

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik

am Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ch. Peschel)

Onkogene Tyrosinkinasen als molekulare targets: Untersuchungen zur sequenziellen Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz von BCR-ABL und zur Inhibition von NPM-ALK

Robert Christian Bauer

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. N. Chr. C. von Bubnoff
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt
3. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Die Dissertation wurde am 21.02.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.01.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	10
1.1 Mechanismen der malignen Transformation.....	10
1.2 Onkogene Tyrosinkinasen und das Konzept der „targeted therapy“.....	12
1.3 Das BCR-ABL Fusionsprotein.....	16
1.3.1 Chronische myeloische Leukämie und Ph+ akute lymphatische Leukämie	16
1.3.2 Struktur und Funktion des BCR-ABL Fusionsproteins	18
1.3.3 Therapeutische Inhibition von BCR-ABL	21
1.3.4 Inhibitorresistenz.....	24
1.4 Das NPM-ALK Fusionsprotein.....	29
1.4.2 Anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL).....	29
1.4.1 Struktur und molekulare Funktionsweise von NPM-ALK	29
1.4.3 NPM-ALK Inhibition.....	34
1.5 Ziele der Arbeit.....	36
2 Material	37
2.1 Standardgeräte	37
2.2 Chemikalien.....	38
2.3 Standardlösungen.....	39
2.4 Zellkulturmedien und -supplemente.....	42
2.5 Kits, Enzyme, Vektoren und Marker.....	42
2.6 Oligonukleotid-Primer.....	43
2.7 Antikörper.....	43
2.8 Tyrosinkinaseinhibitoren.....	44
2.9 Zelllinien.....	44
3 Methoden.....	45
3.1 Zellkultur	45
3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	45
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	45
3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
3.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	46

3.2	Sequenzielle Screeningstrategie für TKI-Resistenz	47
3.3	Zellproliferationsbestimmung mittels MTS-Assay	48
3.4	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	49
3.4.1	RNA-Isolation	49
3.4.2	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	50
3.4.3	RT-PCR.....	50
3.4.4	Nested-PCR.....	52
3.4.5	Agarosegelelektrophorese	53
3.4.6	DNA-Sequenzierung	54
3.5	Proteinbiochemische Methoden	54
3.5.1	Zelllysate	54
3.5.2	SDS-PAGE.....	55
3.5.3	Western Blot (Immunoblot)	56
4	Ergebnisse	58
4.1	Sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz BCR-ABL positiver Zellen	58
4.1.1	Mutationen der ABL-Kinasedomäne treten unter sequenzieller TKI-Behandlung regelmäßig auf.....	58
4.1.2	Zelluläre Wachstumsmuster korrelieren mit dem BCR-ABL-Mutationstatus inhibitorresistenter Zelllinien	63
4.1.3	Effektivität von Dasatinib gegenüber Nilotinib als Zweit- und Drittlinieninhibitor in vitro.....	70
4.1.4	Die BCR-ABL-Mutationsprofile sind von Art und Reihenfolge der Tyrosinkinaseinhibition abhängig.....	71
4.1.5	BCR-ABL-unabhängige Resistenzmechanismen tragen zur sequenziellen TKI- Resistenz bei.....	76
4.2	Die Substanz 4SC-203 als NPM-ALK Inhibitor	80
4.2.1	Wirkung von 4SC-203 auf NPM-ALK-abhängige Ba/F3 Zellen	80
4.2.2	Wirkung von 4SC-203 auf humane NPM-ALK positive Zelllinien	82
5	Diskussion	85
5.1	Sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitortherapie in vitro und klinisch	85
5.1.1	Mutationsstatus und Wachstumsverhalten	85
5.1.2	Mutationsabhängige sequenzielle Inhibitorresistenz	86
5.1.3	Compound-Mutationen und multiple Mutationen.....	88
5.1.4	Mutationsunabhängige Resistenzmechanismen	90

5.2	Die Verbindung 4SC-203 – ein effektiver NPM-ALK-Inhibitor	92
6	Zusammenfassung.....	93
7	Abbildungsverzeichnis	95
8	Tabellenverzeichnis.....	96
9	Literaturverzeichnis.....	97
10	Anhang	105
11	Publikation	106
12	Danksagung.....	107
13	Lebenslauf.....	108

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha; anti-
Abb.	Abbildung
Abl, ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene
ABR	ATP binding region
AGP	α 1 acid glycoprotein
AP	Accelerated phase (Akzelerationsphase)
AK	Antikörper
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma (Anaplastisch großzelliges Lymphom)
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
A-Loop	Activation loop
AMV	Avian myeloblastosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BC/BK	Blast crisis/Blastenkrise
bp	Basenpaare
Bcr, BCR	Breakpoint cluster region
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
ca.	circa
CCyR	Complete cytogenetic response
Cdk	Cyclin dependant kinase
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisolon
CHR	Complete hematologic response
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	Chronic phase (Chronische Phase)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DLCL	Diffuse large cell lymphoma (Diffus großzelliges Lymphom)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol; Oligo-dT-Primer

ECL	Enhanced chemical luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
F	Farad
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast growth factor
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
for	forward
Fos	FBJ (Finkel, Biskis, Jinkins) murine osteosarcoma viral oncogene homolog
g	Gramm
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
h	Stunde(n)
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration (halbmaximale inhibitorische Konzentration)
IFN- α	Interferon- α
Ig	Immunglobulin
IL-3	Interleukin 3
IP3	Inositoltrisphosphat
IRIS	International Randomized study of Interferon and STI571
JAK	Janus kinase
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
kit	(Abkürzung für „kitten“)
LDLa	Low-density lipoprotein class A
μ g	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μ l	Mikroliter (10^{-6} Liter)
μ M	mikromolar (10^{-6} Mol/L)
mM	millimolar (10^{-3} Mol/L)
MAM	Mepirin, A5 protein and receptor protein tyrosine phosphatase mu
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCyR	Major cytogenetic response
MDR	Multidrug resistance
Mig	MSCV-IRES-GFP (murine stem cell virus – internal ribosome entry site – green fluorescent protein)
min	Minute(n)
MK	Midkine
MMR	Major molecular response
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)

MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
Myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
Myb	Myeloblastosis viral oncogene homolog
n	Probenzahl
n.a.	nicht anwendbar
NES	Nuclear export signal
ng	Nanogramm (10^{-9} Gramm)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NIPA	Nuclear interaction partner of ALK
NLS	Nuclear localization signal
nM	nanomolar (10^{-9} Mol/L)
NPM	Nucleophosmin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Kochsalzlösung mit Phosphatpuffer)
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PCyR	Partial cytogenetic response
PDGF(R)(A)	Platelet-derived growth factor (receptor) (alpha)
Pfu	Pyrococcus furiosus
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
P-Loop	Phosphate binding loop
PTN	Pleiotrophin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pwo	Pyrococcus woesei
Ras	Rat sarcoma
RB1	Retinoblastoma 1
Ref.	Referenz
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SBR	Substrate binding region
SCF	Skp, Cullin, F-box
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGI	Second generation inhibitor (Inhibitor der zweiten Generation)
SH	Src homology

Src, SRC	Sarcoma
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Temperatur
TAE	Tris base/acetic acid/EDTA (Tris/Eisessig/EDTA)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP53	Tumor protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U	Units (Einheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
WBC	White blood cell
Wt/WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der malignen Transformation

Nach wie vor sind die malignen Erkrankungen nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Im Jahr 2008 erkrankten in Deutschland 469.800 Menschen an Krebs, für das Jahr 2012 werden 486.200 Neuerkrankungen erwartet (Kaatsch, Spix et al. 2012). Krebs entsteht unter dem Einfluss bekannter Risikofaktoren, zu denen beispielsweise das Rauchen, mutagene chemische Verbindungen, ionisierende und ultraviolette Strahlen, virale und bakterielle Infektionen, bestimmte Ernährungsfaktoren und genetische Faktoren im Sinne einer genetischen Prädisposition gehören (Böcker, Kleihues et al. 2004). Häufig entsteht Krebs aber auch ohne erkennbare äußere Ursachen. Krebs ist stets als eine genetische Erkrankung zu betrachten, bei der es durch den schädigenden Einfluss von Risikofaktoren oder spontan zu einer Veränderung im Erbgut einer Zelle kommt, die dazu führt, dass die Zelle nicht mehr der normalen Wachstumsregulation unterliegt. Die Folge ist eine autonome neoplastische Proliferation der Zelle. Eine derartige maligne Transformation von Zellen erfordert oft mehrere genetische Veränderungen in einer Zelle, abhängig von der Art der malignen Erkrankung kann aber auch ein einziges Ereignis ausreichend sein.

Die betroffenen Gene können unter pathogenetischen Gesichtspunkten in verschiedene Systeme eingeordnet werden. Die beiden wichtigsten an der Kanzerogenese beteiligten Gensysteme sind die Onkogene und die Tumorsuppressorgene (Hanahan, Weinberg 2000; Cooper, Hausman 2007). Tumorsuppressorgene, wie z.B. RB1, TP53 oder BRCA1, können ihre tumorsupprimierende Funktion, etwa Apoptoseinduktion oder DNA-Reparatur, durch loss of function-Mutationen verlieren, so dass Krebs entsteht. Im Unterschied dazu können Protoonkogene, die in der normalen Zelle häufig wichtige Wachstumsregulationsaufgaben erfüllen, durch gain of function-Mutationen konstitutiv aktiviert werden. Aktivierungsmechanismen sind beispielsweise Genamplifikation, chromosomale Translokationen, Punktmutationen oder die Überexpression von Genen. Die aktivierten Onkogene, bzw. deren Genprodukte, die Onkoproteine, bewirken eine Stimulation und Enthemmung des Zellwachstums und führen dadurch zur Krebsentstehung. Protoonkogene kodieren beispielsweise für Wachstumsfak-

toren (z.B. PDGF, FGF), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. EGFR, Her-2/neu), intrazelluläre Signaltransduktoren (z.B. Ras, Src, Abl), nukleäre Transkriptionsfaktoren (z.B. Myc, Fos, Myb) und Zellzyklusregulatoren (z.B. Zyklone, Cdks) (Böcker, Kleihues et al. 2004).

Die onkogenen Fusionsproteine BCR-ABL und NPM-ALK, die in dieser Arbeit untersucht werden, gehen zurück auf die Protoonkogene ABL1, eine zytoplasmatische und nukleäre Tyrosinkinase bzw. ALK, eine Rezeptortyrosinkinase. Die Heterogenität der malignen Erkrankungen, die auf molekularer Ebene besonders deutlich wird, erfordert eine genaue molekularbiologische Charakterisierung der einzelnen Entitäten und eine Anpassung der Therapie an diese Erkenntnisse im Sinne einer Individualisierung der Tumorthherapie.

1.2 Onkogene Tyrosinkinasen und das Konzept der „targeted therapy“

Viele Onkogene gehören zur Gruppe der Proteinkinasen. Allgemein stellen diese ein wesentliches Element der zellulären Signaltransduktion dar. Durch reversible Phosphorylierung von Proteinen verändern sie deren Aktivität und Bindungseigenschaften und beeinflussen dadurch den Informationsfluss in der Zelle. Nach ihrer Substratspezifität unterscheidet man zwischen Serin-/Threoninkinasen und Tyrosinkinasen, es gibt aber auch Proteinkinasen mit dualer Spezifität. Die Proteinphosphorylierung erfolgt durch Übertragung der γ -Phosphorylgruppe eines ATP-Moleküls auf einen Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest des zu phosphorylierenden Proteins. Durch Phosphatasen kann die Phosphorylgruppe wieder abgespalten und die Proteinphosphorylierung beendet werden. Viele Proteinkinasen weisen konstante Struktur motive auf, wie zum Beispiel die ATP-Bindungsstelle, den P-Loop (phosphate binding loop) und den A-Loop (activation loop) (Blume-Jensen, Hunter 2001; Berg, Tymoczko et al. 2002).

Bei den Tyrosinkinasen werden grundsätzlich Rezeptortyrosinkinasen und Nicht-Rezeptortyrosinkinasen unterschieden. Rezeptortyrosinkinasen sind Membranproteine mit einer extrazellulären Rezeptordomäne, einer Transmembranhelix und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Sie dienen als Zelloberflächenrezeptoren und unterscheiden sich in der ligandenspezifischen Aminosäuresequenz der Rezeptordomäne (Abbildung 1). In der Regel sind Rezeptortyrosinkinasen enzymatisch inaktiv, solange sie als Monomer vorliegen. Nach Bindung des Liganden an die Rezeptordomäne kommt es zur Dimerisierung von zwei Rezeptortyrosinkinasen und dadurch zur Aktivierung der Kinasedomänen. Es erfolgt eine Autophosphorylierung bzw. gegenseitige Phosphorylierung der Kinasedomänen. Proteine der intrazellulären Signaltransduktionskaskaden können mit ihren SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste der intrazellulären Domäne der Rezeptortyrosinkinasen binden. Je nach Ligand und Rezeptortyrosinkinase kommen unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden in Gang, die dann beispielsweise Prozesse des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung steuern. Im Gegensatz zu den Rezeptortyrosinkinasen handelt es sich bei den Nicht-Rezeptortyrosinkinasen um im Zytoplasma vorliegende Tyrosinkinasen (z.B. SRC, ABL, JAK; Abbildung 2), die ebenfalls durch Dimerisierung und Autophosphorylierung aktiviert werden und häufig Bestandteile intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden sind (Blume-Jensen, Hunter 2001; Lemmon, Schlessinger 2010).

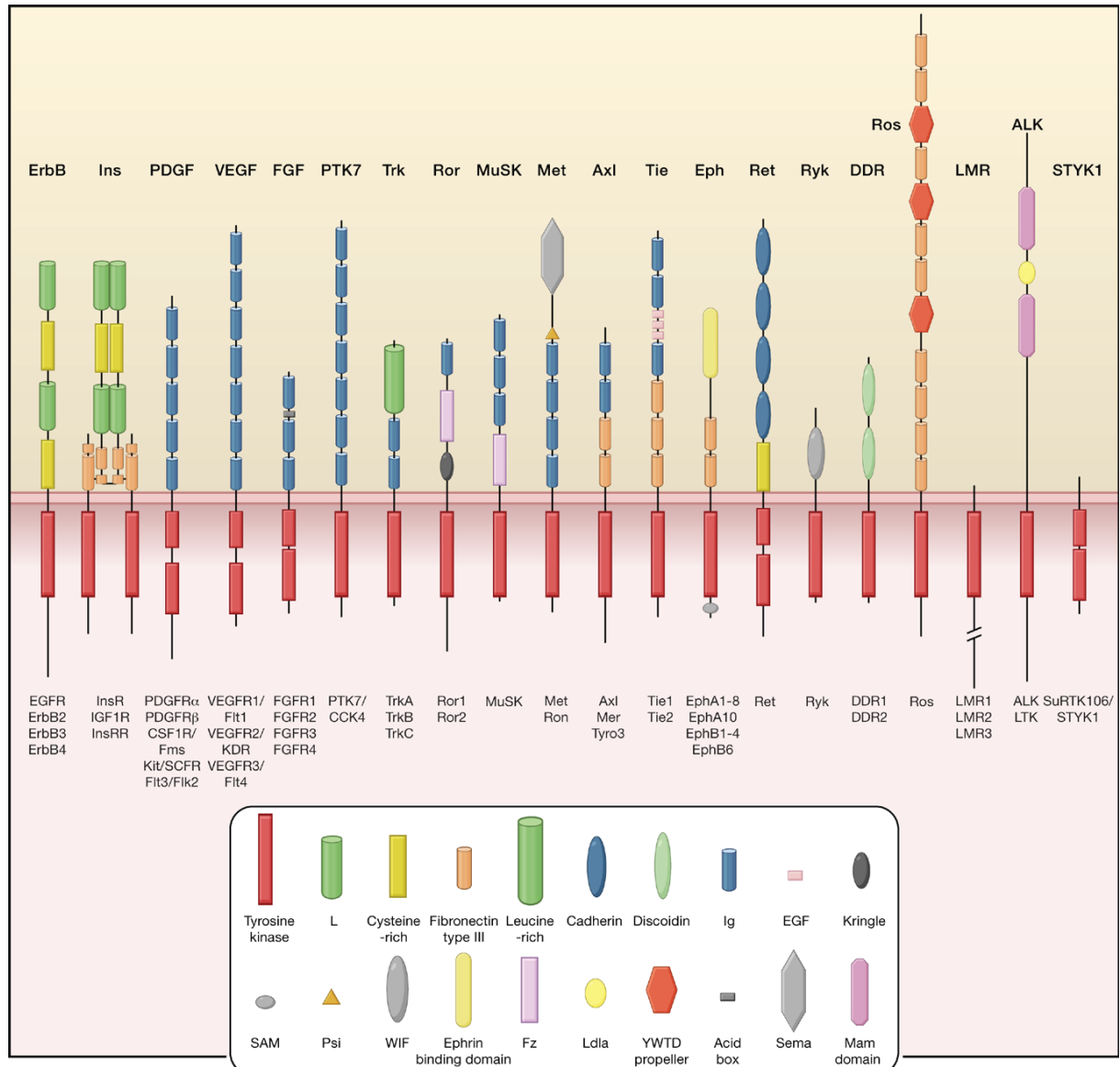


Abbildung 1: Rezeptortyrosinkinasen. Schematische Darstellung der 20 bekannten Rezeptortyrosinkinasenfamilien mit extrazellulären (oben) und intrazellulären (unten) Domänen, darunter sind die Mitglieder der einzelnen Familien angegeben. Die Domänen sind in der Legende benannt, z.B. bezeichnen rote Rechtecke die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. ALK ist an zweiter Stelle von rechts zu sehen (Lemmon, Schlessinger 2010).

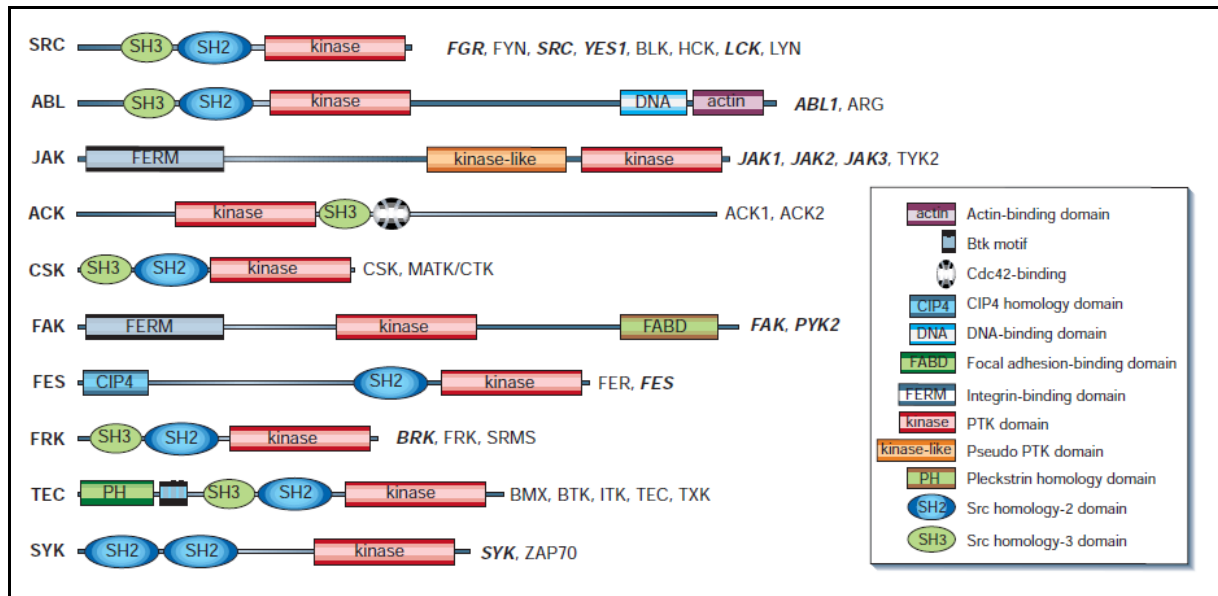


Abbildung 2: Zytosolische Tyrosinkinasen. Abgebildet ist eine Übersicht über die humanen Nicht-Rezeptortyrosinkinasen. Links sind die Proteinfamilien und rechts einzelne Vertreter dieser Familien angegeben. Proteinkinasen, die bei malignen Erkrankungen eine Rolle spielen, sind durch Kursivschrift markiert (Blume-Jensen, Hunter 2001).

Die konstitutive, d.h. reizunabhängige Aktivierung einer Tyrosinkinase kann eine permanente Aktivierung der zugehörigen Signaltransduktionskaskade mit unkontrolliertem Zellwachstum verursachen. So führen die konstitutive Aktivierung der ABL-Kinase durch eine t(9;22) Translokation zur chronischen myeloischen Leukämie (CML), die Aktivierung von ALK durch eine t(2;5) Translokation zum anaplastisch-großzelligen Lymphom und die Aktivierung von c-Kit oder PDGFRA durch Mutationen zum gastrointestinalen Stromatumor (GIST). Somit ist die molekulare Ursache dieser Erkrankungen bekannt und die identifizierten Tyrosinkinasen können als Zielstrukturen für eine „targeted therapy“, also eine zielgerichtete Therapie, dienen. Als Wirkprinzip kommt dabei in erster Linie eine Inhibition der onkogenen Tyrosinkinasen durch niedermolekulare Verbindungen in Frage. Bei der klassischen Chemotherapie erfolgt eine Reduktion der sich schnell teilenden Krebszellen durch unspezifisch zytotoxische Substanzen, gleichzeitig werden aber auch normale Körperzellen in Mitleidenschaft gezogen. Im Gegensatz dazu ist die targeted therapy tumorzellspezifisch und damit im Idealfall sehr effektiv und gleichzeitig nebenwirkungsarm, da normale Körperzellen weitgehend verschont bleiben. Der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren hat sich im Lauf des vergangenen Jahrzehnts als eine sehr vielversprechende Form der targeted therapy erwiesen (Arora, Scholar 2005).

Die reversible oder irreversible Bindung eines Inhibitor-moleküls an eine onkogene Tyrosinkinase verhindert die Bindung von ATP und blockiert so die Kinaseaktivität der Tyrosinkinase. Die abnorme Aktivierung der betreffenden Signaltransduktionskaskade wird so verhindert und das Wachstum der malignen Zellen wird gebremst. In der Regel ist dazu die dauerhafte Verabreichung des Inhibitors erforderlich. Voraussetzungen für die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren sind Membrangängigkeit, die bei unpolaren niedermolekularen Inhibitoren gegeben ist, und hohe Bindungsaffinität, um eine ausreichende Inhibition in Gegenwart der hohen intrazellulären ATP-Konzentration zu gewährleisten. Eine hohe Spezifität des Inhibitors für die Tyrosinkinase, gegen die er gerichtet ist, ist wünschenswert, um Nebenwirkungen gering zu halten, andererseits können auch eher unspezifische Pan-Tyrosinkinaseinhibitoren gute Ergebnisse erzielen, indem sie an mehreren Stellen eingreifen. Ein wesentliches Problem der Tyrosinkinaseinhibitortherapie ist die Entstehung von Resistenzen, ein Prozess, der an die Entstehung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien erinnert. Durch unterschiedliche Mechanismen, z.B. Punktmutationen in der ATP-Bindungsdomäne, welche die Bindung des Inhibitors verhindern, die ATP-Bindung aber weiterhin zulassen, bilden sich inhibitorresistente Zellen, die in ihrem Wachstum durch den betreffenden Tyrosinkinaseinhibitor nicht mehr gehemmt werden. Verschiedene Ansätze, um das Problem der Resistenzentwicklung zu umgehen, sind derzeit Gegenstand klinischer und experimenteller Forschung (Alberts, Johnson et al. 2008).

1.3 Das BCR-ABL Fusionsprotein

1.3.1 Chronische myeloische Leukämie und Ph⁺ akute lymphatische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne klonale Störung der hämatopoetischen Stammzelle, die zu einer neoplastischen Proliferation myeloischer Zellen und damit zu einer starken Erhöhung der Leukozytenzahl im peripheren Blut führt (Sawyers 1999). Sie wurde erstmals durch die Pathologen Bennet, Craigie und Virchow unabhängig voneinander im Jahre 1845 beschrieben (Wong, Witte 2004). Die CML tritt mit einer Inzidenz von 1 bis 2 pro 100.000 Einwohner pro Jahr auf und ist für etwa 15% der Leukämien im Erwachsenenalter verantwortlich (Faderl, Talpaz et al. 1999). Das durchschnittliche Alter bei Auftreten der Erkrankung liegt bei ca. 53 Jahren. Typische klinische Symptome bei Erstdiagnose sind Müdigkeit, Gewichtsverlust und Splenomegalie oder Hepatomegalie, 40% der Betroffenen sind jedoch asymptomatisch. Das Blutbild ist charakterisiert durch eine Erhöhung der Leukozytenzahl auf mehr als 25.000/mm³, Basophilie, reduzierte Aktivität der leukozytären alkalischen Phosphatase und das Auftreten von Granulozyten in allen Differenzierungsstadien. In 30 bis 50% der Fälle wird eine erhöhte Thrombozytenzahl beobachtet. Im Knochenmark treten vermehrt Megakaryozyten, ein erhöhtes Verhältnis von myeloischen zu erythroiden Zellen und reduzierter Fettgehalt bei gleichzeitiger Hyperzellularität auf. Der Anteil von Blasten und Promyelozyten an der Gesamtzellzahl unterschreitet 10%. Die CML verläuft in drei Phasen: Auf die chronische Phase (CP) folgt innerhalb von drei bis fünf Jahren die Blastenkrise (BC), der häufig eine Akzelerationsphase (AP) vorausgeht (Sawyers 1999). Die Blastenkrise wird definiert durch das Auftreten von mindestens 20% leukämischer Zellen im peripheren Blut oder Knochenmark oder durch das Vorhandensein extramedullärer Infiltrationen durch Blasten (von Bubnoff, Duyster 2010).

Die Diagnose der CML basiert in der Regel auf der Detektion des sog. Philadelphia-Chromosoms, welches 1960 durch Nowell und Hungerford entdeckt wurde (Nowell, Hungerford 1960; Wong, Witte 2004). Es handelt sich hierbei um ein verkürztes Chromosom 22, welches durch eine t(9;22)(q34;q11)-Translokation entsteht (Abbildung 3). Diese genetische Besonderheit kann bei 95% der Patienten festgestellt werden und tritt in Zellen von myeloischer, erythroider, megakaryozytischer und B-lymphoider Abstammung auf, was als Hin-

weis auf eine Stammzellerkrankung gewertet wird. Die Translokation führt zu einer Fusion des *ABL*-Gens, das beim Gesunden auf Chromosom 9 liegt, mit dem *BCR*-Gen auf Chromosom 22, so dass auf dem entstehenden verkürzten Chromosom 22 (dem Philadelphia-Chromosom) ein *BCR-ABL*-Fusionsgen gebildet wird. Das zugehörige BCR-ABL-Fusionsprotein ist konstitutiv aktiv und gilt als molekularer Auslöser der CML (Sawyers 1999). Das Philadelphia-Chromosom kann nicht nur bei der CML, sondern auch bei etwa 20-30% der Erwachsenen und etwa 2-3% der Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) nachgewiesen werden, wobei die Inzidenz der ALL bei ca. 1,5/100.000 pro Jahr liegt (Fielding 2010). Man spricht dann von Philadelphia-Chromosom positiver akuter lymphatischer Leukämie (Ph⁺ ALL).

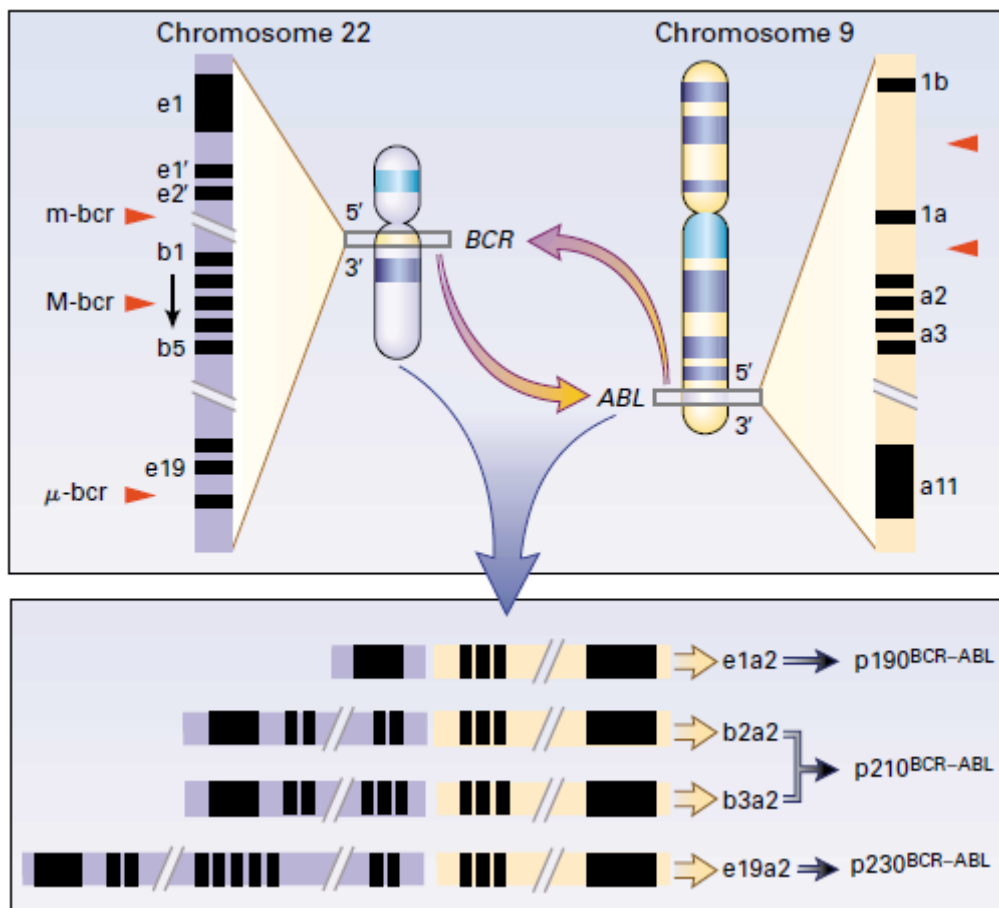


Abbildung 3: Durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) entstehen *BCR-ABL*-Fusionsgene. Je nach Lokalisation des DNA-Bruchs (m-bcr: minor breakpoint cluster region; M-bcr: major breakpoint cluster region; μ-bcr: alternative breakpoint cluster region) werden BCR-ABL-Fusionsproteine unterschiedlicher Länge (p190, p210, p230) von den entsprechenden Fusionsgenen exprimiert (unterer Teil der Abbildung). Diese Proteine unterscheiden sich ausschließlich im BCR-Anteil, der ABL-Anteil besteht konstant aus den Exons a2-a11. Bei Patienten mit CML tritt in der Regel das p210^{BCR-ABL}, bei Patienten mit B-ALL das p190^{BCR-ABL} auf (Faderl, Talpaz et al. 1999; Wong, Witte 2004).

