Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Duale PI3K/mTOR-Inhibition zeigt antileukämische Wirkung in *MLL*-rearrangierter akuter myeloischer Leukämie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades
der Humanbiologie
(Dr. rer. hum. biol.)



an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nadine Sandhöfer
aus Saarbrücken

München, April 2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Karsten Spiekermann
Mitberichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Christian Ries
	Prof. Dr. med. Monika Führer
	Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2015

Eidesstattliche Versicherung

Sandhöfer, Nadine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Duale PI3K/mTOR-Inhibition zeigt antileukämische Aktivität in *MLL*-rearrangierter akuter myeloischer Leukämie“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 23.07.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1. Akute myeloische Leukämie (AML) 1
1.2. *Mixed lineage leukemia* (*MLL*) und seine Bedeutung in der Leukämie 3
1.2.1. *MLL*-Aberrationen 4
1.2.2. Aufbau und Funktionen des Proteins MLL 5
1.2.3. Transformation durch MLL-Aberrationen 7
1.3. Zielgerichtete Therapien in der AML 8
1.3.1. Fehlregulierte Signalwege in der AML 9
1.3.2. Die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade 9
2. Zielsetzung der Arbeit 15
3. Material & Methoden 17
3.1. Material 17
3.1.1. Geräte 17
3.1.2. Verbrauchsmaterial 18
3.1.3. Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen 19
3.1.4. Kitsysteme 21
3.1.5. Puffer und Lösungen 21
3.1.6. Plasmide 24
3.1.7. Oligonukleotide 24
3.1.8. Antikörper 25
3.1.9. Inhibitoren 26
3.1.10. Zellen und Nährmedien 27
3.1.11. Patientenproben 27
3.2. Methoden 28
3.2.1. Molekularbiologische Methoden 28
3.2.2. Zellbiologische Methoden 34

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden 43
3.2.4. *In vivo*-Behandlungsmodell 47
3.3. Software 50
3.4. Statistik 51
4. Ergebnisse 53
4.1. Sensitivität primärer AML-Patientenproben 53
4.1.1. Heterogener genetischer Hintergrund verwendeter AML-Patientenproben 53
4.1.2. Apoptose-Sensitivität primärer AML-Patientenproben 55
4.1.3. Apoptose-Sensitivität primärer AML-Patientenproben gegenüber spezifischen Inhibitoren *in vitro* 57
4.1.4. Spontanapoptose unbehandelter AML-Patientenproben 58
4.1.5. Sensitivität und genetischer Hintergrund 59
4.2. Sensitivität humaner Zelllinien 66
4.2.1. Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch BEZ-235, MK-2206 und Rapamycin 67
4.2.2. Apoptose-Induktion nach Inhibition des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs. 71
4.2.3. Proliferationsinhibition nach Inhibition des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs. 74
4.2.4. Korrelation zwischen Signalwegs- und Proliferationsinhibition in der *PI3K*-mutierten Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 78
4.3. Wirkung der PI3K/mTOR-Inhibition auf eine *MLL-ENL*$^{+}$- immortalisierte Zelllinie (MLL-ENL ICs) 80
4.3.1. Etablierung der Zelllinie 80
4.3.2. Sensitivität der *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierten Zelllinie gegenüber der PI3K/AKT/mTOR-Inhibition 83
4.4. *In vivo*-Therapiemodell 86
4.4.1. Modelletablierung und Versuchsplan 86

