



III. Medizinische Klinik und Poliklinik
am Klinikum rechts der Isar

**Resistenzmechanismen gegen
Tyrosinkinaseinhibitoren in BCR-ABL und
FLT3ITD positiven Zelllinien**

Maria Eylert

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Betreuer: 1. apl. Prof. Dr. Nikolas von Bubnoff
2. Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 12.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.03.2017 angenommen.

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chronische Myeloische Leukämie	1
1.1.1	Klinik der CML	1
1.1.2	Zytogenetik und das Fusionsprotein BCR-ABL	2
1.1.3	BCR-ABL Signalkaskade	2
1.1.4	Therapie	3
1.2	Akute Myeloische Leukämie	4
1.2.1	Klinik der AML	4
1.2.2	Molekulargenetische Grundlagen der AML	4
1.2.3	Therapie	5
1.3	Tyrosinkinaseinhibitoren	6
1.3.1	BCR-ABL Inhibitoren	6
1.3.2	JAK2-Inhibitor	8
1.3.3	FLT3ITD-Inhibitor	9
1.3.4	SRC-Inhibitor	9
1.4	Resistenzmechanismen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie der CML	10
1.4.1	Punktmutationen	10
1.4.2	BCR-ABL Amplifikation	11
1.4.3	Genetische Instabilität	12
1.4.4	α 1 acid Glycoprotein	12
1.4.5	AHI-1	12
1.4.6	GM-CSF	12
1.4.7	Multidrug-Resistance-Protein1	13

1.5	Fragestellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Allgemeine Ausrüstung	14
2.1.1	Antikörper	14
2.1.2	Chemikalien	16
2.1.3	Medien und Supplemente	17
2.1.4	Molekularbiologische Kits	17
2.1.5	PCR-Primer	17
2.1.6	Nested PCR-Primer	18
2.1.7	Tyrosinkinaseinhibitoren	18
2.1.8	Zellkulturen	18
2.1.9	Geräte	19
2.2	Zellkultur	20
2.2.1	Auftauen der Zelllinien	20
2.2.2	Kultivierung der Zelllinien	20
2.2.3	Konservierung der Zelllinien	21
2.2.4	Bestimmung der Zahl und Aktivität der Zellen	21
2.3	Proliferationsassay	21
2.4	Proteinbestimmung	22
2.4.1	Lyse der Zellen	22
2.4.2	SDS-Page	23
2.4.3	Immunblot	24
2.4.4	Immunodetektion von Proteinen	25
2.4.5	Entfernung der gebundenen Antikörper	26
2.5	Molekularbiologische Methoden	26
2.5.1	RNS-Extraktion	26
2.5.2	PCR	27
2.5.3	Agaroseelektrophorese	29
2.5.4	Extraktion der DNS aus dem Agarosegel	30
2.6	Versuche mit Zytokinen	31
2.6.1	Conditioned Media	31
2.6.2	Zytokin Array	32

2.7	Statistik	34
2.7.1	Student t-Test	34
2.7.2	Mann-Whitney-Test	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Resistenz Screening und Selektion der nicht mutierten Klone .	36
3.2	Wachstumszeit der Wildtyp und Mutierten Klone	37
3.3	Kreuzresistenz der BCR-ABL positiven Zelllinien gegen ver- schiedene Tyrosinkinaseinhibitoren	38
3.3.1	Resistenz der STI2 Klone	39
3.3.2	Kreuzresistenz der STI4 Klone	42
3.3.3	Resistenz der AMN200 Klone	44
3.4	Phosphorylierungsmuster in den STI4 Klonen	47
3.5	Phosphorylierungsmuster der AMN200 Klone	51
3.6	Inhibition von JAK2	55
3.6.1	Proliferationsassay	55
3.6.2	Phosphorylierungsmuster bei JAK2-Inhibition	58
3.7	Beteiligung von Zytokinen an der JAK2 Aktivierung	59
3.7.1	Einfluss des Zellüberstandes auf das Wachstum paren- taler BaF/3 Zellen	59
3.7.2	Einfluss des Überstandes auf das Phosphorylierungs- muster	60
3.7.3	Zeitlicher Verlauf des Phosphorylierungsmuster des AMN200 Klons G3	63
3.7.4	Zytokin-Array	64
3.8	JAK2 Aktivierung auch in FLT3ITD positiven Zelllinien . . .	64
3.8.1	Proliferationsassay bei Inhibition von JAK2	65
3.8.2	Einfluß des JAK-Inhibitors-I auf das Phosphorylierungs- muster der Zellen	67
3.9	Unterschiedliche Aktivität der SRC Kinasen	68
3.10	Phosphorylierung von HCK durch JAK2 in der Zelllinie C10 .	70

4 Diskussion	73
4.1 Längere Wachstumszeit der resistenten Zellklone ohne Mutation im Zielprotein	73
4.2 Kreuzresistenz	74
4.3 Unterschiedliche Resistenzmechanismen der Wildtypzelllinien .	76
4.4 JAK2 Aktivierung der AMN 200 Klone	77
4.5 Nachweis des Y1007/1008 in JAK2 auch bei Inhibition von JAK2	78
4.6 JAK2 Aktivierung der FLT3ITD positiven Zellen	79
4.7 JAK2 vermittelte Aktivierung von HCK	80
4.8 Inhibition von JAK2 hemmt die Proliferation in BCR-ABL und FLT3ITD positiven Zelllinien	81
5 Zusammenfassung	82
Literaturverzeichnis	83
Abbildungsverzeichnis	97
Tabellenverzeichnis	99

Abkürzungsverzeichnis

α	Anti/ Alpha
β	Beta
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Adenosin
Ak	Antikörper
Abb.	Abbildung
ABCB1	<i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family B</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
ABL-1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
A.d.	Aqua destillata
Ahi-1	<i>Abelson helper integration site 1</i>
AKT	ProteinkinaseB
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMN107	Nilotinib, Tassigna
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BMS-354825	Dasatinib, Sprycel
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumine</i> Rinderserumalbumin
C	Celsius/Cytosin
cDNS	<i>copy-DNA</i> Komplementäre Desoxyribonukleinsäure

cKit	<i>Mast-Stem cell growth factor receptor Kit</i>
CM	<i>conditioned media</i>
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxynukleosid-5-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Eph A2	<i>Ephrin Type A receptor 2</i>
F	Phenylalanin
FCS	<i>fetal calf serum</i> Fötales Kälberserum
FLT3	<i>FMS-like-Tyrosine-Kinase</i>
FYN	<i>src-like kinase</i>
g	Gramm
G	Glycin/Guanin
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colon Stimulating Factor</i>
Grb2	<i>emphGrowthfactorreceptor – boundprotein2</i>
h	Stunde/human
H	Histidin
H ₂ O	Wasser
HCK	<i>Hemopoietic cell kinase</i>
HES	Hypereosinophiles Syndrom
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> Meerrettichperoxidase
I	Isoleucin
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIT	Stammzellfaktor Rezeptor
L	Leucin
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
mA	Milliampere
min	Minuten
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>Multi-Drug-resistance</i>
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
mg	Milligramm
mM	10 ⁻³ Mol/Liter
mRNS	<i>messenger RNA</i> Boten-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OCT1	<i>Organic Cation Transporter 1</i>
p	phospho
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
pH	Potentia Hydrogenii
PH	Philadelphia Chromosom
PI-3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC412	Midostaurin®
PVDF	Polyvinylidenfluorid

pY	Phosphotyrosin
q	Langer Arm eines Chromosoms
Ras	Rat sarcoma
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> /Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Raumtemperatur/Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat
SRC	<i>(Schmidt-RuppinA-2) viral oncogene homolog</i>
Sos1	<i>Son of sevenless homolog 1</i>
STAT	<i>Signal transducer and Activator of Transcription</i>
STI571	Imatinib, Glivec®
SZT	Stammzelltransplantation
T	Threonin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Tbl	Tablette
Tec	<i>Tec protein tyrosine kinase</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TYK2	Tyrosinkinase2
U	Unit
u.a.	und andere
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wo	<i>without</i>
wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
Yes	<i>Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1</i>

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Chronische Myeloische Leukämie

1.1.1 Klinik der CML

Die CML wird zu den chronischen myeloproliferativen Erkrankungen gezählt. Hierbei handelt es sich um eine monoklonale Erkrankung einer pluripotenten Knochenmarksstammzelle (Deininger u. a. 2003). Die CML macht circa 15% aller Leukämien aus und hat eine Inzidenz von 2 Fällen auf 100.000 Einwohner pro Jahr (Sawyers 1999). Die CML tritt überwiegend im Erwachsenenalter auf, je älter die Patienten desto häufiger ist die Diagnose CML (Deininger u. a. 2003). Die Ätiologie der CML ist weitgehend unbekannt, aber Benzol, radioaktive Strahlung, Gammastrahlen und Röntgenstrahlen stellen Risikofaktoren zur Entstehung einer CML dar (Heyssel u. a. 1960). Die Krankheit verläuft in 3 Phasen. Zunächst beginnt die chronische Phase, in der die Patienten meist asymptomatisch sind und die Diagnose oft ein Zufallsbefund ist (Cervantes u. a. 1999). Nach 4-5 Jahren der chronischen Phase tritt die Akzelerationsphase ein in der mehr Blasten im peripheren Blut zu finden sind und die Patienten vermehrt Symptome aufweisen (Cervantes u. a. 1999). Die Akzelerationsphase variiert in ihrer Dauer von Wochen bis zu mehreren Jahren (Deininger u. a. 2003). Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zum Blastenschub. Der Anteil der Myeloblasten im peripheren Blut und Knochenmark steigt weiter auf Werte $>30\%$ an. Die reguläre Hämato-

poese wird zu Gunsten der Blastenbildung verdrängt, es kommt zur Anämie, Thrombozytopenie und einer Abwehrschwäche. Wird der Patient in dieser Krankheitsphase nicht behandelt tritt der Tod meist relativ rasch innerhalb von Wochen ein (Deininger u. a. 2003).

1.1.2 Zytogenetik und das Fusionsprotein BCR-ABL

In den meisten Fällen der CML läßt sich das Philadelphia-Chromosom nachweisen (Nowell u. a. 1960). Hierbei handelt es sich um eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (Rowley 1973). Dadurch kommt es zur Transkription des Fusionsprotein BCR-ABL (Kurzrock u. a. 1987). Auf dem Chromosom 9 liegt an der Bruchstelle (q 31.4) das c-ABL Protein (*Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*). c-Abl ist eine Proteinkinase die in der Signaltransduktion für Wachstums- und Relokationssignale zuständig ist. Die Bruchstelle auf Chromosom 22 (*q22.1*) liegt am BCR Gen (*Breakpoint Cluster Region*) (Groffen u. a. 1984). Durch die Translokation $t/(9;22)/(q34;q11)$ werden diese beiden Gene verknüpft und es entsteht nach der Translation das 210 kDa sowie das 180 kDa schwere Fusionsprotein BCR-ABL (Lugo u. a. 1990).

Ein Nachweis der Erkrankung gelingt mittels PCR über den Nachweis der BCR-ABL DNS oder über den Nachweis des Philadelphiachromosoms. Dass BCR-ABL die Erkrankung der CML verursacht, wurde im Jahre 1990 von mehreren Gruppen beschrieben und untermauert. Durch die Transplantation von Knochenmark, welches mit dem BCR-ABL Konstrukt transfiziert wurde, wird in Mäusen eine Erkrankung ausgelöst, welche der CML ähnelt (Heisterkamp u. a. 1990; Daley u. a. 1990).

1.1.3 BCR-ABL Signalkaskade

In Abbildung 1.1 ist schematisch die BCR-ABL Signalkaskade dargestellt. Weitere Proteine sind in die Signalkaskade involviert, diese Abbildung stellt eine Auswahl dar (O'Hare u. a. 2011). Grb2 und Sos-1 binden direkt an BCR-ABL, somit wird die RAS-Kaskade aktiviert (Puil u. a. 1994). Desweiteren aktiviert BCR-ABL die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und löst hier

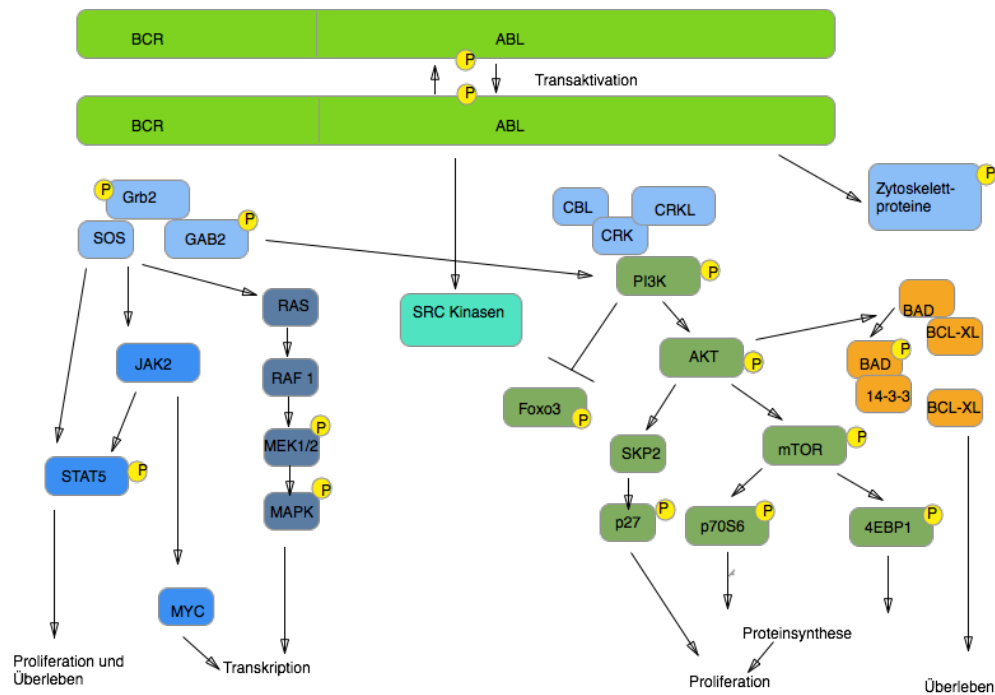


Abbildung 1.1: BCR-ABL Signalkaskade (angelehnt an O'Hare u. a. 2011)

eine weitere Signalkaskade aus (Skorski u. a. 1997). JAK2 wird ebenfalls durch BCR-ABL aktiviert (Xie u. a. 2001), STAT5 wird durch JAK2 und auch direkt von BCR-ABL phosphoryliert (O'Hare u. a. 2011).

1.1.4 Therapie

Eine definitive Heilung der chronisch myeloischen Leukämie ist bisher nur durch eine allogene Stammzelltransplantation zu erreichen (Bubnoff u. a. 2010). Da diese Therapieform sehr aggressiv ist und eine hohe Morbidität und Mortalität nach sich zieht wird inzwischen als First-line Medikament Imatinib empfohlen (Bubnoff u. a. 2010). Wie andere Leukämien spricht auch die CML auf eine Chemotherapie an. Hier sind unterschiedliche Therapieoptionen einzeln oder in Kombination mittels Hydroxyurea, Interferon α und Arac-c möglich (Hochhaus 2007). Eine langfristige Remission oder gar Heilung ist auch hier nicht möglich (Hochhaus 2007). Inzwischen ist der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Glivec[®]) Mittel der ersten Wahl (Bubnoff

u. a. 2010; Hochhaus u. a. 2009). Auf die genauere Wirkungsweise wir später noch eingegangen (Vgl. Kapitel 1.3). Mittels Imatinib ist eine vergleichsweise nebenwirkungsarme jedoch hoch effektive Therapie möglich. Die Patienten entwickeln jedoch mit der Zeit Resistenzen gegen Imatinib und auch gegen neu entwickelte second line Inhibitoren (Bubnoff u. a. 2010).

1.2 Akute Myeloische Leukämie

1.2.1 Klinik der AML

Die akute myeloische Leukämie repräsentiert eine Gruppe von Erkrankungen mit einem heterogenem Erscheinungsbild. Durch einen Fehler der Zellen in der Proliferation kommt es zu einer Anhäufung von nicht funktionierenden Blasten, welche die normale Hämatopoese verdrängen (Stone u. a. 2004). Durch die schnelle Proliferation der Zellen ist die Klinik durch eine rasche Progredienz gekennzeichnet. Die weitere Klinik ist abhängig von der Verdrängung der normalen Hämatopoese. In der klinischen Untersuchung können eine Splenomegalie sowie Hepatomegalie imponieren. Bedingt sind diese durch die extramedulläre Blutbildung (Stone u. a. 2004).

1.2.2 Molekulargenetische Grundlagen der AML

In etwa $\frac{1}{3}$ der Patienten mit einer AML ist eine Mutation des FLT3 nachweisbar (Kelly u. a. 2002). Der Nachweis einer Mutation von FLT3 geht oft einer schlechten Prognose für den Patienten einher (Small 2008). FLT3 (FMS-like-Tyrosine-Kinase) ist eine Tyrosinkinase welche eine wichtige Rolle in der Funktion von Stammzellen spielt. Bei der weiteren Differenzierung der Zellen wird FLT3 normalerweise nicht weiter exprimiert (Small u. a. 1994). Zwei Mutationsarten von FLT3 sind bekannt, Punktmutationen von FLT3 und Mutationen welche zu einer *internal-tandem-dublication* führen (FLT3ITD) (Nakao u. a. 1996). Diese Mutationen führen zu einer Aktivierung der FLT3 Kinase. Somit werden die JAK/STAT, Ras/MAPK und PI-3-K/AKT Signalwege aktiviert und führen somit zu einer Proliferation der Zellen (Small

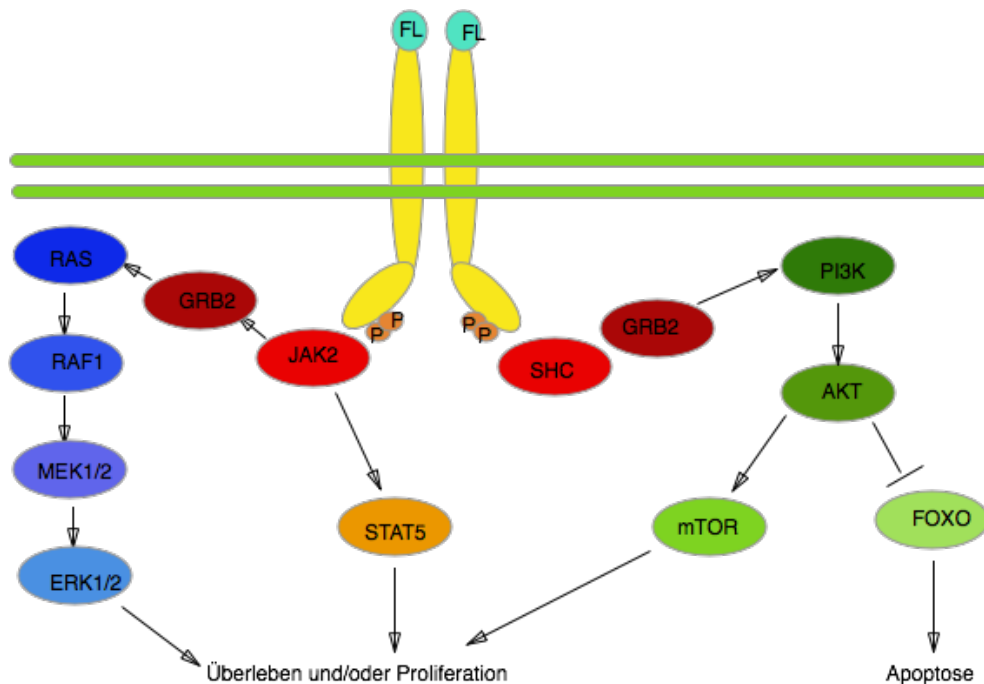


Abbildung 1.2: Flt3ITD Signalkaskade (angelehnt an Swords u. a. 2012)

2008). In Abbildung 1.2 ist schematisch die FLT3 Rezeptor Signalkaskade dargestellt (Swords u. a. 2012). Die Infektion von Mäusen mit FLT3ITD transfiziertem Knochenmark führt zu einer myeloproliferativen Erkrankung der Mäuse (Kelly u. a. 2002).

1.2.3 Therapie

Im Gegensatz zur CML kommt hier keine Monotherapie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor zum Einsatz, sondern häufig eine Kombination aus Chemotherapie und Tyrosinkinaseinhibitoren (Small 2008). In klinischen Studien wurde gezeigt, dass auch der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren wirksam ist (Fiedler u. a. 2005, Knapper u. a. 2006, Fischer u. a. 2010). Die Wirkung der Medikamente ist jedoch oft nur von kurzer Dauer. Häufig besteht schon eine primäre Resistenz, oder die Patienten entwickeln im Verlauf der Therapie eine Resistenz gegen die Inhibitoren (Knapper u. a. 2006, Fischer u. a. 2010).

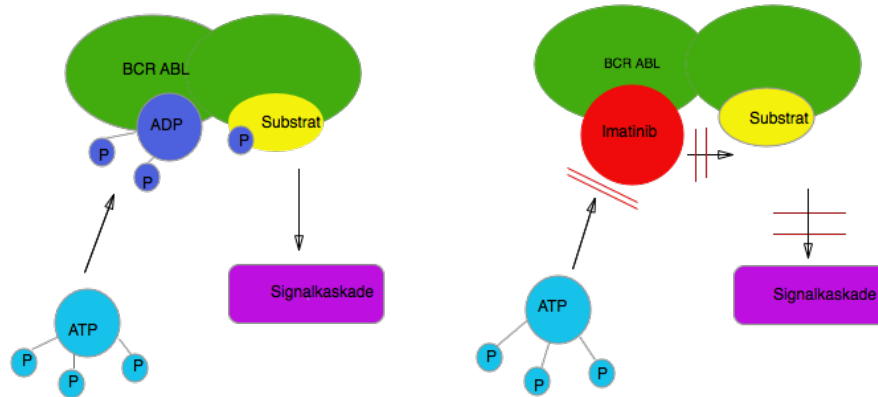


Abbildung 1.3: Funktionsweise der Tyrosinkinaseinhibitoren am Beispiel der Inhibition von BCR-ABL durch Imatinib (angelehnt an Rosenbloom u. a. 2010)

1.3 Tyrosinkinaseinhibitoren

1.3.1 BCR-ABL Inhibitoren

Die bisher bekannten BCR-ABL Inhibitoren haben alle den gleichen Wirkmechanismus. Der Inhibitor bindet in der ATP-Bindungsstasche der ABL Kinase. Somit wird verhindert, dass die ABL-Kinase die energiereiche Phosphatgruppe des ATP (Adenosintriphosphat) auf ein Zielprotein überträgt und es somit aktiviert. Schematisch ist dies in Abbildung 1.3 dargestellt.

Imatinib

Imatinib wurde in den 80er Jahren von Forschern der Firma Ciba Geigy (heute Novartis) entwickelt (Deininger 2008a). STI 571 (Imatinib-Mesylat, Gleevec oder Glivec) weist eine große Selektivität gegenüber dem Zielprotein BCR-ABL auf (Deininger u. a. 2005). Es besteht jedoch keine reine Se-

lektivität gegen BCR-ABL. Es werden bei den erreichbaren Plasmaspiegeln nicht nur die ABL Kinase sondern auch c-KIT und PDGF-Rezeptor inhibiert (Deininger u. a. 2005). Der in vitro sowie in vivo Effekt wurde erstmals 1996 beschrieben (Druker u. a. 1996). Der Einsatz des Medikamentes bei allen Erkrankungen bei der eine Dysregulation einer dieser Kinasen eine Rolle spielt, ist denkbar. In Deutschland wird Imatinib derzeit zur Therapie der CML sowie der Philadelphia-Chromosom-Positiven (Ph⁺) ALL eingesetzt. Des Weiteren findet Imatinib Anwendung in der adjuvanten Therapie des GIST (Gastro Intestinaler Struma Tumor), zur Therapie eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) mit Genumlagerung des PDGF Rezeptors, bei dem Hypereosinophilen Syndrom (HES) und, falls keine operative Therapie möglich ist, auch beim Dermatofibrosarcoma protuberans (Deininger u. a. 2005).

Nilotinib

Nilotinib (AMN107, Tasigna ®) ist eine Weiterentwicklung von Imatinib. Nach Kristallstrukturanalysen der Bindung von Imatinib an ABL wurde das Imatinibmolekül so verändert und angepaßt, dass die Bindung an BCR-ABL spezifischer ist (O'Hare u. a. 2005a). Das Molekül passt somit besser in die ATP Bindungstasche als Imatinib (Deininger 2008b). Mit einem niedrigen IC₅₀ Level von 30nM inhibiert Nilotinib die ABL-Kinase (Weisberg u. a. 2007). Des Weiteren werden KIT und der PDGF-Rezeptor ebenfalls gut inhibiert jedoch mit erst in höheren Konzentrationen des Inhibitors (Deremer u. a. 2008; Deininger 2008b). Seit 2008 wird Nilotinib als Second-line Medikament in der Behandlung der CML eingesetzt. Studien zeigen, dass Nilotinib auch bei BCR-ABL Mutationen wirksam ist bei denen Imatinib wirkungslos ist (Deininger 2008b; Bubnoff u. a. 2006). Inzwischen wird Nilotinib als First-line Medikament eingesetzt (Saglio u. a. 2010). Es zeigen sich hier gute zytogenetische Ansprechraten von 93% in 12 Monaten (Saglio u. a. 2010). In der ENESTnd Studie wurde gezeigt, dass Nilotinib bei gleicher Verträglichkeit bessere zytologische und molekularbiologische Ansprechraten aufweist als Imatinib (Larson u. a. 2012).

Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel®) ist ein Multityrosinkinaseinhibitor, der von Bristol Myers Squibb als SRC-Kinase Inhibitor entwickelt wurde. Es gibt eine Reihe von Mutationen im BCR-ABL Gen, die zur Resistenz gegen Imatinib führen (vgl. Kapitel 1.4.1). Ziel war es nun einen Inhibitor zu nutzen der auch gegen einige dieser Mutationen wirksam ist. Schon gegen unmutiertes BCR-ABL bindet Dasatinib über 300 mal wirksamer als Imatinib (Aguilera u. a. 2009). Der IC₅₀ Wert für Inhibition der ABL Kinase liegt bei 0,6nM (O'Hare u. a. 2005b). Es inhibiert auch effektiv die SRC Kinasen FYN, YES, SRC und LYK, ebenso werden Eph A2, PDGF und cKit inhibiert (Aguilera u. a. 2009). Dasatinib bindet wie Imatinib in der ATP-Bindungstasche der ABL-Kinase, jedoch breitet sich der Inhibitor in eine andere Richtung aus, somit kann Dasatinib noch bei einigen Mutationen wirken in der Imatinib wirkungslos ist. So werden zum Beispiel die durch Mutation veränderten BCR-ABL Proteine L248, Y253, E255 und F359, gegen die Imatinib nicht mehr wirkt, effektiv von Dasatinib inhibiert (Aguilera u. a. 2009; O'Hare u. a. 2005b). Dasatinib wird ebenfalls als First-line Medikament eingesetzt und zeigt in der DASISION Studie eine bessere zytogenetische und molekularbiologische Ansprechrate als Imatinib (Jabbour u. a. 2014).

1.3.2 JAK2-Inhibitor

JAK-Inhibitor-I

Bei dem JAK-Inhibitor-I (Pyrodone 6) hergestellt von Calbiochem®, handelt es sich um einen Inhibitor von JAK2, JAK1, JAK3 und TYK2 (Thompson u. a. 2002). JAK2 wird schon in einer Konzentration von 1nM inhibiert. JAK1 bei 15nM, JAK3 bei 5nM und TYK2 bei 1nM (Thompson u. a. 2002). Der JAK-Inhibitor-I geht eine reversible Bindung in der ATP-Bindungsstelle der Zielkinase ein und inhibiert somit die Funktion der Kinasen (Haan u. a. 2011). Der klinische Einsatz von JAK Inhibitoren ist sinnvoll bei Erkrankungen mit einer Dysregulation der JAK-Signalkaskade und einer Dysregulation der Zytokinsignalkaskade. Klinisch werden JAK-Inhibitoren bei der Myelofibrose

eingesetzt (Stein u. a. 2015), bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (Boyle u. a. 2014) sowie bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Vuitton u. a. 2013).

1.3.3 FLT3ITD-Inhibitor

Midostaurin

Midostaurin® (PKC412) wurde von der Firma Novartis entwickelt und ist ein Multi-Target-Tyrosinkinaseinhibitor. Es inhibiert neben FLT3ITD auch c-Kit, VEGF-Rezeptor-2, PDGF-Rezeptor, MDR und die Protein-Kinase C (Fischer u. a. 2010). PKC412 inhibiert schon in niedrigen Konzentrationen die Autophosphorylierung von FLT3ITD, der IC₅₀ Wert liegt bei unter 10nM (Weisberg u. a. 2002). In Studien wird Midostaurin in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika bei der Behandlung der AML eingesetzt. Eine klinische Zulassung für Midostaurin besteht derzeit noch nicht. (Cooper u. a. 2015). In einer Studie wurde Midostaurin ebenfalls zur Therapie der Mastozytose eingesetzt (Gotlib u. a. 2005).

1.3.4 SRC-Inhibitor

Es gibt einige SRC-Kinaseinhibitoren auf dem Markt und in der Forschung, so z.B. die Gruppe der Pyrido[2,3-d]pyrimidine Tyrosinkinase Inhibitoren, Dasatinib®, SU6656 und viele mehr. In dieser Arbeit wurde ein Mitglied der Pyrido[2,3-d]pyrimidine Tyrosinkinase Inhibitoren verwendet, somit wird an dieser Stelle nur auf den verwendeten Inhibitor eingegangen.

PD0166326

Hierbei handelt es sich um einen Tyrosinkinaseinhibitor welcher die Kinasen der SRC-Familie aber auch ABL, FGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor inhibieren kann (Antczak u. a. 2009). PD0166326 ist ein kompetitiver Inhibitor bezüglich auf das ATP (Bubnoff u. a. 2005a).

1.4 Resistenzmechanismen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie der CML

In der Therapie der CML ist Imatinib inzwischen gut etabliert. Nahezu alle Patienten sprechen initial gut auf die Therapie an (Bubnoff u. a. 2010). In der IRIS- Studie wurde eine 6-Jahres- Überlebensrate von 88% der Patienten in der chronischen Phase gezeigt (Hochhaus u. a. 2009; Bubnoff 2011). In der Akzelerationsphase zeigt sich ein deutlich vermindertes Ansprechen, in dieser Phase der Erkrankung ist die Überlebensrate nur bei 53% innerhalb von 4 Jahren. (Bubnoff 2011). In der Blastenkrise liegt die Überlebensrate nur bei 11% in 3 Jahren (Bubnoff 2011). Im Verlauf der Krankheit, vor allem während der Blastenkrise entwickeln jedoch viele Patienten eine Resistenz gegen den Tyrosinkinaseinhibitor (Druker u. a. 2001). Durch Imatinib wird die Kinase effektiv inhibiert und es kommt zu keiner weiteren Proliferation. Resistenzen sind zu erklären in dem Imatinib nicht mehr an BCR-ABL binden kann, die Zellen einen BCR-ABL unabhängigen Weg bestreiten oder der Inhibitor nicht mehr in ausreichender Menge am Zielort ankommen kann (Bubnoff u. a. 2003). Unterschieden werden primäre und sekundäre Resistenzmechanismen (Mauro 2006). Bei primären Mechanismen sprechen die Patienten schon in der initial Therapie mit TKI nicht komplett an, sekundäre Resistenzmechanismen sind im Verlauf der Erkrankung erworben (Mauro 2006).

1.4.1 Punktmutationen

Ein effektiver Resistenzmechanismus sind die Punktmutationen im Targetprotein (Schindler u. a. 2000). Die Punktmutationen führen dazu, dass die Inhibitoren nicht mehr an BCR-ABL binden können und die Kinase somit weiterhin aktiv ist. In nahezu 70% der Patienten die initial auf Imatinib gut angesprochen haben und einen Rückfall erleiden sind Punktmutationen zu finden (Bubnoff u. a. 2003). Die bekannteste und effektivste Mutation ist die

Mutation	IC50 Wert gegen Imatinib (μM)
M244V2	0.68
G250E	1.58
Q252H	2.93
Q252R	nicht erruiert
Y253H	>10
Y253F	5.96
E255K	7.81
E255V	6.25
F311L	nicht erruiert
T315I	>10
F317L	3.3
M351T	1.07
E355G	2.82
F359V	nicht erruiert
V379I	nicht erruiert
L387M	nicht erruiert
H396P	2.0
H396R	nicht erruiert

Tabelle 1.1: Punktmutationen des BCR-ABL und Resistenz gegen Imatinib (angelehnt an Bubnoff u. a. 2003)

T315I Mutation, durch den Wechsel von Threonin zu Isoleucin an der Stelle 315 können die meisten Inhibitoren nicht mehr an BCR-ABL binden. Es kommt somit zu einer Resistenz gegen die Imatinib, Dasatinib und Nilotinib (Bubnoff u. a. 2003). Der 2012 zugelassene Inhibitor Ponatinib ist gegen die T315I Mutation wirksam, weist jedoch teilweise schwere Nebenwirkungen auf (Miller u. a. 2014). Einige der bisher bekannten Mutationen sind in den der Tabelle 1.1 dargestellt.

1.4.2 BCR-ABL Amplifikation

Die Zellen regulieren die Produktion des BCR-ABL Proteins hoch, somit befindet sich mehr aktive Kinase in den Zellen (LeCoutre u. a. 2000). Es

wird also auch mehr Inhibitor benötigt um die Kinase zu hemmen (Bubnoff u. a. 2003).

1.4.3 Genetische Instabilität

Das Philadelphia Chromosom führt zu einer genetischen Instabilität. Somit ist es in den Zellen in denen das Philadelphia Chromosom aktiv ist eine weitere Mutation wahrscheinlich. Diese können auch zu einer unabhängigen Proliferation von BCR-ABL führen (Bubnoff u. a. 2003).

1.4.4 α 1 acid Glycoprotein

Normalerweise ist Imatinib in vivo an Plasmaproteine wie Albumin und α 1 Glycoprotein gebunden. Wenn nun mehr Plasmaproteine vorhanden sind und die Tyrosinkinaseinhibitoren an die Proteine gebunden sind, steht weniger Inhibitor zur Verfügung welcher in die Zellen eindringen kann um so BCR-ABL effektiv zu inhibieren (Gambacori-Passerini u. a. 2000).

1.4.5 AHI-1

Abelson helper integration site 1(AHI1) kann in Philadelphia Chromosom positiven Zelllinien hochreguliert sein. Dieses Protein reguliert in der Hämatopoese einige Schritte. AHI1 bildet mit BCR-ABL und JAK2 einen Komplex und verändert somit die Sensibilität der Zellen gegenüber den Tyrosinkinaseinhibitoren (L.Zhou u. a. 2008).

1.4.6 GM-CSF

Eine erhöhte Zytokinproduktion stellt einen weiteren Resistenzmechanismus dar. So wurde gezeigt, dass eine vermehrte Sekretion der Tumorzellen von GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colon Stimulating Factor), einem Zytokin, zu einer BCR-ABL unabhängigen Aktivierung von JAK2 und STAT5 führt. Somit erhalten die Zellen weiterhin ein Wachstumssignal obwohl BCR-ABL weiterhin durch die Tyrosinkinaseinhibitoren blockiert ist (Wang u. a. 2007).

1.4.7 Multidrug-Resistance-Protein1

In dem die Zellen die Tyrosinkinasen schneller aus der Zelle herausschaffen, können diese nicht mehr die Zielkinase inaktivieren und die Tumorzellen proliferieren weiter. Gezeigt worden ist dieser Mechanismus auch für CML Patienten. Hier waren ABCB1(=MDRP1) ABCG2 und OCT1 vermehrt an den Zellmembranen der erkrankten Zellen exprimiert (K.Eechoute u. a. 2010).

1.5 Fragestellung

In einigen Patienten sind Resistenzen zu beobachten, ohne das bekannte Resistenzmechanismen nachzuweisen sind. Bei etwa 20 % der Patienten in der chronischen Phase der CML sind primäre Resistenzen nachweisbar (Bixby u. a. 2009). In nur etwa 20 % der Patienten in der chronischen Phase sind Mutationen des BCR-ABL feststellbar, während der Blastenkrise bei 70-80 % der Patienten (Morozova u. a. 2015). In der AML ist das Ansprechen auf eine Monotherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren oft nur von kurzer Dauer da sich sekundäre Resistenzen rasch ausbilden (Heidel u. a. 2006). Die Frage ist nun welche Resistenzmechanismen hier in Kraft treten. Eine Reihe an denkbaren Mechanismen ist hier denkbar. So sind z.B. zusätzliche Mutationen anderer Kinasen möglich. Sowohl BCR-ABL abhängige wie auch unabhängige Wege sind denkbar. In dieser Arbeit werden Resistenzmechanismen in Zelllinien untersucht, die keine Mutation im Zielprotein aufweisen und trotzdem eine ausgeprägte Resistenz gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren zeigen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Allgemeine Ausrüstung

2.1.1 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind entweder von Mäusen, Kaninchen oder Esel generiert. (Maus=M, Kaninchen=R, Esel=D)

α Abl	M	BD Pharmingen, Heidelberg
α - β -Aktin(KlonAC-15)	M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
α -Phospho-STAT5 A/B	M	Wheeler, Hamilton, New Zealand
α -Stat5	R	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -Phospho-Hck	R	Upstate Biotechnology, New York, USA
α -Phospho-Lck	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Phospho-Tyrosin(Klon4G10)	M	Upstate Biotechnology, New York, USA

α -Phospho-Tyrosin,(Klon pY20)	M	PharMingen, San Diego, USA
α -Kaninchen, HRP-konjugiert	D	Amersham, Braunschweig
α -Maus, HRP-konjugiert,	D	Amersham, Braunschweig
α -Phospho-Jak2 (pY1007/1008)	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Jak2	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Tec(Klon H90)	R	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -pSrc family	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Src	M	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Flt3	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Phospho-Flt3(pY589/591)	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α - β -Tubulin	R	Upstate Biotechnology, New York, USA
α -Lck	R	Cell Signaling, Frankfurt/Main
α -Hck	R	Upstate Biotechnology, New York, USA

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Amidoschwarz 10B	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Fluka, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$)	Fluka, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Phosphat buffered saline (PBS),10-fach	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt

SuperSignal West Pico, Dura, Femto	Perbio Science, Berlin
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trizol	Life Technologys, Carlsbad
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

2.1.3 Medien und Supplemente

FCS Gold	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin	PAA Laboratories, Cölbe
Murines rekombinantes Interleukin-3	R&D Systems, Wiesbaden
PBS, 10-fach, steril	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe

2.1.4 Molekularbiologische Kits

CellTiter® AQueous Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA
NucleoSpin®Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren
RayBio® Human Cytokine Antibody Array 3	RayBiotech Inc., Norcross, USA
Titan One Tube RT-PCR Kit	Roche, Penzberg

2.1.5 PCR-Primer

BCR

5-CACTAAAGCGAGTGAGCTGGACTTGG 3-

ABL

5- GGTGGATGAGTCAAACCTGCTTGCCAGC 3-

2.1.6 Nested PCR-Primer

ABL SH3 Domain

5-GGAGATGAGAAAATGGGTCCTGTCG 3-

5-CCGTAGATACTGGGCTTGTGCGC 3-

ABL Kinase Domain

5-GCGCAACAAGCCCCTGTCTATGG 3-

5-GCCAGGCTCTCGGGTGCAGTCC 3-

2.1.7 Tyrosinkinaseinhibitoren

AMN107	Novartis, Basel
BMS-354825	Bristol-Myers-Squibb, München
Jak-Inhibitor-I	Calbiochem, Bad Soden
PD0166326	Thomson Reuters Pharma, New York, USA
PKC412	Novartis, Basel
STI571	Novartis, Basel

2.1.8 Zellkulturen

Ba/F3 immortalisierte, murine Prä-B-Zelllinie, abhängig von IL-3, gewonnen aus Balb/C Mäusen

Die Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich menschliche und tierische Zellkulturen) in Braunschweig zur Verfügung gestellt.

2.1.9 Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Entwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inkubator-Schüttler Certomat®BS-1	Braun, Melsungen
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R und 5810R	Eppendorf, Hamburg
Laminar flow 1.8, Sterile Werkbank	Holten, Gydevang, Dänemark
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät CB162	Carl Stuart Limited, Dublin, Irland
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi- Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
NanoDrop 3300 Fluorospectrometer	Thermo Scientific, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter inoLab®	WTW, Weilheim
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
PowerPac 200, Stromgenerator	Bio-Rad, München
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer 7-2020	neoLab, Heidelberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Megafuge R 1.0	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.2 Zellkultur

2.2.1 Auftauen der Zelllinien

Gelagert werden die Zelllinien bei -196°C im Stickstofftank. Um die eingefrorenen Zelllinien wieder aufzutauen und somit wieder in einen stoffwechsellaktiven Zustand zu überführen, werden die eingefrorenen Tubes rasch von -196°C auf 37°C erwärmt. Die Tubes mit den Zellen werden zu diesem Zweck in ein Wasserbad von 37°C gelegt. Sobald die Zieltemperatur erreicht ist werden die Zellen zügig in 5ml Kulturmedium resuspendiert. Um das toxische DMSO zu entfernen wird die Zellsuspension 3 Minuten lang bei 1500rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen können nun in frischem Kulturmedium resuspendiert werden und in Kulturflaschen übernommen werden.

2.2.2 Kultivierung der Zelllinien

Material

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, FCS 10%, 2mM Glutamin, 2% Penicillin-Streptomycin Lösung

Methode

Alle Arbeiten an den lebenden Zellen werden grundsätzlich unter sauberen Bedingungen an der dafür vorgesehenen Werkbank durchgeführt. Kultiviert werden die Zellen in Zellkulturflaschen in Inkubatoren. In diesen herrschen festgelegte Bedingungen mit einer Temperatur von 37°C , einem CO_2 -Gehalt der Luft von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Die Zellen werden alle 2-3 Tage in neues Medium umgesetzt. Hierfür werden die gelösten Zellen mit dem Medium in Tubes überführt und für 3 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend können die Zellen in frischem Kulturmedium wieder resuspendiert und in die Kulturflaschen rücküberführt werden.

2.2.3 Konservierung der Zelllinien

Material

Einfriermedium: 80% FCS, 20% DMSO

Methode

In dem FCS sind viele Substanzen enthalten, die den Zellen helfen sollen die schädliche Prozedur des Einfrierens gut zu überstehen. Das DMSO ist ein Frostschutzmittel, dass die Bildung von Eiskristallen in und um die Zellen verhindern soll. Um die Zellen einzufrieren werden sie gezählt und die Menge an Medium, in denen sich ca. 10^7 Zellen befindet, für 3 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1ml Einfriermedium suspendiert. Die Zellen werden nun 24 Stunden bei -80°C langsam in einer Ethanolkammer heruntergekühlt und anschließend in einen Stickstofftank bei -196°C gelagert.

2.2.4 Bestimmung der Zahl und Aktivität der Zellen

Um die Zellzahl zu bestimmen werden $50\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $50\mu\text{l}$ einer 0,5% Trypanblaulösung gemischt. Ein Tropfen dieser Suspension wird in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop angeschaut. Lebendige Zellen haben eine funktionierende Zellmembran und nehmen den Farbstoff nicht auf. Tote Zellen hingegen färben sich auf Grund der fehlenden Barrierefunktion der Membran blau an und lassen sich somit differenzieren. Dadurch dass die Zellen 1:1 verdünnt sind wird die ausgezählte Zellzahl der vitalen Zellen mit dem Faktor 2 multipliziert und durch den Kammerfaktor kann die tatsächliche Zellzahl in einem Mililiter Medium hochgerechnet werden.

2.3 Proliferationsassay

Ziel der Versuche ist es zu zeigen wieviele Zellen nach einer bestimmten Zeitspanne lebensfähig sind. Die Grundlage bildet hier die Fähigkeit von viablen

Zellen durch gebildetes NADH und NADPH das gelbe MTS zu einem braunen Formazan Salz zu reduzieren. Das braune Salz hat ein Absorptionsmaximum bei 490nm und kann somit photometrisch genau bestimmt werden. Für die Versuche werden in 96-Loch-Platten Triplets von 10^4 Zellen in $100\mu\text{l}$ Kulturmedium ausgebracht und für 48 Stunden im Inkubator kultiviert. Für die Messung wird ein Loch mit $100\mu\text{l}$ Kulturmedium gefüllt, dieser Wert gilt als Leerwert. In die anderen zu messenden Kavitäten wird $20\mu\text{l}$ MTS hinzugegeben und die 96-Loch-Platten für weitere 2 Stunden im Inkubator mit dem Substrat kultiviert. Anschließend erfolgt die photometrische Messung bei 490nm.

2.4 Proteinbestimmung

2.4.1 Lyse der Zellen

Material

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/ HCL, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml A.d.

SDS-Probepuffer: 1 M Tris/ HCL, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20%Glycin in A.d.

Methode

Um die Zelllysate herzustellen werden 10^6 Ba/F3 Zellen für 5 Minuten bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt und das Zellpellet in $150\mu\text{l}$ Lysispuffer resuspendiert und in ein 1,5ml Eppendorf-Tube überführt. Für 20 Minuten wird dieses Tube auf Eis inkubiert. Nun wird erneut für 20 Minuten bei 4°C bei 1400rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abpipetiert und in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt. Es erfolgt nun die Zugabe von $75\mu\text{l}$ SDS-Probepuffers und die Zelllysate

werden nun bei 95°C für 10 Minuten gekocht, hierdurch werden die Proteine denaturiert. Um das Kondensationswasser wieder zurückzuführen erfolgt kurze Zentrifugation an der Tischzentrifuge. Das Lysat ist nun fertig für die SDS-Gelelektrophorese. Durch die Zugabe von SDS zu den denaturierten Proteinen kann das SDS die Ladungen der Proteine überdecken und zu einer einheitlichen negativen Ladung und somit gegenseitigen Abstoßung der Proteine führen.

2.4.2 SDS-Page

SDS-Page=Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Material

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/ HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/ HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Puffer: 25 mM TRIS; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Methode

Durch diese Methode können Proteingemische aufgetrennt und somit der weiteren Analyse zugeführt werden. Durch das diskontinuierliche Trenngel können durch Anlegen einer elektrischen Ladung unterschiedlich große Proteine proportional zu ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Große Proteine wandern langsamer, da sie durch das Gel stärker zurückgehalten werden, kleine Proteine können das Trenngel relativ leicht durchdringen und wandern somit schneller entlang des elektrischen Stromes. Das Sammelgel weist einen neutralen pH-Wert auf und dient dem Aufkonzentrieren der Proteine. Das Trenngel hat einen basischen pH-Wert und eine kleinere Porengröße. Die Porengröße kann durch unterschiedliche Anteile der Polyacrylamid-Lösung variiert werden. Durch diese Variation können bestimmte Proteingrößen besser aufgetrennt werden. (Laemmli 1970).

Das Trenngel wird rasch zwischen zwei Gelplatten gegossen, die durch einen Abstandhalter von einander getrennt sind. Über diese Schicht wird 70%iges Ethanol gegossen um einen sauberen Abschluß des Geles zu erreichen. Nach etwa einer Stunde ist das Trenngel fest und das Ethanol kann abgegossen werden. Nun wird das Sammelgel darübergelassen und oben in das Sammelgel ein Kamm eingelegt um Taschen zu bilden, in die die Zellysate später gegeben werden können. Nach einer halben Stunde wird der Kamm entfernt und das Gel ist einsatzbereit. Die Platten werden in die Elektrophoresekammern eingespannt. Nun können die Taschen im Gel mit den Zellysaten beladen werden. Des Weiteren wird in eine Kammer eine sogenannte Leiter geladen, diese ist eine gefärbte Mischung aus Proteinen mit bekannter Größe. Die Leiter dient zur ungefähren Größenbestimmung der Proteine. Durch Anlegen einer Spannung an die Elektrophoresekammern beginnen die Proteine entlang des Geles zu laufen und sich aufzutrennen.

2.4.3 Immunblot

Material

Transferpuffer: 25 mM TRIS; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Methode

Ein Immunblot, oder auch Westernblot, bezeichnet den Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran. Um die Proteine der SDS-Page auf eine PVDF Membran zu transferieren muss die Membran zunächst kurz in Methanol eingelegt werden um aktiviert zu werden. In einer Schale gefüllt mit Transferpuffer befindet sich eine geöffnete Plastikgitterbox in welche die Membran eingelegt wird. Das Trenngel wird nun mittig und grade auf die PVDF-Membran gelegt und die Gitterbox verschlossen. Diese kann nun in die Transferkammer eingelegt werden. Wird ein elektrisches Feld angelegt wandern die Proteine zur Anode, dass heisst, es muss die Anordnung Kathode-Gel-Membran-Anode herrschen. An die Transfermembran wird eine Stromstärke von einem Am-

pere angelegt. Die Dauer des Transferses ist abhängig von der Proteingröße. Ein ungefähres Richtmaß ist die Größe des Proteins in kDa, dies entspricht in etwa der Dauer des Transferses in Minuten (Renart u. a. 1979).

2.4.4 Immunodetektion von Proteinen

Material

PBS-Tween Puffer: 0,1%Tween 20 in PBS

Milch zum Blocken: 5% Trockenmilchpulver in PBS-Tween Puffer

BSA zum Blocken: 5%BSA in PBS-Tween Puffer

Methode

Es befinden sich viele unterschiedliche, aufgetrennte Proteine auf der Membran. Die zu untersuchenden Proteine müssen sichtbar gemacht werden. Die Membran wird kurz mit dem PBS-Tween Puffer abgewaschen und anschließend mit der Milch oder dem BSA inkubiert. Das BSA wird verwendet wenn später Antikörper gegen phosphorylierte Proteine zur Verwendung kommen, ansonsten wird Milch angewandt. Für 30 Minuten wird die Membran nun mit dem entsprechenden Blockierungsmittel auf dem Schüttler bei Raumtemperatur blockiert. Die Milch bzw. das BSA wird anschließend abgeschüttet und ein in frischer Milch bzw. BSA gelöster Antikörper zu der Membran gegeben. Für mindestens 12 Stunden wird die Membran nun bei 4°C auf einen Schüttler inkubiert. Um den nicht gebundenen Antikörper von der Membran zu waschen wird die Antikörper-Lösung abgeschüttet und die Membran 3 Mal für 10 Minuten in PBS-Tween Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt über einen mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Dieser bindet an den F_c Teil des Primärantikörpers. Die Membran wird für 30 Minuten mit dem in Blockierpuffer gelöstem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der überschüssige Antikörper erneut 3 mal mit PBS-Tween Puffer abgewaschen. Wird der Membran Luminol zugegeben tritt auf Grund der Meerrettich-Peroxidase des

Sekundärantikörpers eine Chemoluminiszenzreaktion ein und der Antikörper kann mit Hilfe eines Hyperfilmes sichtbar gemacht werden.