1.3.2 Struktur und Funktion des BCR-ABL Fusionsproteins

Das zelluläre Protein c-Abl wurde als Homolog des leukämieinduzierenden Proteins im *Abelson murine leukemia virus* identifiziert (Wong, Witte 2004). Das humane Protoonkogen *ABL1* ist ca. 174 kb lang und besteht aus 12 Exons. Die Transkription erfolgt in eine etwa 5400 bp lange mRNA, welche in zwei Spleißvarianten vorliegt. Die resultierenden Proteinformen ABL1a und ABL1b unterscheiden sich ausschließlich in der N-terminalen Aminosäuresequenz:

- ABL1a: 1-MLEICLKLVGCKSKKGLSSSSSCYLE-26
- ABL1b: 1-MGQQPGKVLGDQRRPSLPALHFIKGAGKKESSRHGGPHCNVFVEH-45
(Glycin-2 ist myristoyliert)

ABL1a wurde als die kanonische Form des Proteins festgelegt, auf welche sich alle folgenden Erläuterungen und Nummerierungen beziehen, sofern nicht anders angegeben. Die Länge des Proteins beträgt 1130 Aminosäuren, die Masse 123 kDa (NCBI 2011a; UniProtKB 2011a).

C-Abl besteht aus 5 großen Domänen, die für die Funktion und Regulation des Proteins eine entscheidende Rolle spielen: SH3-, SH2-, Kinase-, DNA-Bindungs- und Aktinbindungsdomäne (Abbildung 4). Die hydrophoben Aminosäurereste der N-terminalen Cap-Struktur sowie der in Spleißform 1b vorhandene Myristoylrest halten c-Abl in einer eng gepackten inaktiven Konformation (Harrison 2003). Drei Kernimportsequenzen und eine Kernexportsequenz ermöglichen es dem Protein, seine intrazelluläre Lokalisation signalabhängig zu verändern (di Bari, Ciuffini et al. 2006).

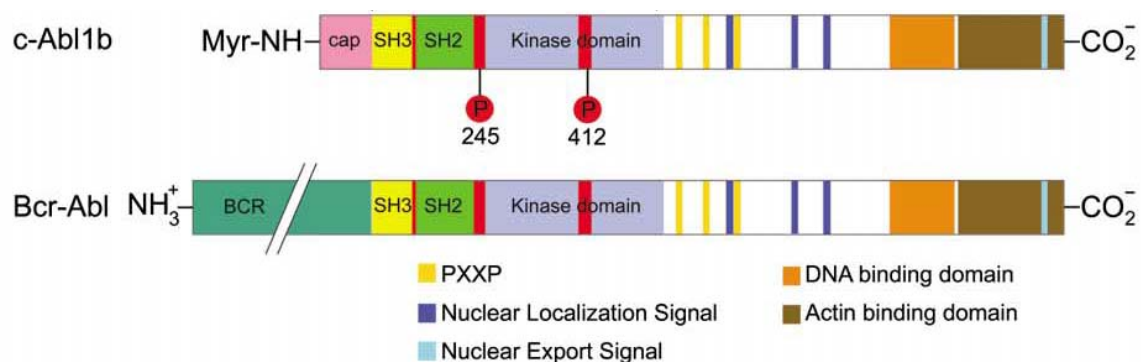


Abbildung 4: Schematische Darstellung von c-Abl 1b und BCR-ABL. Die Kinasedomäne hat eine zweilappige Struktur (N-lobe und C-lobe) mit zentralem Activation Loop (Aminosäuren 381-402).

Phosphorylierung an Tyr-245 verstärkt die katalytische Aktivität. PXXP: Prolinreiche Sequenzmotive (Nagar, Hantschel et al. 2003).

Die Aktivierung des nativen c-Abl-Proteins erfolgt in drei Schritten: Unlatching, Unclamping und Switching (Abbildung 5). Beim Unlatching verlässt die N-terminale Cap-Struktur die hydrophobe Tasche der Kinasedomäne. Das Unclamping, also das Auflösen der dichten Packung der SH3- und SH2-Domäne gegen die Kinasedomäne, erfolgt dosisabhängig durch erhöhte lokale Konzentrationen von prolinreichen und phosphotyrosinreichen Peptiden (Wong, Witte 2004). Im letzten Schritt (Switching) verändert der Activation Loop der Kinasedomäne seine Konformation von einem geschlossenen und spezifischen Zustand zu einem offenen und bei vielen Src-Kinasen strukturell konservierten Zustand. Nach Phosphorylierung an Tyrosin-412 (Isoform ABL 1a: Tyr-393) liegt c-Abl in seiner vollständig aktiven Form vor (Schindler, Bornmann et al. 2000; Nagar, Bornmann et al. 2002).

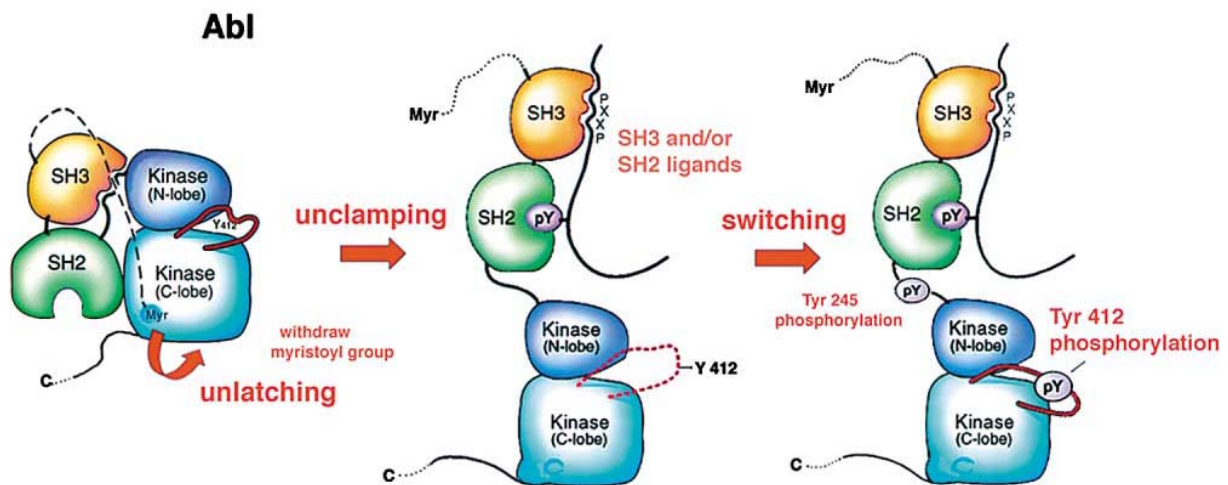


Abbildung 5: Aktivierung von c-Abl 1b. Die inaktive Form des Proteins ist dicht gepackt (links). Unlatching und Unclamping führen zu einer Öffnung der Struktur (Mitte) bis mit dem finalen Switch des Activation Loops und der Phosphorylierung an Tyr-412 die Aktivierung abgeschlossen ist (Harrison 2003).

Im gesunden zellulären Kontext unterliegt die Aktivität von c-Abl einer genauen und komplizierten Regulation. Die Bildung des Fusionsproteins BCR-ABL durch die t(9;22)-Translokation führt dagegen zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase. Die Mechanismen dieser Aktivierung sind vielfältig, z.B. fehlen dem Fusionsprotein der N-terminale

Myristoylrest und ein Teil des hydrophoben Caps, was zu einer Verhinderung des latching und damit zu einer Auflockerung der Gesamtstruktur führen könnte. Des Weiteren wird bei BCR-ABL eine Oligomerisierung beobachtet, wohingegen c-Abl als Monomer vorliegt. Die experimentelle Deletion der Oligomerisationsmotive in BCR-ABL setzt das onkogene Transformationspotential des Proteins stark herab. Die Fusion von ABL mit Oligomerisationsmotiven anderer Proteine führt ebenfalls zur malignen Transformation von Zellen, was auf eine große Bedeutung der Oligomerisierung für die konstitutive Kinaseaktivierung schließen lässt. Des Weiteren scheinen Regionen des BCR-Proteins (A box, B box) mit der SH2-Domäne von ABL zu interagieren und dadurch das Clamping zu behindern (Wong, Witte 2004).

Die Expression von BCR-ABL hat Auswirkungen auf eine Reihe von Signaltransduktionswegen und beeinflusst unter anderem Apoptose, Hämatopoese und die Struktur des Zytoskeletts (Abbildung 6). So werden z.B. die antiapoptotische Kinase PI3K oder das mitogene ERK1/2 aktiviert. Eine besondere Bedeutung scheint dem Ras-Pathway zuzukommen, da dessen Inaktivierung zu einer starken Verminderung des onkogenen Potentials von BCR-ABL führt (Faderl, Talpaz et al. 1999; Wong, Witte 2004).

BCR-ABL und hat daher eine sehr hohe Selektivität, denn die Konformation des geschlossenen Activation Loops in ABL unterscheidet sich stark von anderen Src-Kinasen. Imatinib bindet in der Furche zwischen N-lobe und C-lobe der Kinase-Domäne (Abbildung 7). Ein Teil des Moleküls blockiert hierbei die Proteinregionen, die ATP binden können (Nagar, Bornmann et al. 2002). Imatinib tritt mit ABL über verschiedene molekulare Mechanismen in Wechselwirkung: Thr-315 bildet eine Wasserstoffbrücke mit einer sekundären Aminogruppe des Inhibitors. Tyr-253, Leu-370, Phe-317, Met-290, Leu-248 und andere hydrophobe Aminosäuren stabilisieren die Position der aromatischen Ringe durch Van-der-Waals-Kräfte (Schindler, Bornmann et al. 2000).

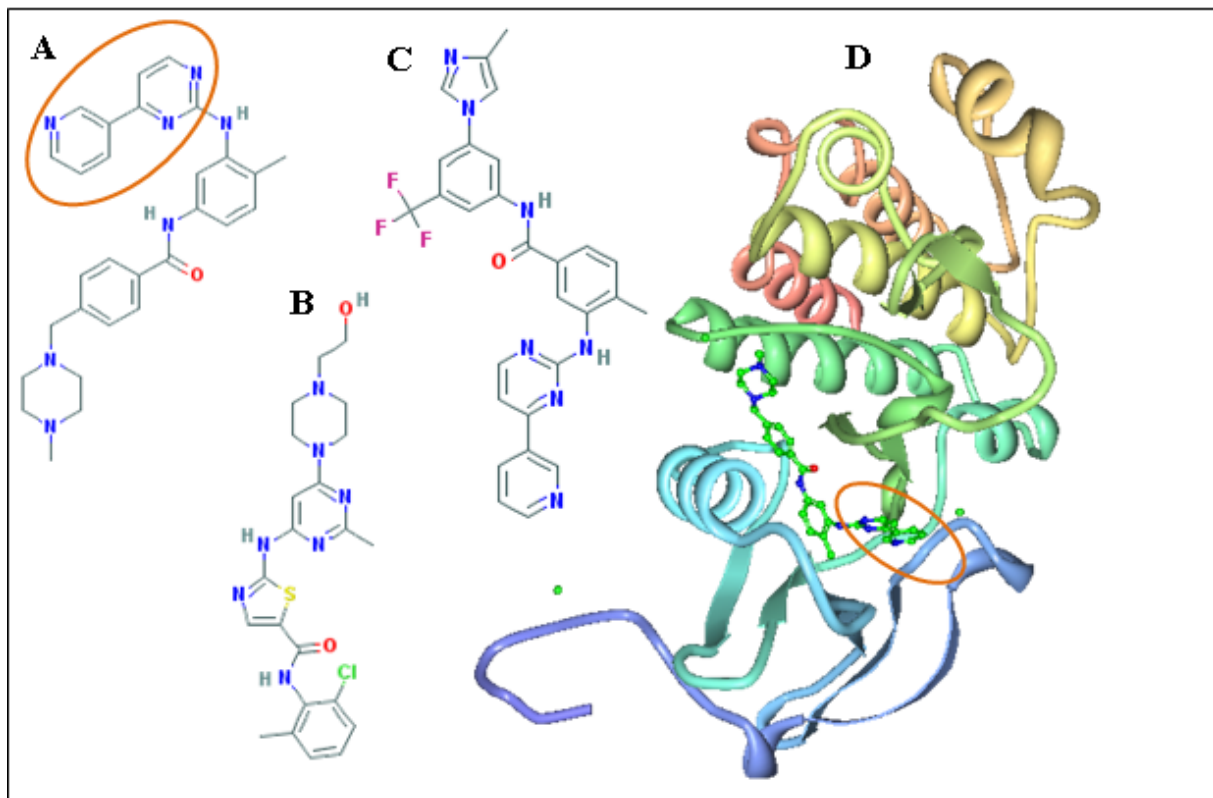


Abbildung 7: BCR-ABL-Inhibitoren. **A**, Imatinib: Der Inhibitor gehört zur Klasse der 2-Phenylaminopyrimidine. Der Pyridin- und der Pyrimidinring (oranges Oval) binden an die Stelle in der ABL-Kinase, an die normalerweise der Adeninring des ATP andockt. **B**, Dasatinib **C**, Nilotinib **D**, Imatinib lagert sich tief in die Furche zwischen N-lobe (überwiegend β -Faltblätter, unterer Teil der Darstellung) und C-lobe (α -helical, oberer Teil der Darstellung) der Kinasedomäne von ABL (Schindler, Bornmann et al. 2000; Nagar, Bornmann et al. 2002; PDB 2002; NCBI 2005b; NCBI 2005a; NCBI 2005c).

Die Wirksamkeit von Imatinib wurde in der IRIS-Studie (International Randomized Study of Interferon and STI571; 2000-2006) eingehend untersucht. Der Inhibitor zeigte sich der bisherigen Standardtherapie (Interferon- α + Cytarabin) klar überlegen. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist gegenüber der Gabe von IFN- α + Cytarabin deutlich erhöht (81-89% vs. 68-70%) (Druker, Guilhot et al. 2006; Pavlovsky, Kantarjian et al. 2009). Nach 60 Monaten zeigten 98% der Patienten ein vollständiges hämatologisches Ansprechen (complete hematological response, CHR) und 87% ein vollständiges zytogenetisches Ansprechen (complete cytogenetic response, CCyR) ohne Voranschreiten der CML zu Akzelerations- oder Blastenphase (Abbildung 8). Da die IRIS-Studie als offene Studie angelegt wurde und 65% der Patienten mit IFN- α + Cytarabin als Initialtherapie in die Imatinibgruppe wechselten, gibt es für die Gabe von IFN- α + Cytarabin keine vergleichbaren Daten. Die Hauptgründe für den Wechsel der Studiengruppe war Intoleranz gegenüber der Therapie oder das Ausbleiben einer CHR oder MCyR (Druker, Guilhot et al. 2006).

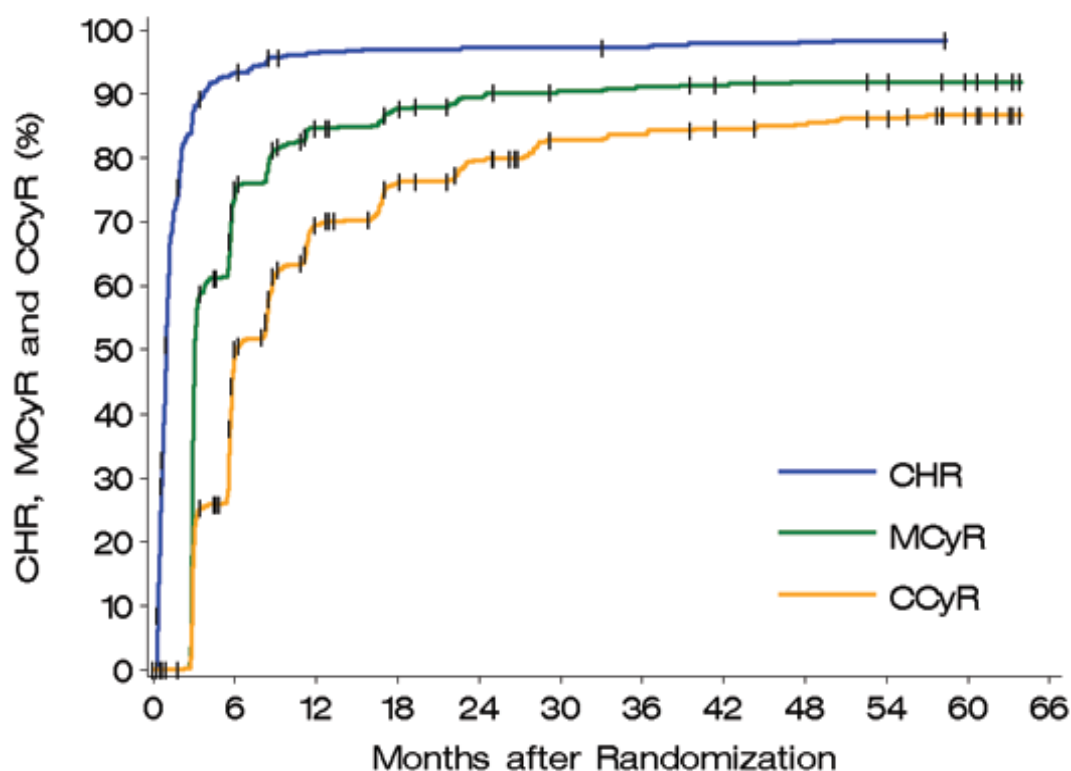


Abbildung 8: Imatinib als Initialtherapie bei Patienten mit Chronische-Phase CML (IRIS-Studie). CHR, Complete hematologic response: Leukozyten < 10 G/L, Thrombozyten < 450 G/L, keine Granulozytenvorläufer im Differentialblutbild, < 5% Basophile; PCyR, Partial cytogenetic response: 1-35% Ph+ Metaphasen in mindestens 20 Knochenmarkszellen; CCyR, complete cytogenetic response: 0% Ph+ Zellen; MCyR: major cytogenetic response: PCyR+CCyR (Druker, Guilhot et al. 2006; von Bubnoff, Duyster 2010).

Aufgrund dieser Ergebnisse ist Imatinib heute die Therapie der Wahl, wenn der Patient nicht für eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommt. Die Standarddosis liegt bei 400 mg pro Tag, bei Patienten in der Akzelerationsphase (AP) oder Blastenkrise (BK) bei 600 mg/Tag (Pavlovsky, Kantarjian et al. 2009). Letztere zeigen jedoch deutlich erniedrigte Überlebensraten: 53% nach 4 Jahren bei AP und 11% nach 3 Jahren bei BK (von Bubnoff, Duyster 2010). Zusätzlich zu Imatinib (Gleevec®, Novartis) gibt es zwei weitere klinisch zugelassene Tyrosinkinaseinhibitoren zur CML-Therapie (Abbildung 7): Dasatinib (Sprycel®, Bristol-Myers Squibb) und Nilotinib (Tasigna®, Novartis).

1.3.4 Inhibitorresistenz

Trotz der unbestreitbaren Erfolge der Imatinibtherapie spricht ein signifikanter Anteil an Patienten nicht ausreichend an. In der IRIS-Studie erreichten 13% keine MCyR und 24% keine CCyR nach einem Follow-up von 19 Monaten (Pavlovsky, Kantarjian et al. 2009). Der wichtigste Grund für ein Ausbleiben des Therapieerfolgs oder einen Rückfall ist das Vorhandensein von BCR-ABL-Mutanten; es wurde aber auch eine Hochregulation der BCR-ABL-mRNA oder die Expression von MDR-1 (multidrug resistance gene), das den Eintritt des Wirkstoffs in die Zelle verhindert, beobachtet (Wong, Witte 2004). Des Weiteren scheint auch eine erhöhte Plasmakonzentration von AGP (α 1 acid glycoprotein) die intrazelluläre Verfügbarkeit von Imatinib zu senken (von Bubnoff, Peschel et al. 2003). Eine Übersicht über die verschiedenen Resistenzmechanismen zeigt Abbildung 9.

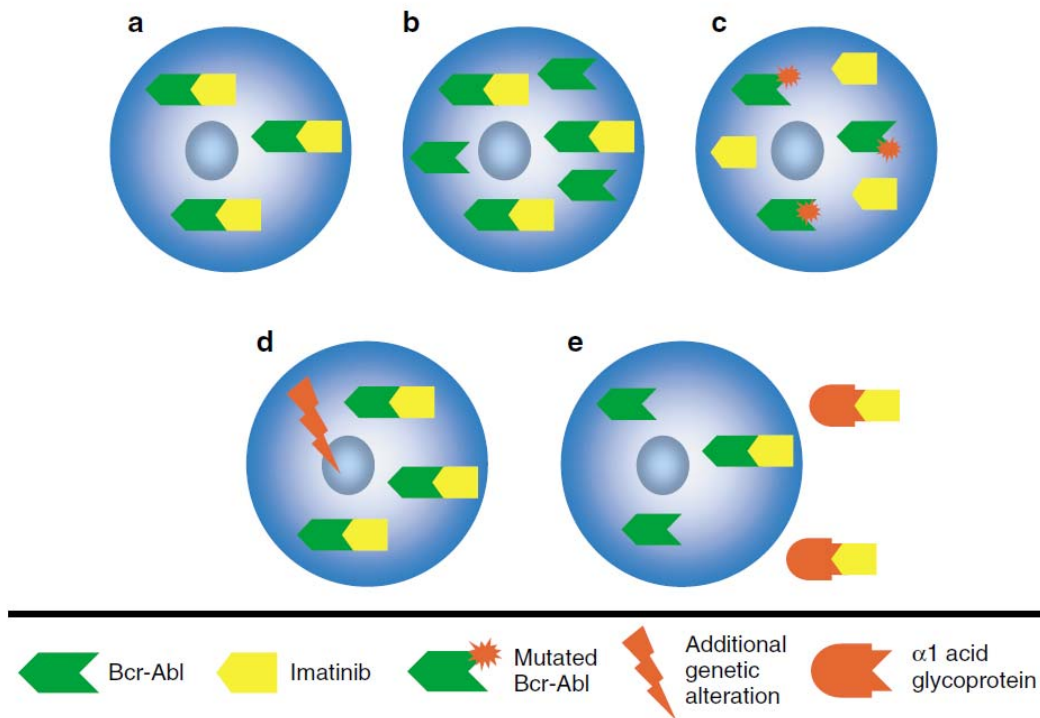


Abbildung 9: Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Imatinib. **a,** Die Imatinib-Konzentration reicht aus, um alle in der Zelle vorhandenen BCR-ABL Moleküle zu binden, die Therapie ist wirksam. **b,** Eine Überexpression von BCR-ABL führt zu zahlreichen freien Onkoproteinen, die katalytisch aktiv sind. **c,** Eine Mutation in BCR-ABL verhindert die Bindung des Inhibitors. **d,** Andere genetische Veränderungen fördern die Proliferation der Tumorzelle unabhängig von BCR-ABL. **e,** Die Sekretion von AGP verhindert den Eintritt des Inhibitors in die Zelle (von Bubnoff, Peschel et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit Punktmutationen in *BCR-ABL*, die zur Entwicklung von Inhibitorresistenz führen. Derartige Mutationen wurden in Blut- und Knochenmarkspalten von Patienten mit Philadelphia Chromosom-positiven Leukämien identifiziert, die auf eine Imatinibtherapie nicht mehr ansprechen (Gorre, Mohammed et al. 2001; von Bubnoff, Schneller et al. 2002). Durch einen Basenaustausch in der *BCR-ABL*-DNA kommt es dabei zu einem Aminosäureaustausch im translatierten BCR-ABL-Protein, der durch sterische oder allosterische Mechanismen dazu führt, dass der jeweilige Inhibitor nicht mehr an BCR-ABL binden kann und das Fusionsprotein aktiv bleibt. Bisher sind über 90 verschiedene Imatinib-resistente Mutationen an über 55 Aminosäuren der Kinasedomäne bekannt (Apperley 2007; Pavlovsky, Kantarjian et al. 2009).

In einer australischen Studie traten bei 27 von 144 Patienten unter Imatinibtherapie Mutationen in der Kinasedomäne von BCR-ABL auf. Bei Patienten in der Akzelerationsphase waren 87% (13 von 15) der Imatinibresistenzen mit Mutationen assoziiert, bei Patienten in später chronischer Phase 85% (11 von 13). Mutationen im P-Loop (ATP-phosphate binding loop) der Kinasedomäne, z.B. Gly250Glu, Gln252His, Tyr253Phe oder Glu255Val, waren dabei mit einer besonders schlechten Prognose verbunden (Branford, Rudzki et al. 2003).

Ebenfalls klinisch relevant sind Mutationen im Activation Loop (A-Loop), z.B. Val379Ile, Leu387Met oder His396Arg (Wong, Witte 2004). Eine wichtige, häufig auftretende Mutation ist auch die Substitution des Threonins 315 durch Isoleucin (Thr315Ile bzw. T315I), die durch Gorre et al. 2001 erstbeschrieben wurde (Gorre, Mohammed et al. 2001). Die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr-315 und Imatinib wird dadurch verhindert und die Bindungsaffinität des Inhibitors zum Protein wird stark herabgesetzt. Bei anderen auftretenden Mutationen wird eine Veränderung der Konformation von BCR-ABL vermutet, die die Bindung von Imatinib verhindert (z.B. Met351Thr, Glu355Gly) (von Bubnoff, Peschel et al. 2003). Den auftretenden Punktmutationen ist gemein, dass sie zwar die Affinität des Proteins zum Inhibitor herabsetzen, die ATP-Bindung jedoch weiterhin zulassen, so dass die mutierten Kinasen weiterhin katalytisch aktiv sind.

Um dem Problem der Resistenzentwicklung entgegenzutreten, wurden neue BCR-ABL-Inhibitoren wie Dasatinib und Nilotinib entwickelt (second generation-Tyrosinkinaseinhibitoren). Diese unterscheiden sich in der Art und Weise, wie sie an die Kinase-Domäne von BCR-ABL binden (Abbildung 10), weshalb die jeweiligen Punktmutationen auch unterschiedlich auf sie ansprechen. So kann z.B. Dasatinib Proteine mit P-Loop-Mutationen weiterhin inhibieren (Tokarski, Newitt et al. 2006; Weisberg, Manley et al. 2007).

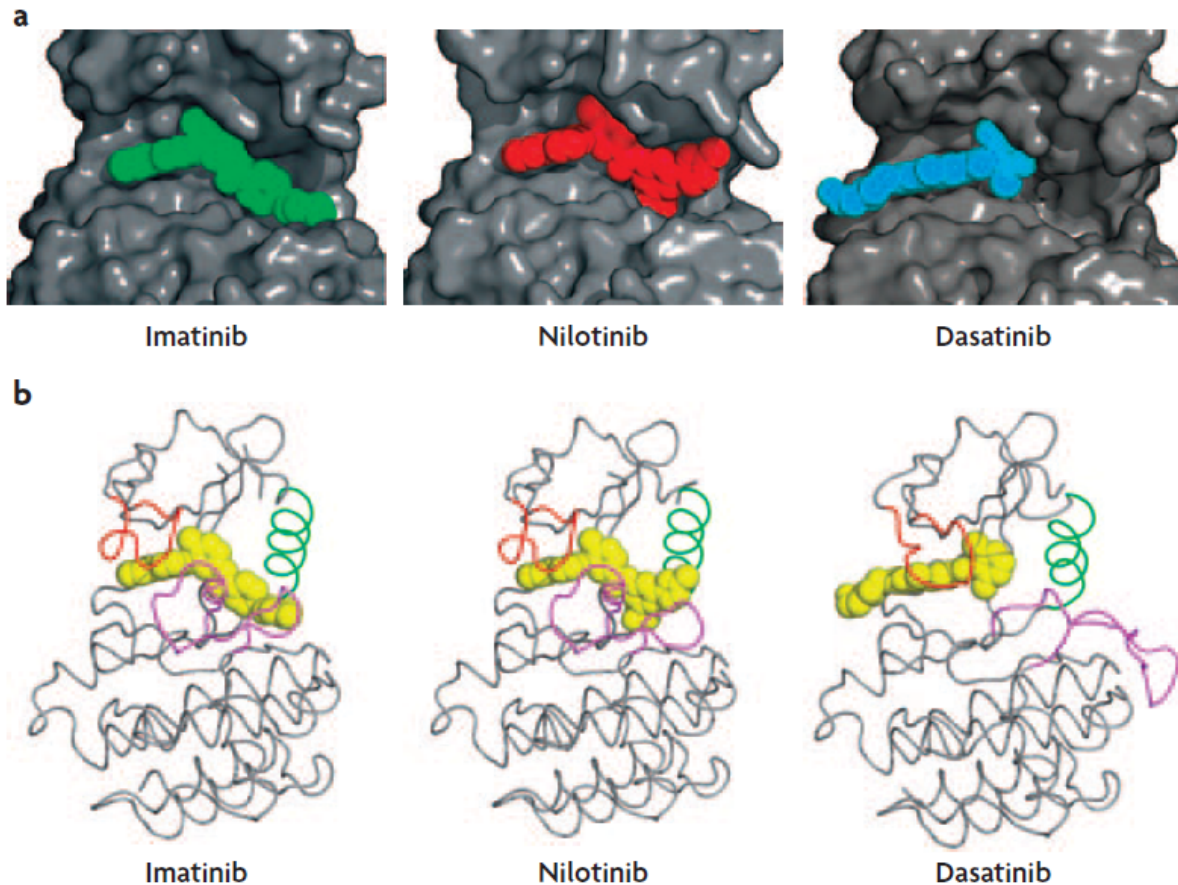


Abbildung 10: Inhibition von BCR-ABL durch die Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib. **a**, Oberflächendarstellung. A-loop und P-loop werden nicht gezeigt. Während Imatinib und Nilotinib fast die gesamte Furche zwischen C- und N-lobe überspannen, dringt Dasatinib nur etwa bis zur Hälfte ein. **b**, Backbonedarstellung. P-loop (rot), A-loop (magenta) und C-Helix (grün) unterscheiden sich in ihrer Konformation je nach Art des bindenden Inhibitors. Besonders auffällig ist die offene (=aktive) Konformation des A-loop bei Dasatinib-Bindung (Weisberg, Manley et al. 2007).