4.4.2. Leukämie-Entwicklung in Xenograft-Mäusen 89
4.4.3. Leukämieausbreitung während der Therapie 90
4.4.4. Inhibition des Signalwegs *in vivo* 93
4.4.5. Veträglichkeit der Therapie 95
4.5. Mögliche Erklärung für die hohe Sensitivität der *MLL*-mutierten AML 96
4.5.1. Expression des Transkriptionsfaktors Evi-1 in *MLL*-rearrangierten Patientenproben 96
4.5.2. Mutationen in Wachstumsfaktor-Signalwegen 97
4.6. Kombination der PI3K/mTORC1/2-Inhibition mit einem MEK-Inhibitor 100
4.6.1. Kreuzaktivierung des PI3K/AKT/mTOR bzw. des ERK-Signalwegs ... 100
4.6.2. Synergistische Effekte durch PI3K/mTOR und MEK-Inhibition 104
5. Diskussion 109
5.1. *In vitro*-Sensitivität primärer AML-Blasten gegenüber spezifischen Signalwegsinhibitoren 109
5.1.1. Etablierung des *in vitro* Apoptose Readout-Systems 109
5.1.2. Signalwege zur Selbsterneuerung in der AML 110
5.1.3. PI3K/AKT/mTOR-Inhibition 112
5.2. *In vitro* Sensitivität muriner *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierter Zellen 116
5.3. *In vivo* Aktivität des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors im Xenograft Mausmodell. 118
5.4. Verschiedene Mechanismen zur erhöhten Sensitivität *MLL*-rearrangierter Proben 120
5.5. Kreuzaktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalwegs 122
6. Ausblick 125
7. Zusammenfassung 127
8. Abstract 129
9. Referenzen 131
10. Anhang 143

10.1. Abkürzungsverzeichnis 143
10.2. Abbildungsverzeichnis..... 149
10.3. Tabellenverzeichnis 151
11. Danksagung..... 153

1. Einleitung

1.1. Akute myeloische Leukämie (AML)

Bösartige Neubildungen körpereigenen Gewebes, deren Wachstum sich weitestgehend der körpereigenen Wachstums- und Lokalisationskontrolle entzogen hat, bezeichnet man als Krebs [1]. Mit 25,5% aller Todesfälle stellt Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine der Haupttodesursachen dar [2]. In Deutschland wird es Schätzungen des Robert-Koch-Instituts zufolge im Jahr 2014 550.900 Neuerkrankungen geben, davon 3% Leukämie-Erkrankungen. Bei Leukämie handelt es sich um eine neoplastische Erkrankung des blutbildenden Systems, bei der es zu einer unkontrollierten Vermehrung hämatopoetischer Vorläuferzellen und Stammzellen kommt [3]. Diese Zellen siedeln sich vermehrt im Knochenmark, im peripheren Blut, in lymphatischen Organen wie der Milz und anderen Organsystemen an. Die unreifen Zellen sind nicht mehr dazu in der Lage, sich in funktionsfähige Blutzellen zu differenzieren. Sie verbleiben stattdessen in einem unreifen Zustand und verdrängen die normal ausgebildete Hämatopoese des Körpers zunehmend. Die Folge ist eine Armut an funktionsfähigen Blutzellen, je nach Zellreihe die sogenannte Anämie, die Thrombozytopenie und die Granulozytopenie. Man unterscheidet schnell fortschreitende (akute) und langsam fortschreitende (chronische) Formen der Leukämie. Während chronische Formen über Jahre relativ symptomarm verlaufen können, sind akute Leukämien von Beginn an sehr lebensbedrohlich und erfordern eine sofortige Diagnostik und Behandlung. Weiterhin unterscheidet man je nach betroffener Zellreihe myeloische und lymphatische Leukämien. Die am häufigsten vorkommende Leukämie ist die chronische lymphatische Leukämie (CLL) mit einem Anteil von 34–40% aller Leukämie-Erkrankungen, gefolgt von der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit einem Anteil von 24–30% [2]. Neben der AML unterscheidet die WHO (*world health organization*)-Klassifikation von 2008 zudem weitere myeloische Neoplasien [4]. Darunter fallen das myelodysplastische Syndrom, die myeloproliferative Neoplasie sowie myeloische Neoplasien, die verbunden sind mit einer Eosinophilie oder mit Anormalitäten in den Rezeptoren „*plateled-derived growth factor receptor*“ (PDGFR) sowie *fibroblast-growth factor receptor-1* (FGFR-1).

