung von Zellen in der frühen Apoptose.

Zur Färbung werden 1×10^6 Zellen sedimentiert und 100 µL 1x AnnexinV-Bindepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl AnnexinV-PE-Konjugat folgt eine 15-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 400 µl 1x-AnnexinV-Bindepuffer gewaschen und pelletiert. Zur Analyse werden die Proben in 500 µl Bindungspuffer resuspendiert und am FACS Canto II gemessen. Eine typische Messung ist in Abbildung 8 dargestellt.

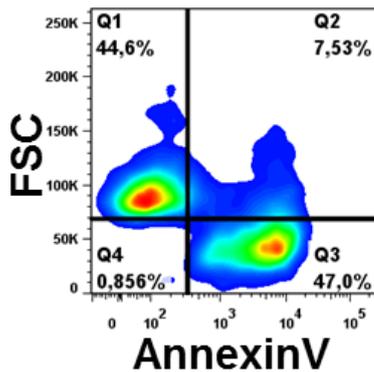


Abbildung 8: Intensitätsdarstellung einer AnnexinV Färbung.

Auf der Abszisse ist die AnnexinV Intensität und auf der Ordinate das Forward Scatter, welches der Zellgröße entspricht, abgebildet. Die Färbung zeigt in den Quadranten Q2 und Q3 jeweils AnnexinV positive Zellen, in den Quadranten Q1 und Q4 befinden sich AnnexinV negative, vitale Zellen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Quadrant-Population ist als Anteil an der Gesamtpopulation angegeben.

3.3.3.4 Färbung der aktivierten Caspase3

Apoptose ist ein stark regulierter Prozess, der eine Vielzahl von Effektoren beinhaltet. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen stellt einen frühen *point of no return* im Ablauf der Apoptose dar. Nach der Akkumulation von Procaspasen an bestimmten Proteinen, erfolgt die autolytische Spaltung der Procaspasen am Asparginrest 175. Die Caspasen sind nun aktiv und können ihre Effektorwirkung ausüben. Die aktivierte Caspase3 dient als Marker für die ablaufenden Prozesse der Apoptose.

Zum Nachweis von aktivierter Caspase3 in Zellen werden 1×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen pelletiert. Es folgt die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wie in 3.3.3.1 beschrieben. Der zur Färbung verwendete Antikörper ist Alexa488 konjugiert und erkennt spezifisch die Schnittstelle Asparagin 715. Der Antikörper detektiert somit nur aktive und gespaltene Caspasen. Die Inkubation des Antikörpers erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es folgen Waschschrte mit PBS um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Vor der Messung am FACS Canto II werden die Zellen in 500 μ l Färbepuffer aufgenommen. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis einer Messung von aktivierter Caspase3.

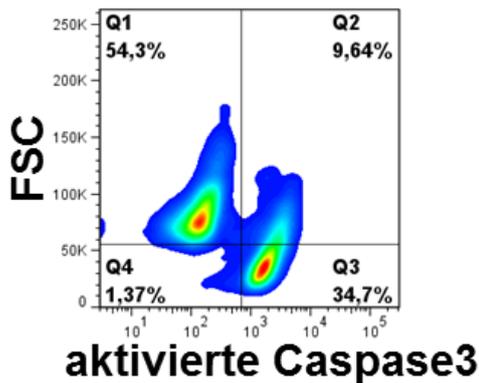


Abbildung 9: Intensitätsdarstellung einer aktivierten Caspase3 Färbung.

Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität der aktivierten Caspase3 und auf der Ordinate die Vorwärtsstreuung (FSC) abgebildet. Die Färbung zeigt in den Quadranten Q2 und Q3 jeweils aktivierte Caspase positive apoptotische Zellen, in den Quadranten Q1 und Q4 befinden sich aktivierte Caspase3 negative, also vitale Zellen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Quadrant-Subpopulation ist als Anteil an der Gesamtpopulation angegeben

3.3.3.5 Oberflächenfärbung von Transporterproteinen

Zur Analyse der Expression von ABC-Transporterproteinen in den K562 Zelllinien wird eine Oberflächenfärbung des Transmembran-Proteins durchgeführt. Hierzu werden je 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen sedimentiert und anschließend in 100 μ l Färbepuffer (s. 3.3.3.1) aufgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgt durch Zugabe von 10 μ l des jeweiligen Antikörpers (s. 2.1) gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen einmal mit Färbepuffer gewaschen, um Antikörperreste zu entfernen, bevor die Zellen am Durchfluss-Zytometer analysiert werden. Als Kontrolle für die Bestimmung positiv gefärbter Zellpopulationen wurden ungefärbte Zellen analysiert.

3.3.3.6 Auswertung der Durchfluss-Zytometrie Daten

Nach Messung der Proben am FACS Canto II erfolgt eine Auswertung der Daten mittels der BD FACS Diva Software. Diese Analyse ermöglicht das Einteilen der Populationen in Subpopulationen, *gaten* genannt, sowie die Bestimmung von prozentualen Anteilen bestimmter Populationen an einer Probe. Zur mehrdimensionalen Darstellung von Histogrammen, Konturplots und Scattergrammen, aber auch zur statistischen Auswertung der gemessenen Daten wird die Software FlowJo (TreeStar) benutzt.

3.4 Tyrosinkinase-Inhibitor-Messungen mittels *high-performance liquid chromatography* (HPLC)

Die HPLC ist eine säulenchromatographische Methode, die der Identifizierung sowie der Quantifizierung von Substanzen in einer Probe dient. Der übliche Aufbau einer HPLC besteht aus einer stationären Phase, der Trennsäule, einer mobilen Phase, dem Laufmittel, und einem Detektor. Eine schematische Übersicht über ein HPLC-Gerät gibt Abbildung 10.

Der Detektor misst neben der Retentionszeit der Probe in der stationären Phase, auch das Spektrum des Stoffes. Eine Software stellt diese Information als Peak-Diagramm dar. Die Fläche des Peaks ist dabei proportional zur Konzentration der eluierten Komponente. Um die Konzentrationen einer Substanz jedoch exakt bestimmen zu können, ist es erforderlich eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen mitzuführen.

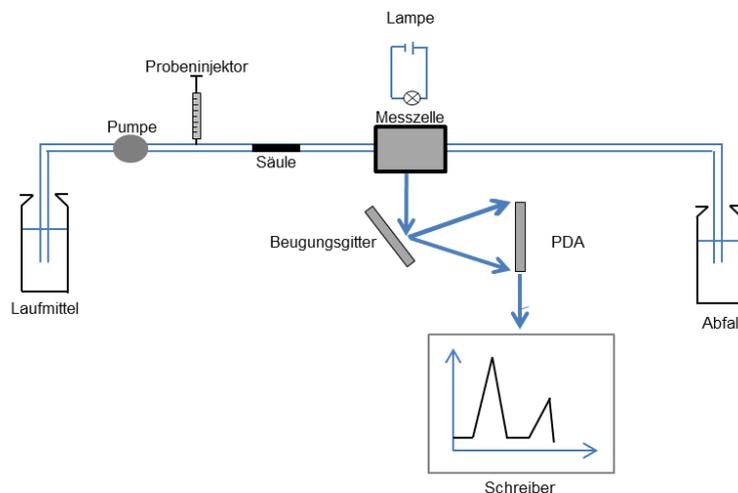


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage.

Nach der Injektion der Probe wird diese auf der Säule zurückgehalten, bevor sie die Messzelle passiert. Anhand der Retentionszeit auf der Säule kann die Substanz identifiziert werden. Die für den Detektor verwendeten Photodioden sind meist zu hunderten in einem kleinen Feld, Photodioden-Array (PDA), angeordnet.

3.4.1 HPLC-Messung von Imatinib und Midostaurin in Zellkulturüberständen

Die Messungen wurden durchgeführt in Kooperation mit Marek Dziadosz vom Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg. Zur Bestimmung von Imatinib- und Midostaurin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen ist es zunächst erforderlich die Bestandteile der Suspension aufzukonzentrieren. Dafür werden 3 ml der Probe über eine Extrelut®NT Säule gegeben. Die Säule wird mit einem Diethyl-Ether/Ethyl-Acetat-Gemisch (50:50, v/v) und dann mit einem Chloroform-/Isopropanol/

Ammonium-Hydroxyd-Gemisch (84:15:1; v/v/v) gewaschen. Das Eluat wird vollständig verdampft. Die Reststoffe werden in 200 µl mobile Phase aufgenommen. Als mobile Phase für Imatinib wird $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-CH}_3\text{CN}$ (7:3, v/v) verwendet. $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-NH}_3$ (89,7:10:0,3; v/v/v) dient als Laufmittel für Midostaurin. Die Flussrate im Gerät beträgt 1 ml/ min. 50 µl der vorbereiteten Probe werden in das HPLC-Gerät injiziert. Die Quantifizierung von Imatinib und Midostaurin wird mit einem Agilent HPLC System der Serie 1200 durchgeführt. Die stationäre Phase bildet eine Lichrospher-RBP 250 x 4 mm Säule, die für Imatinib-Messungen bei $30\pm 1^\circ\text{C}$ und für Midostaurin-Messungen bei $40\pm 1^\circ\text{C}$ betrieben wird. Der Dioden Array Detektor wird für die Imatinib Detektion bei 265 nm betrieben. Für die Midostaurin-Quantifizierung detektiert der DAD bei 286 nm. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Detektion gibt Abbildung 11.

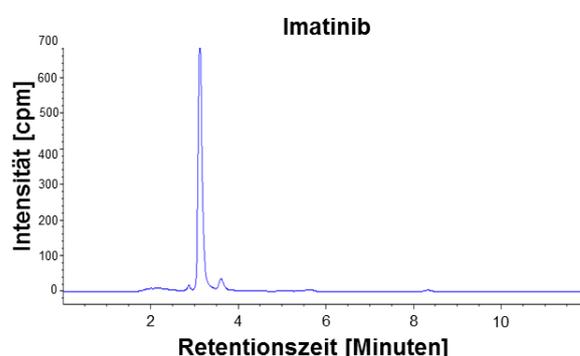


Abbildung 11: Chromatogramm einer Imatinib-Messung.

Dargestellt ist auf der Abszisse die Retentionszeit der Substanz innerhalb der stationären Phase in Minuten. Die Ordinate gibt die Peakintensitäten der Substanz pro Minute (*counts per minute*) in absträren Einheiten an.

3.4.2 LC-MS/MS-Messung von Dasatinib und Nilotinib

Bei der LC-MS/MS handelt es sich um eine Weiterentwicklung der oben beschriebenen HPLC-Messung. Dabei wird die Flüssigchromatographie (**LC**) mit der Massenspektrometrie (**MS**) gekoppelt. Die Chromatographie dient bei dieser Messung vor allem der Auftrennung der Substanzen und die Massenspektrometrie wird zu Identifizierung dieser verwendet.

Zur Messung von Dasatinib und Nilotinib wird ein Triple-Quad-Massenspektrometer benutzt. Für die Messung von Dasatinib wurde das Vorläuferion beim Massenübergang 488.1 und das Produktionion bei 401 detektiert. Die stationäre Phase bildete eine Zorbay SB-C18, 4,6x50 mm 5 micron Säule, betrieben bei $45\pm 1^\circ\text{C}$. Von den vorbereiteten Proben werden 20 µl in die Apparatur injiziert. Die mobile Phase bildete eine Mischung von A: CH_3OH und B: 50 ml 0,1M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ + 50 ml CH_3CN + 950

ml H₂O + 1 ml CH₃COOH mit einer Ratio von A:B von 7:3 und einer Flussgeschwindigkeit von 0,3 ml/min.

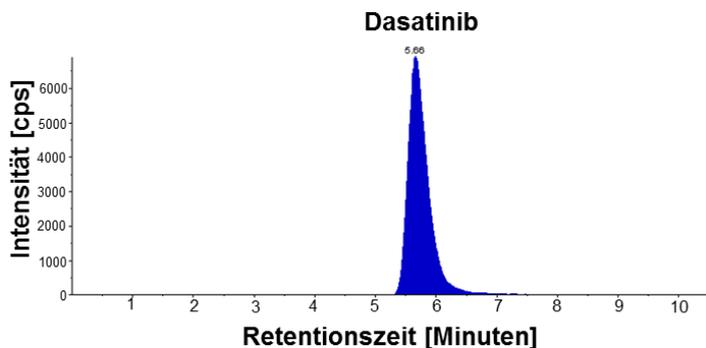


Abbildung 12: Chromatogramm einer Dasatinib-Messung.

Angegeben ist auf der Abszisse die Retentionszeit der Substanz innerhalb der stationären Phase. Die Ordinate gibt die Peakintensität der Substanz pro Sekunde (*counts per seconds*) in abstrakten Einheiten an.

3.4.3 Intrazelluläre Messung von Tyrosinkinase-Inhibitor Konzentrationen mittels HPLC

Die Messungen wurden durchgeführt in Kooperation mit Marek Dziadosz vom Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg. Zur Messung der intrazellulären Konzentration von Tyrosinkinase-Inhibitoren werden zunächst 2×10^5 Zellen in 4 ml für zwei Stunden mit dem entsprechenden TKI bei 37°C, 80% Luftfeuchte und 5% CO₂ behandelt. Nach Ende der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit 4 ml PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgt die Zellyse für Imatinib-Bestimmungen wie unter 3.2.1 beschrieben in 500 µL Japan-Puffer. Für die Dasatinib-Messungen wird das Zellpellet nach dem Waschen in 500 µl 90%iges Methanol resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Das Lysat wird durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm 4°C von Zelltrümmern geklärt. Das geklärte Lysat wird anschließend in 3,5 ml RPMI1640 Kulturmedium mit 10% FCS überführt. Zur Messung der intrazellulären TKI-Konzentrationen von Imatinib und Dasatinib wird genauso verfahren wie in 3.4.1 bzw. in 3.4.2 beschrieben.

3.5 Szintillator-Messungen von ¹⁴C-markiertem Imatinib

Zur Bestätigung der mittels HPLC-Messung erhobenen Daten werden zusätzlich Versuche mit radioaktiv ¹⁴C-markiertem Imatinib (Gesamtaktivität: 32,12 MBq) durchgeführt. Durch die radioaktive Markierung werden die pharmakologischen Eigenschaften der Substanz nicht verändert. Die radioaktive Markierung von Imatinib hat den Vorteil,

dass die Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute konstant ist und direkte Rückschlüsse auf die vorhandene Imatinib-Konzentration gibt.

3.5.1 Analyse von ^{14}C -Imatinib-Konzentrationen mittels *intracellular uptake and retention assay (IUR)*

Es werden 50.000 Zellen pro ml für zwei Stunden mit Imatinib behandelt. Nach der Inkubation werden flüssige und zelluläre Phase durch Zentrifugation voneinander getrennt. Das Zellkulturmedium wird zur Messung vorbereitet. Die Zellen werden zweimal in PBS gewaschen und anschließend in Kulturmedium resuspendiert und dann für die Messung (s. 3.5.2) vorbereitet. Um den Verlauf der Imatinib-Konzentrationen in Zellkulturüberständen und in Zellen nach dem Entfernen des Inhibitors analysieren zu können, werden die Zellen zurück in Imatinib-freies Medium gesetzt und im Brutschrank inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 120 Minuten) nach dem *Wash Out* werden sowohl das Zellpellet als auch der Zellkulturüberstand auf vorhandene Imatinib-Konzentrationen analysiert. Das Entfernen des Inhibitors nach der Behandlung erfolgt wie in 3.3.2.2 beschrieben. Die Zellen werden vor der Messung zweimal mit PBS gewaschen, um Imatinib-Reste an den Zellen zu entfernen.

3.5.2 Messung der Proben mittels Szintillator

Zur Messung wird jeweils 1 ml der entsprechenden Probe in ein Szintillationsgefäß überführt. Zur Erhöhung der Mess-Sensitivität wird die Probe mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Messzeit der Proben im Flüssigszintillator beträgt pro Probe 5 Minuten. Gemessen werden die Disintegrationseinheiten pro Minute (**DPM**). Die Bestimmung der einzelnen Probe erfolgt im technischen Triplikate. Um die Menge an Imatinib genau quantifizieren zu können wird eine Standardreihe im Bereich von 25–0,0195 μM Imatinib mitgemessen. Die Standardreihe wird ebenfalls mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Aus der Standard-Reihe wird nach der Proben-Messung eine Eichgerade erstellt und über die Geradengleichung werden die Konzentrationen der Proben errechnet. Vor jeder Daten-Set Messung wird das Gerät normalisiert und kalibriert.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionalitätsüberprüfung der verwendeten Zelllinien

Zu Beginn der Arbeit lagen die verwendeten Ba/F3-Zelllinien bereits transfiziert mit einem der folgenden Onkogene: BCR-ABL, FLT3-ITD oder JAK2V617F, im Labor der Arbeitsgruppe vor. Die parentale Ba/F3-Zelllinie ist eine murine Pro-B-Zelllinie, deren Wachstum von Interleukin-3 abhängig ist (Palacios and Steinmetz, 1985). Die Zelllinien zeigten bereits aufgrund der Onkogen-vermittelten Transformation Wachstum im IL-3-freiem Medium (Lewalle and Martiat, 1993; Kelly et al., 2002; Lu et al., 2005). Es galt daher funktionell zu testen, ob die Zellen das richtige Onkogen tragen und die Signaltransduktion des Onkogens durch Tyrosinkinase-Inhibitoren unterbrochen werden kann. Dazu wurden die Zelllinien für 2 Stunden mit einem für das Onkogen spezifischen Inhibitor in geringer Konzentration behandelt (s. 3.3.2.1). Ba/F3-BCR-ABL Zellen wurden entweder mit 0,25 μM Imatinib, 1 nM Dasatinib oder 25 nM Nilotinib inkubiert. Ba/F3-FLT3-ITD Zellen wurden mit 35 nM Midostaurin behandelt und Ba/F3-JAK2V617F mit 1 μM Jak Inhibitor I (**Jak In I**). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert (s. 3.2.4). Es sollten dabei sowohl die Aktivierung des Onkogens, als auch der nachgeschalteten Signalwege AKT, ERK und STAT5 unter dem Einfluss des Inhibitors untersucht werden. Es war zu erwarten, dass sowohl das Onkogen als auch die nachfolgenden Signalwege ohne externen Stimulus konstitutiv aktiv sind und diese durch die Behandlung mit einem Onkogen-spezifischen TKI inhibiert werden. Die im Western Blot analysierten Phosphorylierungsstellen (**P**) der einzelnen Proteine sind jeweils repräsentativ für die Aktivierung des entsprechenden Proteins. Eine Übersicht über die untersuchten Phosphorylierungsstellen ist unter 2.1 zusammengestellt. In BCR-ABL positiven Zellen wurde zusätzlich zu ERK und STAT5 das Adapterprotein CRKL untersucht. CRKL kommt eine besondere Bedeutung in der onkogenen Transformation von BCR-ABL zu (Seo et al., 2010). Abbildung 13 fasst die Ergebnisse der Western Blot Analysen zusammen.

In den unbehandelten Proben zeigte sich, dass alle untersuchten Zelllinien das Onkogen exprimierten und es phosphoryliert vorlag. Eine Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege AKT, ERK und STAT5 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Für BCR-ABL positive Ba/F3-Zellen wurde zudem eine Aktivierung des Adapterproteins CRKL festgestellt.

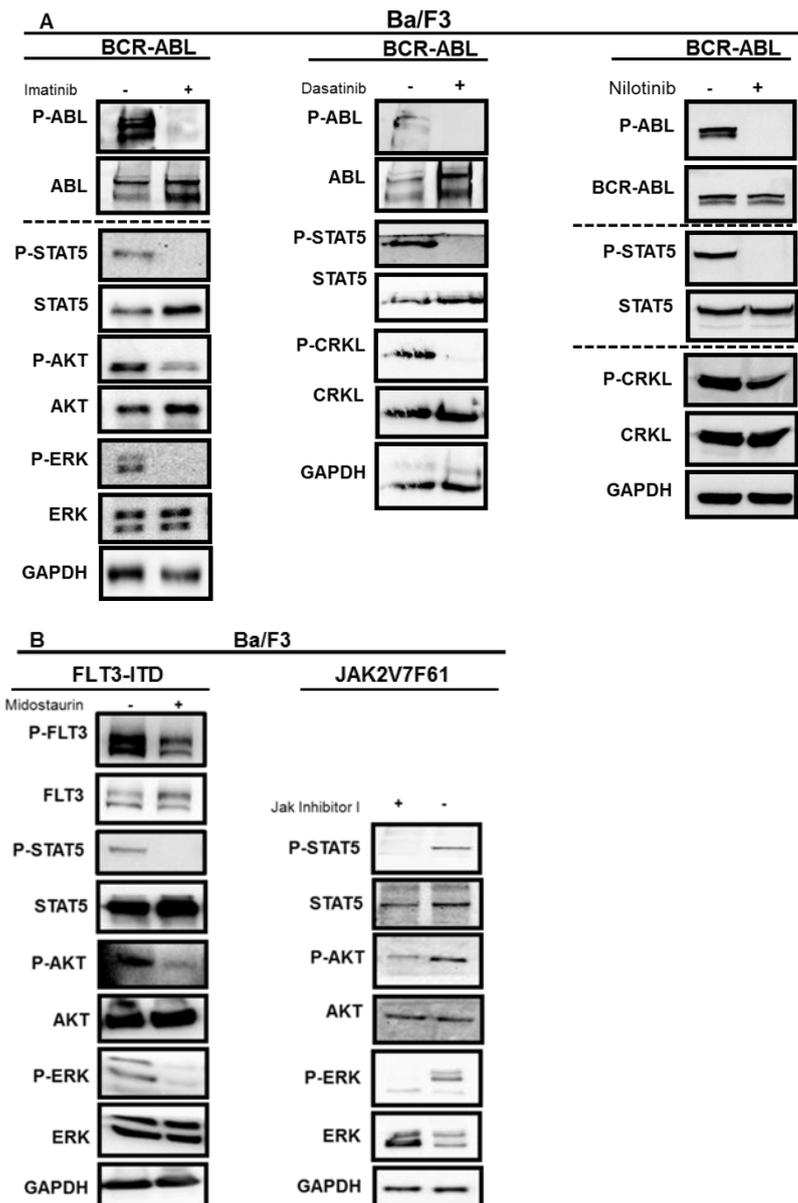


Abbildung 13: Aktivierung und Inhibition der Onkogen-vermittelten Signaltransduktion in den verwendeten Zelllinien.

(A) Analyse der Ba/F3-BCR-ABL Zellen unter Behandlung mit 0,25 μ M Imatinib/ 1 nM Dasatinib/ 25 nM Nilotinib. (B) Die Behandlung der Ba/F3-FLT3-ITD Zellen erfolgte mit 35 nM Midostaurin und die der Ba/F3-JAK2V617F Zellen mit 1 μ M Jak Inhibitor I. Die Zellen wurden für 2 Stunden behandelt. Aufgetragen wurden 25 μ g Gesamtprotein. Der Nachweis der totalen Proteine sicherte die Identität der jeweiligen Phosphorylierungssignale im Gel und diente gleichzeitig als Ladekontrolle. Die Detektion von GAPDH diente zusätzlich der Vergleichbarkeit der Proteinbeladung.

Es zeigte sich, dass die TKI-Behandlung der Ba/F3-BCR-ABL Zellen zu einer Reduktion der BCR-ABL-Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 412 (P-ABL) führt. Unter Imatinib-Behandlung wurde zudem eine Reduktion der STAT5-, AKT- und ERK-Phosphorylierung festgestellt. Die CRKL-Phosphorylierung zeigte eine deutliche Reduktion unter Behandlung mit Dasatinib und Nilotinib. Bei der Analyse der Ba/F3-FLT3-ITD Zellen waren unter TKI-Behandlung die Phosphorylierung von FLT3 und die der weiteren Signaltransduktionswege ebenfalls reduziert. In Ba/F3-JAK2V617F Zellen

war der Nachweis des aktivierten Onkogens aufgrund der schlechten Qualität geeigneter Antikörper nicht möglich. Aus diesem Grund wurden nur die JAK2 nachgeschalteten Signalwege, ERK und STAT5 analysiert. Nach Inhibitor-Inkubation wurde eine Inhibition dieser Signalwege festgestellt.

Zusammenfassend konnte im Western Blot die Identität sowie die Funktionalität der verwendeten Zelllinien überprüft und festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die drei untersuchten Onkogene wie erwartet in der Aktivierung von AKT, ERK und STAT5 resultierten (Sawyers, 1997; Kiyoi et al., 2002; Ugo et al., 2005).

Um abschließend sicherzustellen, dass die Ba/F3-JAK2V617F Zellen das Onkogen exprimieren und die beobachtete Aktivierung der Signalwege nicht auf anderem Weg hervorgerufen wurde, wurden die Ba/F3-JAK2V617F Zellen mittels PCR genetisch getestet (s. 3.1.4). Zum einen wurde ein Fragment des *JAK2*-Gens amplifiziert. Dieses schließt die JH2-Pseudo-Kinase Domäne und somit die Punktmutation, die zum Austausch von Valin (V) zu Phenylalanin (F) führt, ein. Mit einer zweiten PCR-Reaktion wurde ein Bereich des Erythropoetin-Rezeptors (**EPOR**) amplifiziert. JAK2V617F-positive Zellen sind für ihre Transformation auf die Expression dieses Rezeptors angewiesen (Lu et al., 2005). Die Ba/F3-JAK2V617F Zellen sollten stabil mit der murinen cDNA-Sequenz von JAK2 und EPOR transfiziert sein. Extrahierte Gesamt-DNA aus den Ba/F3-JAK2V617F Zellen diente als Template für die PCR, die Primer wurden daher so gewählt, dass sie jeweils 2 Exons überspannen. Dies hat den Vorteil, dass das spezifische Produkt des nachzuweisenden Transgens, welches keine Introns enthält deutlich kleiner ist, als das Produkt der endogenen Gensequenz.

Wie in Abbildung 14 A zu sehen ist, ergaben sich in der PCR für EPOR zwei Banden bei 870 bp und 270 bp. Die obere Bande repräsentiert das PCR-Produkt der genomischen DNA und die untere Bande das Produkt des Transgens. Die JAK2-PCR zeigt das erwartete Produkt des Transgens bei 215 bp. Für die Sequenzierung wurde diese Bande ausgeschnitten und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 14 B dargestellt und bestätigte das Vorliegen der G zu C Punktmutation auf Nukleotidebene.

Alle Zelllinien exprimierten somit das Onkogen und waren in Bezug auf ihre Signaltransduktion funktionell und konnten für die weiteren Analysen verwendet werden.

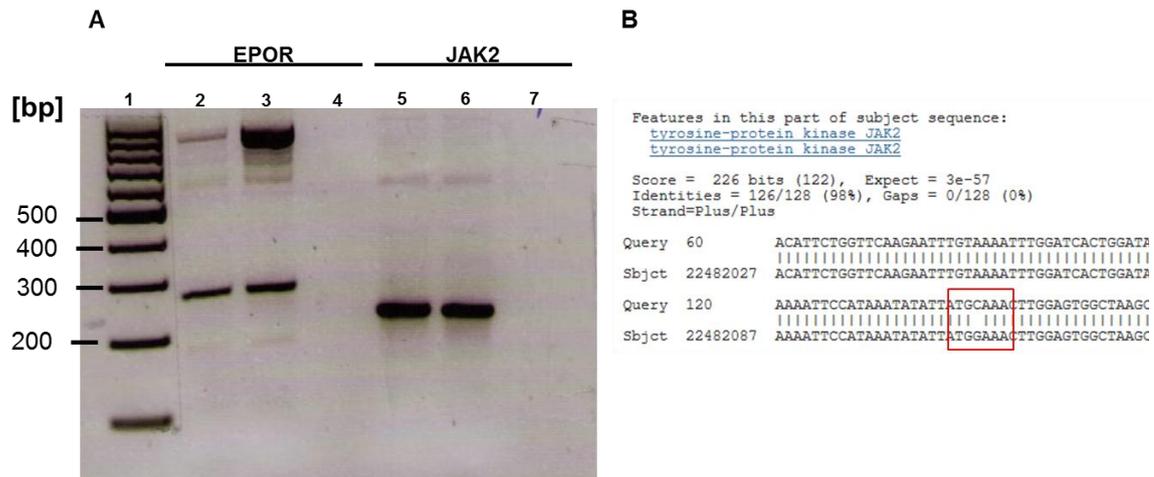


Abbildung 14: Die Ba/F3-JAK2V617F Zellen weisen die JAK2V617F-Punktmutation auf.

In **A** abgebildet ist die Ethidiumbromid-Färbung eines 2%igen Agarose-Gels auf dem die folgenden Proben aufgetragen sind: 1=100 bp Marker, 2=EPOR-PCR Produkt von JAK2V617F-Zellen, 3=EPOR-PCR Produkt von JAK2WT-Zellen, 4=Negativkontrolle der EPOR-PCR, 5=JAK2-PCR Produkt der JAK2V617F-Zellen, 6=JAK2-PCR Produkt der JAK2WT-Zellen, 7= Negativkontrolle der JAK2-PCR. **B** zeigt das Ergebnis des *Blast-Alignments* des sequenzierten JAK2-PCR-Produkts der JAK2V617F-Zellen. Rot umrahmt ist die Stelle des Basenaustauschs, der zum Aminosäureaustausch V zu F führt.

4.2 Bestimmung der IC_{50} -Konzentration für die Tyrosinkinase-Inhibitoren

Nach Feststellung der Funktionalität sollte die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für die entsprechenden Inhibitoren auf den Zelllinien bestimmt werden, um äquivalente TKI-Konzentrationen verwenden zu können. Als IC_{50} -Konzentration wurde die Konzentration definiert, die nach 24-stündiger Inkubation zu ca. 50% apoptotischer Zellen führte, gemessen als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus. Alle TKIs wurden in DMSO gelöst. Ein Ansatz, der mit DMSO in entsprechender Konzentration versetzt wurde, diente bei allen durchgeführten TKI-Behandlungen als Kontrolle.

Zur Titration der IC_{50} -Konzentration wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Inhibitors dauerhaft inkubiert (s. 3.3.2.1). Die Zellen wurden mittels Propidiumiodid 24 und 48 Stunden nach Beginn der Inkubation (s. 3.3.3.2) analysiert. Zum Nachweis der apoptotischen Zellen wurde der Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase bestimmt. Das Ergebnis der Zellzyklus-Analyse ist in Abbildung 15 gezeigt.

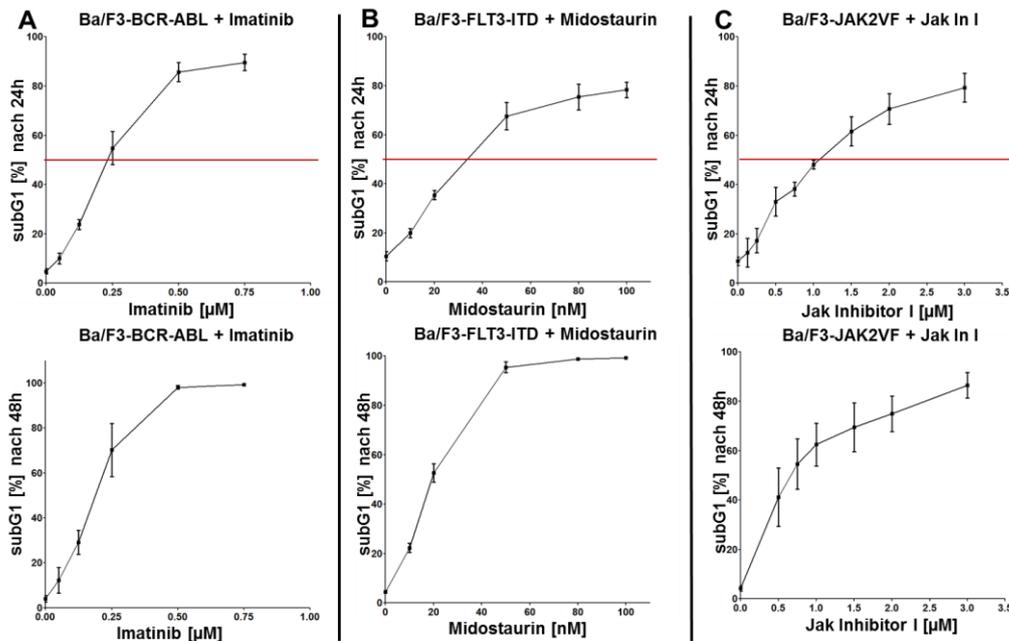


Abbildung 15: Bestimmung der IC_{50} -TKI-Konzentration für Onkogen-mutierte Ba/F3-Zellen.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml mit der angegebenen TKI-Konzentration inkubiert: **A** Ba/F3-BCR-ABL mit Imatinib, **B** Ba/F3-FLT3-ITD mit Midostaurin, **C** Ba/F3-JAK2V617F mit Jak Inhibitor I. Als Kontrolle diente eine Probe, die mit dem TKI-Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration behandelt wurde (0 nM/ μM). Die Zellzyklus-Analyse der Proben erfolgte 24 und 48 Stunden nach Beginn der Inkubation. Angegeben ist der Prozentsatz der Zellen in subG1 als Anteil an der Gesamtpopulation. Dargestellt ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

Die Konzentrationen bei denen sich nach 24 Stunden 50% der Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus befanden, wurden wie folgt festgelegt:

- Ba/F3-BCR-ABL 0.25 μM Imatinib
- Ba/F3-FLT3-ITD 35 nM Midostaurin
- Ba/F3-JAK2V617F 1 μM Jak Inhibitor I

Diese Konzentrationen wurden im Folgenden als niedrigste TKI-Konzentration für Inkubationen verwendet.

4.3 Kinetik der Kinaseinhibition und Apoptoseinduktion

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden Daten publiziert, die suggerierten, dass bereits eine sehr kurzzeitig andauernde, aber hoch effektive Kinaseinhibition Apoptose auslösen kann (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Daher wurde der Frage nachgegangen, ob eine kurzzeitige aber potente Kinaseinhibition irreversibel Apoptose auslösen kann. Dazu wurden die Beziehung zwischen der Dauer der Kinaseinhibition und der Induktion von Apoptose genauer untersucht.

4.3.1 Inhibition von ERK und STAT5 unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Inkubation

Zu Beginn sollte die Frage beantwortet werden wie potent die titrierten IC_{50} -Konzentrationen in Bezug auf die Inhibition nachgeschalteter Signaltransduktionswege sind. Außerdem sollte analysiert werden, wann die nachgeschalteten Signalwege die maximale Reduktion der Phosphorylierung unter TKI aufweisen. Dazu wurden die Ba/F3-Zellen mit der IC_{50} -Konzentration der Inhibitoren (s. 4.2) für 2 und 12 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die für 12 Stunden nur mit DMSO exponiert wurden. Im Anschluss an die TKI-Inkubation folgte die Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der Zellen für die Durchfluss-Zytometrie (s. 3.3.3.1). Die verwendeten phosphorylierungsspezifischen Antikörper (s. 2.1) weisen die Aktivierung des jeweiligen Proteins nach und wurden gemeinsam gefärbt. Insgesamt sollten allgemein gültige Aussagen zur TKI-Behandlung von Onkogen-mutierten Zellen getroffen werden. Aus diesem Grund wurden die Indikator-Signalwege, P-ERK und P-STAT5 ausgewählt, da deren Aktivierung durch die jeweiligen Onkogene hervorgerufen wird (Sawyers, 1997; Kiyoi et al., 2002; Ugo et al., 2005). Die Zellen unterschieden sich bei gleichem zellulärem Hintergrund nur durch das Onkogen, die Untersuchungsmethode war identisch.

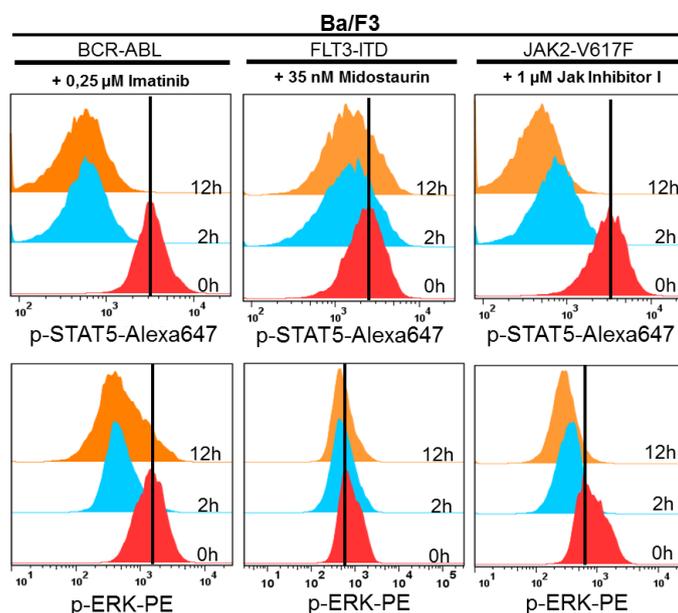


Abbildung 16: Die maximale Reduktion der ERK- und STAT5-Phosphorylierung erfolgt innerhalb von 2 Stunden nach TKI-Inkubation.

Es wurden 1×10^6 Zellen für 2 oder 12 Stunden mit der entsprechenden IC_{50} -Konzentration an TKI behandelt. Die Histogramme zeigen die Signalintensität von P-STAT5 und P-ERK der vitalen Zellpopulation in arbiträren Einheiten. Der Strich markiert die mittlere Signalintensität der DMSO-behandelten Probe (0h), die zur Kontrolle der Phosphorylierungssignale diente. Es wurde dabei so viel DMSO zugegeben wie in der TKI-behandelten Probe mit der höchsten DMSO-Konzentration. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde FLOWJO verwendet. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Wiederholungen ist abgebildet.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde in allen untersuchten Zelllinien eine maximale Reduktion des Phosphorylierungssignals von STAT5 und ERK bereits nach 2 Stunden erreicht. Eine längere TKI-Inkubation resultierte in keinem weiteren Abfall des jeweiligen Phosphorylierungssignals. Die verschiedenen Rekonstitutionsmodelle zeigten jedoch Unterschiede in Bezug auf die relative Stärke der Inhibition der jeweiligen Signalwege. Ba/F3-BCR-ABL und Ba/F3-JAK2V617F Zellen zeigten unter TKI-Behandlung eine sehr deutliche Reduktion des P-STAT5 Signals. Ebenso zeigte sich eine Reduktion des P-ERK Signals. Die Ausnahme bildeten die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen, hier kam es unter Midostaurin-Exposition zu einer weniger starken Reduktion des P-STAT5 und des P-ERK Signals.

Eine maximale Reduktion der Phosphorylierung nach 2-stündiger TKI-Behandlung wirft die Frage auf, ob bereits zu diesem Zeitpunkt Apoptose durch den starken Aktivitätsverlust der onkogenen Signaltransduktion induziert wurde. Weiterhin stellt sich die Frage, ob verschiedene Konzentrationen von Inhibitoren zur unterschiedlich potenten Hemmung der Phosphorylierungssignale führen. Um diese Fragen zu adressieren, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz mit verschiedenen TKI-Konzentrationen über 2, 12 und 24 Stunden behandelt. Neben P-ERK und P-STAT5 wurde auch aktivierte Caspase3 parallel im gleichen Ansatz gefärbt und mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert (s. 3.3.3.1). Der Nachweis der aktivierten Caspase3 kann dazu beitragen herauszufinden, ob Apoptose zum Zeitpunkt des maximalen Signalverlusts induziert wird.

Wie Abbildung 17 zu entnehmen ist, zeigen diese Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen verwendeter TKI-Konzentration und der Reduktion Phosphorylierung von P-STAT5 und P-ERK. Die höchste verwendete TKI-Konzentration bewirkte die stärkste Reduktion der Phosphorylierung, eine geringere Konzentration führte zu einem geringeren Signalverlust. Eine Aktivierung von Caspase3 konnte in allen untersuchten Zelllinien und für alle Konzentrationen erst nach 12 Stunden festgestellt werden. Zellen, welche mit hohen TKI-Konzentrationen behandelt wurden, wiesen zu diesem Zeitpunkt den höchsten Anteil Zellen mit aktivierter Caspase3 auf. Zum Zeitpunkt des maximalen Signalverlusts von P-ERK und P-STAT5 (2 Stunden) war jedoch in keiner der analysierten Proben eine Spaltung von Caspase3 nachweisbar. Dies impliziert die Frage, wie sich die Kinetik der Caspasen-Spaltung in den Zeiträumen zwischen 2 und 12 Stunden verhält.

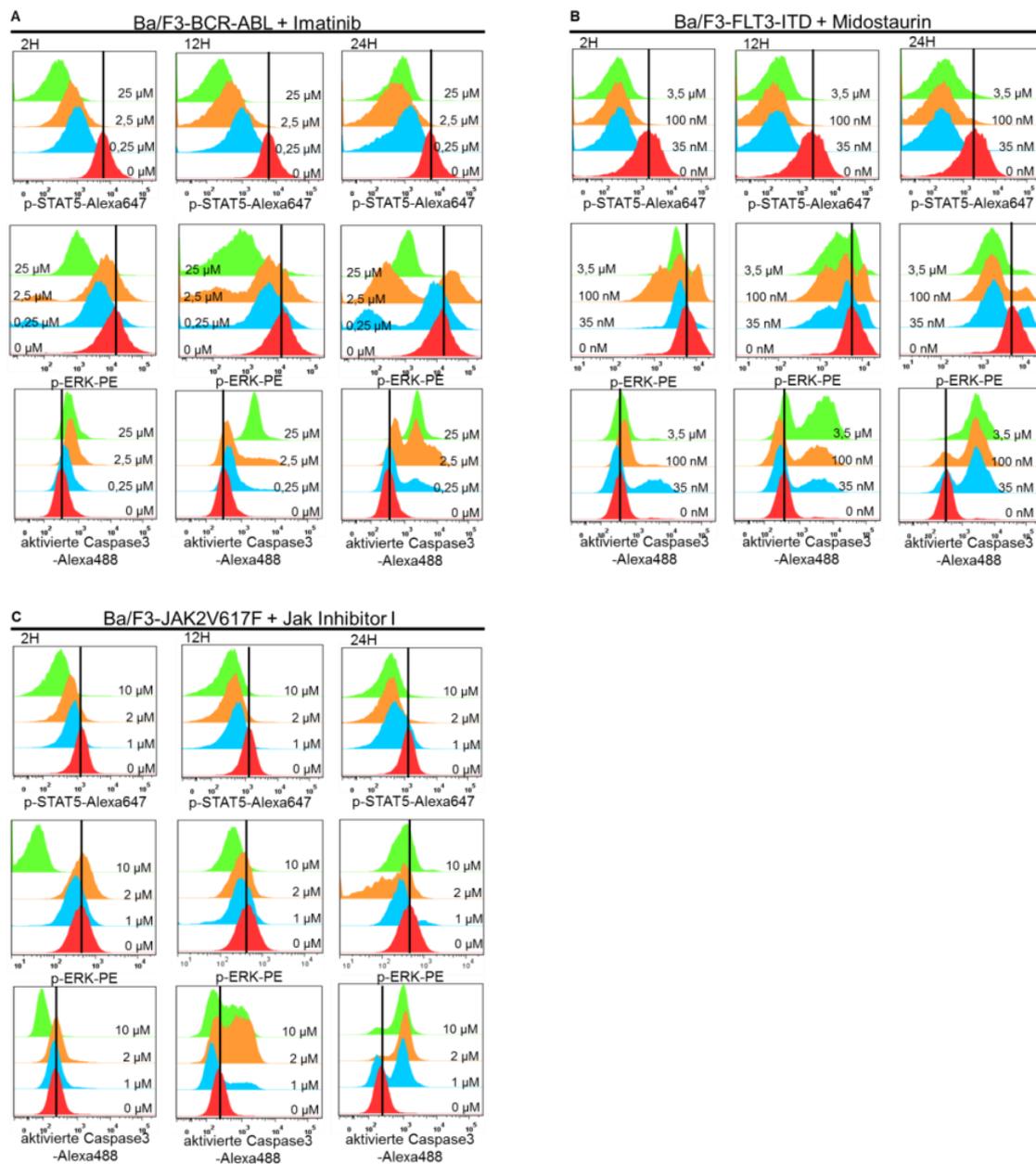


Abbildung 17: Die Reduktion des P-ERK und P-STAT5 Signals ist konzentrationsabhängig.

Es wurden 1×10^6 Zellen für 2, 12 oder 24 Stunden mit den angegebenen TKI-Konzentrationen behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Antikörper wurden gleichzeitig in einem Ansatz gefärbt und parallel mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität als Histogramm in abitären Einheiten. Der Strich markiert die mittlere Signalintensität der DMSO-behandelten Probe (0h), die zur Kontrolle der Phosphorylierungssignale diente. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOWJO-Software. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von unabhängigen Wiederholungen.

4.3.2 Induktion von Apoptose unter Behandlung mit IC_{50} -Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Inhibition von Onkogenen kontinuierlich sein muss, um Apoptose in Onkogen-transformierten Zellen zu induzieren. Dabei stellt sich allerdings unweigerlich die Frage, ob es einen Punkt in der Apoptoseinduktion gibt an dem der Prozess unwiderruflich ausgelöst wird. Um dieser Frage nachzugehen wurden sogenannte *Wash Out* Experimente mit Ba/F3-BCR-ABL, -FLT3-ITD und – JAK2V617F-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dabei für 2 bis 16 Stunden mit der IC_{50} -Konzentration des entsprechenden Inhibitors (s. 4.2) behandelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, bevor sie wieder in TKI-freies Medium zurückgesetzt wurden (s. 3.3.2.2). Zum Analysezeitpunkt 24 Stunden wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt (s. 3.3.3.2) und so der Anteil der Zellen in der subG1-Phase ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

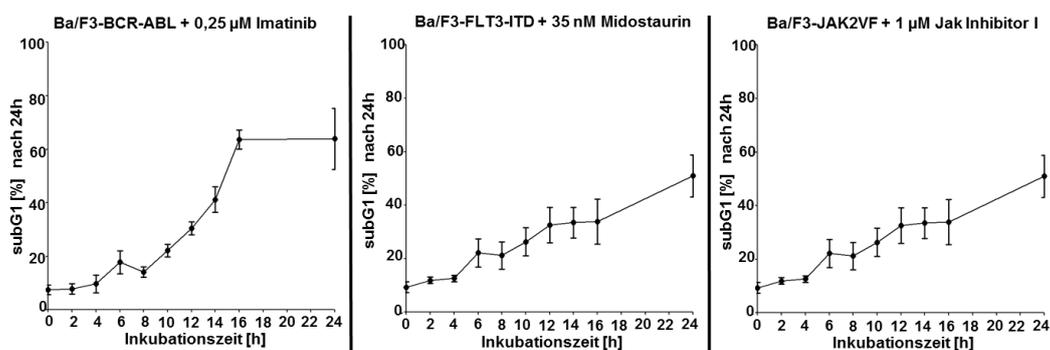


Abbildung 18: Die 8-12-stündige Inkubation von TKI (IC_{50} -Konzentration) induziert Apoptose.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für die angegebene Zeit mit der entsprechenden TKI-Konzentration inkubiert. Um die Inkubation zu beenden, wurden die Zellen zweimal mit dem gleichen Volumen PBS gewaschen und in TKI-freies Medium zurückgesetzt. Die Zellzyklus-Analyse der Proben erfolgte 24 Stunden nach Beginn der TKI-Inkubation. Angegeben ist der prozentuale Anteil der subG1-Fraktion an der Gesamtpopulation als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Für alle untersuchten Zelllinien zeigte sich, dass eine Exposition mit der IC_{50} -Konzentration eines Inhibitors für einen Zeitraum von mindestens 8 bis 12 Stunden erfolgen muss, um relevante Apoptoseraten in den Zellen auszulösen. Bei längeren Inkubationszeiten stieg der Anteil apoptotischer Zellen deutlich an. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Daten überein (le Coutre et al., 1999), die zeigen, dass die Inhibition onkogener Kinasen durch Inhibitoren zwischen 8 und 21 Stunden andauern muss, um Apoptose zu induzieren. Es ist jedoch bislang unklar, ob die verwendete TKI-Konzentration einen Einfluss auf die Apoptosekinetik hat.

4.3.3 Aktivierung der Caspase3 in Abhängigkeit von der verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration

Nachdem für IC_{50} -TKI-Konzentrationen nachgewiesen werden konnte, dass eine Inkubationszeit von 8 bis 12 Stunden benötigt wird, um Apoptose in den Zellen auszulösen (s. 4.3.2), sollte nun überprüft werden, ob hohe TKI-Konzentrationen zu einer veränderten Apoptosekinetik führen. Die Onkogen-transformierten Ba/F3-Zellen wurden dazu mit jeweils drei Konzentrationen des entsprechenden Inhibitors für Zeiträume von 2 bis 12 Stunden inkubiert und anschließend im Western Blot auf die Aktivierung der Caspase3 analysiert. Als niedrigste Konzentrationen für die Behandlung wurde die IC_{50} -Konzentration gewählt und als Hochdosis (**HD**) die 100x IC_{50} -Konzentration. Es wurde weiterhin eine mittlere Konzentration analysiert. Insgesamt wurden somit Konzentrationen verwendet, die in ihrer Wirkung äquipotent sind und damit eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zulassen. Für Nilotinib wurde lediglich die 40-fache IC_{50} -Konzentration verwendet, da diese Konzentration bereits als Hochdosis beschrieben war (Hiwase et al., 2009). Für Jak Inhibitor I konnte nur die 10-fache IC_{50} -Konzentration, 10 μ M, eingesetzt werden, da der Inhibitor bei dieser Konzentration seine maximale Löslichkeit erreicht hat. Die Ergebnisse sind Abbildung 19 dargestellt.

Die Western Blot Analyse von Caspase3 und aktivierter Caspase3 ergab, dass bei allen untersuchten Zelllinien die Spaltung von Caspase3 etwa nach 6 bis 8-stündiger TKI-Exposition zu erkennen ist, ohne dass sich ein wesentlicher Zusammenhang mit der verwendeten TKI-Konzentration ergibt. Für die Kinetik in Ba/F3-BCR-ABL nach Inkubation mit Nilotinib zeigten sich leichte Abweichungen. In diesen Proben war die Spaltung der Caspase3 bereits nach 4-6 Stunden zu beobachten, auch hier war dieser Effekt konzentrationsunabhängig. Es konnten insgesamt keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die Behandlung mit hohen TKI-Konzentrationen die Kinetik der Apoptoseinduktion wesentlich beeinflusst.

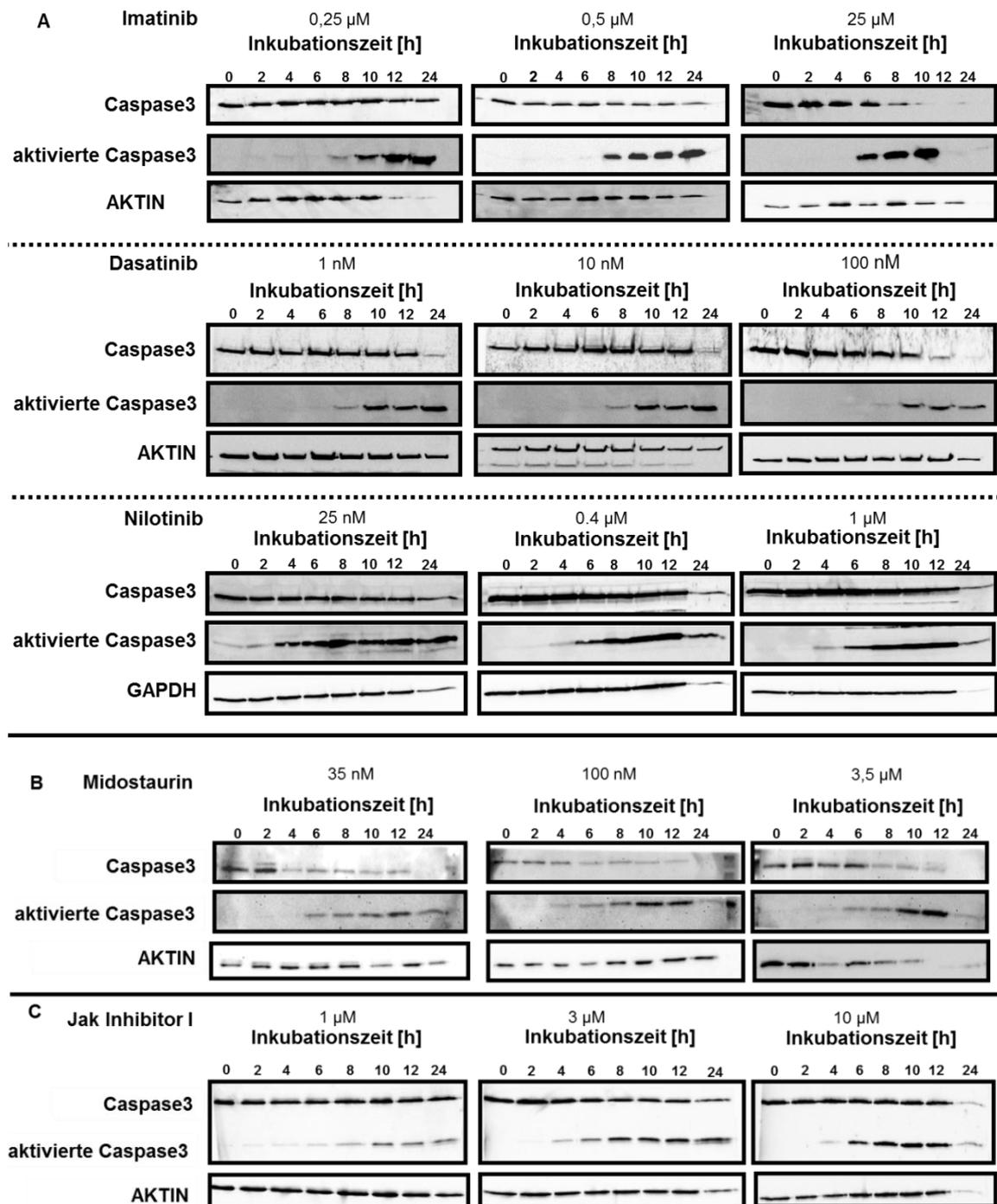


Abbildung 19: Die Spaltung von Caspase3 erfolgt unabhängig von der verwendeten TKI-Konzentration.

Ba/F3-BCR-ABL Zellen wurden mit Imatinib, Dasatinib oder Nilotinib behandelt (A). Ba/F3-FLT3-ITD Zellen wurden mit Midostaurin inkubiert (B) und Ba/F3-JAK2V617F Zellen mit Jak Inhibitor I (C). Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen mit dem entsprechenden TKI für den angegebenen Zeitraum behandelt. Insgesamt wurden 25μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die gleichmäßige Proteinbeladung der Spuren wurde durch den Nachweis von β -AKTIN bzw. GAPDH sichergestellt.

4.4 Auswirkungen der Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitoren-Konzentrationen

In aktuellen Publikationen wurde gezeigt, dass bereits die kurzzeitige Hochdosis-TKI-Behandlung BCR-ABL-positiver Zellen in der Induktion von Apoptose resultiert. Bereits nach einer 20-minütigen Inkubation von 32,5 μM Imatinib, 100 nM Dasatinib oder 1 μM Nilotinib und der Analyse der Proben nach 48 Stunden war Apoptose nachweisbar (Shah et al., 2008b; Snead et al., 2009; Hiwase et al., 2010). Als Beweis für das vollständige Entfernen des Inhibitors wurde das Wiederauftreten der Phosphorylierung von BCR-ABL (Y177) und CRKL gewertet (Shah et al., 2008b). Von Shah *et al.* wurde geschlussfolgert, dass die Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen nur zu einer kurzzeitigen Inhibition des Onkogens führt, die dennoch in der Induktion von Apoptose resultiert. Weiterhin wurde postuliert, dass diese kurzzeitige TKI-Behandlung zur Apoptose führt, da die Kinase sehr potent, wenn auch nur kurzfristig, gehemmt wurde.

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI ein genereller Mechanismus zu Grunde liegt, der unabhängig ist vom exprimierten Onkogen, vom verwendeten TKI sowie vom zellulären Hintergrund. Weiterhin wurde getestet, ob in den Onkogen-transformierten Zellen durch die Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI irreversibel Apoptose ausgelöst werden kann, oder ob die Zellen vielmehr vor der Induktion der Apoptose gerettet werden können.

4.4.1 Test der Toxizität der verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen auf Wildtyp-Zelllinien

Bei der Verwendung von Inhibitoren bleibt zu bedenken, dass alle gegenwärtig bekannten Tyrosinkinase-Inhibitoren nicht nur spezifisch eine Kinase hemmen, sondern ein mehr oder weniger breit gefächertes Spektrum an Kinasen konzentrationsabhängig inhibieren. Die Inhibition weiterer Kinasen und damit verbundene zytotoxische Effekte auf die Zellen mussten zunächst ausgeschlossen werden. Ba/F3-parentale Zellen dienten dabei als Kontrolle für die Spezifität der BCR-ABL TKI. Zellen, die mit dem FLT3-Wildtyp-Rezeptor (**FLT3-WT**) transfiziert waren, stellten die Kontrolle für Ba/F3-FLT3-ITD Zellen dar. JAK2-Wildtyp Zellen (**JAK2-WT**) wurden verwendet um die Spezifität des Jak Inhibitors I zu verifizieren. Die Zellen wurden mit verschiedenen TKI-Konzentrationen (s. 4.3.3) für 2 und 24 Stunden behandelt. Nach 2-stündiger Inkubation der TKIs wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in TKI-freies Medium zurückgesetzt (s. 3.3.2.2). Zur Bestimmung der Apoptose wurde 24 Stunden nach Beginn des Experiments der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt.

Wie der Abbildung 20 zu entnehmen ist, löste eine 2-stündige Inkubation mit entsprechenden HD-TKI keine zytotoxischen Effekte in den Kontroll-Zellen aus. Lediglich unter Behandlung mit Jak Inhibitor I war Apoptose in den Wildtyp-Zellen nachweisbar. Dieser Befund ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass Ba/F3-JAK2-WT für ihr Überleben auf die über JAK1 und JAK2 vermittelte IL-3-Signaltransduktion angewiesen sind (Palacios and Steinmetz, 1985). Bei einer 24-stündiger Dauerinkubation zeigte eine Konzentration von 3,5 μM Midostaurin und alle Konzentrationen des Jak Inhibitor I einen hohen Prozentsatz an apoptotischen Zellen. Dieser Effekt ist sicherlich auf die unspezifische Hemmung von Kinasen zurückzuführen, auch *off target* Effekt genannt.

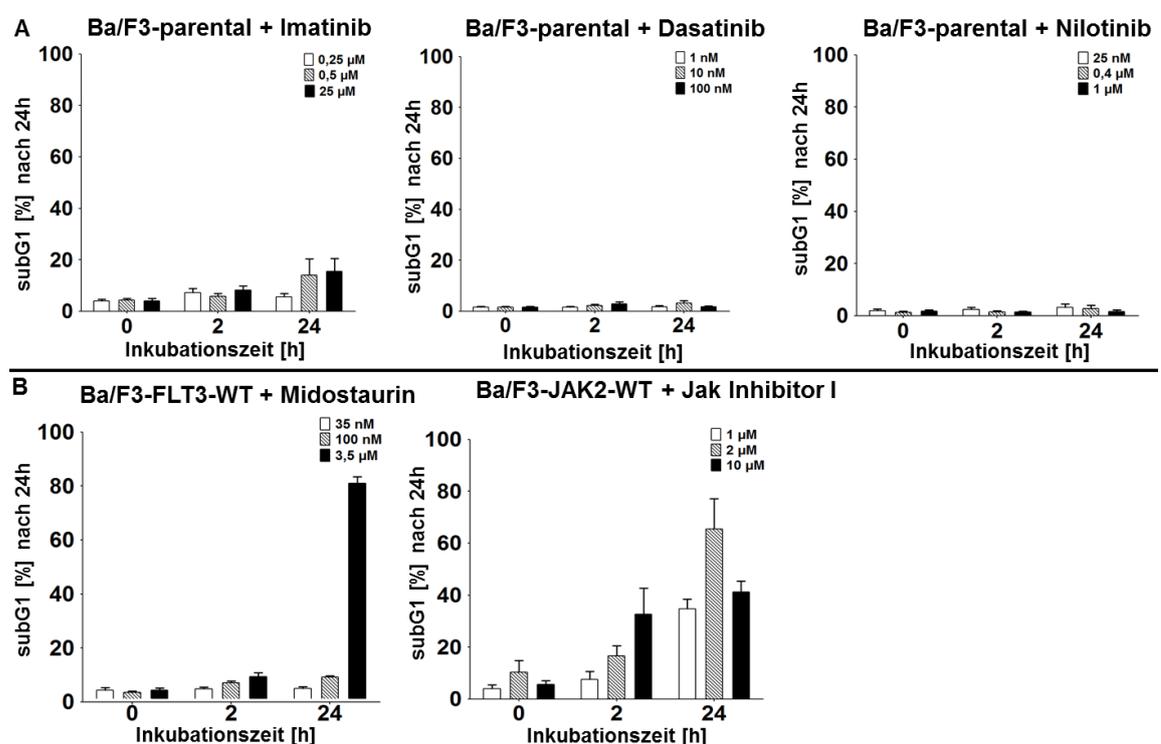


Abbildung 20: Die verwendeten HD-TKI-Konzentrationen lösen bei Kurzzeit-Inkubation keine Zytotoxizität in Kontroll-Zellen aus.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration für 2 oder 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die dauerhaft nur mit DMSO behandelt wurden (0h). Dabei wurde so viel DMSO hinzugegeben, wie in der TKI-behandelten Probe mit der höchsten DMSO-Konzentration verwendet wurde. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mittels Zellzyklus-Analyse auf ihren DNA-Gehalt analysiert. Gezeigt ist der Anteil der Zellen, die sich zum Analysezeitpunkt in der subG1-Phase des Zellzyklus befanden. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von mindestens drei Messungen.

Insgesamt ergab die Hochdosis-Inkubation der verwendeten Inhibitoren für kurze Zeit in den Kontroll-Zellen keine Hinweise für unspezifische zytotoxische Effekte, die ursächlich für die beschriebene Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Inkubation sein könnten. Die HD-TKI-Konzentrationen können daher für die Kurzzeit-Inkubation auf Onkogen-abhängigen Zellen eingesetzt werden.

4.4.2 Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen

Für Dasatinib, Imatinib sowie Nilotinib ist bereits bekannt, dass sie bei Kurzzeit-Inkubation im Hochdosis-Bereich in K562-Zellen Apoptose auslösen (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Für andere TKIs ist in Bezug auf ihre Wirkung unter Kurzzeit-Inkubation bislang nichts bekannt. Die Wirkung von hohen Konzentrationen an Midostaurin und Jak Inhibitor I nach Kurzzeit-Exposition sollten daher analysiert werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, ob die Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis TKI, ein genereller Mechanismus für alle Inhibitoren ist. Zum anderen sollte geprüft werden, ob die Kurzzeit-Exposition mit Hochdosis Imatinib oder Dasatinib Apoptose in Ba/F3-BCR-ABL Zellen auslöst. Zu diesem Zweck wurden *Wash Out* Experimente mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden TKIs (s. 4.3.3) durchgeführt. Die Zellen wurden dazu für 2 Stunden mit HD-TKI inkubiert, gefolgt von einer intensiven Waschprozedur mit PBS und der Analyse mittels Propidiumiodid nach 24 Stunden. Für die verwendeten TKI-Konzentrationen konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie bei Kurzzeit-Inkubation keine unspezifische Toxizität auf Wildtyp-Zelllinien besitzen (s. 4.4.1).

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, zeigte sich für die untersuchten Inhibitoren Imatinib, Dasatinib, Midostaurin und Jak Inhibitor I, dass hohe TKI-Konzentrationen bereits nach 2-stündiger Behandlung in den Zellen Apoptose auslösen können. Niedrige TKI-Konzentrationen hingegen waren nicht in der Lage bei 2-stündiger Expositionszeit Apoptose auszulösen (s. 4.3.2, 4.3.3). Hier waren längere Inkubationszeitzeiten zwischen 10 und 12 Stunden notwendig (s. 4.3.2). Alle verwendeten TKI-Konzentrationen induzierten nach 24-stündiger Dauerinkubation hohe Level an apoptotischen Zellen.

In früheren Experimenten (s. 4.3.1, 4.3.3) konnte bereits gezeigt werden, dass hohe TKI-Konzentrationen nicht zu einer veränderten Apoptosekinetik führten. Zusammen mit den oben gezeigten Daten wirft dies, die Frage nach dem molekularen Mechanismus der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI auf.