2.4.5 Entfernung der gebundenen Antikörper

Material

Stripping-Puffer: 0,2M NaOH

Methode

Auf einer Membran befinden sich mehrere Proteine die nacheinander sichtbar gemacht werden können. Phosphorylierte Proteine werden generell zuerst nachgewiesen. Der Erstantikörper wird mit Natriumhydroxid gelöst. Hierzu wird die Membran für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gelegt. Anschliessend wird die Membran 3 Mal mit Aqua dest. gewaschen. Nun kann die Membran erneut in Milch blockiert werden und die Immundetektion mit einem anderen Antikörper wiederholt werden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNS-Extraktion

Um die RNS aus den Zellen zu extrahieren werden mindestens 10^7 Ba/F3 Zellen für 3 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgeschüttet und das Zellpellet kurz in flüssigen Stickstoff getaucht um alle weiteren Prozesse in der Zelle zu stoppen. Unter dem Abzug wird auf dem Zellpellet 1,8ml Trizol gegeben. Das Tube kommt solange verschlossen auf den Vortex bis sich das Zellpellet aufgelöst hat. In das Gefäß wird nun $200\mu\text{l}$ Chloroform hinzugegeben und das Gemisch kurz auf dem Vortex vermischt bis die Flüssigkeit milchig trüb ist. Mit einer Pipette wird der Ansatz in ein 2ml Eppendorfcup überführt. Diese werden für 15 Minuten bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Es zeigen sich hier 2 Phasen der Flüssigkeit. In der oberen, durchsichtigen Phase befindet sich die RNS. Diese Phase wird vorsichtig abpipetiert und in ein frisches 1,5ml Eppendorfcup überführt. Nun

wird 700 μ l Isopropanol hinzugegeben und das Cup für mindestens 1 Stunde bei -20°C eingefroren. Das Eppendorfcup wird bei 4°C und 14000rpm für 15 Minuten zentrifugiert und anschließend das Isopropanol abgeschüttet. Auf das Pellet wird 500 μ l 70%iges Ethanol gegeben. Es erfolgt erneut Zentrifugation für 8 Minuten bei 4°C mit 8400rpm. Das Ethanol wird abpipettiert und das Eppendorfcup erneut für 1 Minute bei 4°C mit 8400rpm zentrifugiert. Das restliche Ethanol kann nun vorsichtig abpipettiert werden. Das Eppendorfcup wird nun offen unter einen Abzug gestellt und somit getrocknet. Das verbliebene Pellet enthält die RNS. Das Pellett wird in 20 μ l H₂O aufgelöst und kann nun weiter verwendet werden. Die Menge und Reinheit der enthaltenen RNS kann durch den Nanodrop® gemessen werden. Hierbei wird die Absorption bei 260 und 280nm gemessen, dadurch kann sowohl die Menge wie auch die Qualität der RNS durch das Gerät ermittelt werden.

2.5.2 PCR

Durch die Polymerasekettenreaktion kann DNS vervielfältigt und somit weiteren Untersuchungen zugeführt werden. Bei der PCR werden 3 Schritte wiederholt durchlaufen.

1.: Denaturierung: bei 94°C werden die doppeläufigen DNS-Stränge aufgespalten.

2.: Hybridisierung: bei einer Temperatur von 50-65°C können sich Primer an die DNS anlegen. Die Temperatur ist von den Primern abhängig und wird durch die Länge und die Sequenz des Primers bestimmt. Primer sind kurze festgelegte DNS-Sequenzen von denen die PCR beginnt.

3.: Elongation: bei 72°C beginnt die DNS-Polymerase zu arbeiten und die Desoxynukleotidtriphosphate Stück für Stück anzubauen. Die Geschwindigkeit der Polymerase liegt bei ungefähr 1000 Basenpaaren pro Minute. Diese Schritte werden immer wieder wiederholt bis ausreichend DNS für weitere Untersuchungen hergestellt worden ist. Da die DNS exponentiell vermehrt wird geht dies relativ rasch. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dieser ist exakt programmierbar und hält die vorgegebenen Temperaturen für festgelegte Zeitspannen (Mullis u. a. 1986).

RT-PCR

Mit der Reverse-Transkriptase-PCR kann RNS in cDNS umgeschrieben und diese dann amplifiziert werden. Da die RNS einsträngig ist kann auf die Denaturierung verzichtet werden. Der erste Zyklus der PCR kann also ohne des Denaturierungsschritt erfolgen. Damit die Reverse Transkriptase ausreichend Zeit zu arbeiten hat ist der Elongationsschritt relativ lang. Anschließend wird die entstandene cDNS noch mittels PCR vervielfältigt und es erfolgen mehrere Zyklen mit allen 3 Schritten der PCR. Damit die RT-PCR auch über Nacht eingesetzt werden kann, ohne dass das Endprodukt Schaden nimmt, endet das Programm mit der Temperatur von 6°C welche gehalten wird.

Ansatz für die RT-PCR:

125µl Mastermix
90µl H₂O
5µl 3' Primer in H₂O 1:10 verdünnt
5µl 5' Primer in H₂O 1:10 verdünnt

Von diesem Ansatz werden

45µl in ein PCR Tube gegeben
+5µ RNA 1:1000 in H₂O
+1µl Reverse Transkriptase

RT-PCR-Programm:

$$1 \times \begin{cases} 54^\circ\text{C} & 30\text{sec} \\ 45^\circ\text{C} & 45\text{min} \end{cases} \quad 50 \times \begin{cases} 94^\circ\text{C} & 30\text{sec} \\ 54^\circ\text{C} & 30\text{sec} \\ 72^\circ\text{C} & 1\text{min} \end{cases} \quad 6^\circ\text{C}$$

Nested-PCR

In dieser Arbeit werden nur die DNS-Sequenzen welche einzelne Proteine kodieren untersucht. Die entsprechenden DNS-Sequenzen sind also relativ kurz.

Es erfolgt auf die erste PCR, also der RT-PCR eine weitere PCR mit innerhalb des ersten amplifizierten Bereich gelegenen Primern. Durch die nested-PCR wird eine sehr hohe Spezifität erreicht und es entsteht eine große Menge an weiter zu untersuchender DNS.

Ansatz für die Nested-PCR:

3 μ l Reaktionspuffer
 1 μ l dNTP
 1 μ l 3' Primer 1:10 verdünnt in H₂O
 1 μ l 5' Primer 1:10 verdünnt in H₂O
 1 μ l Pfu-Polymerase
 22 μ l H₂O
 1 μ l Probe

Nested-PCR-Programm:

$$1 \times \left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 2 \text{ min} \\ 54^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 100 \text{ sec} \end{array} \right. \quad 50 \times \left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ sec} \\ 54^{\circ}\text{C} \quad 30 \text{ sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 100 \text{ sec} \end{array} \right. \quad 1 \times \left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C} \quad 30\text{sec} \\ 54^{\circ}\text{C} \quad 30\text{sec} \\ 72^{\circ}\text{C} \quad 4\text{min} \end{array} \right. \quad 6^{\circ}\text{C}$$

2.5.3 Agaroseelektrophorese

Material

TAE-Puffer (10-fach): 0,4 M TRIS, 1,1% C₂H₄O₂, 2% 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 in H₂O

DNS-Probenpuffer (10-fach): 50% Glycerol, 0,5% Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in H₂O

Methode

Durch die Agaroseelektrophorese können DNS Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. Die DNS Fragmente sind negativ geladen und

wandern in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Das verwendete Gel wirkt dabei als Filter und die DNS Fragmente werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Durch Variation der verwendeten Agarose Konzentration werden Gele mit unterschiedlicher Porengröße hergestellt. Mit hochprozentigen Gelen (1,5-2%) können DNS Fragmente mit weniger als 500 Basenpaaren besser aufgetrennt werden. Niedrigprozentige Gele (0,5-1%) sind gut geeignet DNS Fragmente mit mehr als 1000 Basenpaaren aufzutrennen. Um die DNS Fragmente nachzuweisen wird Ethidiumbromid zu den Gelen zugesetzt. Dieser Farbstoff interkaliert in DNS Stränge und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Die Fluoreszenz des Ethidiumbromids wird dadurch stark erhöht und die DNS kann mittels UV-Licht nachgewiesen werden.

Zur Herstellung eines 1%igen Geles wird 400ml TAE-Puffer mit 4g Agarose gemischt. Diese Mischung wird erhitzt und gerührt bis sie vollkommen klar ist. Erst wenn das Gemisch auf 50°C heruntergekühlt ist werden 10 μ l Ethidiumbromid hinzugegeben. Der Ansatz wird nun in Gelträger gegossen und eine Schablone für die Taschen eingelegt. Das Gel verfestigt sich nach etwa einer Stunde und kann dann benutzt oder in TAE-Puffer aufbewahrt werden. Für die Agaroseelektrophorese wird das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die zu untersuchenden Proben, also die Proben aus der PCR, werden mit 5 μ l DNS-Probepuffer versetzt und in die Taschen eingebracht. In eine Tasche wird eine DNS-Leiter geladen. Die Leiter ist ein Gemisch aus DNS-Strängen bekannter Länge und kann somit zur ungefähren Größenbestimmung der zu untersuchenden DNS-Fragmente herangezogen werden. Nun wird eine elektrische Spannung von 20-120 Volt angelegt und die DNS Fragmente beginnen sich entlang des elektrischen Feldes aufzuspalten.

2.5.4 Extraktion der DNS aus dem Agarosegel

Um ein DNS-Fragment weiter zu analysieren muss es wieder aus dem Agarosegel extrahiert werden. Auf Höhe der nachgewiesenen Banden wird das Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 2ml Eppendorfcup überführt. Die Extraktion erfolgt analog des NucleoSpin®Extract II Kits.

Dem Cup werden 500 μ l des NT-Puffers zugesetzt und das Gemisch bei 50°C für 10 Minuten auf dem Rüttler inkubiert bis sich das Gelstück vollständig aufgelöst hat. Die Flüssigkeit wird in ein dafür vorgesehenes Tube mit einer Säule in der sich ein Filter befindet überführt und bei 13000rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird abgeschüttet und 600 μ l NT3 Puffer hinzugegeben. Das Ganze wird bei 13000rpm für eine Minute erneut zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Tube wird anschließend bei 13000rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Die Säule wird in ein frisches Eppendorfcup überführt und 40 μ l H₂O hinzugegeben. Das Cup wird nun für 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend erfolgt erneute Zentrifugation für 1 Minute bei 13000rpm. Die DNS befindet sich nun in dem H₂O gelöst und kann weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

2.6 Versuche mit Zytokinen

2.6.1 Conditoned Media

Material

PBS Wasch Puffer: 900ml H₂O, 100ml 10fach PBS

Medium: RPMI1640, 10 %FCS, 1 %Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin
Lösung

Methode

Um zu untersuchen ob Zellen Zytokine produzieren wird das Medium in dem die Zellen leben genauer untersucht. Wichtig ist, dass den Zellen ausreichend Zeit bleibt um Zytokine zu produzieren, ausreichend Zellen vorhanden sind und ausreichend Medium für weitere Versuche hergestellt wird. Für die Herstellung des CM wurden jeweils 2,5x10⁶ Ba/F3 Zellen für 3 Minuten bei 1400rpm zentrifugiert und mit 10ml PBS Wasch Puffer resuspendiert. Dieser

Vorgang wird 2 mal wiederholt. Die somit vom Medium gereinigten Zellen wurden in 5 ml frischem Medium für 24 Stunden inkubiert. Nach 24 Stunden werden die Zellen erneut zentrifugiert und das Medium abpipettiert. Das Medium wird durch einen $0,2\mu\text{m}$ Filter in ein Tube überführt damit garantiert ist, dass keine Ba/F3 Zellen mit in das Medium gelangen. Das Medium kann nun für weitere Versuche verwendet werden.

2.6.2 Zytokin Array

Prinzip des RayBio® Human Cytokine Antibody Array 3

Um die Zytokine im Medium zu detektieren wird der Human Cytokine Antibody 3 der Firma Raybiochem® verwendet. Mit diesem Array kann man schnell und einfach die von den Zellen produzierten Zytokine nachweisen. Durch diese Methode können Zytokine in geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden als mittels dem traditionellen ELISA-Test. Auf dem Array sind unterschiedliche Antikörper gegen Zytokine aufgebracht. Wird das Medium mit den Zytokinen auf den Array gegeben binden diese an die Antikörper. Darüber wird nach einer bestimmten Inkubationszeit Biotin gelabelter Antikörper gegen die Zytokine gegeben. Anschließend wird Streptavidin hinzugegeben welches an das Biotin der Antikörper bindet. Dieses erzeugt nun ein Chemoluminiszenzsignal welches mit einem Hyperfilm nachgewiesen werden kann. In Tabelle 2.1 sind die gespotteten Zytokine auf der hier verwendeten Membran aufgezeigt.

Methode

Die Membran wird mit der Negativseite nach oben in eine 8-Loch-Platte gelegt. Dazu wird 2 ml des Blocking Buffers gegeben und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert und anschließend der Überstand abgeschüttet. Nun wird 2 ml des zu untersuchenden Mediums auf die Membran gegeben und die Platte erneut bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einen Rüttler inkubiert. Währenddessen werden die Wasch-Puffer 1

Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β 1
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Ang	OSM	THPO	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Ang	OSM	THPO	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos

Tabelle 2.1: Membran des Cytokin Array 3 mit den darauf gespotteten Zytokinen (Abbildung angelehnt an die Firma Raybiochem®, Mouse Cytokine Array C3)

und 2 1:20 in H₂O verdünnt. Nach der Inkubationszeit wird das überstehende Medium von der Membran abpipettiert. Es erfolgt 3x ein Waschschriff mit dem Waschpuffer1: es werden 2ml des Puffers auf die Membran gegeben, die Platte für 10 Minuten auf den Rüttler gegeben und anschließend der Puffer abpipettiert. Dieser Vorgang wird noch 2 Mal mit dem Waschpuffer 2 wiederholt. Während der Waschschriffe wird der Primärantikörper vorbereitet: der Antikörper wird in 100 μ l Blocking Puffer suspendiert und kurz auf dem Vortex vermischt. Dieser Ansatz wird in ein vorbereitetes Gefäß mit 2ml Blocking Puffer überführt. Nach den Waschschriffen wird nun 1ml der vorbereiteten Lösung des Primärantikörpers auf die Membran gegeben. Die 8-Loch-Platte wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Rüttler inkubiert. Nach 2 Stunden wird der Antikörper abpipettiert und die Waschschriffe wiederholt: die Membran wird 3 Mal mit Waschpuffer 1 und anschließend 2 mal mit Waschpuffer 2 von dem nicht gebundenen Antikörper gereinigt. Währenddessen wird das Streptavidin vorbereitet. 2 μ l des an Meerrettichperoxidase gekoppelten Streptavidins werden in 2 ml Blocking Puffer gelöst. Nach den Waschschriffen wird 2ml dieser Lösung auf jede Membran gegeben. Für mindestens 12 Stunden werden die Platten nun bei 4°C auf dem Rüttler inkubiert. Am nächsten Tag können nun die Signale wie bei einem Immunblot mittels einem Hyperfilm sichtbar gemacht werden.

2.7 Statistik

2.7.1 Student t-Test

Der t-Test dient der Untersuchung von Mittelwertunterschieden von zwei normalverteilten Stichproben. Bei dem Student t-Test wird geprüft ob Mittelwerte aus den Stichproben identisch sind. Bei dem t-Test wird eine Varianzhomogenität und eine Normalverteilung der Werte vorausgesetzt.

Bei dem t-Test wird die Nullhypothese gegen die Alternativhypothese geprüft. Die Nullhypothese prüft ob die Mittelwerte der Proben gleich sind.

Nullhypothese: $H_0 : \mu_1 = \mu_2$

Die Alternativhypothese prüft ob die Mittelwerte der Proben unterschiedlich sind.

Alternativhypothese: $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$

(Student 1908)

2.7.2 Mann-Whitney-Test

Bei dem Mann-Whitney-Test (=U-Test) handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test.

Die Verteilungsfunktion der Daten in den beiden Gruppen X und Y soll für diesen Test die gleiche Form aufweisen. X und Y können die Umfänge n und m besitzen. Die Daten können innerhalb dieser Verteilungsfunktion zu einer Seite verschoben sein. Somit ist dieser Test weniger streng als der t-Test.

Bei dem Mann-Whitney-Test werden die Daten gepoolt und der Größe folgend mit einem Rang versehen (=rg). Somit wird hierbei mit Rangdaten anstatt mit den ursprünglichen Rohdaten gearbeitet.

Die Nullhypothese kann dargestellt werden als $H_0 : x_{median} = y_{median}$

Die Alternativhypothese lässt sich darstellen als; $H_1 : x_{median} \neq y_{median}$

Definition der Teststatistik des U-Test:

$$T_w = \sum_{i=1}^n rg(X_i) = \sum_{i=1}^{n+m} iV_i$$

Hierbei ist

$V_i = 1$ i -te Beobachtung der geordneten gepoolten Stichprobe ist die X-Variable

$V_i = 0$ sonst

Nun wird der T_w Wert mit einem tabellierten Wert verglichen und entschieden ob die Nullhypothese verworfen werden kann oder nicht. Der Mann-Whitney Test kann auch bei nicht stetigen Variablen verwendet werden.

(Mann u. a. 1947; Lehmann 1951).

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Resistenz Screening und Selektion der nicht mutierten Klone

Um auf die Fragestellung einzugehen werden Zellen benötigt welche die gewünschten Eigenschaften, vergleichbar zum Patienten, aufweisen. Die benötigten Zellen sollen BCR-ABL positiv sein, keine sekundäre Resistenzmutation im BCR-ABL Gen aufweisen und trotzdem eine Resistenz gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren aufweisen. Bubnoff u.a. beschrieben einen Screen, in dem Zellen ständig dem Inhibitor ausgesetzt sind und mit der Zeit Resistenzen entwickelten (Bubnoff u. a. 2005b). In dieser Methode werden die BCR-ABL positiven Zellen stets einem Tyrosinkinaseinhibitor ausgesetzt. Vergleichbar ist dies mit einem Patienten, der ständig mit einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt wird. Die Patienten entwickeln unter der Therapie mit den Inhibitoren die Resistenzen. Somit kommt dieser Screen der Umgebung im Patienten sehr nahe und man kann im Screen ähnliche Ergebnisse erwarten wie im Patienten. BaF3 Mig EGFPp185 Zellen, das heisst Zellen denen das BCR-ABL Konstrukt transfiziert worden war, wurden in 96-Loch Platten in Nährmedium (RPMI) mit verschiedenen Konzentrationen von Inhibitoren (STI=Imatinib, AMN= Nilotinib oder BMS= Dasatinib) kultiviert. Das Medium wurde alle 48 Stunden ausgewechselt, und durch frisches Medium mit den jeweiligen Inhibitoren ersetzt. Wenn Zellkolonien gewachsen waren,

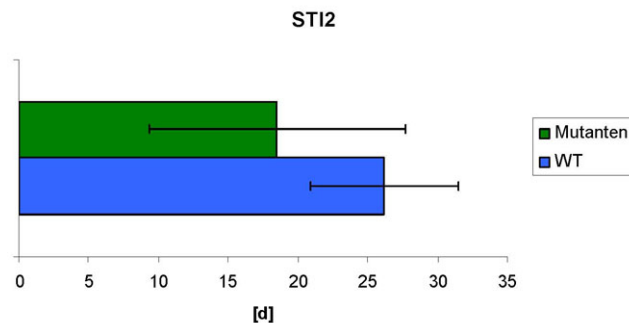


Abbildung 3.1: Wachstumszeit der STI2 Klone (Zellen aus einem Screen mit Imatinib in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$)

wurden diese in größere Flaschen suspendiert und vermehrt. Die Zellklone wurden anschließend auf Mutation im BCR-ABL Gen mittels PCR getestet und die geeigneten Zellen für weitere Untersuchungen expandiert. Im Verlauf der Arbeit wurden die Zellklone in regelmäßigen Abständen auf Mutationen im BCR-ABL Gen untersucht.

3.2 Wachstumszeit der Wildtyp und Mutierten Klone

Um zu sehen ob die Zelllinien mit bzw. ohne Mutationen unterschiedlich lang brauchen um sich zu entwickeln wurde die Zeiten zwischen dem Setzen der Zellen in die 96-Loch Platten und den fertigen Kulturen der Zellklone protokolliert. Interessanterweise unterschieden sich die Wachstumszeiten der Klone mit Mutation im BCR-ABL Gen von den Wachstumszeiten der Zellen ohne eine Mutation im BCR-ABL Gen.

In der Abbildung 3.1 ist die Wachstumszeit der BCR-ABL positiven Zellen beschrieben, die in einer Umgebung gewachsen sind in der sie Imatinib in der Konzentration von $2\mu\text{M}$ ausgesetzt waren. Die Zellen wurden mittels PCR auf Mutationen im Target-Protein der Tyrosinkinaseinhibitoren, also hier BCR-ABL getestet. Auf der x-Achse ist in dieser Abbildung die Zeit in Tagen aufgetragen in der sich Zellkolonien gebildet hatten bis sie expandiert

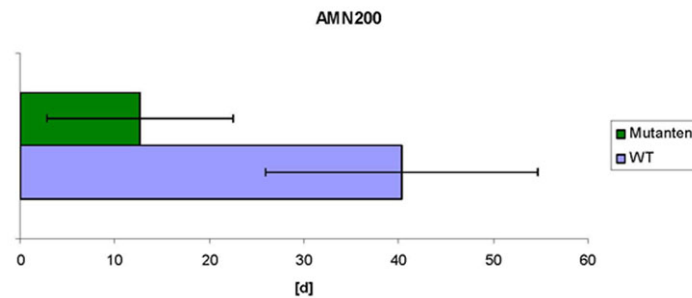


Abbildung 3.2: Wachstumszeit der AMN 200 Klone (Zellklone aus einem Screen mit Nilotinib in einer Konzentration von 200nM)

werden konnten. Der obere Balken (grün) stellt die Zellkolonien mit Mutation im BCR-ABL Gen (mutiertes BCR-ABL) dar, der untere Balken (blau) die Zellkolonien ohne Mutation im BCR-ABL (Wildtyp BCR-ABL). Aus der Abbildung 3.1 geht somit hervor, dass die Zellen mit Mutation im BCR-ABL ungefähr 10 Tage schneller gewachsen sind.

Bei den Klonen die eine Resistenz gegen AMN107 aufwiesen war dieser Unterschied in der Wachstumszeit noch wesentlich deutlicher. In der Abbildung 3.2 ist auf der x-Achse ebenfalls die Zeit in Tagen aufgetragen. Der obere Balken (grün) steht hier ebenfalls für die Klone mit Mutationen im BCR-ABL, der untere Balken (blau) für Zellen ohne Mutation im Ziel-Protein. So brauchten Zellen mit einer Mutation im BCR-ABL Gen im Schnitt nur etwa 12,6 Tage bis sie expandiert werden konnten, die nicht mutierten Zellen hingegen 40,3 Tage.

3.3 Kreuzresistenz der BCR-ABL positiven Zelllinien gegen verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren

Es stellte sich nun die Frage wie stark der Resistenzmechanismus der Zellklone ohne Mutation im BCR-ABL ist. Weisen die Zellen eine deutliche Resistenz gegen den zuerst verwendeten Inhibitor auf und auch gegen die Second-

line Inhibitoren? Um die Fragestellung zu beantworten wurden MTS-Assays durchgeführt. Mit Hilfe dieser Assays wird die Vitalität und Proliferation der Zellen bestimmt. Einer definierten Zellzahl wurde unterschiedliche Mengen an Inhibitoren zugesetzt und nach einem festgesetzten Zeitpunkt wird gemessen wieviele Zellen die Behandlung überlebt haben. Somit kann auch der IC₅₀ Wert der Wildtypzellen gegen die eingesetzten Inhibitoren bestimmt werden. Die Konzentration der eingesetzten Inhibitoren wurden so gewählt, dass in der jeweils geringsten Konzentrationsstufe mit einer Inaktivierung des BCR-ABL in den Wildtyp Zellen zu rechnen ist (Bubnoff u. a. 2006).

3.3.1 Resistenz der STI2 Klone

In dem Assay wurden Zellklone verwendet, die im Screen resistent gegen STI571 in einer Konzentration von 2 μ M waren und keine Mutation im BCR-ABL Protein aufwiesen (im Folgenden nur noch STI2 Klone genannt). Die STI2 Klone wurden auf ihre Resistenz gegen STI571, AMN107 und BMS354825 in verschiedenen Konzentrationen getestet. Als Kontrolle dient hier eine nicht gegen Tyrosinkinaseinhibitoren resistente Ba/F3 mig p185 Zelle. Diese Zelllinie weist keine Mutation im BCR-ABL auf und ist somit sensibel auf alle drei angewendeten Inhibitoren.

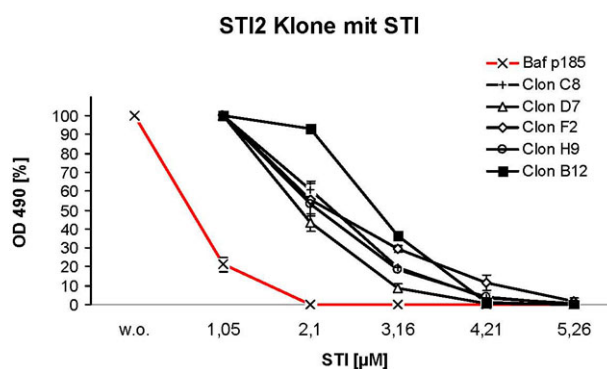


Abbildung 3.3: Resistenz der STI2 Klone gegen Imatinib

In der Abbildung 3.3 ist die Resistenz der STI2 Klone gegen Imatinib

dargestellt. Auf der y-Achse ist die Prozentzahl der lebenden Zellen aufgetragen, die x-Achse stellt die verschiedenen Konzentrationen von Imatinib dar. $0\mu\text{M}$ heisst, dass die Zellen ohne STI oder DMSO in purem Medium gehalten wurden, die weiteren Konzentrationen stellen die Konzentration des angewandten Inhibitors im Medium dar. Die STI2 Klone zeigten keine hohe Resistenz gegen STI selber und waren mit höheren Konzentrationen des Inhibitors gut zu eliminieren. Wurde die Dosis des Imatinibs von 2 auf $4\mu\text{M}$ verdoppelt waren kaum noch Zellen lebensfähig. Die Zellklone zeigen hier auch eine Homogenität der Kreuzresistenz, alle Zelllinien verhalten sich sehr ähnlich. Da sich die Zelllinien homogen verhalten ist denkbar, dass alle Zellen den gleichen Resistenzmechanismus haben.

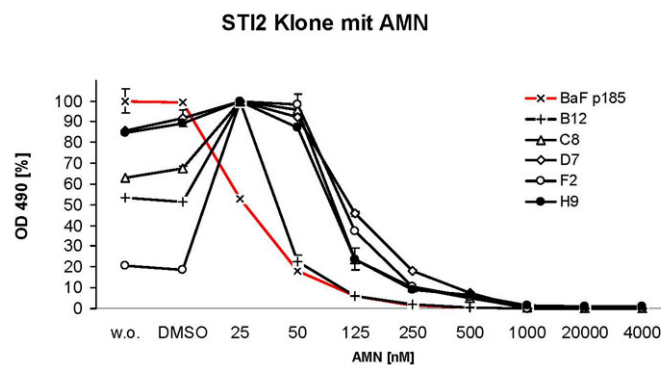


Abbildung 3.4: Resistenz der STI2 Klone gegen Nilotinib

In der Abbildung 3.4 ist die Resistenz der STI2 Klone gegen Nilotinib dargestellt. Gegen AMN zeigten die STI2 Klone eine geringgradige Kreuzresistenz, waren aber ebenfalls in höheren Konzentrationen des Inhibitors vollständig in ihrem Wachstum inhibiert. Die Dosis-Wirkungskurve wird hier zu höheren Konzentrationen verschoben. Der IC_{50} Wert liegt hier bei etwa 100nM .