Dasatinib und Nilotinib erwiesen sich als effektive Substanzen zur Therapie der CML bei klinischer Imatinibresistenz. Sie zeigten sich auch bei Patienten mit Mutationen der BCR-ABL Kinase aktiv, wobei allerdings die T315I-Mutation eine wichtige Ausnahme bildet (Kantarjian, Giles et al. 2006; Talpaz, Shah et al. 2006). Als Erstlinientherapie bei CML in der chronischen Phase schneiden beide Substanzen im Vergleich zu Imatinib im Hinblick auf die Ansprechensraten bei einem follow-up von 24 Monaten vorteilhaft ab (Kantarjian, Hochhaus et al. 2011; Kantarjian, Shah et al. 2011). In vitro-Studien ließen auf ein eingegrenztes, aber teilweise überlappendes Spektrum von Resistenzmutationen der neuen Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib gegenüber Imatinib schließen (Burgess, Skaggs et al. 2005; Bradeen, Eide et al. 2006; von Bubnoff, Manley et al. 2006; O'Hare, Eide et al. 2007; Redaelli, Piazza

et al. 2009). Klinische Studien zeigten, dass diese in vitro identifizierten Mutationen, nämlich Q252H, E255K/V, V299L, F317L und T315I für Dasatinib sowie Y253H/F, E255K/V, F311I, T315I und F359C/V für Nilotinib, zum einen mit eher ungünstigen klinischen Ansprechensraten verbunden waren, und zum anderen oft zu dem Zeitpunkt auftraten, als es zu einem Fortschreiten der Erkrankung unter Zweitlinientherapie kam, so dass die in vitro-Daten durch klinische Daten reproduziert und validiert wurden (Cortes, Jabbour et al. 2007; Hughes, Saglio et al. 2009; Muller, Cortes et al. 2009).

Dasatinib und Nilotinib werden aktuell als Zweit- und Drittlinientherapie bei CML-Patienten mit Resistenz oder Unverträglichkeit gegenüber Imatinib verwendet. Deshalb werden viele Patienten mit einer Sequenz von drei oder mehr Abl-Kinaseinhibitoren behandelt. In der vorliegenden Arbeit soll unter anderem der klinische Ansatz der sequenziellen Inhibitortherapie unter Verwendung eines zellbasierten Screeningmodells in vitro abgebildet und analysiert werden.

1.4 Das NPM-ALK Fusionsprotein

1.4.2 Anaplastisch großzelliges Lymphom (ALCL)

Neben ABL gibt es zahlreiche andere Tyrosinkinasen, die bei der Entstehung von Krebserkrankungen eine Rolle spielen. Eine davon ist die membranständige Rezeptortyrosinkinase ALK (Anaplastic lymphoma kinase), die beim anaplastisch großzelligem Lymphom als zytoplasmatisches Fusionsprotein mit Nucleophosmin (NPM) vorliegt. Das ALCL (anaplastic large cell lymphoma, anaplastisch großzelliges Lymphom) gehört zu den aggressiven Non-Hodgkin Lymphomen und weist in der Regel T-Zell-Marker auf. Es ist durch die Expression des CD30/Ki-1 Antigens charakterisiert (Falini, Pileri et al. 1999; Stein, Foss et al. 2000). Das Fusionsprotein NPM-ALK, das durch eine Chromosomentranslokation $t(2;5)(p23;q35)$ entsteht, liegt in ca. 40-60% der Fälle des anaplastisch großzelligen Lymphoms vor (Amin, Lai 2007). Patienten, bei denen ein ALCL diagnostiziert wurde, erhalten heute eine Standardchemotherapie (z.B. nach dem CHOP-Schema), wobei die Prognose stark vom ALCL-Subtyp abhängig ist. Der ALK-positive Typ spricht mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 70% gut auf eine Chemotherapie an, während der ALK-negative Typ mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 40% eine schlechtere Prognose hat (Gascoyne, Aoun et al. 1999; Savage, Harris et al. 2008).

1.4.1 Struktur und molekulare Funktionsweise von NPM-ALK

Das Fusionsprotein NPM-ALK wurde 1994 erstmals beschrieben. Es entsteht als Genprodukt eines *NPM-ALK*-Fusionsgens, welches durch eine $t(2;5)(p23;q35)$ -Translokation zustande kommt, die zur Fusion von *ALK*-Sequenzen auf Chromosom 2 an *NPM*-Sequenzen auf Chromosom 5 führt (Morris, Kirstein et al. 1994).

Das humane *ALK*-Gen auf Chromosom 2 ist ca. 730 kb lang und besteht aus 29 Exons (NCBI 2011b). Es kodiert für ein 1620 Aminosäuren großes Protein, das an der extrazellulären Domäne mehrfach N-glykosyliert ist und somit eine Masse von 200 kDa hat. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus zwei MAM-Domänen, die eine LDLa-Domäne einschließen, und einer

membrannahen glycinreichen Domäne zusammen (Palmer, Vernersson et al. 2009; UniProtKB 2011b). Die Transmembrandomäne besteht aus einer hydrophoben Helix, gefolgt von basischen Aminosäuren, was typisch für den Übergang zwischen Membran und Zytoplasma ist. Die intrazelluläre Domäne wird von der Kinase-Domäne, die ein YxxxYY-Motiv enthält, und einem ungewöhnlich langen C-terminalen Rest gebildet, welcher mit Downstream-Proteinen interagieren kann (Abbildung 11) (Morris, Naeve et al. 1997; Palmer, Vernersson et al. 2009).

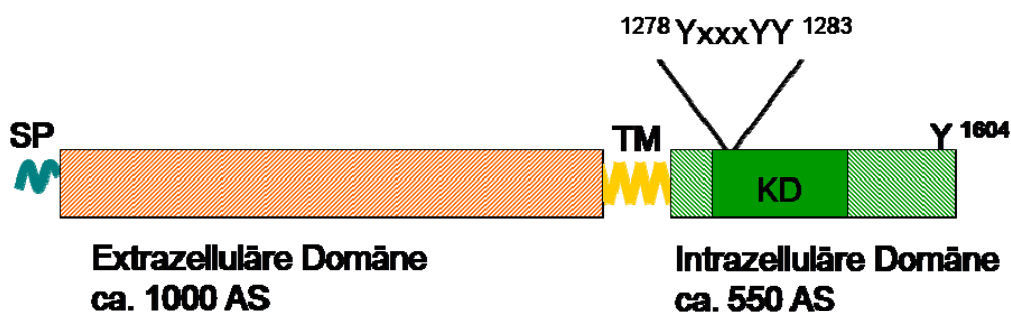


Abbildung 11: Schematische Darstellung des humanen ALK-Proteins. SP: Signalpeptid (26 AS); TM: Transmembrandomäne (28 AS); KD: Katalytische Domäne (254 AS). Gesamtlänge des Proteins: 1620 Aminosäuren (Morris, Naeve et al. 1997; Palmer, Vernersson et al. 2009).

ALK wird in Mäusen ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert, jedoch nicht in Basalganglien, Cerebellum und Cortex. Bei neugeborenen und adulten Mäusen ist die Expression im Gehirn hauptsächlich auf die thalamische Region beschränkt (Morris, Naeve et al. 1997). Während der Embryogenese beobachtet man hohe Konzentrationen von ALK-mRNA im Nervensystem, die ebenso wie die Proteinkonzentration nach der Geburt abnehmen (Iwahara, Fujimoto et al. 1997; Palmer, Vernersson et al. 2009). Diese Daten lassen auf eine Rolle von ALK bei der Entwicklung und Funktion des Nervensystems schließen. In Säugetieren wurden die Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren Pleiotrophin (PTN) und Midkin (MK) als aktivierende Liganden von ALK identifiziert (Abbildung 12). Über verschiedene Signaltransduktionswege werden Zellproliferation und -differenzierung stimuliert und Apoptose verhindert (Palmer, Vernersson et al. 2009).

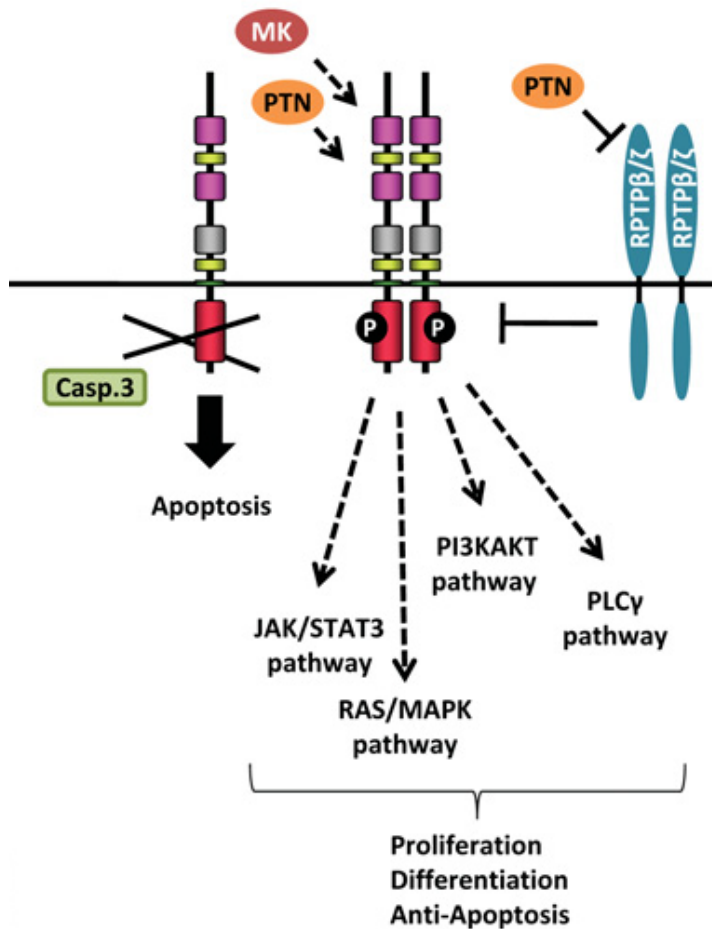


Abbildung 12: Signaltransduktion über ALK. Die Bindung der Liganden Pleiotrophin (PTN) oder Midkin (MK) an ALK führt zur Dimerisierung der Rezeptortyrosinkinase und zur Autophosphorylierung. Die Aktivierung von Downstreamproteinen verschiedener Signaltransduktionswege wirkt anti-apoptotisch und proliferationsfördernd. In inaktivem Zustand wird ALK von Caspase 3 geschnitten, was Apoptose induziert (links im Bild) (Palmer, Vernersson et al. 2009).

ALK wurde als konstitutiv aktiviertes Fusionsprotein bei verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen (Tabelle 1). Es hat den Anschein, dass Transkription und Lokalisation des Fusionsproteins dabei vom jeweiligen Fusionspartner und nicht von ALK abhängig sind, und dass die konstitutive Aktivierung über Oligomerisierung des Fusionsproteins und anschließende Autophosphorylierung von ALK erfolgt. Darüber hinaus sind auch tumorinduzierende gain-of-function-Mutationen von ALK bekannt, z.B. beim Neuroblastom (Duyster, Bai et al. 2001; George, Sanda et al. 2008; Palmer, Vernersson et al. 2009).

Disease	Fusion protein	Chromosomal abnormality
ALCL	NPM-ALK	t(2;5)(p23;q35)
ALCL	ALO17-ALK	t(2;17)(p23;q25)
ALCL	TFG-ALK	t(2;3)(p23;q21)
ALCL	MSN-ALK	t(2;X)(p23;q11-12)
ALCL	TPM3-ALK	t(1;2)(q25;p23)
ALCL	TPM4-ALK	t(2;19)(p23;p13)
ALCL	ATIC-ALK	inv(2)(p23;q35)
ALCL	MYH9-ALK	t(2;22)(p23;q11.2)
ALCL	CLTC-ALK	t(2;17)(p23;q23)
IMT	TPM4-ALK	t(2;19)(p23;p13)
IMT	TPM3-ALK	t(1;2)(q25;p23)
IMT	CLTC-ALK	t(2;17)(p23;q23)
IMT	ATIC-ALK	inv(2)(p23;q35)
IMT	SEC31L1-ALK	t(2;4)(p23;q21)
IMT	RANBP2-ALK	t(2;2)(p23;q13) inv(2)(p23;q11-13)
IMT	CARS-ALK	t(2;11;2)(p23;p15;q31)
NSCLC	EML4-ALK	inv(2)(p21;p23)
NSCLC	TFG-ALK	t(2;3)(p23;q21)
DLBCL	NPM-ALK	t(2;5)(p23;q35)
DLBCL	CLTC-ALK	t(2;17)(p23;q23)
SCC	TPM4-ALK	t(2;19)(p23;p13)

Tabelle 1: ALK-Fusionsproteine bei verschiedenen Krebserkrankungen. ALCL: Anaplastic large cell lymphoma; IMT: Inflammatory myofibroblastic tumours; NSCLC: Non-small cell lung cancer; DLBCL: Diffuse large B-cell lymphomas; SCC: Squamous cell carcinoma (Palmer, Vernersson et al. 2009).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit dem Fusionsprotein NPM-ALK, welches in ca. 50% der Fälle des anaplastisch-großzelligen Lymphoms vorliegt (Amin, Lai 2007). NPM (Nucleophosmin), das Genprodukt des *NPM*-Gens auf Chromosom 5, ist ein Chaperon, das unter anderem die Faltung von Histonen und damit die Chromatinstruktur beeinflusst. Außerdem ist es am Transport von prä-ribosomalen Untereinheiten und an der Verdopplung des Zentrosoms beteiligt. NPM trägt zwei Kernexportsequenzen (NES, nuclear export signal) und eine Kernlokalisationssequenz (NLS, nuclear localization signal) und kann somit zwischen Nukleus und Zytoplasma shutteln (Okuwaki 2008).

Das *NPM-ALK*-Fusionsgen entsteht durch eine t(2;5)(p23;q35)-Translokation. Das resultierende Fusionsprotein NPM-ALK hat ein Molekulargewicht von 80 kDa und besteht aus den 117 N-terminalen Aminosäuren von NPM und den C-terminalen Aminosäuren 1058-1620 von ALK (Duyster, Bai et al. 2001; Huret 2001). Der ALK-Anteil entspricht somit der gesamten intrazellulären Domäne von ALK. Der NPM-Anteil enthält eine Oligomerisierungsdomäne und beide NES-Motive. In der Zelle ist das Fusionsprotein sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert, obwohl es kein NLS-Motiv trägt. Diese Tatsache lässt sich mit einer Heterooligomerisierung von zellulärem NPM mit NPM-ALK erklären (Duyster, Bai et al. 2001).

NPM-ALK interagiert mit einer Reihe onkogener Moleküle und aktiviert verschiedene Signaltransduktionskaskaden (vgl. Abbildung 12). So konnte z.B. eine direkte Bindung an und Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung in den Nukleus transloziert und dort an der Regulation von Apoptose, Zellzyklus und Zellwachstum beteiligt ist. Diese aktivierende Phosphorylierung erfolgt normalerweise durch Januskinasen (JAKs), welche indirekt ebenfalls durch NPM-ALK stimuliert werden können, da NPM-ALK-positive Zellen autokrin Interleukin-9, einen Upstream-Induktor des JAK/STAT-Signalwegs, freisetzen. Ein dritter Mechanismus der Aktivierung von STAT3 durch NPM-ALK ist die Herunterregulation von Shp1 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1), welches Januskinasen durch Dephosphorylierung inaktivieren kann (Amin, Lai 2007).

Phospholipase C- γ (PLC- γ) ist ein weiterer Interaktionspartner von NPM-ALK, der mit hoher Affinität über eine SH2-Domäne an das Fusionsprotein bindet. Die Bildung des Komplexes erfolgt über Tyrosin664 (entspricht Tyr1604 im zellulären ALK). Zelllinien, die eine Mutation (Y664F) dieser Aminosäure tragen, können nicht mehr IL-3-unabhängig wachsen, was dafür spricht, dass der PLC- γ -Signalweg eine wichtige Rolle für die onkogene Wirkung von NPM-ALK spielt. Die Aktivierung von PLC- γ führt zur Bildung von DAG und IP3 und letztendlich zur Stimulation der Zellteilung (Bai, Dieter et al. 1998).

Ein anderer wichtiger Signaltransduktionsweg, der durch NPM-ALK aktiviert wird, ist der PI 3-Kinase-Pathway. NPM-ALK interagiert mit der C-terminalen SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI 3-Kinase und führt zu einer Aktivierung von Akt. Dieses Protein wiederum wirkt antiapoptotisch. Die spezifische Inhibition der PI 3-Kinase verlangsamt das Zellwachstum von NPM-ALK-positiven Zelllinien und induziert Apoptose (Bai, Ouyang et al. 2000).

Als ein weiterer Interaktionspartner von NPM-ALK wurde NIPA (nuclear interaction partner of ALK) identifiziert, ein 60 kDa-Protein mit antiapoptotischen Eigenschaften in NPM-ALK-vermittelten Signalkaskaden. Es handelt sich um ein humanes F-box-enhaltendes Protein, das eine E3 Ligase vom SCF-Typ definiert, welche den Mitoseeintritt kontrolliert (Ouyang, Bai et al. 2003; Bassermann, von Klitzing et al. 2005).

1.4.3 NPM-ALK Inhibition

NPM-ALK ist ein vielversprechendes molekulares Ziel für die pharmakologische Intervention bei ALK-positivem ALCL. Niedermolekulare Kinaseinhibitoren zeigten gute Ergebnisse in Zellkultur und Mausmodell. Der Inhibitor PF-2341066 z.B. hemmt Zellproliferation und induziert Apoptose in ALK-positiven ALCL-Zellen, aber nicht in ALK-negativen Lymphomzellen. Er zeigt eine Selektivität für ALK und c-Met gegenüber 120 anderen Kinasen. In immundefizienten Mäusen mit ALCL-Xenografts erreicht PF-2341066 eine vollständige Tumorrückbildung innerhalb von 15 Tagen bei einer Konzentration von 100 mg/kg/d (Christensen, Zou et al. 2007). Der Inhibitor NVP-TAE684 (Abbildung 13) kann ebenfalls das Wachstum ALK-abhängiger Zelllinien inhibieren. Er führt zu einer massiven Dephosphorylierung von NPM-ALK und Downstream-Proteinen und schließlich zur Apoptoseinduktion (Galkin, Melnick et al. 2007).

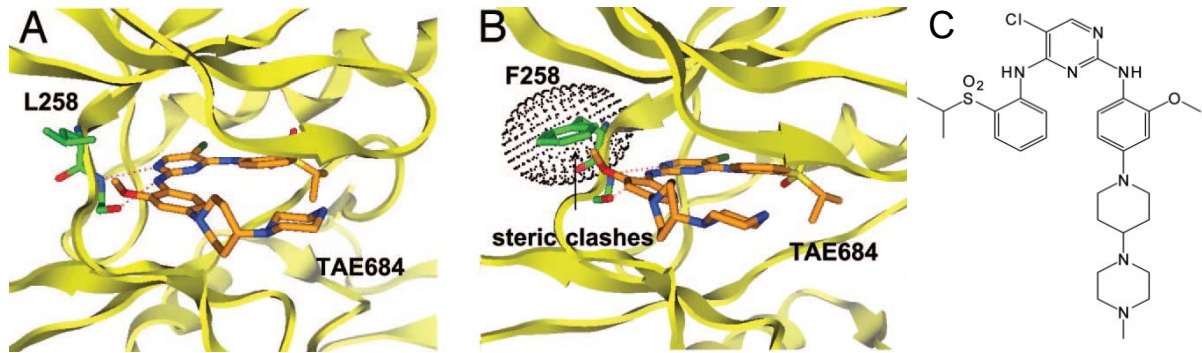


Abbildung 13: NVP-TAE684. **A,** Modell der ALK-Inhibition durch NVP-TAE684. Der Inhibitor ist im Komplex mit ALK gezeigt, er fügt sich in die ATP-Bindungsstelle ein und bildet Wasserstoffbrückenbindungen zur Kinase „hinge“-Region von ALK aus. **B,** Der Aminosäurerest L258 ist für die ALK-Selektivität von NVP-TAE684 von Bedeutung. Substitution von L258 durch Phenylalanin (F258) führt zu einem Zusammenstoß der hinge-Region mit dem Inhibitor und erschwert dessen Bindung. **C,** Strukturformel von NVP-TAE684 (Galkin, Melnick et al. 2007).

1.5 Ziele der Arbeit

Dasatinib und Nilotinib werden als Zweit- und Drittlinientherapie bei CML-Patienten mit Imatinibresistenz oder –unverträglichkeit angewandt. Daher werden viele Patienten mit einer Sequenz von drei oder mehr Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt. Im ersten Teil der Arbeit soll eine sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitortherapie (Erst-, Zweit- und Drittlinientherapie) mit Imatinib, Dasatinib und Nilotinib mit Hilfe eines dreistufigen Zellkulturmodells *in vitro* abgebildet werden. Dabei sollen BCR-ABL positive Ba/F3 Zellen als Modellorganismen verwendet und Reihenfolge und Konzentration der jeweiligen Inhibitoren variiert werden. Anschließend soll in resistenten Zelllinien die BCR-ABL-Kinasedomäne sequenziert und auf Mutationen hin überprüft werden. Folgende Fragestellungen sollen als Ausgangspunkte dienen:

- Lässt sich im Zellkulturmodell eine sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitortherapie abbilden, d.h. entstehen sequenziell resistente Zelllinien?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen sequenzieller Tyrosinkinaseinhibitorresistenz und Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne?
- Welche Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne treten auf und inwiefern ist ihr Auftreten von Art, Konzentration und Reihenfolge der Tyrosinkinaseinhibitoren abhängig?

Im zweiten Teil der Arbeit soll der neu entwickelte Tyrosinkinaseinhibitor 4SC-203 auf seine Wirksamkeit hinsichtlich der Inhibition der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK untersucht werden. Dabei werden sowohl mit NPM-ALK transfizierte murine Ba/F3 Zellen als auch primäre humane Zelllinien im Hinblick auf Proliferation und Kinaseaktivität unter dem Einfluss von zunehmenden Konzentrationen von 4SC-203 getestet. Folgende Aspekte sollen untersucht werden:

- Hemmt 4SC-203 die Autophosphorylierung und damit die Kinaseaktivität von NPM-ALK *in vitro*?
- Hat 4SC-203 eine spezifische proliferationshemmende Wirkung auf NPM-ALK-abhängige Zellen?

2 Material

2.1 Standardgeräte

Analysenwaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Sartorius, Göttingen
Durchflusszytometer (EPICS®XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Elektroporiergerät IBI geneZapper 450	Kodak, New Haven, USA
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Nalgene Kryobehälter	Nalgene, Hereford, Großbritannien
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Mini-Gel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Nanodrop Spektrophotometer	Nanodrop, Wilmington, USA
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Sunrise Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Männedorf, Schweiz
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hofer, San Francisco, USA

Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aprotinin, Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Aqua ad iniectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tbl.	Roche, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DTT	Promega, Heidelberg
EDTA	Fluka, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Fluka, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt

MTS-Reagenz	Promega, Madison, USA
Naphtol Blauschwarz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka, Neu-Ulm
PBS, 10-fach	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
TEMED	Fluka, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trizol™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka, Deisenhofen

2.3 Standardlösungen

Amidoschwarz-Färbelösung	0,2% Naphtol-Blauschwarz 25% Isopropanol 10% Essigsäure in Aqua dest.
Amidoschwarz-Entfärbelösung	25% Isopropanol 10% Essigsäure in Aqua dest.

DNA-Ladepuffer, 10-fach	50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5% EDTA in Aqua dest.
PBS-Tween	0,1% Tween in PBS
Protein-Ladepuffer, 2-fach	1 M Tris/HCl, pH 6,8 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycerin in Aqua dest.
Protein-Lysispuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7,0 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (pro 10 ml) in Aqua dest.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele, 4-fach	0,5 M Tris 0,4% SDS in Aqua dest., pH 6,8

SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in Aqua dest.
TAE-Puffer, 10-fach	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA, pH 8,0 in Aqua dest.
TBS-Puffer	138 mM NaCl 5 mM KCl 248 mM Tris in Aqua dest.
Transferpuffer für Western Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol in Aqua dest.
Trenngelpuffer für SDS-Gele, 4-fach	1,5 M Tris 0,4% SDS in Aqua dest. pH 8,8
Zell-Einfriermedium (2-fach)	20% DMSO 80% FCS

2.4 Zellkulturmedien und -supplemente

FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Murines rekombinantes IL-3	R&D Systems, Wiesbaden
PBS, 10x, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 100x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.5 Kits, Enzyme, Vektoren und Marker

Molekularbiologische Kits:

Proliferationsassay Cell Titer 96	Promega, Madison, USA
NucleoSpin Kit	Macherey & Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Titan One Tube RT-PCR Kit	Roche, Penzberg

Enzyme:

AMV Reverse Transkriptase	Roche, Penzberg
Taq- und Pwo-Polymerase	Roche, Penzberg
Pfu-Turbo	Stratagene, La Jolla, USA

Vektoren:

MigRI p185 BCR-ABL (McWhirter, Galasso et al. 1993; von Bubnoff, Veach et al. 2005)
 MigRI NPM-ALK (Bai, Ouyang et al. 2000)

Molekulargewichtsmarker:

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Prestained SDS-PAGE Standard, broad range	Bio-Rad, München

2.6 Oligonukleotid-Primer

BCR-ABL, 2242 bp Fragment:

Forward Primer (BCR, p185xba): 5'CCACTAAAGCGAGTGAGCTGGACTTGG3'

Reverse Primer (ABL, p185sphI): 5'GGTGGATGAGTCAAAGCTTGCCAGC3'

BCR-ABL Kinasedomäne, 579 bp Fragment:

Forward Primer (p185Abl5'): 5'GCGCAACAAGCCCACTGTCTATGG3'

Reverse Primer (p185Abl3'): 5'GCCAGGCTCTCGGGTGCAGTCC3'

Die Synthese der Primer erfolgte durch MWG-Biotech, Ebersberg.

2.7 Antikörper

Anti- β -Actin (Klon AC-15), monoklonal, Maus IgG, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Anti-ABL (Klon 8E9), monoklonal, Maus IgG, Pharmingen, BD Biosciences, Heidelberg

Anti-Phosphotyrosin (Klon 4G10), monoklonal, Maus IgG, Upstate Biotechnology, Biozol, Eching

Anti-Phosphotyrosin (Klon PY20), monoklonal, Maus IgG, Transduction, BD Biosciences, Heidelberg

Anti-ALK (No.11), polyklonal, Kaninchen IgG, (Morris, Naeve et al. 1997)

Anti-Phospho-ALK (Tyr1604), polyklonal, Kaninchen IgG, Cell Signaling, Frankfurt/Main

Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG, Amersham, Braunschweig

Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG, Amersham, Braunschweig

2.8 Tyrosinkinaseinhibitoren

Imatinib (STI571)	Novartis, Basel, Schweiz
Dasatinib (BMS-354825)	Bristol-Myers Squibb, New York, USA
Nilotinib (AMN107)	Novartis, Basel, Schweiz
4SC-203 (SC71710)	4SC AG, Planegg-Martinsried

2.9 Zelllinien

Murine Zelllinien:

- Ba/F3 par: Parentale Ba/F3 Zellen (murine prä-B-Zelllinie)
- Ba/F3 Mig p185 BCR-ABL: BCR-ABL positive Ba/F3 Zellen (Mig-Vektor)
- Ba/F3 Mig NPM-ALK: NPM-ALK positive Ba/F3 Zellen (Mig-Vektor)

Humane Zelllinien:

- Karpas299: Humane ALCL-Zellen, NPM-ALK positiv
- SU-DHL1: Humane ALCL-Zellen, NPM-ALK positiv
- JB6: Humane ALCL-Zellen, NPM-ALK positiv
- HDLM2: Humane Hodgkin-Lymphomzellen, NPM-ALK negativ

(Bai, Dieter et al. 1998; Bai, Ouyang et al. 2000)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In Zellkultur gehaltene eukaryotische Säugetierzellen dienen als Ausgangsmaterial für viele Experimente in dieser Arbeit. Es wurden sowohl die murine Zelllinie Ba/F3 als auch humane Zelllinien (Karpas 299, SUDHL1, JB6, HDLM2) verwendet. Die Zelllinien werden als Suspensionszellen in RPMI-Medium mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 200 U Penicillin/200 µg Streptomycin pro L kultiviert. Die parentalen Ba/F3 Zellen benötigen zusätzlich 2 ng/ml murines IL-3 und die HDLM2-Zellen benötigen 20% FCS statt 10% FCS. Die Zellen werden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die Zellen alle zwei bis drei Tage z.B. im Verhältnis 1:10 gesplittet, d.h. 90% der Zellsuspension werden verworfen und die gleiche Menge an frischem Kulturmedium wird hinzugegeben (besonders die HDLM2 Zellen zeigen ein langsames Wachstum und werden entsprechend seltener gesplittet). In der Regel werden die Zellen in Kulturflaschen in 20 ml Medium kultiviert und, falls für die Experimente eine größere Zellzahl benötigt wird, in einem größeren Volumen expandiert. Für Experimente sollten sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, was durch Bestimmung der Zellzahl erkannt werden kann (z.B. ca. 5×10^5 Zellen/ml bei Ba/F3 Zellen).

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zellzahl und Zellviabilität können mit einem Trypanblau-Assay bestimmt werden. Die Zellsuspension wird gründlich geschüttelt, damit die Zellen homogen verteilt sind. Dann werden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl 0,5% Trypanblaulösung gemischt und ein Teil der Probe wird in eine Neubauer-Zählkammer mit definiertem Volumen pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop werden die Zellen in vorgegebenen Quadraten gezählt. Lebende Zellen erscheinen hell

leuchtend, während avitale Zellen blau angefärbt werden, da Trypanblau beschädigte Zellmembranen durchdringen kann. Die Zellzahl pro ml ergibt sich als Produkt aus der durchschnittlichen Zellzahl pro 4x4-Quadrat, dem Kammerfaktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 (Beispiel: 25 Zellen/Quadrat x 10^4 x 2 ergibt 5×10^5 Zellen/ml).