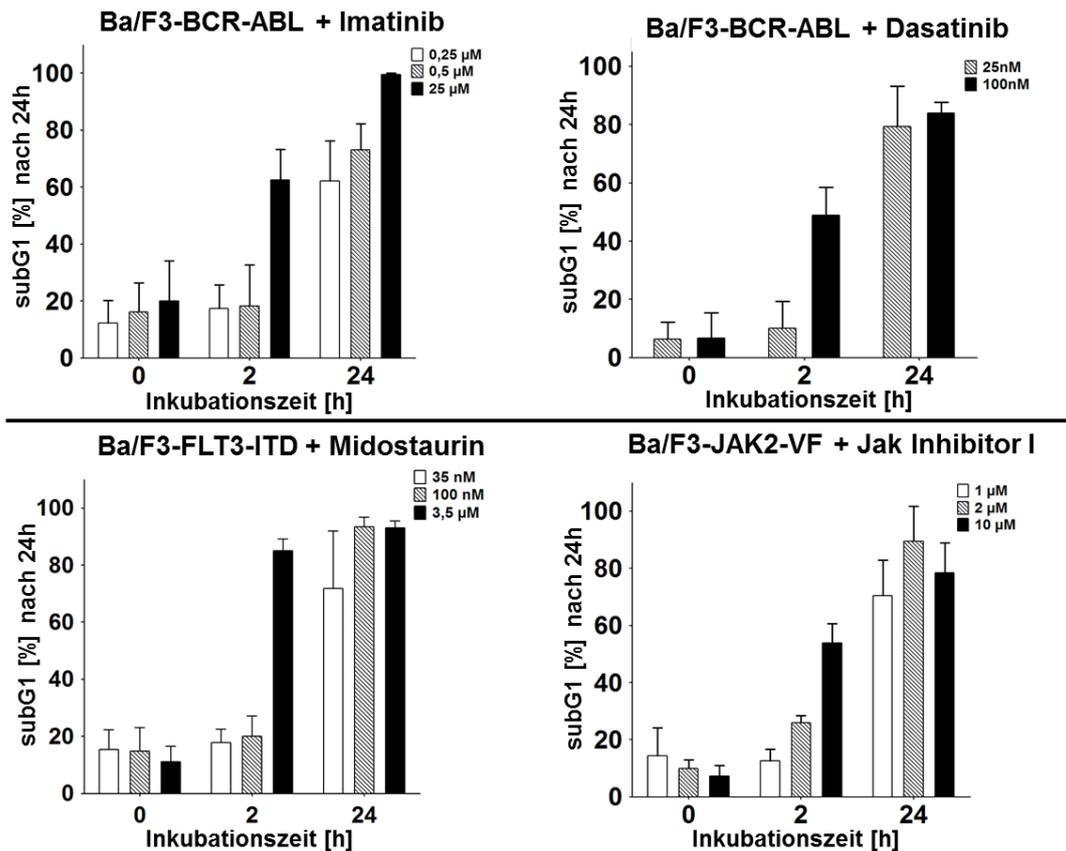


Abbildung 21: Hohe TKI-Konzentrationen induzieren nach 2-stündiger Expositionszeit Apoptose in Onkogenen-transformierten Zellen.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration für 2 oder 24 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit DMSO dauerbehandelt wurden (0h). Dabei wurde so viel DMSO hinzugegeben, wie in der TKI-behandelten Probe mit der höchsten DMSO-Konzentration verwendet wurde. 24 Stunden nach Start des Experiments wurde der DNA-Gehalt der Zellen analysiert. Gezeigt ist Anteil der Zellen, die sich zum Analysezeitpunkt in der subG1-Phase des Zellzykluses befinden. Dargestellt ist der Mittelwert + SEM von mindestens drei unabhängigen Messungen.

4.4.3 Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis-Tyrosinkinase-Inhibitoren unter repetitivem *Wash Out*

Auf Basis eigener Daten konnte ein unspezifischer zytotoxischer Effekt der Kurzzeit-Exposition mit Hochdosis TKI als Erklärung für die Apoptoseinduktion weitgehend ausgeschlossen werden (s. 4.4.1). Bei Betrachtung der erhobenen Daten zur Apoptosekinetik nach kurzzeitiger TKI-Inkubation (s. 4.3.1, 4.3.3) erscheint die Möglichkeit einer irreversiblen Induktion von Apoptose unwahrscheinlich, da sonst zu einem früheren Zeitpunkt aktivierte Caspase3 detektierbar sein müsste. Es wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es nach dem *Wash Out* residuelle TKI-Aktivität gibt, die zu einer kontinuierlichen Exposition von Zellen führen und die Apoptoseinduktion erklären würde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die TKI-behandelten Zellen einem konsekutiven *Wash Out* unterzogen wurden. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit HD-TKI behandelt und in der Folge wurde das Zellkulturmedium zweimal durch PBS ersetzt, bevor die Zellen zurück in TKI-freies Zellkulturmedium aufgenommen wurden. Diese Proben werden als „**1x**“ bezeichnet. Nach 2 Stunden wurden diese Zellen einem erneuten *Wash Out* unterzogen und im Folgenden „**2x**“ genannt. Dieser Schritt wurde ein drittes Mal wiederholt („**3x**“). Es wurde also ein Mediaumaustausch mit zeitlichem Versatz durchgeführt. Parallel wurden die Zellkulturüberstände (**S**), die bei dem jeweiligen Waschschrift gewonnen wurden auf bis zu diesem Zeitpunkt unbehandelte Zellen übertagen und entsprechend des korrespondierenden *Wash Outs* als „**S1**“, „**S2**“ und „**S3**“ bezeichnet. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen (**Medium**) sowie Zellen, die mit der entsprechenden TKI-Konzentration dauerbehandelt wurden (**24h**). Der genaue Ablauf dieser Versuche ist unter 3.3.2.3 detailliert erklärt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Beginn der TKI-Behandlung mittels Zellzyklus-Analyse, AnnexinV-Färbung und intrazellulärer aktivierter Caspase3-Färbung am FACS (s. 3.3.3.2, 3.3.3.3, 3.3.3.4) analysiert.

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Zellzyklus-Analyse für Ba/F3-Zellen dargestellt. Bei Betrachtung der 1x gewaschenen Proben zeigte sich für alle TKIs, dass die Kurzzeit-Exposition mit hohen TKI-Konzentrationen zu hohen Prozentsätzen an apoptotischen Zellen führt. Die Proben, die jedoch einem zweiten *Wash Out* unterzogen wurden, wiesen einen deutlich geringeren Anteil an apoptotischen Zellen auf. Zellen die mit Imatinib, Dasatinib oder Midostaurin behandelt wurden zeigten nach dem zweiten *Wash Out* (2x) Apoptoseraten, die vergleichbar waren mit denen unbehandelter Zellen. Dies entsprach einer Reduktion der Apoptose um mehr als 70 Prozent. Dieser Trend setzt sich bei allen TKI behandelten Zellen nach dem dritten *Wash Out* (3x) weiter fort. In den untersuchten Proben konnten kaum noch apoptotische Zellen detektiert werden. Lediglich Zellen, die mit Nilotinib oder Jak Inhibitor I behandelt wurden, zeigten nach dem zweiten *Wash Out* (2x) noch deutlich erhöhte Apoptoseraten, welche sich durch einen dritten Waschschrift verringern ließen. Jedoch blieb hier der Anteil apoptotischer Zellen auch nach dem dreimaligem *Wash Out* im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich erhöht.

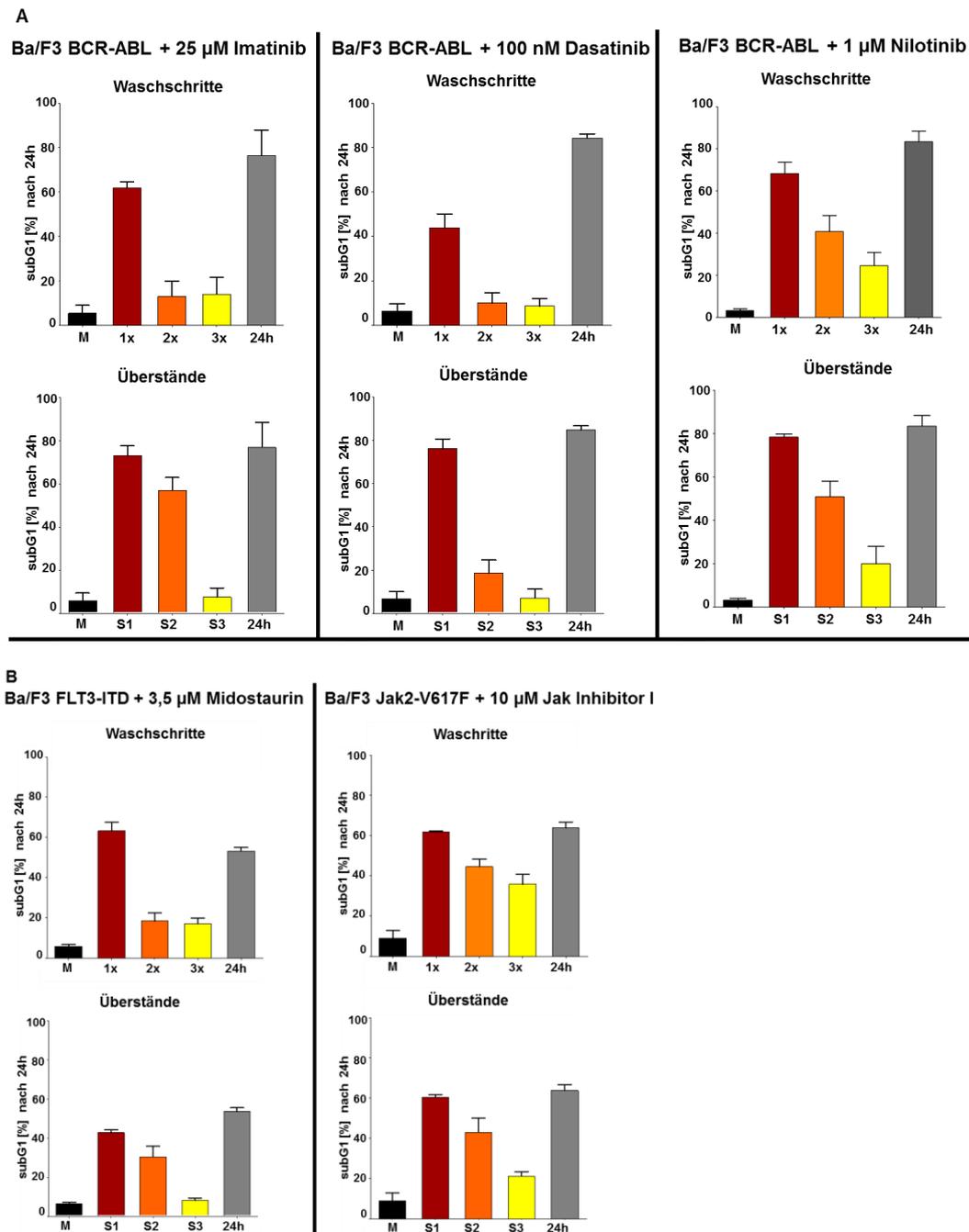


Abbildung 22: Repetitives *Wash Out* rettet Onkogen-transformierte Zellen vor der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden mit TKI behandelt und zum Entfernen der TKIs gewaschen. Dabei wurde das Medium zweimal durch PBS im gleichen Volumen ersetzt. Nach dem *Wash Out* wurden die Zellen in TKI-freies Medium zurückgesetzt (1x). Nach 2 Stunden wurden diese Zellen erneut einer Waschprozedur unterzogen (2x). Dies wurde ein drittes Mal wiederholt (3x). Vor jedem *Wash Out* wurden die Zellkulturüberstände der behandelten Proben auf zuvor unbehandelte Proben übertragen und entsprechend benannt: S1, S2, S3. Die Proben wurden 24 Stunden nach Versuchsbeginn mittels Propidiumiodid-Färbung im FACS ausgewertet. (A) Ergebnis von Ba/F3-BCR-ABL Zellen nach Behandlung mit entweder Imatinib, Dasatinib oder Nilotinib. (B) Ergebnis der Behandlung von Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mit Midostaurin und von Ba/F3-JAK2V617F Zellen mit Jak Inhibitor I. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase des Zellzykluses. Es ist der Mittelwert von mindestens drei Messungen + SEM.

Die Betrachtung der Proben nach Übertragung von Zellkulturüberstand machte deutlich, dass nach Inkubation mit S1 hohe Anteile an apoptotischen Zellen detektiert werden konnten. Dies war erwartet, da es sich bei S1 um den Zellkulturüberstand handelt, der direkt mit TKI versetzt wurde. Viel bedeutender war daher die Tatsache, dass Zellen, die mit dem Überstand der 1x gewaschenen Zellen (S2) behandelt wurden, hohe Apoptoseraten zeigen. Besonders die Proben S2 von vormals Imatinib, Nilotinib, Midostaurin und Jak Inhibitor I behandelten Zellen zeigten hohe Anteile an apoptotischen Zellen. Der Übertrag von Medium vor dem dritten *Wash Out* auf unbehandelte Zellen, resultierte nur noch bei Nilotinib und Jak Inhibitor I behandelten Zellen in der Induktion von Apoptose. Bei den übrigen Proben wurden nur die Prozentsätze der Grundapoptose erreicht. Die Ergebnisse des Mediumübertrags deuten darauf hin, dass residuelle TKI-Konzentrationen nach dem Mediaumaustausch vorhanden sein müssen, da S2 in unbehandelten Zellen Apoptose auslöst, obwohl das Medium zu keinem Zeitpunkt mit TKI versetzt wurde. Die einzige Möglichkeit zur TKI-Übertragung in dieses Medium bieten die vormals TKI-behandelten Zellen. Es wäre jedoch möglich, dass der TKI in vormals behandelten Zellen retiniert wurde und in der Zeit nach dem *Wash Out* ins Medium abgegeben wurde. Die genaue Ursache für das Vorhandensein von relevanten TKI-Konzentrationen in S2 blieb nach diesen Versuchen unklar.

Zusammenfassend konnte mit diesen repetitiven *Wash Out* Versuchen gezeigt werden, dass in Zellen nach Kurzzeit-Exposition mit HD-TKI Apoptose nicht irreversibel ausgelöst wurde, sondern vielmehr Apoptose durch konsekutives *Wash Out* verhindert werden konnte. Dies untermauert die vorherigen Daten (s. 4.3.3, 4.4.2), da nun deutlich gezeigt werden konnte, dass die Zellen durch Kurzzeit-Exposition mit HD-TKI nicht irreversibel geschädigt werden.

Die Zellzyklus-Analyse zeigte insgesamt hohe Apoptoseraten an. Zellen, die sich in dieser Phase des Zellzyklus befinden, besitzen keine intakte DNA mehr. Die Fragmentierung von DNA kann sowohl durch Nekrose als durch Apoptose hervorgerufen werden. Bei gleichem Versuchsablauf wurde daher zum Analysezeitpunkt 24 Stunden eine AnnexinV-Färbung exemplarisch für Ba/F3-BCR-ABL Zellen wie unter 3.3.3.3 beschrieben durchgeführt, was die Identifizierung von Zellen in der frühen Phase der Apoptose erlaubt. Die Ergebnisse der Färbung sind in Abbildung 23 dargestellt.

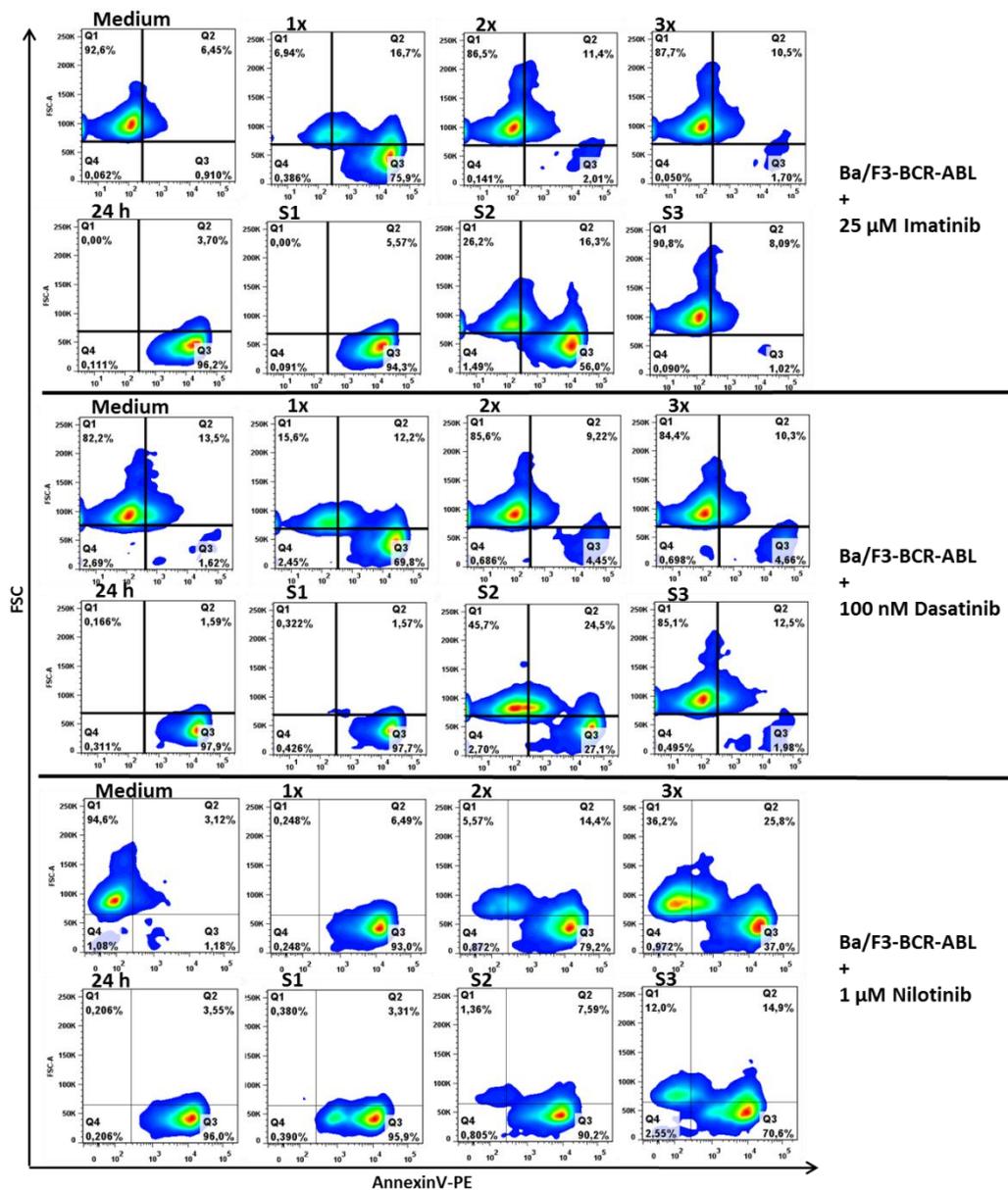


Abbildung 23: Repetitives *Wash Out* rettet Ba/F3-BCR-ABL Zellen vor der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI.

Insgesamt wurden 1×10^6 Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration exponiert. Die Proben wurden behandelt und benannt wie im Text beschrieben. Die Färbung der Proben erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Experiments. Dargestellt ist die Intensität der AnnexinV-PE-Färbung in arbiträren Einheiten gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC). Zellen in Q2 und Q3 sind positiv für AnnexinV-PE. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOWJO-Software. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass die Probe, welche nur einmal gewaschen wurde (1x) ebenso wie die Proben nach Mediumübertrag S1 und S2, stark AnnexinV positiv war. Dies korreliert mit den hohen Anteilen an Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus. Die Proben 2x, 3x, und S3 wiesen jedoch nur eine geringe Population an AnnexinV positiven Zellen auf. Insgesamt kann gesagt werden, dass die vorangegangenen Ergebnisse der Zellzyklus-Analysen mit denen der AnnexinV-Färbung korrelieren.

Zusätzlich zur AnnexinV-Färbung wurde in einem weiteren Ansatz eine intrazelluläre Färbung gegen aktivierte Caspase3 exemplarisch für Ba/F3-BCR-ABL Zellen durchgeführt. Die Spaltung der Procaspase3 zur aktiven Caspase3 ist ein früher messbarer Indikator für die Induktion von Apoptose in Zellen. Der Ablauf der Färbung ist unter 3.3.3.4 erklärt. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 dargestellt.

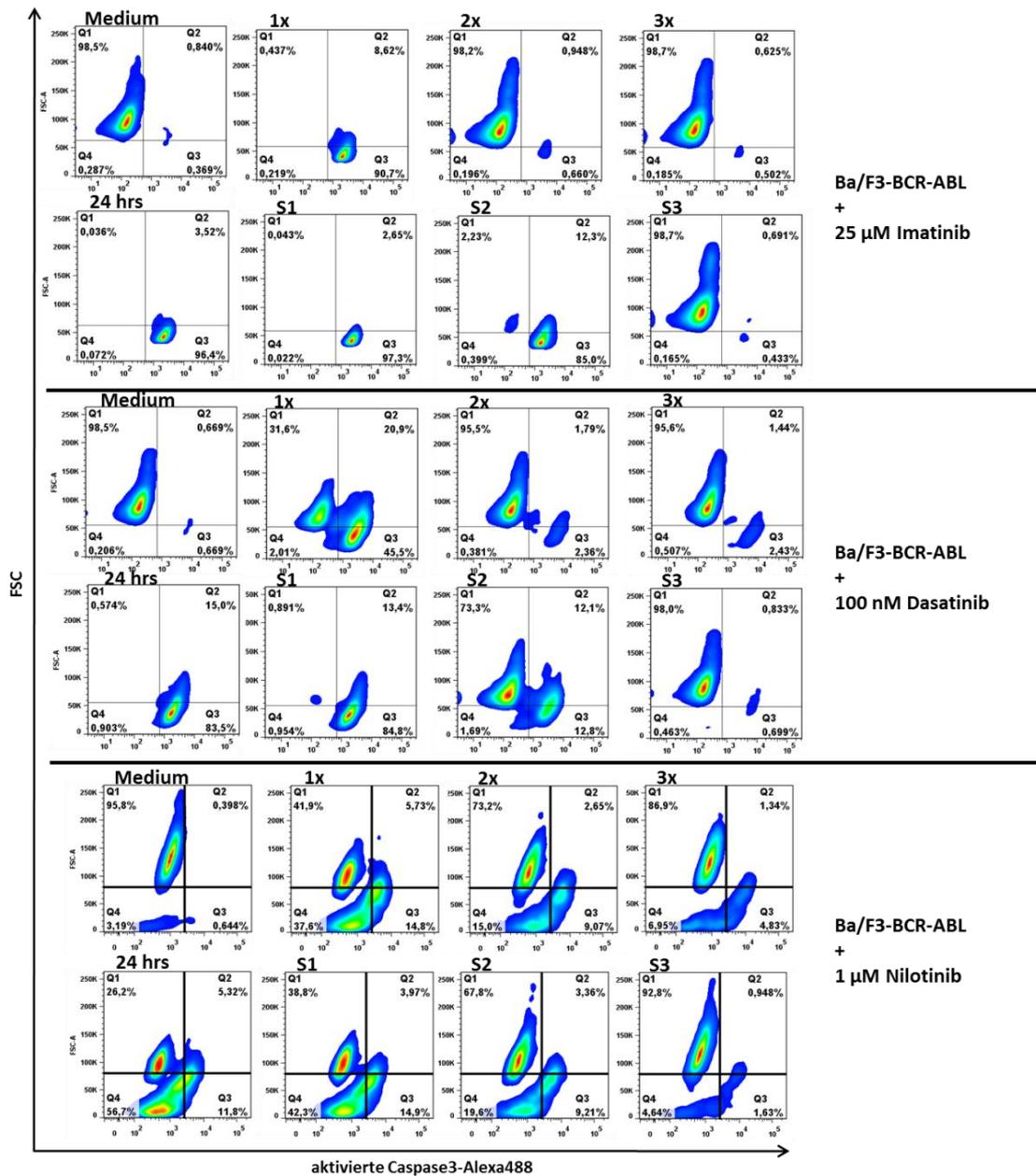


Abbildung 24: Repetitives Wash Out schützt Ba/F3-BCR-ABL Zellen vor der Aktivierung von Caspase3.

Insgesamt wurden 1×10^6 Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration exponiert. Die Proben wurden behandelt wie im Text beschrieben. Die Färbung der Proben erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Experiments. Dargestellt ist die Intensität der aktivierten Caspase3-Alexa488 Färbung in abiträren Einheiten gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC). In den Quadranten Q2 und Q3 befinden sich die aktivierten Caspase3-Alexa488 positiven Zellen. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOWJO-Software. Es wurde ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Wiederholungen zur Darstellung ausgewählt.

Eine deutlich verstärkte Spaltung von der Procaspase3 in die aktive Caspase3 im Vergleich zur Medium-Kontrolle konnte in den Proben 1x, S1 und S2 sowie in der dauerbehandelten Kontrolle detektiert werden, was vergleichbar war mit dem Vorhandensein von Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus. Die Proben 2x, 3x und S3 zeigten eine deutliche Reduktion der Zellpopulation, in denen die aktive Caspase3 vorliegt. Diese Ergebnisse korrelieren sowohl mit der AnnexinV-Färbung als auch mit den Messungen des Zellzyklus.

Sowohl die AnnexinV- als die aktivierte Caspase3-Färbung konnten zeigen, dass die Zellen durch repetitives *Wash Out* tatsächlich vor kontrolliert ablaufender Apoptose gerettet werden können. Darüber hinaus konnten die Ergebnisse der Zellzyklus-Analyse bestätigt werden, was beweist, dass die Zellzyklus-Analyse ein valider, einfacher und kostengünstiger Assay zur Detektion von Apoptose ist.

Um die Relevanz der Daten des repetitiven *Wash Outs* für das humane System zu überprüfen, sollten in der Folge humane Zelllinien untersucht werden. Dazu wurden BCR-ABL positive K562 Zellen und FLT3-ITD positive MV4-11 Zellen mit den entsprechenden TKIs behandelt und durchliefen die gleichen Waschschriffe wie oben beschrieben. Die Analyse der Probe erfolgte aufgrund der erhobenen Vergleichsdaten mittels Zellzyklus-Analyse. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 zusammengestellt.

In den humanen Zelllinien ergab sich ein vergleichbares Ergebnis wie in den murinen Ba/F3-Zellen. Nach dem einmaligen *Wash Out* konnten hohe Level an apoptotischen Zellen gemessen werden. Die Apoptoserate wurde nach Durchführung eines zweiten *Wash Outs* um 80% bei Imatinib behandelten K562 Zellen reduziert, um 70% bei Dasatinib behandelten K562 Zellen sowie um 55% bei Midostaurin behandelten MV4-11 Zellen. Der Übertrag des Inkubationsmediums S1 und S2 löste in vormals unbehandelten Zellen Apoptose aus. Die Ergebnisse des humanen Systems konnten somit mit denen des murinen Systems verglichen werden, wobei erwähnt werden sollte, dass die subG1-Raten der Proben 1x, S1, S2 und 24 Stunden im murinen Ba/F3-System höher waren.

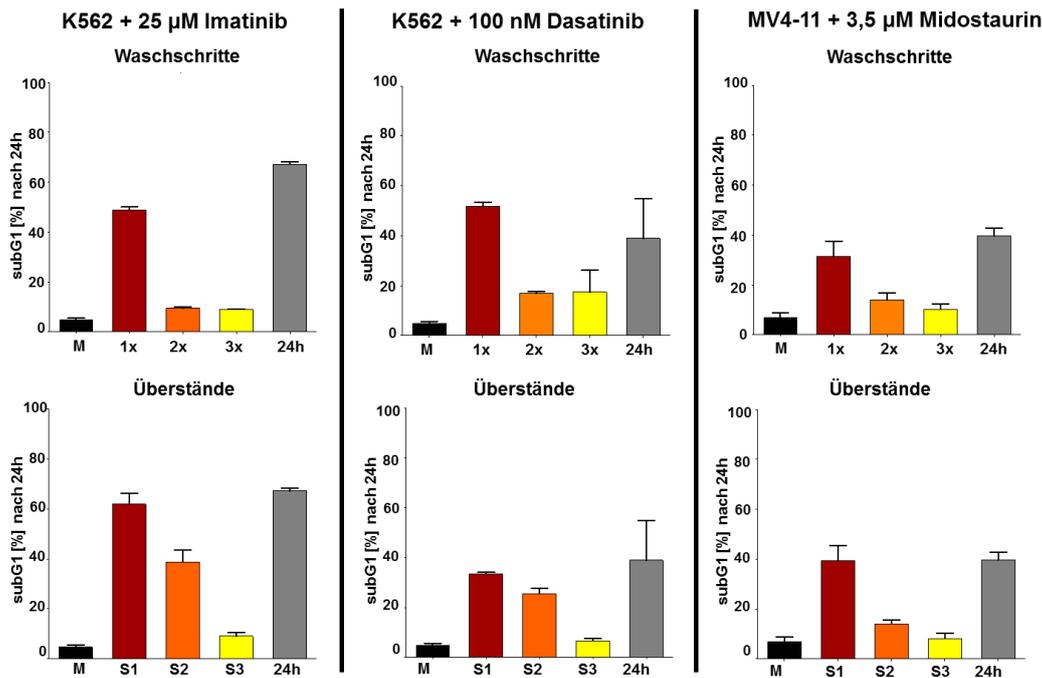


Abbildung 25: Repetitives *Wash Out* rettet humane Onkogen-mutierte Zellen vor Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI.

Es wurden 5×10^4 K562/ MV4-11 Zellen pro ml für 2 Stunden mit der entsprechenden TKI-Konzentration behandelt und zum Entfernen der Inhibitoren gewaschen. Dabei wurde das Medium zweimal durch PBS im gleichen Volumen ersetzt. Nach dem *Wash Out* wurden die Zellen in TKI-freies Medium zurückgesetzt (1x). Nach 2 Stunden wurden diese Zellen erneut einer Waschprozedur unterzogen und erneut in TKI-freies Medium überführt (2x). Dies wurde ein drittes Mal wiederholt (3x). Vor jedem *Wash Out* wurden die Zellkulturüberstände der behandelten Proben auf zuvor unbehandelte Proben übertragen und entsprechend benannt: S1, S2, S3. Die Proben wurden 24 Stunden nach Beginn mittels Propidiumiodid-Färbung im FACS analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. Es ist der Mittelwert von mindestens drei Messungen + SEM abgebildet.

4.4.4 Signaltransduktion unter repetitivem *Wash Out*

Aufgrund der Beobachtung in den vorangegangenen Experimenten, dass Zellen nach kurzzeitiger TKI-Exposition und der Durchführung von nur einem *Wash Out* in Apoptose gehen, ein weiterer Mediaumaustausch die Zellen jedoch rettet, ist anzunehmen, dass sich dies auch auf Signaltransduktionsbene der Zellen widerspiegelt. Es sollte daher untersucht werden, wie sich die Phosphorylierung bestimmter Proteine unter repetitivem *Wash Out* verhält und ob sich ein prädiktiver Marker für das Überleben der Zellen ausmachen lässt.

Die Zellen wurden daher, wie bereits beschrieben, für 2 Stunden mit HD-TKI exponiert, gefolgt vom repetitivem *Wash Out* sowie dem Transfer des Zellkulturüberstands auf zuvor unbehandelte Zellen. Nach Entfernen des TKI wurden die Zellen in TKI-freies Zellkulturmedium zurückgesetzt und 2 Stunden später zur Analyse im Western Blot vorbereitet. Als Kontrollen dienten eine nur mit DMSO behandelte Probe (M) sowie die dauerbehandelten Proben 2h und 10h. Zunächst wurden P-ERK und P-STAT5

untersucht, da zuvor gezeigt werden konnte, dass sie von allen untersuchten Onkogenen aktiviert werden (s. 4.1).

Die Analyse der Phosphorylierung von ERK und STAT5 ist in Abbildung 26 dargestellt und ergab eine Reduktion der Phosphorylierung unter TKI-Dauerbehandlung (2h, 10h) im Vergleich zur unbehandelten Probe. Nach dem einmaligen *Wash Out* (1x) zeigte sich für TKI-behandelte Zellen, dass die Phosphorylierung der beiden Marker noch immer stark reduziert war. Die Signale erholten sich jedoch nach dem wiederholten Mediaumaustausch (2x, 3x). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Phosphorylierung von ERK und STAT5 nach Mediumübertrag (S1, S2) ebenfalls deutlich reduziert war. Nur in S3 konnte teilweise eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Reduktion der Phosphorylierung in den Proben S1, S2, und 1x deutet auf TKI-Aktivität hin. Für die Probe S1 ist dies nicht überraschend, da der TKI direkt ins Medium gegeben wurde. Für die Proben S2 und 1x ist dieses Ergebnis zwar konsistent mit den vorherigen Beobachtungen, dass Apoptose in diesen Proben induziert wird, wirkt aber dennoch die Frage auf, ob der TKI durch den *Wash Out* nicht vollständig entfernt werden konnte oder ob er eventuell von den Zellen retiniert wird. Das Wiederauftreten der Phosphorylierung von STAT5 und ERK nach dem zweiten Mediaumaustausch korreliert mit dem Überleben der Zellen (s. 4.4.3).

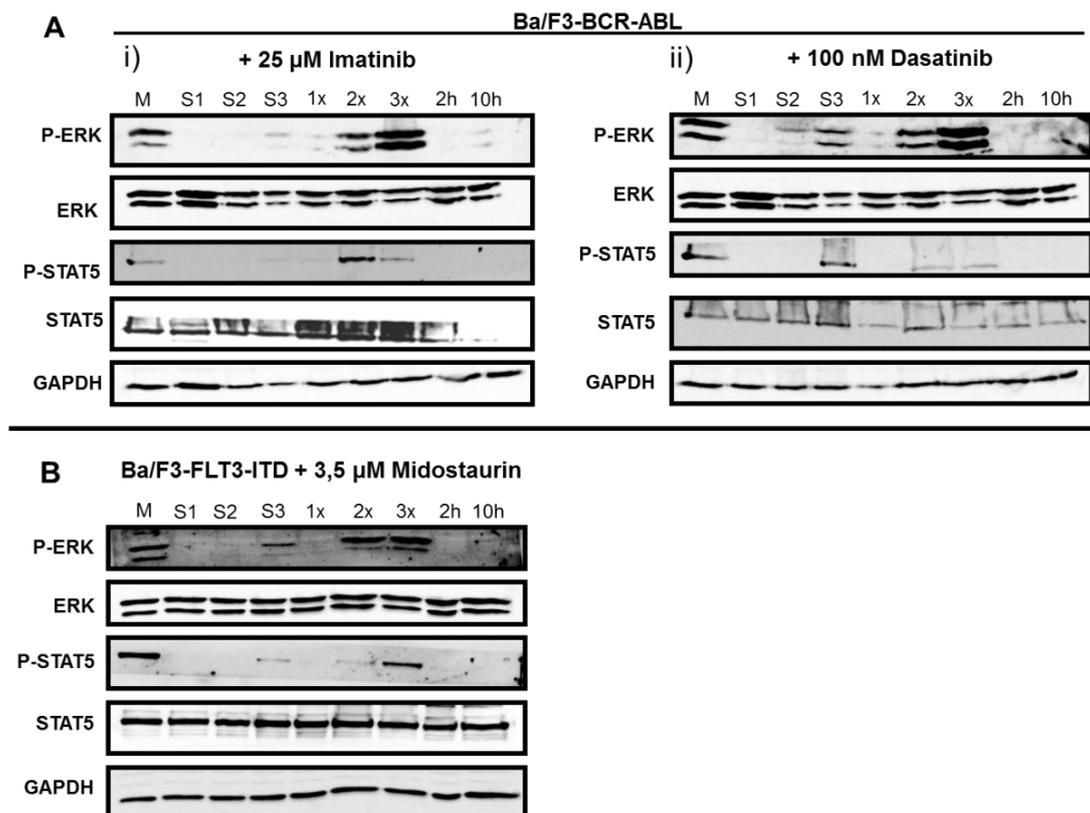


Abbildung 26: Die Phosphorylierung von P-STAT und P-ERK ist erst nach dem zweiten *Wash Out* wieder rekonstituiert.

In (A) dargestellt ist die Western Blot-Analyse der Ba/F3-BCR-ABL Zellen nach repetitivem *Wash Out* von Imatinib (i) oder Dasatinib (ii). (B) Ba/F3-FLT3-ITD Zellen nach *Wash Out* von Midostaurin. Die Proben wurden 2 Stunden nach Durchführung der jeweiligen Wasch- bzw. Übertragschritte lysiert. Die Zellen hatten somit Zeit die Phosphorylierungssignale wieder zu regenerieren. Insgesamt 2×10^6 Zellen wurden lysiert. Aufgetragen sind 25 μg Totalprotein. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper gegen die Proteine auf der Membran hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH diente dem Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung.

Für BCR-ABL positive Zellen ist neben STAT5 und ERK auch CRKL als Protein beschrieben, dessen Aktivität als entscheidend für die Transformation bekannt ist. Bei CRKL handelt es sich um ein Adapterprotein, dass in der Lage ist direkt an BCR-ABL zu binden und somit Signaltransduktion zu vermitteln (de Jong et al., 1997). Es ist weiterhin bekannt, dass CRKL nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis-TKI sehr rasch rephosphoryliert, was als Erholung der BCR-ABL Kinaseaktivität interpretiert wurde (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Aus diesem Grund sollte die Phosphorylierung von CRKL zusammen mit der BCR-ABL Phosphorylierung im Rahmen des repetitiven *Wash Outs* näher untersucht werden. Dazu wurden die Phosphorylierungsstellen Y177 von BCR und Y412 von ABL sowie Y207 von CRKL näher betrachtet. In der Literatur wurde in Permutationsexperimenten gezeigt, dass diese Phosphorylierungsstellen entscheidend sind für Aktivität des jeweiligen Proteins (de Jong et al., 1997; Brasher and Van Etten, 2000; Chu et al., 2007). Der *Wash Out* wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

Die Analyse dieser Phosphorylierungsmarker nach repetitivem *Wash Out* mit Mediumtransfer, zeigte eine starke Diskrepanz der Phosphorylierungsmuster der beiden BCR-ABL Phosphorylierungsstellen. Während der Tyrosin-Rest Y412 sowohl in den Kontrollproben 2h und 10h, wie auch in den Proben 1x, S1 sowie S2 eine deutliche Reduktion der Signalintensität aufwies, war die Phosphorylierung an der Position Y177 nur bei 10-stündiger Behandlung gegenüber der Medium-Kontrolle reduziert. In den Proben 1x, S1 und S2 war die Phosphorylierung von BCR-ABL an der Position 177 im Vergleich zur Medium-Kontrolle nahezu unverändert vorhanden. Die gleichzeitige Analyse der CRKL-Phosphorylierung ergab, dass sich bereits nach Durchführung von nur einem Mediaustausch (1x) wieder eine deutliche Phosphorylierung zeigte. Ebenso war eine Phosphorylierung in der Probe S2 zu beobachten. Die Kontrollen 2h und 10h wiesen, aber eine deutliche Reduktion der CRKL-Phosphorylierung auf. Die parallele Analyse von STAT5 ergab das bekannte Ergebnis einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung in den Proben 1x, S1, S2 sowie 2h und 10h. Somit zeigte sich zusammenfassend eine deutliche Diskrepanz in der Phosphorylierungskinetik der beteiligten Signalproteine. Die beobachteten Phänomene bestätigen die publizierten Daten

von Shah und Kollegen, die nach der Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen auf der Basis des Phosphorylierungsstatus von CRKL fälschlicherweise eine vollständige Auswaschung der TKI-Aktivität annahmen (Shah et al., 2008b). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass einzig der Phosphorylierungszustand von STAT5 mit der vorhandenen TKI-Aktivität und damit der Induktion von Apoptose korreliert. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage nach der Dephosphorylierungskinetik der untersuchten Marker unter TKI-Exposition (s. 4.6.).

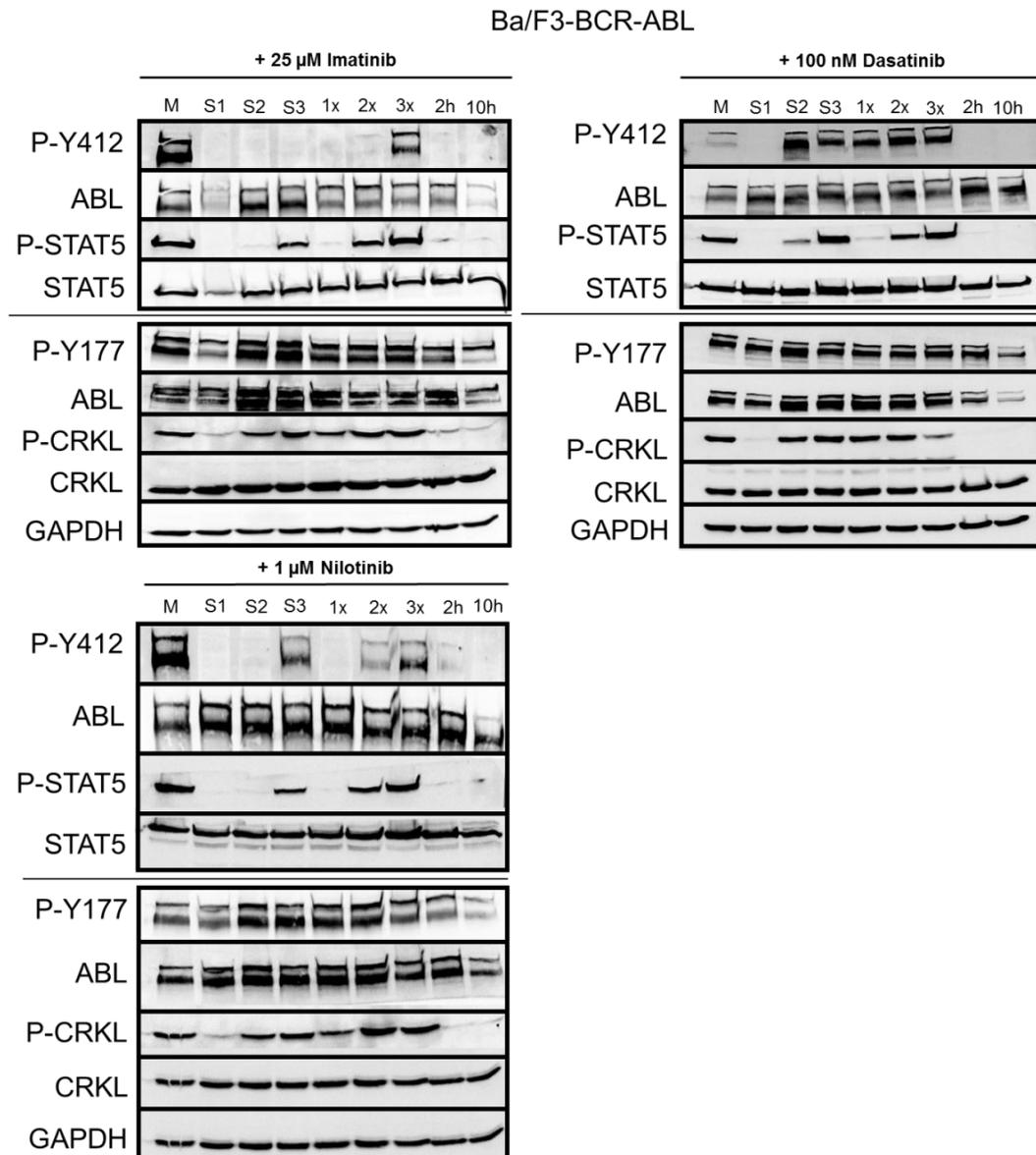


Abbildung 27: Differentielle Rekonstitution der Phosphorylierung an den BCR-ABL Tyrosin-Resten 177 und 412 sowie der Signalproteine STAT5 und CRKL.

Western Blot Analyse der Signaltransduktion in Ba/F3-BCR-ABL Zellen nach repetitivem *Wash Out*. Die Trennlinie der Blots zeigt an, dass die gleichen Lysate auf 2 unterschiedlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen wurden. Es wurden 2×10^6 Zellen entweder mit 25 µM Imatinib, 100 nM Dasatinib oder 1 µM Nilotinib inkubiert und jeweils 2 Stunden nach Durchführung der im Text beschriebenen Waschvorgänge mit Mediumtransfer lysiert. Aufgetragen wurden 25 µg Gesamtprotein. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper gegen die Proteine hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH diente dem Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung.

Insgesamt deutete die Analyse aller Signaltransduktionsproteine die Möglichkeit an, dass es residuelle TKI-Mengen in den Zellen geben könnte, die nicht entfernt werden konnten. Zum *Wash Out* wurde PBS verwendet, das jedoch nur eine geringe Proteinbindungskapazität besitzt. Aus diesem Grund wurden weitere *Wash Out* Experimente durchgeführt mit veränderten Bedingungen durchgeführt.

4.5 Repetitives *Wash Out* mit Zellkulturmedium

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse des repetitiven *Wash Outs* durch unzureichendes Waschen entstanden waren, wurden weitere *Wash Out* Experimente durchgeführt. Dabei wurde anstelle des zuvor verwendeten PBS vorgewärmtes Zellkulturmedium mit 10%igem FCS zum Entfernen der TKI verwendet. Dies könnte aufgrund der höheren Proteinbindungskapazität des FCS in einer höheren Effektivität im Rahmen der Waschprozedur führen könnte. Das Waschprotokoll wurde ebenfalls nach Shah et al. angepasst (Shah et al., 2008b). Das TKI-haltige Medium wurde nach der Zentrifugation abgenommen und durch neues TKI-freies Medium mit dem 50%igem Volumen der TKI-Inkubation ersetzt. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt und anschließend wurden die Zellen in TKI-freies Medium zurückgesetzt. Es wurde weiterhin dreimal mit zeitlichem Versatz ein *Wash Out* durchgeführt und vor jedem Waschgang wurde das Inkubationsmedium auf unbehandelte Zellen transferiert. Die Benennung der Proben erfolge daher identisch zu den vorherigen Versuchen. Die Auswertung der Proben nach 24 Stunden erfolgte mittels Apoptose-Assays und Western Blot. Für die Durchführung dieser Experimente wurde aus Kapazitätsgründen nur die humane K562 Zelllinie verwendet.

4.5.1 Induktion von Apoptose nach repetitivem *Wash Out* mit Zellkulturmedium

Zunächst wurde 24 Stunden nach Durchführung des repetitiven *Wash Outs* mit Medium der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 A dargestellt. Es zeigte sich, dass die Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI auch nach Waschen mit Medium zu hohen Apoptoseraten führt (1x). Die Wiederholung des Mediaustausches (2x, 3x) resultierte in einer deutlichen Reduktion der apoptotischen Zellen. Auch der Transfer von Zellkulturüberständen auf unbehandelte Zellen, in den Proben S1 und S2 führte zur Apoptose. Insgesamt waren die Apoptoseraten, besonders die der Probe S2, geringer als beim Entfernen der TKI mit PBS. So zeigten die Proben nach dem Entfernen der TKI mit PBS 40% apoptotische Zellen, mit Medium gewaschene

Zellen nur 15% (s. 4.4.3). Shah und Kollegen konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen zu Apoptose nach 48 Stunden führt. Um eine direkte Vergleichbarkeit zu diesen Daten zu gewährleisten, wurden die Proben der vorliegenden Arbeit auch zum Zeitpunkt 48 Stunden analysiert (Abbildung 28 B). Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich für alle TKIs in den Proben 1x, S1, und S2 und auch in den dauerbehandelten Proben (48h) ein hoher Prozentsatz an Zellen in der subG1-Phase. Insgesamt führte somit auch das Entfernen der TKI mit Medium nach HD-TKI-Exposition zur Apoptoseinduktion, vor der die Zellen durch repetitives *Wash Out* gerettet werden konnten.

Auch bei diesen Versuchen wurden parallel zu den Propidiumiodid-Messungen, Färbungen von AnnexinV und aktivierte Caspase3 durchgeführt (s. 3.3.3.2, 3.3.3.3, 3.3.3.4). Beide Marker wurden schon in vorangegangenen Experimenten verwendet, um die Apoptoseinduktion zu verifizieren (s. 4.4.3). Die Ergebnisse der AnnexinV-Färbung sind in Abbildung 29 dargestellt.

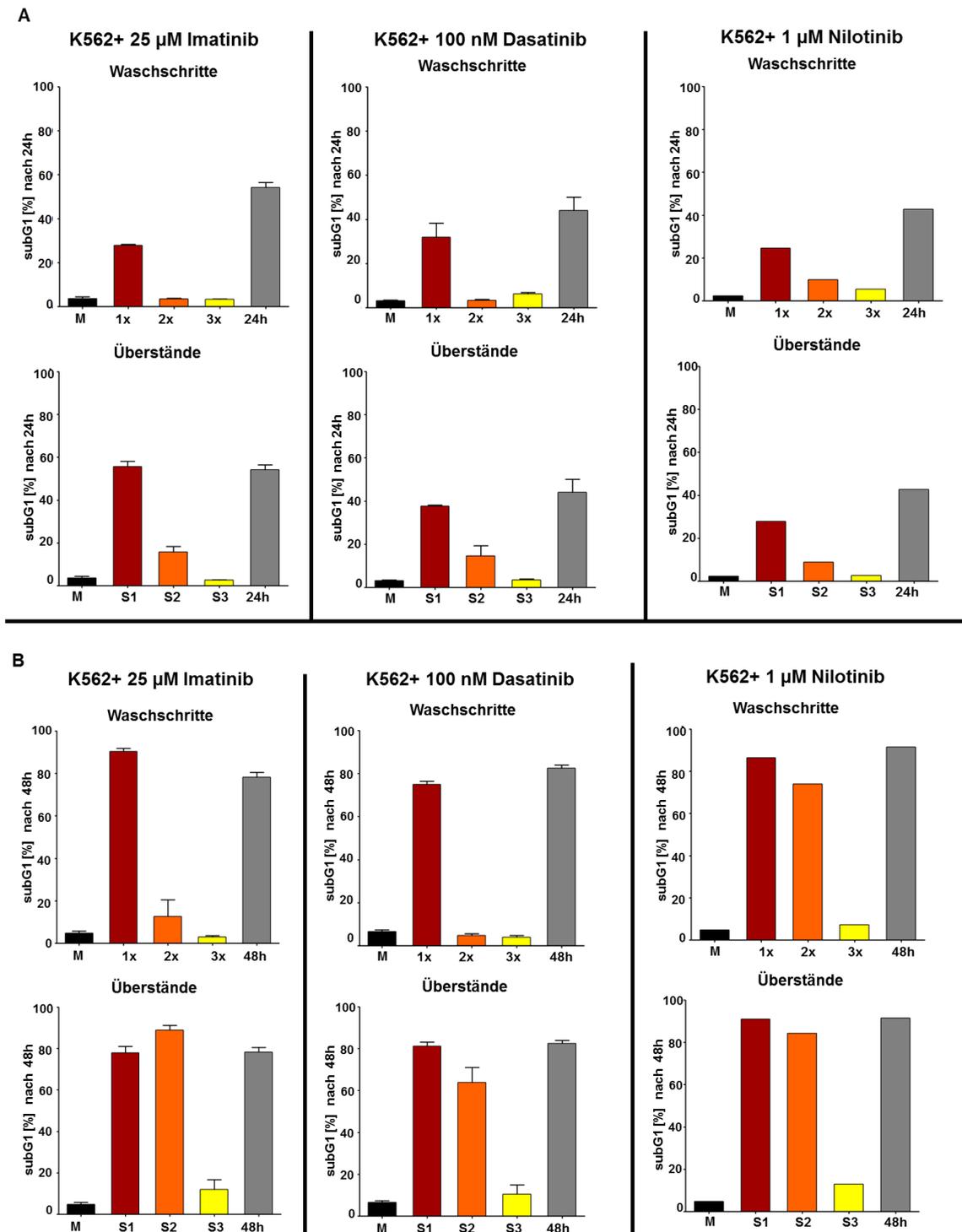


Abbildung 28: Repetitives Wash Out mit Zellkulturmedium verhindert Apoptose nach der Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden mit der entsprechenden TKI-Konzentration behandelt und zum Entfernen der Inhibitoren gewaschen. Dabei wurde das Medium zweimal durch Zellkulturmedium im halben Volumen ersetzt. Nach dem Wash Out wurden die Zellen in TKI-freies Medium zurückgesetzt (1x). Nach 2 Stunden wurde erneut ein Mediaumaustausch durchgeführt und die Zellen wurden danach in TKI-freies Medium überführt (2x). Dies wurde ein drittes Mal wiederholt (3x). Vor jedem Waschvorgang wurden die Zellkulturüberstände der behandelten Proben auf unbehandelte Proben übertragen und entsprechend benannt: S1, S2, S3. Die Proben wurden nach 24 Stunden (A) und 48 Stunden (B) mittels Propidiumiodid-Färbung analysiert. Behandelt wurden BCR-ABL positive K562 Zellen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. Es wird der Mittelwert von mindestens drei Messungen + SEM abgebildet, für Nilotinib wurde der Versuch nur einmal durchgeführt.

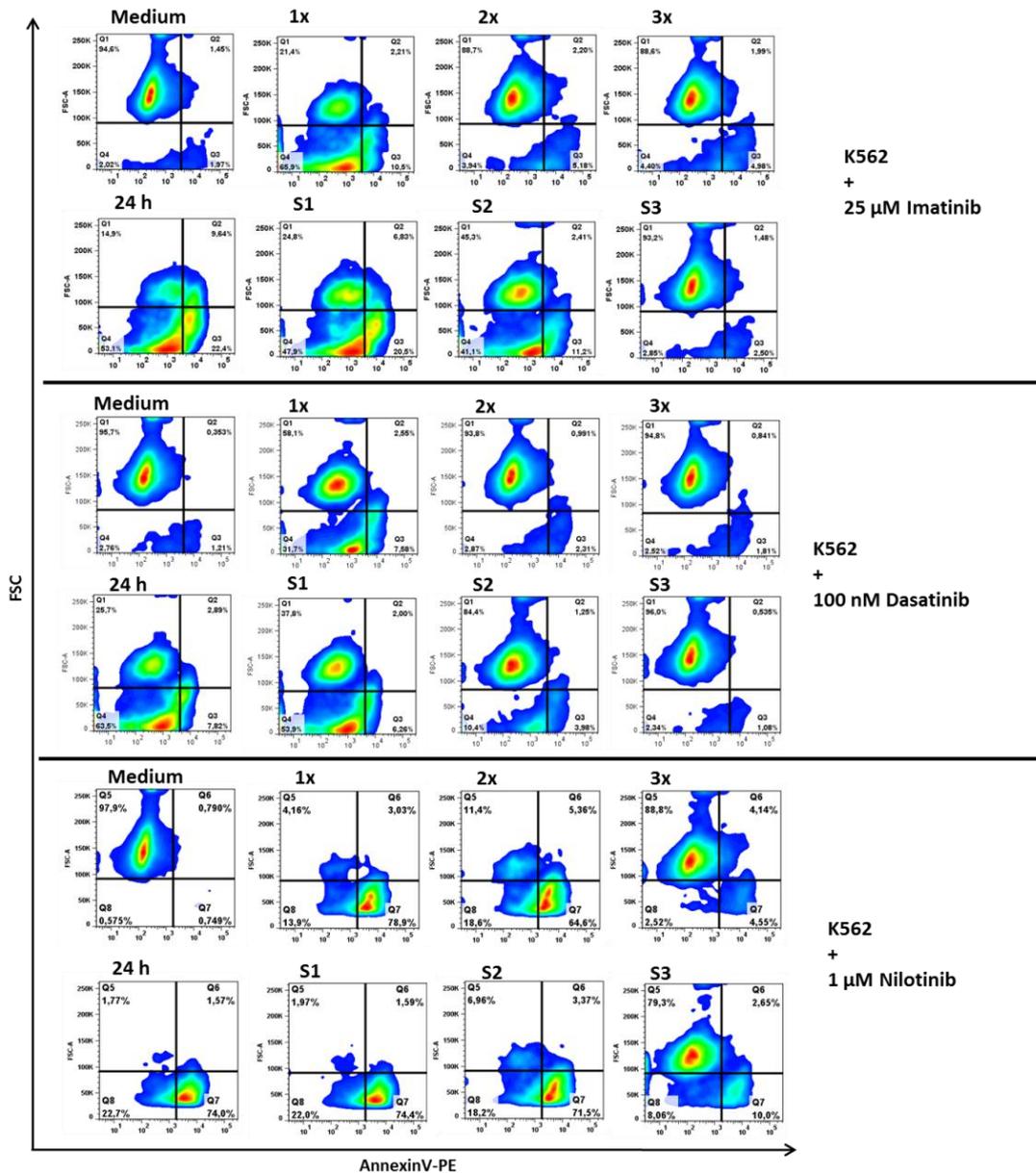


Abbildung 29: Wash Out mit Zellkulturmedium schützt BCR-ABL positive Zellen vor Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition.

Es wurden 1×10^6 Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration für 2 Stunden exponiert, gefolgt vom *Wash Out* mit Zellkulturmedium wie im Text beschrieben. Die Färbung der Proben erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Experiments. Dargestellt ist die Intensität der AnnexinV-PE-Färbung in arbiträren Einheiten gegen das Vorwärtsstreuung (FSC). Zellen in Q2 und Q3 sind positiv für AnnexinV-PE. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOW-JO-Software. Es wurde ein repräsentatives Ergebnis von dreien zur Darstellung ausgewählt.

Die Analyse der K562 Zellen mittels AnnexinV-Färbung zeigte, dass die Proben 1x, S1 und S2 sowie die dauerhaft behandelte Probe 24h, große AnnexinV-positive Populationen aufwiesen. In den Ansätzen M, 2x, und 3x wurden jedoch kaum AnnexinV-positive Zellen detektiert. Insgesamt korrelierte die AnnexinV-Positivität der Zellen mit den Ergebnissen der Zellzyklus-Analyse. Dies bestätigt die Ergebnisse, welche bereits in früheren Experimenten erhoben wurden (s. 4.4.3). Ebenso konnte bereits im Verlauf

der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Spaltung der Procaspase3 in die aktive Caspase3 sowohl mit der AnnexinV-Färbung als auch der Zellzyklus-Analyse korreliert. Die Spaltung von Caspase3 wurde daher analysiert und ist in Abbildung 30 zusammengefasst.

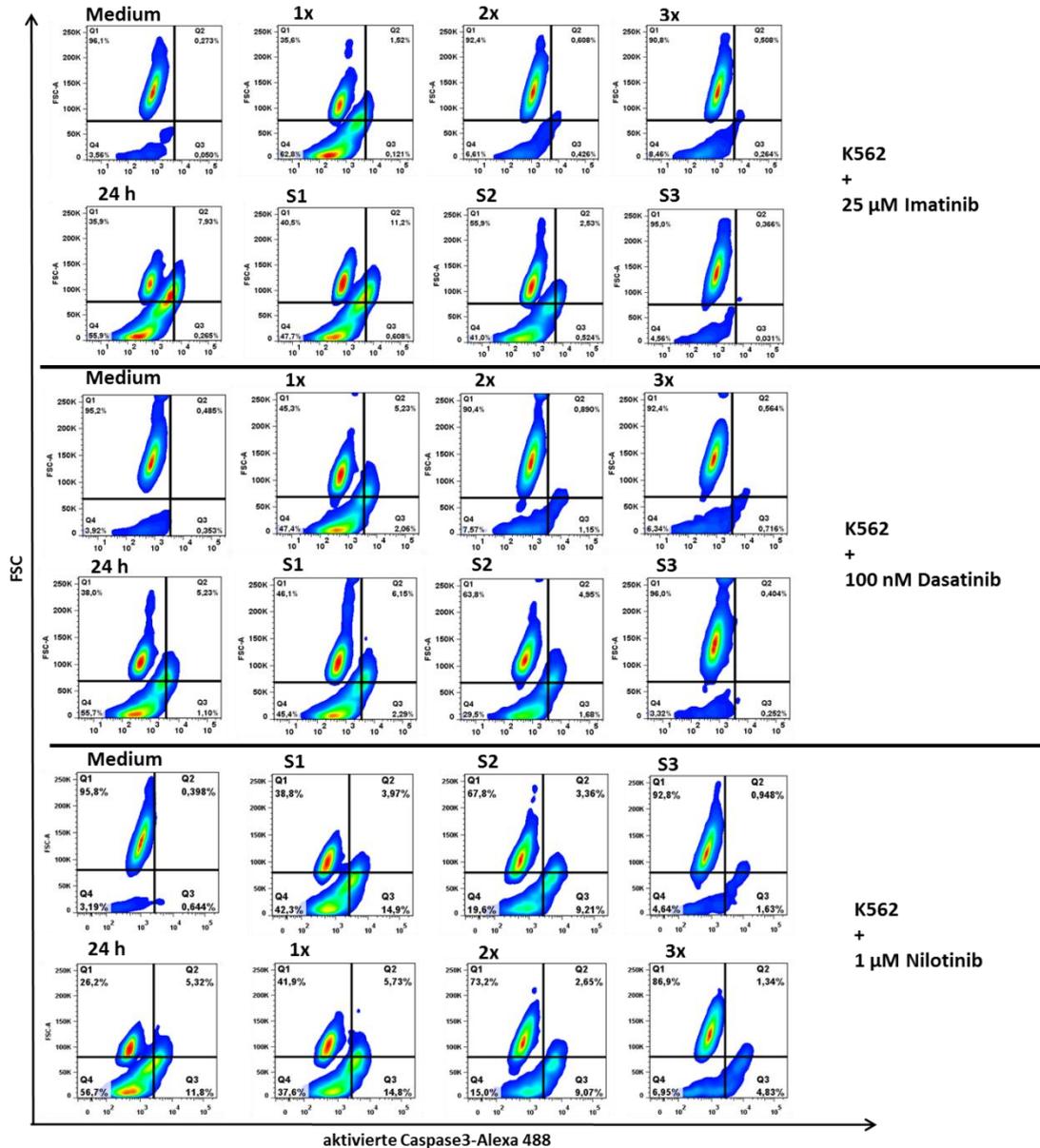


Abbildung 30: Wash Out mit Zellkulturmedium schützt BCR-ABL positive Zellen vor Caspase3-Aktivierung nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI.

Es wurden 1×10^6 K562 Zellen in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml mit der entsprechenden TKI-Konzentration für 2 Stunden exponiert, gefolgt von intensiven Waschstufen mit Zellkulturmedium wie im Text beschrieben. Die Färbung der Proben erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Experiments. Dargestellt ist die Intensität der aktivierten Caspase3-Färbung in arbiträren Einheiten gegen das Vorwärtsstreulich (FSC). In den Quadranten Q2 und Q3 befinden sich die aktivierte Caspase3 positiven Zellen. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOWJO-Software. Es ist ein repräsentativer Datensatz von insgesamt drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Bei der intrazellulären Färbung der gespaltenen Caspase3 nach repetitivem *Wash Out* mit Medium zeigte sich, dass die Proben 1x, S1 und S2 sowie die dauerhaft behandelte Probe (24h) positiv für die Spaltung der Caspase waren. In den Proben M, 2x, 3x und S3 war nur jeweils eine kleine Subpopulation positiv für die aktivierte Caspase3. Insgesamt konnte mit den verwendeten Assays gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI nicht durch die Verwendung eines alternativen Protokolls zur Entfernung der TKI beeinflusst werden kann. Die hohen Apoptoseraten in den Proben 1x, S1 und S2 konnten somit nicht auf ein unvollständiges *Wash Out* zurückgeführt werden. Diese Daten legen vielmehr nahe, dass die Ursache der Apoptoseinduktion eine intrazelluläre Anreicherung von TKIs sein könnte. Weiterhin wurde erneut die gute Vergleichbarkeit der Zellzyklus-Analyse, AnnexinV und aktivierte Caspase3-Färbung nachgewiesen.

4.5.2 Signaltransduktion von K562 Zellen unter repetitivem *Wash Out* mit Zellkulturmedium

Nach Durchführung des *Wash Outs* mit Zellkulturmedium sollte im Folgenden auf Signaltransduktionsebene untersucht werden, wie sich die Phosphorylierung der Proteine verhält. In früheren Analysen wurde eine Rephosphorylierung von CRKL und des BCR-ABL Tyrosin-Rests 177 bereits nach dem ersten *Wash Out* mit PBS festgestellt. STAT5 und BCR-ABL Y412 erholten sich erst nach der Durchführung einer weiteren Waschprozedur (s. 4.4.4.). In Abbildung 31 ist das Ergebnis der Signaltransduktion von K562 Zellen nach *Wash Out* mit Medium dargestellt.

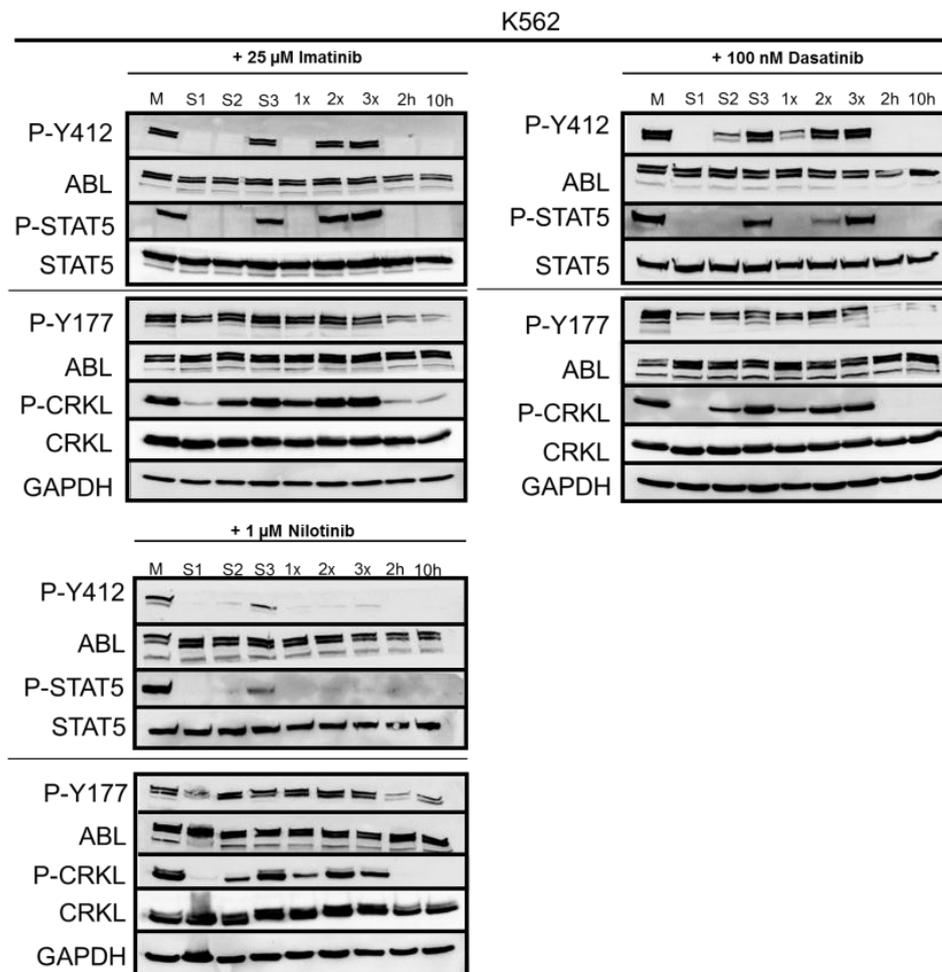


Abbildung 31: Die Rekonstitution der Phosphorylierung von BCR-ABL, CRKL und STAT5 nach Zellkulturmedium *Wash Out* ist differentiell reguliert.