Die Abbildung 3.5 zeigt die Resistenz der STI2 Klone gegen Dasatinib. So zeigte sich auch hier, dass die Zellen zwar noch bei höheren Konzentrationen des Inhibitors leben als die Kontrollzelllinie. Wird jedoch der Inhibitor höher

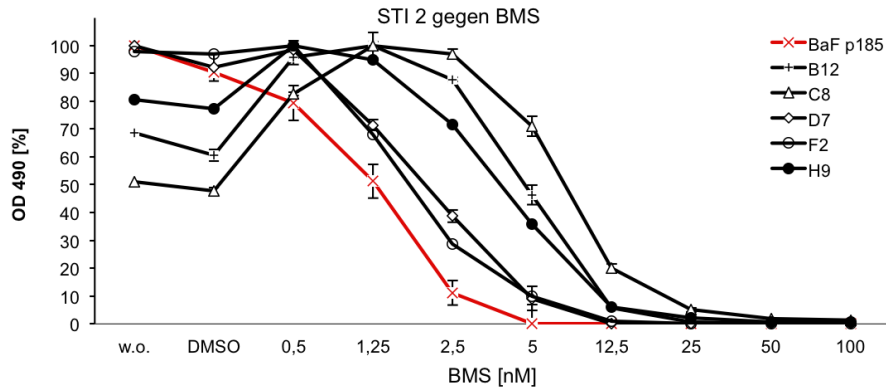


Abbildung 3.5: Resistenz der STI2 Klone gegen Dasatinib

konzentriert wachsen auch die resistenten STI2 Klone nicht weiter.

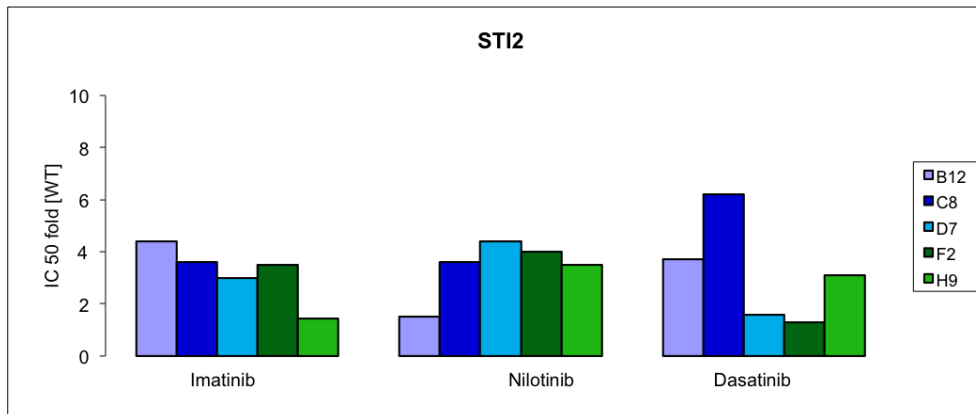


Abbildung 3.6: Kreuzresistenz der STI2 Klone gegen Imatinib, Nilotinib und Dasatinib

Die Abbildung 3.6 fasst die Ergebnisse der MTS-Assays zusammen. Hier wurde berechnet um wieviel die einzelnen Zelllinien gegen die eingesetzten Inhibitoren resistenter waren im Vergleich zur unmutierten Kontrolle. Auf der y-Achse sind die IC50 Werte der Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle aufgetragen, auf der x-Achse sind die Klone bei den unterschiedlichen Inhibitoren zu sehen. Die STI2 Klone zeigen alle eine recht homogene Kreuzresistenz. Die Zelllinien lassen sich jedoch in etwas höherer Konzentration durch alle drei Inhibitoren im Wachstum inhibieren.

3.3.2 Kreuzresistenz der STI4 Klone

Nun wurden Zellen untersucht die höheren Konzentrationen von Imatinib ausgesetzt waren. Es wurden Klone verwendet welche in einem Screen unter einer Konzentration von $4\mu\text{M}$ STI gezogen wurden (im Folgenden nur STI4 Klone genannt). In Abbildung 3.7 ist die Resistenz der STI4 Klone gegen Imatinib zu sehen. Als Kontrollzelllinie wurde wieder die sensible Wildtypzelllinie BaF Mig p185 gewählt. Diese STI4 Zellen zeigten sich wesentlich stärker re-

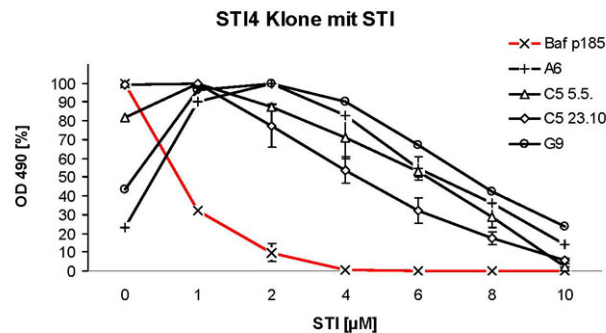


Abbildung 3.7: Resistenz der STI4 Klone gegen Imatinib

sistent als der Wildtyp. Diese Zellen wachsen in Abwesenheit des Inhibitors schlechter als in Anwesenheit. Des Weiteren werden hohe Konzentrationen von Imatinib benötigt um die Zellen relevant zu inhibieren. Besonders die Zelllinien G9 und A6 weisen eine hohe Resistenz gegen STI auf. Erst bei ca $8\mu\text{M}$ STI sind 50% der Zellen effektiv im Wachstum inhibiert.

In Abbildung 3.8 wurde die Resistenz der Zelllinien gegen Nilotinib dargestellt. Die Zelllinien G9 und A6 wiesen ein schlechteres Wachstum bei niedrigen Konzentrationen des Inhibitors auf. Erst bei etwa 100nM Nilotinib zeigte sich ein volles Wachstum. Bei weiterer Erhöhung der Inhibitor Konzentration lassen sich aber auch diese Zelllinien effektiv durch Nilotinib inhibieren. Beide Zelllinien C5 wachsen bis etwa 100nM Nilotinib ungestört durch den Inhibitor, bei weiterer Erhöhung der Konzentration sind auch sie in ihrem Wachstum deutlich eingeschränkt.

Ebenfalls zeigten die Zellen eine Resistenz gegen BMS auf (Vgl. Abb.

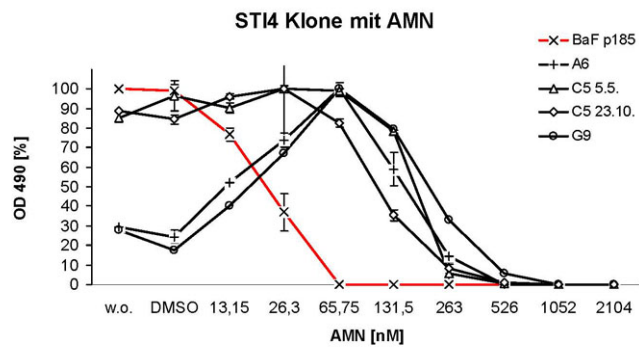


Abbildung 3.8: Resistenz der STI4 Klone gegen Nilotinib

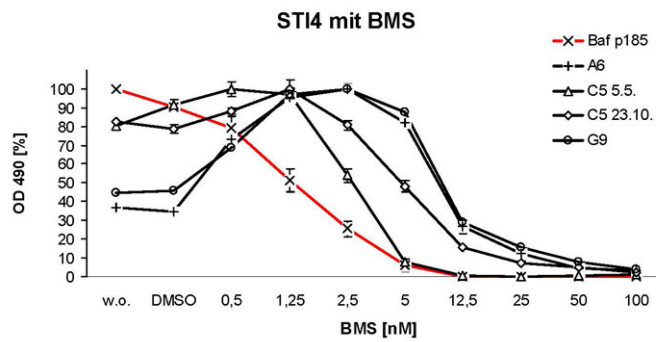


Abbildung 3.9: Resistenz der STI4 Klone gegen Dasatinib

3.9). Die Zelllinien C5 5.5. und C5 23.10. waren nur geringfügig resistent gegen Dasatinib wohingegen die beiden anderen Zelllinien A6 und G9 erneut deutlicher resistenter sind. In der Abbildung 3.10 wird die Kreuzresistenz

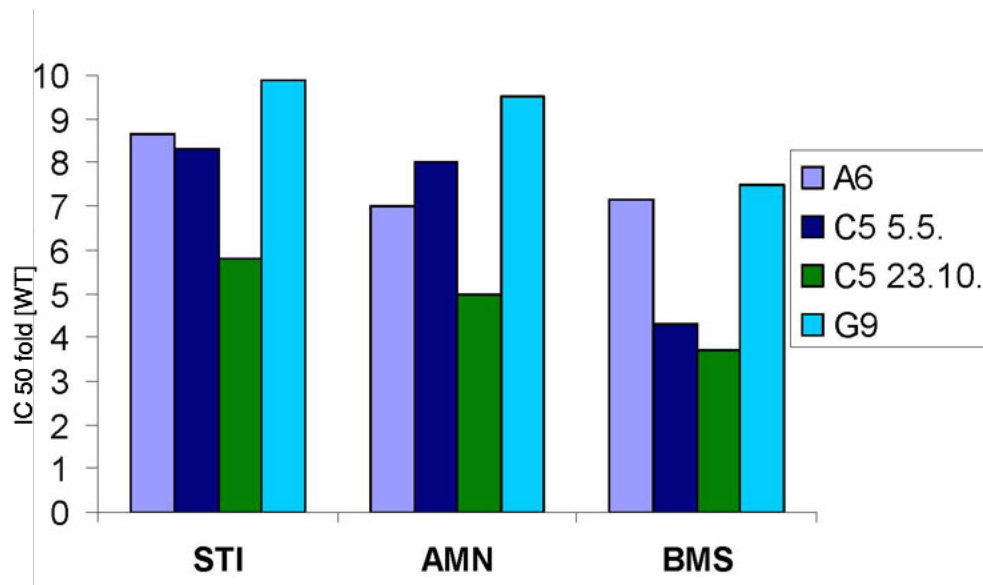


Abbildung 3.10: Kreuzresistenz der STI4 Klone gegen Imatinib (STI), Nilotinib (AMN) und Dasatinib (BMS)

der Zelllinien gegen die unterschiedlichen Inhibitoren zusammengefaßt. Die IC₅₀ Werte der STI4 Klone waren bis zu 10-fach höher als bei der Kontrolle. Ebenfalls zeigte sich in diesen Experimenten, dass Zellen die primär eine Resistenz gegen Imatinib entwickelten auch eine Resistenz gegen die beiden Second-line Inhibitoren Nilotinib und Dasatinib aufwiesen.

3.3.3 Resistenz der AMN200 Klone

In einem Screen wurden Klone erzeugt die resistent gegen AMN in einer Konzentration von 200nM waren (im Folgenden nur noch AMN200 Klone genannt). Für die MTS-Assays wurden wieder die Klone gewählt ohne eine Mutation im BCR-ABL Gen.

In der Abbildung 3.11 wurden die AMN200 Klone in einem Proliferationsassay mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nilotinib behandelt.

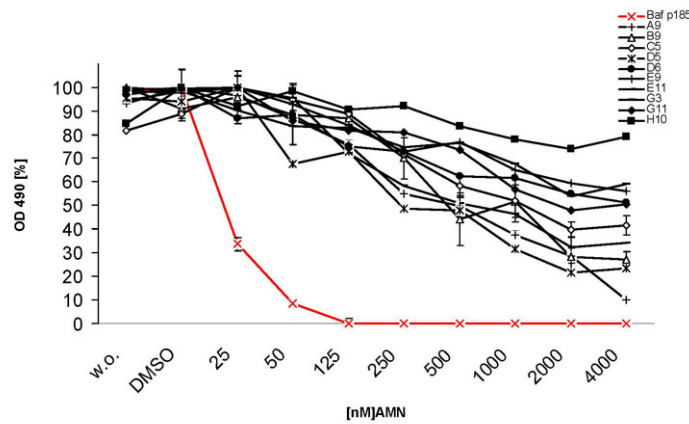


Abbildung 3.11: Resistenz der AMN200 Klone gegen Nilotinib

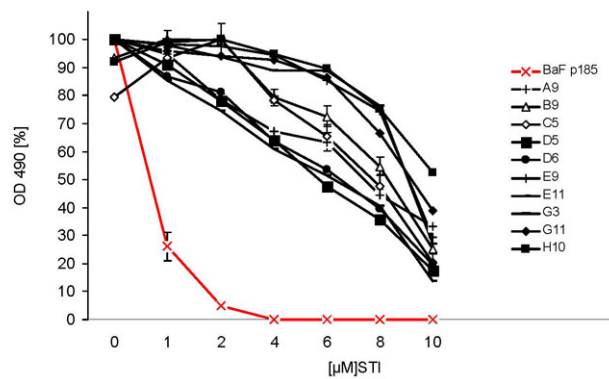


Abbildung 3.12: Resistenz der AMN200 Klone gegen Imatinib

Es zeigt sich hierbei, dass die AMN Klone eine starke Resistenz gegen den Inhibitor aufwiesen. Die Zelllinie H10 ist zum Beispiel bei 4000nM, also der 20fachen Menge an Nilotinib, nicht wesentlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Auch einige andere Klone zeigen eine vergleichbar hohe Resistenz.

In der Abbildung 3.12 ist die Kreuzresistenz der AMN200 Klone gegen Imatinib dargestellt. Eine ausgeprägte Kreuzresistenz der Zelllinien konnte hier gezeigt werden. Auch bei Konzentrationen von 10 μ M STI sind noch nicht alle Zellen komplett inhibiert. Diese Zellen waren erst bei Konzentrationen inhibiert, die in Patienten nicht zu erreichen sind. In der Untersuchung der

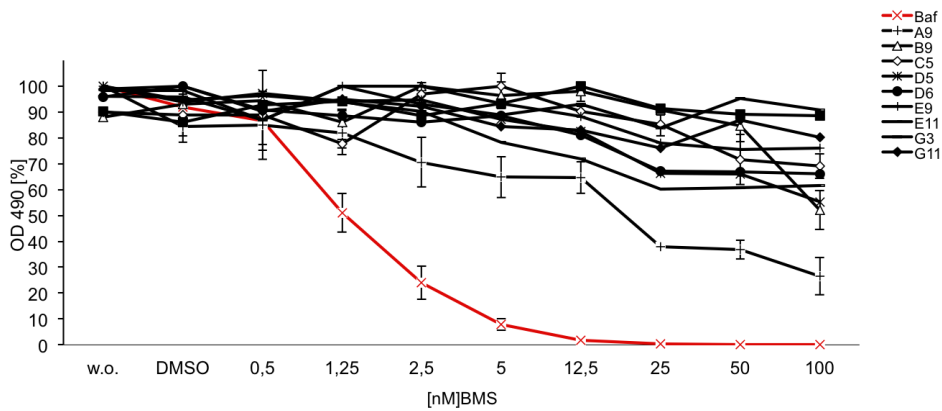


Abbildung 3.13: Resistenz der AMN200 Klone gegen Dasatinib

Kreuzresistenz der AMN200 Klone gegen BMS (vgl. Abbildung 3.13) zeigte sich ebenfalls, dass die Zellen gegen den Multityrosinkinaseinhibitor Dasatinib eine Resistenz aufweisen. Auch in hohen Mengen des Inhibitors zeigen die Zellen noch ein Wachstum.

In Abbildung 3.14 ist die Kreuzresistenz der AMN200 Zellklone noch einmal verdeutlicht. Zu beachten ist die veränderte Skalierung y-Achse. Da die Zelllinien bis zu 100-fach resistenter gegenüber der Vergleichszelllinie waren, wurde in dieser Grafik eine logarithmische Skalierung verwendet. Es zeigt sich hier, dass die Zellen einen ausgeprägten Resistenzmechanismus gefunden hatten. Dieser Mechanismus ist wirksam gegenüber allen drei der hier verwendeten Inhibitoren und verursacht so eine Kreuzresistenz. Auch bei wiederholten PCRs der ABL Domäne konnte keine Mutation festgestellt werden. Es ist also ein anderer Resistenzmechanismus in Kraft getreten und dieser ist so stark, dass sie auch eine Kreuzresistenz gegen andere Inhibitoren verursacht. Um diese Resistenz weiter zu untersuchen, erfolgten noch weitere Untersuchungen der Zelllinien.

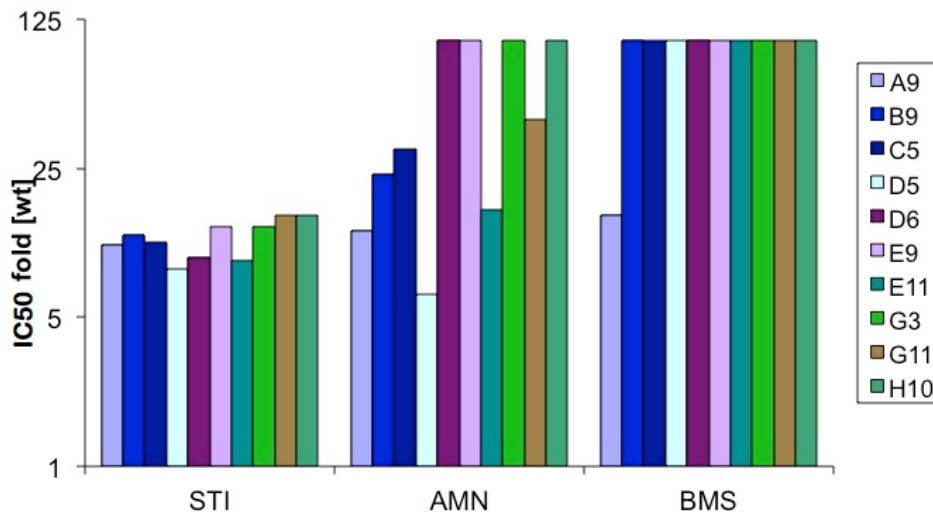


Abbildung 3.14: Kreuzresistenz der AMN200 Klone gegen Imatinib (STI), Nilotinib (AMN) und Dasatinib (BMS)

3.4 Phosphorylierungsmuster in den STI4 Klonen

Um mögliche Resistenzmechanismen zu überprüfen wurden Westernblots mit den Zelllinien durchgeführt. Hierdurch kann in An- bzw Abwesenheit der Inhibitoren das Phosphorylierungsmuster der Proteine nachgewiesen werden. Ein Phosphotyrosin Antikörper soll zeigen ob das BCR-ABL sich überhaupt durch Imatinib und die anderen Tyrosinkinaseinhibitoren inhibieren läßt. Ein ABL-Antikörper wurde verwendet um zu zeigen ob die Zellen unterschiedliche ABL-Expressionsmuster aufwiesen. Da BCR-ABL JAK2 und STAT 5 aktiviert (Chai u. a. 1997) wurden die Antikörper pJAK2 und pSTAT5 genommen um die Aktivität des BCR-ABL zu zeigen. Da BCR-ABL die Src-Kinasen phosphoryliert wurde ein pSRC-Antikörper verwendet um die Aktivität des BCR-ABL zu zeigen. Die Antikörper gegen STAT5, JAK2 und SRC dienen als Expressionskontrolle. Als Ladekontrolle wurde β -Tubulin verwendet (Vgl. Abb. 3.15). Als Kontrolle wurden BaF mig p185 Wildtyp Zellen verwendet. Mit diesen Zellen wird gezeigt, dass der Inhibitor funktioniert

und sowohl die Phosphorylierung des BCR-ABLs wie auch die Phosphorylierung der Downstream-Signale aufgehoben wird. Es zeigt sich hier, dass die Funktion des BCR-ABL durch den Inhibitor blockiert wird. Die zweite Kontrolle stellte der Zellklon C6 dar. Dieser wurde ebenfalls im Screen gezogen und wies von Anfang an die Mutation F311I im BCR-ABL Protein auf. Die Mutation F311I ist eine Punktmutation im BCR-ABL Protein und führt dazu, dass Imatinib nicht mehr an das Targetprotein binden kann (Schindler u. a. 2000). Bei Anwesenheit des Inhibitors sind in der Zelllinie C6 somit ein phosphoryliertes BCR-ABL Signal sowie Phosphorylierungssignale der Downstream Proteine zu erwarten. Des weiteren wurden die beiden Zellklone C5 5.5. und G9 untersucht. Diese beiden Zellen waren im Screen im BCR-ABL als Wildtyp getestet worden, wiesen also zunächst keine sekundären Resistenzmutationen im BCR-ABL auf. Die Zellen zeigten jedoch im MTS-Assay eine Kreuzresistenz gegen andere Inhibitoren. In diesem Westernblot zeigt sich bei der Kontrolle eine durch Imatinib verursachte Dephosphorylierung des BCR-ABL. In der Wildtypzelllinie ist zu sehen das ohne Inhibitor BCR-ABL, JAK2, STAT5 sowie SRC phosphoryliert werden. Werden jedoch die Zellen mit Imatinib behandelt verschwinden die Phosphorylierungssignale auch von JAK2, STAT5 sowie SRC. Diese Kinasen werden durch BCR-ABL aktiviert. Wird nun durch Imatinib BCR-ABL inhibiert können somit auch keine Phosphorylierungen der in der Signalkaskade drunter stehenden Proteine mehr beobachtet werden. Durch den Inhibitor ist die Kinase nicht mehr aktiv und kann somit die hier untersuchten Tyrosinkinasen nicht mehr aktivieren. Im Zellklon C6, welcher die Mutation F311I aufweist, läßt sich das BCR-ABL nicht durch STI inhibieren. Auch in Anwesenheit des Inhibitors ist BCR-ABL weiterhin phosphoryliert. Die durch ABL phosphorylierten Kinasen JAK2, STAT5 sowie SRC bleiben weiterhin aktiviert. Somit zeigt sich durch diese Kontrolle auch, dass Imatinib nicht die weiteren Kinasen inhibiert sondern in diesem Versuch spezifisch Wildtyp BCR-ABL hemmt. Im Zellklon C5 zeigt sich zunächst einmal eine hohe Expression des ABL-Proteins. Ein bekannter Resistenzmechanismus gegen Imatinib ist die Überexprimierung des BCR-ABL-Proteins (LeCoutre u. a. 2000). Durch das hohe Aufkommen von BCR-ABL kann die gleiche Menge an Inhibitor weni-

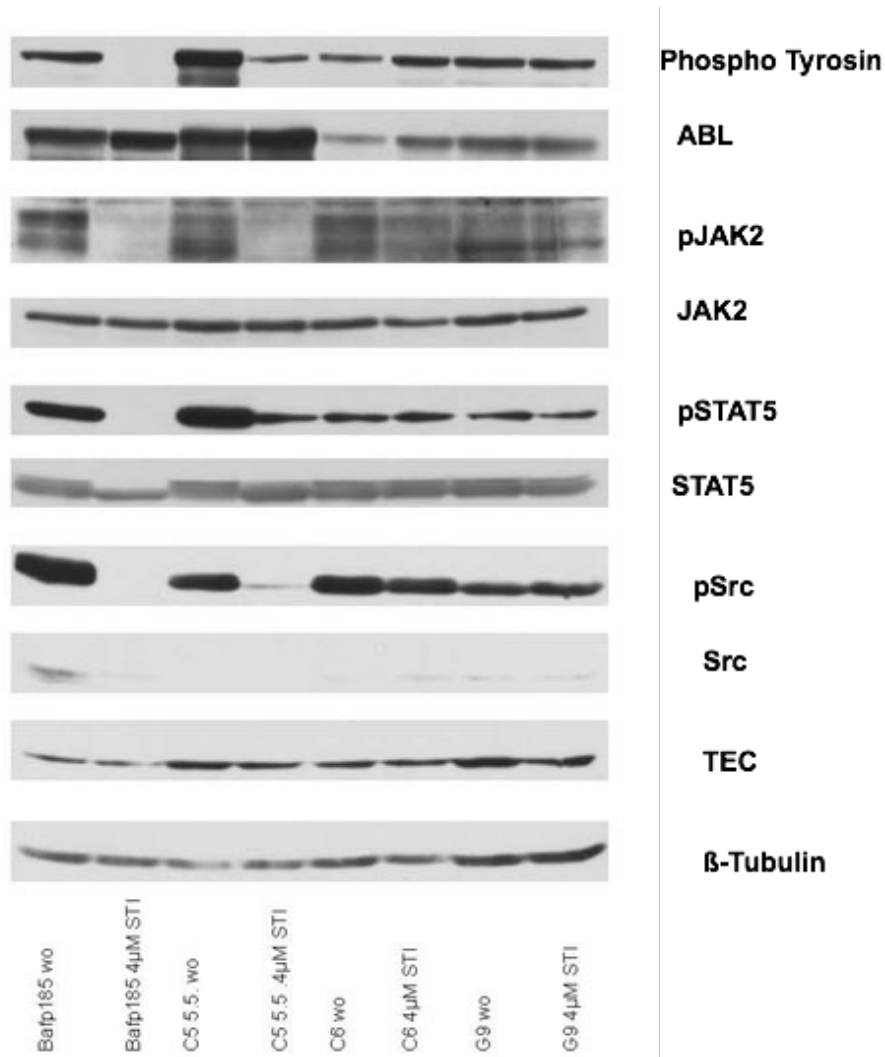


Abbildung 3.15: Inhibition der BCR-ABL Signaltransduktion der STI4 Klone

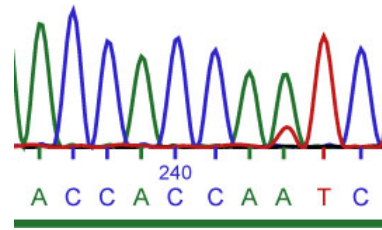


Abbildung 3.16: Klon C5 5.5. Mutation A-T

ger Kinasen inaktivieren und somit bleiben einige Tyrosinkinase weiterhin aktiv und die Zelle erhält ein Wachstumssignal. Werden die Zellen der Linie C5 nun mit Imatinib behandelt ist sichtbar das nun deutlich weniger BCR-ABL phosphoryliert ist. Das Imatinib scheint also die Phosphorylierung zu hemmen jedoch nicht komplett aufzuheben. Auch in der Signalkaskade ist zu sehen, dass unter der Behandlung mit Imatinib weniger pSTAT5, pSRC und pJAK2 vorhanden ist.