Die Diagnose der AML wird auf der Basis von mehreren Diagnoseverfahren gestellt. Dazu zählen die Zytomorphologie-Analyse von Knochenmark und peripherem Blut und die Immunphänotypisierung der Zellen, über die unter anderem eine Aussage über die Zugehörigkeit der Tumorzelle zu der entsprechenden Zellreihe getroffen wird. Auf Basis der Morphologie erfolgt die weitere Unterteilung in die jeweiligen FAB-(*French-American-British*)-Subgruppen (M0-M7) [5]. Ebenso wichtig sind die Chromosomenanalyse, die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Analyse und die Untersuchung somatischer Mutationen mittels molekulargenetischer Verfahren. Laut „*European Leukemia Net*“ (ELN)-Klassifikation werden die prognostischen Gruppen „günstig“, „intermediär-I“, „intermediär-II“ und „ungünstig“ unterschieden (Tabelle 1-1) [6].

Tabelle 1-1 Einteilung der prognostischen Risikogruppen nach der ELN-Klassifikation. *Es werden vier prognostische Gruppen aufgrund der Zytogenetik und Molekulargenetik unterschieden [6]*

Prognostische Risikogruppe	**Charakteristika der Risikogruppe**
Günstig	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1q22) bzw. t(16;16)(p13.1;q22) *NPM1*-Mutation ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) *CEBPA*-Mutation (normaler Karyotyp)
Intermediär-I	*NPM1*-Mutation mit FLT3-ITD (normaler Karyotyp) *NPM1*-Wildtyp mit FLT3-ITD (normaler Karyotyp) *NPM1*-Wildtyp ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp)
Intermediär-II	t(9;11)(p22;q23) Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig bzw. ungünstig klassifiziert werden
Ungünstig	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2) t(6;9)(p23;q34) t(v;11)(v;q23) -5 oder del(5q);-7; abnl(17p); komplexer Karyotyp

abnl: abnormal, del: Deletion, inv: Inversion, ITD: interne Tandemduplikation, t: Translokationen, v: variabel

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten zehn Jahre nach Diagnosestellung unterscheidet sich je nach Gruppe und liegt zwischen 68–72% für die Patienten der „günstigen“ Gruppe und 2–11% für die der „ungünstigen“ Gruppe. Die Erhebung einer Prognose wird in der AML überwiegend auf Basis des vorliegenden Karyotyps getroffen. Dieser ist der stärkste prognostische Faktor für das Ansprechen auf eine

Induktionstherapie und das Überleben [7, 8]. Gehört der Patient zur „ungünstigen“ Prognosegruppe, so ist die allogene Knochenmark-Transplantation die Therapie der Wahl, da die Wahrscheinlichkeit eines Rückfalls der Erkrankung nach Standardchemotherapie sehr groß ist [9-12]. Gehört er zur „günstigen“ Prognosegruppe, so spricht er in den meisten Fällen sehr gut auf die Standardchemotherapie an. Da 45% der Patienten einen normalen Karyotyp aufweisen und damit auf Basis der Zytogenetik überwiegend zur intermediären Gruppe gehören [6], wird diese Einteilung zunehmend durch molekulargenetische Marker ergänzt, um eine genauere Einteilung vornehmen zu können. Nicht alle Genmutationen, die in der AML häufig sind, sagen jedoch etwas über die Prognose des Patienten aus. Für die meisten betroffenen Gene gibt es keinen nachgewiesenen Zusammenhang zwischen Parametern wie Therapieansprechen oder Überleben und dem Mutationsstatus. Im Rahmen der Routinediagnostik werden Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase „*fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-like tyrosine kinase 3*” (FLT3) [13-16], dem nukleären Transportprotein „*nucleophosmin 1*“ (NPM1) [17-21], dem Transkriptionsfaktor „*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*“ (CEBPA) [22, 23] und der Histon-Methyltransferase „*mixed lineage leukemia*“ (MLL) analysiert. Diese haben sich bereits in vielen Studien als prognostisch bedeutsam erwiesen und ergänzen die Einteilung zu den Risikogruppen [24].