Es wurden 2×10^6 K562 Zellen mit der angegebenen TKI-Konzentration inkubiert und zur Zellyse 2 Stunden nach Durchführung des *Wash Outs* mit Mediumtransfer lysiert. Eine TKI-unbehandelte Probe, M, diente als Kontrolle für die Phosphorylierungssignale. Die Inkubation von Antikörpern gegen die totalen Proteine verifiziert die Lage der phosphorylierten Proteine. Aufgetragen wurden 25 μ g Gesamtprotein. GAPDH diente dem Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung. Die Trennlinie der Blots zeigt an, dass die gleichen Lysate auf zwei unterschiedlichen SDS-Gelen aufgetragen wurden.

Die Ergebnisse zeigten auch nach Medium *Wash Out* die differentielle Rekonstitution der BCR-ABL Phosphorylierung an Y177 und Y412, sowie von STAT5 und CRKL. Die Frage, ob diese Unterschiede eventuell durch die zeitliche Durchführung bedingt sein könnten, blieb bislang unbeantwortet. Um herauszufinden, ob die Phosphorylierungssignale vielleicht innerhalb einer längeren Zeitspanne nach dem ersten *Wash Out* wieder rekonstituieren, wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach dem *Wash Out* eine Probe hinsichtlich der bekannten Parameter analysiert. Es wurden Zeiträume zwischen einer und 4 Stunden untersucht. Zusätzlich zu den bereits verwendeten Markern wurden zwei Antikörper, Y100 und 4G10, verwendet, die eine allgemeine Phosphorylierung an Tyrosin-Resten nachzuweisen. Die Analyse wurde exemplarisch für Dasatinib durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt.

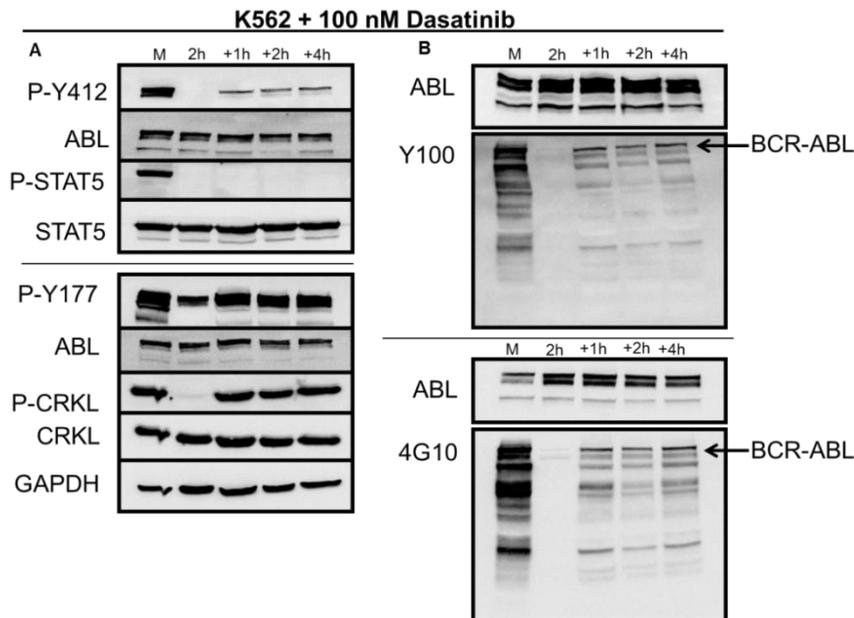


Abbildung 32: Die allgemeine BCR-ABL-Tyrosin-Phosphorylierung nach dem ersten *Wash Out* ist nicht vollständig rekonstituiert.

Insgesamt wurden 2×10^6 K562 Zellen für 2 Stunden mit 100 nM Dasatinib inkubiert, gefolgt vom *Wash Out* mit Medium und dem Zurücksetzen der Zellen in TKI-freies Medium. Die Lyse der Proben erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Eine unbehandelte Probe, M, diente als Kontrolle für die Phosphorylierungssignale. **(A)** Ergebnis der Hybridisierung mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern. **(B)** Inkubation mit pan-Phosphotyrosin-Antikörpern (4G10 bzw. Y100), gezeigt ist die gesamte Membran. ABL diente als Beladungskontrolle und zur Bestimmung der Lage von BCR-ABL. Die Trennlinie der Blots zeigt an, dass die gleichen Lysate auf getrennten SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen wurden. Es wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Bei der Betrachtung der Phosphorylierung von BCR-ABL an Position Y412 und von STAT5 zeigte sich, dass 4 Stunden nach dem *Wash Out* nur eine sehr geringe Phosphorylierung vorlag. Im Vergleich dazu, war die Phosphorylierung von BCR-ABL Y177 und CRKL bereits eine Stunde nach Entfernen von Dasatinib wieder vollständig vorhanden. Die Hybridisierung mit den pan-Phosphotyrosin-Antikörpern machte deutlich, dass BCR-ABL nach erfolgtem *Wash Out* im Vergleich zur Medium-Kontrolle nicht vollständig rephosphoryliert. Der Nachweis von ABL zeigte eine gleichmäßige Proteinbeladung des Gels. Somit kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL am Tyrosin-Rest 412 zusammen mit weiteren Phosphorylierungsstellen einen großen Anteil an der Gesamtphosphorylierung des Proteins hat, im Gegensatz zu Y177, dessen vorhandene Phosphorylierung die allgemeine Phosphorylierung von BCR-ABL nicht auf Mediumlevel bringt.

Der großen Diskrepanz in der Phosphorylierung an den beiden Tyrosinen Y177 und Y412 sowie der nachgeschalteten Proteine CRKL und STAT5 soll in weiteren Analysen nachgegangen werden.

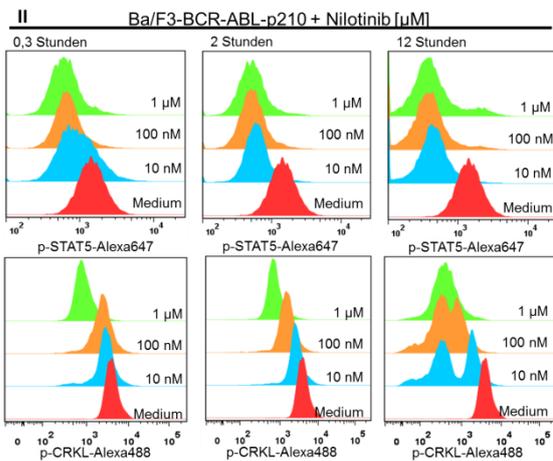
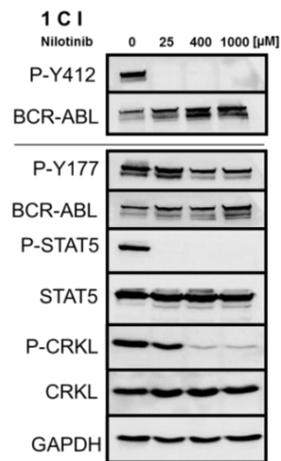
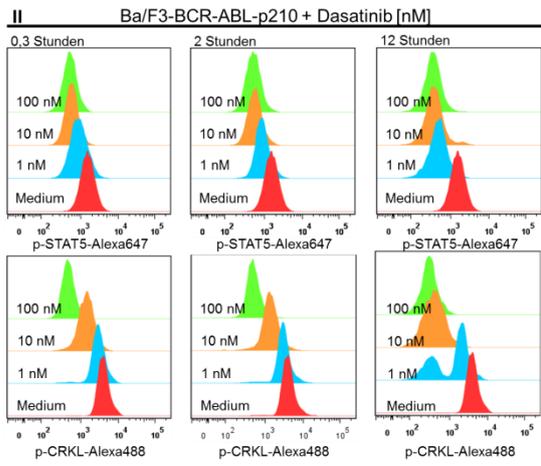
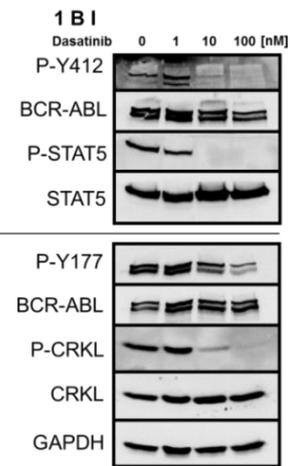
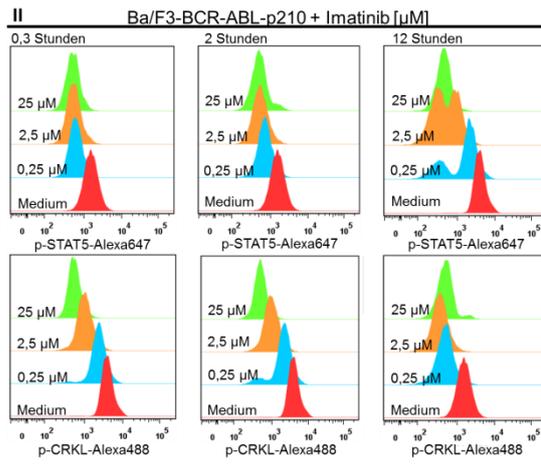
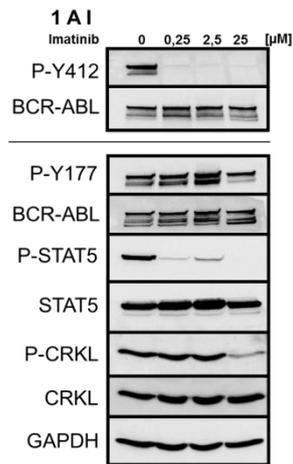
4.6 Signaltransduktion in der chronisch myeloischen Leukämie unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung

Die Analyse der Tyrosin-Reste 177 und 412 von BCR-ABL sowie der Proteine CRKL und STAT5 unter repetitivem *Wash Out* zeigte eine Diskrepanz in der Rekonstitution der Phosphorylierung (s. 4.4.4, 4.5.2). Bei Massenspektrometrie-Untersuchungen von BCR-ABL wurden in verschiedenen Studien bis zu 12 potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden (Salomon et al., 2003; Steen et al., 2003). Darunter auch die Stelle Y177, welche in den voran gegangenen Experimenten nicht von der kurzzeitigen TKI-Inkubation inhibiert zu sein schien. Ein Fehlen der Phosphorylierung an Position 177 führt zum Verlust der leukämischen Transformationseigenschaften des BCR-ABL Proteins (Pendergast et al., 1993). Der Tyrosin-Rest 412 liegt in der katalytischen Schleife der c-ABL Kinase und ist sowohl für die Kinaseaktivität des Proteins als auch für die Regulation dieser Domäne entscheidend (Brasher and Van Etten, 2000; Dorey et al., 2001; Pluk et al., 2002).

Das De- und Rephosphorylierungsverhalten der beiden Tyrosin-Reste von BCR-ABL sollte unter TKI-Behandlung im Folgenden zusammen mit den Markern CRKL und STAT5 genauer untersucht werden.

4.6.1 Dynamik und Kinetik der BCR-ABL-Signaltransduktion

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der Verlust der Phosphorylierung der Proteine BCR-ABL, CRKL und STAT5 TKI-konzentrationsabhängig ist. Dazu wurden murine Ba/F3-BCR-ABL und humane K562-Zellen für 2 Stunden mit drei unterschiedlichen TKI-Konzentrationen (s. 4.3.3) behandelt, anschließend lysiert und mittels Western Blot analysiert. In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit drei unterschiedlichen TKI-Konzentrationen für 0, 3, 2 und 12 Stunden lang behandelt, anschließend fixiert und für eine intrazelluläre Bestimmung von phosphorylierten Proteinen vorbereitet (s. 3.3.3.1). In den Ansätzen wurden parallel P-STAT5 und P-CRKL gefärbt und mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammengestellt.



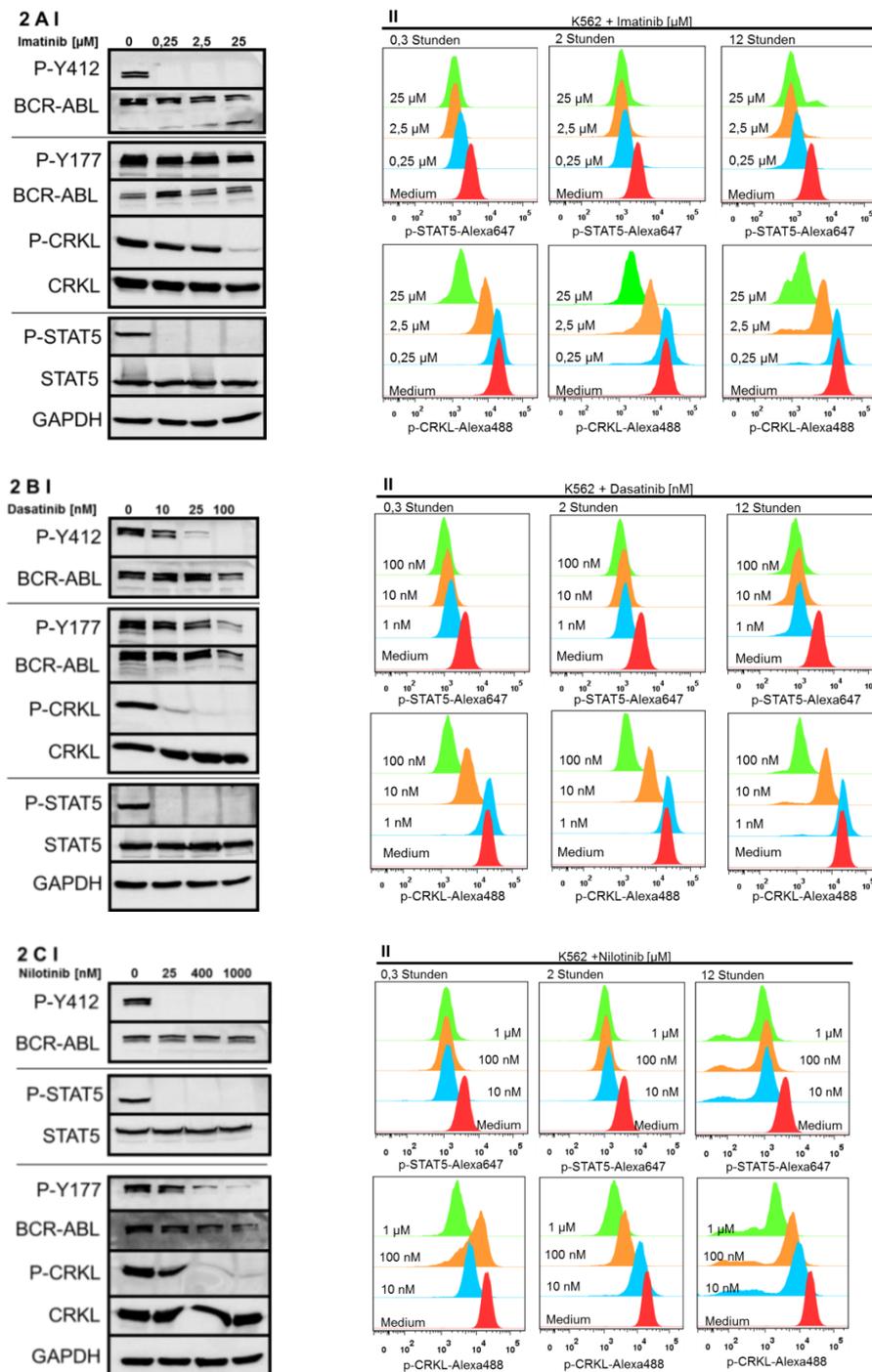


Abbildung 33: Die Dosis-Wirkungs-Beziehung und Divergenz der Dephosphorylierungskinetik der Marker BCR-ABL, CRKL und STAT5 unter TKI-Behandlung.

Zur Western Blot Analyse (I) wurden die Zellen für 2 Stunden mit der angezeigten TKI-Konzentration inkubiert und anschließend lysiert. Aufgetragen sind 25 μg Gesamtprotein. Die Trennlinie zeigt an, dass die gleichen Lysate auf verschiedenen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen wurden. Der Nachweis von GAPDH diente der Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung. Zur intrazellulären FACS-Analyse (II) wurden 1×10^6 Zellen für 0,3, 2 oder 12 Stunden mit der angegebenen TKI-Konzentration behandelt. Eine Probe, die mit DMSO in der TKI entsprechenden Konzentration behandelt wurde, diente als Positiv-Kontrolle für den Phosphorylierungsnachweis. P-STAT5 und P-CRKL wurden parallel gefärbt und analysiert. Dargestellt ist die Signalintensität in arbiträren Einheiten. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOW JO-Software. In (1) sind die Ergebnisse der Ba/F3-BCR-ABL Zellen nach Exposition mit Imatinib (A), Dasatinib (B) und Nilotinib (C) gezeigt. In (2) ist das Ergebnis der K562 Zellen nach Behandlung mit Imatinib (A), Dasatinib (B) und Nilotinib (C) dargestellt.

Die Western Blot Analyse brachte in beiden Zellsystemen vergleichbare Ergebnisse. Eine Reduktion der Phosphorylierung des BCR-ABL Tyrosin-Rests 412 war schon bei geringen Konzentrationen aller TKI erkennbar. Für Y177 trat eine Reduktion der Phosphorylierung erst bei hohen TKI-Konzentrationen auf. Für die Inkubation mit Nilotinib zeigte sich ein Signalverlust der Y177-Phosphorylierung auch schon bei der mittleren Konzentration. Die Analyse der Tyrosin-Phosphorylierungen von BCR-ABL ergab für Y412 eine konzentrationsunabhängige Reduktion der Phosphorylierung, für Y177 war eine konzentrationsabhängige Reduktion zu beobachten.

Bei dem Nachweis von P-STAT5 und P-CRKL wurden ebenfalls Unterschiede deutlich. So fand bei STAT5 eine Reduktion der Phosphorylierung bereits bei den geringsten TKI-Konzentrationen statt. Die Phosphorylierung von CRKL hingegen war erst bei mittleren TKI-Konzentrationen leicht und bei hohen Dosen TKI dann deutlich reduziert. Die Ergebnisse der Durchfluss-Zytometrie belegten ebenfalls diesen Unterschied in der Reduktion der Phosphorylierung von STAT5 und CRKL nach Kurzzeit-Inkubation der TKIs (0h, 3h, 2h). Für STAT5 konnte eine Dephosphorylierung bereits nach 0, 3 Stunden bei allen verwendeten Konzentrationen festgestellt werden. STAT5 wurde insgesamt im getesteten Dosisbereich unabhängig von der TKI-Konzentration dephosphoryliert. Für CRKL hingegen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Dephosphorylierung des Proteins. Nach 12-stündiger TKI-Dauerinkubation zeigte CRKL bei allen verwendeten TKI-Konzentrationen einen vergleichbar starken Verlust der Phosphorylierungssignale.

4.6.2 Dynamik der Rephosphorylierung von STAT5 und CRKL

Die Phosphorylierungsstellen Y177 und Y412 von BCR-ABL sowie STAT5 und CRKL wiesen starke Unterschiede im Dephosphorylierungsverhalten unter TKI-Exposition auf (s. 4.6.1). Es sollte nun das Rephosphorylierungsverhalten dieser Proteine nach Beendigung der TKI-Exposition auch mittels Durchfluss-Zytometrie weiter untersucht werden. Dazu wurden murine Ba/F3-BCR-ABL und humane K562 Zellen mit HD-TKI für 2 Stunden behandelt, gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. Die gewaschenen Zellen wurden korrespondierend zur durchgeführten Waschprozedur 1x, 2x sowie 3x benannt. Jeweils 2 Stunden dem *Wash Out* wurden die Ansätze fixiert und für die intrazelluläre Färbung von P-STAT5 und P-CRKL vorbereitet. Als Kontrolle für das Vorhandensein von Phosphorylierungssignalen wurden TKI-unbehandelte Zellen mitgeführt und für die Reduktion der Signale unter TKI wurde eine Probe für 2 Stunden mit TKI behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

Für alle untersuchten Inhibitoren zeigte sich in beiden Zellsystemen eine Rephosphorylierung von CRKL bereits nach dem ersten *Wash Out*. Eine Ausnahme war die Behandlung mit Nilotinib, hier kam es erst nach dem dritten Mediumaustausch zu einer Phosphorylierung von CRKL, die der in der unbehandelten Probe entsprach. Für STAT5 zeigte sich frühestens nach dem zweiten *Wash Out* eine Rephosphorylierung auf Mediumniveau. Auch hier bildete Nilotinib eine Ausnahme, die STAT5-Phosphorylierung erreichte auch nach dem dritten Mediumaustausch nicht mehr das Ausgangsniveau. Diese Daten bestätigen die Western Blot Daten nach repetitivem *Wash Out* (s. 4.4.4), dort zeigte sich, dass CRKL bereits nach Durchführung einer Waschprozedur rephosphoryliert vorliegt, STAT5 jedoch frühestens nach dem zweiten *Wash Out* wieder phosphoryliert ist. Weiterhin ergab sich, dass im Vergleich mit den Apoptose-Daten nach repetitivem Mediumaustausch (s. 4.4.3) die Rephosphorylierung von STAT5 mit dem Überleben der Zellen nach Kurzzeit-Exposition mit HD-TKI und repetitivem *Wash Out* korrelierte. Die Phosphorylierung von CRKL scheint ein Ereignis zu sein, welches für das Überleben der Zellen nicht entscheidend ist.

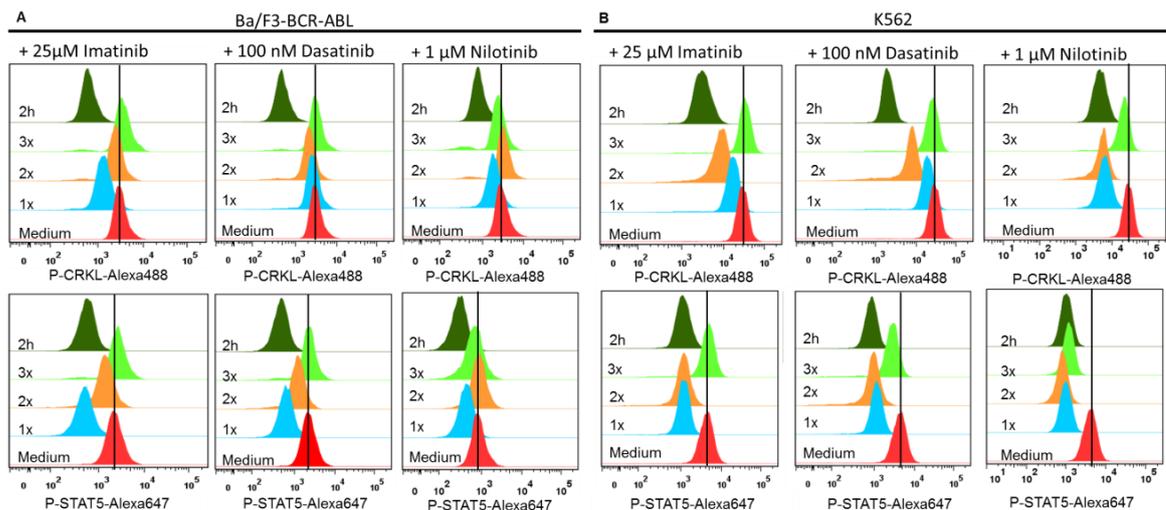


Abbildung 34: Die Rekonstitution der STAT5- und CRKL-Phosphorylierung unter repetitivem *Wash Out* ist differentiell reguliert.

Dargestellt ist das Ergebnis der intrazellulären FACS-Färbung der Marker P-STAT5 und P-ERK in Ba/F3-BCR-ABL (**A**) und K562 Zellen (**B**). Insgesamt 1×10^6 Zellen wurden für 2 Stunden mit der angegebenen TKI-Konzentration inkubiert. Zum Entfernen der Inhibitoren wurden die Zellen zweimal in PBS resuspendiert und anschließend in TKI-freies Medium zurückgesetzt (1x). Der Mediumaustausch wurde nach 2 Stunden ein zweites und ein drittes Mal (2x, 3x) wiederholt. Die Fixierung und Permeabilisierung der Proben erfolgte 2 Stunden nach den jeweiligen Waschschritten. Als Kontrolle für die Phosphorylierungssignale diente eine TKI-unbehandelte Probe, Medium, und für die Reduktion der Signale unter TKI diente ein Ansatz, der für 2 Stunden behandelt wurde (2h). Dargestellt ist Signalintensität der Färbung in arbiträren Einheiten. Ein repräsentatives Experiment von zweien ist dargestellt. Die graphische Aufbereitung erfolgte mit der FLOW-JO-Software.

4.7 Quantitativer Tyrosinkinase-Inhibitor Nachweis mittels HPLC sowie LC-MS/MS

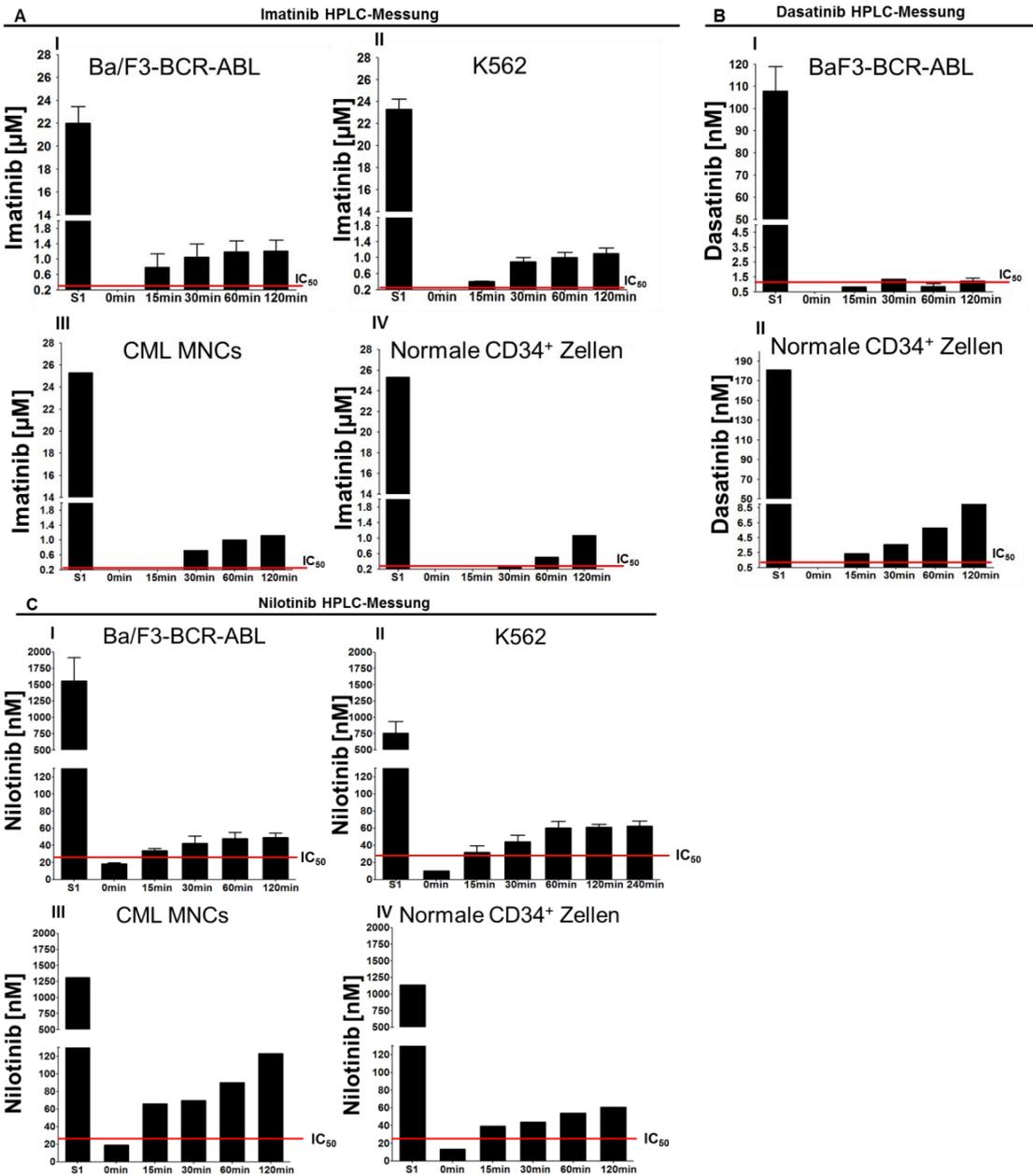
Die bisher erhobenen Daten (s. 4.4.3, 4.4.4, 4.5) deuten sehr stark daraufhin, dass Apoptose nach HD-TKI Kurzzeit-Inkubation durch residuelle TKI-Aktivität hervorgerufen wird. Dies kann einerseits durch inkomplette Entfernung des TKI im Rahmen eines möglicherweise insuffizienten *Wash Outs* begründet sein. Andererseits kommt auch eine intrazelluläre TKI-Akkumulation mit nachfolgender langsamer Freisetzung der TKI als Ursache in Frage. Insuffizientes Entfernen des TKIs würde dazu führen, dass der TKI sofort nach dem Waschen in hoher Konzentration im Zellkulturmedium nachweisbar wäre. Bei einer intrazellulären Akkumulation mit anschließender Freisetzung hingegen wäre der TKI nach dem *Wash Out* zunächst nicht im Zellkulturmedium detektierbar und die TKI-Konzentration würde zeitabhängig zunehmen. Zur Analyse einer möglichen Freisetzung von TKIs ins Medium wurden HPLC-Messungen von Zellkulturüberständen, in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Magdeburg, durchgeführt. Die HPLC Methode wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt, um TKI-Konzentrationen genau zu quantifizieren. Mittels HPLC konnten die Serum- und Plasma-Konzentrationen von Dasatinib und Nilotinib in CML-Patienten bestimmt werden (De Francia et al., 2009; Parise et al., 2009). Aber auch für die Bestimmung von TKI-Konzentrationen im Zellkultur-System ist die HPLC-Messung eine gut etablierte Methode (le Coutre et al., 2004; Hegedus et al., 2009).

4.7.1 Quantitative Bestimmung von Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Zur Quantifizierung von TKI-Konzentrationen wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition und dem *Wash Out*, der Zellkulturüberstand auf freigesetzte TKI-Menge überprüft. Zunächst war eine Etablierung der Nachweismethoden für jeden TKI notwendig. Die Messparameter sowie die Details der Durchführung für die TKIs sind unter 3.4.1 und 3.4.2 zu finden. Auf die Etablierung einer Nachweismethode für Jak Inhibitor I wurde aus Kapazitätsgründen verzichtet. Für alle Proben wurden 3 ml Zellkulturüberstand zunächst an Aktivkohle-Säulen gebunden und aufgereinigt. Das Eluat der Säule wurde vollständig verdampft und anschließend in das etablierte HPLC-Laufmittel aufgenommen und in die HPLC-Anlage injiziert. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben wurde eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen mitgeführt.

Zur Probengewinnung wurden zunächst onkogene Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden Tyrosinkinase-Inhibitoren für 2 Stunden behandelt, gefolgt vom *Wash Out* mit PBS und dem Zurücksetzen der Zellen in TKI-freies Medium (s. 3.3.2.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Mediaustausch des TKIs (0, 15, 30, 60, 120 Minuten) wurden Proben für die Analyse gewonnen. Die Probe, welche unmittelbar nach dem Zurücksetzen der Zellen ins Medium analysiert wurde, diente als Kontrolle für mögliche residuelle TKI-Mengen infolge eines möglichen inkompletten Entfernen des Inhibitors (0 Minuten). Als Kontrolle für das Vorhandensein von TKI im Medium diente Inkubationsmedium (S1), welches zu Beginn des Versuches mit TKI versetzt worden war. Zum jeweiligen Analyse-Zeitpunkt wurden 4 ml Zellsuspension entnommen, zentrifugiert und der Mediumüberstand wurde zellfrei zur Messung verwendet. Im weiteren Verlauf wurden neben den Ba/F3-Zellen auch die humanen K562 Zellen, sowie primäre mononukleäre Zellen von CML- bzw. AML-Patienten und angereicherte hämatopoetische Vorläuferzellen (CD34⁺-positive Zellen) von Kontrollpersonen untersucht. Für die Verwendung von humanem Primärmaterial lag ein Votum der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Magdeburgs vor. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 35 dargestellt .

In allen untersuchten Zellsystemen zeigte sich nach dem *Wash Out* des jeweiligen Inhibitors ein Anstieg der TKI-Konzentration über die Zeit. In allen Fällen erreichte oder überschritt die freigesetzte TKI-Konzentration die jeweilige IC₅₀-Konzentration. Der deutlichste Konzentrationsanstieg im Überstand fand sich zwischen 15 und 30 Minuten nach dem *Wash Out*. Danach erreichten die TKI-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen ein Plateau und die Anstiege der Konzentration waren nur noch gering. Für Imatinib und Dasatinib lag die untersuchte Probe zum Zeitpunkt 0 Minuten, unterhalb der Sensitivitätsgrenze der Messmethode. Dies deutet daraufhin, dass mit der angewendeten Waschprozedur der TKI effizient entfernt wird. Der Übertrag vom Zellkulturmodell auf primäres Patientenmaterial machte deutlich, dass die beobachteten Effekte auch in der Klinik von Relevanz sein könnten und die primären Zellen auch Konzentrationen von klinischer Bedeutung freisetzen. Diese Daten deuten an, dass Zellen nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition in der Lage sind, massive TKI-Konzentrationen zurückzuhalten und wieder freizusetzen. Die Exposition mit dem TKI nach HD-TKI Kurzzeit-Behandlung ist somit nicht kurzfristig, sondern resultiert durch das Rückwirken der TKIs nach der Freisetzung auf die Zellen, in einer kontinuierlichen TKI-Exposition. Diese Daten implizieren die Frage, in welchem Maße die Zellen den TKI aufnehmen und ob eine Akkumulation der TKI vorliegt.



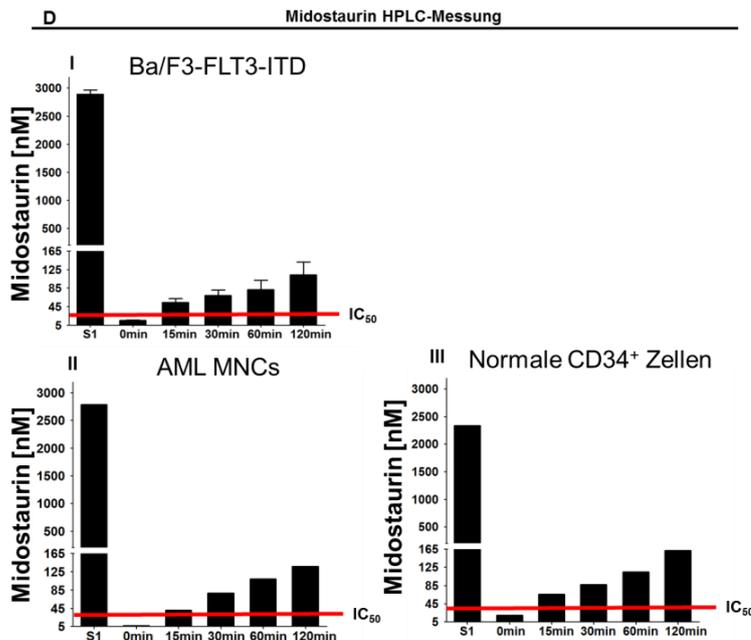


Abbildung 35: Die TKI-Konzentrationen im Zellkulturmedium steigen über die Zeit nach *Wash Out* an.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden mit dem entsprechenden TKI behandelt. Für das Entfernen der Inhibitoren wurde PBS verwendet. Die Zellen wurden anschließend in TKI-freies Medium überführt. Die Analyse der Überstände erfolgte zum angegebenen Zeitpunkt. S1 diente als Kontrolle für das Vorhandensein von TKI. Die rote Linie zeigt die IC_{50} -Konzentration auf Ba/F3 Zellen für den jeweiligen Inhibitor an. In **A** wurden die Zellen mit 25 μ M Imatinib, in **B** mit 100 nM Dasatinib und in **C** mit 1 μ M Nilotinib und in **D** mit 3,5 μ M Midostaurin behandelt. Als MNCs werden mononukleäre Zellen bezeichnet. Für Ba/F3 und K562 Zellen sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen +SEM angegeben. Für die primären humanen Zellen wurde ein repräsentatives Ergebnis zur Darstellung ausgewählt.

4.7.2 Bestimmung der Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen in Zelllysaten

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur Ursache der Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition machen deutlich, dass diese Art der experimentellen TKI-Exposition letztendlich mittels protrahierter TKI-Exposition zu einer kontinuierlichen Kinaseinhibition führt. Dies ist nur möglich, wenn die behandelten Zellen unter TKI-Inkubation diese massiv intrazellulär anreichern und nach Beendigung der Exposition langsam wieder freisetzen. Es zeigte sich, dass es nach dem *Wash Out* der Inhibitoren zu einer Zunahme der TKI-Mengen im Zellkulturüberstand kommt (s. 4.7.1). Die Arbeitsgruppe von le Coutre konnte bereits vor einigen Jahren mittels HPLC-Messungen nachweisen, dass HL-60 Zellen Imatinib dosisabhängig, um ein Vielfaches der extrazellulären Konzentration, intrazellulär anzureichern (le Coutre et al., 2004). Über die intrazelluläre TKI-Konzentration in Zellen nach HD-TKI Kurzzeit-Inkubation ist bislang nichts bekannt.

Um das Ausmaß der intrazellulären Akkumulation von TKIs nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition bestimmen zu können, wurden dieselben HPLC-basierten TKI-Nachweise verwendet, wie für die TKI-Quantifizierung (s. 4.7.1). Um die Ergebnisse interpretieren zu können, musste zu Beginn das zelluläre Volumen bestimmt werden. Dazu wurde der Durchmesser von 100 Zellen mikroskopisch mittels der MetaMorph-Software bestimmt. Aus dem Radius wurde unter der Annahme einer kubischen Form das Volumen der Zellen nach folgender Formel berechnet: $V_{\text{Zellen}} = 4/3 \times \pi \times r^3$

Anschließend wurden HPLC-Messungen von Zelllysaten durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 Stunden mit HD-TKI inkubiert und anschließend wurde das Inkubationsmedium zum Entfernen des TKI zweimal durch PBS ersetzt, gefolgt von der Zellyse. Die genauen Bedingungen für die Lyse sind unter 3.4.3 aufgeführt. Nach der Lyse wurde das Lysat von Zelltrümmern geklärt und nach der Verdünnung in Zellkulturmedium zur Messung verwendet. Als Kontrolle für die TKI-Zugabe wurde der Zellkulturüberstand 2 Stunden nach TKI-Zugabe ebenfalls analysiert. Die bestimmte Konzentration wurde anschließend in die folgende Formel zur Berechnung der intrazellulären TKI-Konzentration eingesetzt: $C_{\text{TKI intrazellulär}} = C_{\text{TKI Überstand}} \times V_{\text{Überstand}} \times 1/V_{\text{Zellen}}$

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Intrazelluläre Anreicherung von TKI in Ba/F3 und K562-Zellen.

Der mittlere Zelldurchmesser \pm SD von 100 gemessenen Zellen ist in (A) angegeben. Das zelluläre Volumen wurde nach der im Text beschriebenen Formel berechnet. (B) Intrazelluläre Konzentrationen nach TKI Kurzzeit-Exposition. Als Positiv-Kontrolle diente Zellkulturüberstand 2 Stunden nach Zugabe des TKIs (S1). Die in der HPLC gemessene Konzentration ist unter Lysat angegeben. Die intrazelluläre Konzentration wurde nach der im Text erklärten Formel berechnet. Dargestellt ist das Ergebnis aus 3 unabhängigen Messung \pm SEM.

A

	Durchmesser [μM] \pm SD	Berechnetes Volumen /Zelle [L]
Ba/F3-BCR-ABL	12,18 \pm 1,63	0,946 \times 10 ⁻¹²
K562	16,81 \pm 1,93	2,482 \times 10 ⁻¹²

B

	C _{Imatinib} [μM] BaF3 BCR-ABL	C _{Imatinib} [μM] K562	C _{Dasatinib} [μM] K562	C _{Nilotinib} [μM] BaF3 BCR-ABL	C _{Nilotinib} [μM] K562
Positiv-Kontrolle S1	20,64 (\pm 2,78)	25,75 (\pm 0,13)	0,100 (\pm 0,0103)	0,600 (\pm 0,0103)	0,784 (\pm 0,0095)
Lysat (verdünnt)	0,52 (\pm 0,09)	0,81 (\pm 0,23)	0,000583 (\pm 0,00004)	0,04563 (\pm 0,0045)	0,0326 (\pm 0,0168)
Intrazelluläre Konzentration (berechnet)	10994	6480	4.66	964	262

Es zeigte sich sowohl bei den Ba/F3-BCR-ABL als auch bei den K562 Zellen eine massive intrazelluläre Anreicherung der Tyrosinkinase-Inhibitoren. Dabei erreichten Ba/F3-BCR-ABL Zellen eine stärkere Anreicherung als K562 Zellen. Ba/F3-Zellen zeigten für Imatinib eine Konzentration von 10947 μM und für Nilotinib 964 μM , was einer Anreicherung um den Faktor 438 für Imatinib und um den Faktor 964 für Nilotinib entspricht. K562 wiesen für Imatinib eine Konzentration von 6514 μM , für Nilotinib 262 μM sowie 4,6 μM für Dasatinib auf. Es wurde eine Anreicherung um den Faktor 260 für Imatinib, 260 für Nilotinib sowie 46,89 für Dasatinib erzielt. Zur Kontrolle, ob es sich bei den gemessenen Imatinib-Konzentration auch um intrazelluläre Konzentrationen handelt und nicht um Anlagerungen an die äußere Plasmamembran, wurden die Zelltrümmer nach Abnahme des Lysats im TKI-freien Medium für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Lösung ebenfalls geklärt und auf vorhandene Imatinib-Konzentrationen mittels HPLC analysiert. Es konnte keine Imatinib-Konzentration nachgewiesen werden. Es ist somit davon auszugehen, dass es sich bei den gemessenen Imatinib-Konzentrationen um intrazelluläre Konzentrationen handelt.

Insgesamt zeigte sich eine ausgeprägte Akkumulation von TKI in den Zellen, was zusammen mit der darauffolgenden verzögerten Freisetzung der TKI die Ursache des HD-TKI Effektes darstellt. Nach *Wash Out* der Inhibitoren waren die intrazellulären Konzentrationen sehr hoch. Es wird somit deutlich, dass diese Art der experimentellen Behandlung von Zellen letztlich mittels protrahierter TKI-Exposition zu einer kontinuierlichen Kinaseinhibition führt.

4.8 Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitoren bei Transporterprotein exprimierenden Zelllinien

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Akkumulation der TKI nach kurzzeitiger HD Inkubation Ursache für die Apoptoseinduktion ist. In verschiedenen Publikationen wurde nachgewiesen, dass *ATP binding-cassette (ABC)*-Transporter den Efflux von TKIs vermitteln können (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Hegedus et al., 2009; Hiwase et al., 2010). In diesen Publikationen wurde die intrazelluläre Konzentration der TKIs durch Expression der entsprechenden ABC-Transporter gesenkt. Es sollte daher geprüft werden, ob die intrazelluläre Konzentration der TKIs durch die Expression von ABCB1 und ABCG2 in K562 gesenkt werden kann und ob die Zellen vor Apoptoseinduktion nach Kurzzeit HD-TKI Inkubation durch die Expression dieser Transporter geschützt werden können.

4.8.1 Verifizierung der Transporterprotein exprimierenden Zelllinien

Die verwendete K562-ABCB1 Zelllinie wurde von Prof. Dr. J. Melo (Department of Hematology, University of Adelaide, Australia) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Gegenwart von steigenden Dosen des Chemotherapeutikums Daunorubicin auf ihre Transporterprotein-Expression hin selektioniert (Marie et al., 1993). Die K562-ABCG2 Zelllinie wurde von Dr. Sheng Zhou (Department of Hematology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen waren stabil mit einem ABCG2-Konstrukt im retroviralen Ha-Vektor transfiziert (Zhou et al., 2005). Zu Beginn sollten die Zelllinien auf die Expression der Transporterproteine hin überprüft werden. Dazu wurde eine Oberflächen-Färbung (s. 3.3.3.5) der Zellen mit Transporter spezifischen Antikörpern durchgeführt (s. 2.1) und mittels Durchfluss-Zytometrie analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 36 dargestellt.

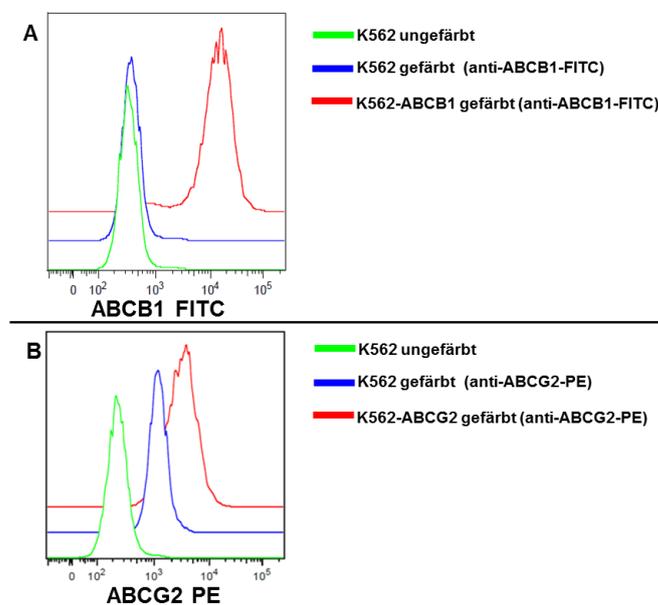


Abbildung 36: Die Zelllinien K562-ABCB1 und K562-ABCG2 zeigen eine Oberflächen-Expression des jeweiligen Transporterproteins.

Insgesamt wurden 1×10^6 Zellen für 15 Minuten mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Ungefärbte K562 Zellen dienen als Kontrolle für die Streuung der Signale in den jeweiligen Fluoreszenzkanal. K562 Zellen wurden mit dem Antikörper gefärbt, um die unspezifische Bindung zu überprüfen. **A** zeigt das Ergebnis der ABCB1-Färbung. In **B** ist das Ergebnis der ABCG2-Färbung gezeigt. Dargestellt ist Signalintensität der Färbung in abstrakten Einheiten. Ein repräsentatives Experiment von zweien wurde zur Darstellung ausgewählt. Die graphische Aufbereitung erfolgte mit der FLOW-JO-Software.

K562 Zellen ohne Transporterproteine dienen als Kontrolle für die unspezifische Bindung des jeweiligen Antikörpers. Ungefärbte Zellen zeigten einen minimalen Ausschlag des Signals im entsprechenden Fluoreszenzkanal an. K562-ABCB1 wiesen eine starke Expression von ABCB1 auf. K562-ABCG2 Zellen exprimierten den ABCG2-Transporter in hohem Maße. Parentale K562 Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine geringe Expression dieses Transporterproteins auf. Insgesamt wiesen die

beiden untersuchten Transporter exprimierenden Zelllinien eine starke Expression des jeweiligen Transporterproteins auf und konnten somit für weitere Analysen verwendet werden.

4.8.2 Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitor bei ABC-Transporterprotein exprimierenden K562 Zellen

Nachdem die Zellen positiv auf die Expression der Transporterproteine überprüft wurden, sollten die Zellen auf Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Exposition mit HD-TKI getestet werden. Die Zellen wurden dafür mit 25 μ M Imatinib für 2 Stunden inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde ein *Wash Out* mit PBS durchgeführt und die Zellen wurden anschließend in TKI-freies Medium zurückgesetzt (s. 3.3.2.2). Als Kontrollen dienten dauerbehandelte Zellen sowie Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden. Die K562 Zelllinie wurde mitgeführt, da die Zellen nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI hohe Apoptoseraten aufwiesen. Die Analyse der Zellen erfolgte nach 24 Stunden mittels Zellzyklus-Analyse (s. 3.3.3.2).

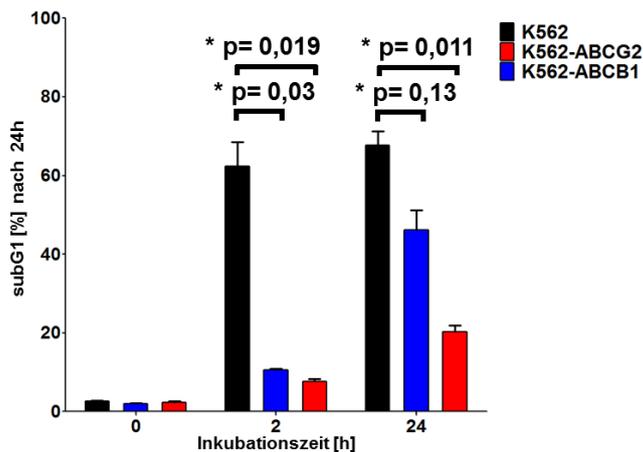


Abbildung 37: Die Expression von ABC-Transporterproteinen schützt K562 Zellen vor Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Exposition.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden mit 25 μ M Imatinib behandelt. Es folgte der *Wash Out* des Inhibitors mit PBS und das Zurücksetzen in TKI-freies Medium. Die Analyse erfolgte 24 Stunden nach Beginn des Experiments. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. Es wird der Mittelwert von mindestens drei Messungen + SEM abgebildet. * markiert die Proben mit signifikanter Abweichung im zweiseitigen gepaarten t-Test ($p < 0,05$).

Wie in Abbildung 37 dargestellt, wiesen die beiden ABC-exprimierenden K562 Zellen im Vergleich zu K562 nur geringe Apoptoseraten nach Kurzzeit-Inkubation mit 25 μ M Imatinib auf. Der prozentuale Anteil von Zellen in der subG1-Phase lag für K562-ABCB1 bei 10% und für K562-ABCG2 bei 7%. Parentale K562 Zellen zeigten hingegen 60% apoptotische Zellen. Der Unterschied zu den K562 Zellen war für beide Zell-

linien signifikant mit einem p-Wert $<0,05$. Bei der Dauerinkubation mit $25 \mu\text{M}$ Imatinib zeigte sich für K562-ABCG2 Zellen im Vergleich zu K562 Zellen eine signifikant verringerte Apoptoserate ($p= 0,011$). Der ABCB1-vermittelte Transport schien durch die hohe Imatinib-Konzentration beeinflusst zu sein, da K562-ABCB1 Zellen mit 45% eine relativ hohe Apoptoserate zeigten. Es war daher kein signifikanter Unterschied zu K562 Zellen vorhanden. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die ABC-exprimierenden K562 Zellen nur eine geringe Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Exposition mit Hochdosis Imatinib aufweisen und auch die Dauerbehandlung dieser Zellen mit Imatinib in einer deutlich geringeren Apoptoserate resultiert.

4.8.3 Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis Tyrosinkinase-Inhibitor nach Inhibition der ABC-Transporterproteine

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die ABC-exprimierenden K562 Zellen im Vergleich zu K562 Zellen eine signifikant erniedrigte Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Inkubation aufwiesen (s. 4.8.2). Um nachzuweisen, dass die Apoptoseresistenz durch die Expression der Transporterproteine vermittelt wurde, sollten diese durch Inhibitoren pharmakologisch gehemmt werden, was in einer Sensitivierung der Zellen gegenüber der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation resultieren sollte. Als Inhibitor für ABCB1 ist PSC833 aus verschiedenen Arbeiten bereits bekannt (Hiwase et al., 2008, 2010; Hegedus et al., 2009). Für ABCG2 ist Verapamil als Inhibitor beschrieben (Scharenberg, 2002; Brendel et al., 2007; Dohse et al., 2010). Die Wirkung der Inhibitoren auf die Transporter wurde zunächst bei Dauerinkubation von $0,25 \mu\text{M}$ Imatinib getestet. Die Ergebnisse der darauffolgenden Zellzyklus-Analyse sind in Abbildung 38 dargestellt.

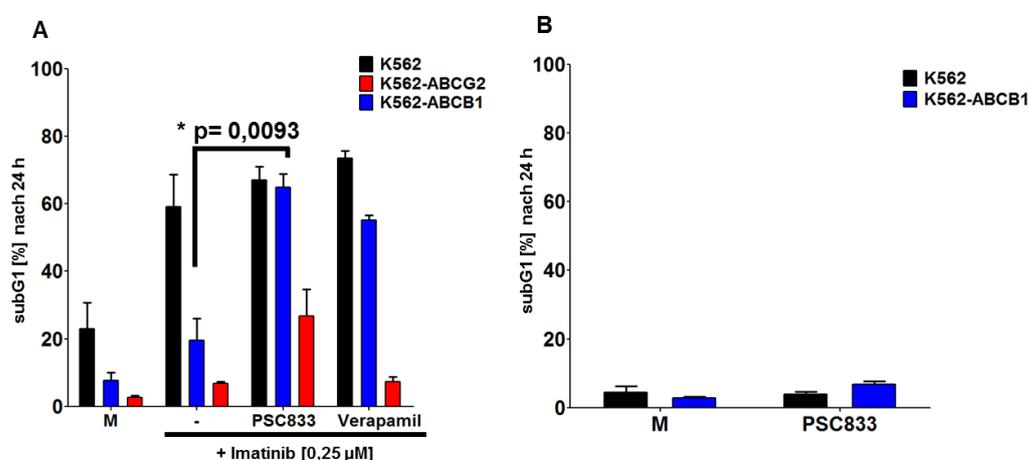


Abbildung 38: Die ABCB1-Inhibition in K562-ABCB1 Zellen durch PSC833 induziert Apoptose nach Zugabe von Imatinib ($0,25 \mu\text{M}$).

Insgesamt wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden in Gegenwart und Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PSC833 und $75 \mu\text{M}$ Verapamil mit $0,25 \mu\text{M}$ Imatinib inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Zellzyklus-Analyse nach 24 Stunden (A). (B) Die Zellen wurden mit $10 \mu\text{M}$ PSC833 für 24 Stunden dauerhaft inkubiert, um zytotoxische Effekte des Inhibitors zu bestimmen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. In A und B gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen + SEM. * markiert die Proben mit signifikanter Abweichung im zweiseitigen gepaarten t-Test.

Die signifikante Zunahme der Apoptoserate ($p= 0,0093$) in PSC833 behandelten K562-ABCB1 Zellen im Vergleich zu K562 Zellen macht deutlich, dass die Zellen wieder sensitiv gegenüber der Imatinib-Behandlung werden. Die Imatinibresistenz konnte durch Inhibition des ABCB1-Transporters revertiert werden. Die Inhibition von ABCG2 durch Verapamil konnte die Apoptoserate bei Imatinib-Behandlung nicht beeinflussen, weshalb K562-ABCG2 Zellen von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Zwar zeigten K562-ABCB1 Zellen eine erhöhte Apoptose nach Inkubation von Verapamil, K562-ABCG2 hingegen wiesen keine gesteigerte Apoptoserate auf. Die mitgeführten K562 Zellen zeigten keine Beeinflussung der Apoptoseraten durch PSC833 oder Verapamil. Insgesamt konnte nur ein geeigneter Inhibitor für den ABCB1-Transporter gefunden werden, daher wurden die weiteren Versuche nur mit K562-ABCB1 Zellen durchgeführt. Zunächst wurde die Toxizität des PSC833 Inhibitors auf K562 und K562-ABCB1 Zellen getestet. Dazu wurden die beiden Zelllinien mit PSC833 für 24 Stunden inkubiert. Die in Abbildung 38 B dargestellte Zellzyklus-Analyse nach 24 Stunden ergab keine Zytotoxizität des Inhibitors.

In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die Resistenz von K562-ABCB1 Zellen gegenüber der Dauerinkubation von Imatinib durch die Inhibition des ABCB1-Transporters aufgehoben werden kann. Für den Versuch wurden K562 und K562-ABCB1 Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von PSC833 mit $0,5 \mu\text{M}$ oder $25 \mu\text{M}$ Imatinib inkubiert, da bereits gezeigt werden konnte, dass ABCB1-Transporter Resistenz gegenüber niedrigen Imatinib-Konzentrationen verleihen.

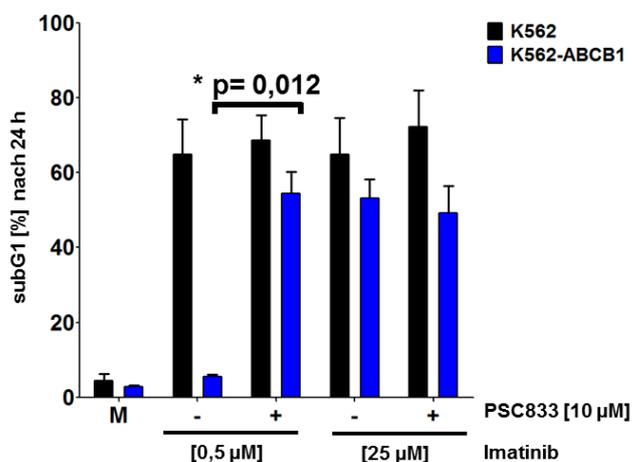


Abbildung 39: Die Expression von ABCB1 induziert Imatinib-Resistenz in Gegenwart von niedrigen Imatinib-Konzentrationen.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden in Gegenwart und Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PSC833 mit $0,5 \mu\text{M}$ oder $25 \mu\text{M}$ Imatinib inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte durch Zellzyklus-Analyse nach 24 Stunden. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. Es wird der Mittelwert von mindestens drei Messungen + SEM abgebildet. * markiert die Proben mit signifikanter Abweichung im zweiseitigen gepaarten t-Test.

Eine 24-stündige Dauerinkubation von $25 \mu\text{M}$ Imatinib resultierte in K562-ABCB1 und in K562 Zellen in ähnlich hohen Apoptoseraten. Die K562 Zellen wiesen 65% apoptotische Zellen auf, K562-ABCB1 Zellen 53%. Die Zugabe des ABCB1-Inhibitors PSC833 hatte unter diesen Versuchsbedingungen keinen zusätzlichen Effekt. Bei Dauerinkubation von $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zelllinien. Die K562-ABCB1 Zellen zeigten nur 5% apoptotische Zellen auf, wohingegen 65% der parentalen K562 Zellen apoptotisch waren. Die Zugabe von PSC833 führte zu einer signifikanten Zunahme ($p=0,012$) der Apoptose-rate in K562-ABCB1 Zellen von 5% auf 55%. Bei Dauerinkubation von hohen Imatinib-Konzentrationen konnte somit kein Unterschied zwischen den PSC833 behandelten bzw. unbehandelten K562-ABCB1 Zellen festgestellt werden.

Im Anschluss wurde die Wirkung des ABCB1-Inhibitors bei Kurzzeit-Inkubation mit Hoch-Dosis Imatinib untersucht. Dazu wurden sowohl K562 als auch K562-ABCB1 Zellen in Gegenwart und Abwesenheit von PSC833 für 2 Stunden mit $25 \mu\text{M}$ Imatinib inkubiert. Nach dem Imatinib *Wash Out* wurden die Zellen in TKI-freies Medium zurückgesetzt. PSC833 wurde entweder erneut zugesetzt oder nicht.

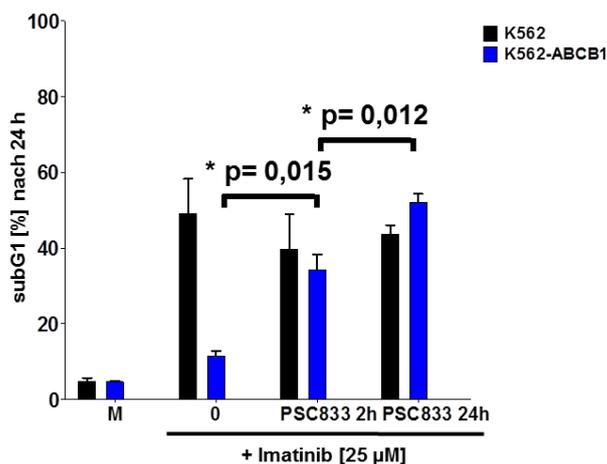


Abbildung 40: Die Zugabe von PSC833 sensitiviert K562-ABCB1 Zellen gegenüber der Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis-Imatinib.

Insgesamt wurden 5×10^4 Zellen pro ml für 2 Stunden in Gegenwart und Abwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PSC833 mit $25 \mu\text{M}$ Imatinib inkubiert gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. Nach Zurücksetzen der Zellen in TKI-freies Medium wurde PSC833 erneut zugegeben (PSC833 24h) oder nicht (PSC833 2h). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, M, die nur mit DMSO in der TKI entsprechenden Konzentration versetzt wurden sowie Zellen, die ohne PSC833 nur mit Imatinib, 0, inkubiert wurden. Die Analyse der Proben erfolgte durch Zellzyklus-Analyse nach 24 Stunden. Die Ergebnisse sind dargestellt als Prozentsatz der Zellen in der subG1-Phase. Dargestellt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen + SEM. * markiert die Proben mit signifikanter Abweichung im zweiseitigen gepaarten t-Test.

Die in Abbildung 40 dargestellte Zellzyklus-Analyse der Proben zeigte, dass K562-ABCB1 Zellen im Vergleich zu K562 Zellen in der Abwesenheit von PSC833 eine Apoptoseresistenz gegenüber der Kurzzeit-Inkubation mit Imatinib aufweisen. Durch die 2-stündige Zugabe von PSC833 wurden K562-ABCB1 Zellen sensitiv gegenüber der Imatinib-Inkubation. Die Zunahme an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den PSC833 unbehandelten K562-ABCB1 Zellen war signifikant ($p= 0,0159$). Die erneute Zugabe von PSC833 nach dem *Wash Out* der Inhibitoren resultierte in einer weiteren signifikanten Erhöhung der apoptotischen Zellen ($p= 0,012$). In K562 Zellen wurde die Apoptoserate nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-Imatinib nicht durch die Zugabe von PSC833 beeinflusst. Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des ABCB1-Transporters zu einer Sensitivierung der K562-ABCB1 gegenüber der Kurzzeit-Inkubation von 25 μM Imatinib führt.

4.9 Quantitativer Nachweis von ^{14}C -markiertem Imatinib mittels Szintillator

Die erhobenen Daten der HPLC-Messungen deuten an, dass Zellen in der Lage sind TKI nach Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen massiv intrazellulär anzureichern (s. 4.7.2). Diese Anreicherung übersetzt sich letztlich mittels protrahierter TKI-Exposition in eine kontinuierliche Kinaseinhibition. Durch die Expression von ABC-Transporterproteinen können die Zellen vor der Apoptoseinduktion nach Inkubation hoher Imatinib-Konzentrationen für kurze Zeit gerettet werden (s. 4.8.2). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass ABC-Transporter in der Lage sind die intrazelluläre Imatinib-Konzentration zu senken. Um die aufgestellte Hypothese zu überprüfen, wurden *Wash Out* Experimente mit radioaktiv markiertem ^{14}C -Imatinib durchgeführt. Der Vorteil dieser Markierung liegt in der guten Quantifizierbarkeit der Imatinib-Mengen, sowie einer hohen Sensitivität der Messung. Radioaktiv markierte Tyrosinkinase-Inhibitoren werden daher häufig verwendet, um die Aufnahme der Substanzen nachzuweisen und um intrazelluläre TKI-Konzentrationen zu bestimmen (White et al., 2006, 2007; Davies et al., 2009; Hegedus et al., 2009; Ringel et al., 2010).