Eine weitere mögliche Erklärung für die persistierende Phosphorylierung könnte auch sein, dass in diesen Zellen BCR-ABL sekundär ebenfalls mutiert ist und durch den Selektionsdruck bei dauernder Kultivierung mit Inhibitor sich diese Zellen vermehrt hatten. Zur Überprüfung führten wir erneut eine PCR durch um das BCR-ABL auf Mutationen zu überprüfen. In den PCRs zeigte sich bei Klon C5 5.5. in etwa einem Drittel der Zellpopulation eine F311I Mutation eingetreten war (siehe Abbildung 3.16). In dieser Abbildung ist zu erkennen das nicht jeder Zellklon der Population eine Mutation aufweist da noch einige Zellen vorhanden sind die an entsprechender Stelle (hier Nukleotid 243) weiterhin ein Thymin anstatt der Mutation zum Adenin aufweisen. Dieser eine Basenaustausch führt im BCR-ABL Molekül zu einem Austausch eines Phenylalanins zu einem Isoleucin. Das wiederum führt zu einer starken Resistenz gegen Tyrosinkinaseinhibitoren. Hier ist nun zu sehen, dass die Zelllinie C5 mehrere parallele Resistenzmechanismen aufweist. Zunächst die Überexpression des BCR-ABLs. Des Weiteren ist hier zu sehen, dass die Zellen, die ständig mit Imatinib gehalten wurden, weiterhin dem Selektionsdruck ausgesetzt sind und nun sekundär auch eine Mutation im BCR-ABL entwickelt haben.

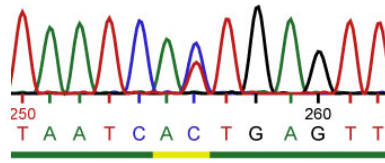


Abbildung 3.17: Klon G9 Mutation C-T

Der Zellklon G9 weist im Westernblot (vgl. Abb. 3.15) in An- und Abwesenheit von STI eine gleichbleibende Phosphorylierung des BCR-ABL auf. Wie zu erwarten ist auch hier in der Signalkaskade keine Änderung zu sehen. Es scheint ein wirksamer Resistenzmechanismus in Kraft getreten zu sein. Auch hier wurde eine erneute PCR gemacht um Mutationen im BCR-ABL nachzuweisen. Es zeigt sich, dass hier zu 50% eine Mutation (hier im Nukleotid 256) von einem Cytosin zu einem Thymin eingetreten ist. Siehe Abb. 3.17. Diese heterozygote Mutation war in der initialen Testung der Zellen noch nicht nachweisbar und führt im BCR-ABL zum Austausch eines Threonin zu einem Isoleucin an Position 315, was eine starke Resistenz gegen Imatinib, Nilotinib und Dasatinib bewirkt. Auch bei diesem Zellklon ist also eine sekundäre Mutation im Verlauf der Kultivierung der Zellen mit Imatinib eingetreten. Der Versuch zeigt, dass die Zellen auch im Verlauf weiterhin Mutationen im BCR-ABL generieren können. Auf Grund der genetischen Instabilität der Zellen ist dies nicht überraschend. Da in der Arbeit alternative Resistenzmechanismen untersucht werden, werden die Klone aus dem AMN200 Screen betrachtet.

3.5 Phosphorylierungsmuster der AMN200 Klone

In diesem Versuch wurde bei den AMN200 Klonen das Phosphorylierungsmuster von BCR-ABL und der Downstream Proteinen untersucht. In der Versuchsanordnung wurden zur Kontrolle BaF mig p185 Wildtypzellen genommen. Um das normale Verhalten der Zellen zu beobachten wurden als Positivkontrolle diese Zellen unbehandelt untersucht. Als Negativkontrolle dienen

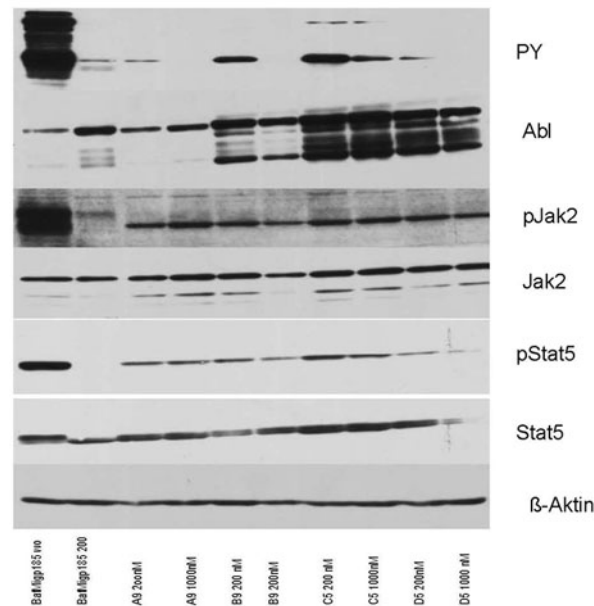


Abbildung 3.18: Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone A9, B9, C5 und D5 bei Exposition von Nilotinib

BaF mig p185 Wildtypzellen die 4 Stunden mit 200nM Nilotinib inkubiert wurden. Untersucht wurden desweiteren die AMN200 Zellen aus den Kreuzresistenz Assays. Sie wurden mit 200nM AMN getestet sowie mit 1000nM AMN. Bei allen Zellen wurden die Phosphorylierung des BCR-ABL Protein mittels eines Phosphotyrosinantikörpers (PY) sowie der Kinasen JAK2 und STAT5 untersucht. Als Ladekontrolle dient β -Aktin.

In Abb. 3.18 sieht man in den Kontrollzellen BaF mig p185 ein starkes Phosphorylierungssignal auf Höhe von 185kDa, dieses entspricht dem phosphoryliertem BCR-ABL. Des Weiteren wird ein starkes Signal bei pJAK2 gesehen, ebenso bei pSTAT5. Das zeigt, dass die Tyrosinkinase BCR-ABL aktiviert ist und das Signal an die in der Signalkaskade darunterliegenden Proteine JAK2 und STAT5 weitergibt. Werden die Zellen nun mit 200nM Nilotinib behandelt wird kein Signal auf Höhe des phosphorylierten BCR-ABL nachgewiesen. Auch die Signale des pJAK2 und des pSTAT5 sind nicht mehr nachweisbar. Durch die Inhibierung des BCR-ABLs mittels Nilotinib wird auch die Phosphorylierung des JAK2 und STAT5 in den BaF mig p185

Zellen unterbrochen.

Die Zellen A9 zeigen auch bei 200nM Nilotinib nur ein geringes Phosphorylierungssignal des BCR-ABL. Bei 1000nM Nilotinib ist dieses Signal nicht mehr nachzuweisen. Überraschenderweise sind die Downstreamsignale pJAK2 und pSTAT5 immer noch zu sehen. Da STAT5 in der Signalkaskade unter JAK2 liegt ist davon auszugehen, dass diese Zelllinie JAK2 und STAT5 BCR-ABL unabhängig aktiviert. Bei den Zellen B9 und D5 ist dies ebenfalls zu beobachten. Die Zelllinien C5 und D5 hingegen zeigen auch bei einer Nilotinib Konzentration von 1000nM weiterhin eine Phosphorylierung des BCR-ABL. Die Klone C5 und D5 weisen jedoch bei der gleichen Menge an β -Aktin Gehalt eine vermehrte Expression von ABL auf. Es ist davon auszugehen, dass diese Zellen durch eine Überexpression des BCR-ABL eine Resistenz gegenüber den Inhibitor aufweisen. Die Abbildung 3.19 zeigt das Phosphorylierungsmuster in den Zelllinien D6, E11 und G3. Hier sieht man auch bei 200nM Nilotinib kein Phosphorylierungssignal des BCR-ABL Proteins, ebensowenig bei 1000nM Nilotinib. Dahingegen sind die Downstreamsignale pJAK2 und pSTAT5 auch in diesen Zellen zu sehen. Zelllinie E9 verhält sich wie die Zelllinien A9, B9 und D5.

In Abb. 3.20 sind die Zellklone G11 und H10 zu sehen die ebenso wie die Klone D6, E11 und G3 keine Phosphorylierung des BCR-ABLs mehr erkennen lassen. Dennoch zeigt sich ein Signal bei pSTAT5 sowie pJAK2, sodass diese Zellen STAT5 und JAK2 BCR-ABL unabhängig aktivieren müssen. Die unterschiedlichen Zellklone weisen unterschiedliche Resistenzmechanismen auf. Der Zellklon C5 zeigt eine so deutliche Überexpression des BCR-ABL, dass auch 1000nM Nilotinib nicht ausreichen um BCR-ABL vollständig zu inhibieren. Bei den übrigen Zellklonen zeigt sich ein BCR-ABL unabhängiger Resistenzmechanismus. In einigen Zellklonen ist zu vermuten das beide Resistenzmechanismen in Kombination eine Rolle spielen, die Überexpression des BCR-ABL sowie der BCR-ABL unabhängige Weg über JAK2 und STAT5. Dieser BCR-ABL unabhängige Weg läuft vermutlich über JAK2. Die Frage ist nun ob JAK2 essentiell für den Resistenzmechanismus ist und wie JAK2 aktiviert wird.

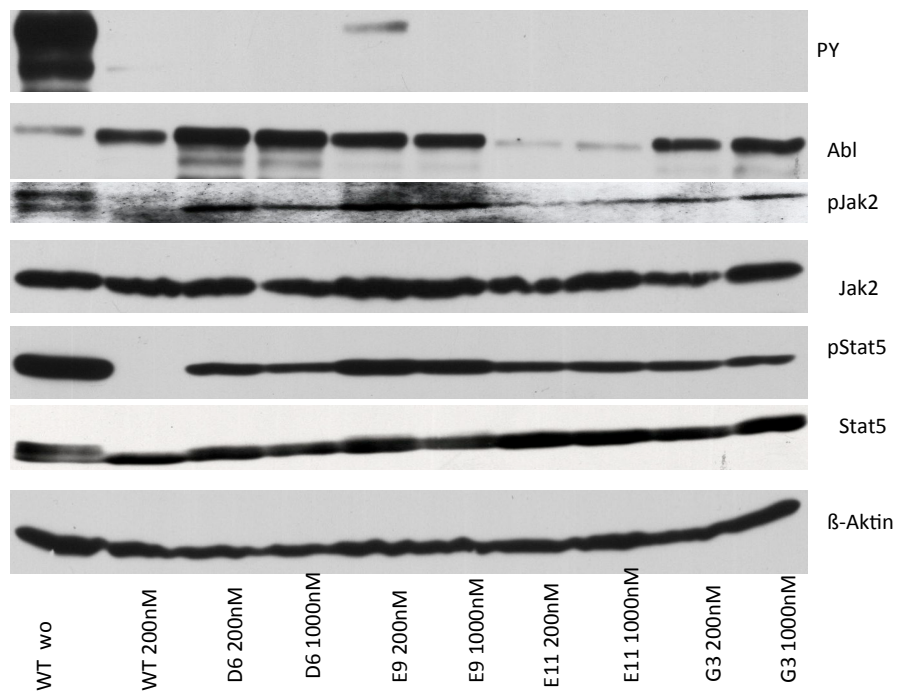


Abbildung 3.19: Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone D6, E9, E11, G3 bei Exposition von Nilotinib

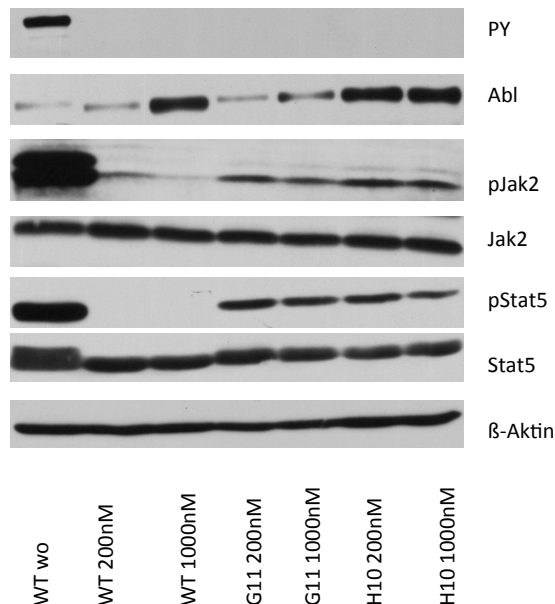


Abbildung 3.20: Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone G11 und H10

3.6 Inhibition von JAK2

3.6.1 Proliferationsassay

Um die Frage zu klären ob JAK2 für den Resistenzmechanismus der Zellen essentiell ist wird einen JAK-Inhibitor genutzt. Der JAK-Inhibitor-I blockiert bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ JAK2 vollständig. In MTS Assays wurden Kontrollzellen mit den AMN200 Zellen verglichen. Als Kontrollen wurden parentale Ba/F3 Zellen verwendet, diese sind in ihrem Wachstum abhängig von Interleukin-3. Das Wachstumssignal wird in den Zellen über JAK2 weitergeleitet. Wird nun JAK2 durch den Inhibitor gehemmt kann das Signal nicht durch JAK2 weitergegeben werden und die Zellen sind in ihrem Wachstum gehemmt. Die zweite Kontrolle sind BaF mig p185 Zellen. Diese sind auf Grund des BCR-ABL unabhängig von IL3 geworden. Ein Inhibitor der Januskinase-2 sollte hier keinen Effekt haben da BCR-ABL direkt über STAT5 und andere Wege ein Wachstumssignal an den Zellkern liefert. Des

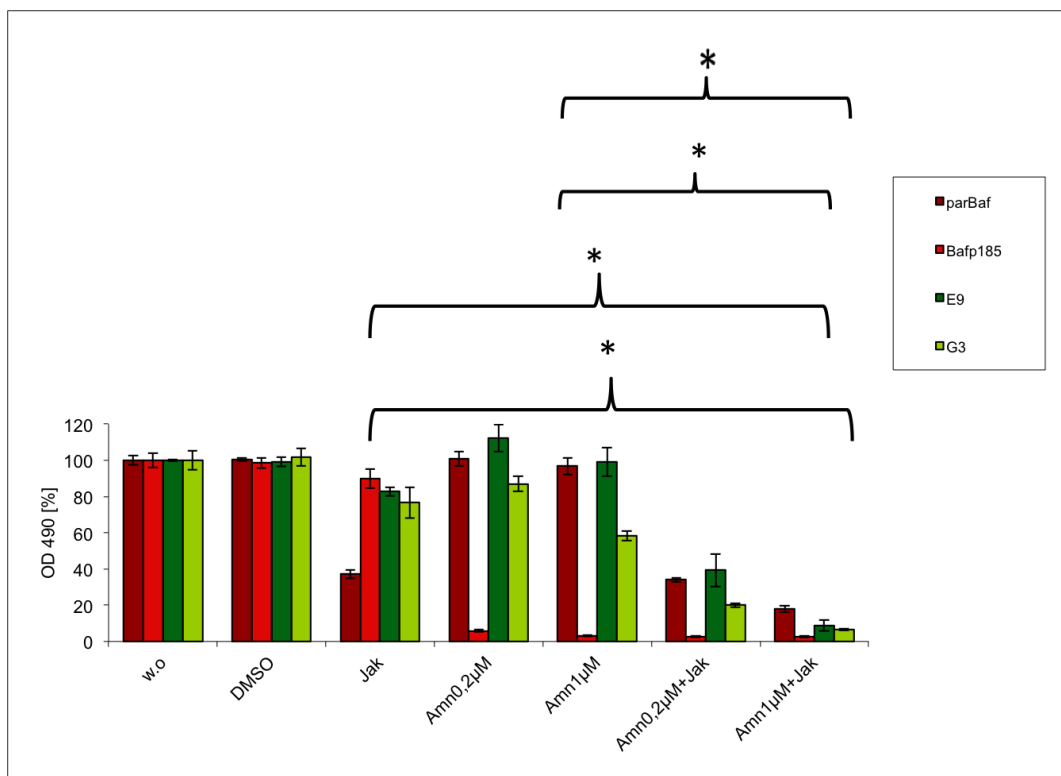


Abbildung 3.21: Inhibition der AMN 200 Klone durch den JAK-Inhibitor-I

weiteren wurden die Zellklone E9 und G3 verwendet, also die Zelllinien in denen ein pJAK2 Signal beobachtet wurde trotz Inhibition von BCR-ABL. Der Inhibitor ist in DMSO gelöst, somit wurde auch eine Kontrolle mit DMSO durchgeführt um zu zeigen das dies kein Effekt auf das Wachstum der Zellen hat.

Es zeigt sich in Abb. 3.21, dass die parentalen BaF Zellen durch den JAK-Inhibitor in ihrem Wachstum gehemmt sind, der Inhibitor also einen biologischen Effekt auf die Zellen hat. Hier wird also die Weiterleitung des Signals von IL3 über JAK2 effektiv gehemmt. Die BaF mig p185 Zellen jedoch sind unbeeinflusst durch den Inhibitor. Das BCR-ABL kann zwar JAK2 aktivieren ist jedoch nicht abhängig hiervon. Eine Weiterleitung des Signals direkt über STAT5 ohne JAK2 ist hier möglich, auch werden weitere Kinasen wie AKT und der IP3 Signalweg über BCR-ABL aktiviert. Es besteht somit keine Abhängigkeit der Wildtypzelllinie von JAK2. Die Zellklone E9 und G3 sind nur unwesentlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Wurden die Zellen nur mit AMN behandelt blieben die parentalen BaF-Zellen im Wachstum unbeeinflusst, die BaF mig p185 Zellen waren jedoch durch 200nM des Inhibitors komplett im Wachstum gehemmt. Der Zellklon E9 wies keine Inhibition durch Nilotinib auf, der Zellklon G3 hingegen war in seinem Wachstum etwas beeinträchtigt, konnte aber auch nicht komplett inhibiert werden. Wurden die Zellen jedoch mit einer Kombination aus dem JAK-Inhibitor und AMN inkubiert zeigte sich wie zu erwarten, bei den parentalen BaF Zellen die gleiche Wirkung wie durch den JAK-Inhibitor alleine, die BaF Mig p185 Zellen waren weiterhin alleine schon durch das AMN inhibiert. Die Zellklone E9 und G3 waren nun durch die Kombination in ihren Wachstum gehemmt da sie durch die Inhibition des BCR-ABL durch AMN vermutlich auf den JAK2 abhängigen Weg angewiesen waren. Dieser wurde nun durch den JAK-Inhibitor ebenfalls gehemmt und die Zellen konnten sich nicht weiter vermehren. Bei einer größeren Konzentration von Nilotinib von $1\mu\text{M}$ war dieser Effekt noch stärker zu sehen.

Um die Signifikanz der Daten zu zeigen erfolgte der Student-t-Test. Hier war stets $p < 0,05$. Auf Grund der kleinen Daten Menge (Triplets) erfolgte zur besseren Darstellung der Signifikanz ebenfalls der Mann-Whitney Test. Hierbei

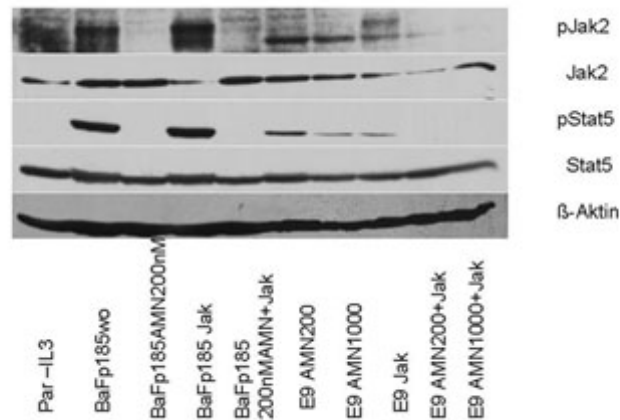


Abbildung 3.22: Phosphorylierungsmuster von BaF mig p185 und E9 bei Inhibition von JAK2

bestätigte sich die Signifikanz der Daten. In der Abbildung (3.21) werden die miteinander verglichenen Zellen mittels Klammer gezeigt, der Stern steht für ein $p < 0,05$.

3.6.2 Phosphorylierungsmuster bei JAK2-Inhibition

In diesem Versuch (vgl. Abb. 3.22) wurden als Negativkontrolle parentale BaF Zellen ohne IL3 gehungert, dadurch wurde das pJAK2 Signal abgeschaltet. Als weitere Kontrolle dienen BaF mig p185 Wildtypzellen, diese dienen unbehandelt als Positivkontrolle da durch BCR-ABL JAK2 aktiviert wird. Eine Inhibition des BCR-ABL wird durch AMN in einer Konzentration von 200nM erreicht, eine Inhibition von JAK2 durch den JAK-Inhibitor-I. Untersucht werden pJAK2 und dessen Downstreamtarget pSTAT5. In Abb. 3.22 sieht man in den parentalen BaF Zellen in Abwesenheit von Interleukin-3 kein pJAK2 oder pSTAT5 Signal. In den BaF mig p185 Zellen ohne einen Inhibitor sieht man, ausgelöst durch das BCR-ABL, ein pJAK2 Signal und auch ein pSTAT5 Signal. Durch Nilotinib werden diese Signale inhibiert. Wenn nur der JAK-Inhibitor bei den Zellen verwendet wird sieht man weiterhin ein pSTAT5 Signal, dieses ist ausgelöst durch BCR-ABL, da BCR-ABL

STAT5 direkt phosphorylieren kann. Man sieht aber weiterhin ein pJAK2 Signal, das liegt vermutlich daran, dass der Antikörper das Tyrosin 1007 in phosphorylierter Form nachweist, diese Phosphorylierungsstelle ist wichtig für den Abbau des JAK2. Das JAK2 aber tatsächlich inhibiert ist, kann man am Downstreamsignal STAT5 ablesen. Wenn der JAK-Inhibitor-I verwendet wird ist in dem Zellklon E9 keine Phosphorylierung des STAT5 mehr nachweisbar. Werden nun AMN und JAK-Inhibitor-I bei den Zellen eingesetzt ist wie bei Nilotinib alleine dieses Signal verschwunden. In den AMN200 Zellen sieht man bei AMN in den Konzentrationen von 200nm und auch bei 1000nM weiterhin ein pJAK2 Signal, ebenso ein pSTAT5 Signal. Bei Anwesenheit des Jak-Inhibitor-I alleine ist, vermutlich ausgelöst durch ein wieder aktiviertes BCR-ABL, ein pJAK2 und pSTAT5 Signal zu sehen. Werden nun in diesen Zellen der JAK-Inhibitor-I und Nilotinib gemeinsam angewendet ist zwar noch ein leichtes pJAK2 Signal nachweisbar aber kein pSTAT5 Signal. In der Kombination beider Inhibitoren werden sowohl der BCR-ABL abhängige Signalweg wie auch die BCR-ABL unabhängige Signalkaskade über JAK2 und STAT5 inhibiert. Dieses Ergebniss passt auch zu den Proliferationsassays (vgl Abb. 3.21).

3.7 Beteiligung von Zytokinen an der JAK2 Aktivierung

3.7.1 Einfluss des Zellüberstandes auf das Wachstum parentaler BaF/3 Zellen

JAK2 wird typischerweise durch Rezeptoren an der Zellmembran aktiviert, dies zumeist durch Zytokine. Um herauszufinden ob die AMN 200 Klone Zytokine produzieren die einen Wachstum ermöglichen wurde der Überstand den diese Zellen produzieren genommen und damit parentale BaF/3 Zellen inkubiert. Wenn die Zellen Zytokine produzieren und sich somit selber zum Wachstum anregen müsste das Medium in dem die Zellen gehalten wurden ausreichend Zytokine beinhalten um parentalen BaF Zellen ein ausreichen-

des Wachstumssignal zu liefern. Die Zellklone wurden für 48h in einem RPMI Medium ohne Zusatz von FCS gehalten. Das Conditioned Medium ist nun dieses Medium nach 48 Stunden. Es wurden unterschiedliche Mengen and Zellen benutzt, 2, 2,5, 3 oder 5×10^5 Zellen. Dies ist in der Abb. 3.23 in Zahlen 2, 2,5, 3 oder 5 hinter den Namen der Zellklone dargestellt. Als Positivkontrolle in diesem Versuch wurden parentale BaF Zellen mit IL3 genommen. Als Negativkontrolle dienten parentale BaF-Zellen ohne IL3 in einem Medium ohne FCS. Untersucht wurden der Überstand von BaF mig p185 Zellen um auszuschliessen, dass schon bei den Wildtypzellen Zytokine produziert werden, die ein Wachstum in parentalen BaF-Zellen stimulieren können. In Abb. 3.23 sieht man das der Überstand der BaF mig p185 Zellen keinen Wachstum bei den parentalen BaF-Zellen auslöst. Nun wurde auch der Überstand der AMN 200 Klone in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht. Aber auch hier ließ sich bei den parentalen BaF-Zellen kein Wachstum induzieren. Es ist anzunehmen das die Zellklone entweder die Zytokine nur in geringer Menge produzieren oder gar keine.