1.2. *Mixed lineage leukemia* (*MLL*) und seine Bedeutung in der Leukämie

Patienten, die chromosomale Aberrationen im *MLL*-Gen tragen, weisen eine hohe Rückfallquote ihrer Erkrankung auf und haben eine Überlebenswahrscheinlichkeit von nur 2–11% [6]. Diese Patienten werden daher wenn möglich einer Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation unterzogen, um ihre Überlebenschancen zu erhöhen [12]. Entsprechend der ELN-Klassifikation gehören sie je nach Aberration der „ungünstigen“ bzw. „intermediären“ Gruppe an.

1.2.1. *MLL*-Aberrationen

Das Gen, das für *MLL* kodiert, ist auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert (11q23). Dieser Bereich ist sowohl in lymphatischen als auch in myeloischen akuten Leukämien von chromosomalen Aberrationen wie Translokationen, Amplifikationen und partiellen Duplikationen betroffen [25-27]. Bei Säuglings-Leukämien machen Translokationen unter Beteiligung des 11q23-Bereichs sogar mehr als 90%, bei Erwachsenen ca. 10% aller Fälle aus [28]. Im Fall der reziproken *MLL*-Translokationen kommt es zu einer Fusion des 5´-*MLL*-Bereichs mit im 3´-Bereich liegenden Exonen anderer Fusionspartner. Hierbei rearrangiert das *MLL*-Gen immer an einer ähnlichen Stelle, einem 9 kb großen Bereich zwischen den Exonen 8 und 14, der sogenannten „*breakpoint cluster region*“ (BCR). Die Folge sind chimäre Transkripte, die zur Bildung eines chimären Fusionproteins führen (Abbildung 1-1).

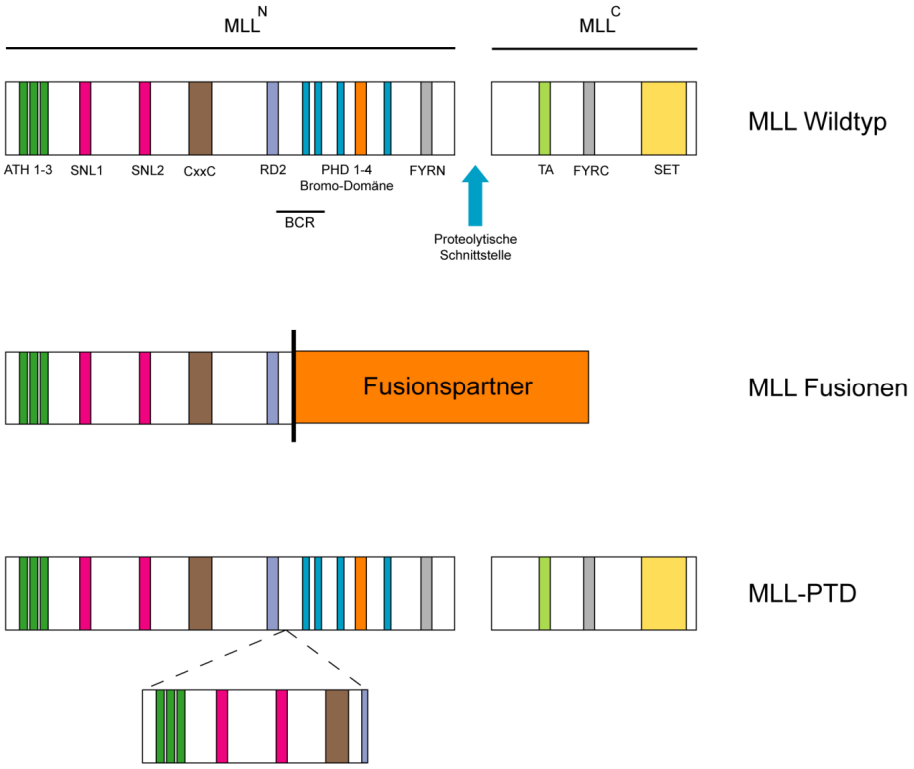


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des wildtypischen MLL-Proteins, der MLL-Fusionsproteine und der partiellen MLL-Duplikation (MLL-PTD). *Die einzelnen Domänen des Proteins und ihre Funktion werden im Abschnitt 1.2.2. erklärt, nach [29].*