4.9.1 Verlauf der ^{14}C -Imatinib-Konzentrationen nach *Wash Out*

Zur Quantifizierung der Imatinib-Konzentrationen in K562, K562-ABCB1 und K562-ABCG2 Zellen sowie im Zellkulturmedium wurden nach der Kurzzeit-Inkubation mit 25 μM ^{14}C -Imatinib, Zellen und Zellkulturmedium durch Zentrifugation voneinander getrennt (s. 3.5). Das Medium wurde zur Probenmessung mit Szintillator-Flüssigkeit versetzt (S1), während die Zellen einem *Wash Out* mit PBS unterzogen und anschließend in Zellkulturmedium resuspendiert wurden. An verschiedenen Zeitpunkten nach dem Mediumaustausch (0, 15, 30, 120 Min) wurde erneut das Zellkulturmedium von den zellulären Bestandteilen getrennt und beides separat der Szintillator-Messung zugeführt (s. 3.5.1, 3.5.2). Die Zellen wurden vor der Messung stets zweimal in PBS resuspendiert. Die gemessenen Konzentrationen der Zellen wurden zur Berechnung der intrazellulären Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

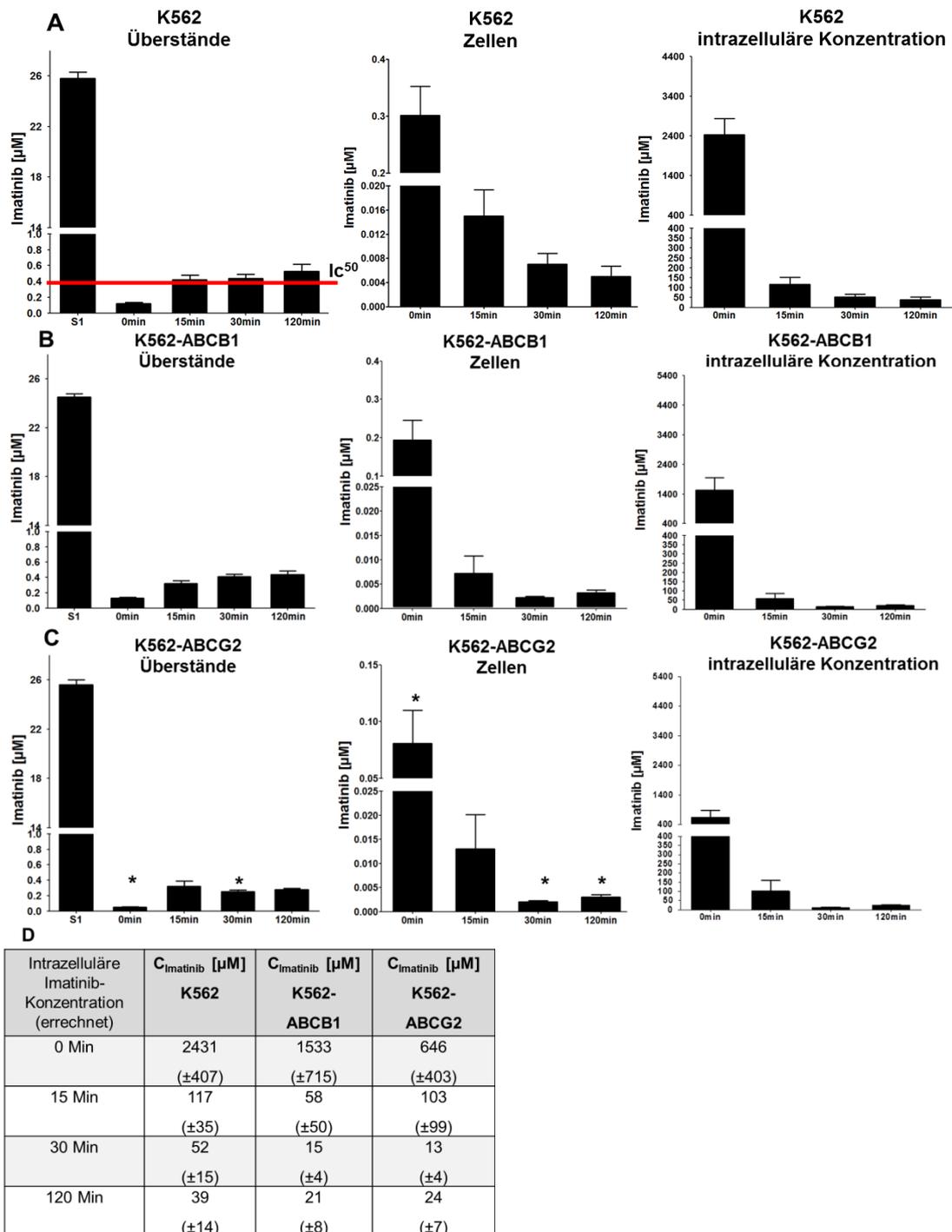


Abbildung 41: Nachweis steigender Imatinib-Konzentrationen im Zellkulturmedium bei gleichzeitiger Verringerung der intrazellulären Imatinib-Konzentrationen.

Die Zelllinien wurden für 2 Stunden mit $25 \mu\text{M}$ ^{14}C -Imatinib inkubiert, gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. Die Zellen wurden während dem Experiment mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro ml gehalten. Gemessen wurden 50.000 Zellen in 1ml (*Zellen*) sowie die 1 ml Zellkulturüberstand (*Überstand*) pro Zeitpunkt in Triplikaten. Gezeigt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Messungen +SEM. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch das Anlegen der gemessenen DPM-Werte an die mitgeführte Standardreihe. Die Berechnung der intrazellulären Konzentration erfolgte durch die folgende Formel: $C_{\text{TKI intrazellulär}} = C_{\text{TKI Zellen}} \times V_{\text{Messvolumen}} \times 1/V_{50.000 \text{ Zellen}}$. In (A) dargestellt sind die Ergebnisse der K562 Zellen. Die rote Linie markiert die IC_{50} -Konzentration von Imatinib auf K562 Zellen. (B) zeigt die Ergebnisse der K562-ABCB1 Zellen, während (C) die der K562-ABCG2 Zellen abbildet. * markiert Proben, die im zweiseitigen t-Test eine signifikante Abweichung zu den Werten der K562 Zellen aufwiesen ($p < 0,05$). (D) gibt die errechneten intrazellulären Konzentrationen der Zellen nach *Wash Out* mit PBS zum jeweiligen Zeitpunkt + SEM an.

Bei der Betrachtung der Zellkulturüberstände der drei verwendeten Zelllinien zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg der Imatinib-Konzentration. Bezüglich der erreichten Konzentration nach 120 Minuten fällt auf, dass der Überstand der K562 Zellen mit 0,53 μM die höchste Imatinib-Konzentration aufwies, K562-ACB1 Zellen setzen 0,44 μM und K562-ABCG2 Zellen 0,28 μM Imatinib frei. Diese Unterschiede wiesen jedoch keine Signifikanz im zweiseitigen t-Test auf. Lediglich die Proben 0 und 30 Minuten der K562-ABCG2 Zellen waren im Vergleich zu den K562 Zellen signifikant mit p-Werten von 0,0228 (0 Min) sowie 0,0345 (30 Min). Für die K562-ACB1 Zellen konnte trotz deutlich geringeren freigesetzten Imatinib-Konzentrationen keine signifikante Abweichung zu K562 Zellen festgestellt werden, was daraufhin deutet, dass dieser Transporter durch die hohe Imatinib-Konzentration inhibiert werden könnte. Parallel zur Imatinib-Konzentration im Überstand wurde diese auch in den Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass während die Konzentration in den Überständen nach dem *Wash Out* zunimmt, die gemessene Konzentration in allen untersuchten Zelllinien abnimmt. Besonders deutlich nimmt die Konzentration im Zeitraum vom 0–15 Minuten ab, was genau dem Zeitraum entspricht, indem die Konzentration im Überstand stark anstieg. Beim Vergleich der zellulären Konzentrationen zwischen den Zelllinien wurde deutlich, dass K562-ABCG2 Zellen zum Zeitpunkt 0 Minuten mit 0,081 μM eine signifikant niedrigere Imatinib-Konzentration aufweisen als K562 Zellen mit 0,3 μM ($p= 0,023$). Auch für die Proben 30 sowie 120 Minuten ergab sich eine signifikant verringerte Imatinib-Konzentration im Vergleich zu K562 Zellen ($p= 0,01$ sowie 0,005). In K562-ACB1 Zellen konnte im Vergleich zu K562 Zellen zu jedem gewählten Zeitpunkt eine deutlich geringere zelluläre Konzentration nachgewiesen werden. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz im t-Test.

Die Berechnung der intrazellulären Konzentration anhand der bestimmten Imatinib-Konzentrationen der Zellen zeigte in allen drei Zelllinien eine massive Anreicherung der Substanz. In den K562 Zellen wurde eine Konzentration von 2431 μM , in den K562-ACB1 Zellen eine Konzentration von 1533 μM und in den K562-ABCG2 Zellen eine Konzentration von 646 μM erreicht, was einer Anreicherung im Bereich von Faktor 25–97 entspricht.

Um bestimmen zu können wie stark die intrazelluläre Konzentration durch die Expression der Transporterproteine beeinflusst werden kann, wurden die verschiedenen Zelllinien für 2 Stunden mit 25 μM ^{14}C -Imatinib inkubiert, anschließend gewaschen, um an die Außenseite der Zellmembran gebundenes Imatinib zu entfernen und mittels Szintillator analysiert. Das Ergebnis dieser Messung Abbildung 42 dargestellt.

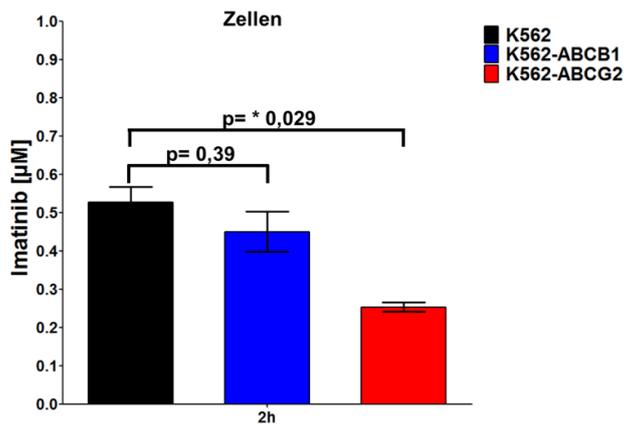


Abbildung 42: Die Expression von ABC-Transporterproteinen senkt die zelluläre ¹⁴C-Imatinib-Konzentration.

Dargestellt sind die zellulären Konzentrationen der Zelllinien nach 2-stündiger Inkubation von 50.000 Zellen/ ml mit 25 µM ¹⁴C-Imatinib. Die Zellen wurden vor der Messung zweimal mit PBS gewaschen. Gemessen wurden 50.000 Zellen pro ml in Triplikaten. Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Messungen ± SEM. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch das Anlegen der gemessenen DPM-Werte an die mitgeführte Standardreihe. * markiert Proben, die im zweiseitigen t-Test eine signifikante Abweichung zu den Werten der K562 Zellen aufwiesen ($p < 0,05$).

Es wird deutlich, dass nach 2-stündiger Inkubation hoher Imatinib-Konzentrationen große Unterschiede in den gemessenen zellulären Konzentrationen vorhanden sind. In K562 Zellen konnte eine Konzentration von 0,527 µM, in K562-ABCB1 Zellen eine von 0,45 µM und in den K562-ABCG2 Zellen konnte eine Konzentration von 0,253 µM Imatinib gemessen werden. Für die K562-ABCG2 Zellen war diese Konzentration signifikant erniedrigt im Vergleich zu K562 Zellen ($p = 0,029$). Für die K562-ABCB1 Zellen konnte keine signifikante Veränderung der zellulären Konzentration festgestellt werden. Dies wirft die Frage auf, in wieweit die zelluläre Imatinib-Konzentration durch die Expression des ABCB1-Transporters beeinflusst werden kann und wie sich dies bei geringeren Imatinib-Konzentrationen verhält.

4.9.2 Dauerinkubation verschiedener ¹⁴C-Imatinib-Konzentrationen

Die bisherigen Ergebnisse zur zellulären Konzentration der K562-ABCB1 Zellen (s. 4.9.1) geben Anlass zur Vermutung, dass der ABCB1-Transporter durch hohe Imatinib-Konzentrationen inhibiert werden könnte, weshalb es zu keiner signifikanten Veränderung der zellulären Konzentration im Vergleich zu K562 Zellen kommt. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden K562 und K562-ABCB1 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen ¹⁴C-Imatinib (0,25/ 2,5/ 25 µM) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Zellkulturüberstand getrennt. Die Zellen wurden vor der Messung zweimal mit PBS gewaschen, um eventuell membrangebun-

denes Imatinib zu entfernen. Das Ergebnis der anschließenden Szintillator-Messung ist in Abbildung 43 dargestellt.

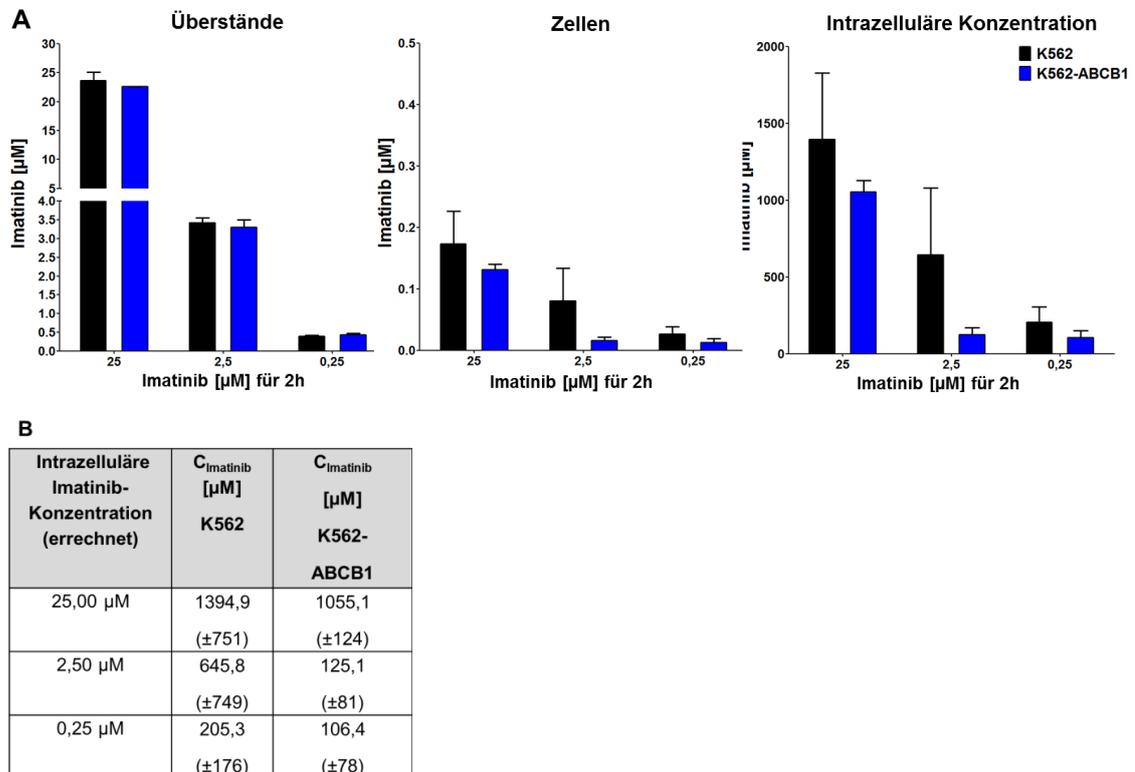


Abbildung 43: Der ABCB1-vermittelte Transport von ^{14}C -Imatinib wird durch hohe Imatinib-Konzentrationen inhibiert.

Die Zelllinien wurden für 2 Stunden mit den angegebenen ^{14}C -Imatinib-Konzentrationen inkubiert, gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. Die Zellen wurden während dem Experiment mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro ml gehalten. Gemessen wurden 50.000 Zellen in 1ml (*Zellen*) sowie die 1 ml Zellkulturüberstand (*Überstand*) pro Zeitpunkt in Triplikaten. In (A) gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Messungen +SEM. Die Konzentrationsberechnung erfolgte durch Anlegen der gemessenen DPM-Werte an die Standardreihe. Die Berechnung der intrazellulären Konzentration erfolgte durch die folgende Formel: $C_{\text{TKI intrazellulär}} = C_{\text{TKI Zellen}} \times V_{\text{Messvolumen}} \times 1/V_{50.000\text{Zellen}}$. In (B) dargestellt sind die errechneten intrazellulären Konzentrationen +SEM der Zelllinie nach der Inkubation mit den angegebenen ^{14}C -Imatinib-Konzentrationen.

Die Messung der Zellkulturüberstände diente als Positiv-Kontrolle für die verwendete ^{14}C -Imatinib-Konzentration. Bei Betrachtung der gemessenen sowie der errechneten zellulären Konzentrationen war erkennbar, dass bei einer Inkubation von 25 µM Imatinib keine signifikanten Unterschiede zwischen K562 und K562-ABCB1 Zellen auftreten, obwohl K562-ABCB1 Zellen eine niedrigere intrazelluläre Konzentration aufwiesen. Bei der Inkubation von 2,5 µM ^{14}C -Imatinib zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. In K562 Zellen konnte eine Konzentration von 0,08 µM und in K562-ABCB1 konnten 0,016 µM gemessen werden. Auch nach der Inkubation von 0,25 µM ^{14}C -Imatinib konnte eine erniedrigte zelluläre Konzentration in den K562-ACB1 Zellen festgestellt werden. Insgesamt zeigte sich somit, dass der ABCB1-Transporter bei niedrigeren Konzentrationen in der Lage ist Imatinib effektiv

aus den Zellen zu transportieren, auch wenn keine Signifikanz dieser Daten vorhanden war.

4.9.3 Messung der Effizienz der *Wash Out* Prozedur

Um zu überprüfen, ob der Efflux der TKI aus den Zellen ein konstanter Prozess ist, wurde das zum Entfernen der TKI verwendete PBS auf rückständiges ^{14}C -Imatinib überprüft. Dabei wurde die Anzahl der *Wash Out* Schritte von zwei auf vier erhöht. Die Zellen wurden wie gewohnt nach dem *Wash Out* zurück in Zellkulturmedium gesetzt, um die Freisetzung von Imatinib nach 120 Minuten zu bestimmen. Das Ergebnis ist in Abbildung 44 dargestellt.

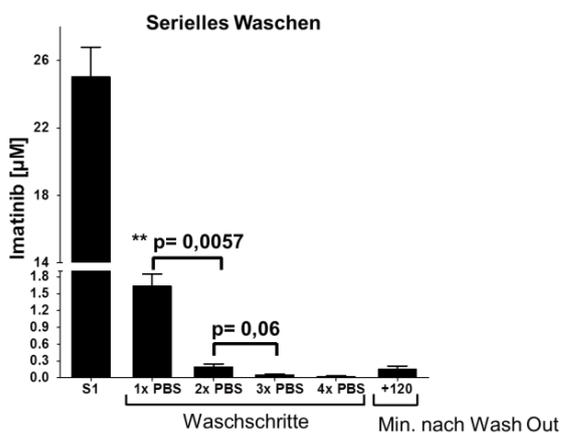


Abbildung 44: Der Efflux von ^{14}C -Imatinib aus den Zellen ist ein kontinuierlicher Prozess.

K562 Zellen wurden für 2 Stunden mit $25\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Imatinib inkubiert, gefolgt von vier *Wash Out* Schritten mit PBS. Die Zellen wurden während dem Experiment mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro ml gehalten. Gemessen wurden 50.000 Zellen in 1ml (*Zellen*) sowie die 1 ml Zellkulturüberstand (*Überstand*) pro Zeitpunkt in Triplikaten. Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Messungen +SEM. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch Anlegen der gemessenen DPM-Werte an die mitgeführte Standardreihe.

Die Messung des zum Waschen verwendeten PBS macht deutlich, dass auch nach dem vierten Waschschrift noch immer geringe Mengen an ^{14}C -Imatinib detektiert werden können. Es ist somit davon auszugehen, dass der Efflux von Imatinib ein konstanter und dauerhaft ablaufender Prozess ist. Nach dem Zurücksetzen der Zellen ins Zellkulturmedium konnte nach 120 Minuten ein deutlicher Anstieg der Imatinib-Konzentration, im Vergleich zum vierten Waschschrift, nachgewiesen werden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass der Efflux von Imatinib aus der Zelle ein kontinuierlicher Prozess ist. Es wird weiterhin deutlich, dass der zweite PBS *Wash Out* zu einer signifikanten Erniedrigung der Imatinib-Konzentration führt ($p=0,0057$). Eine Erhöhung der Waschschrift von zwei auf drei hingegen bringt keine signifikante Erniedrigung der Imatinib-Konzentration ($p=0,06$).

5 Diskussion

Tyrosinkinase-Inhibitoren haben sich innerhalb kurzer Zeit zu einer etablierten Therapieoption in der Behandlung von malignen Erkrankungen entwickelt. Dabei ist es allgemein akzeptiert, dass die Tyrosinkinase-Inhibition kontinuierlich erfolgen muss, um klinisch effektiv zu sein. Bei der Entwicklung neuer Tyrosinkinase-Inhibitoren wird deshalb darauf geachtet, dass diese Substanzen eine lange Plasma-Halbwertszeiten aufweisen, um eine möglichst lange pharmakokinetisch wirksame Substanzmenge im Körper zu erreichen. Neuere *in vitro* und *in vivo* Daten legen die Möglichkeit nahe, dass eine kurzzeitige, aber hoch potente Kinaseinhibition in Bezug auf die Apoptoseinduktion gleichwertig mit einer dauerhaften Inhibition ist (Shah et al., 2008a, 2008b; Snead et al., 2009; Hiwase et al., 2010). Diese Daten haben zu einer Diskussion über die Wechselwirkung zwischen Kinaseinhibition und der Apoptoseinduktion geführt. Trotz bereits langjähriger Anwendung von Inhibitoren in der Klinik zeigt sich, dass das Grundlagenverständnis für das Zusammenspiel von Kinaseinhibition, der Inhibition der nachgeschalteten Signalwege und der Induktion von Apoptose, lückenhaft ist. Das detaillierte Verständnis dieser Parameter ist jedoch entscheidend, um vorhandene Therapieregime zu verbessern und die Entwicklung von neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren voranzutreiben.

5.1 Kinetik der Apoptoseinduktion

Bislang ist nur wenig über die determinierenden Parameter in der Kinetik der Apoptoseinduktion von malignen Zellen bekannt. Zunächst sollte daher in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung zwischen Kinaseinhibition und Apoptoseinduktion anhand von zellulären Rekonstitutionsmodellen für maligne hämatopoetische Neoplasien untersucht werden. Als Modell für die chronische myeloische Leukämie wurde eine Ba/F3-BCR-ABL(p210) Zelllinie verwendet. Ba/F3-Zellen, welche mit JAK2V617F transfiziert waren, dienten als Modell für Philadelphia-Chromosom-negative myeloproliferative Neoplasien und die Ba/F3-FLT3-ITD Zelllinie wurde als Modell für eine akute myeloische Leukämie verwendet (Mizuki et al., 2000; Lipka et al., 2008b; Markova et al., 2010).

Zu Beginn wurde die Funktionalität der verwendeten Zelllinien mittels Western Blot festgestellt (s. Abb. S. 42). Die Ba/F3-BCR-ABL(p210) Zellen zeigten eine Phosphorylierung von BCR-ABL, was in der Aktivierung von AKT, ERK, STAT5 und dem Adapterprotein CRKL resultierte. Diese Aktivierungen konnten wie zu erwarten mittels Im-

tinib, Dasatinib oder Nilotinib inhibiert werden (Druker et al., 1996; Lombardo et al., 2004; Weisberg et al., 2005). Für die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen zeigte sich die bekannte konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors sowie von AKT, ERK und STAT5, die durch die Inkubation mit dem FLT3-Inhibitor Midostaurin inhibiert wurde (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Kiyoi et al., 2002). Für die Ba/F3-JAK2V617F Zelllinie wurde die bekannte Aktivierung von AKT, ERK und STAT5 festgestellt (Levine et al., 2005), welche unter Behandlung mit Jak Inhibitor I supprimiert wurde. In allen verwendeten Ba/F3-Modellen wurde durch das eingebrachte Onkogen eine konstitutive Aktivierung von ERK und STAT5 verursacht, weshalb diese im Folgenden als Indikatorsignalwege für die Aktivität der onkogenen Kinasen verwendet wurden, um allgemein gültige Aussagen über die TKI-Behandlung in Onkogen-transformierten Zellen treffen zu können.

Um äquipotente TKI-Konzentrationen für die unterschiedlichen Onkogene verwenden zu können und somit die Vergleichbarkeit der erzielten Effekte zu gewährleisten, wurde im Folgenden die IC_{50} -Konzentration für Imatinib, Jak Inhibitor I sowie für Midostaurin bei den entsprechenden Onkogen-mutierten Ba/F3-Zellen bestimmt (s. Abb. S. 45). Die untersuchten IC_{50} -Konzentrationen wurden anschließend auf ihre inhibitorische Wirkung hinsichtlich der Indikatorsignalwege ERK und STAT5 getestet. Es zeigte sich, dass die 2-stündige TKI-Inkubation in einer deutlichen Signalreduktion von P-ERK sowie P-STAT5 resultierte. Eine Inkubationszeit von 12 Stunden führte nicht zu einer weiteren Reduktion der Phosphorylierungssignale (s. Abb. S. 46). Weiterhin war die Phosphorylierung von STAT5 im Vergleich zu ERK sehr deutlich reduziert, was darauf hindeutet, dass STAT5 ein sehr sensibler Marker für die Kinaseinhibition durch TKI sein könnte. Insgesamt ließen sich jedoch keine Unterschiede in der Tiefe der Phosphorylierungsinhibition im untersuchten Zeitraum feststellen.

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von ERK und STAT5 in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors reduziert wird. Ebenso sollte geprüft werden, ob die Tiefe der Inhibition der nachgeschalteten Signalwege eine Auswirkung auf die Apoptoseinduktion hat. Als höchste Konzentration wurde die 100fache IC_{50} -Konzentration (**HD-TKI**) und als geringste die IC_{50} -Konzentration des jeweiligen Inhibitors eingesetzt. Die Durchfluss-Zytometrie-Analyse ergab, dass P-STAT5 und P-ERK in Abhängigkeit von den eingesetzten TKI-Konzentrationen inhibiert werden (s. Abb. S. 48). Für die Spaltung der Caspase3 konnten keine Unterschiede im Beginn der Aktivierung zwischen der Inkubation mit Hochdosis-TKI- versus IC_{50} -TKI-Konzentrationen festgestellt werden. Die Spaltung der Procaspase3 konnte im verwendeten Konzentrationsbereich erst nach einer TKI-Inkubationszeit von 12 Stunden beobachtet werden, was eine Abhängigkeit der Apoptose von einer sehr potenten

ERK und STAT5 Inhibition unwahrscheinlich erscheinen lässt. Um herauszufinden wie lange Onkogen-abhängige Ba/F3-Zellen mit der IC_{50} -Konzentration inkubiert werden müssen, um Apoptose zu induzieren, wurden Zellen für unterschiedliche Zeitintervalle (2-24 Stunden) mit TKI behandelt. Anschließend wurde der TKI entfernt und die Zellen wurden 24 Stunden nach Versuchsbeginn mittels Zellzyklus-Analyse analysiert. Für alle untersuchten Inhibitoren war eine Inkubation von 8-12 Stunden notwendig, um relevante Apoptoseraten zu induzieren (s. Abb. S. 49). Diese Daten stehen im Einklang mit publizierten Daten, die zeigen dass Apoptose nach 8-21-stündiger Imatinib-Behandlung einsetzt (le Coutre et al., 1999). Dies deutet bereits daraufhin, dass Apoptose nach einem festgelegten Programm abläuft, welches vor allem zeitlich determiniert wird. Zur näheren Analyse der Apoptosekinetik sowie einer möglichen Konzentrationsabhängigkeit, wurde die Spaltung der Caspase3 im Western Blot zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2-12 Stunden) untersucht. Die Spaltung der Procaspase3 als Anzeichen für Apoptose konnte nach 6-8-stündiger TKI-Behandlung detektiert werden (s. Abb. S. 48). Dabei ergab sich kein wesentlicher Zusammenhang mit der verwendeten TKI-Konzentration. Die Caspase3 gehört zur Familie der Cysteinyl-Aspartat-spaltenden Proteinkinasen. Der Spaltung von Caspasen kommt eine wichtige Schlüsselfunktion in der Effektorphase der Apoptose zu (Cohen, 1997). Intrinsische aber auch extrinsische Faktoren können die autolytische Spaltung der inaktiven Caspasen bewirken, man spricht nun von aktivierten Caspasen. Die Spaltung der Caspase3 wird in viablen Zellen durch die Bindung von *inhibitor of apoptosis* Proteinen verhindert. Bei Apoptoseinduktion, werden diese Proteine abgebaut und die autolytische Spaltung der Procaspase kann erfolgen (Liston et al., 1996). Auch wenn Caspase-unabhängige Wege der Apoptoseinduktion bekannt sind, wird dennoch davon ausgegangen, dass jedes Todessignal in der Zelle parallel zur Aktivierung von Caspasen führt (McCarthy et al., 1997; Borner and Monney, 1999). Aus diesen Gründen stellt der Nachweis von aktivierter Caspase3 einen guten und validen Marker der Apoptoseinduktion dar. Aufgrund der in diesem Teil der Arbeit erhobenen Daten ist davon auszugehen, dass die Kinetik der Apoptoseinduktion durch die Zeitdauer der Kinaseinhibition determiniert wird. Diese Daten belegen, dass Apoptose konzentrationsunabhängig nur nach mindestens 6-stündiger TKI-Inkubation induziert werden kann.

5.2 Auswirkungen der Kurzzeit-Inkubation hoher Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen auf Onkogen-transformierten Zellen

In den vergangenen Jahren konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass es nach Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen in CML-Zellen zur Induktion von Apoptose kommt (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Bereits die 20-minütige Exposition von BCR-ABL positiven Zellen mit der 100-fachen IC_{50} -Konzentration von 100 nM Dasatinib oder 32,5 μ M Imatinib ist ausreichend um Apoptose auszulösen (Shah et al., 2008b). Weiterhin schien diese Kurzzeit-Exposition nur zu einer transienten BCR-ABL-Inhibition zu führen. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 30-minütige Inkubation von 1 μ M Nilotinib ausreichend ist, um Apoptose in BCR-ABL positiven Zellen zu induzieren (Hiwase et al., 2009). Die Arbeit von Snead *et al.* stellte sowohl für Nilotinib als auch für Dasatinib eine Induktion von Apoptose nach Hochdosis TKI-Inkubation für 0,5-2 Stunden fest (Snead et al., 2009). Diese Arbeiten werteten als Beweis für das vollständige Entfernen der TKI nach dem *Wash Out*, das Wiederauftreten der CRKL-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von CRKL wird in klinischen Studien häufig als Surrogat-Parameter für BCR-ABL-Aktivität verwendet (Copland et al., 2006; Hamilton et al., 2006). Aufgrund dieser Tatsache wurde geschlossen, dass die kurzzeitige Hochdosis TKI-Inkubation zu einer transienten aber hoch potenten Kinaseinhibition führt, die daher in der Induktion von Apoptose resultiert (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009).

In dieser Arbeit sollte zunächst der Frage nachgegangen werden, ob die Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis TKI (**HD-TKI**) unabhängig vom zellulären Hintergrund als genereller Mechanismus nachweisbar ist. In einer weiteren Analyse sollte untersucht werden, was die molekulare Ursache für die Apoptoseinduktion nach HD-TKI Kurzzeit-Inkubation ist. Die Zellen wurden dazu während der Experimente mit der 100-fachen IC_{50} -Konzentration des jeweiligen Inhibitors inkubiert, um weiterhin äquipotente Konzentrationen einsetzen zu können. Für Dasatinib wurde die bereits publizierte Konzentration von 100 nM Dasatinib verwendet (Shah et al., 2008b). Für den Jak Inhibitor I konnte lediglich die 10-fache IC_{50} -Konzentration verwendet werden, da die Löslichkeit des Inhibitors keine höhere Konzentration erlaubte. Zytotoxische Nebenwirkungen der hohen TKI-Konzentrationen nach Kurzzeit-Inkubation konnten durch Experimente mit Zelllinien, welche dem Onkogen entsprechende Wildtyp-Kinasen exprimieren, ausgeschlossen werden (s. Abb. S. 53). Lediglich der JAK Inhibitor I, der zur Inhibition von JAK2V617F-positiven Ba/F3-Zellen eingesetzt wurde,

zeigte eine leichte Zytotoxizität auf JAK2-WT Zellen. Die Ursache hierfür ist, dass Ba/F3-Zellen für ihr Wachstum auf IL-3 angewiesen sind (Palacios and Steinmetz, 1985). Die Signaltransduktion von Zytokin-Rezeptoren wird durch Januskinasen vermittelt und daher unterbricht die Inhibition dieser Kinasen die überlebenswichtige Signaltransduktion. Es ist bekannt, dass der Jak Inhibitor I nicht spezifisch für die JAK2V617F-Mutation ist, sondern alle Januskinasen inhibiert (Thompson et al., 2002). Die Apoptoseraten in den WT-Zellen waren jedoch geringer als in den JAK2V617F-Ba/F3-Zellen so dass, der Inhibitor dennoch zur Behandlung eingesetzt werden konnte. In Ba/F3-BCR-ABL Zellen konnte die Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation von Imatinib sowie Dasatinib reproduziert werden (Shah et al., 2008b; Snead et al., 2009). Die Analyse der Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI in FLT3-ITD und JAK2V617F positiven Zellen ergab auch hier die Induktion hoher Apoptoseraten (s. Abb. S. 55). Es konnte somit von einem allgemeinen Mechanismus als Ursache für die Apoptoseinduktion ausgegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit, konnte eine irreversible Induktion von Apoptose in den Zellen nach hochdosierter kurzzeitiger TKI-Inkubation weitgehend ausgeschlossen werden (s. Abb. S. 48, 51). Es wurde daher im Folgenden untersucht, ob eine mögliche unvollständige Entfernung des Inhibitors ursächlich für die Apoptoseinduktion ist. Die Onkogen-exprimierenden Ba/F3-Zellen wurden dazu einem repetitiven *Wash Out* mit PBS unterzogen (1x-3x) und der Zellkulturüberstand der TKI-behandelten Zellen wurde auf zuvor unbehandelte Zellen überführt (S1-S3). Die Analysen mittels Apoptose-Assays ergaben hohe Apoptoseraten in den Zellen die einmal der Waschprozedur (1x) unterzogen wurden. Zellen, welche einen zweiten oder dritten *Wash Out* (2x, 3x) durchliefen, wiesen deutlich geringere Apoptoseraten auf (s. Abb. S. 57, 59, 60). Lediglich Zellen, die mit Jak Inhibitor I oder Nilotinib behandelt wurden, zeigten erst nach der dritten Waschprozedur (3x) deutlich erniedrigte Apoptoseraten. Der Übertrag der Zellkulturüberstände S1 und S2 induzierte in allen untersuchten Zelllinien Apoptose. Die Tatsache, dass die Zellen durch repetitives *Wash Out* vor der Apoptoseinduktion geschützt wurden zeigt, dass Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI nicht notwendigerweise in der Apoptoseinduktion resultiert. Diese Daten stehen im Kontrast zu bereits publizierten Daten (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Aufgrund der Tatsache, dass der Zellkulturüberstand nach dem ersten *Wash Out* in unbehandelten Zellen Apoptose auslöst, obwohl das Medium zu keinem Zeitpunkt mit TKI versetzt wurde, deutet auf residuelle TKI-Konzentrationen nach dem *Wash Out* hin. Die Ergebnisse der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation nach repetitivem Mediaustausch konnten in humanen BCR-ABL positiven K562-Zellen sowie in FLT3-ITD positiven MV4-11-Zellen verifiziert werden (s. Abb. S. 62), was die Relevanz für das humane System bestätigt.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Protokoll zum Entfernen der TKI weicht im Detail von den publizierten Protokollen ab. Um auszuschließen, dass die Diskrepanz der Daten darin begründet sein könnte, wurde für einige Experimente das Protokoll exakt nach Shah *et al.* durchgeführt (Shah *et al.*, 2008b). Bei der Analyse der Proben mittels Apoptose-Assays zeigte sich, dass das repetitive *Wash Out* mit Medium ebenfalls zum Schutz vor Apoptoseinduktion führt und die übertragenen Zellkulturüberstände vor dem ersten und nach dem ersten *Wash Out* (S1 und S2) weiterhin Apoptose induzierten (s. Abb. S. **68, 69, 70**). Durch das Waschen mit Medium konnte vermutlich mehr TKI aus den Zellen entfernt werden, weshalb sich geringere Apoptoseraten nach 24 Stunden zeigten. Die Ursache für die geringeren Apoptoseraten zu diesem Zeitpunkt ist vermutlich die höhere Proteinbindungskapazität des fötalen Kälberserum im Vergleich zu PBS. Es ist bekannt, dass Imatinib an das saure α 1-Glykoprotein im Serum bindet, was die Bioverfügbarkeit der Substanz reduziert (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2000; le Coutre *et al.*, 2002). Für Dasatinib sowie Nilotinib ist ebenfalls bekannt, dass bis zu 98% dieser Substanzen proteingebunden vorliegen (Brave *et al.*, 2008; Deininger, 2008; Di Gion *et al.*, 2011).

Die erhobenen Daten zeigen deutlich, dass es nach Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen nicht zur irreversiblen Induktion von Apoptose kommt, sondern die Zellen vielmehr durch wiederholtes *Wash Out* vor Apoptose geschützt werden. Diese Ergebnisse bestätigen weiterhin die bereits publizierten Daten bezüglich der Induktion von Apoptose nach Kurzzeit-Inkubation von Tyrosinkinase-Inhibitoren (Shah *et al.*, 2008b; Hiwase *et al.*, 2009; Snead *et al.*, 2009), lassen jedoch die von den Autoren postulierte irreversible Induktion von Apoptose durch die potente aber transiente Kinaseinhibition unwahrscheinlich erscheinen. Die erhobenen Daten lassen vielmehr den Schluss zu, dass die Tyrosinkinase-Inhibitoren durch die einmalige Durchführung des Mediumaustauschs nicht vollständig aus den Zellen entfernt werden können, weshalb das repetitive *Wash Out* der Zellen diese vor Apoptoseinduktion schützt und der Übertrag von Zellkulturüberständen in unbehandelten Zellen Apoptose auslöst.

5.3 Signaltransduktion der Onkogen-transformierten Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Inkubation

Die Beobachtung, dass die Apoptoseinduktion nach hochdosierter Kurzzeit-Inkubation mit TKI reversibel war, sollte im weiteren Verlauf auf die molekularen Vorgänge hin analysiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Phosphorylierung von CRKL nicht mit dem Überleben von Zellen nach der Kurzzeit-Inkubation von HD-TKI korreliert (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009), sollte weiterhin geprüft werden, ob auf Signaltransduktionsebene ein prädiktiver Marker für das Überleben der Zellen bestimmt werden kann. Die Zellen dazu wurden einem repetitiven *Wash Out* unterzogen und nach einer 2-stündigen Erholungszeit lysiert. Im Western Blot wurden P-ERK und P-STAT5 als Indikatorsignalwege für die untersuchten Onkogene analysiert (Faderl et al., 1999; Fenski et al., 2000; Levine et al., 2005). Die Analyse ergab eine Rephosphorylierung der beiden Indikatorsignalwege erst nach dem zweiten *Wash Out* (2x) (s. Abb. S. 63), was gut mit dem Überleben der Zellen nach dem zweiten *Wash Out* korrelierte. Diese Ergebnisse deuten ebenso wie die Daten der Apoptose-Assays an, dass sich nach einmaliger Durchführung der Waschprozedur biologisch relevante TKI-Konzentrationen in den Zellen befinden und diese über die Zeit in das Zellkulturmedium abgegeben werden. Dies resultiert in der Inhibition der onkogenen Kinasen sowie der nachgeschalteten Signalwege.

Bislang wurde in der Literatur in BCR-ABL positiven Zellen nach Kurzzeit-Inkubation hoher TKI-Konzentrationen eine Rephosphorylierung von CRKL und BCR-ABL (Y177) nach dem einmaligen *Wash Out* beobachtet, was als Erholung der BCR-ABL Kinaseaktivität interpretiert wurde (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). STAT5 wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht. Neben CRKL und STAT5 wurde in dieser Arbeit auch die Phosphorylierung von BCR-ABL an den Tyrosin-Resten 177 und 412 nach repetitivem *Wash Out* genauer analysiert. Y412 ist entscheidend für die Aktivität des BCR-ABL Proteins, während Y177 essentiell für die transformierenden Eigenschaften ist (Pendergast et al., 1993; Brasher and Van Etten, 2000). Sowohl in murinen Ba/F3-BCR-ABL als auch in humanen K562 Zellen zeigte sich erst nach der Durchführung von einem zweiten *Wash Out* (2x) eine Phosphorylierung von BCR-ABL (Y412) und STAT5, während CRKL und BCR-ABL (Y177) bereits nach dem ersten *Wash Out* (1x) deutliche Phosphorylierungen aufwiesen (s. Abb. S. 65, 72). Die Daten zur CRKL und BCR-ABL (Y177) Phosphorylierung stimmen mit publizierten Daten überein, auch hier zeigte sich nach dem Mediaustausch eine Rephosphorylierung von CRKL und BCR-ABL (Y177) (Shah et al., 2008b; Hiwase et al., 2009; Snead et al., 2009). Die Diskrepanz in der Rekonstitution des Phosphorylie-

rung von STAT5 und BCR-ABL (Y412) im Vergleich zu der Phosphorylierung von BCR-ABL (Y177) und CRKL ist bislang nicht bekannt und wirft die Frage nach der Kinetik bzw. Dynamik der Phosphorylierung dieser Proteine auf. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung von BCR-ABL, STAT5 und CRKL in Abhängigkeit von verschiedenen Imatinib-, Dasatinib- und Nilotinib-Konzentrationen über die Zeit in Western Blot und Durchfluss-Zytometrie untersucht. Diese Analysen ergaben, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL (Y412) und STAT5 bereits durch niedrige TKI-Konzentrationen innerhalb von 2 Stunden stark inhibiert wurde, während BCR-ABL (Y177) und CRKL erst bei höheren TKI-Konzentrationen eine Reduktion der Phosphorylierung zeigten (s. Abb. S. **76**). Eine konzentrationsabhängige Inhibition der CRKL-Phosphorylierung wurde bereits in BCR-ABL transformierenden hämatopoetischen Progenitorzellen (CD34⁺-CML-Zellen) unter steigenden Imatinib-Konzentrationen gezeigt (Khorashad et al., 2009). Eine mögliche Erklärung für die CRKL-Phosphorylierung in Abwesenheit der Kinaseaktivität von BCR-ABL (Y412) könnte eine Phosphorylierung durch SRC-Kinasen sein. Es ist bekannt, dass CRKL auch über SRC-Kinasen phosphoryliert werden kann (Qiao et al., 2006). Publierte sowie eigene Daten legen somit nahe, dass der Phosphorylierungsstatus von CRKL keine direkten Rückschlüsse auf die BCR-ABL Aktivität zulässt (Qiao et al., 2006). CRKL und STAT5 sind beide BCR-ABL untergeordnete Signalmoleküle deren Phosphorylierung jedoch unterschiedlich gut mit der Kinaseaktivität von BCR-ABL übereinstimmt. Die unterschiedliche Phosphorylierungskinetik von CRKL und STAT5 legt auch den Schluss nahe, dass P-CRKL kein besonders verlässlicher Parameter für den Nachweis residueller TKI-Konzentrationen nach kurzzeitiger Inkubation darstellt, was von besonderer Relevanz für das Monitoring der BCR-ABL Kinaseaktivität unter TKI-Therapie im Rahmen klinischer Studien ist. Bislang wird CRKL im Rahmen klinischer Studien als Surrogat-Parameter für BCR-ABL Aktivität analysiert (Hamilton et al., 2006). Eine Arbeit konnte ebenfalls zeigen, dass die CRKL-Phosphorylierung *in vitro* kein verlässlicher Marker ist, um BCR-ABL-Aktivität im Zeitraum von 24 Stunden zu monitoren (Zhou P., Abstract #0804, EHA Meeting 2010). Einige Autoren schlagen daher alternative Strategien zum klinischen Monitoring der BCR-ABL Aktivität vor. Schultheis *et al.* postuliert, dass anstelle der CRKL-Phosphorylierung der Gesamtgehalt an Phosphoproteinen der Zellen entscheidend sein könnte, um das Therapieansprechen der Patienten auf Imatinib-Therapie zu prognostizieren (Schultheis et al., 2005).

Für STAT5 belegen eigene Daten, dass bereits geringe TKI-Konzentrationen eine sehr deutliche Reduktion der Phosphorylierung bedingen (s. Abb. S. **46, 48**). Weiterhin zeigte sich, dass die Phosphorylierung von STAT5 gut mit dem Überleben der Zellen korreliert (s. Abb. S. **57, 59, 60**). In allen untersuchten Rekonstitutionsmodellen erwies

sich STAT5 als guter und sensitiver Marker für die Präsenz von Tyrosinkinase-Inhibitoren (s. Abb. S. 46, 48). Der Phosphorylierung von STAT5 kommt in der Transformation der leukämischen Erkrankung eine entscheidende Rolle zu. Es konnte gezeigt werden, dass STAT5 Signaling notwendige Voraussetzung für die Initiation und Erhaltung der BCR-ABL vermittelten leukämischen Transformation ist (Nieborowska-Skorska et al., 1999; Hoelbl et al., 2006, 2010; Scherr et al., 2006). In FLT3-ITD positiven Zellen ist STAT5 aberrant aktiviert und vermittelt entscheidende Überlebenssignale für die Zellen (Mizuki et al., 2000; Rocnik et al., 2006; Choudhary et al., 2007). Auch für JAK2V617F konnte gezeigt werden, dass STAT5 für die transformierende Wirkung des Onkogens unerlässlich ist (Wernig et al., 2008a; Walz et al., 2012). Möglicherweise könnte STAT5 daher als diagnostisch relevanter Marker für die Aktivität der onkogenen Kinasen BCR-ABL, FLT3-ITD sowie JAK2V617F und für das Überleben der Zellen unter TKI-Behandlung verwendet werden, wenn die in den zellulären Modellen gewonnen Erkenntnisse in der Zukunft auch im primären Patientenmaterial bestätigt werden können.

Über die starke Diskrepanz der beiden BCR-ABL-Phosphorylierungsstellen Y177 und Y412 unter TKI-Inkubation liegen bislang keine Daten vor. Bezüglich der biologischen Relevanz der beiden Phosphorylierungsstellen des BCR-ABL Proteins ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Y177 bedeutend ist für leukämische Transformation des Fusionsproteins (Pendergast et al., 1993). Die Phosphorylierung an diesem Rest resultiert in der Bindung von GRB-2, was zur Aktivierung von der RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade und von PI3K/AKT führt (Nieborowska-Skorska et al., 1999; Sattler et al., 2002; Chu et al., 2007). Die Beobachtung, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL (Y177) nicht mit der BCR-ABL Kinaseaktivität korreliert, wird durch kürzlich veröffentlichte Daten unterstützt (Samanta et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL (Y177), nicht wie ursprünglich angenommen von ABL, sondern von JAK2 vermittelt wird (Samanta et al., 2011). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass die SRC-Kinase HCK mit BCR-ABL in Abwesenheit von BCR-ABL-Kinaseaktivität interagiert. Diese Interaktion scheint verantwortlich für die Aktivierung von HCK, was in der Phosphorylierung von BCR-ABL an Y177 resultiert (Warmuth et al., 1997). BCR-ABL (Y412) ist essentiell für die Kinaseaktivität des Proteins sowie für die Regulation der Kinase und ist somit entscheidend für die Aktivierung von untergeordneten Signalwegen (Brasher and Van Etten, 2000; Dorey et al., 2001; Pluk et al., 2002). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass unphosphoryliertes Y412 nach innen in die Aktivierungsschleife gerichtet ist und dadurch die Aktivität der Domäne behindert (Dorey et al., 2001). Diese Daten belegen, dass die Phosphorylie-

rung von BCR-ABL Y412 ein direkterer Parameter für das Monitoring der BCR-ABL Aktivität sein kann.

In der Veröffentlichung von Shah *et al.* 2008 wurde aus der vorhandenen BCR-ABL Phosphorylierung (Y177) geschlossen, dass die Kinase aktiv ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Phosphorylierung von Tyrosin 177 nur ein geringer Anteil an der Gesamtphosphorylierung des BCR-ABL Proteins zukommt (s. Abb. S. 73). Im Vergleich zu Y412 scheint Y177 nicht wesentlich von der kurzzeitigen HD-TKI Inkubation beeinflusst zu werden. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten überein, die zeigen, dass die 2-stündige Inkubation von 10 μ M Imatinib auf BCR-ABL positiven 32D-Zellen nicht zu einer Reduktion der BCR-ABL Phosphorylierung an Tyrosin 177 führt (Samanta *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von BCR-ABL innerhalb kurzer Zeit nach Inhibition durch Tyrosinkinase-Inhibitoren reduziert wird, was vermutlich durch eine aktive Dephosphorylierung verursacht wird. Die Dephosphorylierung wird dabei von Protein-Tyrosin-Phosphatasen, PTP, vermittelt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die gleichzeitige Expression von PTP1B und BCR-ABL zu einer deutlichen Reduktion der allgemeinen BCR-ABL-Phosphorylierung an Tyrosin-Resten führt (LaMontagne *et al.*, 1998). Es kann geschlossen werden, dass die PTP1B-Aktivität innerhalb von 2 Stunden zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von BCR-ABL (Y412) führt. Die Y177-Phosphorylierung unterliegt jedoch einer langsameren Regulation, die vermutlich nicht durch PTP1B reguliert wird. Der Nachweis dieser Annahme könnte in der Zukunft durch den siRNA-vermittelten *knock down* von PTP1B und der Betrachtung der beiden Phosphorylierungsstellen Y412 und Y177 unter Inhibitor-Inkubation erbracht werden. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Insgesamt konnte die Diskrepanz der Phosphorylierung der beiden BCR-ABL-Phosphorylierungsstellen sowie der Phosphorylierungen von CRKL und STAT5 sowohl im murinen als auch im humanen Rekonstitutionsmodell festgestellt werden. Zukünftige Experimente in primären humanen CML-Zellen werden Aufschluss darüber geben, ob diese Diskrepanz auch dort zu beobachten ist und ob die Phosphorylierung von STAT5 als prädiktiver Marker für das Überleben der Onkogen-mutierten Zellen unter TKI-Exposition verwendet werden kann.

5.4 Quantifizierung der extrazellulären und intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentrationen

In den Experimenten mit repetitivem Mediaustausch wurde deutlich, dass die Apoptoseinduktion nach hochdosierter TKI Kurzzeit-Inkubation aus einer verlängerten Kinaseinhibition resultiert, die letztlich durch protrahierte TKI-Exposition hervorgerufen wird. Als mögliche Ursache erschien eine intrazelluläre TKI-Akkumulation mit nachfolgender langsamer Freisetzung in das umgebende Zellkulturmedium sehr wahrscheinlich. Um mögliche freiwerdende Tyrosinkinase-Inhibitoren quantifizieren zu können, wurde die Kinetik der TKI-Konzentrationen in Zellkulturüberständen mittels HPLC quantifiziert. Der Vorteil der Methode ist, dass keine radioaktive oder fluoreszente Markierung der Inhibitoren zur Messung benötigt wird. HPLC-Messungen wurden bereits in verschiedenen Publikationen verwendet, um TKI-Konzentrationen genau zu bestimmen. Dabei konnten die Konzentrationen von Imatinib, Dasatinib und Nilotinib erfolgreich im Serum von CML-Patienten und in Zellkulturmodellen mittels HPLC-MS determiniert werden (Bakhtiar et al. , 2002; Gambacorti-Passerini et al. , 2003a; De Francia et al. , 2009; Parise et al. , 2009, le Coutre et al., 2004; Hegedus et al., 2009; Mlejnek et al., 2011).

Für die Messung der TKI in der vorliegenden Arbeit konnten die Bedingungen so etabliert werden, dass die Nachweisgrenze der jeweiligen Substanz deutlich unter der in Ba/F3-Zellen bestimmten IC_{50} -Konzentration lag (s. Abb. S. 82). Die Messung der Zellkulturüberstände nach der Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI gefolgt vom *Wash Out* ergab eine Freisetzung der Inhibitoren im zeitlichen Verlauf. Dabei wurden Konzentrationen oberhalb der IC_{50} -Konzentration des jeweiligen Inhibitors erreicht. Diese Daten konnten sowohl im murinen als auch im humanen Rekonstitutionsmodell erhoben werden (s. Abb. S. 82). Durch die Verwendung von primärem CML- bzw. AML-Patientenzellen sowie von hämatopoetischen Progenitorzellen ($CD34^+$ -Zellen) von gesunden Probanden konnten die Ergebnisse auch *ex vivo* in primären humanen Zellen verifiziert werden. In den klinischen Proben konnte ebenfalls ein Anstieg der TKI-Konzentrationen im Zellkulturüberstand über die Zeit nach dem Mediaustausch detektiert werden (s. Abb. S. 82). Die freigesetzten TKI-Konzentrationen erreichten dabei Konzentrationen von klinischer Bedeutsamkeit. Für Imatinib konnten 120 Minuten nach dem *Wash Out* im Zellkulturüberstand eine Konzentration von 1,2 μ M nachgewiesen werden. In CML-Patienten wurde nach Einnahme von 400 mg Imatinib ein Plasma-Talspiegel von 1,5 μ M Imatinib erreicht (Druker et al., 2001; Peng et al., 2004). Als Ursache für die Freisetzung der TKI im verwendeten Modell kommt eine starke intrazelluläre TKI-Akkumulation in Frage. Die Tatsache, dass unmittelbar nach dem *Wash Out* (0 Minuten) keine relevante Imatinib- bzw. Dasatinib-Konzentration

nachgewiesen werden konnte belegt, dass mit dem angewendeten Protokoll die TKI sehr effizient entfernt werden konnten. Für Nilotinib sowie für Midostaurin wurden zu diesem Zeitpunkt nur geringe Konzentrationen des Inhibitors detektiert.

Die HPLC-Daten legten eine intrazelluläre Retention der Inhibitoren nach kurzzeitiger HD-TKI-Exposition nahe, die zur Freisetzung der Substanzen über die Zeit führt. Einige Arbeiten belegen, dass es zu signifikanten dosisabhängigen intrazellulären TKI-Akkumulationen nach Imatinib-Behandlung kommt (le Coutre et al., 2004; Mlejnek et al., 2011). Um die intrazellulären Konzentrationen der Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Dasatinib sowie Nilotinib bestimmen zu können, wurde erneut ein HPLC-Ansatz gewählt. In verschiedenen Publikationen wurden die intrazellulären Konzentrationen von Inhibitoren bereits erfolgreich mittels HPLC bestimmt (le Coutre et al., 2004; Hegedus et al., 2009; Mlejnek et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen, welche für 2 Stunden mit HD-TKI inkubiert worden waren, vor der Messung aufgeschlossen und das Lysat wurde von Zelltrümmern geklärt. Die intrazelluläre Konzentration der Substanzen wurde unter Berücksichtigung des zuvor bestimmten zellulären Volumens errechnet. Es zeigte sich eine dramatische Akkumulation der gemessenen Inhibitoren sowohl in murinen Ba/F3-BCR-ABL Zellen (Faktor 440–960) als auch in humanen K562 Zellen (Faktor 47-260) (s. Tab. S. 83). Die Tatsache, dass K562 Zellen dabei eine geringere intrazelluläre Konzentration aufwiesen, könnte die geringeren Apoptoseraten der K562 Zellen nach HD-TKI Kurzzeit-Behandlung erklären (s. Abb. S. 62). Um sicherzustellen, dass die gemessenen TKI-Konzentrationen von vollständig lysierten Zellen bestimmt wurden, wurden die Zelltrümmer nach Abnahme des Lysats in Zellkulturmedium inkubiert und dieses wurde ebenfalls analysiert. Die Messung, die exemplarisch für Imatinib durchgeführt wurde, ergab keine nachweisbare Imatinib-Konzentration. Aufgrund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass die Zellen vollständig lysiert waren und sich keine rückständigen TKI in den Zelltrümmern befanden. Der TKI lag somit vor allem intrazellulär und nicht gebunden an die Plasmamembran vor.

Die erhobenen HPLC-Daten lassen insgesamt den Schluss zu, dass es nach der Kurzzeit-Inkubation von HD-TKI zu einer starken intrazellulären Akkumulation der Substanzen kommt. Bereits in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zellen in der Lage sind dosisabhängig TKIs um ein Vielfaches der extrazellulären Konzentration intrazellulär anzureichern (le Coutre et al., 2004; Mlejnek et al., 2011). Chapuy *et al.* konnten zeigen, dass Imatinib lysosomal sequestriert wird und damit vor allem in den Organellen vorliegt (Chapuy et al., 2009). Es erscheint möglich, dass diese subzelluläre Speicherung von Imatinib dazu führt, dass die Zellen sehr hohe Imatinib-Konzentrationen anreichern können. Die Endozytose der lysosomalen Vesikel hat ver-

mutlich einen gewissen Anteil an der freigesetzten Imatinib-Konzentration nach dem *Wash Out*.

Über die Aufnahme von Imatinib ist bekannt, dass sie vor allem aktiv über das Transporterprotein OCT-1 vermittelt wird. Eine niedrige Expression dieses Transporters führt klinisch zu einem suboptimalen Ansprechen der CML-Patienten auf Imatinib (White et al., 2007). Die pharmakologische Hemmung von OCT-1 resultiert in einer erniedrigten intrazellulären Imatinib-Konzentration (Thomas et al., 2004). Für Dasatinib und Nilotinib konnte eine OCT-1 vermittelte Aufnahme nicht gezeigt werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass der Transport entweder durch passive Vorgänge oder durch bislang unbekannte Transporterproteine erfolgt (White et al., 2006; Giannoudis et al., 2008; Hiwase et al., 2008b; Davies et al., 2009). Aufgrund der veröffentlichten Daten wird angenommen, dass sowohl der aktive als auch der passive Import der Inhibitoren zu einer intrazellulären Akkumulation führen kann. Eine Analyse der Kinetik der Imatinib-Aufnahme machte deutlich, dass die maximale Aufnahme nach 2 Stunden erreicht ist (Mlejnek et al., 2011). Eine weitere Arbeit konnte nachweisen, dass neben der Aufnahme von Imatinib auch die Aufnahme von Dasatinib bereits nach 30 Minuten ein Plateau erreicht, welches auch nach 2 Stunden noch stabil ist (Giannoudis et al., 2008). Es ist somit davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit erhobenen intrazellulären Daten die maximal erreichbaren Dasatinib- sowie Imatinib-Konzentrationen wiedergeben. Die intrazelluläre Akkumulation der Inhibitoren übersetzt sich in eine verlängerte Kinaseinhibition, was die entscheidende Ursache für die Apoptoseinduktion nach kurzzeitiger HD-TKI-Exposition ist. Zusammenfassend ist es somit auf der Basis der hier vorliegenden Daten im klinischen Kontext auch weiterhin entscheidend eine möglichst kontinuierliche Inhibition von onkogenen Tyrosinkinase zu erzielen, um effektiv Apoptose auszulösen. Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass dies nicht unbedingt durch anhaltend hohe Plasmaspiegel erreicht werden muss, sondern dass man sich dabei zukünftig die intrazelluläre Anreicherung und Retention der TKI nach Hochdosis Inkubation zunutze macht.

Um die aufgestellten Hypothesen der intrazellulären Akkumulation von TKI sowie der Freisetzung dieser über die Zeit nach dem Mediumaustausch mit einer zweiten Methode zu verifizieren, wurden IUR-Assays mit radioaktiv markiertem Imatinib durchgeführt. Die radioaktive Markierung von Imatinib mit einem ^{14}C -Atom erlaubt dabei eine sehr sensitive Bestimmung von extrazellulären und intrazellulären Imatinib-Konzentrationen. Der Nachweis von radioaktiv markierten Substanzen mittels IUR-Assay ist eine akzeptierte und vielfach angewendete Methode um TKI-Konzentrationen zu bestimmen (White et al., 2006; Giannoudis et al., 2008; Hiwase et

al., 2008, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden K562 Zellen für 2 Stunden mit 25 μM ^{14}C -Imatinib inkubiert, gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem *Wash Out* wurden sowohl der Zellkulturüberstand als auch die K562 Zellen auf vorhandene ^{14}C -Imatinib-Konzentrationen analysiert. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der ^{14}C -Imatinib-Konzentration im Zellkulturmedium, hervorgerufen durch die Freisetzung von Imatinib aus den Zellen (s. Abb. S. 92). Es wurde 120 Minuten nach Mediumaustausch eine Konzentration im klinisch relevanten Bereich von 0,53 μM Imatinib detektiert (Druker et al., 2001; Peng et al., 2004). Diese Daten bestätigen die erhobenen HPLC-Daten.

Bei der Betrachtung der Daten fiel weiterhin auf, dass direkt nach dem *Wash Out* (0 Minuten) ^{14}C -Imatinib im Medium zu detektieren war, was die Frage eines konstanten Efflux der Substanz aus der Zelle aufwarf. Um zu prüfen, ob ein konstanter Efflux von Imatinib aus den Zellen stattfindet, wurden diese nach der Kurzzeit-Inkubation von 25 μM ^{14}C -Imatinib einer Waschprozedur von 4 PBS-Waschschritten unterzogen. Das PBS wurde auf Rückstände von ^{14}C -Imatinib hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Menge an ^{14}C -Imatinib nach dem zweiten Waschvorgang signifikant verringert wurde. Die Erweiterung der Waschprozedur auf 3 bzw. 4 Waschschritte führte jedoch nicht zu einer weiteren signifikanten Reduktion der ^{14}C -Imatinib-Konzentration in diesem zum Waschen verwendeten PBS. Auch nach dem vierten Waschschritt war noch ^{14}C -Imatinib im PBS detektierbar (s. Abb. S. 96). Dies lässt auf einen kontinuierlichen Efflux von Imatinib aus den Zellen schließen. Ein dauerhafter Ausstrom von Imatinib aus den Zellen würde auch erklären, warum in der 0 Minuten Probe des *Wash Outs* Imatinib nachweisbar war (s. Abb. S. 92). Bislang sind lediglich aktive Transportvorgänge bekannt, die den Efflux von Imatinib vermitteln können (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Hegedus et al., 2009; Hiwase et al., 2010). Dabei sind vor allem ABC-Transporter in der Lage den Transport von Tyrosinkinase-Inhibitoren aus den Zellen zu vermitteln. Für K562 Zellen ist jedoch aus eigenen Experimenten (s. Abb. S. 85) sowie aus der Literatur bekannt, dass sie keine Expression der Transporter ABCB1, ABCC1 oder ABCG2 aufweisen (Scharenberg, 2002; Thomas et al., 2004; Hegedus et al., 2009), somit ist von einem unbekanntem gegebenenfalls auch passiven Mechanismus für den Imatinib-Efflux auszugehen.

5.5 Modulation der intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor-Konzentration

Den *ATP binding cassette* (ABC-)Transportern kommt eine Barrierefunktion an der zellulären Membran zu, da sie die Bioverfügbarkeit verschiedener Substanzen einschränken. Die Expression der Transporterproteine ist daher besonders hoch im Darm, der Leber, in den Nieren sowie in primitiven hämatopoetischen Stammzellen (Zhou et al., 2001; Scharenberg, 2002; Jordanides et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass die ABC-Transporter in der Lage sind den Efflux von Imatinib, Dasatinib sowie Nilotinib zu vermitteln (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Hiwase et al., 2008; Hegedus et al., 2009) wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht in wie weit die intrazelluläre Akkumulation der Tyrosinkinase-Inhibitoren durch die Expression von spezifischen ABC-Transporterproteinen moduliert werden kann. Die Überprüfung der verwendeten Zelllinien K562, K562-ABCB1 sowie K562-ABCG2 auf die Oberflächenexpression der Transporterproteine zeigte, dass parentale K562-Zellen nur eine geringe endogene Expression der Transporter aufwiesen, was im Einklang mit bereits publizierten Daten steht (Scharenberg, 2002; Thomas et al., 2004; Hegedus et al., 2009). Die Transporterprotein überexprimierenden Zelllinien waren deutlich positiv für das jeweilige Transporterprotein (s. Abb. S. 85).

Die folgende Kurzzeit-Inkubation mit 25 μM Imatinib machte deutlich, dass die Expression von ABCB1 sowie von ABCG2 in K562-Zellen vor Apoptoseinduktion nach HD-Imatinib schützt (s. Abb. S. 86). Die Transporterprotein überexprimierenden Zelllinien wiesen im Vergleich zu K562 Zellen signifikant erniedrigte Apoptoseraten auf. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit publizierten Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass Imatinib in niedrigen Konzentrationen sowohl ein Substrat von ABCB1 als auch von ABCG2 ist (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Dohse et al., 2010). Bei Dauerbehandlung mit 25 μM Imatinib zeigten sich in K562-ABCB1 Zellen deutlich erhöhte Apoptoseraten, während in K562-ABCG2 Zellen auch hier noch signifikant geringere Apoptoseraten im Vergleich zu K562 Zellen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. S. 86). Der ABCB1-vermittelte Transport scheint somit bei Dauerinkubation mit hohen Imatinib-Konzentrationen durch diese inhibiert zu werden. Die Daten der Dauerinkubation von K562-ABCG2-Zellen legen den Schluss nahe, dass ABCG2 ein effizienter Transporter für Imatinib ist. Insgesamt ist die Datenlage über den ABCG2-vermittelten Transport von Imatinib jedoch nicht eindeutig. Die Arbeitsgruppe von Houghton *et al.* konnte zum ersten Mal beschreiben, dass Imatinib mit ABCG2 interagiert, jedoch kein Substrat ist (Houghton, 2004). Eine andere Arbeitsgruppe konnte den Transport von Imatinib durch ABCG2 nachweisen. Die Expression von ABCG2 führte hier zu einer erniedrigten intrazellulären Konzentration von Imatinib (Burger et al., 2004). Jordani-

des *et al.* konnten in hämatopoetischen CML-Vorläuferzellen (CD34⁺-CML-Zellen) zeigen, dass eine Konzentration von 5 μM Imatinib inhibitorisch auf ABCG2 wirkt und dass Imatinib nicht durch ABCG2 transportiert wird (Jordanides et al., 2006). Brendel *et al.* konnten in murinen hämatopoetischen Stammzellen zeigen, dass eine Konzentration von 1 μM Imatinib bereits eine Inhibition des ABCG2-Transporters auslöst (Brendel et al., 2007).