3.7.2 Einfluss des Überstandes auf das Phosphorylierungsmuster

Um zu sehen ob in dem Überstand der AMN200 Zellen genug Zytokine produziert worden sind um parentale BaF Zellen dazu anzuregen eine Signalkaskade anzuschalten, wurde das Conditioned media der Zellen auf parentale Baf Zellen gegeben. Die parentalen BaF Zellen wurden für 4 Stunden gehungert und anschließend für 2,5h mit dem jeweiligen Agens stimuliert. Als Positiv Kontrolle dienten parentale BaF Zellen mit einer Stimulation durch IL3 und somit einer Phosphorylierung von JAK2 und STAT5. Als Negativ Kontrolle dienten gehungerte parentale BaF Zellen ohne Stimulation. Als Positivkontrolle wurden auch hier parentale Baf Zellen mit IL3 stimuliert, IL3 gibt das Signal wie die meisten Zytokine über JAK2 und STAT5 weiter. Da der Resistenz Mechanismus den wir suchen in den AMN200 Zellen ein pJAK2 und somit auch ein pSTAT5 Signal auslösten wurden diese beiden Proteine getestet. Des Weiteren wurde als Negativkontrolle der Überstand der BaF mig

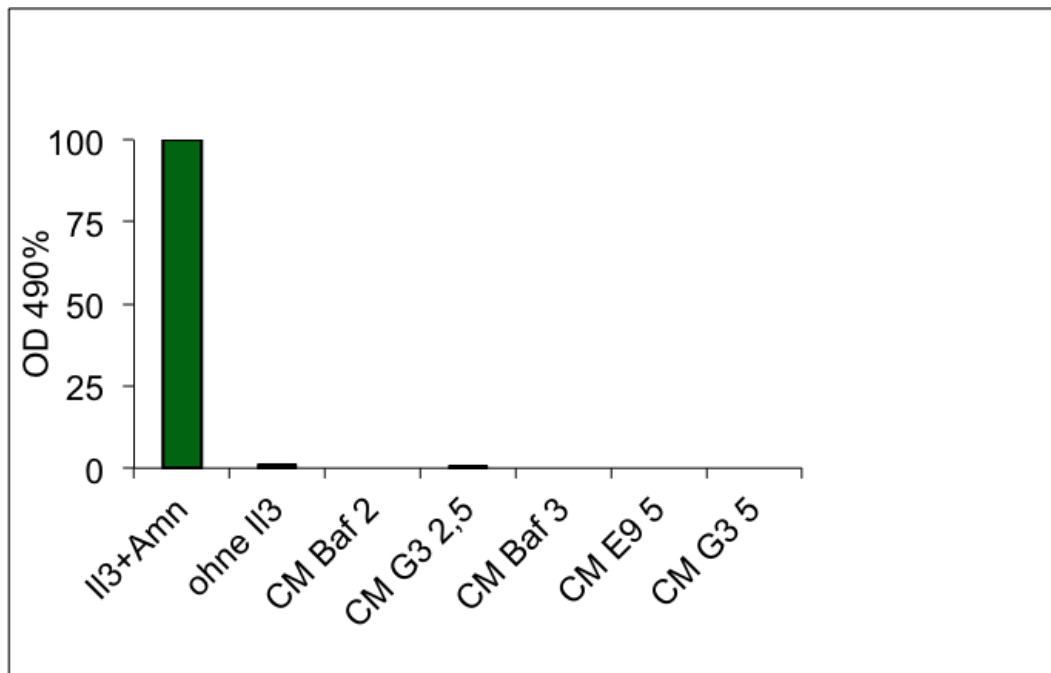


Abbildung 3.23: MTT-Assay: Der Effekt des Conditioned media der AMN200 Zellklone G3 und E9 auf das Wachstum der parentale BaF Zellen

p185 Wildtypzellen genommen. Der Überstand von den Zellklonen E9 und G3 wurde auf parentale BaF-Zellen gegeben. Wie man in Abb. 3.24 sieht löst dieser Überstand in den parentalen BaF-Zellen keine Phosphorylierung des JAK2 aus. Ebenso wenig, selbst bei sehr langer Exposition des Films, läßt sich ein Phosphorylierungssignal des STAT5 nachweisen. Auch wurden in diesem Versuch zwei weitere Zelllinien getestet. Der Zellklon G1 aus dem AMN200 Screen beinhaltet im BCR-ABL eine Y253H Mutation. Hierdurch ist eine Resistenz gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren gegeben (Bubnoff u. a. 2003). Als Kontrolle zu dieser Zelllinie dienen BaF Zellen die über einen zeo Vektor mit BCR-ABL mit einer Y253H Mutation infiziert wurden. Wird nun der Überstand des Klons G1 auf die parentalen BaF Zellen gegeben ist kein Signal in den parentalen BaF-Zellen nachweisbar. Ebenso wenig bei dem Überstand der Kontrollzelllinie BaF zeo Y253H. (siehe Abb. 3.24).

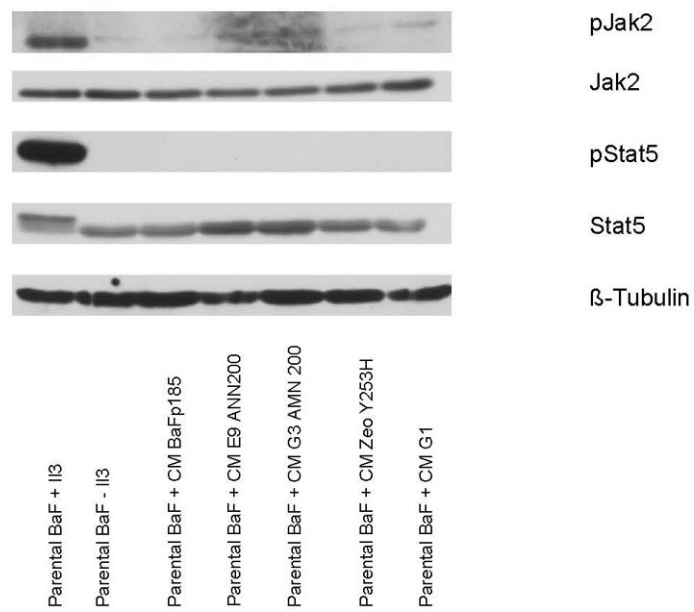


Abbildung 3.24: Einfluss des Conditioned Media der AMN200 Zellklone E9 und G3 auf das Phosphorylierungsmuster von parenteralen BaF Zellen

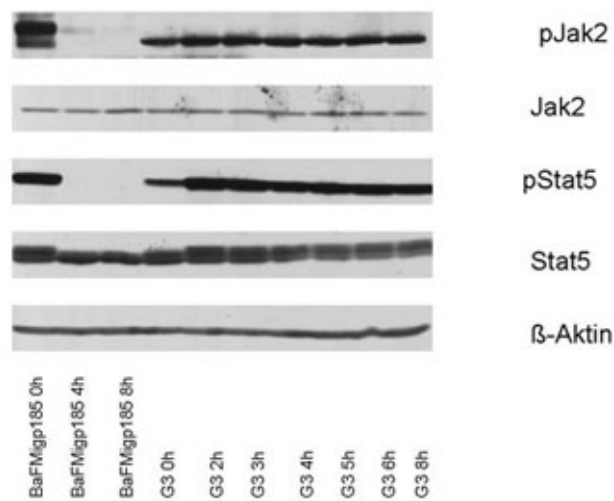


Abbildung 3.25: Zeitlicher Verlauf des Phosphorylierungsmusters der G3 AMN200-Zelllinie

3.7.3 Zeitlicher Verlauf des Phosphorylierungsmuster des AMN200 Klons G3

Falls Zytokine bei dem JAK2 abhängigen Resistenzmechanismus eine Rolle spielen müsste sich das pJAK2 Signal im Laufe der Zeit bei gehungerten Zellen verändern. In Abbildung 3.25 wurde die Phosphorylierung der Zellen im Verlauf der Zeit dargestellt. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 untersucht, hierbei herrschten noch die normalen Wachstumsbedingungen. Anschließend wurden jeweils 10×10^6 in RPMI Medium ohne FCS und 200nM Nilotinib überführt und nach festgelegten Zeitpunkten geerntet. Als Positivkontrolle wurden BaF mig p185 Wildtyp Zellen zum Zeitpunkt 0 verwendet. Zum Zeitpunkt 0 sind diese Zellen noch keinem Inhibitor ausgesetzt gewesen und somit ist eine Aktivierung von JAK2 und STAT5 zu erwarten. Nach 4 und 8 Stunden sieht man in den Kontrollzellen durch die Inhibition von BCR-ABL durch Nilotinib keine Aktivierung von JAK2 oder STAT5 mehr. Die Zellen G3 aus dem AMN200 Screen wurden in einem RPMI Medium ohne FCS mit 200nM Nilotinib inkubiert und nach 2,3,4,5,6 und 8 Stunden geerntet. In

dem Zellklon G3 aus dem AMN200 Screen persistiert selbst nach 8 Stunden das pJAK2 und das pSTAT5 Signal. Das Signal bleibt über die Zeitspanne hinweg konstant. Es ist also unwahrscheinlich das ein Zytokin abhängiger Mechanismus bei diesen Zellen eine Rolle spielt. Bei einer Zytokinproduktion der Zellen wäre beim Zeitpunkt 0 ein starkes Signal zu erwarten da die Zellen zu diesem Zeitpunkt von den produzierten Zytokinen umgeben sind. Wenn die Zellen in ein neues Medium ohne Zusätze umgesetzt werden wäre ein zunächst verringertes Signal zu erwarten welches sich im Verlauf der Zeit schrittweise vermehrt. Dieser Effekt ist in der Zelllinie G3 nicht zu beobachten. Das Signal des pJAK2 bleibt in der Zelllinie G3 über die Zeit konstant. Somit ist eine Zytokinproduktion der Zellen unwahrscheinlich und eine Zytokin unabhängige Aktivierung des JAK2 wahrscheinlich.

3.7.4 Zytokin-Array

Um eine veränderte Zytokinproduktion der AMN200 Zellklone auszuschließen wurde noch ein Zytokin-Array durchgeführt. Auf diesem Array sind verschiedene Antikörper gespottet an die sich die Zytokine des Mediums anheften können. Über einen fluoreszierenden Antikörper kann dann detektiert werden ob ein Zytokin in dem Medium vorhanden war. Die auf der verwendeten Membran gespotteten Antikörper sind in der Tabelle 2.1 dargestellt. Es wurde wieder Conditioned Media hergestellt (vgl. Kapitel 3.7.1). Als Vergleichskontrolle wurde das Überstandsmedium der BaF mig p185 Wildtyp Zellen genommen. Es wurden wieder die Zellklone E9 und G3 aus dem AMN 200 Screen verwendet. In Abbildung 3.26 ist zu sehen das bei allen Zelllinien die Zytokine im Medium identisch sind. Makroskopisch ist kein Unterschied in der Zytokinproduktion der Zellen zu sehen.

3.8 JAK2 Aktivierung auch in FLT3ITD positiven Zelllinien

Bei FLT3ITD Zelllinien, die durch einen Screen eine Resistenz gegen PKC entwickelt hatten, wurde in einigen Zelllinien eine Resistenz gegen PKC ohne

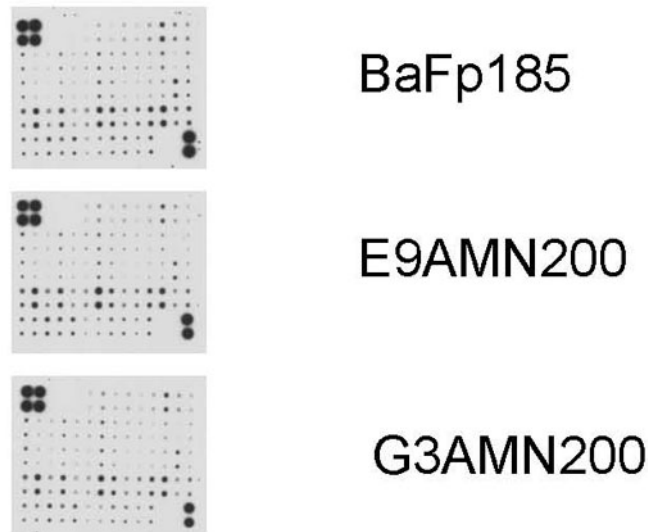


Abbildung 3.26: Zytokin Array BaF mig p185, E9, G3

die Beteiligung einer Mutation im FLT3ITD Protein detektiert. In einigen dieser Zellen wurde eine pJAK2 Aktivierung beobachtet. So zum Beispiel in dem Zellklon C10. Der Zellklon C7 hingegen weist eine Resistenz gegen PKC auf ohne Mutation im FLT3ITD und ohne eine Aktivierung von pJAK2.

3.8.1 Proliferationsassay bei Inhibition von JAK2

In diesem Versuch wurde die Inhibition von JAK2 auf die Proliferation der PKC-resistenten Zellen C7 und C10 getestet. Als Kontrolle dienen parentale BaF Zellen, diese sind in ihrem Wachstum von IL3 abhängig, dieses gibt das Proliferationssignal über JAK2 weiter. Wird nun JAK2 inhibiert ist die Proliferation der Zellen eingeschränkt (vgl. Abb. 3.27). PKC alleine hat hingegen keinen Effekt auf das Wachstum der parentalen BaF-Zellen, die Kombination aus PKC und JAK-Inhibitor-I hingegen schon, genau wie der JAK-Inhibitor-I alleine auch. Als weitere Kontrolle wurden BaF mig FLT3ITD Wildtypzellen verwendet. Da diese Zellen durch FLT3ITD in ihrem Wachstum von IL3 und JAK2 unabhängig sind hat der Inhibitor alleine kaum Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Der Inhibitor PKC hemmt die Proliferation schon bei

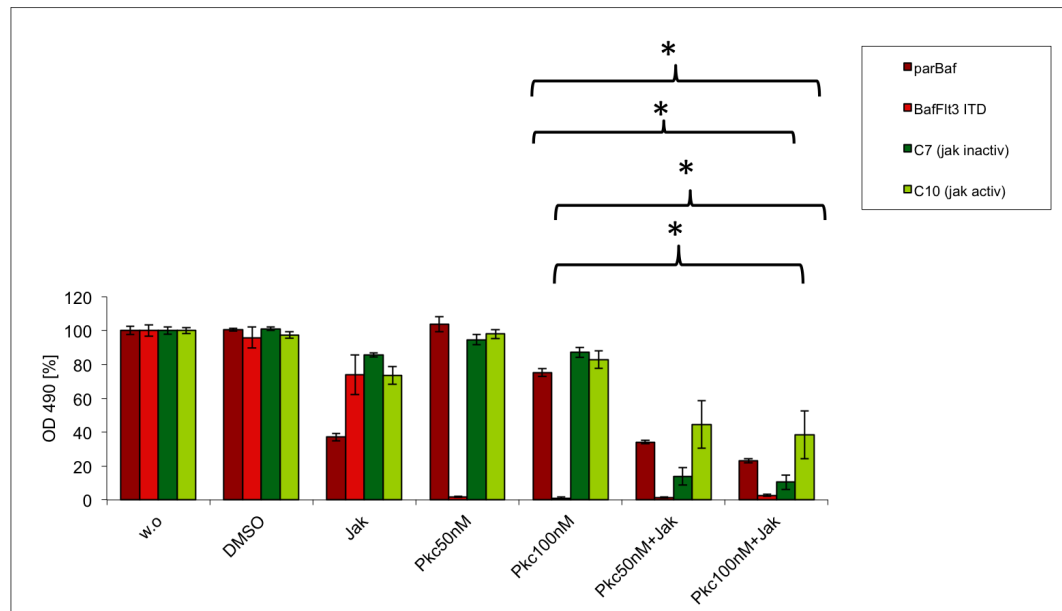


Abbildung 3.27: MTT-Assay: Proliferation der FLT3ITD Zellen bei JAK2 Inhibition

einer Konzentration von 50nM vollständig. Bei dem Zellklon C7 wie auch bei C10 sieht man bei dem FLT3ITD Inhibitor PKC bei der Konzentration von 50nM keine wesentliche Einschränkung der Proliferation. Ebenfalls bei 100nM proliferieren die Zellen weiter, wohingegen die Wildtypzelllinie nicht mehr wachsen kann. Sowohl beim Zellklon C7 der im Westernblot keine Phosphorylierung von JAK2 zeigt, als auch bei C10, der eine Phosphorylierung von JAK2 zeigt, hat der JAK-Inhibitor-I eine Wirkung auf den Zellwachstum. Beide Zelllinien zeigen bei Einsatz des JAK Inhibitors alleine keine starke Wirkung auf die Proliferation. Das liegt vermutlich daran, dass ohne PKC FLT3ITD wieder ein Proliferationssignal an den Zellkern weitergeben kann und die Zellen somit nicht mehr auf JAK2 angewiesen sind. Setzt man hingegen die beiden Inhibitoren gemeinsam ein zeigt sich eine deutlich eingeschränkte Wachstum der beiden Zelllinien.

Eine Kombination aus den beiden Inhibitoren führt also bei den resistenten Zelllinien C7 und C10 zu einem verminderten Wachstum.

Um die Signifikanz der Daten zu zeigen erfolgte der Student-t-Test. Hier war stets $p < 0,05$. Auf Grund der kleinen Daten Menge (Triplets) erfolgte zur bes-

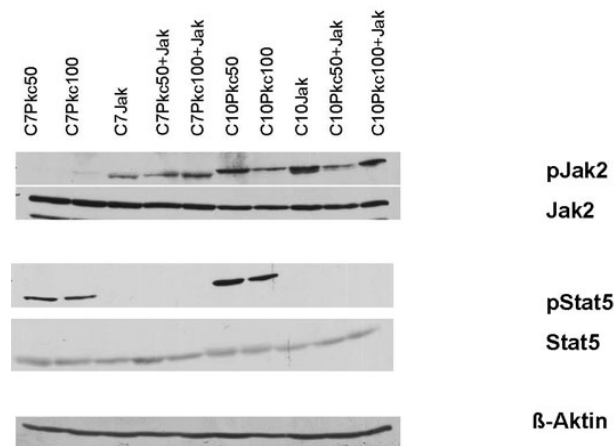


Abbildung 3.28: Phosphorylierungsmuster bei JAK2 Inhibition bei den PKC resistenten Zelllinien C7 (JAK2 negativ) und C10 (JAK2 positiv)

seren Darstellung der Signifikanz ebenfalls der Mann-Whitney Test. Hierbei bestätigte sich die Signifikanz der Daten. In der Abbildung (3.27) werden die miteinander verglichenen Zellen mittels Klammer gezeigt, der Stern steht für ein $p < 0,05$.

3.8.2 Einfluß des JAK-Inhibitors-I auf das Phosphorylierungsmuster der Zellen

Es wurde in vorhergehenden Experimenten beobachtet, dass einige Zellen der aus dem Screen gezogenen Zellen ohne Mutation im FLT3ITD, eine JAK2 Aktivierung aufwiesen. In Abbildung 3.27 wurde gezeigt, dass der JAK-Inhibitor-I die gegen PKC resistenten Zellen in ihrem Wachstum beeinflussen kann. Um zu sehen, ob sich auch das Phosphorylierungsmuster geändert hat, wurden die Zelllinien C7 und C10 im Westernblot miteinander verglichen. Zellklon C7 und C10 sind beide im FLT3ITD Gen nicht mutiert. Bei Behandlung mit PKC weist C7 keine JAK2 Aktivierung auf, C10 hingegen schon.

In Abbildung 3.28 werden die beiden Zellklone miteinander verglichen. Hierbei kann man auch bei alleiniger Behandlung der Zellen mit PKC in den Konzentrationen von 50nM wie auch bei 100nM sehen, dass C7 keine JAK2

Aktivierung aufweist, C10 hingegen schon. Bei beiden Zelllinien sieht man hingegen eine STAT5 Phosphorylierung. Werden die Zelllinien nun mit dem JAK-Inhibitor-I inkubiert sieht man bei Zelllinie C10 eine Verstärkung des pJAK2 Signals, vermutlich wird dieser Effekt eben durch den JAK2 Inhibitor verursacht. Der Antikörper erkennt die Phosphorylierungsstelle 1007 des JAK2 Proteins. Diese Stelle ist jedoch wichtig für den Abbau des Proteins, die phosphorylierten JAK2 Proteine akkumulieren in der Zelle und das Signal wird verstärkt. Die Effektivität des Inhibitors ist somit nur indirekt ablesbar durch die Wirkung auf STAT5. Hier ist zu sehen, dass mit dem JAK-Inhibitor-I das pSTAT5 Signal verschwindet. In der Zelllinie C7 ist bei hinzufügen des JAK2 Inhibitors ebenfalls eine Phosphorylierung des JAK2 Proteins nachweisbar. Auch das Phosphorylierungssignal von STAT5, einem Downstreamtarget von JAK2 verschwindet. Es ist anzunehmen, dass auch Zellklon C7 einen Januskinase abhängigen Resistenzmechanismus hat der aber von dem verwendeten pJAK2 Antikörper nicht detektiert wird. Hierzu passt auch die Inhibition des Wachstums von Zellklon C7 durch den JAK2-Inhibitor (Vgl. Abb. 3.27).

3.9 Unterschiedliche Aktivität der SRC Kinasen

Um zu klären, durch welchen Mechanismus JAK2 in den Zellen aktiviert wurde, erfolgten weitere Westernblots. Hier wurde besonders das Phosphorylierungsmuster der SRC-Kinasen untersucht. Da SRC-Kinasen in der Aktivierung von STAT5 durch FLT3ITD beteiligt sind (Leischner u. a. 2012).

In einem Westernblot (Vgl Abb. 3.29) wurden die Zelllinien FLT3ITD Wildtyp, also ohne eine Mutation im FLT3ITD und sensibel auf PKC verglichen mit der PKC resistenten Linie C10. Diese Linie weist eine pJAK2 Aktivierung auf ohne eine Mutation im FLT3ITD. Als weitere Kontrolle wurden Zellen untersucht welche die Mutation 691I im FLT3ITD Protein aufweisen. Diese Mutation führt zu einer PKC Resistenz, FLT3ITD sendet das Signal also weiterhin an den Zellkern, auch in Anwesenheit von PKC. Der FLT3 Ge-

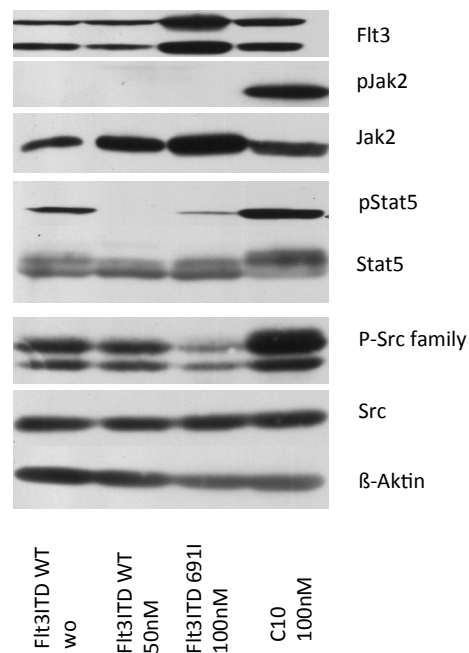


Abbildung 3.29: Vergleich der Phosphorylierung zwischen FLT3ITD Wildtyp, FLT3ITD691I und C10

halt der Zellen C10 sowie der Kontrollzellen ist bei gleichem β -Aktingehalt der Zellen ähnlich. Somit ist eine Überexpression des FLT3ITD als Resistenzmechanismus unwahrscheinlich. In den Westernblots zeigt sich auch hier wieder ein phosphoryliertes JAK2. Eine pSTAT5 Aktivierung ist in den BaF mig FLT3ITD Wildtypzellen zu sehen, da FLT3ITD STAT5 aktivieren kann. Wie zu erwarten verschwindet dieses Phosphorylierungssignal bei Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor PKC. Die FLT3ITD 691I Zellen sind gegen PKC resistent, hier verschwindet auf Grund der bleibenden Aktivität das pSTAT5 bei Behandlung mit PKC nicht. Die Zellen C10 weisen eine STAT5 Phosphorylierung auf, ausgelöst durch die JAK2 Aktivierung. In diesem Versuch fällt des Weiteren in den C10 Zellen eine deutlich stärkeres Signal der pSRC-Familie auf. Welches Protein der SRC-Familie hier stärker phosphoryliert ist wurde im Weiteren untersucht (Vgl Abb. 3.30) . Es wurden die Proteine RRS, LCK und HCK auf ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster untersucht und wieder die Zelllinien BaF mig FLT3ITD Wildtyp, BaF mig FLT3ITD 691I

und C10 verglichen. Die Zelllinie BaF mig FLT3ITD wurde mit und ohne PKC untersucht um zu sehen ob der Inhibitor einen Einfluss auf eine unterschiedliche Phosphorylierung der SRC-Kinasen hat. Werden die FLT3ITD Wildtyp Zellen mit PKC behandelt, also FLT3ITD Inhibiert verschwindet das Phosphorylierungs Signal des FLT3. Da FLT3ITD SRC aktiviert ist dieses Verhalten auch zu erwarten. Das pLCK Signal ist unverändert mit und ohne Behandlung der Zellen mit PKC, ein pHCK Signal läßt sich gar nicht nachweisen. In der Zelllinie BaF mig FLT3ITD 691I ist trotz PKC FLT3ITD weiter aktiv. Die 691I Mutation führt zu einer starken Resistenz gegen den Inhibitor, wie zu erwarten ist weiter ein Phosphorylierungssignal der SRC-Kinase zu sehen. LCK ist auch weiter aktiviert und ein pHCK Signal läßt sich wie in der Wildtyp Zelllinie nicht nachweisen. Im Zellklon C10 hingegen fällt auf, dass HCK ein Phosphorylierungssignal aufweist. Das pHCK Signal ist in den anderen Zelllinien nicht zu sehen. Der Zellklon C10 ist in vorhergehenden Versuchen JAK2 positiv (Vgl Abb 3.28). Nun stellt sich die Frage ob und in welchem Zusammenhang das pHCK Signal zum pJAK2 Signal der Zellen steht.

3.10 Phosphorylierung von HCK durch JAK2 in der Zelllinie C10

Es stellt sich die Frage ob HCK durch JAK2, JAK2 durch HCK oder beide Kinasen vollkommen unabhängig voneinander aktiviert werden. Die Frage läßt sich klären, in dem die Kinasen abwechselnd mit dem entsprechenden TKI behandelt werden und die Phosphorylierungsmuster gezeigt werden. In Versuch in Abb. 3.31 wurde HCK durch den Inhibitor PD 16 inhibiert. JAK2 wurde durch den JAK-Inhibitor-I blockiert. Der Inhibitor PD16 wurde in den Konzentrationen 50nM und 500nM eingesetzt, der JAK2 Inhibitor in einer Konzentration von 1 μ M. Untersucht wurden wieder die gleichen Zelllinien wie in Abb. 3.28: C7 und C10.