3.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, können sie kryokonserviert werden. Dazu werden ca. 2×10^6 Zellen pelletiert (3 min, 1500 rpm, RT). Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet wird in 0,8 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein Kryotube transferriert. Anschließend werden 0,8 ml Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) hinzugefügt. DMSO dient als Frostschutzmittel, das die Entstehung von zellschädigenden Eiskristallen verhindert, allerdings ist es toxisch für die Zellen, solange sie nicht gefroren sind. Deshalb wird die Probe kurz gemischt und sofort in einem Kryobehälter (Abkühlrate ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$) bei -80°C eingefroren. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wird die Probe im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut. Das DMSO wird entfernt, indem die Zellen mit etwa 10 ml Kulturmedium gewaschen werden (Zentrifugation 3 min, 1500 rpm, RT). Anschließend werden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Konstrukte MigRI p185 BCR-ABL und MigRI NPM-ALK wurden verwendet, um Ba/F3 Zellen mit den Onkogenen BCR-ABL bzw. NPM-ALK zu transfizieren. Bei dem MigRI p185 BCR-ABL Konstrukt handelt es sich um den retroviralen MigRI-Vektor, in den die BCR-ABL p185 Wildtyp-cDNA kloniert wurde, eine 4812 bp umfassende chimäre cDNA, die humanes *BCR* und murines *Abl* enthält und deren Translationsprodukt ein BCR-ABL Fusionsprotein von 185 kDa ist (McWhirter, Galasso et al. 1993; von Bubnoff, Veach et al. 2005). Das MigRI NPM-ALK Konstrukt trägt die kodierende Sequenz des humanen NPM-ALK-Fusionsgens (Morris, Kirstein et al. 1994). Die transfizierten Zellen exprimieren das BCR-

ABL-Protein bzw. das NPM-ALK-Protein, wodurch sie autonom proliferieren können und, im Gegensatz zu parentalen Ba/F3 Zellen, IL-3 unabhängig werden. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Elektroporation. Dabei handelt es sich um eine physikalische Methode, die zur Transfektion von Suspensionszellen gut geeignet ist. Ihr Grundprinzip besteht darin, dass sich in einem ausreichend starken elektrischen Feld die Transmembranspannung der Zellen so weit erhöht, dass in der Plasmamembran Poren entstehen, durch die Plasmid-DNA in die Zellen eindringen kann. Zur Transfektion eukaryotischer Suspensionszellen durch Elektroporation werden 5×10^6 Zellen pelletiert (3 min, 1500 rpm, RT), mit PBS gewaschen und in 400 μ l PBS (4°C) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und es werden 25 μ g der jeweiligen Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Küvette wird in das Elektroporationsgerät gestellt und die Zellen werden 5 Millisekunden lang elektroporiert (Spannung 250 V, elektrische Kapazität 950 μ F) und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen in frisches Kulturmedium überführt und im Brutschrank inkubiert. Da die Zellen durch den Elektroporationsvorgang geschädigt werden, proliferieren sie zunächst nur langsam. Es empfiehlt sich, dem Medium noch für einige Tage IL-3 hinzuzufügen, bis sich die Zellen erholt haben. Der IL-3 Entzug bedeutet dann einen entscheidenden Selektionsvorteil der erfolgreich transfizierten Zellen und führt zu ihrer stabilen Transformation. Der Transfektionserfolg kann durchflusszytometrisch als Prozentsatz der EGFP-positiven Zellen ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten, mit MigRI p185 BCR-ABL bzw. mit MigRI NPM-ALK transfizierten Ba/F3 Zellen standen aus vorangehenden Experimenten der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung.

3.2 Sequenzielle Screeningstrategie für TKI-Resistenz

Zur Generierung von Tyrosinkinaseinhibitor-resistenten Zelllinien wurde eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte, zellbasierte Screeningmethode angewandt (von Bubnoff, Barwisch et al. 2005; von Bubnoff, Veach et al. 2005) und im Sinne der Simulation einer sequenziellen Therapie erweitert. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen für Imatinib, Dasatinib und Nilotinib entsprechen den klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen (Imatinib: 4000 nM (Peng, Hayes et al. 2004); Dasatinib: 100 nM (Sawyers, Kantarjian et al. 2005); Nilotinib: 1700 nM (Kantarjian, Giles et al. 2006; Kantarjian, Giles et al. 2007) sowie 50% dieser Kon-

zentrationen (bei Dasatinib und Nilotinib, 2. und 3. Schritt). Im ersten Schritt des dreistufigen Experiments (vgl. Abb. 14) wurden Ba/F3 Mig p185 BCR-ABL Wildtyp-Zellen in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/well in zwei 96-well-plates pipettiert und bei einer Imatinibkonzentration von 4 μM inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 28 Tage. Im Laufe dieser Zeit auftretende resistente Zellkolonien wurden durch Verfärbung des Indikatormediums im betroffenen well und durch Lichtmikroskopie identifiziert. Die Expansion der resistenten Replikatе erfolgte in 12-well-plates und in Zellkulturflaschen unter Aufrechterhaltung der initialen Imatinibkonzentration. Im zweiten Schritt wurden die Imatinib-resistenten Linien so in 96-well-plates ausplattiert, dass eine Spalte von 8 wells für Replikatе einer resistenten Linie aus dem ersten Schritt zur Verfügung stand. 24 Imatinib-resistente Zellklone aus dem ersten Schritt wurden so der Reihe nach in zwei 96-well-plates ausplattiert und bei einer Dasatinibkonzentration von 100 nM inkubiert. Der gleiche Vorgang wurde für eine Dasatinibkonzentration von 50 nM sowie für Nilotinibkonzentrationen von 1700 nM und 850 nM wiederholt. Die Inkubation der Zellen in den insgesamt acht 96-well-plates erfolgte erneut für 28 Tage und resistente Kolonien und Zelllinien wurden wie im ersten Schritt erkannt und expandiert. Im anschließenden dritten Schritt wurden die resistenten Zelllinien aus dem zweiten Schritt ihrerseits in 8-well-Spalten in 96-well-plates ausplattiert und 28 Tage lang mit Inhibitor inkubiert, nämlich die Dasatinib-resistenten aus dem zweiten Schritt mit Nilotinib (1700 nM und 850 nM) und die Nilotinib-resistenten mit Dasatinib (100 nM und 50 nM).

3.3 Zellproliferationsbestimmung mittels MTS-Assay

Der MTS-Assay (Cell Titer 96, Promega, Madison, USA) ermöglicht die Bestimmung der Zellproliferation und wurde in dieser Arbeit verwendet, um den antiproliferativen Effekt von Tyrosinkinaseinhibitoren zu quantifizieren. In lebenden, metabolisch aktiven Zellen werden die Reduktionsäquivalente NADPH und NADH gebildet. Diese reduzieren im MTS-Assay mit Hilfe von Phenazinthosulfat das Substrat MTS (d.h. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) zu Formazan. Die Formazankonzentration kann photometrisch bestimmt werden und repräsentiert die Anzahl lebender Zellen. Zur Durchführung eines MTS-Assays werden Zellen in einer definierten Konzentration in 96-well-plates pipettiert (z.B. 1×10^4 Zellen pro well, 180 μl Zellsuspension pro well). Die erste Spalte von wells wird zur Leerwertbestimmung mit zellfreiem Kulturme-

dium gefüllt. Die mit Zellen bestückten wells werden mit 10-fach konzentrierter Inhibitorlösung (20 μ l) versehen, wobei jeweils ein Triplet von wells die gleiche Inhibitorkonzentration erhält und die Inhibitorkonzentration in den wells von links nach rechts in festgelegter Weise ansteigt. Anschließend werden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ für 24, 48 oder 72 h inkubiert, während der Inhibitor auf die Zellen wirken kann. Danach werden pro well 20 μ l MTS-Lösung zugefügt und die Zellen ca. 2 h inkubiert, bis eine durch die Formazanbildung bedingte Braunverfärbung der wells beginnt. In einem ELISA-Reader (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) wird die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen und der Leerwert wird von den Messwerten abgezogen. Die optische Dichte bei 490 nm ist direkt proportional zur Zahl metabolisch aktiver Zellen und gibt darüber Aufschluss, ob und wie stark durch den zugesetzten Inhibitor, im Vergleich zur inhibitorfreien Kontrolle, die Zellproliferation während des Inkubationszeitraums gehemmt wurde. Die Daten werden als Mittelwerte der Messwerte der Triplikate mit Standardabweichung angegeben. Die Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) kann durch graphische Extrapolation aus den Messwerten erfolgen.

3.4 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.4.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der mRNA aus eukaryotischen Zellen werden ca. 2×10^6 Zellen pelletiert, in 1,8 ml Trizol-Reagenz (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Es werden 180 μ l Chloroform hinzugefügt, die Probe wird etwa 10 s lang gevortext und weitere 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Probe für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert, wobei eine Trennung in eine obere hydrophile Phase und eine untere lipophile Phase erfolgt. Die obere Phase enthält die RNA. Sie wird vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-tube transferiert. Zum Fällen der RNA wird ein gleiches Volumen Isopropanol (ca. 200 μ l) hinzugefügt, vorsichtig gemischt und die Probe für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert. Die darauffolgende Zentrifugation (10 min, 14.000 rpm, 4°C) liefert ein RNA Pellet. Das Isopropanol wird vorsichtig abgekippt und das Pellet wird zweimal mit 500 μ l Ethanol 70% gewaschen (zwischendurch abzentrifugieren, 1 min, 14.000 rpm, 4°C). Das

gesamte restliche Ethanol wird abpipettiert. Anschließend wird das Pellet 5-10 min lang bei RT getrocknet (wobei es aber nicht austrocknen soll) und in 30 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Probe wird bei -80°C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von RNA und DNA kann photometrisch ermittelt werden. Zunächst werden 2 µl Aqua dest. auf die Messvorrichtung des Spektrophotometers (Nanodrop, Wilmington, USA) pipettiert und der Leerwert bestimmt. Anschließend werden 2 µl der jeweiligen Probe auf die Messvorrichtung pipettiert und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren. Die Nukleinsäurekonzentration in µg/ml ergibt sich als Produkt aus der OD (260 nm), dem Verdünnungsfaktor und dem Multiplikationsfaktor. Eine OD (260 nm) von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml, weshalb der Multiplikationsfaktor 50 bei DNA und 40 bei RNA beträgt. Zur Beurteilung der Reinheit der Probe werden automatisch auch die optische Dichte bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren in Proteinen und bei 230 nm, dem Absorptionsmaximum weiterer möglicher Verunreinigungen (z.B. Salze, Phenolrot) gemessen. Als wichtigstes Qualitätskriterium dient das Verhältnis OD (260 nm) : OD (280 nm), das zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.4.3 RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) wird vorher isolierte mRNA revers transkribiert, d.h. sie wird in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Unmittelbar danach wird ein gewünschter Abschnitt der cDNA durch PCR amplifiziert. Unter Verwendung des Titan One Tube RT-PCR Kits (Roche, Penzberg) wird für jede Probe ein Ansatz gemäß Tabelle 2 in ein PCR-tube pipettiert und die Ansätze werden einem Thermocycler-Programm nach Tabelle 3 unterzogen. Die cDNA-Synthese erfolgt bei 50°C durch das Enzym reverse Transkriptase (im Enzymmix: AMV Reverse Transkriptase). Aus-

gehend von Oligo-dT-Primern (DTT), die an den Poly-A-tail der mRNA binden, werden dNTPs zum cDNA-Strang verknüpft. Im anschließenden PCR-Schritt erfolgt die Amplifizierung des cDNA-Abschnitts zwischen dem Forward Primer und dem Reverse-Primer durch das Enzym DNA-Polymerase (im Enzymmix: Mischung aus Taq- und Pwo-Polymerase). Die PCR besteht aus wiederholten Zyklen von drei Schritten: 1. Trennung der Doppelstränge (Denaturierung oder melting, bei 94°C), 2. Bindung der komplementären Primer an das template (annealing, bei 58°C) und 3. DNA-Synthese aus dNTPs durch die DNA-Polymerase (elongation, bei 68°C). Das resultierende PCR-Produkt besteht aus stark vervielfältigten, identischen DNA-Fragmenten mit der durch die Primerwahl festgelegten Länge und Sequenz. Um die DNA-Fragmente in reiner Form zu erhalten, ist eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll zweckmäßig. Die DNA-Fragmente werden dabei an eine Ionenaustauscher-Säule gebunden und gewaschen, wobei unerwünschte Bestandteile abzentrifugiert und verworfen werden. Anschließend wird das aufgereinigte PCR-Produkt mit 30 µl sterilem H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

	Bestandteil (Konzentration)	Volumen/µl
Mastermix 1	H ₂ O steril	10,5
	dNTP-Mix (10 mM)	4
	DTT (100 mM)	2,5
	RNase-Inhibitor (5 U/µl)	1
	Forward Primer (10 mM)	1
	Reverse Primer (10 mM)	1
	Gesamt	20
Mastermix 2	H ₂ O steril	14
	RT-PCR-Puffer (5-fach)	10
	Enzym-Mix	1
	Gesamt	25
RT-PCR-Ansatz	Mastermix 1	20
	Template-RNA (1:100 in H ₂ O steril)	5
	Mastermix 2	25
	Gesamt	50

Tabelle 2: Ansatz für die RT-PCR.

Phase	Zyklen	Temperatur/°C	Dauer/min
Lid	1	80	automatisch
Reverse Transkription	1	50	30
Lid	1	110	automatisch
Denaturierung	1	94	2
PCR	50		
- Melting		94	0,5
- Annealing		58	0,5
- Elongation		68	2,5
Elongation	1	68	6
Aufbewahrung	1	4	unbegrenzt

Tabelle 3: Thermocycler-Programm für die RT-PCR.

3.4.4 Nested-PCR

Ein durch PCR generiertes DNA-Fragment kann als Matrize (template) für eine weitere PCR dienen, eine sogenannte nested-PCR. Die Spezifität der Reaktion wird durch die nested PCR erhöht. In dieser Arbeit wurde ein nested PCR-Ansatz verwendet, um die ABL-Kinasedomäne von BCR-ABL zu erhalten und eine Kontamination durch die ABL-Kinasedomäne von c-Abl auszuschließen. Als template dient ein durch RT-PCR generiertes BCR-ABL-cDNA-Fragment von 2242 bp Länge (Forward Primer in BCR gelegen, Sequenz 5'CCACTAAAGCGAGTGAGCTGGACTTGG3', Reverse Primer in ABL gelegen, Sequenz 5'GGTGGATGAGTCAAAGTCTTGCCAGC3'). Die nested-PCR mit diesem template und mit Primern, welche die ABL-Kinasedomäne umschließen (Forward Primer: 5'GCGCAACAAGCCCACTGTCTATGG3', Reverse Primer : 5'GCCAGGCTCTCGGGTGCAGTCC3') liefert ein DNA-Fragment der Länge 579 bp. Im Übrigen folgt der nested-PCR-Ansatz dem üblichen PCR-Protokoll und führt über wiederholte Zyklen von melting, annealing und elongation zur DNA-Amplifikation. Als DNA-Polymerase wird die Pfu-Polymerase verwendet. Es werden Ansätze gemäß Tabelle 4 pipettiert und einem Thermocycler-Programm entsprechend Tabelle 5 unterzogen.

Bestandteil (Konzentration)	Volumen/ μ l
H ₂ O steril	22
dNTP-Mix (10 mM)	1
Pfu-Puffer (10-fach)	3
Forward Primer (10 mM)	1
Reverse Primer (10 mM)	1
DNA Template (RT-PCR-Produkt in H ₂ O steril)	1
Pfu-Polymerase (2,5 U/ μ l)	1
Gesamt	30

Tabelle 4: Ansatz für die nested-PCR.

Phase	Zyklen	Temperatur/ $^{\circ}$ C	Dauer/min
Lid	1	110	automatisch
Denaturierung	1	95	2
PCR	42		
-Melting		95	0,5
-Annealing		58	0,5
-Elongation		72	2
Elongation	1	72	6
Aufbewahrung	1	4	unbegrenzt

Tabelle 5: Thermocycler-Programm für die nested-PCR.

3.4.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben, wie z.B. PCR-Produkte, können durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Je nach ihrer Größe wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld unterschiedlich weit. Ein 1%-iges Agarosegel mit 0,005% Ethidiumbromid wird hergestellt, indem 1 g Agarose in 100 ml 1-fach TAE-Puffer aufgeköcht, mit 5 μ l Ethidiumbromidlösung versetzt

und in eine Form gegossen wird. Das Gel wird in eine mit 1-fach TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Zu 25 µl PCR-Produkt werden 5 µl 6-fach DNA-Ladepuffer hinzugefügt und die Proben werden in die Taschen des Agarosegels geladen. Als Größenstandard werden 10 µl des 1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarkers oder des 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarkers (beide Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 80 V für ca. 30 min. Unter UV-Licht, das die DNA im Ethidiumbromidgel aufleuchten lässt, können die DNA-Fragmente gemäß ihrer erwarteten Größe als Banden identifiziert werden. Sie werden im Block ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) den Herstellerangaben entsprechend aus dem Gel extrahiert. Dabei wird das DNA-haltige Gelstück aufgelöst und die DNA-Fragmente werden an eine Ionenaustauscher-Säule gebunden und gewaschen. Anschließend wird das so aufgereinigte PCR-Produkt mit 30 µl sterilem H₂O eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der gelelektrophoretisch aufgereinigten, photometrisch quantifizierten PCR-Produkte erfolgte durch die Firmen GATC Biotech, Konstanz und MWG Biotech, Ebersberg.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Zellysate

Die proteinbiochemische Untersuchung von Zellysaten diente in dieser Arbeit vor allem zur Bestimmung des Effekts von niedermolekularen Inhibitoren auf die Phosphorylierungsaktivität von Tyrosinkinase. Die betreffenden Zellen werden in festgelegter Konzentration in 6-well-plates pipettiert (z.B. 2×10^6 Zellen pro well, 4,5 ml Zellsuspension pro well) und es wird 10-fach konzentrierte Inhibitorlösung (500 µl) in ansteigenden Konzentrationen hinzugefügt. Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO₂ z.B. für 2, 4 oder 6 h inkubiert. Anschließend werden

die Zellen geerntet, indem sie in 15 ml-tubes transferiert, in kaltem PBS gewaschen, pelletiert und in flüssigem Stickstoff gefroren werden (Zentrifugation jeweils 1500 rpm, 3 min, 4°C, der Überstand wird sorgfältig abgesaugt und verworfen). Die Zellpellets werden auf Eis aufgetaut und durch Zugabe von 150 µl Protein-Lysispuffer und 20-minütiges Stehenlassen auf Eis lysiert. Die Lysate werden in Eppendorf-tubes transferiert und die Zelltrümmer werden abzentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, 4°C). Der proteinhaltige Überstand wird vorsichtig abpipettiert und jeweils in ein neues Eppendorf-tube transferiert. Zur Denaturierung der Proteine werden die Lysate mit 150 µl 2-fach Protein-Ladepuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Proben können gleich einer SDS-PAGE unterzogen werden oder bei -20°C aufbewahrt werden.

3.5.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel. Abhängig von ihrer Größe und Ladung wandern Proteine im elektrischen Feld unterschiedlich weit. Um den Einfluss der Protein-Eigenladung auszuschalten, werden die zu untersuchenden Zelllysate mit dem SDS-haltigen Protein-Ladepuffer auf 95°C erhitzt. Das anionische Detergens SDS bindet an die Proteine im Lysat und überdeckt durch seine negative Ladung die Eigenladung der Proteine. Das Erhitzen führt zur Denaturierung der Proteine, d.h. zur Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur. In diesem Zustand kann die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht eindeutig zugeordnet werden. Während der Elektrophorese bewegen sich die durch SDS negativ geladenen Proteine im Polyacrylamidgel zur Anode. Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid, pH 6,8) und einem Trenngel (5-15% Acrylamid/Bisacrylamid, pH 8,8). Zunächst sammeln sich die Proteine im porösen Sammelgel. In dem diskontinuierlichen Puffersystem kommt es an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel zu einem stacking-Effekt, d.h. zu einer Konzentration der Proteine in einem sehr kleinen Volumen, wodurch die Auflösung der SDS-PAGE stark erhöht wird. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung der Proteinfractionen durch den Siebeffekt des quervernetzten Polyacrylamids, wobei sich kleine Proteine schnell und große Proteine langsam durch die Polyacrylamid-Poren bewegen. In einem niedrig konzentrierten Polyacrylamidgel steht den

Proteinen ein geringer Widerstand entgegen, weshalb auch große Proteine relativ weit wandern und voneinander getrennt werden können. Dagegen eignet sich ein hoch konzentriertes Gel zur Auftrennung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht. Zur Durchführung einer SDS-PAGE wird zuerst das Trenngel hergestellt, indem z.B. für ein 12%-iges Gel 4,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 3,9 ml H₂O, 2,8 ml 4-fach Trenngelpuffer, 37,5 µl APS und 7,5 µl TEMED zusammenpipettiert werden. Das TEMED startet die Polymerisationsreaktion zu Polyacrylamid, weshalb das Trenngel sogleich in die Gelform gegossen wird. Um eine glatte Oberfläche zu erzielen, wird das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, das nach dem Festwerden des Trenngels nach etwa 30 min sorgfältig entfernt wird. Anschließend wird das 5%-ige Sammelgel, bestehend aus 0,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 4,3 ml H₂O, 1,8 ml 4-fach Sammelgelpuffer, 35,0 µl APS und 7,0 µl TEMED, auf das Trenngel gegossen. Ein Kamm für die Geltaschen wird eingesetzt und das Gel polymerisiert in ca. 30 min aus. Das fertige Polyacrylamidgel wird in eine Elektrophoresekammer gespannt, die mit SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt wird. In die Taschen des Gels werden 25 µl der einzelnen Protein-Proben bzw. 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-Rad, München) gefüllt. Die Elektrophorese erfolgt zunächst bei 60 V, bis die Proben ins Trenngel gewandert sind und danach bei 120 V für ca. 5 h oder bei 25 V über Nacht.

3.5.3 Western Blot (Immunoblot)

Bei dem Western Blot-Verfahren werden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Der Proteintransfer erfolgt elektrophoretisch, in der vorliegenden Arbeit mit der wet-blot-Methode. In einer mit Transferpuffer gefüllten Schale wird eine Blot-Kassette in dieser Reihenfolge bestückt: Auf ein Whatman-Papier folgt die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, darauf wird das Polyacrylamidgel gelegt und auf dieses ein weiteres Whatman-Papier. Luftblasen sollen vermieden bzw. entfernt werden. Die Kassette wird verschlossen und so in die mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gespannt, dass das Gel auf der Kathodenseite und die PVDF-Membran auf der Anodenseite liegt. So können die Proteine in Richtung Anode aus dem Gel auf die Membran wandern. Der Proteintransfer erfolgt unter Wasserkühlung bei einer Stromstärke von 1,00 A für 1,5 h. Bei kleineren Proteinen wird eine kürzere, bei größeren Proteinen eine längere Transferzeit gewählt (Richtwert ca. 1 min/kD).

Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, kann eine Amidoschwarz-Färbung erfolgen. Die Membran wird dazu ca. 10 min in die Amidoschwarz-Färbelösung gelegt und danach solange mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden zu erkennen sind. Für die Darstellung bestimmter Proteine mittels spezifischer Antikörper und Chemiluminiszenz wird die PVDF-Membran zunächst in Blocking-Lösung gelegt und für 30 min bei 37°C sanft geschüttelt. Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen der Proteine blockiert. Während normalerweise eine Lösung von 5% Magermilch in PBS-T zum Blocken verwendet wird, empfiehlt sich bei der Darstellung phosphorylierter Proteine die Verwendung von 5% BSA in PBS-T zum Blocken und für alle weiteren Schritte, denn Milch selbst ist reich an phosphorylierten Proteinen. Anschließend wird die Membran mit dem Primärantikörper, der nach Herstellerangaben in 5% Milch- oder 5% BSA-Lösung verdünnt wurde, für mindestens 2,5 h bei RT oder besser über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Membran dreimal 10 min lang in PBS-T gewaschen und 30 min bei RT mit dem horseradish-peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper (1:1000 in 5% Milch- oder 5% BSA-Lösung) inkubiert. Wiederum wird die Membran dreimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Die ECL-Reagenzien (SuperSignal West Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, USA) werden nach Herstellerangaben in einer Schale angesetzt und die Membran wird damit bedeckt. Daraufhin kommt die Membran in eine Belichtungskassette und im Dunkeln wird ein Röntgenfilm darauf gelegt. Der Röntgenfilm wird durch das von der horseradish peroxidase umgesetzte ECL-Substrat an den Stellen belichtet, wo sich auf der Membran das gesuchte Protein mit gebundenem Primär- und Sekundärantikörper befindet. Nach einer festgelegten Belichtungszeit (Sekunden bis Minuten) wird der Film entwickelt. Um auf der gleichen Membran noch weitere Proteine darzustellen, können die gebundenen Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörper durch sog. „Stripping“ von der Membran entfernt werden. Dazu wird die Membran für 10 min bei RT in 0,2 M NaOH-Lösung inkubiert und anschließend dreimal 10 min in PBS-T gewaschen.

4 Ergebnisse

4.1 Sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz BCR-ABL positiver Zellen

4.1.1 Mutationen der ABL-Kinasedomäne treten unter sequenzieller TKI-Behandlung regelmäßig auf

In dem zellbasierten Screen zur Untersuchung sequenzieller Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz (Abbildung 14), der in dieser Arbeit vorgestellt wird, erfolgte zunächst eine Erstlinientherapie BCR-ABL positiver Ba/F3 Zellen mit Imatinib bei einer Konzentration von 4 μM , was etwa der Plasma-Talkonzentration bei einer Dosis von 800 mg täglich beim Menschen entspricht (Peng, Hayes et al. 2004). Dabei wurden 24 Imatinib-resistente Zellklone erzeugt. Die Sequenzierung der durch PCR amplifizierten BCR-ABL-Kinasedomäne zeigte, dass alle 24 Klone einzelne Punktmutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne enthielten, wobei insgesamt zehn unterschiedliche Mutationen an neun verschiedenen Aminosäurepositionen auftraten.

Als nächstes wurden jeweils acht Replikate von jeder der 24 Imatinib-resistenten Zelllinien einer Zweitlinientherapie mit Dasatinib bzw. Nilotinib unterzogen. Dabei wurden sowohl die „optimalen“ Inhibitorkonzentrationen Dasatinib 100 nM (entsprechend der Plasma-Talkonzentration beim Menschen bei einer Dosis von 70 mg zweimal täglich (Sawyers, Kantarjian et al. 2005)) und Nilotinib 1700 nM (entsprechend der Plasma-Talkonzentration beim Menschen bei einer Dosis von 400 mg zweimal täglich (Kantarjian, Giles et al. 2006)) verwendet als auch die „suboptimalen“ Inhibitorkonzentrationen Dasatinib 50 nM und Nilotinib 850 nM (entsprechend 50% der jeweils optimalen Dosis).

Acht von den 24 Imatinib-resistenten Klonen wuchsen auch in Gegenwart von Dasatinib als Zweitlinienbehandlung, fünf von den acht bei der optimalen Dasatinibkonzentration von 100 nM, die drei übrigen wuchsen nur bei der suboptimalen Dasatinibkonzentration von 50 nM. Da ein Imatinib-resistenter Klon (Nr.10 in Tabelle 7) zwei unabhängige Dasatinib-resistente Klone lieferte, konnten insgesamt neun Dasatinib-Zweitlinien-resistente Zelllinien generiert

werden. Sie alle behielten ihre ursprünglichen Kinasedomänenmutationen und vier von ihnen entwickelten zusätzliche Mutationen.

Unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib wuchsen 23 von 24 Imatinib-resistenten Klonen. 13 von den 23 wuchsen bei der optimalen Nilotinibkonzentration von 1700 nM, die zehn übrigen wuchsen nur bei der suboptimalen Nilotinibkonzentration von 850 nM. Es entstanden insgesamt 24 Nilotinib-Zweitlinien-resistente Zelllinien. Auch von diesen zeigten alle ABL-Kinasedomänenmutationen; 22 behielten ihre ursprüngliche Mutation, 13 entwickelten zusätzliche Mutationen und zwei veränderten ihren Mutationsstatus zu einer anderen Punktmutation (Switch).

Bei der Drittlinientherapie Imatinib-Dasatinib-resistenter Zelllinien mit Nilotinib zeigte sich eine Resistenz aller neun Zelllinien, alle wuchsen bei der optimalen Nilotinibkonzentration von 1700 nM. Neun Drittlinien-resistente Zelllinien (Imatinib-Dasatinib-Nilotinib-resistent) wurden gewonnen. Alle von ihnen behielten ihre vorbestehenden Kinasedomänenmutationen und eine zusätzliche Mutation trat auf. Unter Drittlinientherapie mit Dasatinib waren 18 von 24 Nilotinib-Zweitlinien-resistenten Zelllinien Dasatinib-resistent. Zwölf von den 18 wuchsen bei der optimalen Dasatinibkonzentration von 100 nM, die sechs übrigen wuchsen nur bei der suboptimalen Dasatinibkonzentration von 50 nM. Insgesamt 21 Imatinib-Nilotinib-Dasatinib-resistente Zelllinien wurden generiert, von denen alle ihre vorbestehenden Mutationen behielten und von denen sieben neue Mutationen entwickelten (Abbildung 15).

Insgesamt traten in diesem Screen 20 unterschiedliche BCR-ABL Kinasedomänenmutationen an 14 unterschiedlichen Stellen auf. Sie sind in Tabelle 6 mit den zugehörigen IC_{50} Werten für Imatinib, Nilotinib und Dasatinib verzeichnet.