Um die Relevanz der beiden Transporterproteine ABCB1 und ABCG2 für den Imatinib-Efflux in der vorliegenden Arbeit zu klären, war es entscheidend die Transporter selektiv pharmakologisch hemmen zu können. Zur Inhibition von ABCB1 wurde daher PSC833 in einer Konzentration von 10 μM verwendet. Die Wirkung von PSC833 auf den ABCB1-vermittelten Transport konnte bereits in einer Vielzahl von Publikationen gezeigt werden (Hiwase et al., 2008, 2010; Davies et al., 2009; Hegedus et al., 2009). Für die Inhibition des ABCG2-vermittelten Transports war Verapamil als Inhibitor gut charakterisiert (Scharenberg, 2002; Brendel et al., 2007; Dohse et al., 2010). Es zeigte sich, dass die Inhibition von ABCB1 durch PSC833 zu einer deutlichen Sensitivierung von K562-ABCB1 Zellen gegenüber einer Dauerinkubation von 0,25 μM Imatinib führt, während Verapamil keine Wirkung auf die Sensitivität der K562-ABCG2 Zellen gegenüber Imatinib erzielte (s. Abb. S. 87). Ein zytotoxischer Effekt von PSC833 auf K562 sowie auf K562-ABCB1 Zellen konnte ausgeschlossen werden (s. Abb. S. 87). PSC833 wurde daher für die Inhibition des ABCB1-vermittelten Transports eingesetzt. Die K562-ABCB1 Zellen wurden im weiteren Verlauf auf die Auswirkungen der Kurzzeit-Inkubation von 25 μM Imatinib untersucht. In Gegenwart von PSC833 zeigten die K562-ABCB1 Zellen hohe Apoptoseraten, während in der Abwesenheit von PSC833 kaum apoptotische Zellen zu detektieren waren. In K562 Zellen zeigte die Inkubation von PSC833, wie erwartet keine Wirkung (s. Abb. S. 89). Diese Beobachtungen stimmen mit bereits publizierten Daten überein, die zeigen, dass die Expression eines ABC-Transporters die intrazelluläre Konzentration der Inhibitoren senkt und diese nach Inhibition des Transporters ansteigt (Brendel et al., 2007; Hiwase et al., 2008; Davies et al., 2009).

Zur Quantifizierung der Reduktion der intrazellulären Akkumulation von Imatinib durch ABC-Transportproteine wurden K562-ABCB1, K562-ABCG2 sowie K562 Zellen für 2 Stunden mit 25 μM ¹⁴C-Imatinib inkubiert gefolgt vom *Wash Out* mit PBS. An verschiedenen Zeitpunkten nach dem Entfernen von ¹⁴C-Imatinib wurden sowohl die Zellen als auch der Zellkulturüberstand auf die vorhandene ¹⁴C-Imatinib-Konzentration analysiert. Im Vergleich zu K562 Zellen wiesen sowohl K562-ABCB1 als auch K562-ABCG2 Zellen zu jedem analysierten Zeitpunkt geringere intrazelluläre Imatinib-

Konzentrationen auf, was den Transport von Imatinib durch ABC-Transporter bestätigt. In den Zellkulturüberständen konnte für die K562-ABCG2 sowie für K562-ABCB1 Zellen zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zu K562 Zellen eine niedrigere Konzentration detektiert werden (s. Abb. S. 92). Insgesamt ließen sich jedoch nur für die K562-ABCG2 Zellen bzw. für die Überstände dieser Zellen signifikante Veränderungen zu den K562 Zellen feststellen. Diese erhobenen Daten stehen im Einklang mit bereits publizierten Daten, die zeigen konnten, dass Imatinib sowohl über den ABCB1- als auch über den ABCG2-Transporter aus den Zellen transportiert werden kann (Dai et al., 2003a; Mahon et al., 2003; Burger et al., 2004, 2005; Giannoudis et al., 2008; Dohse et al., 2010). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von ABCB1 die intrazelluläre Imatinib-Konzentration senkt (Widmer et al., 2003; Illmer et al., 2004). Eine Dauerinkubation von 25 μM ^{14}C -Imatinib führte in K562-ABCB1 sowie in K562-ABCG2 Zellen zu einer geringeren intrazellulären Konzentration im Vergleich zu K562 Zellen (s. Abb. S. 94). Dieser Unterschied war ebenfalls nur für K562-ABCG2 Zellen signifikant. Aufgrund der Tatsache, dass für K562-ABCB1 Zellen keine Signifikanz festgestellt werden konnte, wurde untersucht in wie weit es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Transporters durch Imatinib kommt. Bereits bei der Betrachtung der Dauerinkubation von 25 μM Imatinib auf K562-ABCB1 Zellen, wurde eine Hemmung des Transporters durch hohe Imatinib-Konzentrationen vermutet (s. Abb. S. 86). Es konnte gezeigt werden, dass bei Konzentrationen von 2,5 μM sowie 0,25 μM ^{14}C -Imatinib der ABCB1-Transporter in der Lage ist die Imatinib-Konzentration im Vergleich zu K562-Zellen effektiv zu senken. Bei einer Konzentration von 25 μM ^{14}C -Imatinib konnten nur sehr geringe Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden (s. Abb. S. 95), was dafür spricht, dass diese Konzentration eine inhibitorische Wirkung hat. Neben diesen Daten gibt es zahlreiche Publikationen, die belegen, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition von ABCB1 sowie von ABCG2-Transportern durch Imatinib kommt (Hamada et al., 2003; Jordanides et al., 2006; Brendel et al., 2007).

Insgesamt zeigen die Daten der Transporterprotein-überexprimierenden Zellen, dass die analysierten Transporter in der Lage sind die intrazelluläre Konzentration in den Zellen zu senken. Dies belegt zum einen, dass Imatinib ein Substrat der beiden Transporter ist. Zum anderen machen die Daten der Kurzzeit-Inkubation deutlich, dass die intrazelluläre Imatinib-Konzentration verantwortlich ist für die Apoptoseinduktion. Es ist bekannt, dass auch Dasatinib und Nilotinib von ABC-Transporterproteinen transportiert werden können (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Giannoudis et al., 2008; Dohse et al., 2010; Hiwase et al., 2010). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von ^{14}C -Dasatinib und ^{14}C -Nilotinib konnten die Experimente mit den Trans-

porterprotein-exprimierenden Zelllinien lediglich für Imatinib durchgeführt werden. Bereits veröffentlichte Arbeiten lassen jedoch vermuten (Burger et al., 2004; Brendel et al., 2007; Hiwase et al., 2008; Hegedus et al., 2009), dass die Kurzzeit-Inkubation hoher Dasatinib- bzw. Nilotinib-Konzentrationen zu vergleichbaren Ergebnissen geführt hätte. Auch hier könnte die erniedrigte intrazelluläre Konzentration der TKI durch die ABC-Expression erreicht werden, was ebenfalls in einer verminderten Apoptoserate nach Kurzzeit-Inkubation von hohen TKI-Konzentrationen resultieren würde. Dabei bleibt zu bedenken, dass Nilotinib als sehr potenter Inhibitor für ABCB1 und ABCG2 beschrieben ist (Dohse et al., 2010).

Zusammengefasst zeigt das hier vorgestellte *in vitro* Modell der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation ein bislang nicht bekanntes pharmakokinetisches Zusammenspiel zwischen der TKI-Konzentration im extrazellulären Medium und der intrazellulären TKI-Konzentration. Die in diesem Teil der Arbeit erhobenen Daten belegen, dass die Ursache der Apoptoseinduktion nach kurzzeitiger Hochdosis TKI-Inkubation die intrazelluläre Akkumulation der Inhibitoren ist. Die protrahierte zelluläre TKI-Exposition resultiert in einer kontinuierlichen Kinaseinhibition verbunden mit einer langsamen Freisetzung der TKI in das Zellkulturmedium, was zur Induktion von Apoptose führt. Die von Shah *et al.* aufgestellte Hypothese, dass eine potente transiente Inhibition der Onkogen-mutierten Kinase ausreichend ist, um Apoptose in den Zellen auszulösen (Shah et al., 2008b), erscheint somit widerlegt.

6 Ausblick

Die in diesem Teil der Arbeit erhobenen Daten liefern die Rationale für das Design von Inhibitoren, die in der Zelle akkumulieren und zurückgehalten werden. Zukünftig könnten daher auch Inhibitoren trotz kurzer Serumhalbwertszeit Eingang in die Therapie maligner Erkrankungen finden, wenn sie in der Lage sind langanhaltende intrazelluläre Wirkspiegel zu erreichen. Eventuell sollte bereits in frühen klinischen Phasen ein breites Spektrum an Dosierungen und Dosierungsintervallen in Betracht gezogen werden, besonders wenn aufgrund von pharmakokinetischen Profilen eine kontinuierliche Medikamentenexposition nicht erreichbar erscheint. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Substanzen mit kurzen Serum-Halbwertszeiten nicht notwendigerweise eine schlechte klinische Effektivität besitzen (Shah et al., 2008a). Aufgrund der vorliegenden Daten wäre es weiterhin denkbar, eine Kombination von Tyrosinkinase-Inhibitoren und Substanzen, welche in der Lage sind die Inhibitoren intrazellulär zu retinieren, präklinisch und klinisch zu testen. Im Bereich der Infektionsbehandlung konnte nachgewiesen werden, dass die einmal tägliche hochdosierte Behandlung mit Aminoglyko-

siden im Vergleich zur mehrmals täglichen Gabe in Bezug auf die Bakterizidie mindestens gleich effektiv ist und zudem mögliche Toxizitäten minimiert (Nicolau et al., 1995). Hochdosis Applikationen von Tyrosinkinase-Inhibitoren können ebenfalls die auftretenden Nebenwirkungen reduzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hohe TKI-Konzentrationen Nebenwirkungen wie hämatologische und gastrointestinale Effekte, Pleura-Ergüsse und Kopfschmerzen minimieren (Talpez et al., 2006; Shah et al., 2008a). Die Daten dieser Arbeit liefern somit neue Hinweise für die zukünftige klinische Entwicklung sowie die Evaluation von Inhibitoren in der Behandlung von CML und anderen hämatologischen Erkrankungen. Dabei sollten Daten sowohl zur Pharmakokinetik im Plasma, als auch zur intrazellulären TKI-Konzentration erhoben werden. Letztlich ist die effektiv erreichbare Konzentration einer Substanz in der Zelle entscheidend für die zu erzielende therapeutische Wirkung.

Die Teil I der Arbeit erhobenen Daten lassen weiterhin die Möglichkeit zu, dass für das Monitoring von Patienten unter TKI-Therapie im Rahmen klinischer Studien zukünftig die Phosphorylierung von STAT5 als Surrogatparameter für die Onkogenaktivität verwendet werden könnte. STAT5 erwies sich in dieser Arbeit als sensitiver Marker für die Präsenz von TKI und das Überleben von Zellen unter TKI-Therapie. Weiterhin stehen für den Nachweis der Phosphorylierung von STAT5 gute Antikörper zur Verfügung, die eine schnelle Analyse mittels Durchfluss-Zytometrie ermöglichen.

Die erhobenen Daten wurden kürzlich als Manuskript mit dem Titel „*Intracellular retention of ABL kinase inhibitors determines commitment to apoptosis in CML cells*“ zur Veröffentlichung eingereicht.

Teil II

Abstract

Acute myeloid leukemia is often associated with mutations within the *FLT3* gene. Two types of FLT3 mutations can be distinguished, juxtamembrane internal tandem duplications (ITD) and point mutations. Recently, it was demonstrated that ITDs can also integrate in tyrosine kinase domain 1 (TKD1-ITD). Prognosis for patients with TKD-ITDs is worse. The FLT3-ITD-627E receptor is a prototype for TKD1-ITD mutations. So far it was unknown whether the transforming phenotype of FLT3-ITD-627E can be mediated without kinase activity. The expression of FLT3-ITD-627E and of kinase dead FLT3-ITD-627E constructs in murine hematopoietic Ba/F3 cells identified activation of FLT3 receptor and downstream signaling, factor independent growth as well as colony formation for kinase active construct, only. Thus, the data provide evidence that full active kinase is essential for transforming phenotype of FLT3-ITD-627E. Furthermore, FLT3-ITD-627E expressing cells revealed differential sensitivity towards treatment with FLT3 tyrosine kinase inhibitor Midostaurin. In respect to a possible activation of NF κ B via FLT3-ITD a translocation of p65 to the nucleus was detected in FLT3-ITD as well as in FLT3-ITD-627E expressing Ba/F3 cells. A siRNA mediated knock down of p65 in both cell lines suggested significant relevance of ITD expressing cells on p65 for survival during midostaurin exposure. Taken together these data help to deeper understand the biology of TKD-ITDs of FLT3.

Die akute myeloische Leukämie ist häufig mit dem Auftreten von Mutationen im *FLT3* Gen assoziiert. Es könnten zwei verschiedene Mutationsarten unterschieden werden, juxtamembranäre interne Tandem Duplikationen (ITD) und Punktmutationen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ITDs auch in die Tyrosinkinase-Domäne 1 integrieren können (TKD1-ITD). Die Prognose für Patienten mit einer TKD1-ITD ist schlecht. Der FLT3-ITD-627E Rezeptor ist ein Prototyp für TKD1-ITD-Mutationen. Bislang war unbekannt ob der transformierende Phänotyp von FLT3-ITD-627E eventuell auch ohne Kinaseaktivität des FLT3 Rezeptors vermittelt werden kann. Die Expression des FLT3-ITD-627E und des *kinase dead* FLT3-ITD-627E Konstrukts in murinen hämatopoetischen Ba/F3 Zellen zeigte eine Aktivierung des FLT3-Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege, faktor-unabhängiges Wachstum sowie die Koloniebildung nur für das Konstrukt mit aktiver Kinase. Folglich geben die Daten Hinweise darauf, dass die Kinaseaktivität essentiell für den transformierenden Phänotyp von FLT3-ITD-627E ist. Zusätzlich konnte eine differentielle Sensitivität der FLT3-ITD-627E Zellen gegenüber einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Midostaurin festgestellt werden. In Bezug auf eine mögliche Aktivierung von NF κ B durch FLT3-ITD konnte eine Translokation von p65 in den Kern in FLT3-ITD und FLT3-ITD-627E exprimierenden Zellen detektiert werden. Ein siRNA-vermittelter *knock down* von p65 in beiden Zelllinien legt eine Relevanz von p65 für das Überleben der Zellen unter Midostaurin Exposition nahe.

Zusammenfassend tragen diese Daten zu einem besseren Verständnis der Biologie von TKD1-ITD-Mutationen des FLT3-Rezeptors bei.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Zellen sind der Lage auf exogene und endogene Stimuli zu reagieren. Dazu besitzen sie je nach Differenzierungszustand ein intrazelluläres Netzwerk an Signaltransduktionswegen. Die Adaptation an die Stimuli erfolgt durch Regulation der Genexpression entsprechender Zielgene. Durch die Expression der Zielgene können die Zellen verschiedene Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben oder Apoptose aktivieren. Der Ablauf dieser Signaltransduktion ist streng reguliert. Ist die Signaltransduktion gestört können die Zellen die Fähigkeit zu unkontrollierten Wachstum und Differenzierung erlangen. Proteine, die an promitotischen Vorgängen beteiligt sind, werden auch als Protoonkogene bezeichnet. Sind diese Proteine von Mutationen betroffen, die zu einer dauerhaften Aktivierung führen, können maligne Erkrankungen entstehen. Aus Protoonkogenen werden dann Onkogene, die die Onkogenese durch konstitutive Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden vorantreiben.

Die Übertragung extrazellulärer Signale in die Zelle erfolgt mit Hilfe von transmembranären Rezeptoren, die auf der intrazellulären Seite sehr häufig über Proteinkinasen die Signale weiterleiten. Die Rezeptor-Tyrosinkinasen (**RTK**) weisen dazu eine Kinasedomäne auf, die es ihnen ermöglicht, bestimmte Tyrosin-Reste (**Y**) innerhalb des Rezeptors zu autophosphorylieren. Diese phosphorylierten Reste dienen im Folgenden als Bindungsstellen für Adapterproteine. Die Bindung an den Rezeptor wird vermittelt von hoch konservierten SH2- oder PTB-Domänen dieser Adapterproteine. Nach der Bindung an den Rezeptor werden durch die intrinsische Kinaseaktivität des Rezeptors Phosphatreste auf diese Proteine übertragen. Die phosphorylierten Adapterproteine treten in der Folge mit intrazellulären Signalmolekülen in Wechselwirkung. Das extrazelluläre Signal wird somit intrazellulär weitergeleitet.

Proteinkinasen sind in der Lage Adenosintriphosphat (**ATP**) zu hydrolysieren und den γ -Phosphatrest auf die Hydroxylgruppe von Substraten zu übertragen. Aufgrund ihrer Substratspezifität werden die Proteinkinasen in drei Gruppen unterteilt. Eine Übertragung von Phosphat auf die Hydroxylgruppe von Serin- oder Threoninresten wird von Serin-Threonin-Kinasen vermittelt. Wird das Phosphat auf Tyrosin-Reste übertragen spricht man von Tyrosinkinasen. Ca. 2% aller Gene im eukaryotischen Genom kodieren für 518 Proteinkinasen, deren Summe auch als Kinom bezeichnet wird. Insgesamt 90 dieser Kinasen sind Tyrosinkinasen, wobei 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen und 32 zytoplasmatische Tyrosinkinasen unterschieden werden können (Manning, 2005; Cowan-Jacob, 2006).

1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase FLT3

Der *fms like tyrosine kinase 3* (**FLT3**)-Rezeptor gehört zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Kommunikation von unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen. Das FLT3-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 13q12 lokalisiert. Das FLT3-Protein besteht aus 993 Aminosäuren, wobei verschiedene Isoformen von FLT3 exprimiert werden. Zum einen die unreife lösliche Form mit einer Größe von 130 kDa, sowie eine reife membrangebundene Form mit einer Größe von 160 kDa (Brasel et al., 1995). Die FLT3-Expression beschränkt sich vor allem auf frühe hämatopoetische CD34⁺-Progenitoren (Rosnet et al., 1996; Lyman and Jacobsen, 1998). Der Ligand des FLT3-Rezeptors (**FL**) hingegen ist nicht nur in hämatopoetischen Organen exprimiert, sondern auch in peripheren mononukleären Blutzellen, die sogar die höchste Expression an FL aufweisen (Brasel et al., 1995). Die Aktivierung des FLT3-Rezeptors durch Bindung seines Liganden führt zur Erhaltung der normalen Hämatopoese sowie der Expansion von CD34⁺-Zellen. Zur optimalen FLT3-Funktion jedoch werden weitere Wachstumsfaktoren wie *stem cell factor* (**SCF**) und Interleukin-3 (**IL-3**) benötigt (Rusten et al., 1996; Shah et al., 1996).

FLT3 ist eine transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase und gehört zur Klasse III der RTK-Familie. Zur RTK-Familie III gehören neben FLT3, auch **CSF1R** (*colony stimulating factor receptor*), **PDGFR α , β** (*platelet derived growth factor receptor*) und KIT. Alle fünf Rezeptoren weisen eine homologe Funktion auf (Yarden et al., 1986; Rosnet et al., 1991). Als Mitglied der RTK-III-Familie besitzt auch FLT3 den charakteristischen Aufbau, den alle Rezeptoren dieser Klasse aufweisen. Der Rezeptor besteht extrazellulär aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Bindungsstellen für den Liganden, gefolgt von einer transmembranären Domäne. Intrazellulär schließen sich eine Juxtamembran-Domäne (**JM**) sowie die beiden Tyrosinkinase-Domänen (**TKD1** und **TKD2**) an, welche über ein Kinase-Insert miteinander verbunden sind (Agnès et al., 1994). Die ATP-Bindungstasche befindet sich in der TKD1-Domäne, während sich die katalytische Kinaseschleife sowie die Aktivierungsschleife in der TKD2 befinden.

Nach Bindung des FLT3-Liganden an die extrazelluläre Domäne kommt es zur Homodimerisierung und Konformationsänderung des Rezeptors. Durch diese Veränderungen gelangen intrazellulär die Tyrosinkinase-Domänen in enge räumliche Nähe, was zur Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste führt. Innerhalb des FLT3-Rezeptors sind 22 mögliche Phosphorylierungsstellen bekannt (Ishiko et al., 2005). Die Phosphorylierung an Tyrosin 842 bewirkt die Stabilisierung des Rezeptors in seiner offenen Form (Griffith et al., 2004). Die Kinaseaktivität des FLT3-Rezeptors ist streng durch die JM-Domäne reguliert. Kristallstruktur-Analysen des Rezeptors konnten zeigen, dass die

ATP-Bindungstasche der TKD1 durch hydrophobe Interaktionen mit der JM-Domäne blockiert wird, was den Rezeptor in einem inaktiven Zustand hält. Zusätzlich sind die Aktivierungsschleifen der TKD2 im Kinase-Insert eingebettet, was ebenfalls eine Aktivierung verhindert. Die Phosphorylierung an den juxtamembranären Tyrosinen 589, 591 sowie 599 führt vermutlich zur Konformationsänderung und zum Verlust der inhibitorischen Funktion dieser Domäne (Griffith et al., 2004). Erst danach kann FLT3 nachgeschaltete Signalwege aktivieren und somit eine Signalweiterleitung ins Zellinnere erfolgen.

1.2.1 Genetische Aberrationen des FLT3-Rezeptors und ihre Bedeutung bei leukämischen Erkrankungen

Eine hohe FLT3-Expression ist verbunden mit einer Vielzahl an hämatologischen Erkrankungen. Die Mehrheit der Patienten mit einer akuten lymphozytischen Leukämie (**ALL**) oder einer akuten myeloischen Leukämie (**AML**) weisen eine starke FLT3-Expression in den Blasten auf. Ebenfalls konnte für die chronisch myeloische Leukämie (**CML**) und die Myelodysplasie eine verstärkte FLT3-Expression nachgewiesen werden (Rosnet et al., 1996). Diese Daten geben Hinweise darauf, dass eine hohe FLT3-Expression für das Überleben der leukämischen Blasten eine Rolle spielt. In verschiedenen hämatologischen Erkrankungen können aktivierende Mutationen von FLT3 auftreten. Dabei treten bei 3% der ALL-Patienten und 10% der Patienten mit Myelodysplasie sowie 25-45% der AML-Patienten Mutationen im *FLT3*-Gen auf (Rosnet et al., 1996). Damit gehört das *FLT3*-Gen zu denen am häufigsten mutierten Genen bei der AML.

Bei der AML lassen sich zwei Arten von FLT3-Mutationen unterscheiden. Zum einen sind es Punktmutationen in der TKD, wobei Kodon 835 am häufigsten betroffen ist. Diese Mutation ist in 7-10% aller AML-Fälle zu finden und führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit seines Liganden (Abu-Duhier et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Kayser et al., 2009). Weitere Punktmutationen konnten am Kodon 836, 840, 841 und 842 detektiert werden (Spiekermann et al., 2002; Thiede et al., 2002; Kindler et al., 2005). Die häufigste Form der FLT3-Mutation ist jedoch die interne Tandem Duplikation (Nakao et al., 1996). Diese entsteht durch Duplikation einer kodierenden Sequenz, die anschließend in *head-to-tail* Orientierung in die ursprüngliche Sequenz eingebaut wird. Die Länge der duplizierten Sequenz kann zwischen 15-180 bp variieren, der Leserahmen wird dabei immer aufrecht gehalten. Die meisten ITD-Mutationen integrieren in Exon 14 und 15 des *FLT3*-Gens (Kayser et al.,

2009). Die Integration der Längenmutation erfolgt zu 70% in die juxtamembranäre Domäne des Rezeptors (**JM-ITD**), meist zwischen Aminosäure 572 und 609. Dabei wird die autoinhibitorische Funktion der Domäne zerstört, was zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führt (Fenski et al., 2000; Kelly et al., 2002; Kiyoi et al., 2002). Kürzlich wurde eine neue Klasse von ITD-Mutationen identifiziert, die in nicht-juxtamembranäre Bereiche wie die Tyrosinkinase-Domäne 1 (**TKD1-ITD**) integrieren. Im Rahmen einer Studie wurden Integrationsstellen von FLT3-ITD positiven Patienten verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass 27,3% der Patienten eine ITD in der TKD1-Domäne des FLT3-Rezeptors aufweisen. Innerhalb der TKD1 konnten drei Subdomänen mit ITD-Integration unterschieden werden: 24% ereignen sich in der β 1-Schleife (Kodon 610-615), 1,3% in der β 2-Schleife (Kodon 624-630) und ca. 2% in der Nukleotid-Bindungsschleife (Kodon 616-623). Ein Prototyp dieser neuen Mutationsklasse stellt der FLT3-ITD-627E-Rezeptor mit einer Integrationsstelle in die β 2-Schleife dar. In der myeloischen Zelllinie 32D konnte gezeigt werden, dass die FLT3-ITD-627E-Expression zu einer konstitutiven Rezeptoraktivierung führt (Breitenbuecher et al., 2009b).

In Bezug auf den Verlauf einer AML-Erkrankung lässt sich feststellen, dass FLT3-ITD-Mutationen einen prognostisch schlechten Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten darstellen (Abu-Duhier et al., 2000). Eine aktuelle Analyse von 241 Patienten mit einer FLT3-ITD zeigte, dass TKD1-ITDs mit einer nochmal schlechteren Prognose der Patienten assoziiert sind, sowohl für das Gesamtüberleben sowie das Rückfallfreie-Überleben (Kayser et al., 2009).

1.2.2 Signaltransduktion des mutierten FLT3-Rezeptors

Die Integration einer ITD in den FLT3-Rezeptor führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors. Es kommt zu einer Phosphorylierung verschiedener Tyrosine wie zum Beispiel Y589, Y591 und Y599 (Heiss et al., 2006; Razumovskaya et al., 2009). Y589 und Y599 wurden als Bindungspartner für *src-family-kinasen* (**SFK**) identifiziert (Heiss et al., 2006). Aber auch Y768, Y955 und Y969, welche als Bindungsstelle für GRB-2 bekannt sind (Schmidt-Arras et al., 2004), werden durch FLT3-ITD phosphoryliert. Weiterhin ist bekannt, dass auch SHC, CBL und CBLB direkt an den FLT3-Rezeptor binden (Lavagna-Sévenier et al., 1998; Marchetto et al., 1999). Die Bindung der Adapterproteine gibt die Möglichkeit zur Ausbildung von Signaltransduktionskomplexen, welche in einer Aktivierung von nachgeschalteten Signalwegen resultieren. GRB-2 kann durch Bindung von SOS die RAS/ RAF/ MEK/ ERK Kaskade aktivieren. Über die Bindung von GAB-2 an GRB-2 wird Phosphoinositol-3-Kinase (**PI3K**) aktiviert, was in

der Phosphorylierung von AKT resultiert. Auch STAT5 wird direkt durch Bindung an GAB-2 aktiviert (Schmidt-Arras et al. , 2004; Brandts et al. , 2005; Choudhary et al. , 2007b; Masson et al. , 2009). Eine Übersicht über die Signaltransduktion des FLT3-ITD-Rezeptors gibt Abbildung 45. Zelleigene Regulationsmechanismen, wie die SOCS-Proteine 1 und 3 (*suppressor of cytokine signaling*) sind nachweislich nicht mehr in der Lage die Signaltransduktion des FLT3-ITD-Rezeptors zu inhibieren (Choudhary et al., 2007). Die konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionswege führt zur Aktivierung von Zielgenen wie *PIM-1*, *CDC25C* und *BAD*, denen eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklus-Regulation zukommt. Weiterhin werden antiapoptotische Proteine wie BCL-2 hochreguliert (Choudhary et al., 2007; Irish et al., 2007). Die Aktivierung dieser Zielgene bewirkt eine hohe Proliferationsrate und schützt die Zellen vor Apoptose.

Die FLT3-ITD-Mutation führt im zellulären Rekonstitutionsmodell aufgrund der Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege zu Faktor-unabhängigem Wachstum und zu klonalem Wachstum mit der Ausbildung von Kolonien im Weichagar (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002).

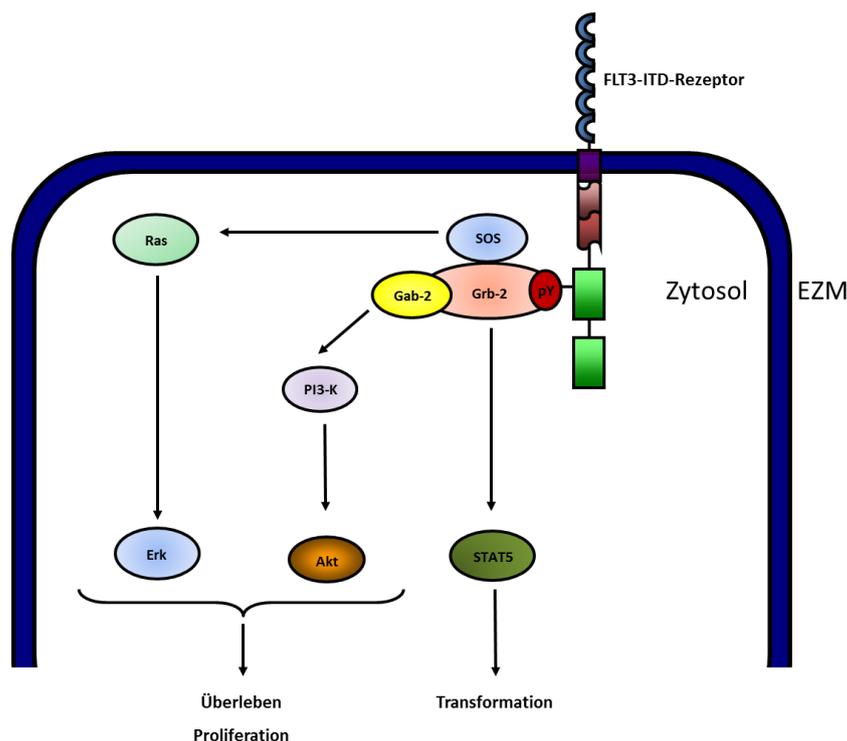


Abbildung 45: Die Signaltransduktion des FLT3-ITD-Rezeptors.

Der transmembranäre FLT3-Rezeptor ragt sowohl in die extrazelluläre Matrix (EZM), als auch ins Zytosol der Zellen. Unabhängig von der Ligandenbindung ist der FLT3-ITD-Rezeptor konstitutiv aktiv, was in der Ausbildung von rezeptornahen Signaltransduktionskomplexen aus GRB-2, GAB-2 und SOS resultiert. Diese Komplexe bieten Bindungsstellen für weitere Proteine, die somit aktiviert werden können. Die Aktivierung von ERK und AKT steuert das Zellüberleben und die Proliferation, STAT5 hingegen ist entscheidend für onkogene Transformation.

1.2.3 Der FLT3-ITD-627E-Rezeptor

Die Integration einer ITD an der Aminosäureposition 627 von FLT3 stellt ein Novum bei den bisher beschriebenen ITD-Integrationen dar. Die FLT3-ITD-627E-Mutation ist die erste im Detail untersuchte ITD, die in der nicht-juxtamembranären Domäne lokalisiert ist. Diese ITD wurde bei einem AML-Patienten mit rezidiviertem Krankheitsverlauf gefunden. Die Integration dieser ITD, welche 31 Aminosäuren lang ist, führt zusätzlich an der Integrationsstelle im β 2-Blatt der TKD1 zu einer Substitution von Alanin (**A**) zu Glutaminsäure (**E**) und wird daher als 627E bezeichnet (Breitenbuecher et al., 2009a). Zur Charakterisierung dieser TKD1-ITD wurde ein zelluläres 32D-Rekonstitutionsmodell generiert. Die Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors ist in diesem Zellsystem konstitutiv und kann durch Behandlung mit Midostaurin, einem FLT3-Inhibitor, reduziert werden. Die Analyse der nachgeschalteten Signaltransduktionswege des FLT3-ITD-627E-Rezeptors ergab eine dauerhafte Aktivierung von STAT5 und AKT, die ebenfalls durch Midostaurin-Exposition inhibiert werden konnte. Ebenso konnte eine konstitutive Aktivierung von ERK detektiert werden, welche unter Midostaurin-Behandlung jedoch nicht reguliert wurde. Diese Aktivierung schien unabhängig von der Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors zu sein. Dieses Ergebnis lieferte einen ersten Hinweis, dass JM-ITDs und TKD1-ITDs eine unterschiedliche Signaltransduktion aufweisen könnten (Breitenbuecher et al., 2009b). Die biologische Konsequenz der FLT3-ITD-627E-Mutation betreffend, wurde eine starke Hochregulation des antiapoptischen Proteins MCL-1 festgestellt. Während der Midostaurin-Behandlung änderten sich die MCL-1 Proteinlevel nicht und verliehen der Zelllinie daher eine Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose (Breitenbuecher et al., 2009b).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der FLT3-ITD-627E-Rezeptor sich durch eine abnormale Bindung des Adapterproteins GRB-2 auszeichnet. Es gibt Hinweise darauf, dass GRB-2 auch Phosphorylierungs-unabhängig an den Rezeptor binden könnte (Sayos et al., 1998; Yaffe, 2002; Jiang et al., 2006; Song et al., 2006a). Die Bindungsstellen für GRB-2 innerhalb des FLT3-ITD-627E-Rezeptors (pY768, pY955, pY969) wurden nach Midostaurin-Behandlung untersucht und ergaben keine residuale Phosphorylierung, wohl aber zeigte sich unter Midostaurin-Behandlung eine Bindung von GRB-2 an den Rezeptor (Breitenbuecher et al., 2009a, 2009b). Es stellt sich somit die Frage, ob der FLT3-ITD-627E-Rezeptor auch ohne Kinaseaktivität, nur aufgrund der ITD-Integration und über die damit verbundene Veränderung der Struktur, die Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen vermitteln kann.

1.2.4 FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren

Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) sind ein wertvolles Werkzeug in der Behandlung von malignen Erkrankungen. Das Wirkprinzip der Inhibitoren ist dabei häufig die Konkurrenz mit ATP an der ATP-Bindungsstasche (Okram et al., 2006). Sind die TKI gebunden, inhibieren sie die enzymatische Aktivität der Kinase und verhindern damit die Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege. Da maligne Zellen im Prozess der onkogenen Transformation vom Onkogen abhängig werden, können die Zellen durch die Inhibition des Onkogens in die Apoptose geleitet werden, was auch als *oncogene addiction* bezeichnet wird (Weinstein, 2002) und einen großen therapeutischen Nutzen birgt.

Bedenkt man den hohen Prozentsatz an FLT3-Mutationen in der AML ist es nicht verwunderlich, dass innerhalb der letzten Jahre eine Vielzahl an FLT3-Inhibitoren in der Präklinik untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition der Autophosphorylierung des FLT3-Rezeptors durch verschiedene Inhibitoren sowohl in Zelllinien als auch in primären AML-Blasten zur Apoptose führte (Levis et al., 2002; Weisberg et al., 2002). Auch im Mausmodell konnte eine mögliche therapeutische Relevanz verschiedener FLT3-Inhibitoren nachgewiesen werden (Kelly et al., 2002; Weisberg et al., 2002). Der FLT3-Inhibitor Midostaurin erwies sich im Zellkulturmodell als besonders effektiv gegenüber FLT3-ITD-Mutationen (Weisberg et al., 2002). Im Rahmen einer klinischen Phase II Studie, die vor allem FLT3-ITD positive Patienten einschließt, wird Midostaurin derzeit getestet. Zusammenfassend zeigten 71% der Patienten eine mindestens 50%ige Reduktion der leukämischen Blasten auf (Fischer et al., 2010). Bei AML-Patienten wurde unter TKI-Therapie jedoch auch beobachtet, dass es zu Punktmutationen innerhalb des *FLT3*-Gens kommt, die zu einer Resistenz gegenüber den eingesetzten Substanzen führen können (Heidel et al., 2006). Die Ausbildung von Punktmutationen sowie weitere mögliche Resistenzmechanismen, stellen eine große Herausforderung bei der TKI-Behandlung aller leukämischen Erkrankungen dar.

1.3 NFκB-Signaltransduktion

Die Rolle des Transkriptionsfaktors „nukleärer Faktor kappa B“ (**NFκB**) als Mediator von Immun- und Entzündungsreaktionen ist gut charakterisiert. Weiterhin beeinflusst der Transkriptionsfaktor die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation. Die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren besteht aus fünf Mitgliedern: RelA (**p65**), RelB, c-Rel, p105/p50, p100/p52. Diese Untereinheiten bilden Heterodimere miteinander aus, wobei das am besten charakterisierte Dimer aus p65 und p50 zusammengesetzt ist (Chen et al., 1998). Klassischerweise wird NFκB im unaktivierten Zustand durch Bindung an seinen Inhibitor IκBα im Zytoplasma retiniert. Die Interaktion zwischen den beiden Proteinen maskiert die Kernlokalisations-Sequenz von NFκB. Nach Bindung des Entzündungsfaktors *tumor necrosis factor* (TNFα) an seinen Rezeptor, werden Kinasen aktiviert, die IκBα phosphorylieren und daher als IκBα-Kinasen (**IKK**) bezeichnet werden. Die Phosphorylierung von IκBα an bestimmten Serin-Resten führt zur Polyubiquitinierung mit anschließender proteosomaler Degradation des Proteins, was die Freisetzung von NFκB zur Folge hat. Der Transkriptionsfaktor kann nun in den Kern transportiert werden und dort die Aktivierung und Regulation von Zielgenen steuern (Neumann and Naumann, 2007). Eine Vielzahl an Zielgenen von NFκB ist bekannt, darunter befinden sich Gene, die für antiapoptotische Proteine wie BCL-XL, IAPs und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-2 und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierende Faktor kodieren. Auch Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin D1 und c-myc gehören zu den durch NFκB regulierten Genen (Van Antwerp et al., 1996; Wang et al., 1996; Bottero et al., 2001). Aufgrund der Vielzahl an Zielgenen, die zur Zellproliferation und dem Überleben der Zellen beitragen, kommt NFκB auch eine Rolle bei der Entstehung von malignen Erkrankungen zu.

Es konnte gezeigt werden, dass NFκB in verschiedenen soliden Tumoren aktiviert ist (Rayet and Gélinas, 1999). Bei hämatologischen Erkrankungen ist NFκB konstitutiv aktiviert wie beispielsweise beim Hodgkin Lymphom (Staudt, 2000), bei der akuten lymphatischen Leukämie (Kordes et al., 2000), beim myelodysplastischen Syndrom und bei der akuten myeloischen Leukämie (Fabre et al., 2007; Grosjean-Raillard et al., 2008).

1.3.1 NFκB-Signaltransduktion bei akuter myeloischer Leukämie

Eine konstitutive Aktivierung von NFκB konnte in Blasten von AML-Patienten nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors über IKK vermittelt wird. Der siRNA-vermittelte *knock down* dieser Kinasen führte im AML-Zellkulturmodell zur Apoptoseinduktion (Grosjean-Raillard et al., 2008).

Über einen Zusammenhang zwischen einer NFκB-Aktivierung und dem Vorliegen einer FLT3-ITD gibt es bislang widersprüchliche Daten. Eine Arbeitsgruppe konnte im humanen Zellkulturmodell zeigen, dass die Inhibition der FLT3-ITD-Mutation zur Inhibition der IKK-Kinasen führt, was in einer Verringerung der NFκB-Level im Kern resultierte (Grosjean-Raillard et al., 2008). Eine andere Arbeit konnte an AML-Blasten zeigen, dass die Aktivierung von NFκB durch die Aktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK- und PI3-K/AKT-Signaltransduktionswegs vermittelt wird. Weiterhin führte eine Stimulation der Blasten mit dem FLT3-Liganden zu einer NFκB-Aktivierung, jedoch konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein einer FLT3-ITD-Mutation und der gleichzeitigen Aktivierung von NFκB hergestellt werden (Birkenkamp et al., 2004). In einer aktuellen Arbeit wurden FLT3-ITD positive Ba/F3-Zellen mit einem STAT3-Inhibitor behandelt, was zu einer Reduktion der NFκB Menge im Zellkern sowie zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen führte. Im unbehandelten Zustand lag überwiegend NFκB im Kern vor. Die Behandlung mit dem Inhibitor jedoch verhinderte die Phosphorylierung von IKKβ und damit die Aktivierung von NFκB. Bei der Kombinationsbehandlung der Zellen mit Midostaurin und STAT3 Inhibitor zeigte sich ein starker synergistischer Effekt, welcher durch hohe Apoptoseraten der Zellen deutlich wurde. (Ahmad et al., 2010).

Insgesamt zeigen die bisherigen Daten zur NFκB-Aktivierung in der AML unterschiedliche Ergebnisse und keine der Untersuchung hat die Aktivierung von NFκB in Abhängigkeit einer TKD1-ITD thematisiert. Ebenso existieren keine Daten dazu, ob Midostaurin als FLT3-Inhibitor alleine in der Lage ist eine potentielle NFκB-Aktivierung zu inhibieren. Es ist daher interessant zu untersuchen, ob neben JM-ITDs auch die TKD1-ITDs in einer Aktivierung von NFκB resultieren und diese durch Midostaurin-Behandlung inhibiert werden kann.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Beobachtung einer Integration von internen Tandem Duplikationen in die Tyrosinkinase-Domäne des FLT3-Rezeptors stellt ein Novum dar (Breitenbuecher et al., 2009b). Über die Signaltransduktion dieser TKD1-ITDs ist bislang nur wenig bekannt. Die Charakterisierung der proteotypischen FLT3-ITD-627E-Mutation und der Signalwege wie AKT und STAT5 zeigte eine konstitutive Aktivierung in Abhängigkeit von der FLT3-Rezeptoraktivität. Die Analyse der ERK-Aktivierung ergab eine dauerhafte Aktivierung, die unabhängig von der Phosphorylierung des FLT3-ITD-627E Rezeptors zu sein schien (Breitenbuecher et al., 2009b). Es ist bekannt, dass GRB-2 in der Lage ist phosphorylierungsabhängig an Rezeptoren zu binden, wenn auch mit geringerer Affinität (Sayos et al., 1998; Yaffe, 2002; Jiang et al., 2006; Song et al., 2006b) und somit Signaltransduktion zu vermitteln. Daher stellt sich die Frage, ob die Weiterleitung der FLT3-ITD-627E-Signaltransduktion auch ohne Beteiligung der Kinaseaktivität, alleine durch die Integration der ITD in die β 2-Schleife der TKD1, erfolgen kann.

NF κ B ist ein wichtiger Mediator von Immun- und Entzündungsreaktionen. Die Aktivierung von der NF κ B Signaltransduktion spielt aber auch bei der Entstehung von malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle. In der akuten myeloischen Leukämie konnte eine Relevanz für die NF κ B-Aktivierung festgestellt werden (Birkenkamp et al., 2004; Grosjean-Raillard et al., 2008). Ein Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer FLT3-ITD konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ebenso fehlen bislang Daten über die NF κ B-Aktivierung durch TKD1-ITDs.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die folgenden Ziele verfolgt werden:

1. Generierung einer Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie sowie einer Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie ohne Kinaseaktivität.
2. Vergleichende Analyse der Signaltransduktion des FLT3-ITD-627E-Rezeptors mit und ohne Kinaseaktivität.
3. Untersuchung der NF κ B-Aktivierung in Abhängigkeit von der Expression des FLT3-ITD und des FLT3-ITD-627E-Rezeptors.

2 Material

Im Folgenden werden nur diejenigen Materialien aufgelistet, welche in Teil I dieser Arbeit nicht verwendet wurden. Alle übrigen Materialien sind in Teil I aufgeführt.

2.1 Antikörper

In Tabelle 10 werden die für die Western Blot Analysen und für die FACS-Messungen verwendeten Antikörper aufgelistet.

Tabelle 10: Für Western Blot und FACS-Messungen verwendete Antikörper.

Antigen	Epitop	Firma	Kat-Nr.	AK-Lösung	Verdünnung	Größe [kDa]
p-AKT	S473	Cell Signaling	9271	5% BSA	1:1000	60
AKT		Cell Signaling	9272	5% BSA	1:2000	60
p-FLT3	Y591	Cell Signaling	3466	5% TM	1:1000	130; 160
FLT3		Santa Cruz	Sc-479	5% TM	1:1000	130; 160
p-RAF	S338	Cell Signaling	9427	5% BSA	1:1000	75
p-MEK	S217 S221	Cell Signaling	9154	5% BSA	1:1000	45
NFκB		Cell Signaling	4764	5% BSA	1:1000	65
HDAC-1		Santa Cruz	81598	5% TM	1:1000	60
FLT3	PE	Becton & Dickinson	553842		1:10	
Isotyp	PE	Becton & Dickinson	560718		1:100	

2.2 Chemikalien und Reaktionskits

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Herkunft der verwendeten Chemikalien und Reaktionskits.

Firma (Firmensitz)	Produkte
Biorad (München)	Elektroporationsküvetten
Calbiochem (Darmstadt)	IKK2 Inhibitor V (IMD-0354)
Dharmacon (Lafayette, USA)	siRNA siGENOME SMARTpool-Mause p65, siRNA humanes FLT3
Invitrogen (Karlsruhe)	Neon Transfection Kit (100 µl), SOC-Medium, Top10-Zellen, OptiMEM,
Novartis (Basel, Schweiz)	Midostaurin
Merck (Darmstadt)	Glycerin
Millipore (Darmstadt)	Dialyse-Papier
Minerva Biolabs (Berlin)	Venor@GeM Mycoplasmen Detektions Kit

Firma (Firmensitz)	Produkte
Qiagen (Hilden)	<i>AllStars negative control</i> Alexa488, QIA Spin Miniprep Kit, RNeasy Mini Kit, QIA shredder Kit, Omniscript RT Kit
Roche (Mannheim)	High Fidelity PCR Kit, <i>Xho</i> I-Enzym
Sigma (Steinheim)	DEPC, Ethidiumbromid
Roth (Karlsruhe)	Agar-Agar, Agarose, Ampicillin, Borsäure, Bromphenolblau, DTT, Hefeextrakt, HEPES, NaCl, NP-40, Trypton
Stratagene (Santa Clara, USA)	Quick Change™ Site-directed-Mutagenesis Kit
Stem Cell Technologies (Grenoble, Frankreich)	MethoCult® M3231,

2.3 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Herkunft der verwendeten Geräte.

Firma (Firmensitz)	Geräte
Biorad (München)	Elektroporationsgerät
Eppendorf (Hamburg)	Photometer, Thermoheizblock
PeqLab (Erlangen)	Gelelektrophorese-Kammer, UV-Tisch und Kamera, PCR-Maschine
VWR (Darmstadt)	Bakterien-Schüttler

2.4 Größenstandard

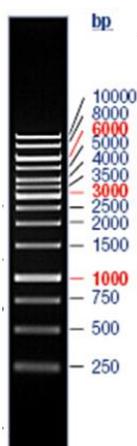


Abbildung 46: 1kB Standard für Agarose-Gele.

1 kB Standard für 1% Gele; Fermentas (St. Leon-Roth).

2.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide der Firma MGW Eurofins (Ebersberg) sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die Sequenzangabe erfolgt immer in 5`-3`-Orientierung.

Tabelle 13: Auflistung der zur PCR und Sequenzierung eingesetzten Primer.

Bezeichnung	Länge [bp]	Temperatur [°C]	Sequenz	Verwendung
Seq_FLT3_For1	20	57,3	atctgctccatcacactgc	Sequenzierung FLT3
Seq_FLT3_For2	20	57,3	aactcctcagaccacattgc	Sequenzierung FLT3
Seq_FLT3_For3	20	57,3	gtgctgtgcatacaattccc	Sequenzierung FLT3
Seq_FLT3_For4	20	57,3	actcaagatgatgaccacgc	Sequenzierung FLT3
Seq_FLT3_For5	20	57,3	ataatgcaatcctgctgggc	Sequenzierung FLT3
FLT3-HpaI-rev	33	62	gcggttaacgcgctacgaatctcgacctgagc	Amplifikation FLT3
FLT3-HpaI_fw	30	62	gttaacacccatgccggcgttgccgcgcgac	Amplifikation FLT3
Random-Hexamer	6	37	N(6)	cDNA Synthese
hFLT3-K644A-F	41	73,4	ctcaatccaggttgccgtcgcaatgctgaaaga aaaagcag	Mutagenese-PCR
hFLT3-K644A-R	41	73,4	Ctgctttttcttcagcattgcgacggcaacctgg attgag	Mutagenese-PCR

3 Methoden

Im Folgenden werden nur diejenigen Methoden erläutert, welche in Teil I dieser Arbeit nicht verwendet wurden. Alle übrigen Methoden sind in Teil I aufgeführt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob ein Plasmid ein gewünschtes Insert enthält, wird ein Restriktionsverdau mit Enzymen durchgeführt, die charakteristische Schnittstellen im Plasmid bzw. im Insert besitzen. Der Restriktionsverdau wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.1.3) analysiert.

Restriktionsverdau	3	U	Enzym
	2	µl	10x-Puffer
	2	µl	Plasmid DNA
	ad 20	µl	Aqua dest.

[130]

3.1.2 RNA-Isolation aus Zellen

Die Überprüfung der Konstrukt-Expression in transfizierten Zellen erfolgt über eine cDNA-PCR. Dazu ist es zunächst erforderlich die Gesamt-RNA der Zellen zu isolieren. Die Extraktion wird mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen wird durch Zentrifugation über QIASHredder Säulen erreicht. Die so aufgeschlossenen Zellen werden auf eine Säule transferiert, wo die RNA aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften an die Membran gebunden wird. Durch Waschen der Säule mit Puffer werden unspezifisch gebundene Zellbestandteile eliminiert. Zur Elution der RNA wird DEPC-Wasser eingesetzt.

3.1.3 cDNA-Synthese

Bevor die isolierte RNA mittels PCR auf die Konstrukt-Expression analysiert werden kann, muss sie zunächst in *complementary* DNA (**cDNA**) umgeschrieben werden. Dabei macht man sich zunutze, dass das virale Enzym Reverse Transkriptase (**RT**) in der Lage ist, DNA aus RNA zu synthetisieren. Um RNA zu synthetisieren, benötigt das Enzym dNTPs und Puffer.

Für die Synthese werden als Ausgangsmaterial 8 µl RNA eingesetzt. Der Ansatz wird eine Stunde in einem Heizblock bei 37°C inkubiert. Die neu synthetisierte cDNA kann dann direkt verwendet oder bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Ansatz zur cDNA-Synthese	
2 µl	10x Puffer (cDNA)
2 µl	dNTPs
1,2 µl	Primer N ₆ (25 ng/µl)
1 µl	Reverse Transkriptase
8 µl	RNA
ad 20 µl	Aqua dest.

3.1.4 PCR zum Nachweis der FLT3-Expression

Das Grundprinzip der Polymerasen-Kettenreaktion wurde bereits unter 3.1.4 im Teil I der vorliegenden Arbeit erläutert. Im Folgenden sind die Bedingungen für die Durchführung der FLT3-PCR zu finden. Die FLT3-PCR wird verwendet, um transfizierte Zellen auf Konstrukt-Expression zu testen. Als Template wird bei dieser PCR FLT3-cDNA eingesetzt. Der Erfolg der PCR wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.1.3, Teil I) überprüft.

Ansatz der FLT3-PCR		PCR-Bedingungen		
5 μ l	10x Puffer (PCR)	Zyklen	Temperatur	Zeit [Minuten]
1 μ l	dNTP	1	95°C	1
0,5 μ l	Primer (10 pmol)	30	95°C	0,5
0,5 μ l	Taq-Polymerase	30	62°C	0,5
2 μ l	cDNA-Template	30	72°C	3
ad 50 μ l	Aqua dest.	1	72°C	10

3.1.5 Zielgerichtete Mutagenese

Mittels zielgerichteter Mutagenese ist es möglich, Mutationen z.B. in Plasmid-DNA einzuführen. Der gezielte Austausch von Basenpaaren eines Templates wird mit Hilfe eines PCR-Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird in das pAL-FLT3-ITD-627E Plasmid eine Punktmutation an der Aminosäureposition 644 eingeführt, welche in einem Austausch von Lysin zu Alanin resultiert.

Für die Mutagenese-PCR werden Primer generiert, die den gewünschten Basenaustausch beinhalten. Während der PCR-Reaktion entstehen so Produkte, welche den Basenaustausch tragen. Um diese vom Ursprung-Template, das den Austausch nicht trägt, zu trennen, wird das PCR-Produkt mit dem *DPM* Enzym für eine Stunde bei 37°C verdaut. Das Enzym erkennt und schneidet methylierte DNA. Nur das Template-Plasmid ist aufgrund der Isolation aus Bakterien methyliert und wird so abgebaut. Nach Aufreinigung des Verdau über eine Gelelektrophorese, kann das mutagenisierte Plasmid zur Transfektion von Säugerzellen eingesetzt werden.

Ansatz der Mutagenese-PCR		PCR-Bedingungen		
5 μ l	10x Puffer	Zyklen	Temperatur	Zeit [Minuten]
1 μ l	dNTP Primer Mix	1	95°C	0,5
1 μ l	Pfu-Polymerase (2,5 U/ μ l)	18	95°C	0,5
3 μ l	Quick Solution	18	55°C	1
1,25 μ l	Primer (125 ng)	18	68°C	7
X μ l	Template (15 ng)			
ad 25 μ l	Aqua dest.			

3.1.6 Dialyse von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA vor der Transfektion in eukaryotische Zellen von störenden Salzen zu reinigen, wird eine Dialyse durchgeführt. Dazu werden 20 µl der DNA auf einer 0,025 µM dünnen Nitrocellulose-Membran für eine Stunde gegen 10%iges steriles Glycerin dialysiert. Die Salze diffundieren dabei aus der Plasmidlösung entlang des Konzentrationsgradienten in das Glycerin.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Fraktionierte Proteinisolierung

Die Lokalisation eines Proteins in der Zelle und damit die Zugänglichkeit zu Interaktionspartnern lässt Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand des Proteins zu. Zur Beantwortung von Lokalisationsfragen ist es entscheidend, die verschiedenen Kompartimente der Zelle getrennt voneinander betrachten zu können. Eine Möglichkeit hierzu bietet die fraktionierte Proteinisolierung, bei der zwischen der Kernfraktion und dem Zytoplasma unterschieden werden kann.

Zur Durchführung einer solchen Extraktion werden 15×10^6 Zellen in 100 µl eines hypotonischen Puffers (Puffer I) aufgenommen, der die Zellen zum Anschwellen bringt. Anschließend werden die Zellen durch eine Nadel mit einer geringen Gauge (26 G) geschert, was zu einer Zerstörung der Zellen und somit zur Freisetzung des Zytoplasmas führt. Die Zugabe von NP-40 führt zur Auflösung von Membranresten. Nach der folgenden Zentrifugation bei 13.000 rpm für drei Minuten bei 4°C kann die zytoplasmatische Fraktion als klare Lösung abgenommen werden. Im Debris befinden sich nun vor allem die Zellkerne und Membranreste. Um die Membranreste zu entfernen wird die Fraktion dreimal in Puffer I resuspendiert und bei 13.000 rpm für 30 Sekunden sedimentiert. Die im Zellkern enthaltenen Proteine werden durch Inkubation mit Puffer II, der eine hohe Konzentration an Salzen enthält, von der DNA gelöst. Dazu wird das Zellkern-Pellet in 30 µl Puffer II aufgenommen und nach gründlichem vortexen eine Stunde bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Durch die abschließende Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 Minuten bei 4°C wird der Debris vom Zellkernextrakt separiert. Die voneinander getrennten Lysate des Zytoplasmas und Zellkerns können direkt für die Western Blot Analyse weiter verarbeitet oder bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

Homogenisierungs-Puffer I:

0,1	mM	EDTA (pH 7,5)
0,1	mM	EGTA (pH 7,5)
10	mM	HEPES (pH 7,9)
10	mM	KCL

Lagerung bei 4°C

Homogenisierungs-Puffer II:

1	mM	EDTA (pH 7,5)
1	mM	EGTA (pH 7,5)
20	mM	HEPES (pH 7,9)
400	mM	NaCl

Lagerung bei 4°C

Bei beiden Puffern wird vor Gebrauch 1 mM DTT frisch zugesetzt, ebenso Protease-Inhibitoren (s. 3.3 Teil I).

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Methylzellulose-Assay

Zur Analyse des klonalen Wachstums einer Zelllinie wird die Kolonie-Bildung der Zellen in Abhängigkeit von Zytokinen im Weichagar, sogenannte Methylzellulose, analysiert. Das Wachstum von Kolonien in Zytokin-freiem Medium lässt z.B. Rückschlüsse auf das transformierende Potential eingebrachter Konstrukte zu. Zur Durchführung eines Methylzellulose-Assays werden 3.000 Zellen in 900 µl Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wird anschließend unter vortexen mit 2,4 ml Methylzellulose-Medium gemischt. Bei dem verwendeten Medium handelt es sich um zytokinfreies Medium, das je nach Ansatz mit 10% IL-3 versetzt wird. Insgesamt 3 ml der Suspension werden in 6-Well-Platten überführt, die anschließend für 7-14 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert werden. Nach der Inkubationszeit wird die Anzahl der gewachsenen Kolonien unter dem Mikroskop bestimmt.

3.3.2 IL-3-Entzug

Das Wachstum der in dieser Arbeit verwendeten Ba/F3-Zelllinie ist abhängig vom Zytokin IL-3 (Palacios and Steinmetz, 1985). Die Transfektion von onkogenen Konstrukten und die folgende Transformation der entsprechenden Zellen, befähigt die Zellen zu IL-3-unabhängigem Wachstum. Um zu überprüfen, ob die Zellen in IL-3-freiem Medium wachsen können, werden auf IL-3 gehaltene Zellen dreimal in 50 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in IL-3-freies Medium aufgenommen und kultiviert. Die Anzahl an apoptotischen Zellen wird über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels DNA-Gehalt-Analyse (s. 3.3.3.2 Teil I) bestimmt.

3.3.3 Elektroporation von Ba/F3 Zellen

Zum Einbringen von DNA oder siRNA in eukaryotischen Zellen wird bei dieser Methode ein Stromimpuls verwendet. Dieser führt dazu, dass die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert wird und die DNA durch Diffusion aus der umgebenden Lösung in die Zelle eintreten kann. Zur Vorbereitung werden 20 µg Plasmid-DNA mittels Dialyse von Salzen gereinigt (s. 3.1.6). Danach werden 2×10^6 Zellen pro Ansatz dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 800 µl Medium aufgenommen, das keinen Farbstoff als pH-Indikator besitzt. Die Zellsuspension wird in eine Elektroporationsküvette überführt. Zur Elektroporation werden ein Impuls von 300 V und 300 µF eingesetzt. Nach dem Stromimpuls werden die Zellen für zwei Minuten auf Eis gekühlt, damit sich die Zellmembran wieder schließen kann. Anschließend werden die Zellen in 20 ml Kulturmedium überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.3.4 siRNA *knock down*

Um die Relevanz bestimmter Proteine auf verschiedene zelluläre Prozesse zu überprüfen, werden diese Proteine spezifisch mittels *silencing RNA* (siRNA) ausgeschaltet. Hierzu werden zur *messenger RNA* (mRNA) des Zielproteins komplementäre kurze RNA-Stränge in die Zelle transfiziert. Es kommt zu einer Wechselwirkung der RNA-Stücke mit der mRNA und zur Bildung von RNA-Doppelsträngen. Die Grundlage dieser Technik besteht darin, dass die Zelle einen Schutzmechanismus gegenüber doppelsträngiger RNA besitzt, da diese oft die Erbgutinformation von Viren darstellt. Erkennt ein sogenannter *RNA inducing silencing complex* die doppelsträngige RNA, wird der enzymatische Abbau dieser eingeleitet. Die mRNA des Zielproteins wird somit abgebaut und es entsteht kein Protein mehr. Man spricht von einem *knock down* des Proteins (Elbashir et al., 2001; Sohail et al., 2003).

Zum spezifischen *knock down* von FLT3 und NFκB wird siRNA der Firma Dharmacon verwendet (s. 2.2). Als Negativ-Kontrolle wird eine *All stars negative siRNA* der Firma Invitrogen verwendet, deren Sequenz keine Entsprechung im Mausgenom findet. Die Kontrolle ist zusätzlich Alexa-488 markiert, um die Effizienz der Transfektion mittels FACS bestimmen zu können. Die Transfektion der siRNA wird mittels Mikroporation durchgeführt. Dazu werden 1×10^6 Zellen dreimal in PBS resuspendiert und anschließend in OptiMEM® resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 10 µl der entsprechenden siRNA in einer Endkonzentration von 2 µM. Die Parameter für die Mikroporation sind wie folgt: ein Impuls bei einer von Pulsstärke 1700 V und einer Pulslänge von 30 ms. Nach der Mikroporation werden die Zellen in Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgt vier Stunden nach Durchführung des *knock downs*. Dazu werden $0,1 \times 10^6$ Zellen aus dem Ansatz entnommen, zentrifugiert und in 300 µl PBS aufgenommen. Die Analyse der Probe erfolgt am Durchfluss-Zytometer. Die Analyse der weiteren Proben erfolgt nach 24 Stunden mittels Western Blot oder mittels Zellzyklus-Analyse (s. 3.3.3.2, 3.2.4 Teil I).

3.3.5 Oberflächenfärbung von FLT3

Zur Analyse der FLT3-Expression in transfizierten Zelllinien ist es möglich eine Oberflächenfärbung des Transmembran-Rezeptors durchzuführen. Diese kann anschließend mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie analysiert werden. Zunächst werden 1×10^6 Zellen im FACS-Röhrchen sedimentiert und in 100 µl Färbepuffer (s. 3.3.3.1 Teil I) aufgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgt durch Zugabe von 10 µl eines FLT3-PE Antikörpers (s. 2.1) und 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen einmal in Färbepuffer resuspendiert, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Danach erfolgt die Analyse mittels FACS.

3.4 Arbeiten mit Bakterien

Alle aufgelisteten Arbeiten werden mit dem *Escherichia coli* Top10 Stamm unter sterilen Bedingungen und Berücksichtigung der Sicherheitsbestimmungen der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

3.4.1 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wird zunächst 1 µl Plasmid-DNA zu 100 µl chemisch kompetenten Bakterien-Zellen gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Bakterien durch Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 90 Sekunden. Die

Zellen werden danach zwei Minuten auf Eis abgekühlt, bevor 500 µl Medium zugegeben werden. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C unter ständigem Schütteln werden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Entsprechend der prokaryotischen Resistenz des Plasmids wird den Platten vor Gebrauch Ampicillin (50 µg/ ml) zur Selektion positiv transformierter Bakterien zugesetzt.

LB-Medium	1	%	Trypton
	0,5	%	Hefextrakt
	0,5	%	NaCl
LB-Platten			LB-Medium
	1,5	%	Agar

3.4.2 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Um große Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wird eine Flüssigkultur zur Anzucht positiv transformierter Bakterien angelegt. Dazu wird eine Kolonie von der LB-Platte gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt. Zur Selektion positiv transformierter Bakterien wird dem LB-Medium Ampicillin (50 µg/ ml) zugesetzt. Der Ansatz wird unter ständigem Schütteln über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Plasmid-Isolation (s. 3.4.3).

Zur Kryokonservierung von Flüssigkulturen wird 87%iges Glycerin 1:1 mit der Kultur gemischt und gevortexet. Anschließend wird die Kultur in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Lagerung in -80°C überführt.

3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini Präparation)

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus den Flüssigkulturen wird eine Mini-Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bakterien werden nach Sedimentation mittels einer modifizierten alkalischen Lyse aufgeschlossen. Das Lysat wird auf eine Säule überführt, wobei die Plasmid-DNA aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften an die Membran gebunden wird. Durch Waschen mit verschiedenen Puffern werden RNA, chromosomale DNA, Proteine und Verunreinigungen entfernt. Die Elution der DNA erfolgt durch Aqua dest. Die Konzentration der so gewonnenen DNA wird mittels Photometer bestimmt (s. 3.1.2 Teil I). Zur Qualitätsüberprüfung wird die DNA nach einem Restriktionsverdau in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Anschließend kann sie zur Transfektion von eukaryotischen Zellen eingesetzt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung der Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie und der FLT3-ITD-627E *Kinase-Dead*-Mutante

Etwa 30% aller AML-Patienten weisen eine interne Tandem Duplikation in der FLT3-Rezeptor-Tyrosinkinase auf (Nakao et al., 1996; Yokota et al., 1997). Damit verbunden sind unter anderem eine konstitutive Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege STAT5 und ERK, sowie die Fähigkeit zum klonalen und Zytokin-unabhängigen Wachstum (Choudhary et al., 2005). Die FLT3-ITD-Mutationen lassen sich in zwei Klassen unterteilen, zum einen erfolgt die Integration im Bereich der Juxtamembran-Domäne. Die Integration der Duplikation kann sich jedoch auch in nicht-juxtamembranären Bereichen ereignen. Die FLT3-ITD-627E-Mutante, bei welcher die ITD an Aminosäureposition 627 der Tyrosinkinase Domäne 1 des FLT3-Rezeptors integriert, ist eine TKD1-ITD. Sie wurde bereits in einem zellulären 32D-Rekonstitutionsmodell hinsichtlich der Aktivierung der klassischen FLT3-ITD nachgeschalteten Signalwege wie ERK und STAT5 untersucht (Breitenbuecher et al., 2009a, 2009b) (s. 1.2.3.).

In der vorliegenden Arbeit sollte die FLT3-ITD-627E-Mutation in Ba/F3-Zellen transfiziert und funktionell charakterisiert werden. Die murine pro-B-Zelllinie Ba/F3 ist für ihr Wachstum abhängig von Interleukin-3 (Palacios and Steinmetz, 1985). Durch die Transfektion von Onkogenen und die damit verbundene Transformation erlangen die Zellen die Fähigkeit zum IL-3-freien Wachstum. Zur Klärung der Frage, ob diese TKD1-ITD unabhängig von der Kinaseaktivität des FLT3-Rezeptors die Transformation vermitteln kann, wurde eine Punktmutation in das FLT3-ITD-627E Konstrukt an Aminosäureposition 644 eingefügt, die zur Substitution von Lysin (**K**) zu Alanin (**A**) und damit zum Verlust der Kinaseaktivität führt (Schmidt-Arras et al., 2004; Schessl et al., 2005; Sargin et al., 2007). Das generierte Konstrukt, FLT3-ITD-627**EKA** wurde ebenfalls in Ba/F3-Zellen transfiziert und funktionell charakterisiert.

Für die Generierung einer FLT3-ITD-627E-Mutante, welche keine Kinaseaktivität mehr besitzt, wurde das bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene pAL-FLT3-ITD-627E Plasmid verwendet. Dazu wurde zunächst ein Kontrollverdau des Plasmids mit *XhoI* durchgeführt. Die FLT3-cDNA besitzt zwei Schnittstellen für das *XHOI* Enzym, wodurch ein Fragment von 1624 bp entsteht. Eine weitere Schnittstelle für das Enzym im pAL-Vektor lässt zwei weitere Fragmente entstehen, bei ca. 900 und 4000 bp. Als

Kontrolle für die Lage der Fragmente wurden die Plasmide pAL-FLT3-ITD sowie pAL-FLT3-WT mitgeführt.