In Abbildung 3.31 werden zunächst die Zellen ohne Inhibitoren gezeigt. C7 zeigt keine Aktivierung von JAK2, jedoch ein Signal bei pSTAT5. Das

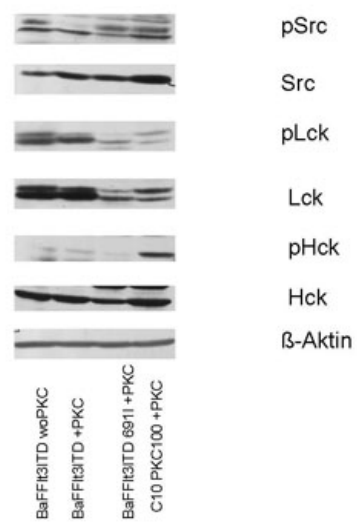


Abbildung 3.30: Unterschiede in der Phosphorylierung der SRC-Kinasen in den FLT3ITD positiven Zelllinien

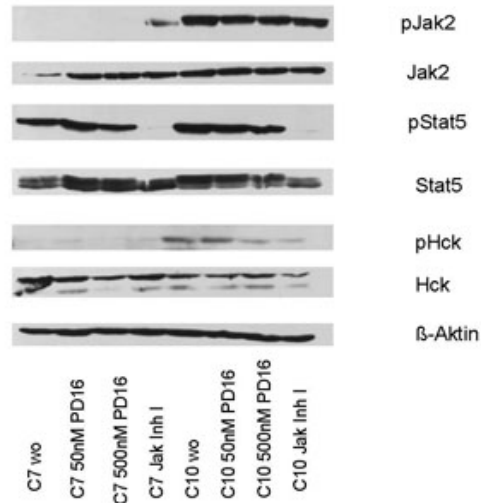


Abbildung 3.31: Inhibition von JAK2 und HCK und Einfluss auf die gegenseitige Phosphorylierung

Phospho HCK Signal ist kaum nachweisbar. Der Zellklon C10 ohne Behandlung eines Inhibitors weist sowohl pJAK2, pSTAT5 sowie pHCK auf. Beide Zellklone wurden nun mit PD16 in einer Konzentration von 50nM behandelt. Der Zellklon C7 zeigt keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters, die Zellen weisen weiterhin keine Phosphorylierung von JAK2 oder Hck auf, die STAT5 Phosphorylierung ist durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase Inhibitor PD16 nicht beeinflusst. Der Zellklon C10 ohne einen Inhibitor weist ein Signal von pJAK2, pSTAT5 sowie pHCK auf. Werden die Zellen mit dem SRC-Kinase Inhibitor PD16 behandelt zeigt sich ein abgeschwächtes Signal des pHCK, das Signal von phosphoryliertem JAK2 und STAT5 sind unverändert. Werden die Zellen mit dem JAK-Inhibitor-I behandelt zeigt sich ebenfalls ein deutlich reduziertes pHCK Signal, das pSTAT5 Signal ist wie in den vorhergehenden Versuchen nicht nachweisbar (vgl. Abb. 3.28).

Kapitel 4

Diskussion

Mit den Tyrosinkinaseinhibitoren wurde eine effektive Therapie gefunden um die CML zu behandeln (Deininger u. a. 2005). Viele Patienten werden im Verlauf der Erkrankung resistent gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren (Bubnoff u. a. 2003). Die Mechanismen sind noch nicht ganz aufgeklärt und verstanden (Bubnoff u. a. 2003). Um die Resistenzen der Zellen zu umgehen müssen zunächst die Mechanismen der Tyrosinkinaseinhibitorresistenz verstanden werden. Eine effektive und zielgerichtete Therapie kann nur entwickelt werden wenn diese Mechanismen bekannt sind.

4.1 Längere Wachstumszeit der resistenten Zellklone ohne Mutation im Zielprotein

In beiden Resistenz-Screens sind die mutierten Klone wesentlich schneller gewachsen als die resistenten Zelllinien ohne Mutation. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Mutation zu einer starken Resistenz der Zelle gegen die Inhibitoren führt und die mutierten Linien einen wesentlichen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Zellen haben und sich somit schnell vermehren. Es ist auch möglich, dass ähnlich wie im Patienten, in den Zellkolonien einige Zellen mit einer Mutation schon präexistieren (Willis u. a. 2005) und sich unter dem Selektionsdruck schneller vermehren. Eine Möglichkeit ist, dass die Resistenzmechanismen nicht so stark sind und somit die Zellen in Anwesenheit

des Inhibitors immer noch teilweise inhibiert werden. Solche Resistenzmechanismen wären zum Beispiel die Überexpression des BCR-ABL oder der Einbau von Pumpen in die Zellmembran um das Medikament schneller aus der Zelle zu schleusen (Bubnoff u. a. 2003). Eine weitere Erklärung ist, dass bei diesen Zelllinien wesentlich komplexere Mechanismen sowie mehrere unterschiedliche Mechanismen nacheinander in Kraft getreten sind. Erst das Zusammenspiel der unterschiedlichen, nacheinander in Kraft getretenen Resistenzmechanismen führt zu der erlangten Resistenz.

4.2 Kreuzresistenz

STI2 Klone

Die STI2 Klone zeigen eine 2-4 mal höhere Resistenz gegen Imatinib als die Kontroll Zelllinie. Auch gegen die anderen Inhibitoren liegt der IC50 etwa bei der Hälfte im Gegensatz zu den Nicht-resistenten Zellen. Diese relativ schwachen Resistenzen sind durch einen relativ einfachen Mechanismus wie zum Beispiel eine Überexpression des BCR-ABL zu erklären (Bubnoff u. a. 2003). Eine höhere Dosierung von Imatinib oder auch der Umstieg auf einen der Second-line Inhibitoren können hier die Resistenz überwinden. Für Patienten ist dies, auch bei Resistenzen ohne Mutation im BCR-ABL Gen, beschrieben (Kantarjian u. a. 2006; Talpaz u. a. 2006). In diesem Versuch zeigt sich auch, dass eine optimale Imatinibdosierung in den Patienten erreicht werden sollte. Bei Patienten wird bei einer täglichen Dosis von 400mg Imatinib eine Plasmakonzentration von etwa $5 \mu\text{M}$ Imatinib erreicht (Bauer u. a. 2013). Bei einer niedrigen Dosierung von $2 \mu\text{M}$ Imatinib werden unmutierte Zellen im Wachstum inhibiert, die mutierten Zellen werden jedoch selektiert.

STI4 Klone

Die STI4 Klone hingegen sind in einer Umgebung von $4 \mu\text{M}$ Imatinib gewachsen. Die gewählte Konzentration von $4 \mu\text{M}$ Imatinib im Versuch kommt den realen Bedingungen sehr nah. Bei Patienten wird in der eingesetzten Dosierung von 400mg Imatinib pro Tag eine Plasmakonzentration von $5,26 \mu\text{M}$

erreicht (Bauer u. a. 2013). Die Konzentration von $4\mu\text{M}$ Imatinib führt in den Kontrollzelllinien zu einer nahezu vollständigen Inhibition des Wachstums. Die STI4 Klone sind gegen alle eingesetzten Inhibitoren resistent. Die Zellen weisen nicht nur eine Resistenz gegen den als ersten eingesetzten Inhibitor auf, sondern auch gegen die Second-line Inhibitoren. In den Versuchen zeigte sich, dass die Zellen in Abwesenheit des Inhibitors schlechter wachsen. Hier ist von einem Adaptationsphänomen auszugehen.

AMN200 Klone

Die AMN 200 Klone zeigen in den Versuchen eine ausgeprägte Kreuzresistenz. Alle drei eingesetzten Tyrosinkinaseinhibitoren waren nicht in der Lage die Zellen effektiv zu inhibieren (vgl. Abb. 3.14). Der Resistenzmechanismus der AMN 200 Zellen scheint im Vergleich zu den STI2 und 4 Klonen deutlich ausgeprägter.

Zusammenfassung der Kreuzresistenz

Alle drei untersuchten Zelllinien zeigen eine Kreuzresistenz auf. Die STI2 Klone wiesen eine geringe Resistenz auf, jedoch sind auch hier die Zellen deutlich unempfindlicher gegen alle drei eingesetzten Inhibitoren. Die STI4 Klone zeigen ebenfalls eine effektive Resistenz gegen alle drei Inhibitoren. Die AMN 200 Zellklone weisen die stärkste Resistenz auf. Ebenso wie bei den anderen Zelllinien ist auch eine Kreuzresistenz gegen alle drei eingesetzten Inhibitoren zu sehen. Die AMN 200 Klone haben jedoch den effektivsten Mechanismus mit der stärksten Resistenz. Hier ist zu sehen, dass die Resistenz gegen einen Inhibitor auch eine Resistenz gegen die eingesetzten Second-line Inhibitoren bedeuten kann. Ein Umstieg in der Behandlung von einem First-line auf ein Second-line Medikament muss also nicht erfolgsversprechend sein. Es gilt den Resistenzmechanismus zu finden um die Zellen effektiv zu inhibieren.

4.3 Unterschiedliche Resistenzmechanismen der Wildtypzelllinien

STI 2 Klone

Die STI2 Klone zeigen in den Kreuzresistenzuntersuchungen zwar eine Resistenz gegen Imatinib und die beiden Second-line Inhibitoren Nilotinib und Dasatinib. Die Resistenz ist signifikant, jedoch durch Dosiserhöhung des eingesetzten Inhibitors oder Substanzwechsel zu überwinden. Bei einer Verdopplung der Dosis des Inhibitors sind schon die meisten Zellen effektiv inhibiert. Klinisch kann dies bedeuten, dass bei dem vorliegendem Mechanismus eine Dosiserhöhung des Inhibitors, oder die Umstellung auf einen Second-line Inhibitor eine therapeutische Option darstellt (Kantarjian u. a. 2006; Talpaz u. a. 2006).

STI 4 Klone

Die Untersuchungen der STI4 Klone zeigen hingegen, dass hier ein stärkerer Resistenzmechanismus vorliegt. Bei den STI4 Klonen ist während der Zellkultur jeweils eine Punktmutation im Zielprotein aufgetreten. Die Zellen wurden stets in einer Umgebung von $4\mu\text{M}$ Imatinib gehalten. Somit bestand ein hoher Selektionsdruck für die Zellen bei der recht hohen Konzentration an Imatinib. Es ist möglich, dass seit Anfang der Selektion der Zellen schon einige Zellen mit einer Punktmutation vorgelegen haben und diese im Verlauf der Zeit auf Grund des Selektionsdruckes hochwachsen. In Patienten ist dieses Phänomen beschrieben (Willis u. a. 2005). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Zellen, bei denen ja auch schon durch das Philadelphia-Chromosom eine erhöhte genetische Instabilität vorliegt (Bubnoff u. a. 2003), im Verlauf die Mutation im Zielprotein aufgetreten ist und diese Zellen nun vermehrt wachsen und somit die Zellen mit einer Resistenz gegen Imatinib ohne Mutation des BCR-ABL verdrängen.

AMN200 Klone

Der Resistenzmechanismus der AMN 200 Klone ist deutlich effektiver als der Mechanismus der STI2 oder STI4 Klone. Keiner der eingesetzten Inhibitoren hemmt das Wachstum der Zellen komplett. Eine Umstellung auf einen bekannten Second-line Inhibitor oder Dosiserhöhung des Nilotinib stellt keine Therapieoption dar. Die Daten weisen daraufhin, dass bei Nilotinib als First-line Inhibitor stärkere Resistenzmechanismen selektiert. Eine Erhöhung der Nilotinib Dosierung oder Substanzwechsel ist in den untersuchten Zellen nicht erfolgversprechend.

4.4 JAK2 Aktivierung der AMN 200 Klone

Gleich mehrere Zelllinien zeigen im Resistenzscreen eine JAK2 Aktivierung trotz effektiver Inhibition des BCR-ABL. Xie u. a. 2001 haben gezeigt, dass JAK2 von BCR-ABL auch Interleukin 3 unabhängig aktiviert werden kann. Es wurde auch gezeigt, dass JAK2 einen Komplex mit BCR-ABL eingeht und eine Inhibition dieses Komplexes zum Zelluntergang führt. (Xie u. a. 2001). In den Versuchen zeigte sich hingegen eine BCR-ABL unabhängige Aktivierung von JAK2 die zu einer Resistenz der Zellen führt und zu einem weiteren Wachstum der Zellen trotz Inhibition des BCR-ABL. Eine Aktivierung von JAK2 durch Zytokine (Wang u. a. 2007) wurde in den Versuchen mit Conditioned media ausgeschlossen (vgl. Abb. 3.7.4 und 3.7.2). In den Westernblots zeigte sich, dass BCR-ABL durch Nilotinib inhibiert wird aber die Zellen anscheinend unabhängig von BCR-ABL weiter proliferieren. Wird BCR-ABL durch einen anderen Inhibitor wie Imatinib oder Dasatinib blockiert, kann dieser BCR-ABL unabhängige Weg trotzdem ein Signal weiterleiten und somit die Zelle zum Wachstum anregen. Die Abhängigkeit dieser alternativen Signalkaskade von JAK2 zeigt sich durch die Inhibition durch den JAK-Inhibitor-I. Wird JAK2 spezifisch durch den Inhibitor blockiert ist keine Proliferation der Zellen mehr zu verzeichnen. Die Zellen werden durch Blockade des für die offensichtlich essentiell gewordenen JAK2 komplett in ihrer Proliferation inhibiert. Die Kombination eines JAK2-Inhibitors mit

Imatinib hat in Versuchen mit BCR-ABL positiven Zelllinien schon erfolgversprechende Ergebnisse gezeigt (Okabe u. a. 2014). Für Patienten könnte dies bedeuten, dass bei einer Resistenz gegen Imatinib und ohne Nachweis einer Mutation des BCR-ABL möglicherweise die Kombination mit einem JAK2-Inhibitor Erfolg bringen könnte.

4.5 Nachweis des Y1007/1008 in JAK2 auch bei Inhibition von JAK2

Durch die Behandlung der Zellen mit Nilotinib als BCR-ABL Inhibitor und dem JAK-Inhibitor I als JAK2-Inhibitor wurden die AMN200 Zellen in ihrem Wachstum effektiv gehemmt (Vgl. Abb. 3.21). Des Weiteren lässt sich in den Western Blots nach der Behandlung mit dem JAK-Inhibitor I das Downstreamsignal von BCR-ABL und JAK2, das STAT5 nicht mehr in phosphorylierter Form nachweisen (vgl. Abb. 3.22).

In früheren Versuchen wurde gezeigt, dass der Pan-JAK-Inhibitor JAK-Inhibitor-I die Phosphorylierung von JAK2 bei einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ inhibieren kann (Pedranzini u. a. 2006). In den hier durchgeführten Versuchen wurde der Inhibitor in einer höheren Dosierung von $1\mu\text{M}$ eingesetzt, trotzdem besteht weiterhin ein Signal bei pJAK2. In den Western Blots wird das aktive JAK2, also das phosphorylierte JAK2 durch einen Antikörper nachgewiesen welcher das phosphorylierte Tyrosin an Stelle 1007/1008 von JAK2 erkennt. Dieses Tyrosin ist sowohl wichtig in der Aktivität des Proteins (Feng u. a. 1997), wie auch in seinem Abbau. An dieser Stelle binden Proteine an JAK2 welche für die Ubiquitination und somit den Abbau von JAK2 zuständig sind (Sasaki u. a. 1999). Dies lässt sich in den Western Blots auch daran erkennen, dass bei den JAK2 negativen Zelllinien durch Einsatz von JAK-Inhibitor-I ein Signal bei Phospho-JAK2 zu erkennen ist. Jedoch kann bei den inhibierten Zelllinien kein Nachweis von Phospho-STAT5, einem Downstream Signal von JAK2, mehr verzeichnet werden.

Auf Grund dessen wurden in den Versuchen nicht nur Phospho-JAK2 sondern auch das Downstreamsignal, das phosphorylierte STAT5, nachgewiesen

um sicher zu gehen, dass es sich bei den nachgewiesenen phosphorylierten JAK2 nicht um ein im Abbau befindliches, inaktives JAK2 handelt, sondern um ein aktives JAK2.

4.6 JAK2 Aktivierung der FLT3ITD positiven Zellen

Parallel zu den Versuchen mit den BCR-ABL positiven Zelllinien wurden auch Resistenzmechanismen in FLT3ITD positiven Zelllinien ohne Mutation im Zielprotein der Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht. Erstaunlicherweise konnte auch hier, wie in der AMN200 Zelllinie, mehrere Zellklone identifiziert werden, die einen starken Resistenzmechanismus aufwiesen und eine JAK2 Aktivierung zeigten. Die JAK2 Aktivierung als Resistenzmechanismus scheint ein krankheitsübergreifender Mechanismus zu sein. Obwohl es sich bei den BCR-ABL und FLT3ITD positiven Zellen um komplett andere Zellen, bzw. Erkrankungen handelt zeigen beide Zelllinien unabhängig voneinander die Aktivierung des JAK2. Auch bei den FLT3ITD positiven Zellen lässt sich die Proliferation der Zellen durch den JAK-Inhibitor-I hemmen. Wird den JAK2 positiven Zelllinien JAK-Inhibitor-I zugegeben, proliferieren sie nicht mehr weiter. Auch lässt sich hier in den Westernblots bei den JAK2 negativen Zelllinien durch Zugabe des JAK-Inhibitor-I ein Phosphorylierungssignal in den eigentlich JAK2 negativen Zelllinien nachweisen. Dies deutet wieder darauf hin, dass das nachgewiesene phosphorylierte Tyrosin 1007/1008 nicht unbedingt ein aktives JAK2 hinweist, sondern auch im Abbau des JAK2 vorkommt, also für ein inaktives JAK2 sprechen kann. Der Nachweis des aktiven JAK2 gelingt auch in diesen Zellen wieder indirekt über den Nachweis von phosphoryliertem STAT5. Hier zeigt sich jedoch auch bei der JAK2 negativen Zelllinie C7, wie auch bei der JAK2 positiven Zelllinie C10, dass durch den JAK-Inhibitor-I eine Proliferation der Zellen nicht mehr möglich ist. Das Signal des phospho STAT5 erlischt durch den Inhibitor in beiden Zelllinien. Auch in den Proliferations Assays zeigte sich, dass bei beiden Zelllinien, der JAK2 negativen und der JAK2 aktiven Zelllinie durch die Kombination der

beiden Inhibitoren: des Inhibitors gegen FLT3ITD und JAK2 die Zellen deutlich in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Da der JAK-Inhibitor-I ein Pan-JAK-Inhibitor ist, ist die Hemmung der Proliferation durch Inhibition einer anderen Janus-Kinase erklärbar. Nicht nur JAK2 aktiviert STAT 5 sondern auch JAK1, JAK3 und TYK2 (Rane u. a. 2000). Auch in diesen Zellen ist die Kombination des JAK Inhibitors mit dem FLT3ITD Inhibitor Midostaurin eine effektive Therapie. Für Patienten kann dies heissen, dass bei einer Resistenzentwicklung gegen Midostaurin ohne Mutation im FLT3ITD eine Kombination mit einem JAK-Inhibitor erfolgversprechend sein könnte.

4.7 JAK2 vermittelte Aktivierung von HCK

In den Westernblot der Abbildung 3.29 zeigte sich in der JAK2 positiven Zelllinie ein stärkeres Phosphorylierungs Signal der SRC-Familien Kinasen. Durch den Antikörper werden alle phosphorylierten Mitglieder der SRC-Familie nachgewiesen. In den weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass in der Zelllinie C10 die SRC Kinase HCK vermehrt phosphoryliert ist (vgl. Abb. 3.30.) In diesem Versuch lässt sich auch zeigen, dass weder das Phospho-JAK2 noch das Phospho-STAT5 Signal durch den SRC-Inhibitor (welcher auch HCK als Mitglied der SRC-Familie inhibiert) verschwindet. Jedoch wird deutlich weniger phosphoryliertes HCK nachgewiesen, wenn JAK2 durch den JAK-Inhibitor-I gehemmt wird. Dies kann darauf schließen lassen, dass HCK durch die JAK2 Signal Kaskade aktiviert wird. Sowohl HCK als auch JAK2 können an den Interleukin-3 Rezeptor binden, was darauf schließen lässt, dass HCK in den resistenten Zelllinien in einem Komplex mehrerer Proteine phosphoryliert wird (Burton u. a. 1997). Ursächlich für den Resistenzmechanismus ist HCK jedoch nicht. Eine Kombination aus dem FLT3ITD Inhibitor Midostaurin und einem SRC-Kinase Inhibitor führt nicht zu einem vermehrten Zelluntergang. Eine Kombination aus Midostaurin und einem SRC-Kinase Inhibitor ist somit bei Patienten mit einer Resistenz ohne Mutation im Zielprotein (FLT3ITD bzw. BCR-ABL) vermutlich nicht effektiv.

4.8 Inhibition von JAK2 hemmt die Proliferation in BCR-ABL und FLT3ITD positiven Zelllinien

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibition von JAK2 sowohl in BCR-ABL wie auch in FLT3ITD positiven Zelllinien zur Apoptose der Zellen führt. Es handelt sich hier um einen krankheitsübergreifenden, effektiven Resistenzmechanismus ohne eine Mutation im Zielprotein. Sowohl BCR-ABL wie auch FLT3ITD positive Zelllinien zeigen eine Aktivierung von JAK2. Diese Aktivierung von JAK2 zeigt sich in beiden Zelllinien als essentiell für deren Überleben. Die Kombination eines JAK-Inhibitors mit dem primär eingesetzten Tyrosinkinaseinhibitor führt zu einer Überwindung des Resistenzmechanismus. Dies wird auch in anderen Arbeiten postuliert (Okabe u. a. 2014). Für die Klinik kann dies bedeuten, dass bei resistenten Patienten ohne Mutation im Zielprotein eine JAK2 Aktivierung eine mögliche Ursache für die Resistenz ist und die die Behandlung durch einen JAK-Inhibitor ergänzt werden könnte.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Resistenzmechanismen in BCR-ABL und FLT3ITD positiven BaF/3 Zelllinien gegen Tyrosinkinaseinhibitoren ohne Mutation im Zielprotein untersucht. Die resistenten Zellen wurden in Screens erzeugt in denen sie ständig dem jeweiligen Inhibitor ausgesetzt waren. Zellklone aus einem Screen unter $2\mu\text{M}$ STI waren mit erhöhter Konzentration von Imatinib oder auch durch die Second-line Inhibitoren Nilotinib und Dasatinib effektiv im Wachstum zu inhibieren. Eine Dosiserhöhung oder auch ein Substanzwechsel ist hier zielführend.

Die STI4 Klone, also Zellen gezogen mittels eines Screens unter $4\mu\text{M}$ Imatinib, entwickelten sekundär im Verlauf Mutationen im BCR-ABL Gen. Eine Mutation auch im Verlauf der Therapie mit Imatinib ist stets möglich und sollte auch in der Therapie des Patienten stets bedacht werden.

Die Zellklone aus einem Screen unter 200nM Nilotinib zeigten eine starke Kreuzresistenz gegen sowohl Imatinib als auch Dasatinib. Der Resistenzmechanismus dieser Zellen war deutlich stärker als in den STI2 oder STI4 Klonen obwohl keine Mutation im Zielprotein vorliegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass bei Zellen welche mit Nilotinib als First-line Medikament behandelt wurden, ein stärkerer Resistenzmechanismus in Kraft tritt. Bei den Klonen aus dem AMN200 Screen sowie bei der FLT3ITD positiven Zelllinie wurde mittels Westernblot trotz Inhibition des Zielproteins ein phospho JAK2 Signal und pHCK Signal nachgewiesen. Die Inhibition des

HCK durch einen SRC-Kinase Inhibitor führte nicht zur Apoptose der Zellen. Wird jedoch in den Zellen JAK2 zusammen mit der Zielkinase (BCR-ABL bzw. FLT3ITD) inhibiert führt dies zur Zellapoptose. Die JAK2 Aktivierung als Resistenzmechanismus tritt hier als krankheitsübergreifender Mechanismus auf, da dieser Mechanismus sowohl in BCR-ABL wie auch in FLT3ITD positiven Zelllinien nachgewiesen wurde. Eine kombinierte Therapie aus einem JAK-Inhibitor und dem eingesetzten First-line Inhibitor kann somit als Strategie zur Durchbrechung der Tyrosinkinaseinhibitor Resistenz bei der CML und der FLT3ITD positiven AML dienen.

Literatur

- [1] DG Aguilera und AM Tsimberidou. „Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review“. In: *Therapeutics and Clinical Risk Management* 5 (2009), S. 281–9.
- [2] S Ali, Z Nouhi, N Chughtai und S Ali. „SHP-2 Regulates SOCS-1-mediated Janus Kinase-2 Ubiquitination/Degradation Downstream of the Prolactin Receptor“. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 52021–31.
- [3] C Antczak, DR Veach, CN Ramirez, MA Minchenko, D Shum, PA Calder, MG Frattini, B Clarkson und H Djaballah. „Structure-activity relationships of 6-(2,6-dichlorophenyl)-8-methyl-2-(phenylamino)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones: toward selective Abl inhibitors“. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19 (2009), S. 6872–6.
- [4] M Baccarani, F Castagnetti, G Gugliotta, F Palandri und G Rosti. „Treatment Recommendations for Chronic Myeloid Leukemia“. In: *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 6 (2014), e2014005.
- [5] RC Bauer, J Sanger, C Peschel, J Duyster und N von Bubnoff. „Sequential Inhibitor Therapy in CML: in Vitro Simulation Elucidates the Pattern of Resistance Mutations after Second- and Third-Line Treatment“. In: *Clinical Cancer Research* 19 (2013), S. 2962–2972.
- [6] D Bixby und M Talpaz. „Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance“. In: *ASH Education K'Book* 2009 no 1.461-476 (2009).