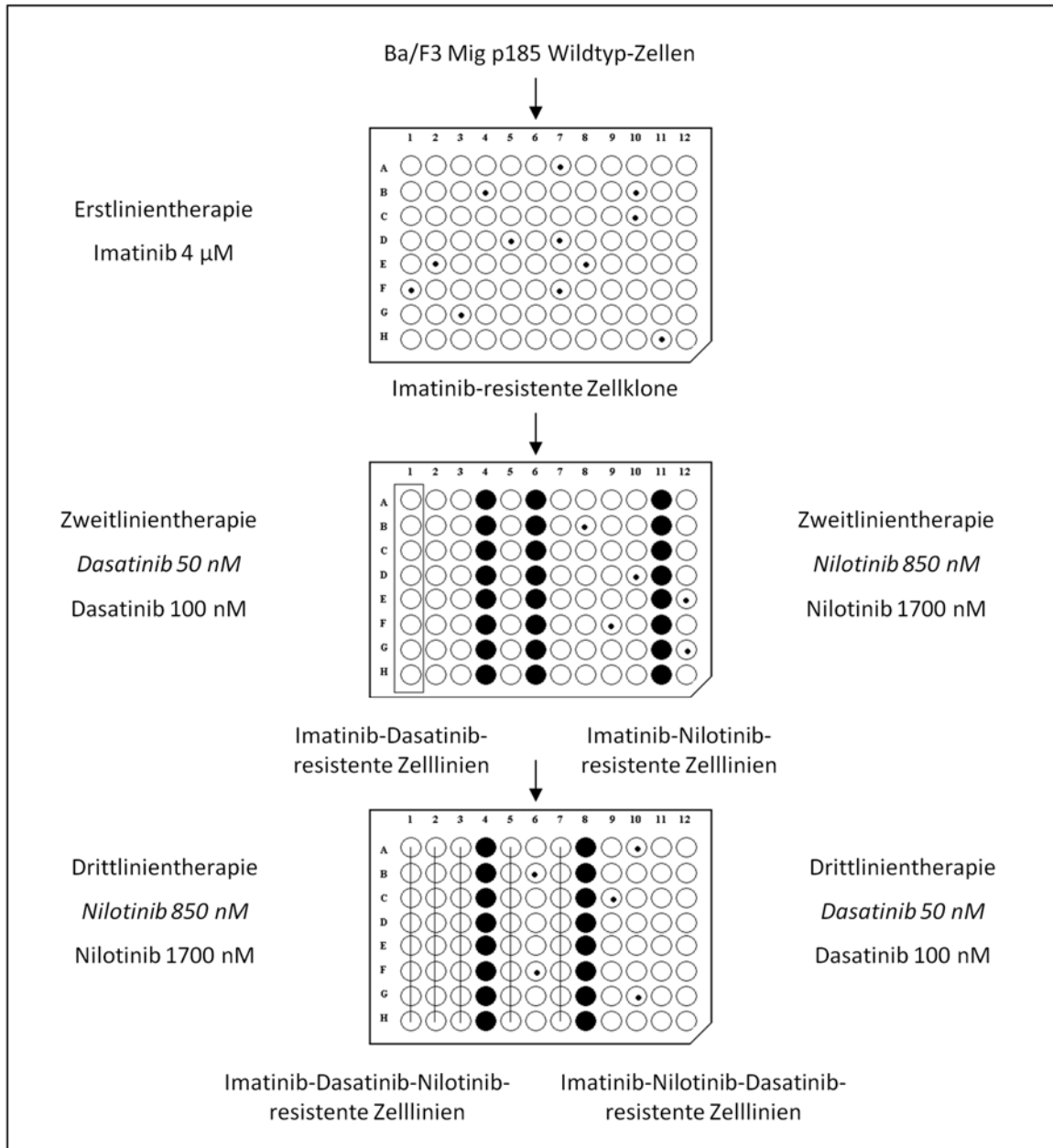


Abbildung 14: Schema des zellbasierten Screens für sequenzielle TKI-Resistenz. BCR-ABL-positive Ba/F3 Mig p185 Wildtyp-Zellen wurden einer Erstlinientherapie mit Imatinib sowie einer Zweit- und Drittlinientherapie mit jeweils Dasatinib oder Nilotinib unterzogen. Weiße Wells stehen für kein Wachstum, schwarze Wells repräsentieren allgemeines, diffuses Wachstum und einzelne Punkte stehen für einzelne resistente Klone. Unter Zweit- und Drittlinientherapie sind Zellen mit dem gleichen Erstlinien-Ursprung in Spalten von 8 wells gruppiert, wie durch den senkrechten Kasten angedeutet. Durchgestrichene wells wurden nicht mit Zellen belegt.

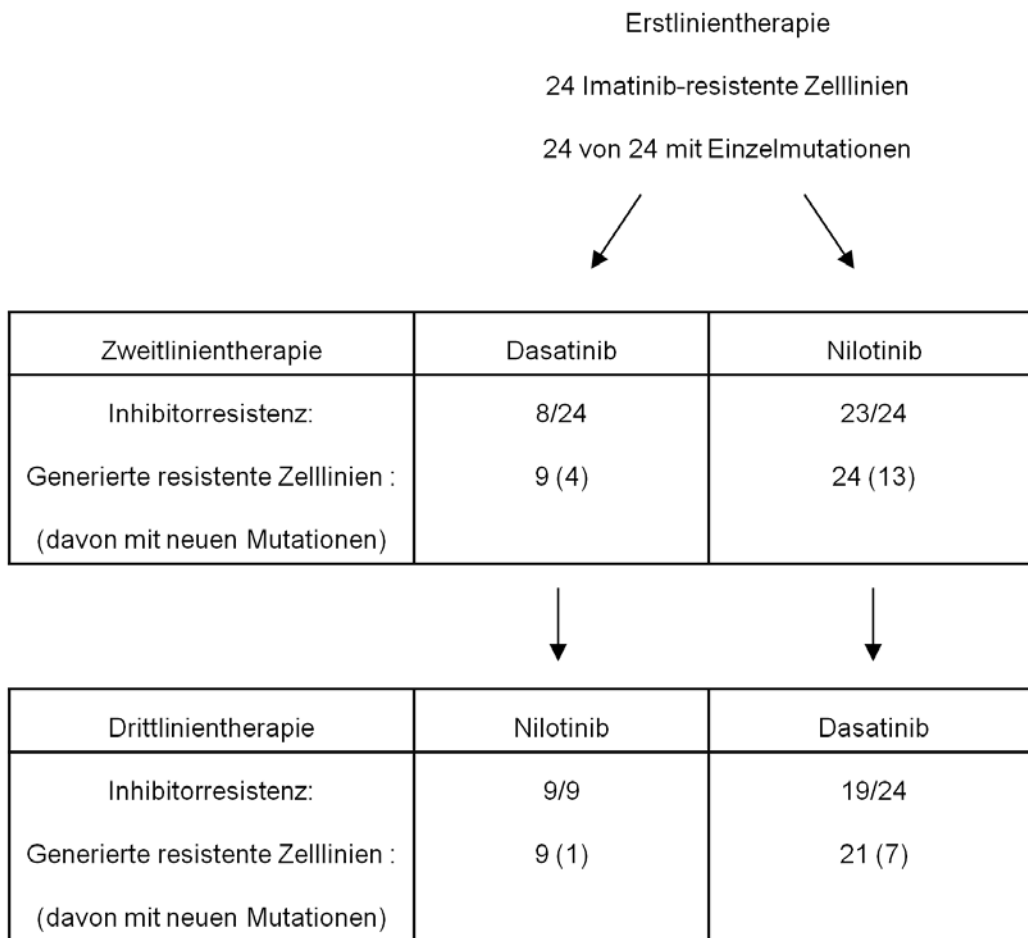


Abbildung 15: Sequenzielle TKI-Resistenz im zellbasierten Screen. Verteilung von Inhibitorresistenz, erzeugten resistenten Zelllinien und Entwicklung zusätzlicher neuer BCR-ABL-Kinasedomänenmutationen unter Erst-, Zweit-, und Drittlinienbehandlung.

Mutation		Imatinib		Dasatinib		Nilotinib	
Typ	Austausch	IC ₅₀ (nM)	Ref.	IC ₅₀ (nM)	Ref.	IC ₅₀ (nM)	Ref.
P-loop	M244I	~1400	A	n.a.		n.a.	
	L248V	1866	R	9.36	R	49.48	R
	G250E	3613	R	8.14	R	80.67	R
	Y253H	>6400	O	1.3	O	450	O
	E255K	3174	R	10.26	R	118.4	R
	E255V	8953	R	6.30	R	182.3	R
C-helix	E281K	1601	B	n.a.		49	B
ATP binding region	V299L	813.7	R	15.83	R	23.7	R
	F311I	n.a.		n.a.		n.a.	
	T315I	9221	R	137.30	R	697.1	R
	T315A	971	O	125	O	61	O
	F317C	694	B	n.a.		19	B
	F317L	1370	R	8.16	R	39.19	R
	F317V	549	B	53	O	28	B
Substrate binding region	F359C	2377	B	n.a.		291	B
	F359I	n.a.		n.a.		n.a.	
A-loop	A380S	3744	B	n.a.		179	B
	A380T	n.a.		n.a.		n.a.	
	L387M	1000	O	2	O	49	O
	H396P	1280	R	1.95	R	42.65	R
	WT	527	R	1.83	R	17.69	R
	Parental	5683	R	>100	R	679.9	R

Tabelle 6: Überblick über die unter sequenzieller TKI-Therapie auftretenden BCR-ABL-Mutationen mit IC₅₀-Werten für Imatinib, Dasatinib und Nilotinib. Es wurden 20 Mutationen an 14 verschiedenen Stellen identifiziert. Mutationen, die auch in der Klinik beobachtet wurden, sind fett gedruckt (Apperley 2007; Branford, Melo et al. 2009; Muller, Cortes et al. 2009). Die jeweiligen IC₅₀-Werte für die Proliferation transformierter Ba/F3-Zellen sind angegeben wie in der Literatur berichtet. Zum Vergleich sind auch die IC₅₀-Werte für Wildtyp (WT) BCR-ABL und für parentale Ba/F3-Zellen angegeben. A, (Azam, Latek et al. 2003); B, (von Bubnoff, Manley et al. 2006); O, (O'Hare, Eide et al. 2007); R, (Redaelli, Piazza et al. 2009); n.a., keine Angabe in der Literatur.

4.1.2 Zelluläre Wachstumsmuster korrelieren mit dem BCR-ABL-Mutationstatus inhibitorresistenter Zelllinien

Mit Hilfe des sequenziellen Screens konnten 24 Imatinib-Erstlinientherapie-resistente Zellklone generiert werden sowie neun Dasatinib-Zweitlinientherapie-resistente Zelllinien, 24 Nilotinib-Zweitlinientherapie-resistente Zelllinien, neun Nilotinib-Drittlinientherapie-resistente Zelllinien und 21 Dasatinib-Drittlinientherapie-resistente Zelllinien. Dabei waren also z.B. Nilotinib-Drittlinientherapie-resistente Zelllinien resistent gegen Imatinib als Erstlinientherapie, Dasatinib als Zweitlinientherapie und Nilotinib als Drittlinientherapie. Bei der Behandlung Imatinib-resistenter Klone mit Dasatinib oder Nilotinib beobachteten wir drei spezifische, wiederkehrende zelluläre Wachstums- bzw. Resistenzmuster: 1. Allgemeine Resistenz mit Wachstum aller Zellen; 2. Wachstum einzelner Klone/Kolonien; und 3. Kein Wachstum (vgl. Abbildung 14; in den Tabellen 7 und 8 sind die Resistenzmuster bezeichnet als 1. "alle", 2. "einzelne" and 3. "keine").

Bei dem ersten Resistenzmuster zeigt sich das sofortige Wachstum Imatinib-resistenter Zellklone in allen Replikaten trotz der Gegenwart von Dasatinib oder Nilotinib als Zweitlinieninhibitoren, was nahelegt, dass diese Klone bereits Veränderungen in sich trugen, die ihnen sofortige Resistenz gegen die Zweitlinieninhibitoren verliehen. Tatsächlich konnten in diesen Zelllinien durch Sequenzierung der ABL-Kinasedomäne die T315I-Mutation als Einzelmutteration nach Dasatinib-Zweitlinientherapie (Tabelle 7) und die T315I-, Y253H- und E255V-Mutationen als Einzelmutterationen nach Nilotinib-Zweitlinientherapie nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die zellulären IC_{50} -Werte sind bei T315I mit 137,3 nM für Dasatinib und 697,1 nM für Nilotinib vorbeschrieben (vgl. Tabelle 6). Die IC_{50} -Werte für Nilotinib betragen bei Y253H 450 nM und bei E255V 182,3 nM. Es zeigt sich also, dass allgemeines, sofortiges Zellwachstum unter Zweitlinientherapie mit Kinasedomänenmutationen assoziiert ist, die hohe substanzspezifische IC_{50} -Werte aufweisen.

Als ein zweites Resistenzmuster zeigte sich das Wachstum einzelner resistenter Zellklone innerhalb einer Serie von Replikaten Imatinib-resistenter Zellen in der Gegenwart von Nilotinib oder Dasatinib. Offensichtlich gelang es diesen Zweitlinien-resistenten Zellklonen, in Gegenwart der neuen Tyrosinkinaseinhibitoren einen Überlebensvorteil gegenüber den verbleibenden Zellen der Imatinib-resistenten Zelllinie zu nutzen, die nicht proliferieren konnten.

Die Sequenzierung dieser Einzelklone zeigte, dass sequenzielle TKI-Therapie häufig zum Erwerb einer zweiten oder sogar dritten BCR-ABL-Mutation zusätzlich zur ursprünglich vorhandenen führt, so dass zusammengesetzte Mutationen (sog. compound-Mutationen) entstehen und es zu einer schrittweisen Erhöhung der Inhibitorresistenz kommt. Dies veranschaulicht beispielsweise die Mutationsfolge H396P (Imatinib, Nr.18 in Tabelle 8) – H396P/E255V (Nilotinib) – H396P/E255V/T315A (Dasatinib) oder die Mutationsfolge E255K (Imatinib, Nr.13 in Tabelle 3) – E255K/A380S (Nilotinib) – E255K/A380S/V299L (Dasatinib). Doppelmutationen unter Zweitlinientherapie waren gelegentlich ausreichend, um der Zelllinie allgemeine Drittlinientherapieresistenz zu verleihen, was sich im sofortigen Wachstum aller Zellen zeigte. Das traf sowohl für die Sequenz Imatinib-Dasatinib-Nilotinib zu (z.B. Y253H/F317L, Nr.1 und Y253H/V299L, Nr.11 in Tabelle 7) als auch für die Sequenz Imatinib-Nilotinib-Dasatinib (z.B. L248/E255V, Nr.2 oder G250K/E255K, Nr.10 in Tabelle 8). Andererseits kann es zur Drittlinientherapieresistenz genauso wie zur Zweitlinientherapieresistenz durch die Entwicklung von Doppel- oder Dreifachmutationen kommen, was zum Wachstum einzelner resistenter Klone mit zusätzlichen Mutationen führt (z.B. die Sequenz G250E/F317C/A380T, Nr.10 in Tabelle 7 oder die Sequenz E255V/F317L, Nr.3 in Tabelle 8). Im vorliegenden Screen traten auch Imatinib-resistente Zelllinien mit Einzelmutationen auf, die unter Zweitlinientherapie bei suboptimaler Inhibitorkonzentration Wachstum als einzelne Zellklone und unter Drittlinientherapie allgemeines Wachstum bzw. Einzelklonwachstum zeigten, ohne dass Veränderungen im Mutationsstatus auftraten (z.B. Nr.23 mit E281K in Tabelle 7; Nr.5 und Nr. 6 mit L248V sowie Nr.7 mit H396P in Tabelle 8). Dies deutet darauf hin, dass in diesen Zellen zusätzliche mutationsunabhängige Resistenzmechanismen vorliegen, die schwache Mutationen (d.h. mit geringem IC₅₀-Wert) zur vollen Resistenz ergänzen. Im Gegensatz zu dem häufigen Auftreten von Doppelmutationen kam es in der vorliegenden Untersuchung nur selten zu einer Veränderung des Mutationsstatus im Sinne eines Wechsels (Switch) zu einer anderen Punktmutation. Es traten zwei derartige Fälle auf, beide unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib (Wechsel von E255K zu E255V, Nr. 12 in Tabelle 8, und Wechsel von H396P zu F359I, Nr. 14 in Tabelle 8), was für klonale Heterogenität nach Selektion durch Imatinib und klonale Selektion während der Zweitlinientherapie in diesen Zelllinien spricht. Das Auftreten neuer Mutationen war in diesem Screen stark mit dem zweiten Wachstumsmuster (einzelne Zellklone) assoziiert, was einen schrittweisen Erwerb zusätzlicher Mutationen bei der Entstehung sequenzieller TKI-Resistenz nahelegt.

Das dritte Resistenzmuster (kein Wachstum) trat auf, wenn Erstlinientherapie-resistente Klone in allen Replikaten durch Zweitlinieninhibitoren erfolgreich inhibiert wurden und wenn Zweitlinientherapie-resistente Zelllinien in allen Replikaten durch Drittlinieninhibitoren erfolgreich inhibiert wurden. Unter Dasatinibtherapie zeigte die Mehrheit (16/24) der Imatinib-Erstlinien-resistenten Zelllinien kein Wachstum, wobei Zelllinien mit Mutationen im P-Loop (L248V, E255K/V), in der C-Helix (E281K, abgesehen von einem Fall mit Wachstum unter 50 nM Dasatinib, Nr. 23 in Tabelle 8), der Substratbindungsregion (F359I) und im A-Loop (H396P) betroffen waren (Tabelle 7). Einige Imatinib-Nilotinib-resistente Zelllinien (5/24) mit Einzel- (Y253H) und Doppelmutationen (F359I/E255K, E281K/Y253H, E281K/F359C und H396P/F311I) wurden ebenfalls durch Dasatinib vollständig am Wachstum gehindert (Tabelle 8). Mit Nilotinib als Zweitlinientherapie konnte bei der suboptimalen Konzentration von 850 nM lediglich eine einzige Imatinib-resistente Zelllinie mit E281K (Nr. 22 in Tabelle 8) am Wachstum gehindert werden. Bei der höheren Nilotinibkonzentration von 1700 nM wurden Imatinib-resistente Zelllinien mit den Mutationen L248V, G250E, E255K, E281K und H396P wirksam inhibiert. Imatinib-Dasatinib-resistente Zelllinien konnten in dieser Studie durch Drittlinientherapie mit Nilotinib nicht am Wachstum gehindert werden.

Erstlinientherapie		Zweitlinientherapie		Drittlinientherapie	
Imatinib (4 µM)		Dasatinib (50 nM, 100 nM)		Nilotinib (850 nM, 1700 nM)	
Nr.	Mutation	Resistenz	Mutation	Resistenz	Mutation
1	Y253H	<i>einzelne</i>	Y253H/F317V	alle	Y253H/F317V
2	L248V	keine			
3	E255V	keine			
4	T315I	alle	T315I	alle	T315I
5	L248V	keine			
6	L248V	keine			
7	H396P	keine			
8	T315I	alle	T315I	alle	T315I
9	F317L	keine			
10	G250E	einzelne	G250E/F317C	einzelne	G250E/F317C/A380T
		einzelne	G250E	alle	G250E
11	Y253H	<i>einzelne</i>	Y253H/V299L	alle	Y253H/V299L
12	E255K	keine			
13	E255K	keine			
14	H396P	einzelne	T315I/H396P	alle	T315I/H396P
15	T315I	alle	T315I	alle	T315I
16	F359I	keine			
17	H396P	keine			
18	H396P	keine			
19	F359I	keine			
20	E255K	keine			
21	E281K	keine			
22	E281K	keine			
23	E281K	<i>einzelne</i>	E281K	alle	E281K
24	H396P	keine			

Tabelle 7: Resistenzmuster und BCR-ABL-Kinasedomänenmutationen bei Behandlung mit der TKI-Sequenz Imatinib–Dasatinib–Nilotinib. Imatinib-resistente Klone (Nr.1-24) wurden einer Zweitlinienbehandlung mit Dasatinib unterzogen und Imatinib-Dasatinib-resistente Zellen wurden mit Nilotinib als Drittlinientherapie behandelt. Resistente Zellen zeigen charakteristische Wachstumsmuster, wobei “alle” für allgemeines, sofortiges Wachstum aller Zellen steht und “einzelne” für das

Wachstum einzelner Klone/Kolonien. “Keine” steht für keine Resistenz/kein Wachstum und somit für Inhibitorsensitivität. Der Kinasedomänenmutationsstatus der resistenten Zellen wurde durch PCR und Sequenzierung bestimmt, wobei Doppel- und Dreifachmutationen der Kinasedomäne beobachtet wurden. Unter Zweit- und Drittlinientherapie bezeichnet **Fettdruck** Zelllinien, die bei den optimalen Inhibitorkonzentrationen auftraten (**Dasatinib 100 nM, Nilotinib 1700 nM**). Mit *Kursivschrift* sind dagegen resistente Zellen bezeichnet, die nur bei den niedrigeren Inhibitorkonzentrationen auftraten (*Dasatinib 50 nM, Nilotinib 850 nM*).

Erstlinientherapie		Zweitlinientherapie		Drittlinientherapie	
Imatinib (4 µM)		Nilotinib (850 nM, 1700 nM)		Dasatinib (50 nM, 100 nM)	
Nr.	Mutation	Resistenz	Mutation	Resistenz	Mutation
1	Y253H	alle	Y253H	keine	-
2	L248V	<i>einzelne</i>	<i>L248V/E255V</i>	alle	L248V/E255V
3	E255V	alle	E255V	einzelne	E255V/F317L
4	T315I	alle	T315I	alle	T315I
5	L248V	<i>einzelne</i>	<i>L248V</i>	alle	L248V
6	L248V	<i>einzelne</i>	<i>L248V</i>	alle	L248V
7	H396P	<i>einzelne</i>	<i>H396P</i>	alle	H396P
8	T315I	alle	T315I	alle	T315I
9	F317L	einzelne	T315I/F317L	alle	T315I/F317L
10	G250E	<i>einzelne</i>	<i>G250E/E255K</i>	alle	G250E/E255K
11	Y253H	alle	Y253H	<i>einzelne</i>	<i>Y253H/F317L</i>
12	E255K	alle	E255V	<i>einzelne</i>	<i>M244I/E255V</i>
13	E255K	einzelne	E255K/A380S	<i>einzelne</i>	<i>E255K/V299L/A380S</i>
14	H396P	einzelne	F359I	<i>einzelne</i>	<i>F317V/F359I</i>
				einzelne	V299L/F359I
15	T315I	alle	T315I	alle	T315I
16	F359I	<i>einzelne</i>	<i>L248V/F359I</i>	<i>einzelne</i>	<i>L248V/F359I</i>
		einzelne	G250E/F359I	<i>einzelne</i>	<i>G250E/F359I</i>
17	H396P	einzelne	G250E/A380S/H396P	<i>alle</i>	<i>G250E/A380S/H396P</i>
18	H396P	<i>einzelne</i>	<i>E255V/H396P</i>	<i>einzelne</i>	<i>E255V/H396P</i>
				einzelne	E255V/T315A/H396P
19	F359I	einzelne	E255K/F359I	keine	
20	E255K	<i>einzelne</i>	<i>E255K/L387M</i>	<i>alle</i>	<i>E255K/L387M</i>
21	E281K	<i>einzelne</i>	<i>Y253H/E281K</i>	keine	
22	E281K	keine			
23	E281K	<i>einzelne</i>	<i>E281K/F359C</i>	keine	
24	H396P	<i>einzelne</i>	<i>F311I/H396P</i>	keine	

Tabelle 8: Resistenzmuster und BCR-ABL-Kinasedomänenmutationen bei Behandlung mit der TKI-Sequenz Imatinib–Nilotinib–Dasatinib. Imatinib-resistente Klone (Nr.1-24) wurden einer Zweitlinienbehandlung mit Nilotinib unterzogen und Imatinib-Nilotinib-resistente Zellen wurden mit

Dasatinib als Drittlinientherapie behandelt. Resistente Zellen zeigen charakteristische Wachstumsmuster, wobei "einzelne" für das Wachstum einzelner Klone/Kolonien steht und "alle" für allgemeines, sofortiges Wachstum aller Zellen. "Keine" steht für keine Resistenz/kein Wachstum und somit für Inhibitorsensitivität. Der Kinasedomänenmutationsstatus der resistenten Zellen wurde durch PCR und Sequenzierung bestimmt, wobei Doppel- und Dreifachmutationen der Kinasedomäne beobachtet wurden. Unter Zweit- und Drittlinientherapie bezeichnet **Fettdruck** Zelllinien, die bei den optimalen Inhibitorkonzentrationen auftraten (**Nilotinib 1700 nM, Dasatinib 100 nM**). Mit *Kursivschrift* sind dagegen resistente Zellen bezeichnet, die nur bei den niedrigeren Inhibitorkonzentrationen auftraten (*Nilotinib 850 nM, Dasatinib 50 nM*).

4.1.3 Effektivität von Dasatinib gegenüber Nilotinib als Zweit- und Drittlinieninhibitor in vitro

Von 24 Imatinib-Erstlinientherapieresistenten Zellklonen konnten 16 durch Zweitlinientherapie mit Dasatinib erfolgreich inhibiert werden, während fünf von ihnen Resistenz gegenüber Dasatinib bei einer Konzentration von 100 nM zeigten und weitere drei von ihnen Resistenz gegenüber Dasatinib bei einer Konzentration von 50 nM zeigten. Unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib wurde lediglich einer von 24 Imatinib-Erstlinientherapieresistenten Zellklonen durch Nilotinib sowohl bei der hohen als auch bei der niedrigen Konzentration inhibiert, während 13 von ihnen Nilotinib-resistent bei 1700 nM waren und weitere 10 von ihnen Nilotinib-resistent bei 850 nM waren. Von den 24 Zelllinien, die bereits gegen die Sequenz Imatinib-Nilotinib resistent waren, wurden fünf durch Drittlinientherapie mit Dasatinib erfolgreich inhibiert, zwölf waren resistent gegenüber Dasatinib bei 100 nM und weitere sieben waren Dasatinib-resistent bei 50 nM. Die neun Zelllinien, die bereits resistent gegenüber der Sequenz Imatinib-Dasatinib waren, konnten durch Drittlinientherapie mit Nilotinib nicht inhibiert werden, alle neun zeigten Wachstum bei der optimalen Nilotinibkonzentration von 1700 nM.

Mit anderen Worten lag die Effektivität von Dasatinib als Zweitlinientherapie nach Imatinib bei 79% (19/24) Inhibition bei der optimalen (klinisch erreichbaren) Konzentration und bei 75% (18/24) Inhibition bei der suboptimalen Konzentration. Für Dasatinib als Drittlinientherapie nach Imatinib-Nilotinib sanken die Werte auf 50% (12/24) Inhibition bei der optimalen Konzentration und auf 25% (6/24) Inhibition bei der suboptimalen Konzentration. Die Effektivität von Nilotinib als Zweitlinientherapie nach Imatinib lag bei 46% (11/24) Inhibition bei der optimalen Konzentration und bei 4% (1/24) Inhibition bei der suboptimalen Konzentration. Als Drittlinientherapie nach Imatinib-Dasatinib erreichte Nilotinib bei beiden Konzentrationen 0% (0/9) Inhibition. Insgesamt zeigte sich also, dass nach dem Auftreten von Imatinibresistenz in Gegenwart von BCR-ABL-Resistenzmutationen in vitro Dasatinib bei Konzentrationen, die den klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen entsprechen, Nilotinib überlegen ist, und dass insbesondere die Aktivität von Nilotinib von der optimalen Inhibitorkonzentration kritisch abhängig ist.

4.1.4 Die BCR-ABL-Mutationsprofile sind von Art und Reihenfolge der Tyrosinkinaseinhibition abhängig

Die vorherrschenden BCR-ABL-Mutationsprofile im vorliegenden Screen waren kreuzresistente Einzelmutationen und sequenziell erworbene zusammengesetzte Mutationen (compound-Mutationen). Diese beiden Mutationsmuster traten sowohl unter Dasatinib-Zweitlinientherapie/Nilotinib-Drittlinientherapie als auch unter Nilotinib-Zweitlinientherapie/Dasatinib-Drittlinientherapie auf. Eine graphische Übersicht geben die Abbildungen 16 und 17.

Zelllinien mit der T315I-Mutation als kreuzresistente Einzelmutation zeigten erwartungsgemäß sofortiges Wachstum in allen Replikaten unabhängig von der Art der Zweit- und Drittlinientherapie. Die Anzahl der T315I-Mutationen nahm im Verlauf des sequenziellen Screens allerdings kaum zu. T315I trat nur in einem Fall während der Zweitlinientherapie mit Dasatinib neu auf (Nr.14 in Tabelle 7) sowie in einem Fall während der Zweitlinientherapie mit Nilotinib (Nr. 9 in Tabelle 8).

Im Gegensatz dazu erwarben vier von neun Dasatinib-Zweitlinienresistenten Zelllinien und 13 von 24 Nilotinib-Zweitlinienresistenten Zelllinien compound-Mutationen unter Zweitlinientherapie. Unter Nilotinib-Drittlinientherapie zeigten wiederum vier von neun Nilotinib-resistenten Zelllinien die präexistierenden compound-Mutationen, und nur eine Mutation wurde neu erworben (Nr. 10 in Tabelle 7). Von den 21 Dasatinib-Drittlinienresistenten Zelllinien zeigten 15 compound-Mutationen, und von diesen 15 Zelllinien hatten sieben im Vergleich zu ihrem Mutationsstatus nach Zweitlinientherapie neue Mutationen erworben. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die sequenziell erworbenen compound-Mutationen.

Unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib wurde eine größere Häufigkeit resistenter Klone im Vergleich zur Zweitlinientherapie mit Dasatinib beobachtet, besonders bei der suboptimalen Konzentration von 850 nM (23/24 gegenüber 8/24 unter Dasatinib; Abb. 16B, 17B). Diese Klone zeigten zum größten Teil P-loop-Mutationen (L248V, G250E, E255K/V, Y253H), die entweder in imatinibresistenten Zelllinien präexistierten oder nach Nilotinib-Zweitlinientherapie neu hinzukamen (Abb. 17D). Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass P-loop-Mutationen die häufigste Gruppe von Mutationen sind, die klinische Imatinibresistenz vermitteln (Apperley 2007) und damit, dass zur vollständigen Hemmung der

P-loop Mutationen Y253H und E255V in vitro Nilotinibkonzentrationen im Bereich der klinisch erreichbaren Plasmakonzentrationen erforderlich sind (von Bubnoff, Manley et al. 2006).

Mutationen an den Positionen V299 und F317, die mit klinischer Dasatinibresistenz assoziiert sind (Soverini, Martinelli et al. 2006; Cortes, Jabbour et al. 2007; Soverini, Colarossi et al. 2007; Muller, Cortes et al. 2009), waren nur in einer imatinibresistenten Zelllinie präexistent (Nr.9 in Tabelle 7), die übrigen acht Fälle traten nach Zweit- oder Drittlinientherapie mit Dasatinib auf. Sie lagen in Gestalt von compound-Mutationen vor, in der Regel als Ergänzung zu präexistierenden P-loop Mutationen (Abb. 16D, 17G, Tab. 9). Obwohl sich Nilotinib gegen V299L und F317C/L/V als wirksam gezeigt hatte (von Bubnoff, Manley et al. 2006; Weisberg, Manley et al. 2006; Muller, Cortes et al. 2009), konnte eine Nilotinib-Drittlinientherapie das Wachstum resistenter Klone in dieser Situation im hier beschriebenen Screen nicht verhindern. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die präexistierenden P-loop Mutationen in Imatinib-Dasatinib-resistenten Zelllinien ursächlich dafür waren.