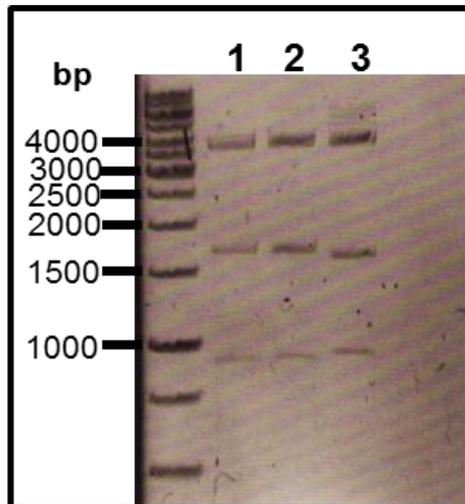


Abbildung 47: Gelelektrophoretische Auftrennung des rekombinanten Plasmids pAL-FLT3-ITD-627E nach XhoI-Verdau.

Jeweils 1 μ l Plasmid wurde 1 Stunde bei 37°C mit *XhoI* restringiert und die DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, bevor die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht detektiert wurde. Die Beladung der Spuren ist wie folgt: 1kb Marker 1= pAL-FLT3-ITD, 2= pAL-FLT3-ITD-627E, 3= pAL-FLT3-WT.

Die Abbildung 47 zeigt das Ergebnis des Restriktionsverdaus. Nach Verdau mit *XhoI* ergab sich für alle drei Plasmide das erwartete Schnittmuster mit den Banden bei ca. 900, 1700 und 4000 bp. Das überprüfte pAL-FLT3-ITD-627E Plasmid wurde im Folgenden zur Generierung einer Punktmutation und zur Transfektion in Ba/F3 parentale Zellen eingesetzt.

Es sollte überprüft werden, welche Rolle die Kinaseaktivität bei der Aktivierung des FLT3-ITD-627E-Rezeptors spielt und ob nachgeschaltete Signaltransduktionswege nur durch die Integration der ITD in das β 2-Blatt der TKD1 aktiviert werden können. Dazu wurde eine Variante des Rezeptors generiert, bei der die Kinaseaktivität aufgehoben ist. An der Aminosäureposition 644 wurde zu diesem Zweck das kodierende Basentriplett mittels Mutagenese-PCR von AAA zu GCA (s. 3.1.5) ersetzt. Die Basensubstitution führte auf Aminosäureebene zu einem Austausch von Lysin zu Alanin. Die Position 644 im FLT3-Rezeptor ist entscheidend für die Kinaseaktivität des Rezeptors. Es konnte nachgewiesen werden, dass Substitutionen an dieser Stelle zum Verlust der Kinaseaktivität führen, weshalb man auch von *kinase dead*-Mutationen spricht (Schmidt-Arras et al., 2004; Schessl et al., 2005; Sargin et al., 2007). Der Erfolg der Mutagenese-PCR wurde mittels Sequenzierung (s. 3.1.5 Teil I, 2.5 Teil II) überprüft und festgestellt. Das Konstrukt wurde im Folgenden als **FLT3-EKA** bezeichnet und in Ba/F3-Zellen transfiziert.

Nach Überprüfung der Sequenz und erfolgreicher Vermehrung der Plasmide pAL-FLT3-ITD-627E und pAL-FLT3-ITD-627E-K644A in Bakterien, mussten zunächst die Parameter für die Transfektion der Ba/F3-Zellen mittels Elektroporation etabliert werden. Die Höhe der verwendeten Stromspannung (**V**) sowie die elektrische Kapazität (**F**) wurden dabei so gewählt, dass die Zellen nach der Transfektion nur einen geringen Anteil an apoptotischen Zellen aufwiesen. Die verwendeten Parameter waren wie folgt: ein Impuls bei 300 μ F und 300 V. Die Elektroporation wurde durchgeführt wie unter 3.3.3 beschrieben. Drei Tage nach der Elektroporation war bereits ein Wachstum der Zellen zu beobachten. Die neu generierten Zelllinien werden im Folgenden als **Ba/F3-FLT3-ITD-627E** und als **Ba/F3-FLT3-EKA** bezeichnet. Um nun eine stabile Integration des Plasmids in das Genom der Zellen zu erreichen, ist es entscheidend, einen konstanten Selektionsdruck auf die Zellen auszuüben, welcher nur von positiv transfizierten Zellen toleriert werden kann. Bei der Verwendung von Antibiotika als Selektionsmarker ist nie auszuschließen, dass diese selbst eine Wirkung auf die intrazellulären Prozesse der Zellen zeigen. Aus diesem Grund wurde ein IL-3 Entzug zur Selektion der positiv transfizierten Zellen durchgeführt (s. 4.1.1). Zunächst wurde jedoch die FLT3-Expression der Zellen überprüft.

FLT3 ist eine transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase, wobei ein Teil des Rezeptors in den extrazellulären Bereich ragt. FLT3 wird daher auch als *cluster of differentiation antigen 135* (**CD135**) bezeichnet. Mit einem FLT3-Konstrukt transfizierte Zellen können somit auf die Expression von FLT3 an der Oberfläche getestet werden. Dies hat den Vorteil, dass langwierige intrazelluläre Färbungen umgangen werden können. Die Färbung mit einem Fluorochrom-gekoppelten FLT3-Antikörper wurde durchgeführt wie unter 3.3.5 beschrieben, die verwendeten Antikörper sind unter 2.1 zu finden.

Mittels Oberflächenfärbung wurden die generierten Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie die Ba/F3-FLT3-EKA Zellen somit auf FLT3-Expression getestet. Als Kontrolle für die Expression wurden sowohl parentale Ba/F3 als auch Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mitgeführt. Parentale Ba/F3-Zellen exprimieren kein endogenes FLT3 und sollten somit negativ für die Färbung sein. Um die Spezifität des verwendeten FLT3-Antikörpers zu überprüfen, wurden alle Zelllinien zusätzlich mit einem Antikörper des gleichen Immunglobulins (**IgG**) gefärbt.

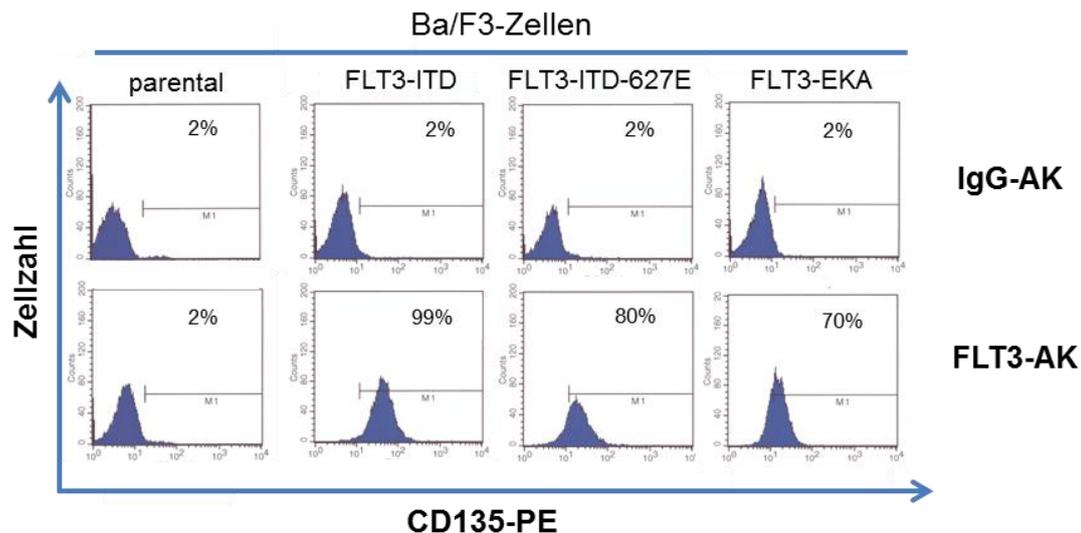


Abbildung 48: Die neu generierten Zelllinien weisen eine FLT3-Oberflächenexpression auf.

Abgebildet sind beispielhafte Histogramme für die verschiedenen Zelllinien, wobei die gemessene Signalintensität im PE-Kanal in arbiträren Einheiten gegen die Zellzahl dargestellt ist. Die obere Reihe zeigt die Färbung mit der Isotypen-Kontrolle (**IgG-AK**), während die untere Reihe die Färbung mit dem spezifischen FLT3-Antikörper (**FLT3-AK**) repräsentiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen aus der Gesamtpopulation der vitalen Zellen.

Das Ergebnis der Färbung mit dem IgG-Antikörper zeigt auf, dass der Antikörper nur ein geringes Hintergrundsignal verursacht. Der Anteil der positiven Zellen an der Gesamtpopulation beträgt nur 2% bei allen Zellen. Durch Färbung der Zellen mit spezifischen PE-konjugierten CD135-Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass parentale Ba/F3-Zellen keinen FLT3-Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Sowohl bei den Ba/F3-FLT3-ITD-627E als auch bei den Ba/F3-FLT3-EKA Zellen ergab sich ein hoher prozentualer Anteil FLT3 positiv gefärbter Zellen an der Gesamtpopulation. Ebenso zeigte die Ba/F3-FLT3-ITD Zelllinie eine starke Expression von FLT3. Somit konnte eine einheitliche Oberflächenexpression des FLT3-Rezeptors in den generierten Zelllinien verifiziert werden.

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem exprimierten Konstrukt tatsächlich um die FLT3-ITD-627E- bzw. FLT3-ITD-627E-K644A-Sequenz handelt, wurde zunächst eine Gesamt-RNA-Extraktion aus den Zellen durchgeführt (s. 3.1.2). Die RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und es erfolgte die Amplifikation von FLT3 mit sequenzspezifischen Primern (s. 3.1.3, 3.1.4). Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und anschließend zur Sequenzierung geschickt (s. 3.1.5 Teil I). Das Ergebnis der PCR zur Amplifikation des FLT3-Fragments ist in Abbildung 49 dargestellt.

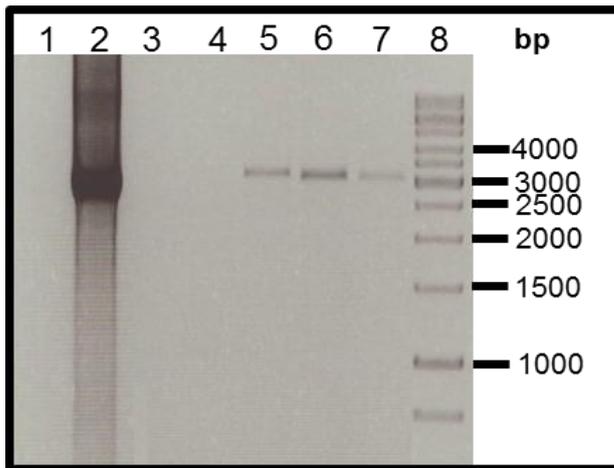


Abbildung 49: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate von Ba/F3-FLT3-ITD-627E bzw. Ba/F3-FLT3-EKA Zellen.

Agarose-Gelelektrophorese der FLT3-PCR im 1%-Agarose-Gel. In den Spuren wurden folgende Proben aufgetragen: 1= negativ Kontrolle, 2= Plasmid pAL-FLT3-ITD-627E, 3= Leerspur, 4= Ba/F3 parental, 5= Ba/F3-FLT3-ITD-627E, 6= Ba/F3-FLT3-ITD, 7= Ba/F3-FLT3-ITD-EKA, 8= 1kb Marker. Zur Visualisierung wurde die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht detektiert.

Als Kontrolle für die Lage des PCR-Produkts im Agarose-Gel wurde das rekombinante pAL-FLT3-ITD-627E Plasmid bei der PCR amplifiziert. Als Kontrolle für unspezifische Produkte wurde DNA aus parentalen Ba/F3 Zellen mitgeführt. Ba/F3-FLT3-ITD Zellen dienten als Kontrolle, für eine erfolgreiche RNA-Extraktion sowie cDNA-Synthese. Die FLT3-mRNA besteht aus 3884 Basenpaaren. Das Ergebnis der PCR zeigt deutlich, dass alle FLT3-ITD Zelllinien positiv für FLT3 getestet wurden. Es war für alle untersuchten Proben eine Produktbande zwischen 3 und 4 kb zu erkennen, während parentale Ba/F3-Zellen keine Bande auf der entsprechenden Höhe zeigten. Das PCR-Produkt der FLT3-ITD-627E sowie der FLT3-ITD-EKA Zelllinie wurde anschließend für die Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenzierung ergab, dass es sich um die Sequenz der FLT3-ITD-627E bzw. FLT3-EKA handelt, welche ohne neu entstandene Mutationen in den generierten Zellen exprimiert wurde. Ebenso konnte der Nukleotidaustausch an der Position 644 im FLT3-EKA-Konstrukt festgestellt werden.

4.1.1 Überprüfung des IL-3-unabhängigen Wachstums

Die murine pro-B-Lymphozyten Zelllinie Ba/F3 ist für ihr Wachstum auf IL-3 angewiesen (Palacios and Steinmetz, 1985). Die Transfektion von Onkogenen in parentale Ba/F3-Zellen bewirkt eine Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege, was in einer onkogenen Transformation der Zellen resultiert und den Zellen die Fähigkeit zu klonalem und IL-3-unabhängigen Wachstum verleiht (Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002). Lediglich Zellen, die die Plasmid-DNA aufgenommen haben und das Onkogen

exprimieren weisen diese Eigenschaft auf. Der Entzug von IL-3 (s. 3.3.2) eignet sich somit auch zur Selektion der transfizierten Zellen. Diese Art der Selektion bietet den Vorteil, dass auf den Einsatz von Antibiotika vollständig verzichtet werden kann.

Als Kontrollen für die korrekte Durchführung wurden Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-WT Zellen mitgeführt. Die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen sind in der Lage in IL-3-freiem Medium zu wachsen, da sie durch die FLT3-ITD-Expression transformiert sind. Die Ba/F3-FLT3-WT sollten jedoch nicht in der Lage sein ohne IL-3 zu wachsen, da der Rezeptor nicht durch eine Mutation konstitutiv aktiv ist. Um das weitere Wachstum aller Zelllinien auf IL-3 zu dokumentieren, wurde ein Ansatz der Zellen nach der Waschprozedur in IL-3-haltiges Medium zurückgesetzt und der DNA-Gehalt wurde täglich mittels Propidiumiodid (s. 3.3.3.2) bestimmt. Das Ergebnis dieser Analyse ist als prozentualer Anteil der viablen Zellen in Abbildung 50 dargestellt.

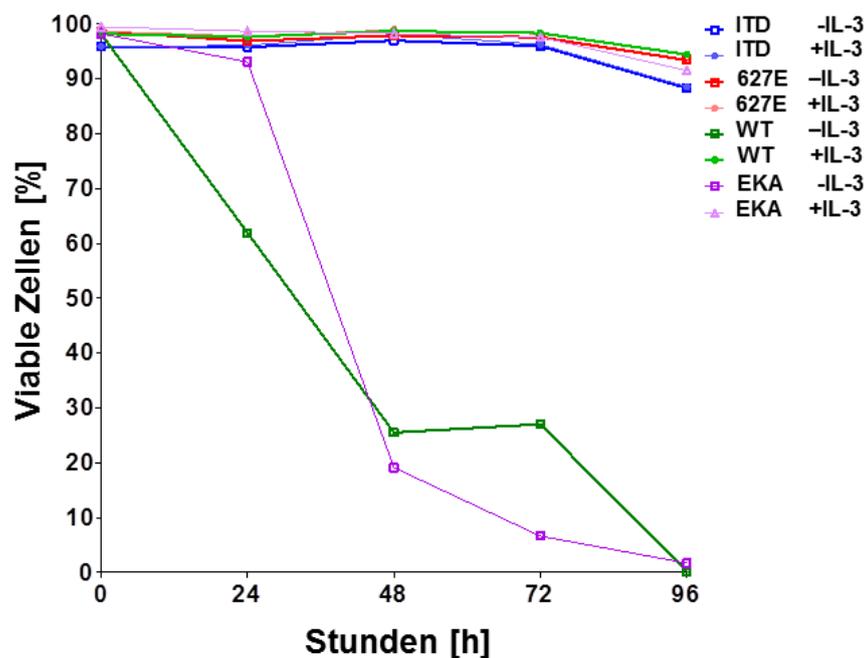


Abbildung 50: Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigen nach 96 Stunden viable Zellen im IL-3-freien Zellkulturmedium.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml sowohl auf IL-3-freies (-IL-3) als auch auf 10% IL-3-haltigem Medium (+IL-3) kultiviert. Die Zellzyklus-Analyse wurde zu den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil der vitalen Zellen (100% - subG1%) als Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Es wurde deutlich, dass die neu generierte Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie ebenso wie die Onkogen-transformierte Zelllinie Ba/F3-FLT3-ITD in IL-3-freiem Medium viable Zellen zeigten. Die Zelllinie wies auch 96 Stunden nach dem Entzug von IL-3 mehr als 90% vitale Zellen auf. In Bezug auf den Anteil viabler Zellen konnten für Ba/F3-FLT3-ITD sowie Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen keine Unterschiede zwischen dem Wachstum in An- oder Abwesenheit von IL-3 festgestellt werden. Die Ba/F3-FLT3-EKA-Zellen,

welche keine FLT3-Kinaseaktivität mehr besitzen, waren nicht in der Lage in der Abwesenheit von IL-3 zu proliferieren. Bereits 48 Stunden nach dem IL-3 Entzug waren nur noch etwa 20% der Zellen vital, während die mit IL-3 gehaltenen Zellen weiterhin vital waren. Die Ba/F3-FLT3-WT Zellen waren ebenfalls nicht in der Lage, in IL-3-freiem Medium zu wachsen und zeigten nach 96 Stunden keine lebenden Zellen mehr. Es konnte somit gezeigt werden, dass die mit FLT3-ITD-627E transfizierten Zellen in der Lage sind, IL-3-unabhängig zu proliferieren. Weiterhin wurde mit dem IL-3-Entzug eine positive Selektion auf transfizierte Zellen durchgeführt. Für die Ba/F3-FLT3-EKA Zellen konnte festgestellt werden, dass die FLT3-ITD-627E-Mutation ohne die Kinaseaktivität den transfizierten Ba/F3-Zellen nicht die Fähigkeit zu Zytokin-unabhängigem Wachstum verleiht. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kinaseaktivität für die onkogene Transformation der Zellen entscheidend ist.

Um zu überprüfen, ob das IL-3-unabhängige Wachstum der Ba/F3-FLT3-ITD-627E-Zellen nur von der FLT3-Aktivierung abhängig ist und nicht durch ein sekundäres FLT3-ITD unabhängiges Ereignis vermittelt wird, wurde ein *knock down* (s. 3.3.4) von FLT3 mittels spezifischer siRNA durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle für eine FLT3-abhängige Zelllinie wurden Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mitgeführt. Die Ba/F3-FLT3-EKA-Zellen wurden von dieser Analyse ausgeschlossen, da sie kein Wachstum in IL-3-freiem Medium zeigten. Die Transfektionseffizienz des FLT3-siRNA *knock downs* wurde mit Hilfe einer Alexa488-markierten Negativ-siRNA bestimmt und war bei jedem der durchgeführten Versuche größer 90%. Das Ergebnis einer repräsentativen Effizienz-Messung ist in Abbildung 51 dargestellt.

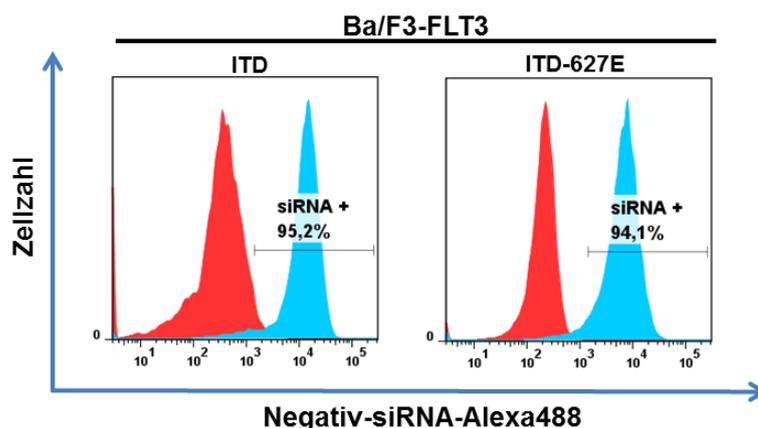


Abbildung 51: Die mit FLT3 spezifischer siRNA transfizierten Ba/F3 Zellen weisen eine hohe Transfektionseffizienz auf.

In **rot** abgebildet sind nicht transfizierte und in **blau** mit der Negativ-siRNA transfizierte Zellen. Dargestellt ist die Signalintensität in arbiträren Einheiten gegen die Zellzahl. Angegeben ist der Prozentsatz der Alexa-488 positiven Zellen als Anteil an der Gesamtpopulation. Die Transfektionseffizienz wurde 4 Stunden nach Durchführung des siRNA-vermittelten *knock downs* bestimmt. Die graphische Aufbereitung der Daten erfolgte mittels der FLOWJO-Software.

Im Anschluss wurde der siRNA-vermittelte *knock down* des FLT3-Rezeptors auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt. Dazu wurden acht Stunden nach Durchführung des *knock downs* Proteinlysate hergestellt. Im Western Blot erfolgte der Nachweis von phosphoryliertem sowie unphosphoryliertem FLT3. Als Kontrolle wurde eine Probe mitgeführt, die lediglich der Prozedur der Transfektion unterzogen wurde (-siRNA). Um den unspezifischen Effekt von eingebrachter siRNA zu überprüfen wurde zusätzlich ein Ansatz mit einer Negativ-siRNA (**neg. siRNA**) transfiziert, deren Sequenz keine komplementäre Sequenz in der murinen mRNA finden kann. Als weitere Kontrolle wurde gleichzeitig ein FLT3 *knock down* der Ba/F3-FLT3-ITD Zellen durchgeführt. Das Ergebnis der Western Blot Analyse und der densitometrischen Auswertung des gezeigten Blots ist in Abbildung 52 zusammengestellt.

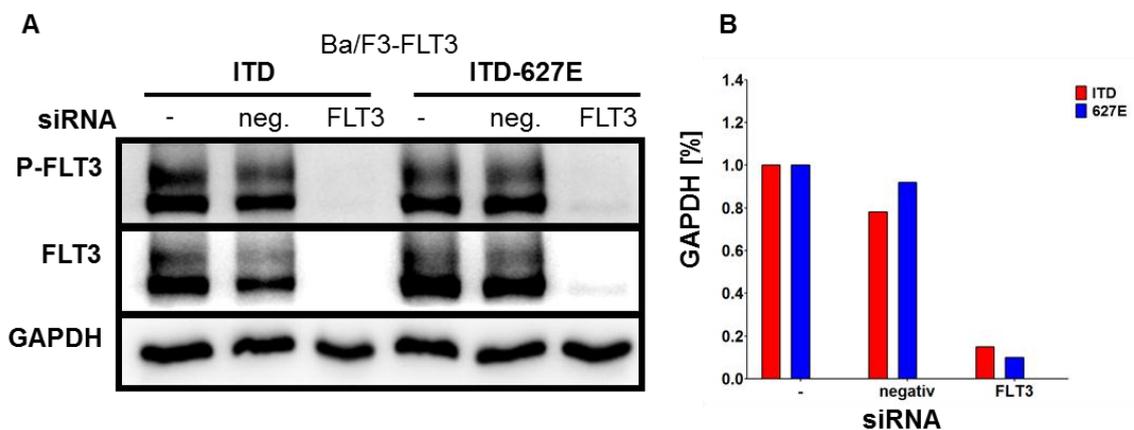


Abbildung 52: Die Transfektion von FLT3 spezifischer siRNA führt zum Protein *knock down* des FLT3-Rezeptors.

(A) Die Analyse der Proteinlysate erfolgte acht Stunden nach Durchführung des FLT3 *knock downs*. Der Ansatz - siRNA wurde ohne Zugabe von siRNA der Prozedur unterzogen. Die Negativ-siRNA Kontrolle wurde so gewählt, dass es keine Entsprechung in der murinen mRNA gibt. GAPDH diente als Kontrolle für die gleiche Beladung der Spuren. Es wurden 25 µg Gesamtprotein aufgetragen. (B) Gezeigt ist die densitometrische Auswertung des in (A) gezeigten Blots. Die Auswertung erfolgte mittels der Graphik-Software Image J. Die Daten wurden normalisiert nach der Rechnung: $(\text{FLT3 Signal}_{\text{Probe}} / \text{FLT3 Signal}_{\text{- siRNA}}) / (\text{GAPDH Signal}_{\text{Probe}} / \text{GAPDH Signal}_{\text{- siRNA}})$.

In der Western Blot Analyse zeigte sich, dass der *knock down* von FLT3 sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen erfolgreich war. Für beide Zelllinien konnte nach der Transfektion mit FLT3-spezifischer siRNA kein Signal für FLT3 mehr nachgewiesen werden. Die Reduktion des FLT3-Proteinlevels betrug nach densitometrischer Auswertung bereits acht Stunden nach Durchführung des *knock downs* 90% in beiden Zelllinien. In den Kontrollansätzen waren sowohl Signale für phosphoryliertes als auch für unphosphoryliertes FLT3 vorhanden, so dass eine unspezifische Regulation des FLT3-Rezeptors ausgeschlossen werden konnte.

Um nun festzustellen, ob die Ba/F3-FLT3-ITD627E Zellen nach dem *knock down* von FLT3 ihre Fähigkeit zum IL-3-unabhängigem Wachstum verlieren, wurde eine Zellzyklus-Analyse mittels Propidiumiodid durchgeführt. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 53 aufgeführt.

Es zeigte sich, dass 48 Stunden nach dem siRNA-vermittelten *knock down* von FLT3 beide Zelllinien in IL-3-freiem Medium signifikant erhöhte Level an apoptotischen Zellen aufwiesen. Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigten 77% apoptotische Zellen, Ba/F3-FLT3-ITD Zellen 80%. Die Kontrollansätze, bei denen kein FLT3 *knock down* vorlag, zeigten hingegen nur eine geringe Apoptoserate, von deutlich weniger als 20% apoptotischen Zellen. Die Fähigkeit zu IL-3-unabhängigem Wachstum steht somit in direkter Verbindung mit der Expression des FLT3-ITD bzw. des FLT3-ITD-627E Konstrukts.

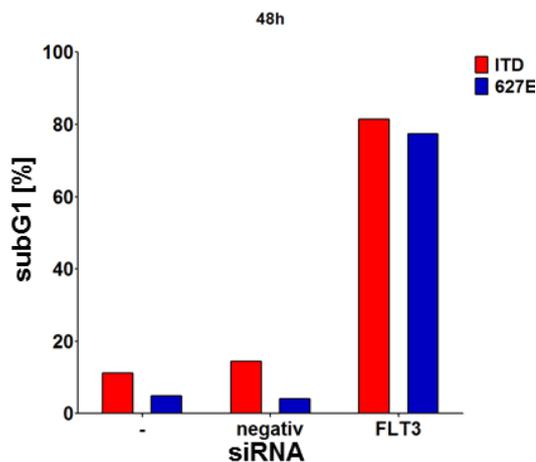


Abbildung 53: Durch den siRNA-vermittelten *knock down* von FLT3 verlieren Ba/F3-FLT3-ITD positive Zellen die Fähigkeit zu IL-3-freiem Wachstum.

Es wurden 1×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{M}$ der jeweiligen siRNA transfiziert und anschließend in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro ml in IL-3-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Nach 48 Stunden wurde der Prozentsatz an Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus mittels Propidiumiodid bestimmt. Der Ansatz – siRNA wurde ohne Zugabe von siRNA der Prozedur unterzogen. Die Negativ-siRNA Kontrolle wurde so gewählt, dass es keine Entsprechung in der murinen mRNA geben sollte.

4.1.2 Methylzellulose-Assay der generierten Zelllinien

Der Methylzellulose-Assay basiert auf der Fähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen, im Methylzellulose-Medium (Weichagar) nach Zytokin-Stimulation zu wachsen und Kolonien auszubilden. Maligne Zellen besitzen die Fähigkeit zu klonalem Wachstum und zur Bildung endogener Kolonien im Weichagar auch in der Abwesenheit von Zytokinen. Ein Charakteristikum der onkogenen Transformation von Zellen ist daher ihre Fähigkeit, in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren Kolonien zu bilden. Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E und die Ba/F3-FLT3-ITD-EKA Zelllinien wurden auf Koloniebildung in

An- und Abwesenheit des wachstumsförderenden Zytokins IL-3 im Methylzellulose-Assay (s. 3.3.1) getestet. Als Kontrollen dienten Ba/F3-FLT3-ITD Zellen, die aufgrund ihrer onkogenen Transformation in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren Kolonien bilden (Mizuki et al., 2000; Choudhary et al., 2005). Eine weitere Kontrolle stellten Ba/F3-FLT3-WT Zellen dar, da sie nur in Anwesenheit von IL-3 wachsen können. Das Ergebnis des Methylzellulose-Assays am Tag 7 ist in Abbildung 54 zu sehen.

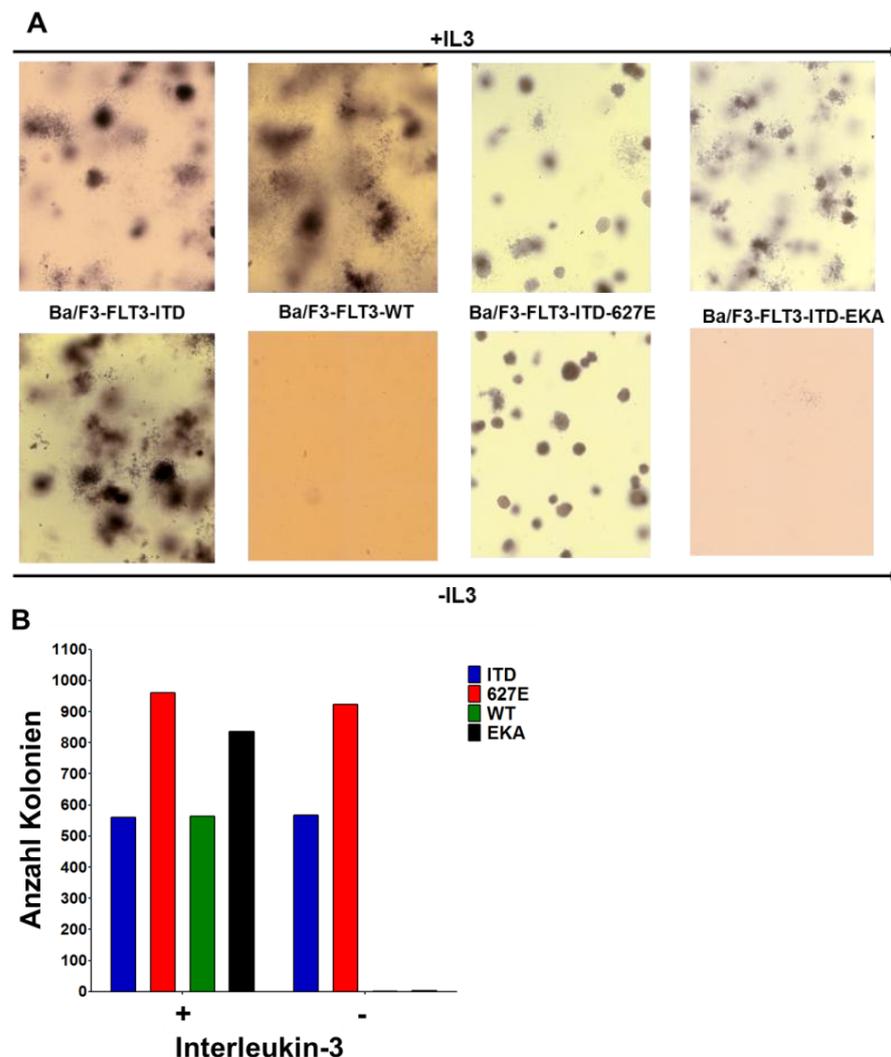


Abbildung 54: Die neu generierten Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen weisen im Methylzellulose-Assay klonales Wachstum in der Abwesenheit von IL-3 auf.

Im Weichagar wurden 3.000 Zellen in Anwesenheit (+IL-3) und Abwesenheit (-IL-3) von 10% IL-3 kultiviert. In (A) sind Bilder der Durchlicht-Mikroskopie am Tag 7 dargestellt. Gezeigt sind Aufnahmen eines charakteristischen Ausschnittes. Abgebildet ist in (B) das Ergebnis der Koloniezählung am Tag 7. Ausgewählt ist ein repräsentatives Experiment von zweien.

Es zeigte sich, dass bei Zugabe von 10% IL-3 alle Zelllinien in der Lage waren im Methylzellulose-Medium Kolonien auszubilden. Bei fehlender Zugabe von IL-3 war lediglich bei den Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen eine Koloniebildung zu beobachten. Im Vergleich der beiden Zelllinien konnte eine deutlich erhöhte Kolonien-

zahl bei Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen festgestellt werden. Die Ba/F3-FLT3-ITD-EKA Zellen konnten nur in der Gegenwart von IL-3 Kolonien bilden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die TKD1-ITD ohne Kinaseaktivität keine Transformation der Zellen vermitteln kann. Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie Ba/F3-FLT3-EKA Zellen wiesen im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien ein deutlich verstärktes Wachstum auf.

4.1.3 Analyse der Signaltransduktion in den generierten Zelllinien

Eine Aktivierung von FLT3 durch seinen Liganden FL aktiviert nachgeschaltete Signalwege wie AKT und ERK (Stirewalt and Radich, 2003). Die Integration einer internen Tandem Duplikation in die Juxtamembran Domäne des FLT3-Rezeptors resultiert in einem FLT3-Rezeptor, der in der Abwesenheit des Liganden konstitutiv aktiv ist. Damit verbunden ist auch eine dauerhafte Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege sowie die aberrante Aktivierung von Proteinen, was der Zelle die Proliferation sowie das Überleben in Abwesenheit von Zytokinen ermöglicht (Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002). Die Kinaseaktivität des FLT3-Rezeptors kann spezifisch durch Midostaurin inhibiert werden, da dieser Tyrosinkinase-Inhibitor mit ATP um die Bindung in die Kinasedomäne konkurriert. Midostaurin wird jedoch im Vergleich zu ATP nicht hydrolysiert und blockiert somit die Kinasedomäne (Weisberg et al., 2002). Als Folge dieser FLT3-Inhibition werden die nachgeschalteten Signaltransduktionswege nicht mehr aktiviert. Für den FLT3-ITD-627E-Rezeptor konnte jedoch ein aberranter Phänotyp unter Midostaurin-Behandlung festgestellt werden. Es zeigte sich im zellulären 32D-Rekonstitutionsmodell, dass die Phosphorylierung von ERK auch unter Midostaurin nicht reduziert wurde (Breitenbuecher et al., 2009a).

Nachdem das transformierende Potential des in die Ba/F3-Zellen eingebrachten Konstruktes FLT3-ITD-627E nachgewiesen worden war (s. 4.1.1, 4.1.2), wurde auf Proteinebene die Aktivierung der Signaltransduktionswege durch die FLT3-ITD-627E und FLT3-EKA-Mutation in Abhängigkeit von Midostaurin im Western Blot getestet. Für die Ba/F3-FLT3-EKA-Zelllinie sollte analysiert werden, ob der FLT3-Rezeptor nur durch die ITD-Integration in die TKD1 aktiviert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass diese Zellen kein IL-3-unabhängiges Wachstum aufweisen (s. 142), wurde die Analyse sowohl in An- und Abwesenheit von IL-3 durchgeführt. Als Kontrolle für Zellen, die eine Inhibition des FLT3-Rezeptors sowie der nachgeschalteten Signalwege unter Midostaurin aufweisen, wurden Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mitgeführt. Das Ergebnis der Western Blot Analyse ist in Abbildung 55 zusammengestellt. Die detektierten Phosphorylierungsstellen sind jeweils entscheidend für die Aktivität des Proteins und unter 2.1 aufgelistet.

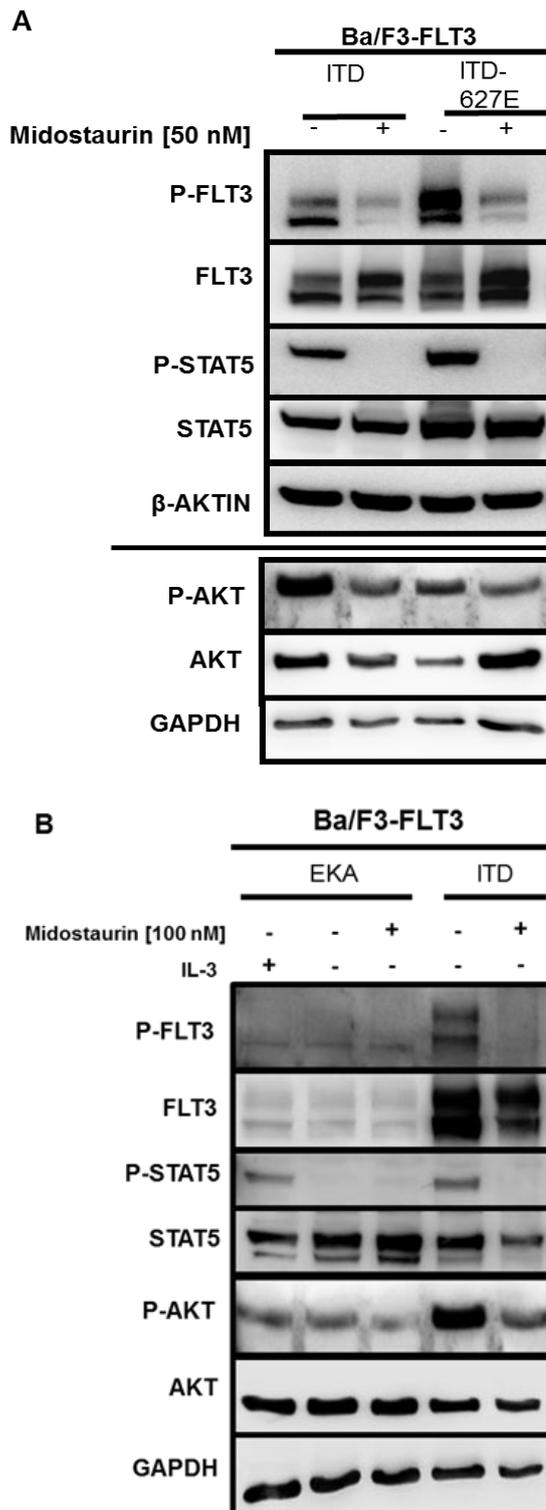


Abbildung 55: Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigen im Gegensatz Ba/F3-FLT3-EKA Zellen eine Aktivierung der Signaltransduktion in Abhängigkeit von der Mutation.

(A) Die Zellen wurden für zwei Stunden mit 50 nM Midostaurin behandelt. Die Trennlinie zeigt an, dass die gleichen Lysate auf einer anderen Membran inkubiert wurden. (B) Die Zellen wurden für 2 Stunden mit 100 nM Midostaurin in der Abwesenheit von IL-3 behandelt. Die Ba/F3-FLT3-ITD-EKA wurden ebenfalls für 2 Stunden mit 10% IL-3 behandelt. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper gegen die Proteine auf der Membran hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH diente als Kontrolle für die gleiche Proteinbeladung der Spuren. Es wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Es wurde jeweils ein repräsentatives Ergebnis zur Darstellung ausgewählt.

Für die FLT3-ITD-627E Zellen zeigte sich in der Abwesenheit von Midostaurin eine starke Aktivierung des FLT3-Rezeptors und der Signalproteine AKT und STAT5. Die 2-stündige Behandlung mit einer Midostaurin-Konzentration (50nM) kurz oberhalb der IC_{50} -Konzentration führte zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von FLT3, STAT5 und AKT. Nach Einführung einer Punktmutation in die Kinasedomäne des FLT3-ITD-627E-Rezeptors zeigten die Zellen keine Phosphorylierung des FLT3-Rezeptors in An- bzw. Abwesenheit von IL-3. Der nachgeschaltete Signalweg, STAT5 war nur in der Anwesenheit von IL-3 aktiviert. Für AKT konnte auch unter IL-3 keine Aktivierung in diesen Zellen festgestellt werden. Bei dem vorhandenen Signal handelt es sich, im Vergleich zum Signal der FLT3-ITD positiven Zellen, um Hintergrundsignale. Diese Analyse der Signaltransduktion und die bereits vorhandenen Ergebnisse (s. 4.1.1 und 4.1.2) legen den Schluss nahe, dass die transformierenden Eigenschaften des FLT3-ITD-627E-Rezeptors abhängig sind von der Kinaseaktivität des Rezeptors und nicht alleine durch die nicht-juxtamembranäre Integration der ITD erfolgen können. Die Kinaseaktivität scheint somit für die Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege unerlässlich.

Die von Breitenbücher *et al.* publizierten Daten zeigten eine dauerhafte ERK-Aktivierung unter Midostaurin-Exposition in 32D-FLT3-ITD-627E Zellen. Diese Aktivierung wurde verursacht durch die phosphorylierungsunabhängige Bindung von GRB-2 an den FLT3-ITD-627E-Rezeptor (Breitenbuecher et al., 2009a). Um zu überprüfen, ob GRB-2 tatsächlich phosphorylierungsunabhängig eine Signaltransduktion vermitteln kann, wurde die ERK-Aktivierung, in der *kinase dead* Mutante des FLT3-ITD-627E-Rezeptors untersucht. Es könnte vermutet werden, dass GRB-2 an den mutierten FLT3-EKA Rezeptor, der keine Phosphorylierung mehr aufweist bindet und somit die ERK-Aktivierung vermittelt. Ba/F3-FLT3-EKA, Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie Ba/F3-FLT3-ITD-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von IL-3 und Midostaurin inkubiert. Das Ergebnis der anschließenden Western Blot Analyse ist in Abbildung 56 zu finden.

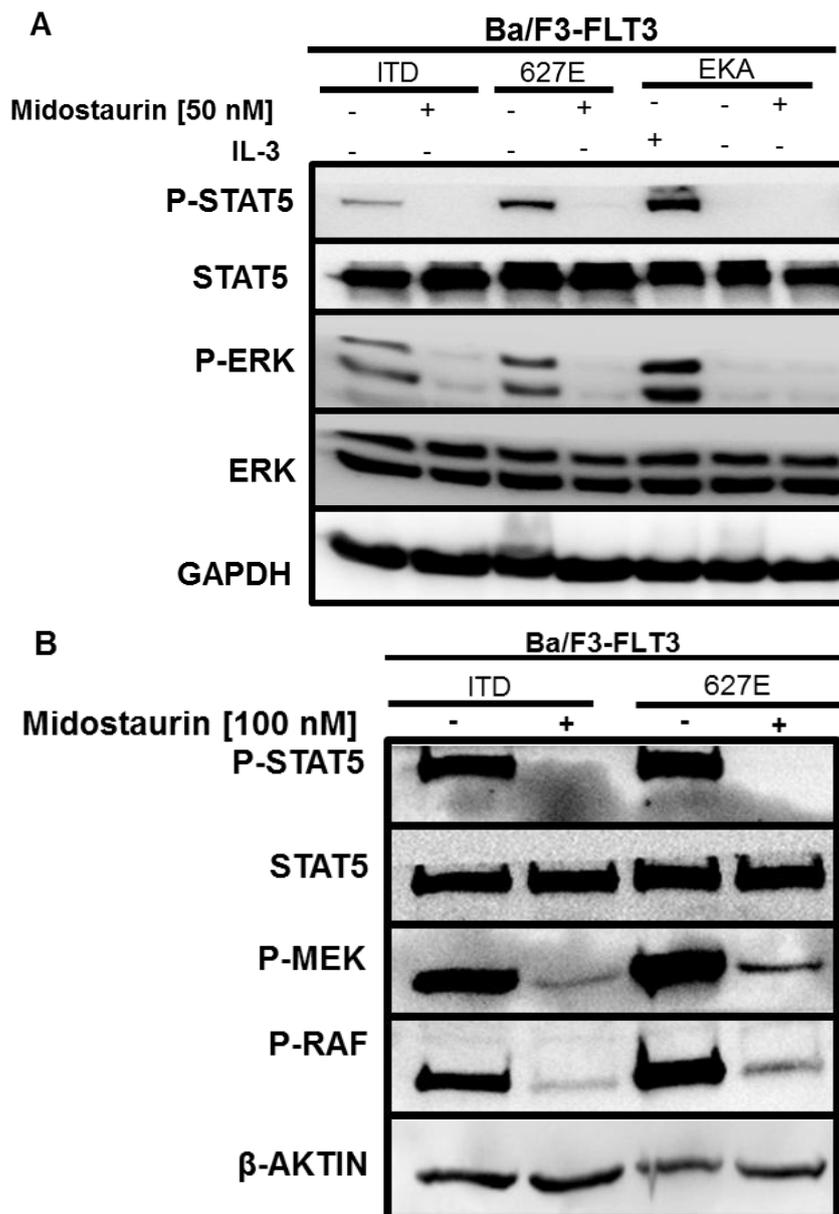


Abbildung 56: Weder Ba/F3-FLT3-ITD-627E noch Ba/F3-FLT3-EKA Zellen zeigen eine aberrante Aktivierung der ERK-Kaskade unter Midostaurin-Exposition.

In (A) wurden die Zellen für zwei Stunden in An- und Abwesenheit von IL-3 (10%) und 50 nM Midostaurin inkubiert. (B) zeigt die Inkubation der Zellen mit 100 nM Midostaurin für 2 Stunden. Nach der Dehybridierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH und β -AKTIN dienten als Kontrollen für die gleiche Proteinbeladung der Spuren. Es wurden jeweils 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Es wurde jeweils ein repräsentativer Blot zur Darstellung ausgewählt.

Es zeigte sich, dass ERK in der *kinase dead* Variante des FLT3-ITD-627E-Rezeptors nur unter IL-3-Zugabe aktiviert ist. Unabhängig vom IL-3-Stimulus konnte keine Aktivierung von ERK und STAT5 festgestellt werden. Ohne Kinaseaktivität scheinen TKD1-ITD-Rezeptoren nicht in der Lage zu sein Signaltransduktion zu vermitteln. Im weiteren Verlauf sollten die transformierenden Eigenschaften der FLT3-ITD-627E untersucht werden. In den Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie in Ba/F3-FLT3-ITD Zellen

konnte unter Midostaurin keine ERK-Phosphorylierung detektiert werden. Auch eine Analyse der übergeordneten Signaltransduktionsproteine von ERK, wie RAF und MEK konnte keinen eindeutigen Hinweis auf eine konstitutive ERK-Aktivierung unter Midostaurin liefern. Die Phosphorylierung von RAF und RAS unter Midostaurin-Exposition der Zellen war sehr deutlich reduziert, wenn auch nicht vollständig. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die FLT3-ITD-627E-Mutation zu einer dauerhaften Aktivierung von ERK führt, die durch Midostaurin-Behandlung inhibiert wird.

Um die strikte Abhängigkeit der nachgeschalteten Signalwege von FLT3 weiter überprüfen zu können und um damit experimentelle Artefakte weitgehend ausschließen zu können, wurde ein FLT3-siRNA *knock down* durchgeführt (s. 3.3.4). Es konnte bereits in früheren Ergebnissen gezeigt werden, dass nach FLT3 *knock down* in Ba/F3-FLT3-ITD-627E-Zellen Apoptose induziert wird (s. 4.1.1). Das Ergebnis der nachgeschalteten Signaltransduktionswege in Abhängigkeit von der Präsenz des FLT3-Rezeptors ist in Abbildung 57 dargestellt.

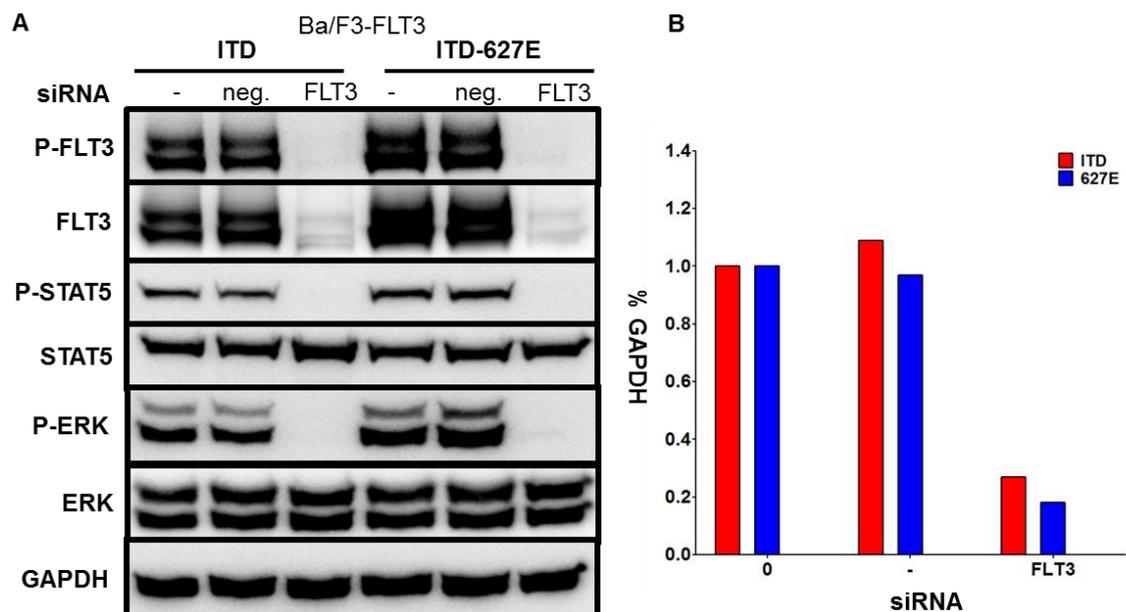


Abbildung 57: Die Aktivierung von STAT5 und ERK ist abhängig von der Präsenz des FLT3-ITD-Rezeptors.

(A) zeigt die Analyse der Proteinlysate acht Stunden nach Durchführung des FLT3-siRNA *knock downs*. Der Ansatz – siRNA wurde ohne Zugabe von siRNA der Prozedur unterzogen. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH diente als Kontrolle für die gleiche Proteinbeladung der Spuren. Es wurden 25 µg Gesamtprotein aufgetragen. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Blots. In (B) dargestellt ist die densitometrische Auswertung des in (A) gezeigten Blots. Gezeigt ist die Expression relativ zur GAPDH-Expression.

Acht Stunden nach Transfektion der siRNA waren nur noch sehr geringe Mengen des FLT3-Proteins im Western Blot zu detektieren. Die densitometrische Auswertung des gezeigten Blots ergab eine Reduktion des FLT3-Signals um 80%, im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit siRNA transfiziert wurde. Der *knock down* von FLT3 war somit erfolgreich. Die Analyse der FLT3-ITD nachgeschalteten Signalwege ERK und STAT5 ergab die bekannte konstitutive Aktivierung der beiden Proteine in den Proben – siRNA und Negativ-siRNA. Unter FLT3 *knock down* war keine Aktivierung von ERK und STAT5 erkennbar. Es konnte somit gezeigt werden, dass die dauerhafte Aktivierung dieser Signalproteine direkt durch den FLT3-ITD bzw. den FLT3-ITD-627E Rezeptor verursacht wird.

4.1.4 Untersuchung der Sensitivität gegenüber Midostaurin

Midostaurin ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der mit ATP um die Bindung an den FLT3-Rezeptor konkurriert, wodurch die Kinaseaktivität des FLT3-Rezeptors inhibiert wird (Weisberg et al., 2002). Eine anhaltende Inhibition der FLT3-Kinase induziert Apoptose in den Zellen, da diese während der Transformation abhängig von der Aktivität des Onkogens geworden sind. Die Abhängigkeit wird auch als *oncogene addiction* bezeichnet (Weinstein, 2002). Innerhalb klinischer Studien wird Midostaurin daher als Therapieoption für FLT3-ITD positive AML-Patienten und für Patienten mit FLT3-Überexpression eingesetzt (Fischer et al., 2010). Breitenbücher *et. al* berichteten von einer primären Resistenz gegenüber Midostaurin, deren Ursache eine Integration der ITD in nicht-juxtamembranäre Bereiche ist. Bei dieser ITD handelte es sich um die FLT3-ITD-627E (Breitenbuecher et al., 2009a). Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie sollte daher auf das Verhalten gegenüber Midostaurin untersucht werden.

Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen wurden dazu in der Gegenwart verschiedener Midostaurin-Konzentrationen kultiviert. Nach 24 und 48 Stunden wurde der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid-Färbung der Zellen bestimmt (s. 3.3.3.2 Teil I). Die Ba/F3-FLT3-ITD Zelllinie diente als Positiv-Kontrolle für die Midostaurin-Sensitivität. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 58 zusammengefasst.

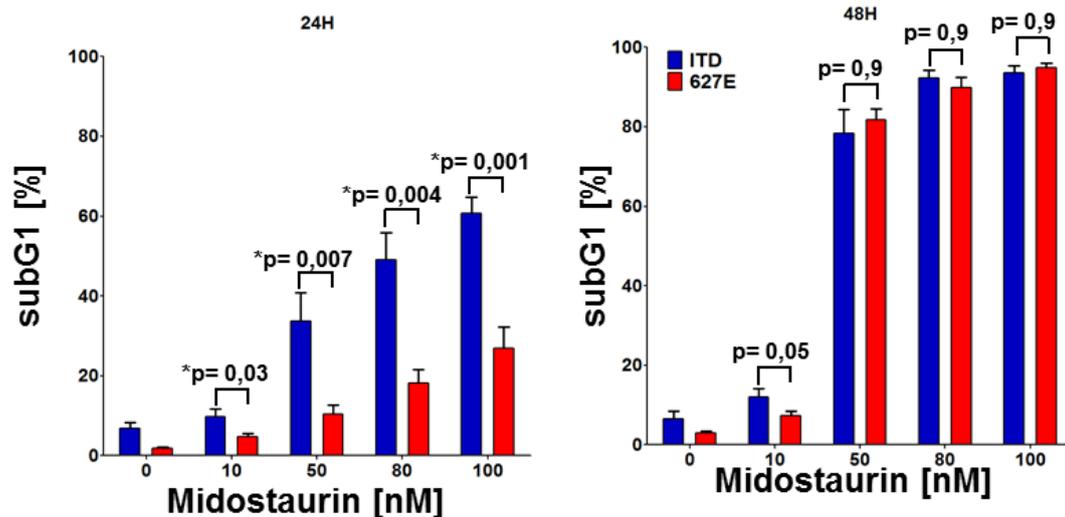


Abbildung 58: Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigen eine differentielle Sensitivität gegenüber Midostaurin.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml mit der angegebenen Midostaurin-Konzentration für 24 und 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist das Ergebnis der Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid als prozentualer Anteil der Zellen in subG1. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Midostaurin-Lösungsmittel DMSO behandelt wurden (0 nM). Dabei wurde so viel DMSO hinzugegeben, wie in der Probe mit der höchsten Midostaurin-Konzentration verwendet wurde. Es ist der Mittelwert + SEM aus mindestens drei unabhängigen Messungen aufgetragen. * markiert die Proben, mit einem p-Wert $< 0,05$ im zweiseitigen t-Test.

Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit verschiedenen Midostaurin-Konzentrationen wurde deutlich, dass die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen im Vergleich zu Ba/F3-FLT3-ITD Zellen zu jedem Zeitpunkt signifikant erniedrigte Apoptoseraten aufwiesen ($p < 0,05$). Es ließ sich also nach einer 24-stündigen Behandlung mit Midostaurin eine differentielle Sensitivität der beiden Zelllinien gegenüber der Substanz feststellen. Dieser Effekt konnte durch längere Expositionszeiten (48 Stunden) jedoch überkommen werden. Insgesamt bestätigen diese Daten die bereits von Breitenbücher *et al.* publizierten Daten über die differentielle Sensitivität der TKD1-ITD gegenüber Midostaurin-Exposition.

4.2 Untersuchung der NFκB-Aktivierung in FLT3-ITD und FLT3-ITD-627E Zelllinien

Der nukleäre Faktor kappa B ist ein Dimer, welcher sich aus fünf Rel-Proteinen, p65/RelA, c-Rel, Relb, NFκ1/p50 und NFκ2/p52, in allen möglichen Kombinationen zusammensetzen kann (Neumann and Naumann, 2007). Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFκB ist vor allem in der Immun- und Entzündungs-Antwort gut studiert (Wang et al., 1996). In der jüngeren Vergangenheit konnte eine Relevanz von NFκB auch für das Zellwachstum sowie für die Onkogenese nachgewiesen werden. Für die AML

konnte gezeigt werden, dass in hämatopoetischen Progenitorzellen (CD34⁺-Zellen) von Patienten im Vergleich zu Zellen von gesunden Probanden eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors vorliegt (Guzman et al., 2001). Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass in 73% der untersuchten AML-Patienten eine Aktivierung des NFκB-Signalweges nachweisbar ist. Die starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors korrelierte mit einer geringen Rate an spontaner Apoptose (Birkenkamp et al., 2004). In Bezug auf eine Aktivierung von NFκB durch FLT3 wurde publiziert, dass eine Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden zu einer NFκB-Aktivierung führt. Ebenso resultierte die Expression einer FLT3-ITD in einem zellulären Rekonstitutionsmodell in der Aktivierung des NFκB-Signalweges (Griessinger et al., 2007).

In den bisherigen Arbeiten wurde nicht untersucht, ob eine FLT3-Inhibition durch Mirdostaurin in der Lage ist die NFκB-Aktivierung zu hemmen. Auch die Frage, ob TKD1-ITDs, wie FLT3-ITD-627E, zu einer Aktivierung dieses Signalweges führen, ist bislang unbeantwortet. Beiden Punkten sollte in den folgenden Experimenten nachgegangen werden.

4.2.1 Behandlung der Zelllinien mit dem IKKβ-Inhibitor V

Der klassische Weg der NFκB-Aktivierung in Zellen erfolgt stufenweise. Nach TNFα-Liganden-Stimulation werden IKK-Komplexe über Phosphorylierung aktiviert. Die aktiven IKK-Komplexe sind nun in der Lage, den Inhibitor von NFκB (**IκBα**) zu phosphorylieren und dadurch für den proteosomalen Abbau zu markieren. Durch den Abbau von IκBα wird das nukleäre Translokationssignal von NFκB frei und NFκB gelangt in den Kern, wo es als Transkriptionsfaktor an der Regulation einer Vielzahl von Zielgenen mitwirkt (Neumann and Naumann, 2007).

Um der Frage nachzugehen, welche Rolle eine NFκB-Aktivierung für Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen besitzt, wurde der Effekt der IκBα-Inhibition in diesen Zellen untersucht. Die Inhibition von IκBα führt zu einer zytoplasmatischen Retention von NFκB. Die Zellen wurden dazu mit einem IKKβ Inhibitor V (**IMD-0354**) behandelt. In verschiedenen Publikationen konnte bereits die Wirksamkeit des Inhibitors auf die NFκB-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen gezeigt werden (Kamon et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Uota et al., 2012). Die Ba/F3-FLT3-ITD sowie Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von IMD-0354 inkubiert und anschließend wurde der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid bestimmt. Zur Kontrolle auf unspezifische und toxische Effekte des Inhibitors wurde eine

FLT3-WT exprimierende Zelllinie mitgeführt, in der keine NFκB-Aktivierung vorliegen sollte. Das Ergebnis der Analyse ist Abbildung 59 zu entnehmen.

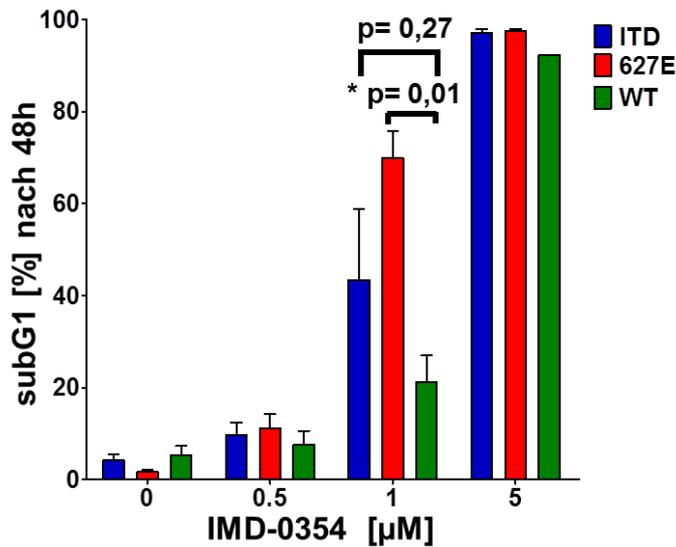


Abbildung 59: FLT3-positive Ba/F3-Zellen zeigen Apoptose nach IKKβ-Inhibition.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml eingesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Die Ba/F3-FLT3-WT Zellen wurden auf 10% IL-3 gehalten. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit IMD-0354 Lösungsmittel DMSO behandelt wurden (0 nM). Dabei wurde so viel DMSO hinzugegeben, wie in der Probe mit der höchsten IMD-0354-Konzentration verwendet wurde. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen in subG1 als Anteil an der Gesamtpopulation zum Zeitpunkt 48 Stunden. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Wiederholungen + SEM. * markiert die Proben, mit einen p-Wert $< 0,05$ im zweiseitigen t-Test.

Die Ba/F3-FLT3-ITD und die Ba/F3-FLT3-ITD-627E wiesen bei einer Konzentration von 1 μM IMD-0354 mehr als 40% apoptotische Zellen auf, die Ba/F3-FLT3-WT Zellen hingegen nur etwa 20%. Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigten bei dieser Konzentration die höchste Apoptoserate aller untersuchten Zellen. Der Unterschied war signifikant mit einem p-Wert von 0,01 im Vergleich zu den Apoptoseraten der WT-Zellen. Bei einer Konzentration von 5 μM IMD-0354 waren in allen drei Zelllinien vergleichbar hohe Anteile an toten Zellen zu detektieren. Insgesamt ist aufgrund der hohen Apoptoserate bei Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen nach Inkubation mit 1 μM IMD-0354 davon auszugehen, dass die Zellen eine Abhängigkeit von dem aktiven NFκB-Weg für ihr Überleben besitzen.

4.2.2 Untersuchung der Translokation von NFκB in den Zellkern

Ist der NFκB-Signalweg aktiviert, transloziert NFκB in den Zellkern. Dort steuert der Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Genen. Im Zytoplasma liegt NFκB stets gebunden an IκBα und somit inaktiv vor (Neumann and Naumann, 2007). Die Lokalisation von NFκB lässt daher Rückschlüsse auf die Aktivierung des Signalweges zu. Bislang liegen keine Daten über die Aktivierung der Signalkaskade in FLT3-Zellen mit einer TKD1-ITD vor. Die Behandlung der Ba/F3-FLT3-ITD-627E mit dem IKKβ-Inhibitor IMD-0354 (s. 4.2.1) hat ergeben, dass die Zellen für ihr Überleben eine Abhängigkeit von der Aktivierung des NFκB-Signalwegs besitzen. Auch die getesteten Ba/F3-FLT3-ITD Zellen zeigten, dass sie für das Überleben vom NFκB-Signal abhängig sind. Um nun die NFκB-Aktivierung in Ba/F3-FLT3-ITD-627E und Ba/F3-FLT3-ITD Zellen direkt nachzuweisen, sollte die Lokalisation von NFκB untersucht werden. Der Transkriptionsfaktor NFκB ist ein Dimer aus verschiedenen Rel-Proteinen, wobei im Folgenden p65 als häufigster Partner im Dimer analysiert wird (Perkins and Gilmore, 2006).

Die Bestimmung der Lokalisation eines Proteins mittels Western Blot erfordert es, eine fraktionierte Proteinisolierung durchzuführen, wodurch die zytoplasmatische und nukleäre Proteinfraction voneinander getrennt werden (s. 3.2.1). Als Ladungskontrolle für das Zytoplasma diene GAPDH, ein Protein, das nicht nukleär lokalisiert ist. Für die Kernfraction wurde als Beladungskontrolle die Histon-Deacetylase-1 (**HDAC-1**) verwendet. Bei HDAC-1 handelt es sich um ein Histon modifizierendes Enzym, welches an der Regulation der Transkription beteiligt ist (Brehm et al., 1998). Die Expression von HDAC-1 ist auf den Nukleus begrenzt. Alle Versuche wurden wie folgt durchgeführt: die Zellen wurden vor jedem Versuch dreimal mit PBS gewaschen, um FCS- oder IL-3-Rückstände zu entfernen und anschließend in Medium aufgenommen, welches nur 0,5% FCS und kein IL-3 enthält. Dies sollte eine unspezifische Aktivierung der p65-Signaltransduktion durch die im FCS enthaltenen Zytokine verhindern.

Zunächst wurde in unbehandelten Zellen geprüft, ob p65 im Kern vorliegt, was Folge einer Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion wäre. Als Kontrolle für eine Zelllinie, bei welcher kein p65 im Kern vorliegen sollte, wurden die Ba/F3-FLT3-WT Zellen mitgeführt. Das Ergebnis der Western Blot Analyse ist in Abbildung 60 dargestellt.