- [7] DI Boyle, K Soma, J Hodge, A Kavanaugh, D Mandel, P Mease, R Shurmur, AK Singhal, N Wei, S Rosengren, I Kaplan, S Krishnaswami, Z Luo, J Bradley und GS Firestein. „The JAK inhibitor toracitinib suppresses synovial JAK1-STAT signaling in rheumatoid arthritis“. In: *Annals of rheumatic diseases* 2014-206028 (2014).
- [8] N von Bubnoff. „Prognostic significance of treatment response in CML in view of current recommendations for treatment and monitoring“. In: *Therapeutic Advances in Hematology* 2 (2011), S. 95–110.
- [9] N von Bubnoff, S Barwisch, MR Speicher, C Peschel und J Duyster. „A cell-based screening strategy that predicts mutations in oncogenic Tyrosine kinases“. In: *Cell Cycle* 4 (2005), S. 400–6.
- [10] N von Bubnoff, PW Manley, J Mestan, J Sanger, C Peschel C und J Duyster. „Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor Nilotinib (AMN107)“. In: *Blood* 108 (2006), S. 1328–33.
- [11] N von Bubnoff, C Peschel und J Duyster. „Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI 571, Glivec): a targeted oncogene strikes back“. In: *Leucemia* 17 (2003), S. 829–38.
- [12] Nikolas von Bubnoff, DR Veach, H van der Kuip, WE Aulitzky, J Sanger, P Seipel, WG Bornmann, C Peschel, B Clarkson und J Duyster. „A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor“. In: *Neoplasia* 105 (2005), S. 1652–9.
- [13] Nikolas von Bubnoff und Justus Duyster. „Chronic Myelogenous Leukemia:treatment and monitoring“. In: *Deutsches rzteblatt International* 107 (2010), S. 114–21.
- [14] EA Burton, S Hunter, SC Wu und SM Anderson. „Binding of src-like kinases to the beta-subunit of the interleukin-3 receptor“. In: *Journal of biological Chemistry* 272 (1997), S. 16189–95.

-
- [15] F Cervantes, JC Hernandez-Boluda, A Ferrer, J Cid und E Montserrat. „The changing profile of Ph-positive chronic myeloid leukemia at presentation: possible impact of earlier diagnosis on survival“. In: *Hematologica* 84 (1999), S. 324–7.
- [16] SK Chai, GL Nichols und P Rothman. „Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-ABL-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients“. In: *Journal of Immunology* 159 (1997), S. 4720–8.
- [17] BW Cooper, TL Kindwall Keller, MD Craig, RJ Creger, M Hamadani, WW Tse und HM Lazarus. „A Phase I Study of Midostaurin and Azacitidine in Relapsed and Elderly AML Patients“. In: *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* (2015), S. 2152–2650.
- [18] GQ Daley, RA Van Etten und D Baltimore. „Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome“. In: *Science* 247 (1990), S. 824–30.
- [19] MW Deininger. „Milestones and Monitoring in Patients with CML Treated with Imatinib“. In: *Hematology American Society Educational Program* 1 (2008), S. 419–26.
- [20] MW Deininger. „Nilotinib“. In: *Clinical Cancer Research* 14 (2008), S. 4027–31.
- [21] MW Deininger und BJ Druker. „Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib“. In: *Pharmacological Reviews* 55 (2003), S. 401–23.
- [22] MW Deininger, E Buchdunger und BJ Druker. „The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leucemia“. In: *Blood* 105 (2005), S. 2640–53.
- [23] DL Deremer, C Ustun und K Natarajan. „Nilotinib A second-generation tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia“. In: *Clinical Therapeutics* 30 (2008), S. 1956–75.

- [24] BJ Druker, CL Sawyers, H Kantarjian, DJ Resta, SF Reese, JM Ford, R Capdeville und M Talpaz. „Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastiv leukemia with the philadelphia chromosome“. In: *New Engleng Journal of Medicine* 344 (2001), S. 1038–42.
- [25] BJ Druker, S Tamura, E Buchdunger, S Ohno, GM Segal, S Fanning, J Zimmerman und NB Lydon. „Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells“. In: *Nature Medicine* 2 (1996), S. 561–6.
- [26] BJ Druker und NB Lydon. „Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia“. In: *The Journal of Clinical Investigation* 105 (2000), S. 3–7.
- [27] J Feng, BA Witthuhn, T Matsuda, F Kohlhuber, IM Kerr und JN Ihle. „Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop“. In: *Molecular Cell Biology* 17 (1997), S. 2497–501.
- [28] W Fiedler, H Serve, H Doehner, M Schwittay, OG Ottmann, AM O Farrell, CL Bello, R Allred, WC Manning, JM Cherrington am SG Louie, W Hong, NM Brega, G Massimini, P Scigalla, WE Berdel und DK Hossfeld. „A Phase 1 study of SU 11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease“. In: *Blood* 105 (2005), S. 986–93.
- [29] Thomas Fischer, Richard M. Stone, Daniel J. DeAngelo, Ilene Galinsky, Elihu Estey, Carlo Lanza, Edward Fox, Gerhard Ehninger, Eric J. Feldman, Gary J. Schiller, Virginia M. Klimek, Stephen D. Nimer, D. Gary Gilliland, Catherine Dutreix, Alice Huntsman-Labed, Jodi Virkus und Francis J. Giles. „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“. In: *Journal of Clinical Oncology* 28 (2010), S. 4339–45.

- [30] C Gambacori-Passerini, R Barni, P LeCoutre, M Zuccetti, G Cabrita, L Cleris, F Rossi, E Gianazza, J Brueggen, R Cozens, P Pioltelli, E Pogliani, G Corneo, F Fornello und M Dincalci. „Role of alpha 1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL (+) leukemic cells to the abl inhibitor STI 571“. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (2000), S. 1641–50.
- [31] J Gotlib, C Berube, JD Gowney, CC Chen, TI George, C Williams, T Kajiguchi, J Ruan, SL Lilleberg, JA Durocher, JH Lichy, Y Wang, PS Cohen, DA Arber, MC Heinrich, L Neckers, SJ Galli, DG Gilliland und SE Coutre. „Activitx if the tyrosine kinase inhibitor PKC 412 in a patient with mast cell leukemia with the D816V KIT mutation“. In: *Blood* 106 (2005), S. 2865–70.
- [32] J Groffen, JR Stephenson, N Heisterkamp, A de Klein, CR Bartram und G Grosveld. „Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22“. In: *Cell* 36 (1984), S. 93–9.
- [33] C Haan, C Rolvering, F Raulf, M Kapp, P Drückes, G Thoma, I Behrmann und HG Zerwes. „Jak1 Has a Dominant Role over Jak3 in Signal Transduction through gc-Containing Cytokine Receptors“. In: *Chemistry and Biology* 18 (2011), S. 314–23.
- [34] F Heidel, F Solem, F Breitenbuecher, D Lipka, S Kasper, M Thiede, C Brandts, H Serve, J Roesel, F Giles, E Feldman, G Ehninger, G Schiller, S Nimer, R M Stone, Y Wand, T Kindler, P Cohen, C Huber und T Fischer. „Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain“. In: *Blood* 107 (2006), S. 293–300.
- [35] N Heisterkamp, G Jenster, J ten Hoeve, D Zovich, PK Pattengale und J Groffen. „Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice“. In: *Nature* 344 (1990), S. 251–3.

- [36] R Heyssel, A Bertrand, L Woodbury, E Nishimura, T Ghose, T Hoshino und M Yamasaki. „Leukemia in Hiroshima Atomic Bomb Survivors“. In: *Blood* 15 (1960), S. 313–31.
- [37] A Hochhaus. „Advances in the treatment of haematological malignancies: optimal sequence of CML treatment“. In: *Annals of Oncology* 18 (2007), S. ix58–63.
- [38] A Hochhaus, SG OBrian, F Guilhot, BJ Druker, S Branford, L Foroni, JM Goldman, MC Mueller, JP Radich, M Rudoltz, M Mone, I Gathmann, TP Hughes und RA Larson. „Six-year follow-up of the patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia“. In: *Leukemia* 23 (2009), S. 1054–61.
- [39] DR Huron, ME Gorre, AJ Kraker, CL Sawyers, N Rosen und MM Moasser. „A Novel Pyridopyrimidine Inhibitor of Abl Kinase Is a Picomolar Inhibitor of Bcr-abl-driven K562 Cells and Is Effective against STI571-resistant Bcr-abl Mutants“. In: *Clinical Cancer Research* 9 (2003), S. 1267–73.
- [40] E Jabbour, HM Kantarjian, G Saglio, JL Steegmann, NP Shah, C Boque, C Chuah, C Pavlovsky, J Mayer, J Cortes, M Baccarani, DW Kim, MB Bradley Garelik, H Mohamed, M Wildgust und A Hochhaus. „Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow up from a randomized phase 3 trial (DASISION)“. In: *Blood* 123 (2014), S. 494–500.
- [41] H Kantarjian, F Giles, L Wunderle, K Bhalla, S OBrian, B Wassmann, C Tanaka, P Manley, P Rae, W Mietlowski, K Bochinski, A Hochhaus, JD Griffin, D Hoelzer, M Albitar, M Dugan, J Cortes, L Alland und OG Ottmann. „Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL“. In: *New England Journal of Medicine* 354 (2006), S. 2542–51.
- [42] K.Eechoute, A. Sparreboom, H. Burger, R. Franke, G. Schiavon, J. Verweij, W. Loos, E. Wiemer und R. Mathijssen. „Drug Transporters

- and Imatinib Treatment: Implications for Clinical Practice“. In: *Clinical Cancer Research* 17 (2010), S. 406–15.
- [43] LM Kelly, Q Liu, JL Kutok, IR Williams, CL Boulton und DG Gilliland. „FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model“. In: *Blood* 99 (2002), S. 310–8.
- [44] A Klejman, SJ Schreiner, M Nieborowska-Skorska, A Slupianek, M Wilson, TE Smithgall und T Skorski. „The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid cells“. In: *The EMBO Journal* 21 (2002), S. 5766–74.
- [45] S Knapper, AK Burnett, T Littlewood, WJ Kell, S Agrawal, R Chopra, R Clark und MJ Levis und D Small. „A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestautinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy“. In: *Blood* 108 (2006), S. 3262–70.
- [46] Alan J Kraker, Brian G. Hartl, Aneesa M. Amar, Mark R. Barvian, H D Hollis Showalter und Charles W. Moore. „Biochemical and Cellular Effects of c-Src Kinase-Selective Pyrido[2,3-d]pyrimidine Tyrosine Kinase Inhibitors“. In: *Biochemical Pharmacology* 60 (2000), S. 885–98.
- [47] R Kurzrock, M Shtalrid, P Romero, WS Kloetzer, M Talpas, JM Trujillo, M Blick, M Beran und JU Gutterman. „A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia“. In: *Nature* 325 (1987), S. 631–5.
- [48] U. K. Laemmli. „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–5.
- [49] RA Larson, A Hochhaus, TP Hughes, RE Clark, G Etienne, DW Kim, IW Flinn, M Kurokawa, B Moiraghi, R Yu, RE Blakesley, NJ Gallagher, G Saglio und HM Kantarjian. „Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up“. In: *Leukemia* 26 (2012), S. 2197–203.

- [50] P LeCoutre, E Tassi, M Varella-Garcia, R Barni, L Mologni, G Cabrita, E Marcheso, R Supino und C Gambacorti-Passerini. „Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification“. In: *Blood* 95 (2000), S. 1758–1766.
- [51] E Lehmann. „Consistency and unbiasedness of certain nonparametric tests“. In: *Annals of mathematical Statistics* 22 (1951), S. 165–179.
- [52] H Leischner, C Albers, R Grundler, E Razumovskaya, K Spiekermann, S Bohlander, L Rönstrand, K Götze, C Peschel und J Duyster. „SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML“. In: *Blood* 119 (2012), S. 4026–33.
- [53] TG Lugo, AM Pendergast, AJ Muller und ON Witte. „Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products“. In: *Science* 247 (1990), S. 1079–82.
- [54] Liang L.Zhou, Yun Zhao, Ashley Ringrose, Donna DeGeer, Erin Kenah, Ann E.J. Lin, Guoqing Sheng, Xiao-Jiang Li, Ali Turhan und Xiaolan Jiang. „AHL-1 interacts with BCR-ABL and modulates BCR-ABL transforming activity and imatinib response of CML stem/progenitor cells“. In: *The Journal of experimental Medicine* 205 (2008), S. 2657–71.
- [55] H. Mann und D. Whitney. „On a Test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other“. In: *Annals of mathematical Statistics* 18 (1947), S. 50–60.
- [56] MJ Mauro. „Defining and managing imatinib resistance“. In: *Hematology American Society Educational Program* (2006), S. 219–25.
- [57] MJ Mauro und BJ Druker. „STI571: Targeting BCR-ABL as Therapy for CML“. In: *The Oncologist* 6 (2001), S. 233–8.
- [58] C Mertens und JE Darnell. „SnapShot: JAK-STAT signaling“. In: *Cell* 131 (2007), S. 612.
- [59] GD Miller, BJ Bruno und CS Lim. „Resistant mutations in CML and Ph(+) ALL- role of ponatinib“. In: *Biologics: Targets and Therapy* 8 (2014), S. 243–54.

- [60] E Morozova, Y Vlasova, M Pryanishnikova, K Lepik und B Afanasyev. „Efficacy of Dasatinib in a CML Patient in Blast Crisis with F317L Mutation: A Case Report and Literature Review“. In: *Biomark Insights* 10 (2015), S. 43–47.
- [61] K Mullis, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn und H Erlich. „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction“. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1986), S. 263–73.
- [62] M Nakao, S Yokota, T Iwai, H Kaneko, S Horiike, K Kashima, Y Sonoda, T Fujimoto und S Misawa. „Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia“. In: *Leukemia* 10 (1996), S. 1911–8.
- [63] PC Nowell und DA Hungerford. „Chromosome studies on normal and leukemic leukocytes“. In: *Journal National Cancer Institute* 25 (1960), S. 85–109.
- [64] T O’Hare, DK Walters, MW Deininger und BJ Druker. „AMN107: Tightening the grip of imatinib“. In: *Cancer Cell* 7 (2005), S. 117–119.
- [65] T O’Hare, DK Walters und EP Stoffregen. „In vitro activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN 107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutations“. In: *Cancer Research* 65 (2005), S. 4500–4505.
- [66] T O’Hare, MW Deininger, CA Eide, T Clackson und BJ Druker. „Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia“. In: *Clinical Cancer Research* 17 (2011), S. 212–21.
- [67] S Okabe, T Tauchi, S Katagiri, Y Tanaka und K Ohyashiki. „Combination of the ABL kinase inhibitor with the Janus kinase 2 inhibitor TG101348 for targeting residual BCR-ABL-positive cells“. In: *Journal of hematology and oncology* 7 (2014), S. 37.

- [68] LA OSullivan, C Liongue, RS Lewis, SEM Stephenson und AC Ward. „Cytokine receptor signaling through the Jak‘StatSocs pathway in disease“. In: *Molecular Immunology* 44 (2007), S. 2497–506.
- [69] L Pedranzini, T Dechow, M Berishaj, R Comenzo, P Zhou, J Azare, W Bornmann und J Bromberg. „Pyridone 6, a pan-Janus-activated kinase inhibitor, induces growth inhibition of multiple myeloma cells“. In: *Cancer Research* 66 (2006), S. 9714–21.
- [70] L Puil, J Liu, G Gish, G Mbamalu, D Bowtell, PG Pelicci, R Arlinghaus und T Pawson. „Bcr-Abl oncoprotein bind directly to activators of the Ras signaling pathway“. In: *EMBO Journal* 13 (1994), S. 764–773.
- [71] R Kurzrock R, HM Kantarjian, BJ Druker und M Talpaz. „Philadelphia Chromosome Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics“. In: *Annals of internal medicine* 138 (2003), S. 819–30.
- [72] R Ramchandren und CA Schiffer. „Dasatinib in the treatment of imatinib refractory chronic myeloid leukemia“. In: *Biologics: Targets and Therapy* 3 (2009), S. 205–14.
- [73] SG Rane und EP Reddy. „Janus kinases. components of multiple signaling pathways“. In: *Oncogene* 19 (2000).
- [74] Jaime Renart, Jakob Reiser und Georg R Stark. „Transfer of proteins from gels to diazobenzylloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (1979), S. 3116–20.
- [75] C Roche-Lestienne, V Soenen-Cornu, N Grardel-Duflos, JL Lai, N Philippe, T Facon, P Feraux und C Preudhomme. „Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI 571, and they can pre-exist to the onset of treatment“. In: *Blood* 100 (2002), S. 1014–8.
- [76] J Rosenbloom, SV Castro und SA Jimenez. „Narrative review: fibrotiv diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies“. In: *Annals of internal medicine* 152 (2010), S. 159–66.

- [77] JD Rowley. „Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining“. In: *Nature* 243 (1973), S. 290–3.
- [78] G Saglio, DW Kin, S Issaragrisil, P leCoutre, G Etienne, C Lobo, R Pasquini, RE Clark, A Hochhaus, TP Hughes, N Gallagher, A Hoene-kopp, M Dong, A Haque, RA Larson und HM Kantarjian. „Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia“. In: *New England Journal of Medicine* 362 (2010), S. 2251–9.
- [79] A Sasaki, H Yasukawa, A Suzuki, S Kamizono, T Syoda, I Kinjyo, M Sasaki, JA Johnston und A Yoshimura. „Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain“. In: *Genes Cells* (1999), S. 339–51.
- [80] CL Sawyers. „Chronic Myeloid Leukemia“. In: *New England Journal of Medicine* 340 (1999), S. 1330–40.
- [81] T Schindler, W Bornmann, P Pellicena, WT Miller, B Clarkson und J Kuriyan. „Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase“. In: *Science* 289 (2000), S. 1938–42.
- [82] T Skorski, A Bellacosa, M Nieborowska-Skorska, M Majewski, R Martinez, JK Choi, R Trotta, P Wlodarski, D Perrotti, TO Chan, MA Wasik, PN Tsichlis und B Calabretta. „Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/AKT dependent pathway“. In: *The EMBO Journal* 16 (1997), S. 6151–6161.
- [83] D Small. „Targeting FLT3 for treatment of leukemia“. In: *Seminars in Hematology* 45 (2008), S. 17–21.
- [84] D Small, M Levenstein, E Kim, C Carow, S Amin, P Rockwell, L Witte, C Burrow, MZ Ratajczak und AM Gewirtz. „STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (1994), S. 459–63.

- [85] BL Stein, F Cervantes, F Giles, CN Harrison und S Verstovsek. „Novel Therapies for Myelofibrosis“. In: *Leukemia and Lymphoma* (2015), S. 1–30.
- [86] M Steinberg. „Dasatinib: A tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia“. In: *Clinical Therapeutics* 29 (2007), S. 2289–308.
- [87] RM Stone, MR ODonnell und MA Sekeres. „Acute Myeloid Leukemia“. In: *Hematology American Society Educational Program* (2004), S. 98–117.
- [88] Student. „The Probable Error of a Mean“. In: *Biometrika* 6 (1908), S. 1–25.
- [89] R Swords, C Freeman und F Giles. „Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia“. In: *Leukemia* 10 (2012), S. 2176–85.
- [90] M Talpaz, NP Shah, H Kantarjian, N Donato, J Nicoll, R Paquette, J Cortes, S O'Brien, C Nicaise, E Bleickardt, MA Blackwood-Chichir, V Iyer, TT Chen, F Huang, AP Decillis und CL Sawyers. „Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias“. In: *New England Journal of Medicine* 354 (2006), S. 2531–41.
- [91] JE Thompson, RM Cubbin, RT Cummings, LS Wicker, R Frankshun, BR Cunningham, PM Cameron, PT Meinke, N Liverton, Y Weng und JA DeMartino. „Photochemical preoatration of a pyridone containing tetracycle: A jak protein kinase inhibitor“. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 12 (2002), S. 1219–1223.
- [92] L Vuitton, S Koch und L Peyrin Biroulet. „Janus kinase inhibition with tofacitinib: Changing the face of inflammatory bowel disease treatment“. In: *Current Drug Targets* 14 (2013), S. 1385–91.

-
- [93] Y Wang, D Cai, C Brendel, C Barrett, P Erben, PW Manley, A Hochhaus, A Neubauer und A Burchert. „Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation“. In: *Blood* 109 (2007), S. 2147–55.
- [94] E Weisberg, C Boulton, LM Kelly, P Manley, D Fabbro, T Meyer, DG Gilliland und JD Griffin. „Inhibition of mutant LLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412“. In: *Cancer Cell* 1 (2002), S. 433–443.
- [95] E Weisberg, PW Manley, SW Cowan-Jacob, A Hochhaus und JD Griffin. „Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia“. In: *Nature Reviews Cancer* 7 (2007), S. 345–56.
- [96] SG Willis, T Lange, S Demehri, S Otto, L Crossman, D Niederwieser, EP Stoffregen, S McWeeney, O Kovacs, B Park, BJ Druker und MW Deininger. „High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy“. In: *Blood* 106 (2005), S. 2128–37.
- [97] S Xie, Y Wang, J Liu, T Sun, MB Wilson, TE Smithgall und R Arlinghaus. „Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation“. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 6188–95.

Abbildungsverzeichnis

1.1	BCR-ABL Signalkaskade (angelehnt an O'Hare u. a. 2011) . . .	3
1.2	Flt3ITD Signalkaskade (angelehnt an Swords u. a. 2012) . . .	5
1.3	Funktionsweise der Tyrosinkinaseinhibitoren am Beispiel der Inhibition von BCR-ABL durch Imatinib (angelehnt an Ro- senbloom u. a. 2010)	6
3.1	Wachstumszeit der STI2 Klone (Zellen aus einem Screen mit Imatinib in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$)	37
3.2	Wachstumszeit der AMN 200 Klone (Zellklone aus einem Screen mit Nilotinib in einer Konzentration von 200nM)	38
3.3	Resistenz der STI2 Klone gegen Imatinib	39
3.4	Resistenz der STI2 Klone gegen Nilotinib	40
3.5	Resistenz der STI2 Klone gegen Dasatinib	41
3.6	Kreuzresistenz der STI2 Klone gegen Imatinib, Nilotinib und Dasatinib	41
3.7	Resistenz der STI4 Klone gegen Imatinib	42
3.8	Resistenz der STI4 Klone gegen Nilotinib	43
3.9	Resistenz der STI4 Klone gegen Dasatinib	43
3.10	Kreuzresistenz der STI4 Klone gegen Imatinib (STI), Nilotinib (AMN) und Dasatinib(BMS)	44
3.11	Resistenz der AMN200 Klone gegen Nilotinib	45
3.12	Resistenz der AMN200 Klone gegen Imatinib	45
3.13	Resistenz der AMN200 Klone gegen Dasatinib	46
3.14	Kreuzresistenz der AMN200 Klone gegen Imatinib (STI), Ni- lotinib (AMN) und Dasatinib (BMS)	47

3.15	Inhibition der BCR-ABL Signaltransduktion der STI4 Klone .	49
3.16	Klon C5 5.5. Mutation A-T	50
3.17	Klon G9 Mutation C-T	51
3.18	Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone A9, B9, C5 und D5 bei Exposition von Nilotinib	52
3.19	Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone D6, E9, E11, G3 bei Exposition von Nilotinib	54
3.20	Phosphorylierungsmuster und Signalkaskade der AMN200 Klone G11 und H10	55
3.21	Inhibition der AMN 200 Klone durch den JAK-Inhibitor-I . .	56
3.22	Phosphorylierungsmuster von BaF mig p185 und E9 bei Inhibition von JAK2	58
3.23	MTT-Assay: Der Effekt des Conditioned media der AMN200 Zellklone G3 und E9 auf das Wachstum der parentale BaF Zellen	61
3.24	Einfluss des Conditioned Media der AMN200 Zellklone E9 und G3 auf das Phosphorylierungsmuster von parenteralen BaF Zellen	62
3.25	Zeitlicher Verlauf des Phosphorylierungsmusters der G3 AMN200-Zelllinie	63
3.26	Zytokin Array BaF mig p185, E9, G3	65
3.27	MTT-Assay: Proliferation der FLT3ITD Zellen bei JAK2 Inhibition	66
3.28	Phosphorylierungsmuster bei JAK2 Inhibition bei den PKC resistenten Zelllinien C7 (JAK2 negativ) und C10 (JAK2 positiv)	67
3.29	Vergleich der Phosphorylierung zwischen FLT3ITD Wildtyp, FLT3ITD691I und C10	69
3.30	Unterschiede in der Phosphorylierung der SRC-Kinasen in den FLT3ITD positiven Zelllinien	71
3.31	Inhibition von JAK2 und HCK und Einfluss auf die gegenseitige Phosphorylierung	72

Tabellenverzeichnis

1.1	Punktmutationen des BCR-ABL und Resistenz gegen Imatinib (angelehnt an Bubnoff u. a. 2003)	11
2.1	Membran des Cytokin Array 3 mit den darauf gespotteten Zytokinen (Abbildung angelehnt an die Firma Raybiochem®, Mouse Cytokine Array C3)	33

Danksagung

Mein herzlichster Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Nikolas von Bubnoff, ihm Verdanke ich dieses interessante Thema. Er stand mir stets zur Seite und hat mich durch viele inspirierende Gespräche dem Ziel näher gebracht. Durch seine Förderung und Ideen konnte diese Arbeit erst entstehen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Duyster für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Durch Ihn und sein Team habe ich viel gelernt und wurde stets motiviert und gefördert.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. C. Peschel für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München durchführen zu dürfen. Vielen Dank an Jana Sänger, für ihre Geduld, die Unterhaltungen und vor allem die freundliche Art mir Ihr Wissen weiterzugeben.

Auch möchte ich hier allen weiteren Mitglieder der AG Duyster danken. Stets konnte ich jedes Mitglied der AG fragen und wurde immer freundlich unterstützt.

Ich danke meinem Vater, meiner Schwester, Dr. Laqua und Dr. Sebastian Schmid für alle Anreize.

Meiner Schwester Dr. Eva Eylert und Sebastian Gutsfeld bin ich ewig dankbar für die Lösung von Computerproblemen und die Korrekturen.

Allen meinen Freunden und Kollegen möchte ich für die jahrelange Unterstützung und Geduld danken.

Ein sehr zwiespaltiges Verhältnis habe ich zu L^AT_EX entwickelt.

Florian Baumann danke ich für die Liebe, Unterstützung und Ablenkung.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter und meinem Vater.