Insgesamt trat Dasatinib-Resistenz in bereits imatinibresistenten Zelllinien weniger häufig auf als Nilotinib-Resistenz, hauptsächlich aufgrund von vorbestehenden P-loop Mutationen. Unter Zweit- und Drittlinientherapie wurden häufig substanzspezifische Mutationen erworben, so dass compound-Mutationen entstanden. Zweitlinientherapieresistente Zelllinien neigten dabei auch zur Drittlinientherapieresistenz. Was die Drittlinientherapie betrifft, war Dasatinib bei einer Konzentration von 100 nM bei einem Teil der Imatinib-Nilotinib-resistenten Zelllinien wirksam, während Imatinib-Dasatinib-resistente Zelllinien stets auch resistent gegenüber Nilotinib-Drittlinientherapie waren. Die Inhibitorkonzentrationen waren kritische Determinanten der Resistenzentwicklung unter Zweit- und Drittlinientherapie.

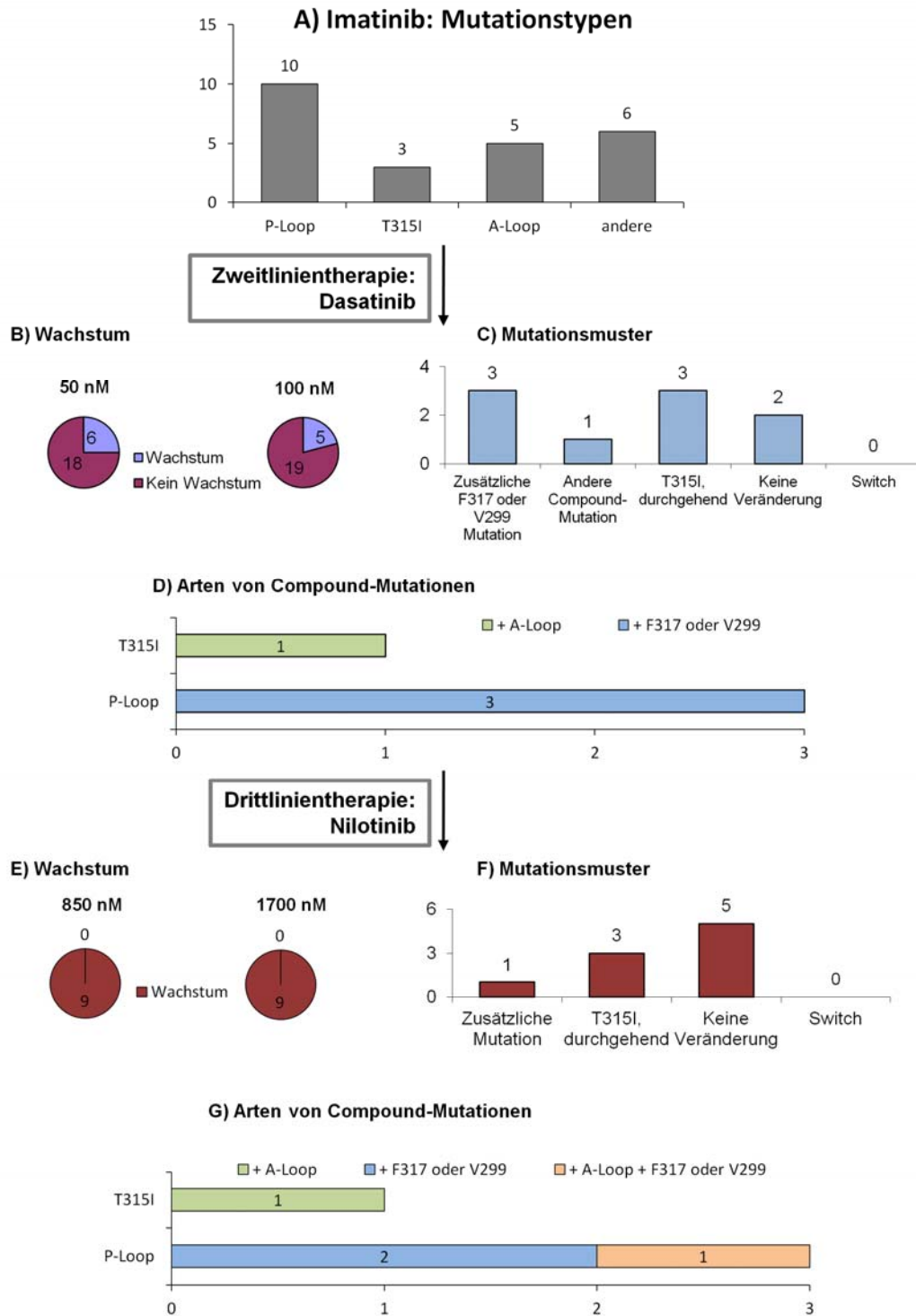


Abbildung 16: Sequenzielle Therapie mit Imatinib-Dasatinib-Nilotinib. **A**, Mutationstypen nach Erstlinientherapie mit Imatinib. **B**, Zellwachstum unter Zweitlinientherapie mit Dasatinib. **C**, Mutationsmuster unter Zweitlinientherapie mit Dasatinib. **D**, Zusammensetzung der compound-Mutationen nach Zweitlinientherapie mit Dasatinib. **E**, Zellwachstum unter Drittlinientherapie mit Nilotinib. **F**, Mutationsmuster unter Drittlinientherapie mit Nilotinib. **G**, Zusammensetzung der compound-Mutationen nach Drittlinientherapie mit Nilotinib.

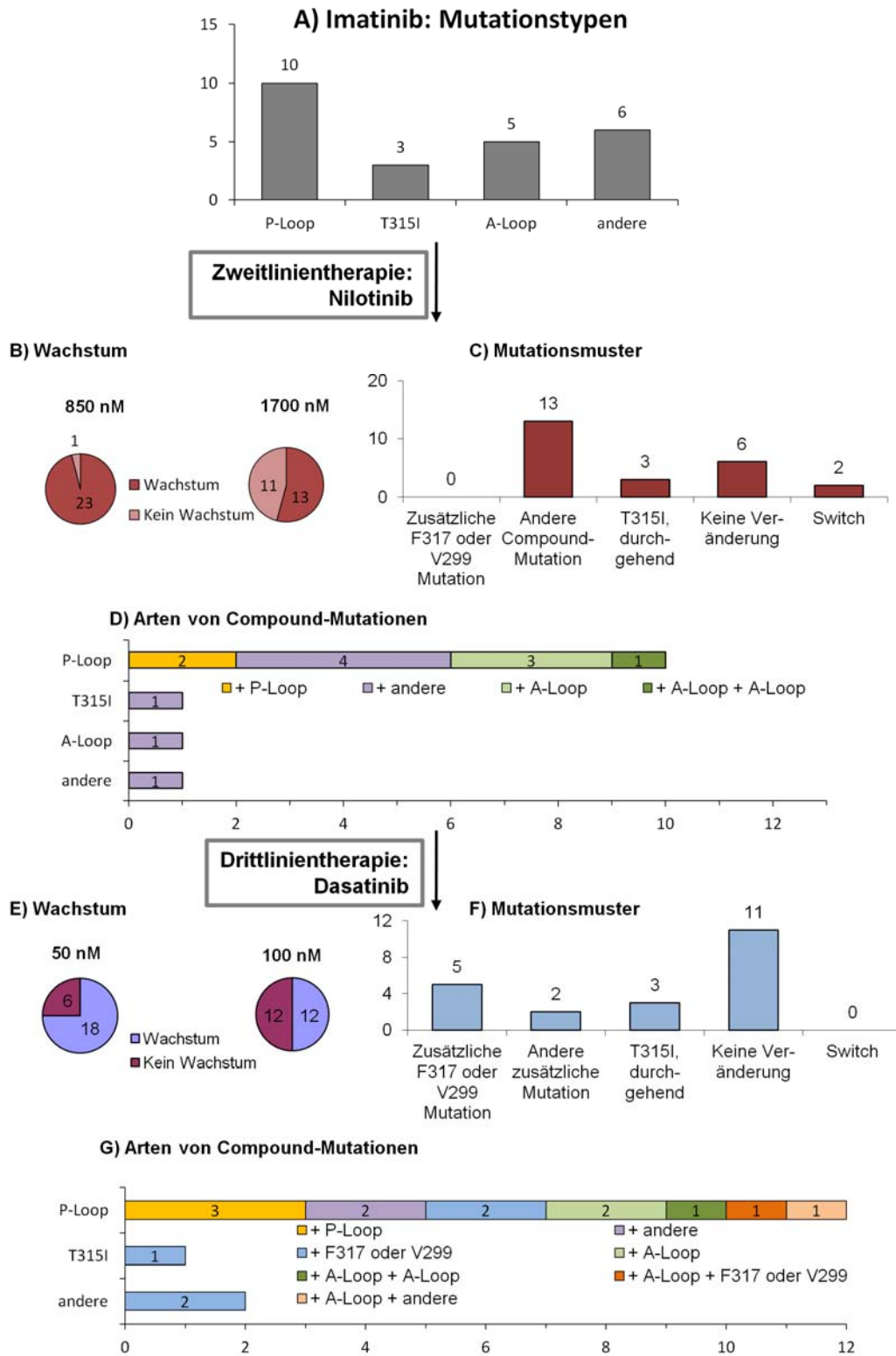


Abbildung 17: Sequenzielle Therapie mit Imatinib-Nilotinib-Dasatinib. **A**, Mutationstypen nach Erstlinientherapie mit Imatinib. **B**, Zellwachstum unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib. **C**, Mutationsmuster unter Zweitlinientherapie mit Nilotinib. **D**, Zusammensetzung der compound-Mutationen nach Zweitlinientherapie mit Nilotinib. **E**, Zellwachstum unter Drittlinientherapie mit Dasatinib. **F**, Mutationsmuster unter Drittlinientherapie mit Dasatinib. **G**, Zusammensetzung der compound-Mutationen nach Drittlinientherapie mit Dasatinib.

TKI-Sequenz	Mutation	Typ	Drittlinientherapie-Resistenz
Imatinib-Dasatinib	<i>Y253H/F317V</i>	P-loop/ABR	ja
	G250E/F317C	P-loop/ABR	ja*
	<i>Y253H/V299L</i>	P-loop/ABR	ja
	H396P/T315I	A-loop/ABR	ja
Imatinib-Dasatinib-Nilotinib	G250E/F317C/A380T	P-loop/ABR /A-loop	n.a.
Imatinib-Nilotinib	<i>L248V/E255V</i>	P-loop/P-loop	ja
	F317L/T315I	ABR/ABR	ja
	<i>G250E/E255K</i>	P-loop/P-loop	ja
	E255K/A380S	P-loop/A-loop	<i>ja*</i>
	<i>F359I/L248V</i>	SBR/P-loop	<i>ja</i>
	F359I/G250E	SBR/P-loop	<i>ja</i>
	H396P/G250E/A380S	A-loop/P-loop/A-loop	<i>ja</i>
	<i>H396P/E255V</i>	A-loop/P-loop	ja*
	F359I/E255K	SBR/P-loop	nein
	<i>E255K/L387M</i>	P-loop/A-loop	<i>ja</i>
	<i>E281K/Y253H</i>	C-helix/P-loop	nein
	<i>E281K/F359C</i>	C-helix/SBR	nein
	<i>H396P/F311I</i>	A-loop/ABR	nein
	Imatinib-Nilotinib-Dasatinib	E255V/F317L	P-loop/ABR
<i>Y253H/F317L</i>		P-loop/ABR	n.a.
<i>E255K/M244I</i>		P-loop/P-loop	n.a.
<i>E255K/A380S/V299L</i>		P-loop/A-loop/ABR	n.a.
<i>F359I/F317V</i>		SBR/ABR	n.a.
F359I/V299L		SBR/ABR	n.a.
H396P/E255V/T315A		A-loop/P-loop/ABR	n.a.

Tabelle 9: Überblick über Doppel- und Dreifachmutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne unter sequenzieller TKI-Therapie. Während der Medikamentensequenz Imatinib-Dasatinib-Nilotinib traten fünf compound-Mutationen auf, davon vier Doppelmutationen nach Dasatinib und eine Dreifachmutation nach Nilotinib. Die Medikamentensequenz Imatinib-Nilotinib-Dasatinib lieferte 20 compound-Mutationen, davon zwölf Doppelmutationen und eine Dreifachmutation nach Nilotinib sowie fünf Doppelmutationen und zwei Dreifachmutationen nach Dasatinib. Die compound-Mutationen sind hier in der Reihenfolge des Auftretens der einzelnen Mutationen benannt, z.B. bedeutet unter Behandlung mit Imatinib-Dasatinib-Nilotinib die Bezeichnung G250E/F317C/A380T, dass sich G250E unter Imatinib entwickelte, F317C unter Dasatinib hinzukam und A380T unter Nilotinib entstand. **Fettdruck** bezeichnet Mutationen, die bei den optimalen Inhibitorkonzentrationen auftraten (**Dasatinib 100 nM, Nilotinib 1700 nM**), mit *Kursivschrift* sind die Mutationen bezeichnet, die bei den suboptimalen Inhibitorkonzentrationen auftraten (*Dasatinib 50 nM, Nilotinib 850 nM*). Der Mutationstyp sowie das Resistenzverhalten gegenüber Drittlinientherapie sind ebenfalls angegeben. ABR,

ATP binding region; SBR, substrate binding region; n.a., nicht anwendbar. * bezeichnet die Entwicklung einer zusätzlichen Mutation unter Drittlinientherapie.

4.1.5 BCR-ABL-unabhängige Resistenzmechanismen tragen zur sequenziellen TKI-Resistenz bei

In einem weiteren Experiment wurden die Resistenzmechanismen, die der sequenziellen TKI-Resistenz zugrundeliegen, näher beleuchtet. Hierzu wurden sequenziell resistente Zelllinien aus dem sequenziellen Screen in Kultur genommen, mit Imatinib, Dasatinib oder Nilotinib inkubiert, lysiert und im Western Blot im Hinblick auf BCR-ABL-Expression und -Phosphorylierung untersucht. Die Inhibitorkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie der Inhibitorkonzentration beim jeweiligen Auftreten der resistenten Zelllinie entsprachen. Falls dies nicht anwendbar war, wurde die niedrigere der beiden im Screen verwendeten Inhibitorkonzentrationen verwendet, um eine etwaige Restphosphorylierung nicht vollständig zu unterdrücken. In Abbildung 18A ist eine Ba/F3 Mig p185 BCR-ABL-Wildtyp-Kontrolle abgebildet, die zeigt, dass unter der Tyrosinkinaseinhibitortherapie die BCR-ABL-Level konstant bleiben und die Phosphorylierung erwartungsgemäß verschwindet.

Es wurden vier Zelllinien-Sequenzen näher analysiert. Als erstes wurden die Zelllinien mit den Mutationen E255K und E255K/A380S (Nr. 13 in Tabelle 8, Abbildung 18A) betrachtet. Sowohl bei der Imatinib-resistenten Zelllinie E255K, als auch bei der nachfolgenden Imatinib-Nilotinib-resistenten Zelllinie E255K/A380S, die bei einer Nilotinibkonzentration von 1700 nM als Einzelklon aus der Zelllinie E255K hervorging, zeigte sich eine konstante BCR-ABL-Expression. Unter Behandlung mit Imatinib zeigte sich die BCR-ABL-Phosphorylierung bei E255K erhalten, bei Behandlung mit Nilotinib oder Dasatinib wurde sie dagegen weitgehend unterdrückt. Die Imatinib-Nilotinib-resistente Zelllinie E255K/A380S wies unter Imatinib- und Nilotinib-Behandlung eine erhaltene BCR-ABL-Phosphorylierung auf, während die Phosphorylierung unter Dasatinib verschwand. Somit liegt hier am ehesten ein BCR-ABL-abhängiger und mutationsabhängiger Resistenzmechanismus vor: Die E255K-Mutation verursacht die initiale Imatinibresistenz, A380S liefert die zusätzliche Nilotinibresistenz und verstärkt die Imatinibresistenz.

Als nächstes wurde die Zellliniensequenz G250E – G250E/F317C - G250E/F317C/A380T untersucht (Nr. 10 in Tabelle 7, Abbildung 18B). Bei der Imatinib-resistenten Zelllinie G250E und der daraus unter Behandlung mit Dasatinib als Einzelklon hervorgehenden Zelllinie G250E/F317C zeigte sich der BCR-ABL-Expressionslevel konstant. Die BCR-ABL-Phosphorylierung bei G250E blieb unter Imatinib-Behandlung in reduzierter Form erhalten, unter Dasatinib und Nilotinib verschwand sie fast vollständig. Bei G250E/F317C war nach TKI-Behandlung eine stärkere Restphosphorylierung vorhanden. Es ist anscheinend ein BCR-ABL-abhängiger Resistenzmechanismus vorhanden, der durch die zusätzliche F317C-Mutation zustande kommt. In der unter Nilotinib-Behandlung als Einzelklon aus der Zelllinie G250E/F317C hervorgehenden Zelllinie G250E/F317C/A380T kam es zu einer deutlichen Zunahme der BCR-ABL-Expression, es lag eine BCR-ABL-Überexpression vor. Die BCR-ABL-Phosphorylierung war unter TKI-Behandlung in diesem Zellklon weiterhin vorhanden. Am ehesten liegt hier ein Kombinationseffekt aus BCR-ABL-Überexpression und mutationsabhängiger Resistenzerhöhung durch die zusätzliche A380T-Mutation vor.

Des Weiteren wurden Sequenzen von Zelllinien mit durchgehender schwacher BCR-ABL-Mutation (d.h. mit niedrigem IC_{50} -Wert) analysiert. Zuerst wurde eine Zellliniensequenz mit konstanter L248V-Mutation untersucht, wobei die Zelllinie, die nach Imatinib-Behandlung auftrat, als L248V-1 bezeichnet wird, die nach Nilotinib als L248V-2 und die nach Dasatinib als L248-3 (Nr. 6 in Tabelle 8, Abbildung 18C). Die BCR-ABL-Expression blieb in dieser Folge sequenziell resistenter Zelllinien konstant, eine BCR-ABL-Überexpression trat nicht auf. Die BCR-ABL-Phosphorylierung blieb in L248-2 und L248-3 gut erhalten, unabhängig vom eingesetzten Inhibitor. Es besteht am ehesten ein BCR-ABL-unabhängiger, mutationsunabhängiger Resistenzmechanismus, z.B. möglicherweise eine zelluläre Pumpe, die den Tyrosinkinaseinhibitor aus dem Zellinneren entfernt.

Die vierte untersuchte Zellliniensequenz zeigte eine durchgehende E281K-Mutation, die in der Regel, genau wie L248V, nur schwache TKI-Resistenz verleiht. Die Zelllinien werden als E281K-1, E281K-2 und E281K-3 bezeichnet (Nr. 23 in Tabelle 7, Abbildung 18D). Die BCR-ABL-Expression blieb hier im Verlauf konstant. Eine BCR-ABL-Phosphorylierung war ab dem Dasatinib-resistenten, als Einzelklon aus E281K-1 hervorgegangenen Zellklon E281K-2 kaum mehr nachweisbar. Es liegt somit am ehesten ein BCR-ABL-unabhängiger Resistenzmechanismus vor.

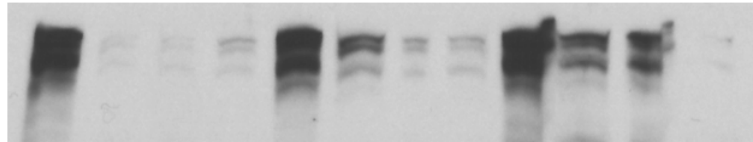
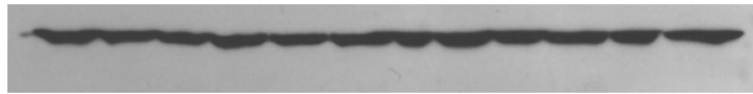
A

Zelllinie:	p185wt				E255K				E255K/A380S			
Inhibitor:	w/o	Ima	Nilo	Dasa	w/o	Ima	Nilo	Dasa	w/o	Ima	Nilo	Dasa
Konzentr./nM:	-	4000	850	50	-	4000	850	50	-	4000	1700	50

BCR-ABL



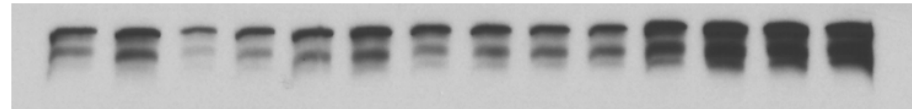
P-Tyrosin

 β -Actin

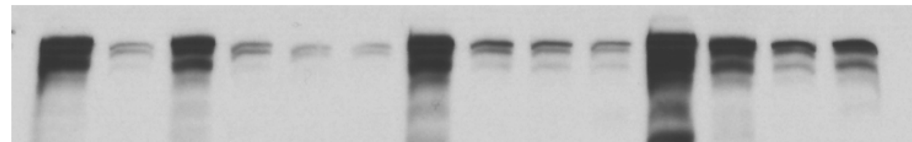
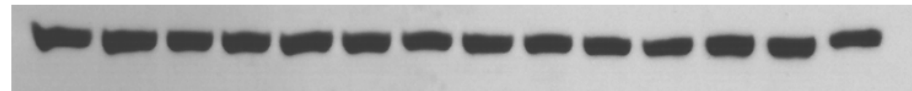
B

Zelllinie:	p185wt		G250E				G250E/F317C				G250E/F317C/A380T			
Inhibitor:	w/o	Ima	w/o	Ima	Dasa	Nilo	w/o	Ima	Dasa	Nilo	w/o	Ima	Dasa	Nilo
Konzentr./nM:	-	4000	-	4000	50	850	-	4000	100	850	-	4000	100	1700

BCR-ABL



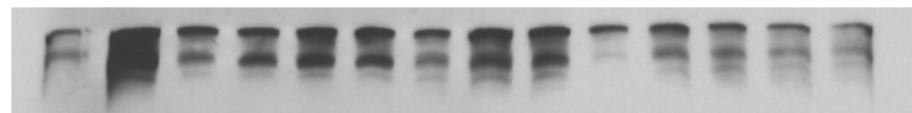
P-Tyrosin

 β -Actin

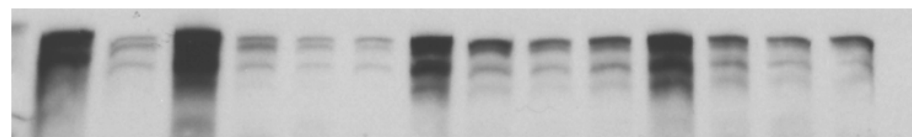
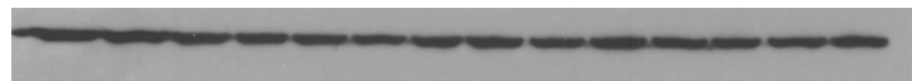
C

Zelllinie:	p185wt		L248V-1				L248V-2				L248V-3			
Inhibitor:	w/o	Ima	w/o	Ima	Nilo	Dasa	w/o	Ima	Nilo	Dasa	w/o	Ima	Nilo	Dasa
Konzentr./nM:	-	4000	-	4000	850	50	-	4000	850	50	-	4000	850	100

BCR-ABL



P-Tyrosin

 β -Actin

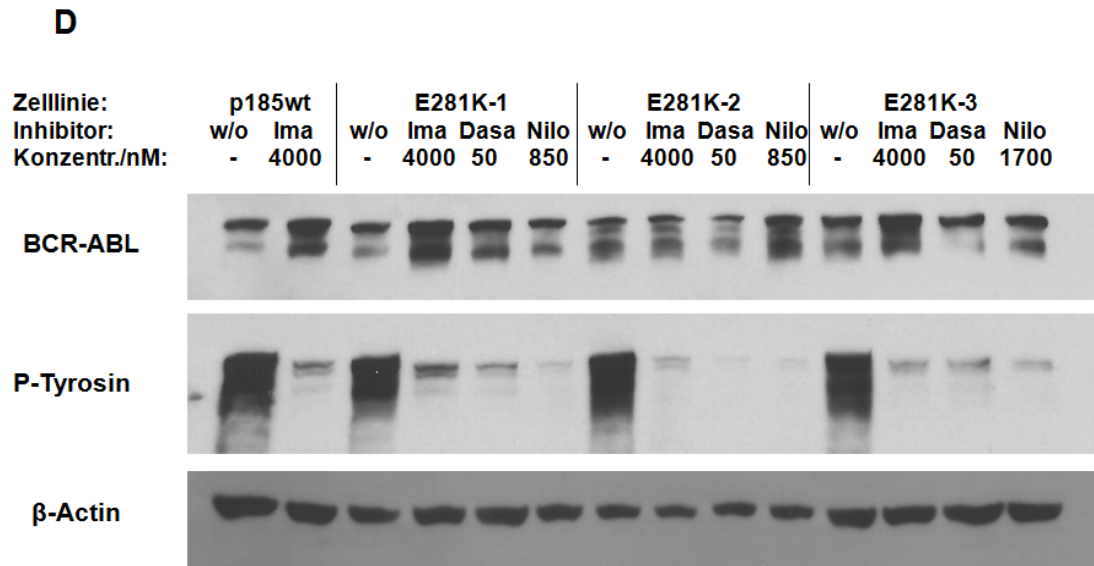


Abbildung 18: Expression und Phosphorylierung von BCR-ABL in sequenziell Tyrosinkinaseinhibitor-resistenten Zelllinien nach Behandlung mit Imatinib, Dasatinib oder Nilotinib. Ba/F3 Zellen mit Wildtyp p185 BCR-ABL und mutiertem p185 BCR-ABL aus dem sequenziellen Screening-Experiment wurden bei einer Konzentration von 8×10^5 /ml kultiviert und mit Imatinib, Dasatinib oder Nilotinib in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, entsprechend dem Behandlungsregime, das im Screen angewendet wurde. Nach 2,5 h wurden die Zellen lysiert, eine SDS-PAGE wurde durchgeführt und die BCR-ABL-Expression und -Phosphorylierung wurden im Western Blot analysiert. Die β -Actin-Expression dient als Ladekontrolle. **A**, Die Zelllinien E255K (nach Imatinib) und E255K/A380S (nach Nilotinib), Sequenz Nr.13 in Tabelle 8. **B**, Die Zelllinien G250E (nach Imatinib), G250E/F317C (nach Dasatinib) und G250E/F317C/A380T (nach Nilotinib), Sequenz Nr.10 in Tabelle 7. **C**, Die Zelllinien L248V-1 (nach Imatinib), L248V-2 (nach Nilotinib) und L248V-3 (nach Dasatinib), Sequenz Nr.6 in Tabelle 8. **D**, Die Zelllinien E281K-1 (nach Imatinib), E281K-2 (nach Dasatinib) und E281K-3 (nach Nilotinib), Sequenz Nr.23 in Tabelle 7.

wt, Wildtyp; w/o, without/ohne Inhibitor; Ima, Imatinib; Nilo, Nilotinib; Dasa, Dasatinib; Konzentr., Inhibitorkonzentration; P-Tyrosin, Phosphotyrosin.

4.2 Die Substanz 4SC-203 als NPM-ALK Inhibitor

4.2.1 Wirkung von 4SC-203 auf NPM-ALK-abhängige Ba/F3 Zellen

Die niedermolekulare Verbindung 4SC-203 wurde als neuer Tyrosinkinaseinhibitor mit multiplen Zielen (multi-target kinase inhibitor) entwickelt. Um den Effekt von 4SC-203 auf ALK-positive Lymphome zu untersuchen, wurden zunächst in vitro Experimente mit MigRI NPM-ALK-transfizierten Ba/F3 Zellen durchgeführt. In einem MTS-basierten Zellwachstumsassay wurde die Proliferation von Ba/F3 NPM-ALK Zellen durch 4SC-203 deutlich gehemmt, mit einem IC_{50} -Wert von 362 nM (Abbildung 19). Die Proliferation von parentalen Ba/F3 Zellen blieb dagegen vollständig unbeeinträchtigt, selbst bei Inhibitorkonzentrationen von 10 μ M.

Der antiproliferative Effekt von 4SC-203 auf Ba/F3 NPM-ALK Zellen korrelierte mit einer dosisabhängigen Reduktion der Autophosphorylierung von NPM-ALK (Abbildung 20; gezeigt wird die Phosphorylierung am NPM-ALK Aminosäurerest Y664, der dem Y1604-Rest von ALK entspricht). Die Behandlung von Ba/F3 NPM-ALK Zellen mit 4SC-203 führte nach einer Inkubationszeit von 6 h zu einer bedeutenden Verringerung der Phosphorylierung von NPM-ALK, mit einem IC_{50} -Wert von weniger als 312,5 nM. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass 4SC-203 auf NPM-ALK-abhängiges Zellwachstum einen spezifischen inhibitorischen Effekt ohne unspezifische Toxizität ausübt.