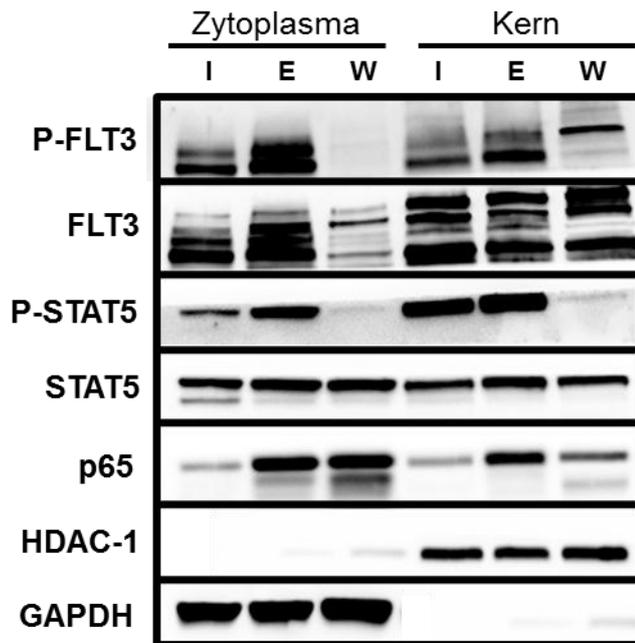


Abbildung 60: In den untersuchten Ba/F3 Zellen ist p65 im Zellkern lokalisiert.

Es wurden 15×10^6 Zellen für die fraktionierte Proteinisolierung eingesetzt. Aufgetragen sind 15 μg der fraktionierten Proteinlysate von unbehandelten und 4 Stunden IL-3 entzogenen Ba/F3-FLT3-ITD (I), Ba/F3-FLT3-ITD-627E (E) und Ba/F3-FLT3 WT-Zellen (W). Die Zellen wurden während der 4 Stunden auf Hungermedium mit nur 0,5% FCS gehalten, um eine Aktivierung von p65 durch Zytokine zu verhindern. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. GAPDH und HDAC-1 dienten als Kontrollen für die gleiche Proteinbeladung der Spuren.

Es zeigte sich, dass p65 bei allen drei untersuchten Zelllinien sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vorlag, was auf eine generelle Aktivierung des NF κ B-Weges in Ba/F3-Zellen hindeutete. Es waren Unterschiede hinsichtlich der Menge an p65 im Kern zu erkennen, wobei in den Ba/F3-FLT3-ITD-627E-Zellen eine starke Aktivierung der NF κ B-Signaltransduktionswege vorzuliegen scheint, da sich in dieser Probe ein starkes Signal von p65 im Kern erkennen ließ. Bei der Betrachtung der Beladungskontrollen GAPDH und HDAC-1 wurde deutlich, dass Zytoplasma- und Kernfraktion sauber voneinander getrennt wurden. Der Nachweis von HDAC-1 ergab in der nukleären Fraktion ein starkes Signal, während sich das GAPDH Signal überwiegend im Zytoplasma zeigte. Bei den P-FLT3 Signalen im Kern handelt es sich um unspezifische Banden des Antikörpers, wie gut durch den Nachweis von totalem FLT3 im Kern ersichtlich wurde. Hier zeigte sich, dass die detektierten Banden im Kern eine andere Höhe aufweisen, als die Banden im Zytoplasma.

Um im Folgenden die spezifische Aktivierung von NF κ B durch den FLT3-Rezeptor zu untersuchen, wurden die Zellen mit Midostaurin behandelt. Eine Midostaurin-Behandlung führt zur Inhibition des FLT3-Rezeptors und damit auch zur Inhibition der nachgeschalteten Signalwege. Sollte die p65-Translokation in den Kern FLT3-ITD

abhängig sein, sollte die Menge an p65 im Kern durch Midostaurin-Behandlung reduziert werden. Das Ergebnis der 16-stündigen Behandlung mit einer Midostaurin-Konzentration (100 nM) oberhalb der IC₅₀-Konzentration ist in Abbildung 61 zusammengefasst.

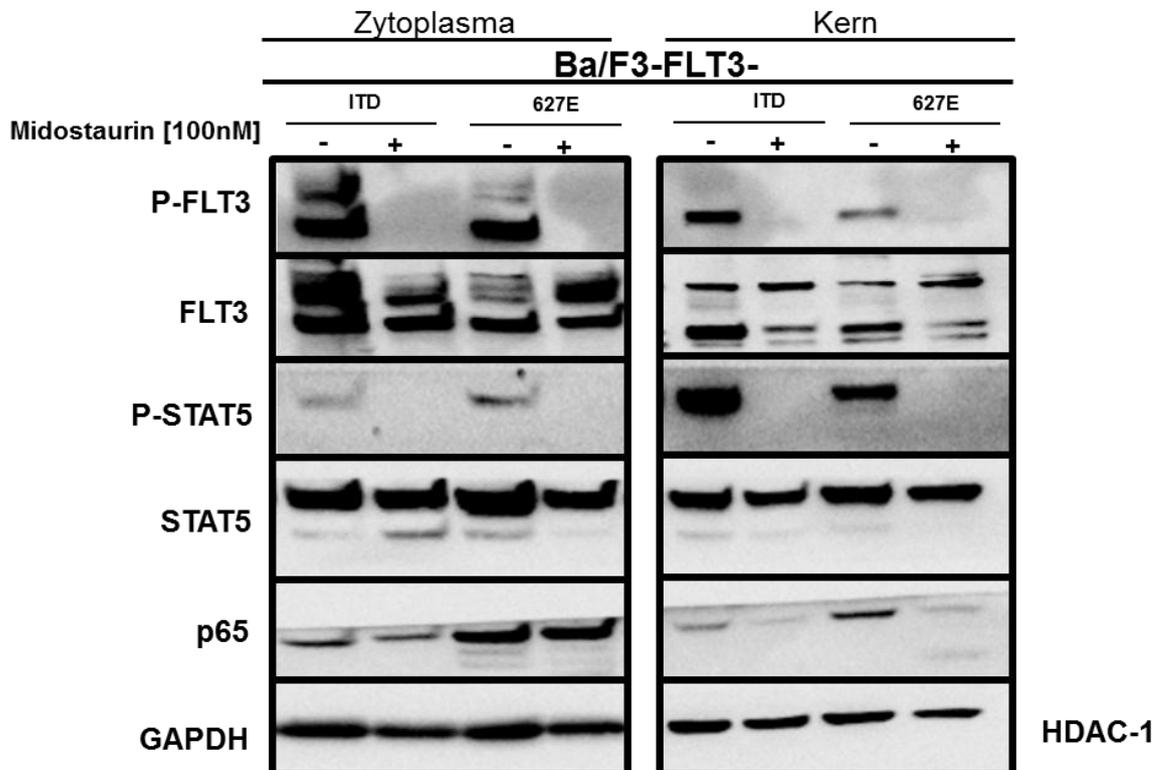


Abbildung 61: Die p65-Translokation in den Zellen ist abhängig von der Aktivität eines FLT3-ITD-Rezeptors.

Es wurden 15×10^6 Zellen für 16 Stunden mit 100 nM Midostaurin behandelt. Aufgetragen sind 15 µg Protein der jeweiligen Proteinfraktion. Zytoplasma und Kernfraktion wurden auf zwei getrennten Membranen analysiert. Die Zellen wurden bereits 2 Stunden vor und während der Behandlung auf Hungermedium mit nur 0,5% FCS gehalten, um eine unspezifische Aktivierung der p65-Signalwege durch Zytokine zu minimieren. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. Für das Zytoplasma erfolgte keine Hybridisierung von HDAC-1 und für die Kernfraktion keine Hybridisierung von GAPDH.

Zunächst konnte der Erfolg der Midostaurin-Inkubation durch die fehlende FLT3- sowie STAT5-Phosphorylierung in diesen Proben festgestellt werden. In der Kernfraktion konnte kein FLT3-Signal detektiert werden. Bei den sichtbaren Banden handelt es sich um unspezifische Banden des Antikörpers. In den Midostaurin behandelten Proben zeigte sich sowohl in Ba/F3-FLT3-ITD als auch in Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen, eine deutliche Reduktion des p65-Signals im Kern, was auf eine Abhängigkeit der p65-Translokation von der FLT3-Signaltransduktion schließen lässt. Es ist jedoch unklar, ob p65 im Zytoplasma retiniert wird, da keine Zunahme der p65-Menge im Zytoplasma erkennbar war. Erneut wurde deutlich, dass die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie bei gleicher Proteinbeladung höhere p65-Mengen im Kern aufweist als Ba/F3-FLT3-ITD

Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass eine Abnahme von p65 im Zellkern zu beobachten war, stellte sich die Frage nach der Kinetik der NF κ B-Translokation. Auf einen Nachweis der Ladungskontrolle HDAC-1 im Zytoplasma sowie von GAPDH in der Kernfraktion wurde verzichtet, da in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Präparation zu einer guten Trennung der beiden Fraktionen führt.

Es ist bekannt, dass die Translokation von p65 in den Kern z.B. nach TNF α -Stimulation innerhalb weniger Minuten erfolgt (Brown et al., 1993). Über die Kinetik der p65 Relokalisation ins Zytoplasma ist bekannt, dass diese in erster Linie von neusynthetisiertem I κ B α vermittelt wird (Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit zur Termination der p65 Aktivität im Kern stellt die proteosomale Degradation des Faktors dar (Saccani et al., 2004). Beide Vorgänge zeigen nach TNF α -Stimulus eine rasche Kinetik (Maine et al., 2007). Um auszuschließen, dass die Relokalisation von p65 bereits nach kurzer Zeit vollzogen ist und stärkere Effekte aufgrund dessen nicht detektiert wurden, wurde eine Kinetik für die Midostaurin-Behandlung durchgeführt. Dabei wurde die Lokalisation von p65 über einen Zeitraum von 0–12 Stunden überprüft. Da es Hinweise gibt, die eine Abhängigkeit der p65-Translokation von der FLT3-ITD-Aktivierung beschreiben (Grosjean-Raillard et al., 2008), wurde diese Kinetik zunächst für Ba/F3-FLT3-ITD Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 62 zusammengefasst.

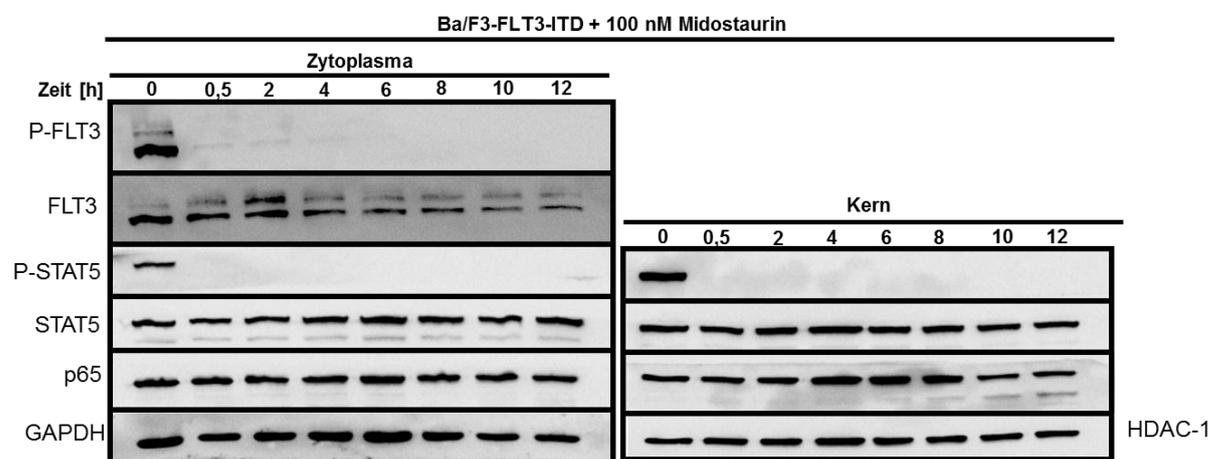


Abbildung 62: Die p65-Translokation zeigt eine Abhängigkeit von der FLT3-ITD-Aktivität.

Es wurden 15×10^6 Ba/F3-FLT3-ITD Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit 100 nM Midostaurin behandelt. Die Zellen wurden während der Behandlung in Zellkulturmedium mit 0,5%igem FCS gehalten. Aufgetragen sind 15 μ g der entsprechenden Proteinfraction. Zytoplasma und Kernfraktion wurden auf separaten Gelen aufgetragen. P-FLT3- und FLT3-Antikörper wurden nicht auf Membran mit der Kernfraktion hybridisiert. Nach der Dehybridisierung der Phospho-Antikörper wurden totale Antikörper hybridisiert, um die Lage der phosphorylierten Proteine zu verifizieren. Als Beladungskontrolle wurde für die Zytoplasma-Fraktion GAPDH und für die Kern-Fraktion HDAC-1 verwendet. Für das Zytoplasma erfolgte keine Hybridisierung von HDAC-1 und für die Kernfraktion keine Hybridisierung von GAPDH.

Die Effektivität der Midostaurin-Behandlung konnte über Reduktion der FLT3-Phosphorylierung und der Inhibition der nachgeschalteten STAT5-Aktivierung in der Zytoplasma-Fraktion festgestellt werden. Bei der Analyse von p65 im Kern wurde deutlich, dass die Lokalisation nur eine geringe Abhängigkeit von der Behandlung mit Midostaurin und damit von der FLT3-Aktivierung zeigt. Es wurde nach 10-12 Stunden Midostaurin-Exposition eine leichte Abnahme des p65-Signals im Zellkern detektiert. Die Beladungskontrolle HDAC-1 ergab eine gleichmäßige Proteinbeladung in den relevanten Proben. Trotz der Abnahme von p65 im Zellkern konnte keine Zunahme von p65 im Zytoplasma zu diesem Zeitpunkt festgestellt werden. Auf einen Nachweis der Ladungskontrolle HDAC-1 im Zytoplasma sowie von GAPDH in der Kernfraktion wurde verzichtet, da in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Präparation zu einer guten Trennung der beiden Fraktionen führt.

In einem nächsten Ansatz sollte nun überprüft werden, ob auch für Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen eine Abhängigkeit der p65-Translokation vom FLT3-Signal besteht. Dazu wurde auch mit diesen Zellen eine Midostaurin-Kinetik erstellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 63 zu sehen.

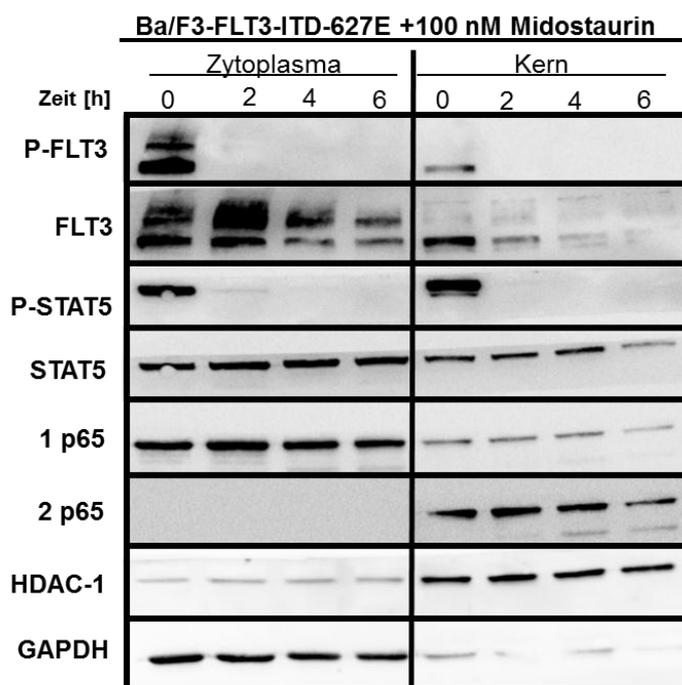


Abbildung 63: Unter Midostaurin-Exposition zeigt sich in Ba/F3-FLT3-ITD-627E-Zellen eine Reduktion von p65 im Kern.

Die 15×10^6 Zellen wurden bereits vor Beginn der Behandlung für 2 Stunden mit Zellkulturmedium inkubiert, das nur 0,5% FCS enthielt. Zytoplasma und Kernfraktion wurden auf einem Gel aufgetragen. **1 p65**) Gemeinsame Detektion des p65-Signals im Zytoplasma und im Kern. **2 p65**) Alleinige Detektion des p65-Signals, die Zytoplasma-Signale wurden nicht analysiert. Die Proteinisolierung erfolgte direkt nach Ende der TKI-Inkubation. Aufgetragen sind 15 μ g der Proteinfraction. Die Proteinfractionen wurden gemeinsam auf einer Membran analysiert.

Die Effektivität der Midostaurin-Behandlung konnte durch die Inhibition der FLT3- und STAT5-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Bei den Banden für P-FLT3 und FLT3 in der Kernfraktion handelt es sich um unspezifische Banden des Antikörpers. Bei der Analyse der p65-Lokalisation in den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen konnte ebenfalls eine gewisse Abhängigkeit der p65-Lokalisation von einer Midostaurin-Behandlung und damit von einer FLT3-Aktivierung beobachtet werden. Nach 6 Stunden zeigte sich eine leichte Reduktion der p65-Menge im Kern. Die gleichmäßige Proteinbeladung der Spuren zu diesem Zeitpunkt wurde durch den Nachweis von HDAC-1 verifiziert. Es zeigte sich bei der Betrachtung der jeweiligen Beladungskontrollen für das Zytoplasma und die Kernfraktion, dass beide Fraktionen ohne größere Verunreinigungen voneinander getrennt werden konnten. Der Nachweis von HDAC-1 ergab in der nukleären Fraktion ein starkes Signal, während sich das GAPDH Signal überwiegend im Zytoplasma zeigte. Trotz der Reduktion von p65 im Kern konnte keine Zunahme von p65 im Zytoplasma festgestellt werden.

Insgesamt konnte mittels fraktionierter Proteinisolierung im Western Blot eine Abhängigkeit der p65-Translokation von der FLT3-Aktivierung für die Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD sowie Ba/F3-FLT3-ITD-627E festgestellt werden. Dabei scheint die Reduktion der p65-Menge im Kern einer zeitlich langsamen Kinetik zu unterliegen, da eine Abnahme erst nach 6 Stunden detektiert werden konnte.

4.2.3 siRNA *knock down* von p65

Eine Aktivierung von p65 in Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie in Ba/F3-FLT3-ITD Zellen konnte in den vorangegangenen Experimenten festgestellt werden (s. 4.2.1). Ein siRNA *knock down* von p65 sollte im Folgenden die Frage beantworten, ob Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen für ihr Überleben von der Aktivierung des p65-Signalweges abhängig sind. Der siRNA *knock down* wurde durchgeführt wie unter 3.3.4 beschrieben.

Zur Analyse des p65 *knock downs* in den Zellen ist es wichtig eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Um Aussagen über die Effizienz der Transfektion machen zu können, wurde ein Ansatz Zellen mit einer Kontroll-siRNA transfiziert, die mit dem Fluorochrom Alexa488 markiert ist. Die Transfektionseffizienz konnte somit am FACS analysiert werden. Bei jeder Transfektion von p65-siRNA wurde diese Kontrolle mitgeführt. In Abbildung 64 ist ein repräsentatives Ergebnis zur Transfektionseffizienz-Messung dargestellt.

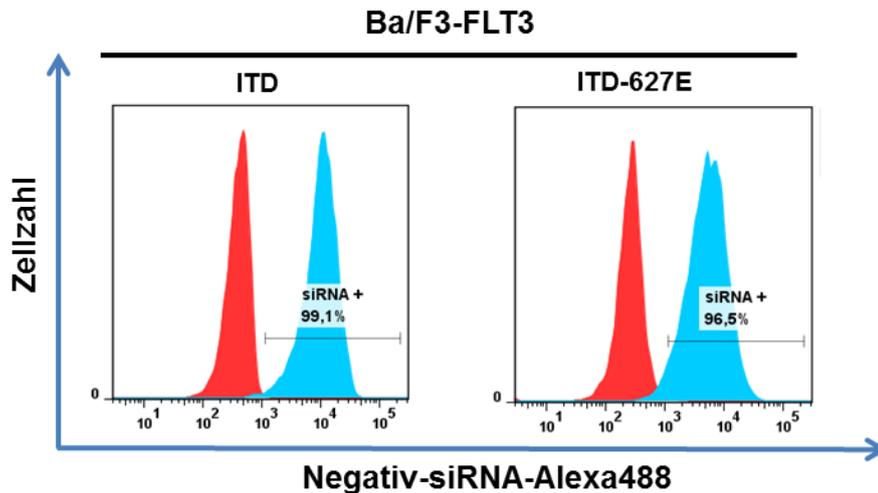


Abbildung 64: Ba/F3-FLT3-ITD positive Zellen zeigen eine hohe Transfektionseffizienz nach p65-siRNA Transfektion.

Es wurden 2×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{M}$ siRNA transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde 4 Stunden nach Durchführung des p65-siRNA *knock downs* bestimmt. Die Bestimmung war möglich, da die transfizierte Negativ-siRNA-Kontrolle eine Alexa488-Fluorochrom-Markierung aufwies. In **rot** dargestellt ist die Signalintensität untransfizierter Zellen, in **blau** die Signalintensität der mit negativ-siRNA transfizierter Zellen. Angegeben ist der Prozentsatz der Alexa488 positiven Zellen an der Gesamtpopulation. Die graphische Darstellung erfolgte mittels der FLOWJO-Software.

Es zeigte sich, dass alle mit Negativ-siRNA transfizierten Zellen einen deutlich nach rechts verschobenen Peak aufweisen, der angibt, dass die Zellen positiv für Alexa488 markierte siRNA transfiziert sind. Bei allen durchgeführten Experimenten lag die Transfektionseffizienz höher als 90% für die untersuchten Ba/F3-FLT3-ITD und die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen.

Nach Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde als nächstes der siRNA *knock down* auf Proteinebene verifiziert. Dazu wurden 48 Stunden nach dem *knock down* Proteinlysate hergestellt und im Western Blot analysiert. Als Kontrolle für unspezifische Effekte, die durch das Einbringen von siRNA entstehen könnten, wurde ein Ansatz mitgeführt, der zuvor mit Negativ-siRNA transfiziert wurde. Für die Sequenz der Negativ-siRNA sollte keine komplementäre Sequenz in der murinen mRNA der Zellen vorhanden sein. Als weitere Kontrolle wurde eine Probe ohne siRNA, 0 siRNA mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind Abbildung 65 A und B dargestellt.

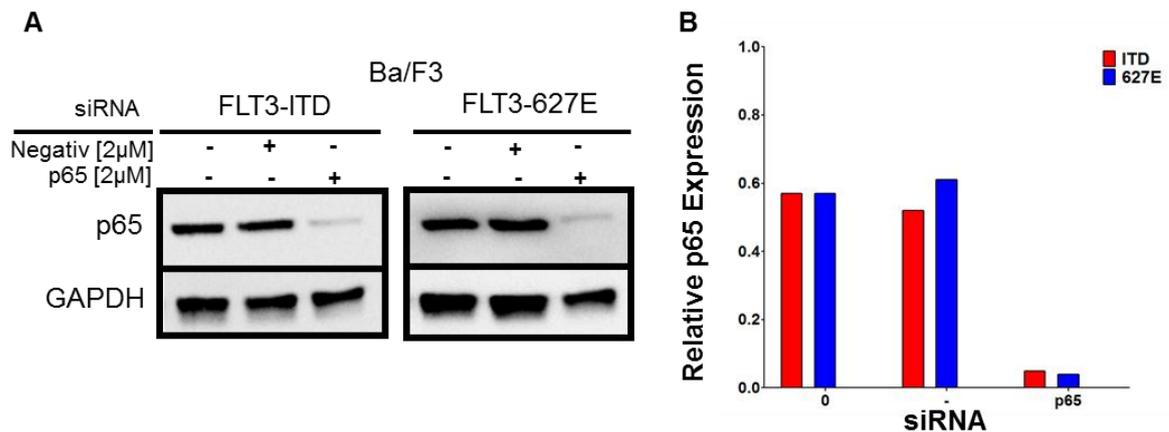


Abbildung 65: Der siRNA-vermittelte *knock down* von p65 in Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen führt zur Reduktion des p65 Proteins.

(A) Western Blot Analyse 48 Stunden nach p65 *knock down*. Es wurden 2×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{M}$ siRNA transfiziert und nach 48 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt. Als Kontrollen dienten 0 siRNA und Negativ-siRNA. Es wurden $25 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aufgetragen. (B) Densitometrische Auswertung des in A dargestellten Western Blots. Gezeigt ist die relative Expression als Ergebnis der folgenden Rechnung $[(\text{Signal p65 Probe} / \text{Signal GAPDH Probe}) \times (\text{Signal GAPDH Probe} / \text{Signal GAPDH (-) siRNA})]$. Die densitometrische Auswertung des Blots erfolgte mit Hilfe der Graphik-Software Image J.

Insgesamt zeigte sich, dass mit den gewählten Bedingungen nach 48 Stunden eine effiziente und langanhaltende Reduktion des p65-Signals erreicht wurde. Bei Verwendung der spezifischen p65-siRNA konnte eine sehr deutliche Reduktion des p65-Signals im Western Blot erreicht werden. Die Transfektion der Zellen mit der Negativ-siRNA führte ebenso wenig zu einer Reduktion der detektierten p65-Menge wie die Durchführung der Prozedur ohne siRNA. Die Banden der p65-Detektion wurden densitometrisch ausgewertet und es ergab sich eine Reduktion der relativen Expression des p65-Signals um den Faktor 10 für beide Zelllinien. Mit dieser Methode konnte somit die Relevanz von p65 für das Überleben der Zellen Stunden überprüft werden.

Die Ba/F3-FLT3-ITD sowie Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen wurden dazu auf den DNA-Gehalt 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mittels Propidiumiodid analysiert (s. 3.3.3.2). Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich zum Analyse-Zeitpunkt in der subG1-Phase befanden, ist in Abbildung 66 dargestellt.

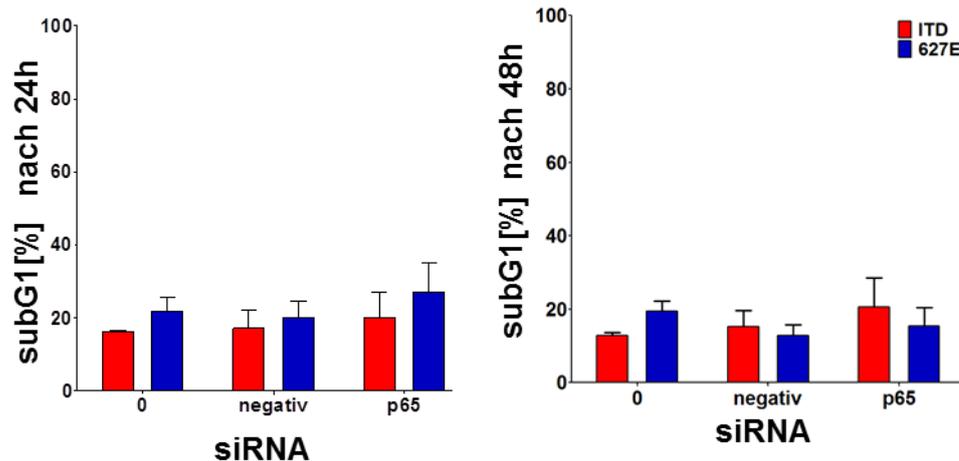


Abbildung 66: Der siRNA-vermittelte *knock down* von p65 zeigt keinen direkten Einfluss auf das Überleben der Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen.

Propidiumiodid-Färbung der beiden Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD (ITD) und Ba/F3-FLT3-ITD-627E (627E) nach 24 Stunden und 48 Stunden. Es wurden 2×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{M}$ siRNA transfiziert und nach der Transfektion mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml kultiviert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation als Mittelwert aus drei Replikaten + SEM.

Der *knock down* von p65 in beiden untersuchten Zelllinien zeigte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden keine offensichtlichen Auswirkungen auf das Überleben der Zellen. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen nach p65-siRNA Transfektion war vergleichbar mit dem Anteil apoptotischer Zellen in den beiden Kontroll-Ansätzen. Mit p65-siRNA transfizierte Zellen zeigten 25% apoptotische Zellen nach 24 Stunden, bei den Kontroll-Zellen befanden sich 20% der Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus. Parallel zur Analyse des DNA-Gehalts wurde zu jedem durchgeführten Experiment der *knock down* auch auf Proteinebene mittels Western Blot festgestellt.

Es ist bekannt, dass das Vorhandensein einer FLT3-ITD einen schlechten prognostischen Marker in der AML darstellt und diese Patienten häufig nur sehr schlecht auf Chemotherapie ansprechen (Kayser et al., 2009). Besonders Patienten mit nicht-juxtamembranärer Integration der Duplikation zeigen ein sehr geringes Ansprechen auf Chemotherapeutika. Innerhalb dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ba/F3-FLT3-ITD-627E nach 24-stündiger Behandlung nur eine geringe Sensitivität gegenüber einer Midostaurin-Behandlung (s. 4.1.4) zeigen. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl in Ba/F3-FLT3-ITD als auch in Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen eine konstitutive Aktivierung des NF κ B-Signalweges vorliegt. Im Folgenden wurde nun der Frage nachgegangen, ob ein *knock down* von p65 die Sensitivität gegenüber Midostaurin erhöhen kann. Dazu wurde ein siRNA-vermittelter p65 *knock down* durchgeführt und die Zellen im Anschluss mit einer Midostaurin-Konzentration behandelt, die unter der bestimmten IC₅₀-Konzentrationen liegt, um apoptotische Ef-

fekte nicht nur die Wirkung des TKI zu erreichen. Der DNA-Gehalt wurde 24 und 48 Stunden nach der siRNA Transfektion mittels Propidiumdiodid-Färbung analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 67 zusammengefasst.

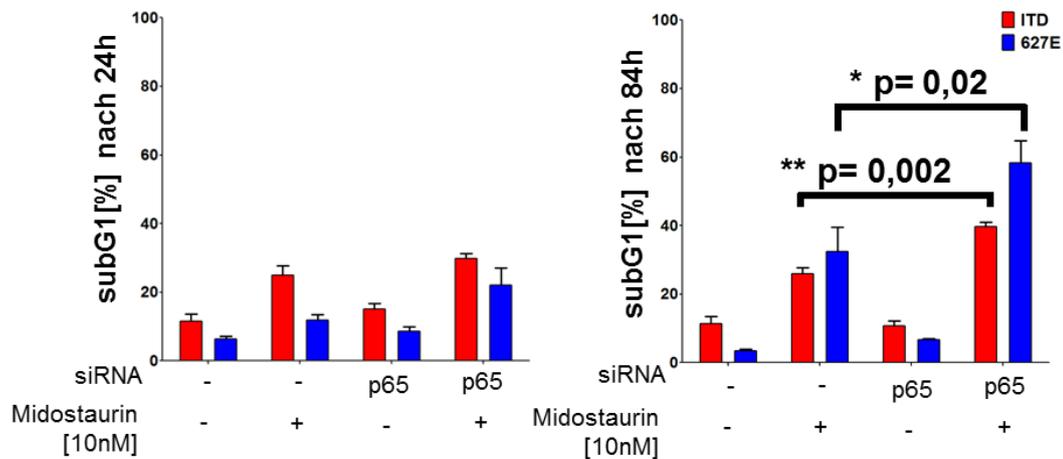


Abbildung 67: Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigen nach p65-siRNA *knock down* und Midostaurin-Inkubation eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen.

Die Zellen wurden 4 Stunden nach *knock down* von p65 für 24 oder 48 Stunden mit 10 nM Midostaurin behandelt. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit einer Dichte von 4×10^5 Zellen/ml ausgesät. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (subG1) an der Gesamtpopulation. „0 siRNA“ repräsentiert die Proben, die ohne Zugabe von siRNA der Prozedur unterzogen wurden. „-siRNA“ stellt die Probe dar, welche mit der Negativ-siRNA transfiziert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten + SEM. * markiert die Proben mit einem p-Wert $< 0,05$ im zweiseitigen t-Test.

Für die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie zeigte sich bekannte differentielle Sensitivität gegenüber Midostaurin nach 24 Stunden (s. 4.1.4). Ba/F3-FLT3-ITD Zellen wiesen ohne Transfektion von siRNA nach 24-stündiger Inkubation von Midostaurin, höhere Apoptoseraten als Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen auf. Auch in diesem Versuch war dieser Effekt nach 48 Stunden nicht mehr erkennbar. Bei Betrachtung der 48 Stunden Werte war unter Midostaurin-Behandlung ein additiver Effekt in den Proben zu erkennen, in denen zuvor p65 ausgeschaltet wurde. Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen wiesen in der Probe mit negativ siRNA und Midostaurin 32% apoptotische Zellen auf, während die Apoptose bei Zellen mit p65 *knock down* und Midostaurin-Behandlung bei 58% lag. Dieser Unterschied war signifikant mit einem p-Wert von 0,02. Auch bei den Ba/F3-FLT3-ITD Zellen zeigte sich ein additiver Effekt. Die Negativ-siRNA Kontrolle wies unter Midostaurin-Exposition 26% apoptotische Zellen auf, die p65-siRNA Probe unter Midostaurin hingegen 40% Apoptose. Hier war der Unterschied hoch signifikant mit einem p-Wert von 0,002. Diese Daten deuteten an, dass p65 eine Relevanz für das Überleben der Zellen unter Midostaurin-Inkubation zukommt.

5 Diskussion

Für den kontrollierten Ablauf der Hämatopoese ist eine strenge Regulation der Tyrosinkinase-Aktivität unerlässlich. Kommt es aufgrund von Mutationen in einer Tyrosinkinase zum Verlust der regulatorischen Kontrolle, ist die Folge meist eine konstitutiv aktive Signaltransduktion. Die Zellen erlangen als Konsequenz die Fähigkeit zur gesteigerten, faktorunabhängigen Proliferation und zur Inaktivierung des Differenzierungsprogramms, was zum Entstehen von malignen hämatopoetischen Erkrankungen führen kann. Um Patienten mit einer solchen Erkrankung effektive zielgerichtete Therapien anbieten zu können, ist es entscheidend die Aktivierungsmuster sowie die pathophysiologischen Prozesse innerhalb der entarteten Zellen zu charakterisieren. Zelluläre Rekonstitutionsmodelle bieten hinsichtlich der Vergleichbarkeit zum humanen System ein valides System, in welchem aktivierte Signaltransduktionswege analysiert werden können und mögliche Ansätze zur molekularen Therapie in Form von Inhibitoren getestet werden können.

5.1 Charakterisierung der Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD-627E und Ba/F3-FLT3-EKA

Dysregulationen des FLT3-Rezeptors sind sehr häufig mit dem Auftreten hämatologischer Erkrankungen assoziiert. Eine starke Expression des Rezeptors kann bei Patienten mit akuter lymphatischer oder akuter myeloischer Leukämie nachgewiesen werden. Mutationen im *FLT3*-Gen können bei mehreren malignen hämatologischen Erkrankungen nachgewiesen werden (Rosnet et al., 1996). So zeigen 3% der ALL-, 10% der Myelodysplasie- und 25-45% der AML-Patienten Mutationen in der *FLT3*-Sequenz (Rosnet et al., 1996). Der FLT3-Rezeptor gehört zu den am häufigsten von Mutationen betroffenen Proteinen in der AML, wobei sich 2 Arten von Mutationen unterscheiden lassen. Punktmutationen ereignen sich in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors. Eine Mutation in dem am häufigsten betroffenen Kodon 835 kann in 7-10% aller AML-Patienten detektiert werden (Abu-Duhier et al., 2001). Neben dem Kodon 835 können Punktmutationen auch in anderen Bereichen innerhalb der *FLT3*-Sequenz nachgewiesen werden (Spiekermann et al., 2002; Thiede et al., 2002; Kindler et al., 2005). Die Integration von internen Tandem Duplikationen innerhalb der *FLT3*-Sequenz stellt eine weitere Art der FLT3-Mutation dar. Es kommt dabei zu einer Verdoppelung bestimmter Teilbereich der *FLT3*-Sequenz, die in Leserichtung in die Sequenz integrieren (Nakao et al., 1996). Durch die Integration der internen Tandem

Duplikation in die JM-Domäne, verliert diese die regulatorische Funktion, was in einem konstitutiv aktiven FLT3-Rezeptor resultiert (Fenski et al., 2000; Kelly et al., 2002; Kiyoi et al., 2002). Die Expression einer FLT3-ITD im zellulären Rekonstitutionsmodell führt zur Aktivierung der RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade sowie von PI3K/AKT und STAT5 (Schmidt-Arras et al., 2004; Brandts et al., 2005; Choudhary et al., 2007). Weiterhin kommt es durch die Expression einer FLT3-ITD in den Zellen zu Faktor-unabhängigem sowie zu klonalem Wachstum mit der Ausbildung von Kolonien im Weichagar (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002). Die Aktivierung des FLT3-ITD-Rezeptors und damit auch der untergeordneten Signalwege kann durch FLT3-spezifische Inhibitoren unterbrochen werden, was zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen führt. Das Vorhandensein einer FLT3-ITD stellt für Patienten einen negativen prognostischen Marker für das Gesamtüberleben dar (Abu-Duhier et al., 2000).

Innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Fischer konnte durch eine breit angelegte Analyse zur Integration von internen Tandem Duplikationen festgestellt werden, dass 216 der 753 untersuchten AML-Patienten eine ITD-Integration in nicht-juxtamembranäre Bereiche aufweisen (Breitenbuecher et al., 2009b). Diese Art der Integration stellt ein Novum innerhalb der ITD-Integrationen dar. Es konnte gezeigt werden, dass 29% der internen Tandem Duplikationen eine nicht-juxtamenbranäre Lokalisation aufweisen und in der Tyrosinkinase-Domäne 1 auftreten. Innerhalb dieser Domäne kann die Integration in verschiedene Bereiche mit unterschiedlicher Häufigkeit beobachtet werden: 24.6% im β 1-Blatt, 2% in der Nukleotid-Bindungsschleife, 2.1% im β 2-Blatt. Diese Beobachtung hat klinische Relevanz, da die Gruppe der TKD-ITD Patienten mit besonders schlechter Prognose für das Überleben der AML-Patienten assoziiert ist (Kayser et al., 2009). Es ist daher notwendig mehr über die Signaltransduktion von TKD1-ITDs zu erfahren, um effektive Therapieansätze entwickeln zu können. Bislang wurde bereits eine TKD1-ITD im zellulären Rekonstitutionsmodell näher analysiert. Die FLT3-ITD-627E weist eine 31 Aminosäuren lange Duplikation auf, welche in das β 2-Blatt integriert. An der Integrationsstelle 627 kommt es zu einer Substitution von Alanin zu Glutamin. Die Charakterisierung dieser ITD im 32D-Zellkulturmodell ergab eine konstitutive Aktivierung des FLT3-Rezeptors. Ebenso zeigte sich eine dauerhafte Aktivierung der Signalwege AKT, ERK und STAT5. Unter Behandlung mit dem FLT3-selektiven Inhibitor Midostaurin zeigte sich eine Inhibition der FLT3-Aktivität, die zum Verlust der AKT- und STAT5-Phosphorylierung führte. Die Aktivierung von ERK konnte durch Midostaurin nicht beeinflusst werden, was einen ersten Hinweis lieferte, dass die TKD1-ITDs im Vergleich zu JM-ITDs eine unterschiedliche Signaltransduktion aufweisen könnten (Breitenbuecher et al., 2009a). Für

FLT3-ITD-627E Zellen konnte gezeigt werden, dass unter Midostaurin-Behandlung GRB-2-Bindungsstellen am FLT3-Rezeptor keine Phosphorylierung mehr aufweisen, es aber dennoch zu einer Bindung von GRB-2 an den Rezeptor kommt. Diese Bindung scheint über einen Phosphorylierungs-unabhängigen Mechanismus vermittelt zu werden und scheint weiterhin verantwortlich zu sein für die bestehende ERK-Aktivierung unter Midostaurin-Exposition der Zellen. Weiterhin zeigten die 32D-Zellen, welche mit der ITD-627E transfiziert waren, eine differentielle Sensitivität gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren. In Vergleich zu JM-ITD exprimierenden Zellen zeigten ITD-627E exprimierende Zellen deutlich weniger apoptotische Zellen nach 24 und 48 Stunden TKI-Inkubation. Auch dies lieferte einen Hinweis auf eine veränderte Biologie der TKD1-ITDs (Breitenbuecher et al., 2009a).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob der FLT3-ITD-627E-Rezeptor auch ohne Kinaseaktivität, also nur die Integration der ITD in die Tyrosinkinase-Domäne, in der Lage ist Signaltransduktion zu vermitteln und ob eine Transformation auch ohne Kinaseaktivität des FLT3-ITD-627E Rezeptors induziert werden kann. Dafür wurden die FLT3-ITD-627E-Mutation in Ba/F3-Zellen transfiziert und anschließend charakterisiert. Das Ba/F3-System stellt dabei ein häufig publiziertes und anerkanntes Zellmodell dar (Ishiko et al., 2005; Masson et al., 2009). Weiterhin wurde ein Konstrukt des FLT3-ITD-627E-Rezeptors generiert, bei dem die Kinaseaktivität aufgehoben war. Dazu wurde an der Aminosäureposition 644 eine Substitution von Lysin zu Alanin mittels PCR eingeführt. Die Punktmutation zerstört die Ionenbindung der Aminosäuren 644 und 611, die jedoch kritisch für die Nukleotid-Bindung im FLT3-Rezeptor und somit entscheidend für die Kinaseaktivität des Rezeptors ist (Griffith et al., 2004). In verschiedenen Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Substitution des Lysins an dieser Position zum Verlust der Kinaseaktivität führt (Schmidt-Arras et al., 2004; Schessl et al., 2005; Sargin et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit führte die Expression einer *kinase dead* Variante des FLT3-ITD-627-Rezeptors zum Verlust der transformierenden Eigenschaften des Rezeptors. Die Zellen wiesen kein IL-3-unabhängiges Wachstum auf (s. Abb. S. **143**), ebenso konnte kein klonales Wachstum der Zellen im Weichagar in der Abwesenheit von IL-3 festgestellt werden (s. Abb. S. **147**). Im Western Blot konnte zwar eine Expression von FLT3 nachgewiesen werden, es konnte jedoch keine Phosphorylierung des Rezeptors detektiert werden. Ebenso konnte keine Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege wie AKT, ERK und STAT5 in Abwesenheit von IL-3 detektiert werden. In Gegenwart von IL-3 zeigte sich eine Aktivierung der Signalwege AKT, ERK sowie STAT5 (s. Abb. S. **149, 151**). Diese Aktivierung ist darauf zurückzuführen, dass Ba/F3 Zellen für ihr Wachstum auf IL-3 angewiesen sind und die Zugabe von IL-3 zur Aktivierung essenti-

eller Signalwege wie AKT und ERK führt (Palacios et al., 1984; Palacios and Steinmetz, 1985). Insgesamt lassen die erhobenen Daten der *kinase dead* Variante des FLT3-ITD-627E Rezeptors vermuten, dass die Kinaseaktivität essentiell für die transformierenden Eigenschaften des Rezeptors ist. Die Integration einer Tandem Duplikation in das β 2-Blatt der Tyrosinkinase-Domäne alleine ist also nicht ausreichend, um die Signaltransduktion in Abwesenheit einer Kinaseaktivität zu vermitteln.

Bezüglich der GRB-2-Bindung an den *kinase dead*-Rezeptor wurden keine Experimente durchgeführt, da aufgrund fehlender Transformation (s. Abb. S. 147, 149, 151) davon auszugehen war, dass GRB-2 nicht an den unphosphorylierten Rezeptor bindet. Die Aktivierung von ERK wird normalerweise durch die Bindung des Adapterproteins GRB-2 an phosphorylierte Tyrosin-Reste eines Rezeptors vermittelt, was zur Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran führt. SOS ist dann in der Lage RAS, zu aktivieren, was zur Aktivierung von RAF, MEK und ERK führt (Marais and Marshall, 1996). Für die ersten Aktivierungsschritte der ERK-Kaskade ist somit die alleinige Bindung von GRB-2 an den Rezeptor erforderlich. Die Durchführung einer Co-Immunpräzipitation von GRB-2 und dem FLT3-Rezeptor könnte in zukünftigen Experimenten den Beweis liefern, dass GRB-2 unter Midostaurin Exposition der Zellen nicht an den FLT3-ITD-627EKA-Rezeptor bindet. Die Ursache für die aberrante Bindung von GRB-2 an den FLT3-ITD-627E-Rezeptor nach Midostaurin-Behandlung konnte somit nicht aufgeklärt werden. Die Insertion einer neuen GRB-2-Bindungsstelle durch die ITD-Sequenz konnte nach Sequenzüberprüfung jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass die SH2-Domäne von GRB-2 mit hoher Affinität die Sequenz pY-E/Q-N- Ψ erkennt, wobei Ψ einen hydrophoben Aminosäurerest darstellt (Kessels et al., 2002). Für die SH3-Domäne von GRB-2 sind 2 Motive bekannt, die mit großer Affinität erkannt werden, die C-terminale SH-Domäne bindet P-X-X-P, während die N-terminale Domäne das R-X-X-K Motiv bevorzugt (Berry et al., 2002). Keines dieser drei Motive wurde durch die ITD-Integration verdoppelt. Es ist denkbar, dass die von Breitenbücher *et al.* gefundene aberrante Bindung von GRB-2 durch residuelle Phosphorylierung am FLT3-Rezeptor vermittelt wurde. Es bleibt festzuhalten, dass FLT3-TKD-ITDs für ihre Transformation ebenso auf die Kinaseaktivität angewiesen sind wie die FLT3-ITD-Rezeptoren.

Zur weiteren Charakterisierung der Signaltransduktion wurde die FLT3-ITD-627E-Mutation ebenfalls in Ba/F3-Zellen transfiziert. Die Charakterisierung der Zelllinie ergab, dass die Zellen klonales Zytokin-unabhängiges Wachstum zeigten (s. Abb. S. 143, 145, 147). Im Western Blot konnte die konstitutive Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege in Abhängigkeit von FLT3-ITD festgestellt werden

(s. Abb. S. **145**, **149**, **152**). Alle untersuchten Signaltransduktionswege zeigten nach dem siRNA-vermittelten *knock down* von FLT3 eine fehlende Aktivierung (s. Abb. S. **152**). Diese Daten stehen im Einklang mit den bisher zu JM-ITD Zelllinien publizierten Ergebnissen. Bei der Charakterisierung von JM-ITDs konnte ebenfalls Wachstum der Zellen in Zytokin-freiem Medium, Koloniebildung in Abwesenheit von Zytokinen im Methylzellulose-Medium sowie die konstitutive Aktivierung des Rezeptors und der nachgeschalteten Signalwege festgestellt werden (Fenski et al., 2000; Mizuki et al., 2000; Kelly et al., 2002; Schmidt-Arras et al., 2004; Brandts et al., 2005).

FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren stellen eine neue Behandlungsoption für AML-Patienten da. Verschiedene FLT3-Inhibitoren wurden in präklinischen Studien untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass die Substanzen zu einer Inhibition der FLT3-Autophosphorylierung führen. Als Folge dieser FLT3-Inhibition kommt es zur Inhibition von nachgeordneten Signaltransduktionswegen, was in einer Proliferationsinhibition und der Induktion von Apoptose resultiert (Levis et al., 2002; Weisberg et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors Midostaurin zunächst auf Signaltransduktionsebene auf Ba/F3-FLT3-ITD-627E sowie auf Ba/F3-FLT3-ITD Zellen überprüft. Unter Midostaurin-Exposition der Zellen wurde eine Reduktion der FLT3-Phosphorylierung sowie der Phosphorylierung des nachgeschalteten Signalweges STAT5 festgestellt. (s. Abb. S. **149**).

Aus Daten der FLT3-ITD-627E Expression im murinen 32D-System ist bekannt, dass die Midostaurin-Exposition nicht in einer Reduktion der ERK-Phosphorylierung resultiert (Breitenbuecher et al., 2009a). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter Midostaurin-Inkubation eine Reduktion der ERK-Aktivierung, wobei die ERK-übergeordneten Signalmoleküle RAF und MEK in ihrer Aktivität nicht vollständig inhibiert wurden (s. Abb. S. **151**). Die residuelle Phosphorylierung von RAF und MEK in den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen war jedoch zu gering, um Unterschiede im Vergleich zur Ba/F3-FLT3-ITD Zellen aufzulösen. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse zu denen von *Breitenbuecher et al.* kann unterschiedliche Ursachen haben. Bei der 32D-Zelllinie handelt es sich um eine myeloische Zelllinie (Migliaccio et al., 1989), während die Ba/F3-Zelllinie lymphatischen Ursprungs ist (Palacios and Steinmetz, 1985). Der unterschiedliche Differenzierungszustand der Zellen könnte dazu führen, dass neben FLT3-spezifischen Mechanismen im 32D-Modell auch andere Mechanismen und Signalwege an der ERK-Aktivierung beteiligt sind, die in den Ba/F3-Zellen nicht aktiviert werden. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die unterschiedliche Adhärenz der beiden Suspensions-Zelllinien eine Rolle bei ERK-Aktivierung spielt. Im Verlauf der Kultivierung der Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zeigte sich, dass diese eine starke Neigung zur Adhärenz besitzen. Es ist bekannt, dass Adhäsion und ERK-Aktivierung sich

gegenseitig beeinflussen (Aplin et al., 2002), somit ist es möglich, dass die Adhäsion die ERK-Aktivierung moduliert.

Um die Sensitivität der generierten Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie gegenüber Midostaurin zu überprüfen, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des FLT3-Inhibitors inkubiert. Der DNA-Gehalt wurde mittels Propidiumiodid zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden analysiert. Als Vergleich für eine Midostaurin-sensitive Zelllinie wurden Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mitgeführt. Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zelllinie zeigte 24 Stunden nach Inkubation mit Midostaurin eine ausgeprägte Resistenz im Vergleich zu der Ba/F3-FLT3-ITD Zelllinie. Nach 48 Stunden jedoch war der Effekt nicht mehr ausgeprägt, die beiden Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E wiesen vergleichbar hohe Apoptoseraten unter Midostaurin-Exposition auf (s. Abb. S. 154). Diese Daten stehen zum Teil im Kontrast zu den von Breitenbücher *et al.* publizierten Daten, im 32D-Rekonstitutionsmodell konnte hier die differentielle Sensitivität gegenüber verschiedenen FLT3-Inhibitoren u.a. auch gegenüber Midostaurin auch nach 48 Stunden festgestellt werden. Die FLT3-ITD-627E Zellen wiesen dabei erheblich geringere Apoptoseraten auf als die FLT3-ITD Zellen. Eine mögliche Ursache für die höheren Apoptoseraten in den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen nach 48 Stunden könnte sein, dass Ba/F3 Zellen generell sensitiver auf Tyrosinkinase-Inhibitoren reagieren und die IC_{50} -Konzentrationen für verschiedene Inhibitoren geringer sind als in 32D Zellen. Die Verwendung unterschiedlicher parentaler Zelllinie könnte diese Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Midostaurin somit erklären. Aufgrund der Tatsache, dass die Resistenz nach 24 Stunden zwischen den beiden zellulären Rekonstitutionsmodellen jedoch vergleichbar war, konnten die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen weiteren Analysen zugeführt werden. Insgesamt wurde die Funktionalität der neu generierten Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen festgestellt, die Zelllinie konnte somit für weitere Experimente verwendet werden. Weiterhin kann festgehalten werden, dass die Kinaseaktivität des FLT3-ITD-627E-Rezeptors, für den transformierenden Phänotyp der Mutation verantwortlich ist.

5.2 Rolle der Aktivierung des NFκB-Signalweges in Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen

NFκB-Transkriptionsfaktoren kontrollieren die Expression vieler verschiedener Gene, denen entscheidende Funktionen in Entzündungen, Zellüberleben und Wachstum zu kommen. Im klassischen NFκB-Signalweg liegen die Familienmitglieder p65 und p50 als Heterodimer im Zytoplasma unstimulierter Zellen vor (Chen et al., 1998). Durch die Bindung des NFκB-Inhibitors, IκBα, wird eine Translokation des Dimers in den Nukleus verhindert. Die Aktivierung der Zellen durch Stress oder Zytokine resultiert in der Phosphorylierung von IκBα an Serin-Resten, was zum proteosomalen Abbau des Inhibitors führt. Die Phosphorylierung von IκBα wird vermittelt durch IκBα-Kinasen, auch IKK genannt. Die Folge ist die Translokation von p65/p50 in den Zellkern, wo die Aktivierung von Zielgenen erfolgt (Neumann and Naumann, 2007). Neben der klassischen Aktivierung durch Zytokine kann NFκB auch durch Onkogene aktiviert werden. Der Aktivierung von NFκB kommt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von malignen hämatopoetischen Erkrankungen zu. Eine konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktor konnte beim Hodgkin Lymphom, der akuten lymphatischen Leukämie und beim myelodysplastischen Syndrom nachgewiesen werden (Kordes et al., 2000; Staudt, 2000; Fabre et al., 2007). Für AML-Patienten konnte eine nukleäre Lokalisation von NFκB in 47–100% der Fälle nachgewiesen werden (Guzman et al., 2001; Bueso-Ramos et al., 2004). Dabei zeigte sich in AML-Blasten eine Aktivierung von NFκB. Eine Inhibition des NFκB-Signalweges über Inhibition des proteosomalen Abbaus führte zur Induktion von Apoptose in diesen Zellen (Guzman et al., 2001). In einer weiteren Arbeit resultierte die *ex vivo* IKK-Inhibition in der Inhibition der NFκB-Aktivität und weiterhin in der Induktion von Apoptose von AML-Zellen (Frelin et al., 2005). NFκB stellt somit eine interessante Zielstruktur für die Behandlung der AML dar.

Die Datenlage über den Zusammenhang einer NFκB-Aktivierung durch FLT3-ITD ist bislang nicht eindeutig. Im humanen Zellkulturmodell konnte zunächst eine Aktivierung des NFκB-Signalweges in FLT3-ITD-positiven Zelllinien festgestellt werden. Die Inhibition der FLT3-ITD Aktivierung führte zu einer Inhibition der IKK-Aktivierung, was in einer verringerten NFκB-Lokalisation im Kern resultierte (Grosjean-Raillard et al., 2008). Eine weitere Arbeit konnte die Aktivierung des NFκB-Signalweges in FLT3-ITD-positiven Zellen ebenfalls bestätigen. Die Inhibition von FLT3-ITD führte auch hier zu einer Inhibition der NFκB-Kerntranslokation. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IκBα zu einer reduzierten Zellviabilität sowie zur Induktion von Apoptose führt (Griessinger et al., 2007). Eine weitere Arbeit stellte eine Aktivierung von NFκB in AML-Blasten fest, die über die Signaltransduktionswege RAS und PI3K vermittelt wird. Eine Inhibition der NFκB-Aktivierung in FLT3-ITD positiven Blasten

mittels FLT3-Inhibitor hatte hier allerdings keinen Effekt auf die NFκB-Aktivität. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer FLT3-ITD und der NFκB-Aktivierung konnte in dieser Arbeit also nicht festgestellt werden (Birkenkamp et al., 2004). Die Wirkung eines in einer klinischen Studie verwendeten FLT3-Inhibitors auf die NFκB-Aktivierung wurde bislang nur von Ahmad *et al.* näher untersucht. Die Kombination eines NFκB-Inhibitors (CDDO-Me) mit Midostaurin resultierte in gesteigerten Apoptoseraten in FLT3-ITD positiven Zellen. Ein alleiniger Effekt von Midostaurin auf die NFκB-Lokalisation wurde jedoch nicht untersucht (Ahmad et al., 2010).

Aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage zur NFκB-Aktivierung durch FLT3-ITD und wegen fehlender Daten über eine NFκB-Aktivierung durch FLT3-ITD-627E, sollte dies im vorliegenden Teil der Arbeit analysiert werden. Als Ausgangsexperiment wurden zunächst Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD627E Zellen auf ihre Abhängigkeit von der NFκB-Aktivierung überprüft. Die Zellen wurden dazu mit einem IKKβ-Inhibitor, IMD-0354, behandelt. Als Kontrollen für mögliche unspezifische Effekte des Inhibitors wurde die Ba/F3-FLT3-WT Zelllinien mitgeführt. Der verwendete Inhibitor wurde bereits in Publikationen erfolgreich zur Inhibition der NFκB-Signaltransduktion im hämatopoetischen System eingesetzt. In den Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Inhibitors zur Inhibition der transkriptionalen Aktivität von NFκB sowie zur Reduktion der DNA-Bindungsaktivität führt (Kamon et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Uota et al., 2012). Die Daten der vorliegenden Arbeit zur Behandlung der Zellen mit dem IKKβ-Inhibitor ergaben eine Induktion von Apoptose in Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor (s. Abb. S. 156). Bei einer Konzentration von 1 μM IMD-0354 zeigten Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen signifikant erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zur Ba/F3-FLT3-ITD Zellen nach 48 Stunden. Die Wildtyp-Kontrolle wies hingegen nur eine leicht gesteigerte Grundapoptose auf. Somit konnte eine Abhängigkeit der Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E von der NFκB-Signaltransduktion festgestellt werden, wobei die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen eine verstärkte Abhängigkeit zeigten. Diese Daten deuten somit einen Effekt der NFκB-Signaltransduktion für das Überleben von FLT3-ITD positiven Zelllinien an, was mit den oben erwähnten Publikationen im Einklang ist. Eine mögliche Erklärung für die Abhängigkeit der Zellen von der NFκB-Aktivierung, könnte die Inhibition der durch NFκB-vermittelten Expression von antiapoptotischen Proteinen sein. Aktiviertes NFκB ist in der Lage die Expression einer Vielzahl an antiapoptotischer Gene zu steuern, darunter sind Proteine wie BCL-XL, cIAP1, cIAP2 und A20 (Kucharczak et al., 2003).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte auf Proteinebene geklärt werden, ob in den verwendeten Ba/F3-Zelllinien eine NFκB-Aktivierung in Form einer p65-Kernlokalisierung vorlag. Als Nachweismethode wurde die fraktionierte Proteinisolierung gewählt, bei der die Proteinfractionen Zytoplasma und Kern getrennt voneinander im Western Blot betrachtet werden können. Vor Durchführung der Proteinextraktion wurden die Zellen für 4 Stunden auf Zellkulturmedium mit nur 0,5% FCS und ohne IL-3 gehalten, um eine unspezifische Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion zu verhindern. Als Kontrolle für eine Zelllinie in der keine NFκB-Aktivierung vorliegen sollte, wurden Ba/F3-FLT3-WT Zellen mitgeführt. In den betrachteten Kernfraktionen der Ba/F3-FLT3-ITD, Ba/F3-FLT3-ITD-627E und Ba/F3-FLT3-WT Zellen konnte das Vorhandensein von p65 in allen Zelllinien festgestellt werden (s. Abb. S. **158**). Das Vorhandensein eines schwachen Signals von p65 im Kern der Ba/F3-FLT3-WT Zellen könnte andeuten, dass bei der Durchführung des Serum- und Zytokinentzugs nicht das gesamte IL-3 entfernt wurde. Hinsichtlich der p65-Mengen im Zellkern ergaben sich große Unterschiede. So zeigten die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen bei vergleichbarer Beladung eine erheblich größere Menge an p65 im Zellkern als die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen, bei denen nur eine geringe Menge p65 im Zellkern detektiert werden konnte. Dies könnte auf eine stärkere Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion durch die FLT3-ITD-627E hindeuten, was die stärkere Abhängigkeit der Zelllinie von der NFκB-Signaltransduktion für das Überleben erklären könnte (s. Abb. S. **156**). Die erhobenen Daten für FLT3-ITD sind in Einklang mit einer bereits publizierten Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von IκBα zur Induktion von Apoptose in FLT3-ITD positiven Zellen führt (Griessinger et al., 2007). Für TKD1-ITD Zellen sind bislang keine Vergleichsdaten bekannt.

Nachdem die allgemeine Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion festgestellt werden konnte, wurde nun der Einfluss der FLT3-Inhibition auf die p65-Translokation untersucht. Dazu wurden die Ba/F3-FLT3-ITD sowie Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen mit dem FLT3-Inhibitor Midostaurin behandelt. Der Erfolg der Behandlung wurde durch die Reduktion der FLT3-Phosphorylierung und der STAT5-Phosphorylierung überprüft. Bei 16-stündiger Behandlung mit 100 nM Midostaurin, was einer Konzentration deutlich über der IC₅₀-Konzentration entspricht, konnte eine leichte Reduktion der p65-Menge im Zellkern beobachtet werden (s. Abb. S. **159**). Die Effekte waren jedoch gering ausgeprägt. Erneut zeigte sich im direkten Vergleich der beiden Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E, dass die FLT3-ITD-627E exprimierende Zelllinie eine deutlich stärkere NFκB-Aktivierung besitzt, da hier bei vergleichbarer Beladung der Spuren eine größere Menge an p65 im Kern vorlag. Bereits in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition einer FLT3-ITD zu einer Verringerung der NFκB-

Kernlokalisierung führt (Griessinger et al., 2007; Grosjean-Raillard et al., 2008). Eine anschließende Kinetik der Midostaurin-Behandlung sollte die Frage beantworten, ab wann eine p65-Reduktion im Kern festgestellt werden kann. Dazu wurden zunächst Ba/F3-FLT3-ITD Zellen mit 100 nM Midostaurin für verschiedene Zeitpunkte behandelt. Nach 10 bis 12 Stunden konnte eine leichte Reduktion der p65-Menge im Zellkern festgestellt werden (s. Abb. S. **160**). In den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen trat 6 Stunden nach Midostaurin-Inkubation eine leichte Reduktion der p65-Menge im Kern auf (s. Abb. S. **161**). Insgesamt konnten jedoch nur geringe Veränderungen der p65-Level im Zellkern festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren überraschend, da aufgrund der publizierten Arbeiten und den Daten der IKK-Inhibition von einer deutlicheren Reduktion der p65-Menge im Zellkern ausgegangen worden war. Zur Termination von p65-vermittelter Genexpression ist eine Vielzahl an regulatorischen Prozessen bekannt, darunter die I κ B α -vermittelte negative Rückkopplung. I κ B α wird in Abhängigkeit von der NF κ B-Aktivität neu synthetisiert und in den Nukleus transportiert, wo es in der Lage ist, NF κ B von der DNA zu lösen und zurück ins Zytoplasma zu bringen (Arenzana-Seisdedos et al., 1995, 1997). Ein weiterer Mechanismus um die p65-Aktivität zu beenden, ist die Proteosom-vermittelte Degradation des Transkriptionsfaktors (Saccani et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p65 an bestimmten Serin-Resten zur Rekrutierung von Faktoren führt, die eine Bindung von Ubiquitin-Ligasen ermöglichen und somit den Abbau einleiten (Maine et al., 2007). Weiterhin ist bekannt, dass die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung und Ubiquitinierung, sich gegenseitig beeinflussen und somit die p65-Aktivität regulieren können (Li et al., 2012). Es ist somit belegt, dass die Menge an p65 im Kern im Zuge der zellulären Regulation verändert wird. Für die Kinetik der Regulation von I κ B α gezeigt werden, dass das Protein innerhalb von 80 Minuten nach TNF α -Stimulation wieder neu synthetisiert wurde. Die proteosomale Degradation von p65 nach TNF α -Stimulation zeigt ebenfalls eine rasche Kinetik, die p65-Mengen im Zellkern werden in einem Zeitfenster von 2 Stunden nach dem Stimulus wieder zurück auf Normalniveau reguliert (Maine et al., 2007). Insgesamt kann festgehalten werden, dass die NF κ B-Aktivität durch eine Vielzahl an Mechanismen sehr schnell und effizient reguliert werden kann. Die Tatsache, dass durch die Midostaurin vermittelte Inhibition von FLT3-ITD nur eine geringe Reduktion von p65 im Kern nachgewiesen werden konnte, ist somit nicht nur auf die Kinetik der Translokation und Regulation von p65 zurückzuführen. Es bleibt zu bedenken, dass die erhobenen Daten der p65-Regulation meist nach TNF α -Stimulation detektiert wurden. Es ist durchaus bekannt, dass der Stimulus entscheidend ist, für die transkriptionale Aktivität von p65 sowie für die Expression ver-

schiedener Zielgene (Perkins and Gilmore, 2006). Die Tatsache, dass nur eine geringe p65-Reduktion nachweisbar war, liegt vermutlich an der gewählten Nachweismethode. Eine fraktionierte Proteinisolierung und die Auftrennung der Lysate im Western Blot scheinen sich nur bedingt für den Nachweis einer p65-Reduktion im Kern zu eignen. In den meisten publizierten Arbeiten wird ein sogenannter *electromobility shift assay* verwendet, um eine Reduktion der p65-Aktivität zu detektieren (Birkenkamp et al., 2004; Griessinger et al., 2007). Bei dieser Methode wird die DNA-Bindung von p65 mittels einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, welche eine p65-Erkennungssequenz enthält, überprüft. Durch die Verwendung einer radioaktiven Markierung ist diese Methode sehr sensitiv und es können bereits geringe Unterschiede gut aufgelöst werden. Eine Etablierung der EMSA-Methode war aus zeitlichen Gründen im Umfang dieser Arbeit nicht mehr möglich, hätte aber eventuell erlaubt, die geringen Unterschiede in der Translokation besser aufzulösen. Eine weitere Möglichkeit eine Reduktion der p65-Aktivität nach FLT3-Inhibitor-Inkubation zu analysieren, wäre die Bestimmung der Expression von NFκB-Zielgenen mittels quantitativer RT-PCR. Eine Vielzahl an NFκB-Zielgenen ist bekannt, dazu zählen die antiapoptotischen Proteine c-IAP1, c-IAP2 und BCL-XL und die proliferationsförderenden Faktoren IL-2, GM-CSF oder Zellzyklus-Regulatoren wie CyclinD1 und c-myc (Kucharczak et al., 2003). In einer Arbeit von Guzman *et al.* wurde die Aktivität von p65 in CD34⁺-AML Blasten durch die Expression der Zielgene c-IAP2 sowie IL-6 bestimmt (Guzman et al., 2001). In einer anderen Arbeit wurde das Transaktivierungspotential von NFκB anhand von IκBα mRNA-Level bestimmt (Frelin et al., 2005). Es ist weiterhin bekannt, dass p65 einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen unterliegt unter anderem Phosphorylierung (Zhong et al., 1998), Acetylierung (Chen et al., 2001), Methylierung (Yang et al., 2009) und Ubiquitinierung (Saccani et al., 2004). Die Veränderungen haben verschiedene Effekte auf das nukleäre p65, sowohl die Stärke als auch die Dauer der p65 transkriptionellen Genexpression werden beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von p65-Aktivität wäre der Nachweis der p65-Phosphorylierung gewesen. Die Phosphorylierung von p65 beeinflusst die Aktivität des Proteins, dabei scheint es entscheidend zu sein, welche Kinase die p65-Phosphorylierung vermittelt. Eine von IKKβ-vermittelte Phosphorylierung am Serin-Rest 536 gilt als aktivitätsförderend (Campbell and Perkins, 2004; Viatour et al., 2005). In Makrophagen konnte nachgewiesen werden, dass die von IKKα-vermittelte Phosphorylierung von p65 an Serin 538 zu einer proteolytischen Degradation und zur Beendigung der NFκB-Antwort führt (Lawrence et al., 2005). Die Phosphorylierungsstelle Serin 276 von p65 erhöht die transkriptionelle Aktivität und fördert die Assoziation mit Co-Aktivatoren (Perkins and Gilmore, 2006). Der Nachweis von phosphorylierten p65-Serin 276 war aufgrund nicht geeigneter Antikör-

per nicht möglich. Der alternative Nachweis der Phosphorylierung von p65 an Serin 536 zeigte keine eindeutigen reproduzierbaren Ergebnissen, die Daten wurden daher nicht in diese Arbeit einbezogen.