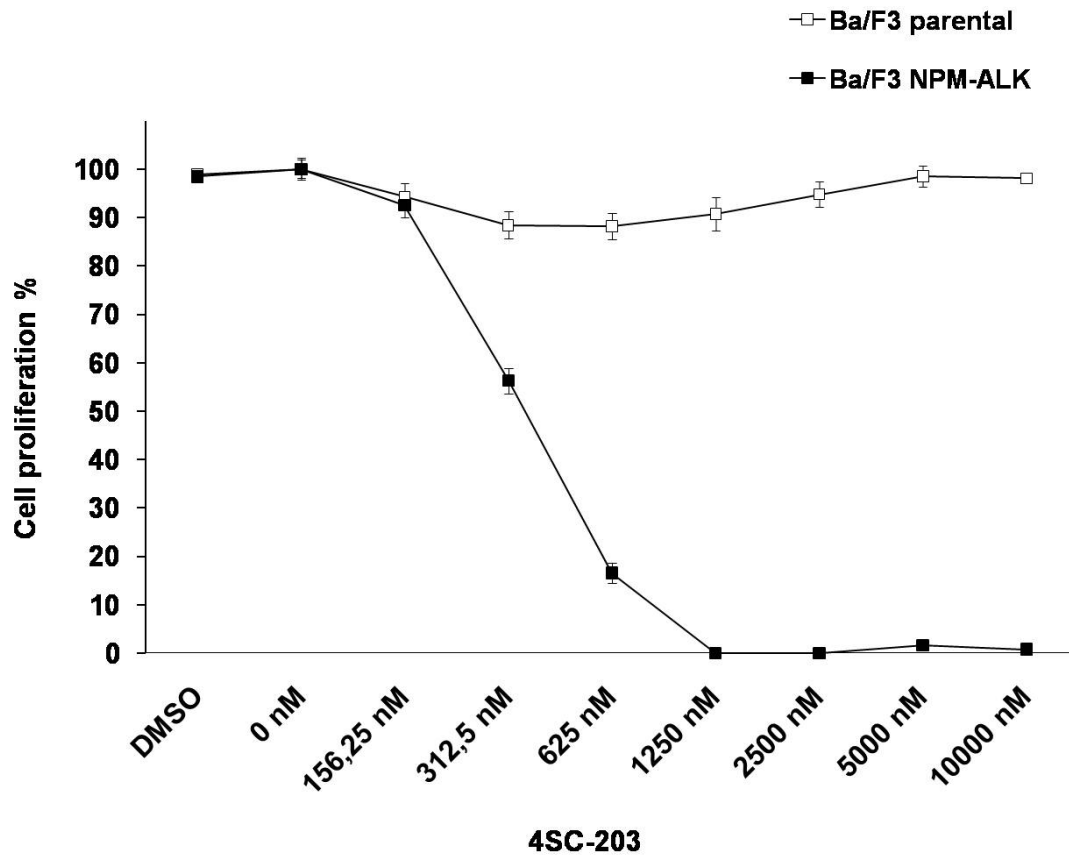
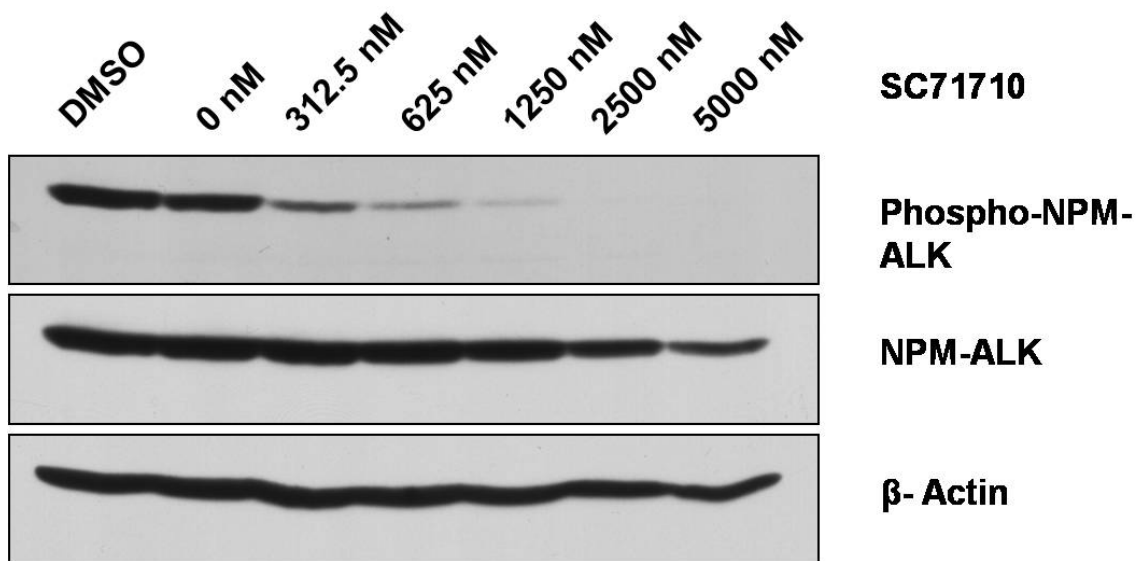


Abbildung 19: 4SC-203 hemmt die Zellproliferation von MigRI NPM-ALK transfizierten Ba/F3 Zellen ohne parentale Ba/F3 Zellen zu schädigen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 /ml ausplattiert und 48 h lang mit Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Proliferation wurde im MTS-Assay gemessen. Die Werte sind als Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung angegeben.



Ba/F3 MIG NPM-ALK

Abbildung 20: 4SC-203 hemmt die Phosphorylierung von NPM-ALK in Ba/F3 NPM-ALK Zellen. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 8×10^5 /ml kultiviert und mit seriellen Inhibitorverdünnungen inkubiert. 4SC-203 wird alternativ als SC71710 bezeichnet. Nach 6 h wurden die Zellen lysiert und die Kinaseaktivität wurde durch Western blot analysiert. Als Ladekontrolle dient β -Actin.

4.2.2 Wirkung von 4SC-203 auf humane NPM-ALK positive Zelllinien

Um den Effekt von 4SC-203 auf primäre humane Lymphomzelllinien zu evaluieren, wurde die Aktivität der Verbindung gegen die NPM-ALK-positiven humanen Zelllinien Karpas299, SU-DHL1 und JB6 untersucht. Die NPM-ALK-negativen, humanen Hodgkin-Lymphomzellen HDLM2 wurden als Kontrolle verwendet. Proliferationsstudien zeigten eine beträchtliche wachstumshemmende Wirkung von 4SC-203 mit einer IC_{50} von 260 nM auf Karpas299 Zellen, mit einer IC_{50} von 210 nM auf SU-DHL1 Zellen und mit einer IC_{50} von 140 nM auf JB6 Zellen (Abbildung 21). Der antiproliferative Effekt gegenüber NPM-ALK-negativen HDLM2 Zellen war geringfügig, bei einer 4SC-203 Konzentration von 625 nM betrug die Überlebensrate von HDLM2 Zellen 70,2%, im Vergleich dazu 29,8% bei Karpas299 Zellen, 0% bei SU-DHL1 Zellen und 3,6% bei JB6 Zellen.

Die NPM-ALK Autophosphorylierung in primären humanen Lymphomzelllinien wurde durch Behandlung mit 4SC-203 deutlich verringert (Abbildung 22). Eine Inhibitorkonzentration von 250 nM, nahe den in den Proliferationsassays ermittelten IC₅₀-Werten, reichte aus, um nach einer Inkubationszeit von 6 h die Phosphorylierung von NPM-ALK in Karpas299, JB6 und SU-DHL1 Zellen vollständig zu unterdrücken. Die hohe Wirksamkeit von 4SC-203 gegen NPM-ALK positive humane Lymphomzelllinien und seine Selektivität für NPM-ALK-abhängige Zellen machen die Verbindung zu einem geeigneten Kandidaten für in vivo Experimente und klinische Studien.

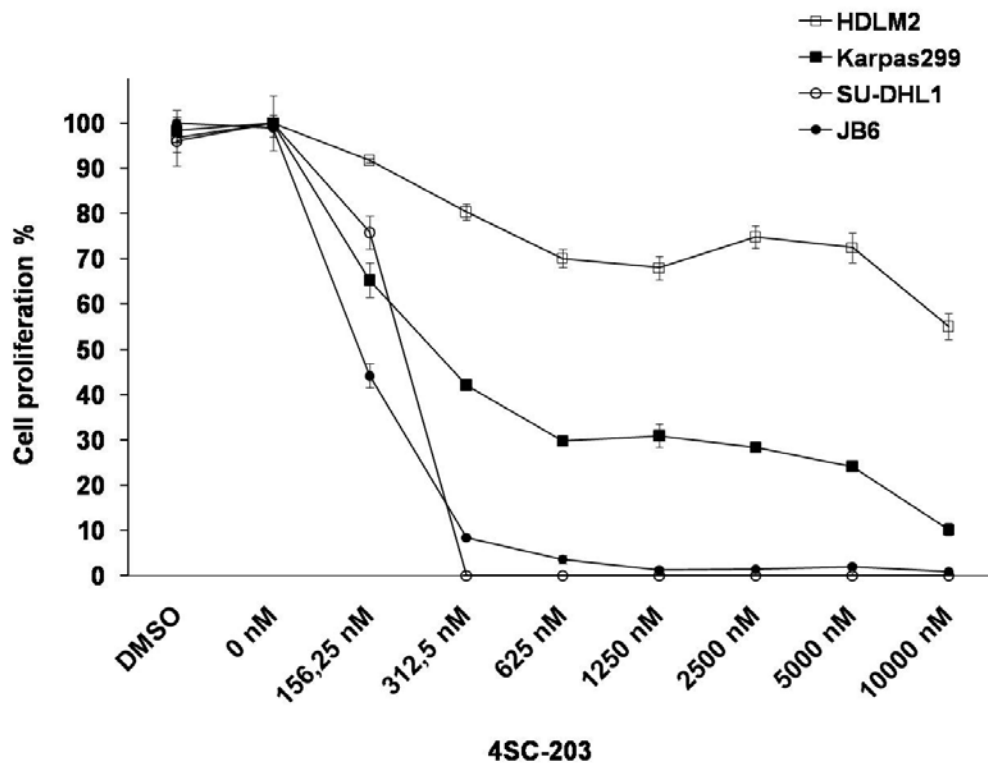


Abbildung 21: 4SC-203 hemmt die Proliferation der humanen NPM-ALK positiven Lymphomzelllinien Karpas299, SU-DHL1 und JB6 mit nur geringer Toxizität gegenüber HDLM2 Hodgkin-Lymphom Kontrollzellen. Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 1×10^5 /ml kultiviert und mit Inhibitor in den angegebenen Konzentrationen 48 h lang inkubiert. Die Proliferation wurde in einem MTS-Assay gemessen. Die Werte sind als Mittelwert einer Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung angegeben.

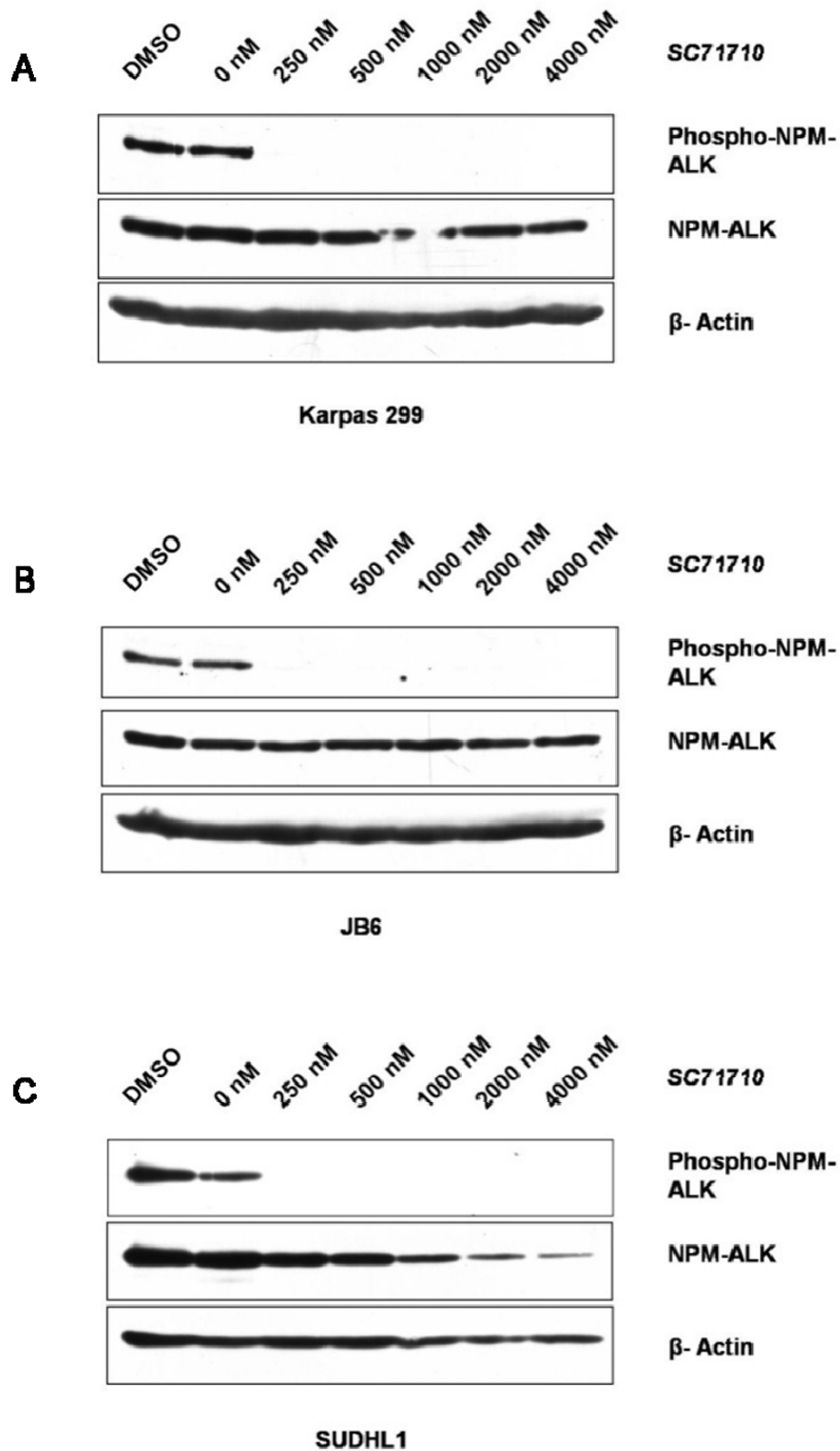


Abbildung 22: 4SC-203 hemmt die Phosphorylierung von NPM-ALK in humanen NPM-ALK positiven Lymphomzelllinien. A, Karpas299, B, JB6, C, SU-DHL1. Die Zellen wurden jeweils bei einer Konzentration von 8×10^5 /ml kultiviert und 6 h lang mit seriell verdünntem Inhibitor behandelt. 4SC-203 wird alternativ als SC71710 bezeichnet. Nach der Zellyse und SDS-PAGE wurde die Kinaseaktivität durch Western blot analysiert. β -Actin dient als Ladekontrolle.

5 Diskussion

5.1 Sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitortherapie in vitro und klinisch

5.1.1 Mutationsstatus und Wachstumsverhalten

Derzeit erhalten die meisten Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in chronischer Phase eine Erstlinientherapie mit Imatinib. Die Inhibitoren der zweiten Generation, Dasatinib und Nilotinib, werden als Zweit- und Drittlinientherapie gegeben, wenn Imatinibresistenz oder –unverträglichkeit auftritt. Vor kurzem wurden sie auch zur Erstlinientherapie der CP-CML zugelassen. Viele Patienten werden derzeit mit einer Sequenz aus drei oder mehr ABL-Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt. Daten aus klinischen Studien lassen darauf schließen, dass dieses therapeutische Vorgehen zum Auftreten von bestimmten Mutationsmustern führt, beispielsweise zur Selektion der panresistenten T315I-Mutation oder zum Erwerb zusätzlicher, medikamentenspezifischer Mutationen. Diese können auch in Form von compound-Mutationen (d.h. von mehreren Mutationen auf dem gleichen BCR-ABL-Transkript) auftreten oder in Form von multiplen Mutationen, im Sinne von mehreren Mutationen in unterschiedlichen Zellklonen im selben Patienten (Cortes, Jabbour et al. 2007; Shah, Skaggs et al. 2007; Soverini, Gnani et al. 2009). Durch Simulierung einer sequenziellen Tyrosinkinaseinhibitortherapie im Zellkulturmodell wurde es in dieser Arbeit möglich, die Auswirkungen einer solchen Therapie auf das Wachstumsverhalten und den Mutationsstatus der ABL-Kinase in BCR-ABL positiven Zellen aufzudecken und die zellulären Wachstumsmuster mit dem Mutationsstatus zu korrelieren. Die Evolution individueller Mutationen konnte in Abhängigkeit von Reihenfolge und Konzentration der Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib, die in identischen Replikaten imatinibresistenter Zelllinien sequenziell angewandt wurden, nachverfolgt werden. Es wurden Inhibitorkonzentrationen verwendet, die den therapeutisch erreichbaren Plasma-Talkonzentrationen entsprechen (4 μM für Imatinib 800 mg einmal täglich, 1700 nM für Nilotinib 400 mg zweimal täglich und 100 nM für Dasatinib 70 mg zweimal täglich als „optimale“ Konzentrationen) und für die Zweit-/Drittlinientherapie auch „suboptimale“ Konzentrationen von 850 nM Nilotinib und 50 nM Dasatinib (Peng, Hayes et al. 2004; Sawyers, Kantarjian et al. 2005; Kantarjian, Giles et al. 2006; Kantarjian, Giles et al. 2007).

Da die zugrundeliegenden Experimente in der Zellkultur durchgeführt wurden, konnte der zelluläre Mutationsstatus mit zellulären Wachstumsmustern verglichen werden. Sofortige Resistenz gegenüber der Inhibitortherapie der nächsten Linie mit allgemeinem Wachstum in allen Replikaten ohne Änderung im Mutationsstatus war mit starken vorbestehenden Mutationen vergesellschaftet. Dazu gehören kreuzresistente Einzelmutationen wie die T315I-Mutation bei allen drei getesteten Inhibitoren, die Y253H- oder E255V-Mutationen bei Imatinib und Nilotinib sowie auch Kombinationen von Mutationen wie z.B. Y253H/F317V, die jeweils zu sequenzieller Inhibitorresistenz führten. Andererseits konnten in unter sequenzieller Inhibitortherapie neu aufgetretenen resistenten Einzelklonen neu erworbene Mutationen nachgewiesen werden, wie in der Folge H396P (Einzelklon, imatinibresistent) – H396P/E255V (Einzelklon, nilotinibresistent) – H396P/E255V/T315A (Einzelklon, dasatinibresistent), die das Resistenzspektrum der Zellklone jeweils um die neu hinzukommende Inhibitorsubstanz erweiterten. Dieses Wachstums-/Resistenzverhalten erinnert an die Entwicklung multiresistenter Bakterienstämme und ist mit einem stufenweisen Prozess der Aneignung zusätzlicher Mutationen in einem malignen Zellklon vereinbar. Dieses Phänomen könnte die Effektivität der sequenziellen Tyrosinkinaseinhibitortherapie bei imatinibresistenten Patienten mit mutierter ABL-Kinasedomäne einschränken.

5.1.2 Mutationsabhängige sequenzielle Inhibitorresistenz

Der sequenzielle Erwerb von Mutationen der Kinasedomäne während der TKI-Therapie stellt bei der CML eine klinische Herausforderung dar (Cortes, Jabbour et al. 2007; Branford, Melo et al. 2009). In diesem Zusammenhang wurden die Mutationen F317L/I/C/V, V299L, T315A und T315I für Dasatinib als SGI- (second generation inhibitor-) klinisch relevante Mutationen klassifiziert. Die Mutationen Y253H, E255K/V, F359V/C and T315I wurden für Nilotinib als SGI-klinisch relevante Mutationen klassifiziert (Branford, Melo et al. 2009). Beispielsweise wurden fast alle diese Mutationen als neu erworbene Mutationen in einer klinischen Studie mit 95 Patienten, die Dasatinib oder Nilotinib als Zweit- oder Drittlinientherapie erhielten, beobachtet, und ein Fortschreiten der Erkrankung war in 83% der Fälle mit dem Auftreten neu erworbener Mutationen verbunden (Soverini, Gnani et al. 2009). Eine Studie mit 17 Patienten, die sequenziell mit Imatinib und Dasatinib behandelt wurden, zeigte bei allen Patienten neu

erworbene Mutationen; bei vier Patienten wurden nach Zweitlinientherapie mit Dasatinib Mutationen in den Codons 299 oder 317 beobachtet und bei 12 Patienten trat T315I neu auf (Shah, Skaggs et al. 2007).

In den *in vitro*-Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine Akkumulation von T315I nach Zweit- oder Drittlinientherapie: T315 trat in einem Fall nach Dasatinibtherapie und in einem Fall nach Nilotinibtherapie als neue Mutation auf. Jedoch zeigten die Zellen, die die T315I-Mutation trugen, eine ausgeprägte Inhibitorresistenz unter sequenzieller TKI-Therapie, was die Notwendigkeit einer Substanz mit Aktivität gegen T315I erneut deutlich macht. Eine Reihe von Molekülen hat diesbezüglich in präklinischen und klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse gezeigt (Giles, Cortes et al. 2007; Gontarewicz, Balabanov et al. 2008; Weisberg, Choi et al. 2010; Zhang, Adrian et al. 2010), darunter auch der BCR-ABL-Inhibitor Ponatinib und die Verbindung Homoharringtonine (Omacetaxine), die einen von der Tyrosinkinaseinhibition unabhängigen Wirkmechanismus hat (Cortes-Franco, Khoury et al. 2009; Cortes, Talpaz et al. 2010).

Das häufige Auftreten zusätzlicher Aminosäureaustausche an den Positionen F317 und V299 nach Zweit- oder Drittlinientherapie mit Dasatinib in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten ist mit dem Auftreten dieser Mutationen in anderen *in vitro*-Screens gut vereinbar (Burgess, Skaggs et al. 2005; Bradeen, Eide et al. 2006). Es stimmt auch mit den klinischen Befunden überein, die zeigen, dass bei Patienten mit einer F317L-Mutation, die nach Imatinibresistenz mit Dasatinib behandelt wurden, die zytogenetischen Ansprechensraten vergleichsweise niedrig sind, und dass F317L und V299L (abgesehen von T315I) die am häufigsten neu nachgewiesenen Mutationen nach dem Auftreten klinischer Dasatinibresistenz sind (Muller, Cortes et al. 2009). Eine ähnliche Beziehung besteht für Nilotinib und P-Loop-Mutationen, denn das häufige Auftreten von P-Loop-Mutationen nach Zweitlinientherapie mit Nilotinib in unserer Untersuchung passt zu der beobachteten Entwicklung von P-Loop-Mutationen in Screens für Erstlinien-Nilotinibresistenz (von Bubnoff, Manley et al. 2006; Ray, Cowan-Jacob et al. 2007). P-Loop Mutationen (E255K/V, G250E, Y253H) waren zusammen mit T315I und F359C/V die klinisch am häufigsten detektierten neuen Mutationen unter Nilotinibtherapie zum Zeitpunkt des Fortschreitens der Erkrankung (Hughes, Saglio et al. 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Wirksamkeit der Inhibitorsequenz Imatinib-Nilotinib durch präexistierende P-Loop-Mutationen und compound-Mutationen, die P-Loop-Mutationen enthielten und unter Nilotinibtherapie her-

vortraten, begrenzt war. Die Zweitlinientherapie mit Nilotinib begünstigte damit stark die Selektion zusätzlicher P-Loop-Mutationen (in 8 von 13 Fällen), wohingegen die Inhibitorsequenz Imatinib-Dasatinib weniger verwundbar gegenüber P-Loop-Austauschen war. Dasatinib-spezifische Mutationen, wie z.B. F317C/V und V299L, traten nicht vor der Behandlung mit Dasatinib auf. Allerdings zeigte sich für Nilotinib als Zweitlinientherapie ein starker Dosisseffekt. Die optimale, d.h. klinisch erreichbare Konzentration von 1700 nM führte zu einer Anreicherung der starken P-loop-Mutationen Y253H und E255K/V sowie des T315I Aminosäureaustauschs, doch war sie im Gegensatz zu der suboptimalen Konzentration von 850 nM immer noch in der Lage, das Wachstum imatinibresistenter Zelllinien zu unterdrücken, die andere P-loop-Mutationen wie L248V oder G250E, Mutationen der C-helix (E281K), der Substratbindungsregion (F359I) oder des A-loop (H396P) trugen.

5.1.3 Compound-Mutationen und multiple Mutationen

Es ist vorgeschlagen worden, dass compound-Mutationen das Ansprechen auf Inhibitoren in unvorhergesehener Weise modulieren und es dadurch komplexer machen, das Ansprechen vorauszusagen (Branford, Melo et al. 2009). In diesem Zusammenhang können die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, Vorhersagen bezüglich des Ansprechens auf eine Drittlinien-Inhibitortherapie zu machen. Wenn wir die compound-Mutationen betrachten, die nach der Zweitlinientherapie mit Dasatinib auftreten (Tab. 7), dann stellen wir fest, dass sie alle auch eine Resistenz gegen Nilotinib als Drittlinientherapie zeigten. Alle außer einer von ihnen bestehen aus einer Mutation an Position F317 oder V299, die die Dasatinib-Resistenz erklären kann, und einer P-loop-Mutation, welche die darauffolgende Nilotinibresistenz erklären kann (die einzige Ausnahme, H396P/T315I, kombinierte eine A-loop-Mutation mit der panresistenten T315I Mutation). Die compound-Mutationen, die während der Inhibitorsequenz Imatinib-Dasatinib auftraten, brachten also auch eine Inhibitorresistenz gegenüber der Drittlinientherapie mit Nilotinib mit sich. Im Gegensatz dazu war Dasatinib als Drittlinientherapie in der Lage, das Wachstum Imatinib-Nilotinib-resistenter Zelllinien mit compound-Mutationen in vier von 13 Fällen zu unterdrücken. Übertragen auf die Klinik bedeutet das, dass die Anwendung von Dasatinib als Drittlinientherapie bei Patienten mit compound-Mutationen nach Resistenzentwicklung gegen Imatinib-Nilotinib eine sinnvolle Option sein kann. Allerdings wurde auch gezeigt, dass Nilotinib klinische Aktivität bei der CML nach der Entwicklung von Imatinib-

und Dasatinib-Resistenz haben kann, auch bei Patienten mit präexistierenden Mutationen wie F317L (Giles, Abruzzese et al. 2010). Es könnte also sein, dass unser in vitro-System die Aktivität von Nilotinib als Drittlinientherapie bei CML-Patienten mit Imatinib- und Dasatinibresistenz unterschätzt. Die hier vorgelegten Ergebnisse betonen jedoch die Notwendigkeit einer optimalen Dosierung von Nilotinib bei Patienten mit imatinibresistenter CML mit BCR-ABL-Mutationen. Die Sicherstellung der Patientencompliance zur Vermeidung einer Unterdosierung ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig.

Das häufige Auftreten von compound-Mutationen in unserem Resistenz-Screen legt nahe, dass ein Teil der Konstellationen, die unter sequenzieller TKI-Therapie in Patienten beobachtet und als “multiple Mutationen” zusammengefasst wurden, tatsächlich compound-Mutationen in sequenziell resistenten Zellklonen sein könnten, was eine sequenzielle Monotherapie zu einem weit weniger wirksamen Konzept für diese Patienten machen würde, als sie es im Fall von polyklonaler Resistenz wäre. In einer aktuellen Studie wurden compound-Mutationen in Patienten identifiziert, die mit der Sequenz Imatinib-Dasatinib behandelt wurden (Shah, Skaggs et al. 2007), was dafür spricht, dass eine sequenzielle TKI-Monotherapie eine stufenweise Akkumulation von Mutationen in Form von compound-Mutationen begünstigt. Eine andere klinische Studie identifizierte eine Untergruppe von Patienten mit imatinibresistenter CML mit multiplen Mutationen, die durch sensitive Mutationsanalyse, jedoch nicht durch konventionelle Sequenzierung identifiziert werden konnten (Parker, Ho et al. 2012). Die Anwesenheit von multiplen Mutationen wirkte sich in jener Studie negativ auf das Ansprechen auf eine Zweitlinientherapie mit Nilotinib oder Dasatinib aus und begünstigte auch das Auftreten von neuen Mutationen, die durch Standardsequenzierung detektiert werden konnten, wobei in zehn von 25 Fällen mehr als eine Mutation vorlag.

Therapeutische Strategien zur Minimierung der Resistenzentwicklung könnten in der primären Kombinationstherapie mit mehreren Tyrosinkinaseinhibitoren (begrenzt durch Toxizitätseffekte) oder in einer Erstlinientherapie mit Nilotinib oder Dasatinib bestehen. Im Hinblick auf die Effektivität von Dasatinib gegen P-loop-Mutationen und von Nilotinib gegen Mutationen an Position 299 und 317 sollte die Therapie entsprechend des Mutationsstatus individualisiert werden. Dies kann auch sensitive Detektionsmethoden involvieren, denn multiple Mutationen könnten in geringer Zahl koexistieren, während der Zweit- oder Drittlinientherapie selektiert werden und dann jederzeit hervortreten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen darauf schließen, dass während einer TKI-Therapie, die mit Imatinib begonnen und mit Nilotinib oder Dasatinib fortgeführt wird, die Entstehung von nilotinib- und

dasatinibresistenten compound-Mutationen, die aus P-loop- oder F359I-Mutationen zusammen mit F317- oder V299-Mutationen bestehen, ein häufigeres Resistenzproblem darstellen könnte als das Auftreten von T315I.

5.1.4 Mutationsunabhängige Resistenzmechanismen

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich die TKI-Resistenz stark mit Mutationen der ABL-Kinasedomäne assoziiert. Es ist bekannt, dass andere Resistenzmechanismen, wie z.B. BCR-ABL-Überexpression, Genamplifikation oder die Hochregulierung von Transportproteinen zur TKI-Resistenz beitragen können (von Bubnoff, Peschel et al. 2003; Apperley 2007). Durch das in dieser Arbeit beschriebene in vitro-System könnte die mutationsabhängige Resistenz eventuell überbetont werden. Obwohl das System beabsichtigt, vor allem die mutationsabhängige TKI-Resistenz abzubilden, wurde kein Mutageneseschritt eingebaut, so dass auch mutationsunabhängige Mechanismen zur TKI-Resistenz beitragen können (von Bubnoff, Barwisch et al. 2005). Des Weiteren war in einer aktuellen Analyse klinischer Daten die sequenzielle Resistenz gegenüber einem Zweit- oder Drittlinien-TKI in 83% der Fälle mit dem Auftreten von BCR-ABL Kinasedomänenmutationen verbunden (Soverini, Gnani et al. 2009), und es wurde gezeigt, dass Patienten, die bereits BCR-ABL Kinasedomänenmutationen tragen, für die Entwicklung zusätzlicher Mutationen mit sequenzieller TKI-Resistenz prädisponiert sind (Cortes, Jabbour et al. 2007; Soverini, Gnani et al. 2009). Das Wachstum einzelner Zellklone unter Zweitlinientherapie bei niedriger Inhibitorkonzentrationen und darauffolgendes allgemeines Wachstum unter der Drittlinientherapie mit Vorliegen lediglich einer "schwachen" Mutation (d.h. mit einem niedrigen IC_{50} -Wert), die sich während der Therapie auch nicht verändert, deutet in der vorliegenden Arbeit auf das Wirksamwerden eines mutationsunabhängigen Resistenzmechanismus hin. Mithin könnten suboptimale Medikamentenkonzentrationen das Auftreten mutationsunabhängiger Resistenzmechanismen (auch in der Klinik) begünstigen. Die Western Blot-Analyse (Abbildung 18) ausgewählter sequentiell resistenter Zelllinien aus dem Screening-Experiment lieferte deutliche Hinweise auf das Vorhandensein BCR-ABL-abhängiger, mutationsunabhängiger Resistenzmechanismen und BCR-ABL-unabhängiger Resistenzmechanismen, besonders in Zellliniensequenzen mit im Verlauf persistierenden schwachen BCR-ABL-Mutationen. Obwohl das in dieser Arbeit verwendete Screening-System mit vergleichsweise hohen Inhibitorkonzentrationen für die Detektion mu-

tationsabhängiger TKI-Resistenz optimiert ist, zeigte sich, dass sowohl BCR-ABL-abhängige, mutationsunabhängige Mechanismen als auch BCR-ABL-unabhängige Mechanismen schwache BCR-ABL-Mutationen so ergänzen konnten, dass vollständige TKI-Resistenz der betroffenen Zellen entstand.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein effektives Screening-Modell für sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz vorgestellt, dem ein zellbasierter *in vitro*-Ansatz zugrunde liegt und das auf verschiedene Onkogene, Inhibitoren und Behandlungsstrategien übertragen werden kann. Die Ergebnisse für BCR-ABL-abhängige Zellen, die mit Imatinib und den neuen Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib behandelt wurden, ermöglichen klinische Schlussfolgerungen bezüglich der Auswahl von therapeutischer Substanz und Reihenfolge bei der Behandlung der CML. Die *in vitro*-Wachstumsmuster korrelierten mit bestimmten Mutationsprofilen und die durchgeführte sequenzielle TKI-Monotherapie war häufiger mit dem schrittweisen Auftreten von Doppel- und Dreifachmutationen assoziiert als mit dem Erwerb der panresistenten T315I-Mutation. Die Zusammensetzung der compound-Mutationen zeigte sich von der Art des Inhibitors und von der Anwendungsreihenfolge der Inhibitoren abhängig. Sowohl compound-Mutationen als auch T315I schränkten die Aktivität der Drittlinientherapie stark ein.

5.2 Die Verbindung 4SC-203 – ein effektiver NPM-ALK-Inhibitor

Von der Wirksamkeit niedermolekularer ALK-Inhibitoren gegenüber ALCL-Zelllinien und in ALCL-Mausmodellen wurde in der Literatur bereits berichtet (Christensen, Zou et al. 2007; Galkin, Melnick et al. 2007). Jedoch ist bisher kein ALK-Inhibitor zur klinischen Routineanwendung zugelassen. Der neue, multi-target Kinaseinhibitor 4SC-203 (SC-71710) wird momentan in klinischen Studien als Inhibitor der FLT3-Kinase bei akuter myeloischer Leukämie getestet. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung von 4SC-203 auf NPM-ALK positive murine Zellen und auf humane, NPM-ALK positive Lymphomzelllinien untersucht. Unter dem Einfluss von 4SC-203 nahm die Phospho-NPM-ALK-Konzentration in murinen und humanen Zelllinien ab, während die NPM-ALK-Konzentration stabil blieb, was die Effektivität von 4SC-203 als NPM-ALK-Inhibitor im Zellkulturmodell belegt. Sowohl in den ALK-positiven Ba/F3-Zellen als auch in den humanen Lymphomzelllinien hemmte die Substanz die Zellproliferation in dosisabhängiger Weise. Es zeigten sich kaum zytotoxische Nebenwirkungen gegenüber NPM-ALK negativen Ba/F3-Kontrollzellen und humanen HDLM2-Kontrollzellen. Die hohe Wirksamkeit von 4SC-203 gegen primäre humane NPM-ALK-positive Lymphomzelllinien und seine Selektivität für NPM-ALK-abhängige Zellen machen die Substanz zu einem geeigneten Kandidaten für in vivo-Experimente und klinische Studien zur ALK-Inhibition beim anaplastisch großzelligen Lymphom und unter Umständen auch bei anderen ALK-positiven Erkrankungen.

6 Zusammenfassung

Tyrosinkinaseinhibitorresistenz bei Philadelphia-Chromosom positiven Leukämien wird am häufigsten durch Punktmutationen in der BCR-ABL-Kinasedomäne verursacht. Derzeit wird der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Imatinib zur Erstlinientherapie bei CML und Ph+ ALL verwendet. Dasatinib und Nilotinib werden im Fall von Imatinibresistenz eingesetzt und viele Patienten werden sequenziell mit drei oder mehr ABL-Kinaseinhibitoren behandelt. Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, das Szenario der sequenziellen Tyrosinkinaseinhibitortherapie mit Hilfe eines in-vitro Modells nachzuzeichnen. In einem zellbasierten Resistenz-Screen wurden BCR-ABL-positive Ba/F3 Zellen nacheinander mit Imatinib, Dasatinib und Nilotinib behandelt, wobei die Reihenfolge und die Konzentration der Inhibitoren variiert wurde. Es wurden charakteristische zelluläre Wachstumsmuster beobachtet und die Sequenzanalyse der resistenten Zellen zeigte typische Mutationsmuster, einschließlich der Entwicklung von Doppel- und Dreifachmutationen (compound-Mutationen) und der Resistenzentstehung ohne Veränderung im Mutationsstatus. Die durchgeführte sequenzielle TKI-Monotherapie war öfter mit dem schrittweisen Auftreten von Doppel- und Dreifachmutationen verbunden als mit dem Erwerb der panresistenten T315I-Mutation. Die Zusammensetzung der compound-Mutationen zeigte sich von der Art des Inhibitors und von der Anwendungsreihenfolge der Inhibitoren abhängig. Sowohl compound-Mutationen als auch T315I schränkten die Wirksamkeit einer Drittlinientherapie stark ein. Insgesamt wird in dieser Arbeit ein effektives Screening-Modell für sequenzielle Tyrosinkinaseinhibitorresistenz vorgestellt, dem ein zellbasierter in vitro-Ansatz zugrundeliegt und das so auf verschiedene Onkogene, Inhibitoren und Behandlungsstrategien übertragen werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse für BCR-ABL-abhängige Zellen, die mit Imatinib und den neuen Inhibitoren Dasatinib und Nilotinib behandelt wurden, ermöglichen Schlussfolgerungen für die Auswahl von Tyrosinkinaseinhibitoren und Anwendungsschemata bei der CML, die zur Therapieentscheidung beitragen können.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der neue multi-target Kinaseinhibitor 4SC-203 (SC71710) auf seine Wirksamkeit zur NPM-ALK-Inhibition untersucht. Das Fusionsprotein NPM-ALK (nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase), das durch eine t(2;5)(p23;q35) entsteht, ist eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die in etwa der Hälfte der anaplastisch großzelligen Lymphome (ALCL) vorliegt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die

Substanz 4SC-203 in vitro einen antiproliferativen Effekt auf NPM-ALK positive Zelllinien ausübt und zur Dephosphorylierung von NPM-ALK führt. Die hohe Wirksamkeit von 4SC-203 gegen primäre humane NPM-ALK positive Lymphomzelllinien und seine Selektivität für NPM-ALK-abhängige Zellen machen die Substanz zu einem geeigneten Kandidaten für in vivo Experimente und klinische Studien zur ALK-Inhibition.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Rezeptortyrosinkinasen.....	13
Abbildung 2: Zytoplasmatische Tyrosinkinasen.....	14
Abbildung 3: Durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) entstehen <i>BCR-ABL</i> -Fusionsgene. .	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung von c-Abl 1b und BCR-ABL.....	18
Abbildung 5: Aktivierung von c-Abl 1b.	19
Abbildung 6: Auswirkungen der Expression von BCR-ABL.....	21
Abbildung 7: BCR-ABL-Inhibitoren.	22
Abbildung 8: Imatinib als Initialtherapie bei Patienten mit Chronische-Phase CML (IRIS-Studie).	23
Abbildung 9: Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Imatinib.....	25
Abbildung 10: Inhibition von BCR-ABL durch die Inhibitoren Imatinib, Nilotinib und Dasatinib.....	27
Abbildung 11: Schematische Darstellung des humanen ALK-Proteins.	30
Abbildung 12: Signaltransduktion über ALK.	31
Abbildung 13: NVP-TAE684.....	35
Abbildung 14: Schema des zellbasierten Screens für sequenzielle TKI-Resistenz.	60
Abbildung 15: Sequenzielle TKI-Resistenz im zellbasierten Screen.....	61
Abbildung 16: Sequenzielle Therapie mit Imatinib-Dasatinib-Nilotinib.....	73
Abbildung 17: Sequenzielle Therapie mit Imatinib-Nilotinib-Dasatinib.....	74
Abbildung 18: Auswirkungen der TKI-Behandlung auf BCR-ABL-Expression und -Phosphorylierung in sequenziell TKI-resistenten Zelllinien.....	78
Abbildung 19: 4SC-203 hemmt die Zellproliferation von MigRI NPM-ALK transfizierten Ba/F3 Zellen ohne parentale Ba/F3 Zellen zu schädigen.....	81
Abbildung 20: 4SC-203 hemmt die Phosphorylierung von NPM-ALK in Ba/F3 NPM-ALK Zellen.....	82
Abbildung 21: 4SC-203 hemmt die Proliferation der humanen NPM-ALK positiven Lymphomzelllinien Karpas299, SU-DHL1 und JB6 mit nur geringer Toxizität gegenüber HDLM2 Hodgkin-Lymphom Kontrollzellen.	83
Abbildung 22: 4SC-203 hemmt die Phosphorylierung von NPM-ALK in humanen NPM-ALK positiven Lymphomzelllinien.....	84

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ALK-Fusionsproteine bei verschiedenen Krebserkrankungen.	32
Tabelle 2: Ansatz für die RT-PCR.	51
Tabelle 3: Thermocycler-Programm für die RT-PCR.....	52
Tabelle 4: Ansatz für die nested-PCR.	53
Tabelle 5: Thermocycler-Programm für die nested-PCR.	53
Tabelle 6: Überblick über die unter sequenzieller TKI-Therapie auftretenden BCR-ABL-Mutationen mit IC ₅₀ -Werten für Imatinib, Dasatinib und Nilotinib.	62
Tabelle 7: Resistenzmuster und BCR-ABL-Kinasedomänenmutationen bei Behandlung mit der TKI-Sequenz Imatinib–Dasatinib–Nilotinib.	66
Tabelle 8: Resistenzmuster und BCR-ABL-Kinasedomänenmutationen bei Behandlung mit der TKI-Sequenz Imatinib–Nilotinib–Dasatinib.....	68
Tabelle 9: Überblick über Doppel- und Dreifachmutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne unter sequenzieller TKI-Therapie.	75

9 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Cancer Treatment: Present and Future. Molecular Biology of the Cell*. 5th edition. New York, Garland Science: 1256-1268.

Amin, H. M., Lai, R. (2007). Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* **110**(7): 2259-2267.

Apperley, J. F. (2007). Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* **8**(11): 1018-1029.

Arora, A., Scholar, E. M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(3): 971-979.

Azam, M., Latek, R. R., Daley, G. Q. (2003). Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* **112**(6): 831-843.

Bai, R. Y., Dieter, P., Peschel, C., Morris, S. W., Duyster, J. (1998). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity. *Mol Cell Biol* **18**(12): 6951-6961.

Bai, R. Y., Ouyang, T., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C., Duyster, J. (2000). Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway. *Blood* **96**(13): 4319-4327.

Bassermann, F., von Klitzing, C., Munch, S., Bai, R. Y., Kawaguchi, H., Morris, S. W., Peschel, C., Duyster, J. (2005). NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* **122**(1): 45-57.

Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2002). *Signal Transduction Pathways: An Introduction to Information Metabolism. Biochemistry*. 5th edition. New York, W.H. Freeman and Company: 395-422.

Blume-Jensen, P., Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**(6835): 355-365.

Böcker, W., Kleihues, P., Höfler, H. K., Lax, S., Poremba, C., Moll, R. (2004). *Allgemeine Tumorpathologie. Pathologie*. 3. Auflage. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. München, Elsevier GmbH: 169-217.

Bradeen, H. A., Eide, C. A., O'Hare, T., Johnson, K. J., Willis, S. G., Lee, F. Y., Druker, B. J., Deininger, M. W. (2006). Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* **108**(7): 2332-2338.

Branford, S., Melo, J. V., Hughes, T. P. (2009). Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood* **114**(27): 5426-5435.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J. F., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., Hughes, T. (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* **102**(1): 276-283.

Burgess, M. R., Skaggs, B. J., Shah, N. P., Lee, F. Y., Sawyers, C. L. (2005). Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(9): 3395-3400.

Christensen, J. G., Zou, H. Y., Arango, M. E., Li, Q., Lee, J. H., McDonnell, S. R., Yamazaki, S., Alton, G. R., Mroczkowski, B., Los, G. (2007). Cyto-reductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* **6**(12 Pt 1): 3314-3322.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2007). *Cancer. The Cell: A Molecular Approach*. 4th edition. Washington, DC, ASM Press: 719-765.

Cortes-Franco, J., Khoury, H. J., Nicolini, F. E., Corm, S., Lipton, J. H., Jones, D., Hochhaus, A., Craig, A. R., Benichou, A.-C., Humphriss, E., Kantarjian, H. (2009). Safety and Efficacy of Subcutaneous-Administered Omacetaxine Mepesuccinate in Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Who Harbor the Bcr- Abl T315I Mutation-Results of An Ongoing Multicenter Phase 2/3 Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* **114**(22): 644-.

Cortes, J., Jabbour, E., Kantarjian, H., Yin, C. C., Shan, J., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Giles, F., Breeden, M., Reeves, N., Wierda, W. G., Jones, D. (2007). Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **110**(12): 4005-4011.

Cortes, J., Talpaz, M., Bixby, D., Deininger, M., Shah, N., Flinn, I. W., Mauro, M., O'Hare, T., Hu, S., Kan, R., Rivera, V. M., Clackson, T., Haluska, F., Kantarjian, H. (2010). A Phase 1 Trial of Oral Ponatinib (AP24534) In Patients with Refractory Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Other Hematologic Malignancies: Emerging Safety and Clinical Response Findings. *ASH Annual Meeting Abstracts* **116**(21): 210-.

di Bari, M. G., Ciuffini, L., Mingardi, M., Testi, R., Soddu, S., Barila, D. (2006). c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *EMBO Rep* **7**(7): 727-733.

Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R. A. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**(23): 2408-2417.

- Duyster, J., Bai, R. Y., Morris, S. W. (2001). Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* **20**(40): 5623-5637.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**(3): 164-172.
- Falini, B., Pileri, S., Zinzani, P. L., Carbone, A., Zagonel, V., Wolf-Peeters, C., Verhoef, G., Menestrina, F., Todeschini, G., Paulli, M., Lazzarino, M., Giardini, R., Aiello, A., Foss, H. D., Araujo, I., Fizzotti, M., Pelicci, P. G., Flenghi, L., Martelli, M. F., Santucci, A. (1999). ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* **93**(8): 2697-2706.
- Fielding, A. K. (2010). How I treat Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **116**(18): 3409-3417.
- Galkin, A. V., Melnick, J. S., Kim, S., Hood, T. L., Li, N., Li, L., Xia, G., Steensma, R., Chopiuk, G., Jiang, J., Wan, Y., Ding, P., Liu, Y., Sun, F., Schultz, P. G., Gray, N. S., Warmuth, M. (2007). Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 270-275.
- Gascoyne, R. D., Aoun, P., Wu, D., Chhanabhai, M., Skinnider, B. F., Greiner, T. C., Morris, S. W., Connors, J. M., Vose, J. M., Viswanatha, D. S., Coldman, A., Weisenburger, D. D. (1999). Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **93**(11): 3913-3921.
- George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Frohling, S., Luther, W., 2nd, Zhang, J., Ahn, Y., Zhou, W., London, W. B., McGrady, P., Xue, L., Zozulya, S., Gregor, V. E., Webb, T. R., Gray, N. S., Gilliland, D. G., Diller, L., Greulich, H., Morris, S. W., Meyerson, M., Look, A. T. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* **455**(7215): 975-978.
- Giles, F. J., Abruzzese, E., Rosti, G., Kim, D. W., Bhatia, R., Bosly, A., Goldberg, S., Kam, G. L., Jagasia, M., Mendrek, W., Fischer, T., Facon, T., Dunzinger, U., Marin, D., Mueller, M. C., Shou, Y., Gallagher, N. J., Larson, R. A., Mahon, F. X., Baccarani, M., Cortes, J., Kantarjian, H. M. (2010). Nilotinib is active in chronic and accelerated phase chronic myeloid leukemia following failure of imatinib and dasatinib therapy. *Leukemia* **24**(7): 1299-1301.
- Giles, F. J., Cortes, J., Jones, D., Bergstrom, D., Kantarjian, H., Freedman, S. J. (2007). MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* **109**(2): 500-502.
- Gontarewicz, A., Balabanov, S., Keller, G., Panse, J., Schafhausen, P., Bokemeyer, C., Fiedler, W., Moll, J., Brummendorf, T. H. (2008). PHA-680626 exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic activity on Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cell lines and primary CD34+ cells by inhibition of both Bcr-Abl tyrosine kinase and Aurora kinases. *Leuk Res* **32**(12): 1857-1865.
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**(5531): 876-880.

- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Harrison, S. C. (2003). Variation on an Src-like theme. *Cell* **112**(6): 737-740.
- Hughes, T., Saglio, G., Branford, S., Soverini, S., Kim, D. W., Muller, M. C., Martinelli, G., Cortes, J., Beppu, L., Gottardi, E., Kim, D., Erben, P., Shou, Y., Haque, A., Gallagher, N., Radich, J., Hochhaus, A. (2009). Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol* **27**(25): 4204-4210.
- Huret, J. (2001). t(2;5)(p23;q35). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t0205.html>; 29.12.2011
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B., Yamamoto, T. (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* **14**(4): 439-449.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: 19.
- Kantarjian, H., Giles, F., Wunderle, L., Bhalla, K., O'Brien, S., Wassmann, B., Tanaka, C., Manley, P., Rae, P., Mietlowski, W., Bochinski, K., Hochhaus, A., Griffin, J. D., Hoelzer, D., Albitar, M., Dugan, M., Cortes, J., Alland, L., Ottmann, O. G. (2006). Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* **354**(24): 2542-2551.
- Kantarjian, H. M., Giles, F., Gattermann, N., Bhalla, K., Alimena, G., Palandri, F., Ossenkoppele, G. J., Nicolini, F. E., O'Brien, S. G., Litzow, M., Bhatia, R., Cervantes, F., Haque, A., Shou, Y., Resta, D. J., Weitzman, A., Hochhaus, A., le Coutre, P. (2007). Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* **110**(10): 3540-3546.
- Kantarjian, H. M., Hochhaus, A., Saglio, G., De Souza, C., Flinn, I. W., Stenke, L., Goh, Y. T., Rosti, G., Nakamae, H., Gallagher, N. J., Hoenekopp, A., Blakesley, R. E., Larson, R. A., Hughes, T. P. (2011). Nilotinib versus imatinib for the treatment of patients with newly diagnosed chronic phase, Philadelphia chromosome-positive, chronic myeloid leukaemia: 24-month minimum follow-up of the phase 3 randomised ENESTnd trial. *Lancet Oncol* **12**(9): 841-851.
- Kantarjian, H. M., Shah, N. P., Cortes, J. E., Baccarani, M., Agarwal, M. B., Undurraga, M. S., Wang, J., Kassack Ipina, J. J., Kim, D. W., Ogura, M., Pavlovsky, C., Junghanss, C., Milone, J. H., Nicolini, F. E., Robak, T., Van Droogenbroeck, J., Vellenga, E., Bradley-Garelik, M. B., Zhu, C., Hochhaus, A. (2011). Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* **119**(5): 1123-1129.
- Lemmon, M. A., Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**(7): 1117-1134.

McWhirter, J. R., Galasso, D. L., Wang, J. Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* **13**(12): 7587-7595.

Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* **263**(5151): 1281-1284.

Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X., Witte, D. P. (1997). ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene* **14**(18): 2175-2188.

Muller, M. C., Cortes, J. E., Kim, D. W., Druker, B. J., Erben, P., Pasquini, R., Branford, S., Hughes, T. P., Radich, J. P., Ploughman, L., Mukhopadhyay, J., Hochhaus, A. (2009). Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* **114**(24): 4944-4953.

Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2002). Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**(15): 4236-4243.

Nagar, B., Hantschel, O., Young, M. A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**(6): 859-871.

NCBI (2005a). dasatinib - Compound Summary. National Center for Biotechnology Information, PubChem: CID 3062316. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3062316&loc=ec_res; 13.12.2011

NCBI (2005b). imatinib - Compound Summary. National Center for Biotechnology Information, PubChem: CID 5291. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5291>; 13.12.2011

NCBI (2005c). nilotinib - Compound Summary. National Center for Biotechnology Information, PubChem: CID 644241. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=644241&loc=ec_res; 13.12.2011

NCBI (2011a). ABL1 c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase [Homo sapiens] National Center of Biotechnology Information: Gene ID: 25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25>; 28.11.2011

NCBI (2011b). ALK anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase [Homo sapiens] Gene ID: 238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/238>; 19.12.2011

Nowell, P. C., Hungerford, D. A. (1960). A minute chromosome in human granulocytic keukaemia. *Science* **132**: 1497.

O'Hare, T., Eide, C. A., Deininger, M. W. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* **110**(7): 2242-2249.

Okuwaki, M. (2008). The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* **143**(4): 441-448.

Ouyang, T., Bai, R. Y., Bassermann, F., von Klitzing, C., Klumpen, S., Miething, C., Morris, S. W., Peschel, C., Duyster, J. (2003). Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J Biol Chem* **278**(32): 30028-30036.

Palmer, R. H., Vernersson, E., Grabbe, C., Hallberg, B. (2009). Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *The Biochemical journal* **420**(3): 345-361.

Parker, W. T., Ho, M., Scott, H. S., Hughes, T. P., Branford, S. (2012). Poor response to second-line kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients with multiple low-level mutations, irrespective of their resistance profile. *Blood* **119**(10): 2234-2238.

Pavlovsky, C., Kantarjian, H., Cortes, J. E. (2009). First-line therapy for chronic myeloid leukemia: Past, present, and future. *Am J Hematol* **84**(5): 287-293.

PDB (2002). CRYSTAL STRUCTURE OF THE C-ABL KINASE DOMAIN IN COMPLEX WITH STI-571. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, PDB: 1IEP. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1IEP>; 13.12.2011

Peng, B., Hayes, M., Resta, D., Racine-Poon, A., Druker, B. J., Talpaz, M., Sawyers, C. L., Rosamilia, M., Ford, J., Lloyd, P., Capdeville, R. (2004). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* **22**(5): 935-942.

Ray, A., Cowan-Jacob, S. W., Manley, P. W., Mestan, J., Griffin, J. D. (2007). Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood* **109**(11): 5011-5015.

Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistroni, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., Boschelli, F. (2009). Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol* **27**(3): 469-471.

Savage, K. J., Harris, N. L., Vose, J. M., Ullrich, F., Jaffe, E. S., Connors, J. M., Rimsza, L., Pileri, S. A., Chhanabhai, M., Gascoyne, R. D., Armitage, J. O., Weisenburger, D. D. (2008). ALK- anaplastic large-cell lymphoma is clinically and immunophenotypically different from both ALK+ ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* **111**(12): 5496-5504.

Sawyers, C. L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **340**(17): 1330-1340.

Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Shah, N., Cortes, J., Paquette, R., Donato, N., Nicoll, J., Bleickardt, E., Chen, T.-T., Talpaz, M. (2005). Dasatinib (BMS-354825) in Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML) and Philadelphia-Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia (Ph+ ALL) Who Are Resistant or Intolerant to Imatinib: Update of a Phase I Study. *ASH Annual Meeting Abstracts* **106**(11): 38-.

Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**(5486): 1938-1942.

Shah, N. P., Skaggs, B. J., Branford, S., Hughes, T. P., Nicoll, J. M., Paquette, R. L., Sawyers, C. L. (2007). Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest* **117**(9): 2562-2569.

Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Castagnetti, F., Rosti, G., Bosi, C., Paolini, S., Rondoni, M., Piccaluga, P. P., Palandri, F., Giannoulia, P., Marzocchi, G., Luatti, S., Testoni, N., Iacobucci, I., Cilloni, D., Saglio, G., Baccarani, M., Martinelli, G. (2007). Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* **92**(3): 401-404.

Soverini, S., Gnani, A., Colarossi, S., Castagnetti, F., Abruzzese, E., Paolini, S., Merante, S., Orlandi, E., de Matteis, S., Gozzini, A., Iacobucci, I., Palandri, F., Gugliotta, G., Papayannidis, C., Poerio, A., Amabile, M., Cilloni, D., Rosti, G., Baccarani, M., Martinelli, G. (2009). Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **114**(10): 2168-2171.

Soverini, S., Martinelli, G., Colarossi, S., Gnani, A., Castagnetti, F., Rosti, G., Bosi, C., Paolini, S., Rondoni, M., Piccaluga, P. P., Palandri, F., Giannoulia, P., Marzocchi, G., Luatti, S., Testoni, N., Iacobucci, I., Cilloni, D., Saglio, G., Baccarani, M. (2006). Presence or the emergence of a F317L BCR-ABL mutation may be associated with resistance to dasatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *J Clin Oncol* **24**(33): e51-52.

Stein, H., Foss, H. D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K., Pileri, S., Falini, B. (2000). CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* **96**(12): 3681-3695.

Talpaz, M., Shah, N. P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., Blackwood-Chirchir, M. A., Iyer, V., Chen, T. T., Huang, F., Decillis, A. P., Sawyers, C. L. (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **354**(24): 2531-2541.

Tokarski, J. S., Newitt, J. A., Chang, C. Y., Cheng, J. D., Wittekind, M., Kiefer, S. E., Kish, K., Lee, F. Y., Borzilleri, R., Lombardo, L. J., Xie, D., Zhang, Y., Klei, H. E. (2006). The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* **66**(11): 5790-5797.

UniProtKB (2011a). P00519 (ABL1_HUMAN) UniProtKB/Swiss-Prot: P00519. <http://www.uniprot.org/uniprot/P00519>; 28.11.2011

UniProtKB (2011b). Q9UM73 (ALK_HUMAN). UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UM73. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UM73#ref18>; 19.12.2011

von Bubnoff, N., Barwisch, S., Speicher, M. R., Peschel, C., Duyster, J. (2005). A cell-based screening strategy that predicts mutations in oncogenic tyrosine kinases: implications for clinical resistance in targeted cancer treatment. *Cell Cycle* **4**(3): 400-406.

von Bubnoff, N., Duyster, J. (2010). Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* **107**(7): 114-121.

von Bubnoff, N., Manley, P. W., Mestan, J., Sanger, J., Peschel, C., Duyster, J. (2006). Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood* **108**(4): 1328-1333.

von Bubnoff, N., Peschel, C., Duyster, J. (2003). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* **17**(5): 829-838.

von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., Duyster, J. (2002). BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* **359**(9305): 487-491.

von Bubnoff, N., Veach, D. R., van der Kuip, H., Aulitzky, W. E., Sanger, J., Seipel, P., Bornmann, W. G., Peschel, C., Clarkson, B., Duyster, J. (2005). A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor. *Blood* **105**(4): 1652-1659.

Weisberg, E., Choi, H. G., Ray, A., Barrett, R., Zhang, J., Sim, T., Zhou, W., Seeliger, M., Cameron, M., Azam, M., Fletcher, J. A., Debiec-Rychter, M., Mayeda, M., Moreno, D., Kung, A. L., Janne, P. A., Khosravi-Far, R., Melo, J. V., Manley, P. W., Adamia, S., Wu, C., Gray, N., Griffin, J. D. (2010). Discovery of a small-molecule type II inhibitor of wild-type and gatekeeper mutants of BCR-ABL, PDGFRalpha, Kit, and Src kinases: novel type II inhibitor of gatekeeper mutants. *Blood* **115**(21): 4206-4216.

Weisberg, E., Manley, P., Mestan, J., Cowan-Jacob, S., Ray, A., Griffin, J. D. (2006). AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer* **94**(12): 1765-1769.

Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A., Griffin, J. D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **7**(5): 345-356.

Wong, S., Witte, O. N. (2004). The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* **22**: 247-306.

Zhang, J., Adrian, F. J., Jahnke, W., Cowan-Jacob, S. W., Li, A. G., Iacob, R. E., Sim, T., Powers, J., Dierks, C., Sun, F., Guo, G. R., Ding, Q., Okram, B., Choi, Y., Wojciechowski, A., Deng, X., Liu, G., Fendrich, G., Strauss, A., Vajpai, N., Grzesiek, S., Tuntland, T., Liu, Y., Bursulaya, B., Azam, M., Manley, P. W., Engen, J. R., Daley, G. Q., Warmuth, M., Gray, N. S. (2010). Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **463**(7280): 501-506.

10 Anhang

Ein- und Dreibuchstaben-Codes der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

11 Publikation

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab publiziert in:

Bauer, R. C., Sanger J., Peschel, C., Duyster, J., von Bubnoff, N. (2008). A sequential, in vitro strategy for drug resistance to the Abl-kinase inhibitors Imatinib, Nilotinib and Dasatinib simulates the clinically established approach of sequential inhibitor therapy in patients with Ph⁺ leukemia and may aid to elucidate the pattern of resistance mutations evolving after 2nd and 3rd line TKI treatment. DGHO Kongress 2008, Wien. 3. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München. (Poster)

Bauer, R. C., Sanger, J., Peschel, C., Duyster, J., von Bubnoff, N. (2013). Sequential Inhibitor Therapy in CML: In Vitro Simulation Elucidates the Pattern of Resistance Mutations after Second- and Third-Line Treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(11): 2962-2972.

12 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Christian Peschel für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im hämatologischen Forschungslabor der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Justus Duyster danke ich sehr für die wissenschaftliche Betreuung der Promotionsarbeit, insbesondere der Experimente zur NPM-ALK-Inhibition, sowie für die Unterstützung bei der Teilnahme am DGHO-Kongress 2008.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff für die Vergabe des Themas der Doktorarbeit, für die eingehende wissenschaftliche Betreuung bei der Planung und Durchführung der Experimente und für die Durchsicht des Manuskripts.

Bei allen Mitarbeitern des hämatologischen Forschungslabors der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik der TU München bedanke ich mich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen. Besonders bedanke ich mich auch bei Frau Jana Sänger für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Robert Christian Bauer
<i>Wohnort</i>	81925 München
<i>Geburtsdatum</i>	15.02.1984
<i>Geburtsort</i>	Rosenheim
<i>Familienstand</i>	Verheiratet mit Christina Ulrike Bauer
<i>Eltern</i>	Robert Andreas Bauer und Margarete Irmgard Bauer
<i>Geschwister</i>	Margit Andrea Bauer und Helen Johanna Bauer

Bildungsgang

<i>1990-1994</i>	Grundschule Seeon-Seebruck
<i>1994-2003</i>	Gymnasium LSH Schloss Ising
<i>27.06.2003</i>	Allgemeine Hochschulreife
<i>07-12/2003</i>	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Prien am Chiemsee
<i>2003-2010</i>	Studium der Humanmedizin an der TU München, der LMU München und am Weill Cornell Medical College, New York
<i>13.09.2005</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>22.04.2010</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>01.06.2010</i>	Approbation als Arzt

Beruf

<i>10/2010-08/2011</i>	Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie am RoMed Klinikum Rosenheim (Direktor: Prof. Dr. med. P. K. Wagner)
<i>Seit 09/2011</i>	Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der TU München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Friess)