Um dennoch weitere Erkenntnisse über die Relevanz der NFκB-Aktivierung in FLT3-ITD positiven Zellen zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein siRNA-vermittelter *knock down* von p65 durchgeführt. Ein siRNA-vermittelter *knock down* hat gegenüber der Verwendung von Inhibitoren den Vorteil, dass ein Protein sehr spezifisch ausgeschaltet werden kann und unspezifische Nebeneffekte meist ausgeschlossen werden können. Ein *knock out* des murinen *p65*-Gens in Mäusen führt zur embryonalen Letalität am Tag E15 und E16 der Entwicklung aufgrund einer fatalen Hepatozyten Apoptose (Beg and Baltimore, 1996). In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass der gezielte *knock down* von p65 oder Einheiten des IKK-Komplexes in Tumorzellen zur Induktion von Apoptose führt. Der *knock down* von p65 im Zellkulturmodell eines Myelodysplastischen Syndrom resultierte nach 72 Stunden in Apoptose (Braun et al., 2006). In einer Brustkrebs Zelllinie zeigte der *knock down* sowie der *knock out* der Untereinheiten des IKK-Komplexes ebenfalls apoptotische Zellen (Farhana et al., 2011). In malignen B-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der *knock down* von p65 Apoptose auslöst (Piva et al., 2005). In einer Vielzahl von anderen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die chemische Inhibition verschiedener Komponenten des NFκB-Signalweges zur Induktion von Apoptose führt. Bislang liegen keine Daten über einen *knock down* von p65 in AML-Zellen vor. In der vorliegenden Arbeit wurde ein siRNA-vermittelter *knock down* von p65 durchgeführt, um die Relevanz von p65 für das Überleben der Ba/F3-FLT3-ITD sowie der Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zu überprüfen. Die Effizienz der Transfektion wurde bei jedem Experiment bestimmt und war stets höher als 90% (s. Abb. S. 163). Auf Proteinebene konnte 48 Stunden nach siRNA-Transfektion eine Reduktion von p65 um den Faktor 10 im Vergleich zu Kontroll-Zellen festgestellt werden. Der siRNA-vermittelte *knock down* war somit effizient und über einen längeren Zeitraum stabil (s. Abb. S. 164). Die Induktion von Apoptose wurde durch DNA-Gehalts-Analysen mittels Propidiumiodid 24 und 48 Stunden nach Durchführung der Transfektion bestimmt. Ein Effekt auf das Überleben war für keine der beiden Zelllinien zu beobachten, beide Zelllinien zeigten keine gesteigerte Apoptoseraten (s. Abb. S. 165). Eine Relevanz von p65 für das Überleben der Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen unter normalen Kulturbedingungen war somit nicht nachweisbar. Aufgrund der hohen Effizienz der siRNA-Transfektion und der deutlichen Proteinreduktion im Western Blot, ist davon auszugehen, dass die Methode gut etabliert war und die Ergebnisse eine gute Aussage über die Relevanz der p65-Expression für das Überleben der Zellen zulassen. Eine mögli-

che Erklärung für die fehlende Relevanz der p65-Expression könnten kompensatorische Mechanismen der Zelle sein, die die fehlende p65-Expression ausgleichen. Die Mitglieder der NF κ B-Familie weisen große Homologien auf und so wäre es denkbar, dass p50 die fehlende Expression von p65 kompensieren kann. Um einen kompensatorischen Effekt auszuschließen, hätte ein doppelter *knock down* sowohl von p65 als auch von p50 durchgeführt werden können. Die Kompensation des p65-Verlusts könnte auch die Diskrepanz dieser Daten mit den Daten der IMD-0354 Behandlung erklären. IMD-0354 inhibiert die Aktivität der I κ B α -Kinasen, wodurch die Aktivität von p50 und p65 inhibiert wird, was einen kompensatorischen Effekt der beiden Rel-Proteine ausschließt. Eine weitere Möglichkeit die Relevanz von p65 für die Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen zu überprüfen wäre eine Analyse der p65-vermittelten Zielgen-Expression durchzuführen. Diese hätte zum einen Hinweise auf kompensatorische Effekte geben können, aber auch die biologische Konsequenz der p65-Reduktion klären können.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob der p65-siRNA *knock down* zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem FLT3-Inhibitor Midostaurin führt. Diese Fragestellung ist besonders für die Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen interessant, da gezeigt werden konnte, dass die Integration der ITD in die TKD1-Domäne des FLT3-Rezeptors den Zellen eine gewisse Resistenz gegenüber verschiedenen Inhibitoren verleiht (s. Abb. S. **154**) (Breitenbuecher et al., 2009a). Aus klinischen Daten ist ebenfalls bekannt, dass die TKD1-ITD positiven Patienten sehr schlecht auf vorhandene Therapie-Optionen ansprechen (Kayser et al., 2009). Es wäre denkbar, dass die Aktivierung des NF κ B Signalweges einen Anteil an der Resistenz-Entwicklung der Zellen besitzt. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen eine größere Menge an p65 im Zellkern aufweisen als Ba/F3-FLT3-ITD Zellen (s. Abb. S. **158**, **159**). Es wurde zunächst ein siRNA-vermittelter *knock down* von p65 durchgeführt und 4 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 10 nM Midostaurin inkubiert. Diese Konzentration liegt unter der bestimmten IC₅₀-Konzentration für Ba/F3-FLT3-ITD Zellen und wurde gewählt, da diese Konzentration nur geringe Apoptoseraten induziert. Die Bestimmung des DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid wurde 24 und 48 Stunden nach Zugabe von Midostaurin durchgeführt. In den Ba/F3-FLT3-ITD-627E Zellen führte die Zugabe von Midostaurin nach p65-Reduktion zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen, im Vergleich zu Zellen ohne p65 *knock down*. Die Ba/F3-FLT3-ITD-627E wurden durch den *knock down* von p65 sensitiver gegenüber der Midostaurin-Behandlung. Die Ba/F3-FLT3-ITD Zellen zeigten in siRNA-behandelten Zellen nach Midostaurin-Exposition ebenfalls signifikant mehr Apoptose, als Zellen die nur mit Mi-

dostaurin behandelt wurden. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass p65 Anteil an der Resistenz der Zellen gegenüber dem Tyrosinkinase-Inhibitor Midostaurin hat. Vermutlich ist p65 an der Expression Resistenz-vermittelnder Proteine beteiligt oder aktiviert Signaltransduktionswege. Zu den NFκB-Zielgenen zählen unter anderem die antiapoptotischen Proteine c-IAP1, c-IAP2 und BCL-XL (Kucharczak et al., 2003).

6 Ausblick

Die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten konnten eine Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion in den Zelllinien Ba/F3-FLT3-ITD und Ba/F3-FLT3-ITD-627E nachweisen. Der siRNA-vermittelte *knock down* von p65 resultierte bei gleichzeitiger Gabe von niedrigen Konzentrationen des FLT3-Inhibitors Midostaurin in einer Steigerung der Apoptoserate. Diese Daten bieten daher eventuell einen neuen Ansatzpunkt bei der Behandlung von AML-Patienten, wenn in zukünftigen *ex vivo* Experimenten belegt werden kann, dass die p65-Inhibition bei gleichzeitiger Gabe von Midostaurin einen additiven Effekt aufweist. In diesem Fall wäre es denkbar, NFκB-Inhibitoren mit FLT3-Tyrosinkinase-Inhibitoren zu kombinieren. Die Wirksamkeit des Proteosomen-Inhibitors Bortezomib beruht unter anderem auf der Inhibition der NFκB-Aktivierung, indem der proteosomale Abbau von IκBα verhindert wird (Chen et al., 2011). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Bortezomib bereits bei Verwendung von Konzentrationen im nanomolaren Bereich, Apoptose in AML-Zellen auslösen kann (Dai et al., 2003b; Attar et al., 2008). Bortezomib wird bereits im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung von malignen hämatopoetischen Erkrankungen eingesetzt (Messinger et al., 2010; Lancet et al., 2011; Santos et al., 2011). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Proteasomen-Inhibitoren und Chemotherapie in leukämischen Stammzellen Apoptose induziert (Guzman et al., 2001, 2002). Als Monotherapie zeigte Bortezomib nur eine geringe Wirkung, weshalb es als Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika in klinischen Studien an AML-Patienten eingesetzt wird (Attar et al., 2008).

Die Daten dieser Arbeit könnten somit zukünftig dazu beitragen in präklinischen FLT3-ITD-positiven AML-Modellen die Kombination der p65-Inhibition mit der Inhibition des FLT3- Rezeptors zu testen.

7 Zusammenfassung/ Summary

Es ist allgemein akzeptiert, dass die kontinuierliche Inhibition onkogener Kinasen durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Voraussetzung für den klinischen Erfolg ist. Kürzlich wurde dies durch Daten in Frage gestellt, die vermuten lassen, dass eine kurzzeitige potente Inhibition der BCR-ABL Kinase ausreichend ist, um Apoptose irreversibel auszulösen. **Teil I** der Arbeit sollte den molekularen Mechanismus aufklären, welcher der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis TKI (**HD-TKI**) zu Grunde liegt. Zu diesem Zweck wurden murine Ba/F3-BCR-ABL/ -FLT3-ITD/ -JAK2V617F Zellen, sowie humane Leukämiezelllinien verwendet und mit den entsprechenden TKI behandelt. Der Nachweis der aktivierten Caspase3 in Western Blot und Durchfluss-Zytometrie zeigte, dass die Apoptoseinduktion unabhängig von der verwendeten TKI-Konzentration, nur durch die TKI-Expositionszeit determiniert wird. Repetitives *Wash Out* nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI rette die Zellen vor Apoptoseinduktion, was durch verschiedene Apoptose-Assays gezeigt wurde. Die Expression von ABC-Transporterproteinen in K562 Zellen verlieh Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen Imatinib-Konzentrationen. Dies wurde durch pharmakologische Inhibition von ABCB1 revertiert. Detaillierte Analysen der BCR-ABL Signaltransduktion in Western Blot und Durchfluss-Zytometrie nach repetitivem *Wash Out* zeigten eine differentielle Rekonstitution sowie Inhibition der BCR-ABL Phosphorylierung Y177 und Y412, sowie von STAT5 und CRKL. Dabei korrelierten die Phosphorylierungen von BCR-ABL (Y412) und STAT5 mit dem Überleben der Zellen.

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären TKI-Konzentrationen mittels HPLC und IUR-Assay (^{14}C -Imatinib) ergaben eine starke intrazelluläre Anreicherung der TKI nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI, verbunden mit der TKI-Freisetzung über die Zeit nach dem *Wash Out*. Diese Daten identifizierten somit die verlängerte intrazelluläre TKI-Aktivität verbunden mit einer protrahierten Kinaseinhibition nach der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation als den Mechanismus, der der Apoptoseinduktion zu Grunde liegt. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass eine kontinuierliche Kinaseinhibition erforderlich ist, um in leukämischen Zellen Apoptose auszulösen. Aus klinischer Sicht könnten diese Daten dazu beitragen, dass künftig neben der Plasma- auch die intrazelluläre TKI-Konzentration bestimmt wird, um die TKI-Dosierung in klinischen Studien zu optimieren. Letztlich ist die Bioverfügbarkeit einer Substanz in der Zelle entscheidend für die zu erzielende therapeutische Wirkung.

FLT3-Mutationen sind häufig assoziiert mit dem Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie. Im FLT3-Rezeptor können Punktmutationen und interne Tandem Duplikationen (ITD) unterschieden werden. Die Integration der ITD kann nicht nur in juxtamembranäre Bereiche erfolgen, sondern auch in die Tyrosinkinase-Domäne 1. Der FLT3-ITD-627E Rezeptor ist eine prototypische Mutante einer TKD1-ITD. Bislang ist nicht bekannt, ob die Integration der ITD in die TKD1 auch ohne Beteiligung der Kinaseaktivität zu einer Aktivierung des Rezeptors führen kann.

In **Teil II** der vorliegenden Arbeit wurden daher eine *kinase dead* Variante des FLT3-ITD-627E sowie das FLT3-ITD-627E Konstrukt in Ba/F3 Zellen exprimiert. Im Western Blot konnte eine konstitutive Aktivierung der FLT3-Signaltransduktion nur für das FLT3-ITD-627E Konstrukt festgestellt werden. Ebenso konnte nur für diese Zelllinie die Koloniebildung in Abwesenheit von IL-3 sowie IL-3-abhängiges Wachstum nachgewiesen werden. Es wurde somit festgestellt, dass der transformierende Phänotyp des FLT3-ITD-627E Rezeptors durch die konstitutive Kinaseaktivität vermittelt wird.

Zum Nachweis einer möglichen Aktivierung der NF κ B-Signaltransduktion durch TKD1-ITDs wurden FLT3-ITD und FLT3-ITD-627E exprimierende Ba/F3 Zellen auf die Translokation von p65 nach fraktionierter Proteinextraktion im Western Blot verglichen. Für beide Zelllinien war eine p65-Kernlokalisation nachweisbar. Die pharmakologische Inhibition der NF κ B-Aktivierung machte eine starke Abhängigkeit beider Zelllinien von der Aktivierung des Signalwegs für das Überleben deutlich. Der siRNA-vermittelte *knock down* von p65 konnte eine signifikante Relevanz für das Überleben beider Zelllinien unter Midostaurin-Exposition nachweisen. Zukünftige Experimente *ex vivo* müssen den additiven Effekt der p65-Inhibition bei gleichzeitiger Gabe von Midostaurin bestätigen, bevor von einem neuem therapeutischen Ansatzpunkt gesprochen werden kann.

Summary

It is widely accepted that continuous target inhibition is a prerequisite for clinically effective TKI treatment. Recently, this assumption has been questioned by data suggesting that transient potent kinase inhibition is sufficient to induce apoptosis in BCR-ABL positive cells.

In **part I** of this dissertation the underlying molecular mechanism of apoptosis induction after pulse incubation of high dose tyrosine kinase inhibitor (**HD-TKI**) was investigated. Therefore murine Ba/F3 cells stably transfected with BCR-ABL, FLT3-ITD or JAK2-V617F as well human leukemia cell lines were treated with respective TKI. Detection of activated caspase3 by Western Blot and FACS analysis over time during TKI incubation provided evidence that apoptosis induction is independent from applied TKI concentrations and determined by exposure time only. Repetitive wash out of TKI pulse exposed cells rescued these cells from induction of apoptosis which was validated by several apoptosis assays. Expression of ABC-transporter proteins in K562 cells rescued cells from apoptosis after pulse incubation of high imatinib concentrations. This was abrogated by pharmacologic inhibition of ABCB1. A detailed investigation of BCR-ABL signal transduction in Western Blot and FACS analysis suggested a differential reconstitution and inhibition of BCR-ABL phosphorylation Y177 and Y412 as well as of STAT5 and CRKL. Thereby phosphorylation of BCR-ABL (Y412) and STAT5 correlated well with survival of cells.

Determination of intra- and extracellular TKI concentration by HPLC measurement and of ¹⁴C-imatinib by IUR assay revealed strong intracellular accumulation of TKI after pulse incubation of HD-TKI, which was associated with a release of TKI over the time after wash out. These data identified a prolonged intracellular TKI activity as the underlying mechanism of apoptosis induction after HD-TKI pulse incubation in leukemic cells. From a clinical perspective these data point to a new cornerstone in clinical development of tyrosine kinase inhibitors: monitoring both, plasma and intracellular drug levels will be informative to optimize dosing schedules in upcoming clinical trials. Finally, bioavailability of a drug is determining the therapeutic outcome.

FLT3 mutations are a common genetic event in acute myeloid leukemia. Besides point mutations, internal tandem duplications (ITD) in the FLT3 receptor can be discriminated. Integration of ITDs does not occur in juxtamenbrane regions only, but also in Tyrosinkinase domain 1. The FLT3-ITD-627E receptor is a prototypic mutant of TKD1-ITD. Integration of ITD in TKD1 may lead to activation of downstream signaling without the activation of the kinase activity.

Therefore in **part II** of this work a kinase dead mutant of FLT3-ITD-627E as well as FLT3-ITD-627E construct was expressed in Ba/F3 cells. Western Blot analysis revealed a constitutive activation of FLT3 signaling only for the FLT3-ITD-627E construct. Similarly, colony formation in absence of cytokines IL-3 as well as factor independent growth was detected for this cell line. This demonstrated that the transforming phenotype of FLT3-ITD-627E is mediated by kinase activity of FLT3 receptor.

To test for possible activation of NFκB signal transduction by TKD1-ITDs FLT3-ITD and FLT3-ITD-627E expressing Ba/F3 cells were analyzed for translocation of p65 by fractionated protein extraction in Western Blot. For both constructs a translocation of p65 into the nucleus was detected. Pharmacologic inhibition of NFκB activation showed a relevance of ITD expressing cells on activation of NFκB signaling. SiRNA mediated knock down of p65 suggested a significant relevance for survival of both cell lines during exposure to the TKI midostaurin. Prior to talk about a new therapeutic approach, future experiments will need to confirm the additive effect of p65 inhibition by simultaneous administration of Midostaurin.

8 Literatur

- Abu-Duhier FM, Goodeve a C, Wilson G a, Gari M a, Peake IR, Rees DC, Vandenberghe E a, Winship PR, Reilly JT (2000) FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group. *British Journal of Haematology* 111:190–195.
- Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT (2001) Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 113:983–988.
- Agnès F, Shamon B, Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F (1994) Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene* 145:283–288.
- Ahmad R, Liu S, Weisberg E, Nelson E, Galinsky I, Meyer C, Kufe D, Kharbanda S, Stone R (2010) Combining the FLT3 inhibitor PKC412 and the triterpenoid CDDO-Me synergistically induces apoptosis in acute myeloid leukemia with the internal tandem duplication mutation. *Molecular Cancer Research* 8:986–993.
- Alves F, Hiddemann W (1997) Tyrosine kinase inhibitors. An approach to pathogenesis-oriented tumor therapy. *Der Internist* 38:1074–1082.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996) Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 274:787–789.
- Aplin AE, Hogan BP, Tomeu J, Juliano RL (2002) Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases. *Journal of Cell Science* 115:2781–2790.
- Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelier F, Thomas D, Hay RT (1995) Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* 15:2689–2696.
- Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997) Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* 110 (Pt 3):369–378.
- Attar EC, De Angelo DJ, Supko JG, D'Amato F, Zahrieh D, Sirulnik A, Wadleigh M, Ballen KK, McAfee S, Miller KB, Levine J, Galinsky I, Trehu EG, Schenkein D, Neuberg D, Stone RM, Amrein PC (2008) Phase I and pharmacokinetic study of bortezomib in combination with idarubicin and cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research* 14:1446–1454.
- Bakhtiar R, Lohne J, Ramos L, Khemani L, Hayes M, Tse F (2002) High-throughput quantification of the anti-leukemia drug STI571 (Gleevec) and its main metabolite (CGP 74588) in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 768:325–340.

- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061.
- Beg AA, Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782–784.
- Berry DM, Nash P, Liu SK-W, Pawson T, McGlade CJ (2002) A high-affinity Arg-X-X-Lys SH3 binding motif confers specificity for the interaction between Gads and SLP-76 in T cell signaling. *Current Biology* 12:1336–1341.
- Birkenkamp KU, Geugien M, Schepers H, Westra J, Lemmink HH, Vellenga E (2004) Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia* 18:103–112.
- Borner C, Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guilotine? *Cell Death and Differentiation* 6:497–507.
- Bottero V, Busuttill V, Loubat A, Magné N, Fischel JL, Milano G, Peyron JF (2001) Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Research* 61:7785–7791.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwäble J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H (2005) Constitutive activation of Akt by FIt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Research* 65:9643–9650.
- Brasel K, Escobar S, Anderberg R, de Vries P, Gruss HJ, Lyman SD (1995) Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia* 9:1212–1218.
- Brasher BB, Van Etten RA (2000) c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *The Journal of Biological Chemistry* 275:35631–35637.
- Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin M-catherine, Lepelley P (2006) NFkB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood* 107:1156–1165.
- Brave M et al. (2008) Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research* 14:352–359.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597–601.

- Breitenbuecher F, Markova B, Kasper S, Carius B, Stauder T, Böhmer FD, Masson K, Rönstrand L, Huber C, Kindler T, Fischer T (2009a) A novel molecular mechanism of primary resistance to FLT3-kinase inhibitors in AML. *Blood* 113:4063–4073.
- Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R, Markova B, Carius B, Brecht A, Duyster J, Haferlach T, Huber C, Fischer T (2009b) Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood* 113:4074–4077.
- Brendel C, Scharenberg C, Dohse M, Robey RW, Bates SE, Shukla S, Ambudkar SV, Wang Y, Wennemuth G, Burchert A, Boudriot U, Neubauer A (2007) Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia* 21:1267–1275.
- Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U (1993) Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2532–2536.
- Bueso-Ramos CE, Rocha FC, Shishodia S, Medeiros LJ, Kantarjian HM, Vadhan-Raj S, Estrov Z, Smith TL, Nguyen MH, Aggarwal BB (2004) Expression of constitutively active nuclear-kappa B RelA transcription factor in blasts of acute myeloid leukemia. *Human Pathology* 35:246–253.
- Bumm TGP, Elsea C, Corbin AS, Loriaux M, Sherbenou D, Wood L, Deininger J, Silver RT, Druker BJ, Deininger MW (2006) Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Research* 66:11156–11165.
- Burger H, van Tol H, Boersma AWM, Brok M, Wiemer EAC, Stoter G, Nooter K (2004) Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* 104:2940–2942.
- Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EAC, de Bruijn EA, Guetens G, de Boeck G, Sparreboom A, Verweij J, Nooter K (2005) Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biology & Therapy* 4:747–752.
- Campbell KJ, Perkins ND (2004) Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB. *Biochemical Society Transactions* 32:1087–1089.
- Cervantes F, Pereira A (2011) Prognostication in Primary Myelofibrosis. *Current Hematologic Malignancy Reports*.
- Chapuy B, Panse M, Radunski U, Koch R, Wenzel D, Inagaki N, Haase D, Truemper L, Wulf GG (2009) ABC transporter A3 facilitates lysosomal sequestration of imatinib and modulates susceptibility of chronic myeloid leukemia cell lines to this drug. *Haematologica* 94:1528–1536.
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP (2011) Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current Cancer Drug Targets* 11:239–253.

- Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 391:410–413.
- Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293:1653–1657.
- Choudhary C, Brandts C, Schwable J, Tickenbrock L, Sargin B, Ueker A, Böhmer F-D, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H (2007) Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110:370–374.
- Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, Tickenbrock L, Sargin B, Kindler T, Fischer T, Berdel WE, Müller-Tidow C, Serve H (2005) AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations. *Blood* 106:265–273.
- Chu S, Li L, Singh H, Bhatia R (2007) BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer research* 67:7045–7053.
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal* 326 (Pt 1):1–16.
- Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD, Morse D, Abraham S, Rahman A, Liang C, Lostritto R, Baird A, Pazdur R (2004) United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clinical Cancer Research* 10:1212–1218.
- Cools J, Mentens N, Furet P, Fabbro D, Clark JJ, Griffin JD, Marynen P, Gilliland DG (2004) Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer Research* 64:6385–6389.
- Copland M, Hamilton A, Elrick LJ, Baird JW, Allan EK, Jordanides N, Barow M, Mountford JC, Holyoake TL (2006) Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107:4532–4539.
- Corbin AS, La Rosée P, Stoffregen EP, Druker BJ, Deininger MW (2003) Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 101:4611–4614.
- le Coutre P, Kreuzer K-A, Na I-K, Lupberger J, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Müller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Bonnet R, Ehninger G, Schmidt CA (2002) Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 28:75–85.
- le Coutre P, Kreuzer K-A, Pursche S, Bonin MV, Leopold T, Baskaynak G, Dörken B, Ehninger G, Ottmann O, Jenke A, Bornhäuser M, Schleyer E (2004) Pharmacokinetics and cellular uptake of imatinib and its main metabolite CGP74588. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 53:313–323.
- le Coutre P, Mologni L, Cleris L, Marchesi E, Buchdunger E, Giardini R, Formelli F, Gambacorti-Passerini C (1999) In vivo eradication of human BCR/ABL-positive

- leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *Journal of the National Cancer Institute* 91:163–168.
- le Coutre PD, Giles FJ, Hochhaus A, Apperley JF, Ossenkoppele GJ, Blakesley R, Shou Y, Gallagher NJ, Baccarani M, Cortes J, Kantarjian HM (2011) Nilotinib in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia in accelerated phase following imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Leukemia*.
- Cowan-Jacob SW (2006) Structural biology of protein tyrosine kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:2608–2625.
- Dai H, Marbach P, Lemaire M, Hayes M, Elmquist WF (2003a) Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304:1085–1092.
- Dai Y, Rahmani M, Grant S (2003b) Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process. *Oncogene* 22:7108–7122.
- Daley GQ, Baltimore D (1988) Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:9312–9316.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247:824–830.
- Dameshek W (1951) Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6:372–375.
- Davies A, Jordanides NE, Giannoudis A, Lucas CM, Hatzieremia S, Harris RJ, Jørgensen HG, Holyoake TL, Pirmohamed M, Clark RE, Mountford JC (2009) Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia* 23:1999–2006.
- Deininger MW (2008) Nilotinib. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:4027–4031.
- Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV (1997) The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 90:3691–3698.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96:3343–3356.
- Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, Robey RW, Volkmann T, Deeken JF, Brendel C, Ambudkar SV, Neubauer A, Bates SE (2010) Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metabolism and Disposition* 38:1371–1380.
- Dorey K, Engen JR, Kretzschmar J, Wilm M, Neubauer G, Schindler T, Superti-Furga G (2001) Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive

- and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 20:8075–8084.
- Druker BJ, Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* 105:3–7.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 344:1031–1037.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine* 2:561–566.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15:188–200.
- Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Adès L, Grosjean J, Boehrer S, Métivier D, Souquère S, Pierron G, Fenaux P, Kroemer G (2007) NF-kappaB inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 26:4071–4083.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 341:164–172.
- Farhana L, Dawson MI, Murshed F, Fontana JA (2011) Maximal adamantyl-substituted retinoid-related molecule-induced apoptosis requires NF-kB noncanonical and canonical pathway activation. *Cell Death and Differentiation* 18:164–173.
- Fenski R, Flesch K, Serve S, Mizuki M, Oelmann E, Kratz-Albers K, Kienast J, Leo R, Schwartz S, Berdel WE, Serve H (2000) Constitutive activation of FLT3 in acute myeloid leukaemia and its consequences for growth of 32D cells. *British Journal of Haematology* 108:322–330.
- Fischer T, Stone RM, Deangelo DJ, Galinsky I, Estey E, Lanza C, Fox E, Ehninger G, Feldman EJ, Schiller GJ, Klimek VM, Nimer SD, Gilliland DG, Dutreix C, Huntsman-Labed A, Virkus J, Giles FJ (2010) Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology* 28:4339–4345.
- De Francia S, D'Avolio A, De Martino F, Pirro E, Baietto L, Siccardi M, Simiele M, Racca S, Saglio G, Di Carlo F, Di Perri G (2009) New HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the antileukemia drugs imatinib, dasatinib, and nilotinib in human plasma. *Journal of Chromatography B* 877:1721–1726.
- Frelin C, Imbert V, Griessinger E, Peyron A-C, Rochet N, Philip P, Dageville C, Sirvent A, Hummelsberger M, Bérard E, Dreano M, Sirvent N, Peyron J-F (2005) Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 105:804–811.

- Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Incalci M (2000) Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *Journal of the National Cancer Institute* 92:1641–1650.
- Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB (1997) Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 23:380–394.
- Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, Tornaghi L, Rossi F, Pioltelli P, Pogliani E, Alberti D, Corneo G, D'Incalci M (2003a) Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clinical Cancer Research* 9:625–632.
- Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galiotta A, Rostagno R, Scapozza L (2003b) Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *The Lancet Oncology* 4:75–85.
- Giannoudis A, Davies A, Lucas CM, Harris RJ, Pirmohamed M, Clark RE (2008) Effective dasatinib uptake may occur without human organic cation transporter 1 (hOCT1): implications for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Blood* 112:3348–3354.
- Di Gion P, Kanefendt F, Lindauer A, Scheffler M, Doroshenko O, Fuhr U, Wolf J, Jaehde U (2011) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clinical Pharmacokinetics* 50:551–603.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876–880.
- Griesshammer M, Gisslinger H, Heimpel, H, Lengfelder E, Reiter A (2006) Chronische myeloproliferative Erkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, DGHO.
- Griessinger E, Imbert V, Lagadec P, Gonthier N, Dubreuil P, Romanelli A, Dreano M, Peyron J-F (2007) AS602868, a dual inhibitor of IKK2 and FLT3 to target AML cells. *Leukemia* 21:877–885.
- Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, Lippke J, Saxena K (2004) The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Molecular Cell* 13:169–178.
- Grosjean-Raillard J, Adès L, Boehrer S, Tailler M, Fabre C, Braun T, De Botton S, Israel A, Fenaux P, Kroemer G (2008) Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Apoptosis* 13:1148–1161.
- Grundler R, Miething C, Thiede C, Peschel C, Duyster J (2005) FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model. *Blood* 105:4792–4799.

- Gruppo Italiano Studio (1995) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Annals of Internal Medicine* 123:656–664.
- Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 98:2301–2307.
- Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, Grimes BA, Rossi RM, Szilvassy SJ, Jordan CT (2002) Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:16220–16225.
- Hamada A, Miyano H, Watanabe H, Saito H (2003) Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307:824–828.
- Hamilton A, Elrick L, Myssina S, Copland M, Jørgensen H, Melo JV, Holyoake T (2006) BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry. *Leukemia* 20:1035–1039.
- Hegedus C, Ozvegy-Laczka C, Apáti A, Magócsi M, Németh K, Orfi L, Kéri G, Katona M, Takáts Z, Váradi A, Szakács G, Sarkadi B (2009) Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *British Journal of Pharmacology* 158:1153–1164.
- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M (2007) Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 370:342–350.
- Heidel F et al. (2006) Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 107:293–300.
- Heiss E, Masson K, Sundberg C, Pedersen M, Sun J, Bengtsson S, Rönstrand L (2006) Identification of Y589 and Y599 in the juxtamembrane domain of Flt3 as ligand-induced autophosphorylation sites involved in binding of Src family kinases and the protein tyrosine phosphatase SHP2. *Blood* 108:1542–1550.
- Hiwase DK, Saunders V, Hewett D, Frede A, Zrim S, Dang P, Eadie L, To LB, Melo J, Kumar S, Hughes TP, White DL (2008) Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clinical Cancer Research* 14:3881–3888.
- Hiwase DK, White D, Zrim S, Saunders V, Melo JV, Hughes TP (2010) Nilotinib-mediated inhibition of ABCB1 increases intracellular concentration of dasatinib in CML cells: implications for combination TKI therapy. *Leukemia* 24:658–660.
- Hiwase DK, White DL, Saunders VA, Kumar S, Melo JV, Hughes TP (2009) Short-term intense Bcr-Abl kinase inhibition with nilotinib is adequate to trigger cell death in BCR-ABL(+) cells. *Leukemia* 23:1205–1206.

- Hoelbl A, Kovacic B, Kerényi MA, Simma O, Warsch W, Cui Y, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R, Sexl V (2006) Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood* 107:4898–4906.
- Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, Fajmann S, Grebien F, Warsch W, Stengl G, Hennighausen L, Poli V, Beug H, Moriggl R, Sexl V (2010) Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Molecular Medicine* 2:98–110.
- Hoelzer, Seipelt (1998) *Leukämitherapien*. UNI-MED Verlag Bremen.
- Houghton PJ (2004) Imatinib Mesylate Is a Potent Inhibitor of the ABCG2 (BCRP) Transporter and Reverses Resistance to Topotecan and SN-38 in Vitro. *Cancer Research* 64:2333–2337.
- Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlägel U, von Bonin M, Pursche S, Bergemann T, Ehninger G, Schleyer E (2004) P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* 18:401–408.
- Irish JM, Anensen N, Hovland R, Skavland J, Børresen-Dale A-L, Bruserud O, Nolan GP, Gjertsen BT (2007) Flt3 Y591 duplication and Bcl-2 overexpression are detected in acute myeloid leukemia cells with high levels of phosphorylated wild-type p53. *Blood* 109:2589–2596.
- Ishiko J, Mizuki M, Matsumura I, Shibayama H, Sugahara H, Scholz G, Serve H, Kanakura Y (2005) Roles of tyrosine residues 845, 892 and 922 in constitutive activation of murine FLT3 kinase domain mutant. *Oncogene* 24:8144–8153.
- Jiang S, Li P, Peach ML, Bindu L, Worthy KW, Fisher RJ, Burke TR, Nicklaus M, Roller PP (2006) Structure-based design of potent Grb2-SH2 domain antagonists not relying on phosphotyrosine mimics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349:497–503.
- Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, Chen Y-F, Williams GM, Duan J, Gobburu J, Booth B, Benson K, Leighton J, Hsieh LS, Chidambaram N, Zimmerman P, Pazdur R (2005) Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clinical Cancer Research* 11:6414–6421.
- de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J (1997) Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene* 14:507–513.
- Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky WE (2000) Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 96:1933–1939.
- Jonuleit T, Peschel C, Schwab R, van der Kuip H, Buchdunger E, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE (1998) Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *British Journal of Haematology* 100:295–303.

- Jordanides NE, Jorgensen HG, Holyoake TL, Mountford JC (2006) Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate. *Blood* 108:1370–1373.
- Kamath AV, Wang J, Lee FY, Marathe PH (2008) Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of dasatinib (BMS-354825): a potent oral multi-targeted kinase inhibitor against SRC and BCR-ABL. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 61:365–376.
- Kamon J, Yamauchi T, Muto S, Takekawa S, Ito Y, Hada Y, Ogawa W, Itai A, Kasuga M, Tobe K, Kadowaki T (2004) A novel IKKbeta inhibitor stimulates adiponectin levels and ameliorates obesity-linked insulin resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323:242–248.
- Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM, Liang C, Booth B, Chidambaram N, Morse D, Sridhara R, Garvey P, Justice R, Pazdur R (2006) Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 12:7271–7278.
- Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG (2006) Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *The New England Journal of Medicine* 354:2542–2551.
- Kantarjian H et al. (2010) Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 362:2260–2270.
- Kantarjian HM, Hochhaus A, Saglio G, De Souza C, Flinn IW, Stenke L, Goh Y-T, Rosti G, Nakamae H, Gallagher NJ, Hoenekopp A, Blakesley RE, Larson RA, Hughes TP (2011) Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *The Lancet Oncology* 12:841–851.
- Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, Groner S, Späth D, Krauter J, Ganser A, Döhner H, Fischer T, Döhner K (2009) Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 114:2386–2392.
- Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG (2002) FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 99:310–318.
- Kessels HWHG, Ward AC, Schumacher TNM (2002) Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligand interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8524–8529.
- Khorashad JS, Wagner S, Greener L, Marin D, Reid A, Milojkovic D, Patel H, Willmott S, Rezvani K, Gerrard G, Loaiza S, Davis J, Goldman J, Melo J, Apperley J, Foroni L (2009) The level of BCR-ABL1 kinase activity before treatment does not identify chronic myeloid leukemia patients who fail to achieve a complete cytogenetic response on imatinib. *Haematologica* 94:861–864.

- Kindler T, Breitenbuecher F, Kasper S, Estey E, Giles F, Feldman E, Ehninger G, Schiller G, Klimek V, Nimer SD, Gratwohl A, Choudhary CR, Mueller-Tidow C, Serve H, Gschaidmeier H, Cohen PS, Huber C, Fischer T (2005) Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 105:335–340.
- Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T (2002) Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 21:2555–2563.
- Kordes U, Krappmann D, Heissmeyer V, Ludwig WD, Scheidereit C (2000) Transcription factor NF-kappaB is constitutively activated in acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* 14:399–402.
- Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C (2003) To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22:8961–8982.
- LaMontagne KR, Hannon G, Tonks NK (1998) Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14094–14099.
- Lancet JE, Duong VH, Winton EF, Stuart RK, Burton M, Zhang S, Cubitt C, Blaskovich MA, Wright JJ, Sebti S, Sullivan DM (2011) A phase I clinical-pharmacodynamic study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in combination with the proteasome inhibitor bortezomib in advanced acute leukemias. *Clinical Cancer Research* 17:1140–1146.
- Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, Gathmann I, Wang Y (2008) Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 111:4022–4028.
- Lavagna-Sévenier C, Marchetto S, Birnbaum D, Rosnet O (1998) FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. *Leukemia* 12:301–310.
- Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M (2005) IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434:1138–1143.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L (2006) X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 107:4139–4141.
- Levine RL et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387–397.

- Levis M, Allebach J, Tse K-F, Zheng R, Baldwin BR, Smith BD, Jones-Bolin S, Ruggeri B, Dionne C, Small D (2002) A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 99:3885–3891.
- Levis M, Murphy KM, Pham R, Kim K-T, Stine A, Li L, McNiece I, Smith BD, Small D (2005) Internal tandem duplications of the FLT3 gene are present in leukemia stem cells. *Blood* 106:673–680.
- Lewalle P, Martiat P (1993) Inhibition of P210 expression in chronic myeloid leukaemia: oligonucleotides and/or transduced antisense sequences. *Leukemia & Lymphoma* 11 Suppl 1:139–143.
- Li H, Wittwer T, Weber A, Schneider H, Moreno R, Maine GN, Kracht M, Schmitz ML, Burstein E (2012) Regulation of NF- κ B activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 31:611–623.
- Li S, Ilaria RL, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA (1999) The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *The Journal of Experimental Medicine* 189:1399–1412.
- Lipka D, Heidel F, Huber C, Fischer T (2008a) Development of tyrosine kinase inhibitors for hematologic neoplasms. FLT3 and JAK2 as therapeutic targets. *Pharmazie in Unserer Zeit* 37:394–403.
- Lipka DB, Hoffmann LS, Heidel F, Markova B, Blum M-C, Breitenbuecher F, Kasper S, Kindler T, Levine RL, Huber C, Fischer T (2008b) LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7:1176–1184.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG (1996) Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379:349–353.
- Liu Y, Gray NS (2006) Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature Chemical Biology* 2:358–364.
- Lombardo LJ et al. (2004) Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of Medicinal Chemistry* 47:6658–6661.
- Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H (2005) Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18962–18967.
- Lyman SD, Jacobsen SE (1998) c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101–1134.
- Mahon F-X, Belloc F, Lagarde V, Chollet C, Moreau-Gaudry F, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV (2003) MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101:2368–2373.

- Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E (2007) COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *The EMBO Journal* 26:436–447.
- Mandanans RA, Leibowitz DS, Gharehbaghi K, Tauchi T, Burgess GS, Miyazawa K, Jayaram HN, Boswell HS (1993) Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 82:1838–1847.
- Manning G (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook*:1–19.
- Marais R, Marshall CJ (1996) Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surveys* 27:101–125.
- Marchetto S, Fournier E, Beslu N, Aurran-Schleinitz T, Dubreuil P, Borg JP, Birnbaum D, Rosnet O (1999) SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor. *Leukemia* 13:1374–1382.
- Marie JP, Faussat-Suberville AM, Zhou D, Zittoun R (1993) Daunorubicin uptake by leukemic cells: correlations with treatment outcome and *mdr1* expression. *Leukemia* 7:825–831.
- Markova B, Albers C, Breitenbuecher F, Melo JV, Brümmendorf TH, Heidel F, Lipka D, Duyster J, Huber C, Fischer T (2010) Novel pathway in Bcr-Abl signal transduction involves Akt-independent, PLC-gamma1-driven activation of mTOR/p70S6-kinase pathway. *Oncogene* 29:739–751.
- Maru Y, Witte ON (1991) The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67:459–468.
- Masson K, Liu T, Khan R, Sun J, Rönstrand L (2009) A role of Gab2 association in Flt3 ITD mediated Stat5 phosphorylation and cell survival. *British Journal of Haematology* 146:193–202.
- McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI (1997) Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *The Journal of Cell Biology* 136:215–227.
- Messinger Y, Gaynon P, Raetz E, Hutchinson R, Dubois S, Glade-Bender J, Sposto R, van der Giessen J, Eckroth E, Bostrom BC (2010) Phase I study of bortezomib combined with chemotherapy in children with relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL): a report from the therapeutic advances in childhood leukemia (TACL) consortium. *Pediatric Blood & Cancer* 55:254–259.
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Broudy V, Kreider B, Rovera G, Adamson JW (1989) Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32 D. *Progress in Clinical and Biological Research* 316B:183–196.
- Mizuki M, Fenski R, Halfter H, Matsumura I, Schmidt R, Müller C, Grüning W, Kratz-Albers K, Serve S, Steur C, Büchner T, Kienast J, Kanakura Y, Berdel WE, Serve H (2000) Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 96:3907–3914.

- Mlejnek P, Novak O, Dolezel P (2011) A non-radioactive assay for precise determination of intracellular levels of imatinib and its main metabolite in Bcr-Abl positive cells. *Talanta* 83:1466–1471.
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S (1996) Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1911–1918.
- Neumann M, Naumann M (2007) Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *The FASEB Journal* 21:2642–2654.
- Nicolau DP, Freeman CD, Belliveau PP, Nightingale CH, Ross JW, Quintiliani R (1995) Experience with a once-daily aminoglycoside program administered to 2,184 adult patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:650–655.
- Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T (1999) Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 189:1229–1242.
- Okram B, Nagle A, Adrián FJ, Lee C, Ren P, Wang X, Sim T, Xie Y, Wang X, Xia G, Spraggon G, Warmuth M, Liu Y, Gray NS (2006) A general strategy for creating “inactive-conformation” abl inhibitors. *Chemistry & Biology* 13:779–786.
- O’Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ (2005) In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Research* 65:4500–4505.
- Palacios R, Henson G, Steinmetz M, McKearn JP (1984) Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* 309:126–131.
- Palacios R, Steinmetz M (1985) Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* 41:727–734.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A (2008) Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 111:2785–2789.
- Pardanani A, Hood J, Lasho T, Levine RL, Martin MB, Noronha G, Finke C, Mak CC, Mesa R, Zhu H, Soll R, Gilliland DG, Tefferi A (2007) TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia* 21:1658–1668.
- Pardanani A, Vannucchi AM, Passamonti F, Cervantes F, Barbui T, Tefferi A (2011) JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. *Leukemia* 25:218–225.
- Parise RA, Egorin MJ, Christner SM, Shah DD, Zhou W, Beumer JH (2009) A high-performance liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantitation of the tyrosine kinase inhibitor nilotinib in human plasma and serum. *Journal of Chromatography B* 877:1894–1900.

- Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, Orlandi E, Arcaini L, Brusamolino E, Pascutto C, Cazzola M, Morra E, Lazzarino M (2004) Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *The American Journal of Medicine* 117:755–761.
- Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON (1993) SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Molecular and Cellular Biology* 13:1728–1736.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON (1991) BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66:161–171.
- Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M, Sawyers CL, Rosamilia M, Ford J, Lloyd P, Capdeville R (2004) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Clinical Oncology* 22:935–942.
- Perkins ND, Gilmore TD (2006) Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death and Differentiation* 13:759–772.
- Picard S, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard M-A, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon F-X (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109:3496–3499.
- Piva R, Gianferretti P, Ciucci A, Taulli R, Belardo G, Santoro MG (2005) 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces apoptosis in human malignant B cells: an effect associated with inhibition of NF-kappa B activity and down-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood* 105:1750–1758.
- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G (2002) Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108:247–259.
- Ponticelli AS, Whitlock CA, Rosenberg N, Witte ON (1982) In vivo tyrosine phosphorylations of the Abelson virus transforming protein are absent in its normal cellular homolog. *Cell* 29:953–960.
- Qiao Y, Molina H, Pandey A, Zhang J, Cole PA (2006) Chemical rescue of a mutant enzyme in living cells. *Science* 311:1293–1297.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J (2007) Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. *Nature Reviews Drug discovery* 6:834–848.
- Quintás-Cardama A et al. (2010) Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115:3109–3117.
- Rayet B, Gélinas C (1999) Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18:6938–6947.
- Razumovskaya E, Masson K, Khan R, Bengtsson S, Rönstrand L (2009) Oncogenic Flt3 receptors display different specificity and kinetics of autophosphorylation. *Experimental Hematology* 37:979–989.

- Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS (1998) A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes & Development* 12:968–981.
- Riccioni R, Senese M, Diverio D, Riti V, Buffolino S, Mariani G, Boe A, Cedrone M, Lo-Coco F, Foà R, Peschle C, Testa U (2007) M4 and M5 acute myeloid leukaemias display a high sensitivity to Bortezomib-mediated apoptosis. *British Journal of Haematology* 139:194–205.
- Ringel F, Schwarz M, Dörken B, Le Coutre P (2010) An atomic absorption spectroscopy assay as a surrogate method to measure imatinib uptake via the organic cation transporter (OCT 1). *Onkologie* 33:143.
- Rocnik JL, Okabe R, Yu J-C, Lee BH, Giese N, Schenkein DP, Gilliland DG (2006) Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD. *Blood* 108:1339–1345.
- Rohrbacher M, Hasford J (2009) Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best practice & Research Clinical Haematology* 22:295–302.
- Rosnet O, Bühring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, Arnoulet C, Chabannon C, Kanz L, Hannum C, Birnbaum D (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10:238–248.
- Rosnet O, Marchetto S, DeLapeyriere O, Birnbaum D (1991) Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. *Oncogene* 6:1641–1650.
- Rozman C, Giral M, Feliu E, Rubio D, Cortés MT (1991) Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 67:2658–2663.
- Rusten LS, Lyman SD, Veiby OP, Jacobsen SE (1996) The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 87:1317–1325.
- Saccani S, Marazzi I, Beg AA, Natoli G (2004) Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *The Journal of Experimental Medicine* 200:107–113.
- Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O (2003) Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Molecular Biology of the Cell* 14:1448–1459.
- Salomon AR, Ficarro SB, Brill LM, Brinker A, Phung QT, Ericson C, Sauer K, Brock A, Horn DM, Schultz PG, Peters EC (2003) Profiling of tyrosine phosphorylation pathways in human cells using mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:443–448.
- Samanta a, Perazzona B, Chakraborty S, Sun X, Modi H, Bhatia R, Priebe W, Arlinghaus R (2011) Janus kinase 2 regulates Bcr-Abl signaling in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 25:463–472.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104–108.
- Santos FPS, Kantarjian H, McConkey D, O'Brien S, Faderl S, Borthakur G, Ferrajoli A, Wright J, Cortes J (2011) Pilot study of bortezomib for patients with imatinib-refractory chronic myeloid leukemia in chronic or accelerated phase. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 11:355–360.
- Sargin B, Choudhary C, Crosetto N, Schmidt MHH, Grundler R, Rensinghoff M, Thiesen C, Tickenbrock L, Schwäble J, Brandts C, August B, Koschmieder S, Bandi SR, Duyster J, Berdel WE, Müller-Tidow C, Dikic I, Serve H (2007) Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 110:1004–1012.
- Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf N a, Podar K, Gesbert F, Iwasaki H, Li S, Van Etten R a, Gu H, Griffin JD, Neel BG (2002) Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer cell* 1:479–492.
- Sawyers CL (1997) Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillière's Clinical Haematology* 10:223–231.
- Sawyers CL et al. (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99:3530–3539.
- Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C (1998) The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395:462–469.
- Scharenberg CW (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99:507–512.
- Scherr M, Chaturvedi A, Battmer K, Dallmann I, Schultheis B, Ganser A, Eder M (2006) Enhanced sensitivity to inhibition of SHP2, STAT5, and Gab2 expression in chronic myeloid leukemia (CML). *Blood* 107:3279–3287.
- Schessl C, Rawat VPS, Cusan M, Deshpande A, Kohl TM, Rosten PM, Spiekermann K, Humphries RK, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Quintanilla-Martinez L, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C (2005) The AML1-ETO fusion gene and the FLT3 length mutation collaborate in inducing acute leukemia in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 115:2159–2168.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J (2000) Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289:1938–1942.
- Schmidt-Arras D, Schwäble J, Böhmer F-D, Serve H (2004) Flt3 receptor tyrosine kinase as a drug target in leukemia. *Current Pharmaceutical Design* 10:1867–1883.

- Schoch C, Kern W, Krawitz P, Dugas M, Schnittger S, Haferlach T, Hiddemann W (2001) Dependence of age-specific incidence of acute myeloid leukemia on karyotype. *Blood* 98:3500.
- Schultheis B, Szydlo R, Mahon FX, Apperley JF, Melo JV (2005) Analysis of total phosphotyrosine levels in CD34+ cells from CML patients to predict the response to imatinib mesylate treatment. *Blood* 105:4893–4894.
- Seo J-H, Wood LJ, Agarwal A, O'Hare T, Elsea CR, Griswold IJ, Deininger MW, Imamoto A, Druker BJ (2010) A specific need for CRKL in p210BCR-ABL-induced transformation of mouse hematopoietic progenitors. *Cancer research* 70:7325–7335.
- Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, Crooks GM (1996) Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* 87:3563–3570.
- Shah NP et al. (2008a) Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and -intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 26:3204–3212.
- Shah NP, Kasap C, Weier C, Balbas M, Nicoll JM, Bleickardt E, Nicaise C, Sawyers CL (2008b) Transient Potent BCR-ABL Inhibition Is Sufficient to Commit Chronic Myeloid Leukemia Cells Irreversibly to Apoptosis. *Cancer Cell*:485–493.
- Shah NP, Kim D-W, Kantarjian H, Rousselot P, Llacer PED, Enrico A, Vela-Ojeda J, Silver RT, Khoury HJ, Muller MC, Lambert A, Matloub Y, Hochhaus A (2010) Potent, transient inhibition of BCR-ABL with dasatinib 100 mg daily achieves rapid and durable cytogenetic responses and high transformation-free survival rates in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance, suboptimal response or int. *Haematologica* 95:232–240.
- Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM (2002) Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 16:1402–1411.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E (1985) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315:550–554.
- Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL (1996) Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13:247–254.
- Snead JL, O'Hare T, Adrian LT, Eide CA, Lange T, Druker BJ, Deininger MW (2009) Acute dasatinib exposure commits Bcr-Abl-dependent cells to apoptosis. *Blood* 114:3459–3463.
- Sohail M, Doran G, Riedemann J, Macaulay V, Southern EM (2003) A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy. *Nucleic Acids Research* 31:e38.
- Song Y-L, Peach ML, Roller PP, Qiu S, Wang S, Long Y-Q (2006a) Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2

- domain by the utilization of 3'-substituted tyrosine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 49:1585–1596.
- Song Y-L, Peach ML, Roller PP, Qiu S, Wang S, Long Y-Q (2006b) Discovery of a novel nonphosphorylated pentapeptide motif displaying high affinity for Grb2-SH2 domain by the utilization of 3'-substituted tyrosine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 49:1585–1596.
- Spiekermann K, Bagrintseva K, Schoch C, Haferlach T, Hiddemann W, Schnittger S (2002) A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 100:3423–3425.
- Staudt LM (2000) The molecular and cellular origins of Hodgkin's disease. *The Journal of Experimental Medicine* 191:207–212.
- Steen H, Fernandez M, Ghaffari S, Pandey A, Mann M (2003) Phosphotyrosine mapping in Bcr/Abl oncoprotein using phosphotyrosine-specific immonium ion scanning. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2:138–145.
- Stirewalt DL, Radich JP (2003) The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature Reviews Cancer* 3:650–665.
- Stone RM, Dohner H, G. Ehninger, M. Villeneuve, T. Teasdale, J. D. Virkus, L. R. Bressler, M. M. Seiler, G. Marcucci RAL (2011) CALGB 10603 (RATIFY): A randomized phase III study of induction (daunorubicin/cytarabine) and consolidation (high-dose cytarabine) chemotherapy combined with midostaurin or placebo in treatment-naïve patients with FLT3 mutated AML. *Journal of Clinical Oncology* 29.
- Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen T-T, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL (2006) Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England Journal of Medicine* 354:2531–2541.
- Tanaka A, Konno M, Muto S, Kambe N, Morii E, Nakahata T, Itai A, Matsuda H (2005) A novel NF-kappaB inhibitor, IMD-0354, suppresses neoplastic proliferation of human mast cells with constitutively activated c-kit receptors. *Blood* 105:2324–2331.
- Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhäuser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99:4326–4335.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R (1996) Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. *Leukemia & Lymphoma* 22:303–317.
- Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M (2004) Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* 104:3739–3745.

- Thompson JE, Cubbon RM, Cummings RT, Wicker LS, Frankshun R, Cunningham BR, Cameron PM, Meinke PT, Liverton N, Weng Y, DeMartino JA (2002) Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycle: a Jak protein kinase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:1219–1223.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111:3931–3940.
- Tokarski JS, Newitt JA, Chang CYJ, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, Kish K, Lee FYF, Borzillieri R, Lombardo LJ, Xie D, Zhang Y, Klei HE (2006) The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Research* 66:5790–5797.
- Ugo V, James C, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Médecine Sciences* 21:669–670.
- Uota S, Zahidunnabi Dewan M, Saitoh Y, Muto S, Itai A, Utsunomiya A, Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S (2012) An I κ B kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells. *Cancer Science* 103:100–106.
- Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC (1991) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Molecular and Cellular Biology* 11:1107–1113.
- Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A (2010) Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *The New England Journal of Medicine* 363:1117–1127.
- Viatour P, Merville M-P, Bours V, Chariot A (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and I kappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends in Biochemical Sciences* 30:43–52.
- Walz C, Ahmed W, Lazarides K, Betancur M, Patel N, Hennighausen L, Zaleskas VM, Van Etten RA (2012) Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and Jak2V617F in mice. *Blood*.
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS (1996) TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784–787.
- Warmuth M, Bergmann M, Priess A, Häuslmann K, Emmerich B, Hallek M (1997) The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *The Journal of Biological Chemistry* 272:33260–33270.
- Weinstein IB (2002) Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297:63–64.
- Weisberg E, Boulton C, Kelly LM, Manley P, Fabbro D, Meyer T, Gilliland DG, Griffin JD (2002) Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 1:433–443.

- Weisberg E et al. (2005) Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7:129–141.
- Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA (1996) The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *The EMBO Journal* 15:1583–1595.
- Wernig G, Gonneville JR, Crowley BJ, Rodrigues MS, Reddy MM, Hudon HE, Walz C, Reiter A, Podar K, Royer Y, Constantinescu SN, Tomasson MH, Griffin JD, Gilliland DG, Sattler M (2008a) The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 111:3751–3759.
- Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, Cullen DE, Gozo M, McDowell EP, Levine RL, Doukas J, Mak CC, Noronha G, Martin M, Ko YD, Lee BH, Soll RM, Tefferi A, Hood JD, Gilliland DG (2008b) Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 13:311–320.
- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG (2006) Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 107:4274–4281.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T (2007) Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood* 110:4064–4072.
- White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino ACW, Cambareri AC, Quinn SR, Manley PW, Hughes TP (2006) OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 108:697–704.
- Widmer N, Colombo S, Buclin T, Decosterd LA (2003) Functional consequence of MDR1 expression on imatinib intracellular concentrations. *Blood* 102:1142.
- Yaffe MB (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 3:177–186.
- Yamamoto Y et al. (2001) Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:2434–2439.
- Yang X-D, Huang B, Li M, Lamb A, Kelleher NL, Chen L-F (2009) Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *The EMBO Journal* 28:1055–1066.
- Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U (1986) Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323:226–232.
- Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, Iwai T, Misawa S, Okuda T, Sonoda Y, Abe T, Katsuma K, Matsuo Y, Naoe T (1997) Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among

- various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia* 11:1605–1609.
- Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS (2002) Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nature Structural Biology* 9:117–120.
- Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998) Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the co-activator CBP/p300. *Molecular Cell* 1:661–671.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature Medicine* 7:1028–1034.
- Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP (2005) Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood* 105:2571–2576.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Thomas Fischer für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas. Seine ständige Hilfsbereitschaft, die zahlreichen nützlichen Diskussionen sowie die vielen Tipps und Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Ich möchte mich für das entgegengebrachte Vertrauen bedanken und dafür, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, mich als Stipendiatin des Graduiertenkollegs weiterzuentwickeln.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Dr. Daniel Lipka für die Betreuung des Themas, die ständige Hilfsbereitschaft, sein Interesse am Fortschritt der Arbeit, die hilfreichen Tipps, seine stete Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte, wenn mal wieder gar nichts klappen wollte. Das alles hat entscheidend zum Erfolg der Arbeit beigetragen. Weiterhin danke ich Dir für die netten Kaffeerunden auf den vielen Zugfahrten nach Magdeburg.

Herrn Prof. Dr. Michael Naumann danke ich herzlich für die Bereitschaft als Zweitgutachter mein GRK1167-Projekt zu begleiten sowie für die freundliche und hilfsbereite Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Dem Graduiertenkolleg GRK1167 der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung, insbesondere für die Gelegenheit zum Laborbesuch in Münster und die Ermöglichung an hochinteressanten internationalen Konferenzen teilzunehmen.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fischer danke ich für eine sehr schöne, intensive und unvergessliche Zeit im Labor sowie für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art, das gute Arbeitsklima und die produktive Zusammenarbeit. Jeder von Euch hat durch seine Art den Laboralltag aufgefrischt und dafür gesorgt, dass wir oft was zu lachen und viel Spaß zusammen hatten. Es war toll mit Euch!

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Tina Schnöder für die unermüdliche Unterstützung, die unzähligen aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so lief, die guten Gespräche, die ständige und unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors. Ich danke Dir auch für Dein Interesse an meiner Arbeit, für die vielen fachlichen Diskussionen, deine Anregungen und Geduld. Schön, dass es dich gibt!

Dr. Marek Dziadosz und Prof. Dr. Heidemarie Bartels vom Institut für Rechtsmedizin des Uniklinikums Magdeburg danke ich für die Durchführung der HPLC-Messungen, die große Hilfsbereitschaft und Spontanität, die dies manchmal erforderte sowie für die Geduld beim Erklären der Anlage und für die gemeinsame Zeit im Haus 28.

Prof. Dr. Steffen Koschmieder danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der IUR-Assays in seiner Arbeitsgruppe, das Interesse an meiner Arbeit, für Tipps und Anregungen. Den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe und den Kollegen aus dem „Büro“ danke ich für die Hilfsbereitschaft und die fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für schöne Tage in Münster.

Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow danke ich für seine Bereitschaft die Experimente in Münster zu beenden.

Prof. Dr. Bocknik danke ich für die Möglichkeit und die Bereitschaft die Szintillatormessungen am Institut für Pharmakologie in Münster durchzuführen.

Bei Prof. Dr. Junia Melo und bei Dr. Sheng Zhou gilt mein Dank für die Bereitstellung der ABC-Transporter Zelllinien.

Den „Mädels“ vom hämatologischen Speziallabor danke ich für die Hilfe am FACS und ihr Verständnis, ihre Geduld und Flexibilität, wenn es am FACS mal wieder schnell gehen musste oder es für Stunden blockiert war. Ich danke Euch für die netten Gespräche, das Interesse an der Forschung und die schöne Zeit.

Bei den Mainzer-Kollegen möchte ich mich für die schönen und ereignisreichen Tage im Labor, für die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft bei Problemen jeder Art und für einen tollen Start in meine Doktorarbeit bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Kindler für die Begleitung und die kurzzeitige Betreuung des Thomas, die Diskussionen und Tipps. Es hat mir viel Spaß mit Euch gemacht.

Bei allen Studenten des GRKs möchte ich mich für eine schöne und erlebnisreiche Zeit sowie für die vielfältigen Unterstützungen, ob moralisch, methodisch oder materiell bedanken. Marc Borgmann danke ich für die geduldige Hilfe und kompetenten Antworten beim NFκB-Projekt. Romy Schneider danke ich für die Unterstützung bei der Größenbestimmung der Zellen. Janine Degen und Anja Papendieck danke ich für die schöne Zeit und die vielen Unternehmungen auch außerhalb des GRKs. Es hat mir sehr viel Spaß mit Euch gemacht!

Weiterhin danke ich den Kollegen des ZIM im Haus 1 für viele schöne Tage, für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art und die angenehme Atmosphäre. Insbesondere danke ich Ulrike Giese, Veronika Thonn und Sönke Weinert für die schöne Zeit und vielen netten Gespräche.

Meinen Mädels Maike, Kerstin, Anke und Patricia danke ich dafür, dass Ihr immer da ward wenn man wahre Freunde braucht. Insbesondere in der schwierigen Zeit habt ihr viel Geduld gehabt und mir stets gezeigt, was die wahren Dinge im Leben sind.

Zum Schluss möchte ich den wichtigsten Personen in meinem Leben danken, ohne die ich es nie soweit geschafft hätte: meinen Eltern, meinem Ehemann und meinen Brüdern. Danke, dass ihr mich immer unterstützt und begleitet habt. Für Euer Verständnis, Euren Glauben an mich, Euren Rückhalt und Eure Liebe danke ich Euch von Herzen. Danke, dass es Euch gibt!

Meinen Ehemann Martin danke ich ganz besonders für seinen unerschöpflichen Vorrat an aufmunternden und motivierenden Worten, wenn es mal nicht so lief und dafür, dass er meine Launen geduldig ertragen und mich immer wieder zum Lachen gebracht hat. Du hast mir die Ruhe und Kraft gegeben, die zum Abschluss dieser Arbeit nötig waren. DANKE!

Lebenslauf und Publikationen

Name: **Marie-Christine Wagner**, geb. Blum
Wohnhaft Friedrich-Ebert-Platz 14
64289 Darmstadt
Geburtsdatum: 11.11.1981
Geburtsort: Koblenz
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Email: marie-christine.blum@med.ovgu.de

Schulische Ausbildung

Bis Juni 2001 Gymnasium Schönstätter Marienschule, Vallendar
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt 2001 – Juni 2007 Studium der Biologie
Hochschule Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Fachsemester 12 (inklusive Diplomarbeit)
Abschluss Diplom Biologin (Note 1,1)
Hauptfach Zellbiologie
Nebenfächer Genetik, Chemie
Mai 2006 – Mai 2007 Diplomarbeit am Universitätsklinikum Bonn, Institut für Pathologie, bei PD Dr. Merkelbach-Bruse
Thema der Diplomarbeit:
„Signaltransduktionsmechanismen gastrointestinale Stromatumoren mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund“

Promotion

Okt. 2007 – Mai 2009 Promotion zum Dr. rer. nat.
Hochschule Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Universitätsklinikum Mainz,
Klinik für Hämatologie / Onkologie
Betreuer Prof. Dr. Thomas Fischer
Thema „Induktion von Apoptose und Signaltransduktion in leukämischen Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung“
Juni 2009-April 2012 Fortsetzung der Promotion zum Dr. rer. nat.
Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs "Zell-Zell-Kommunikation in Nerven- und Immunsystem: Topologische Organisation von Signalwegen" (GRK1167)

Hochschule Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Universitätsklinikum Magdeburg
Klinik für Hämatologie / Onkologie

Betreuer Prof. Dr. Thomas Fischer

Thema „Induktion von Apoptose und Signaltransduktion in leukämischen Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung“

Publikationen

2012

Lipka DB*, **Wagner MC***, Dziadosz M, Schnöder T, Heidel F, Kindler T, Koschmieder S, Fischer T, “ Intracellular retention of ABL kinase inhibitors determines commitment to apoptosis in CML cells.” Submitted to PLoS ONE (April 2012), *Both authors contributed equally to this article

2011

Dziadosz M, **Wagner MC**, Bartels H, Lipka DB, Fischer T “High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and protein precipitation as a way of quantitative determination of nilotinib with and without internal standard.” Accepted in Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies

Heidel FH, Mack TS, Razumovskaya E, **Blum MC**, Lipka DB, Ballaschk A, Kramb JP, Plutizki S, Rönstrand L, Dannhardt G, Fischer T (2011) “3,4-Diarylmaleimides-a novel class of kinase inhibitors-effectively induce apoptosis in FLT3-ITD-dependent cells.” Annals of Hematology. 2011 Sep 1

2010

Fassunke J, **Blum MC**, Schildhaus HU, Zapatka, Brors B, Künstlinger H, Büttner R, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S (2010) “qPCR in gastrointestinal stromal tumors: Evaluation of reference genes and expression analysis of KIT and the alternative receptor tyrosine kinases FLT3, CSF1-R, PDGFRB, MET and AXL.” BMC Molecular Biology 20;11:100.

2008

Lipka DB, Hoffmann LS, Markova B, **Blum MC**, Breitenbuecher F, Kasper S, Kindler T, Levine RL, Huber C, Fischer T (2008) “LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells.” Molecular Cancer Therapeutics 7(5):1176-84

Marie-Christine Wagner

Friedrich-Ebert-Platz 14

64289 Darmstadt

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

„Induktion von Apoptose und Signaltransduktion in leukämischen Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung“

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 19.04.2012

Marie-Christine Wagner