Es sind über 121 verschiedene *MLL*-Translokationen mit mehr als 79 molekular charakterisierten Translokationspartnern bekannt [30, 31]. Klinisch am Bedeutendsten sind die Translokationen t(4;11), t(9;11), t(10;11) und t(11;19), die insgesamt mehr als 80% der *MLL*-rearrangierten Leukämien ausmachen [31]. Da diese Translokationen abhängig von ihrem Fusionspartner sowohl in lymphatischen als auch in myeloischen Leukämien zu finden sind, wurde das betroffene Gen *„mixed lineage leukemia“ (MLL)* genannt. Neben den Translokationen sind weiterhin auch *MLL*-Amplifikationen [32, 33] und interne partielle Tandemduplikationen (MLL-PTD) bekannt [34]. Bei letzteren kommt es zu einer Verdopplung des Bereichs zwischen Exon 5 und Exon 12 und zu einer Insertion dieses Bereichs zwischen Exon 11 und Exon 12 [35].

1.2.2. Aufbau und Funktionen des Proteins MLL

Das *MLL*-Gen kodiert für eine Histon-Methyltransferase, die in den meisten Geweben des Körpers, wie auch in hämatopoetischen Stamm-und Vorläuferzellen exprimiert wird [36, 37]. Es bildet das menschliche Homolog zum Drosophila-Protein Trithorax und ist Mitglied der sogenannten Trithorax-Proteingruppe. Wichtigste Funktion dieser Proteingruppe ist die Regulation der Genexpression durch Histon-Modifikationen, Chromatin-remodellierende Funktionen und durch Binden von DNA [38]. Dabei wird die Genexpression von Genen der *Homeobox* (Hox)-Gruppe reguliert, die eine wichtige Rolle bei der Körpersegmentierung, der Entwicklung des skeletalen und neuronalen Gewebes und beim Aufbau des blutbildenden Systems spielen [39-41]. Trithorax-Proteine üben überwiegend eine Transkription-aktivierende Funktion aus. Im Gegensatz dazu stehen die Mitglieder der Polycomb-Proteine, die überwiegend hemmende Funktionen auf die *Hox*-Genexpression ausüben [38].

Bei MLL handelt es sich um ein sehr großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kD (Abbildung 1-2). Posttranslational wird MLL von dem Enzym Taspase-1 proteolytisch in einen N-Terminus (320 kD) und in einen C-Terminus (180 kD) gespalten [42, 43]. Die beiden Abschnitte interagieren jedoch weiterhin über die Domänen FYRN bzw. FYRC nichtkovalent miteinander. MLL übt wie auch die anderen Trithorax- bzw. Polycomb-Proteine seine Funktion nicht alleine, sondern in einem großen Makroproteinkomplex aus und besitzt dafür viele DNA- und

Proteinbindestellen. Der N-Terminus beinhaltet wichtige Bindungsstellen zu den Proteinen Menin und „*lens-epithelium-derived growth factor*“ (LEDGF), beide sind wichtig für die Spezifität von MLL [44-46]. Darauf folgen drei kurze *AT-Hook* (AT-H) Domänen, die mit der kleinen Schleife AT-reicher genomischer DNA interagieren. Auf die beiden nukleären Transportsignale (SNL1 und SNL2) folgt ein CxxC Zinkfinger Motif zur DNA-Bindung. Hiermit bindet MLL an unmethylierte CpG-Inseln und verhindert deren Methylierung und damit auch den Stop der Transkription [47-50]. Desweiteren stellt dieser Bereich die Interaktionsstelle mit dem „*human Polymerase-Associated Factor complex*“ (PAFc)-Komplex dar, ein Komplex, an dem auch die RNA Polymerase II beteiligt ist [51, 52]. Über die RD2 Domäne werden Histon-Deacetylasen (HDACs) rekrutiert, die sich antagonistisch zum MLL verhalten können. Die folgenden vier PHD-Domänen binden Cyclophilin 33 (Cyp33) und weitere Proteine [51, 53-55].

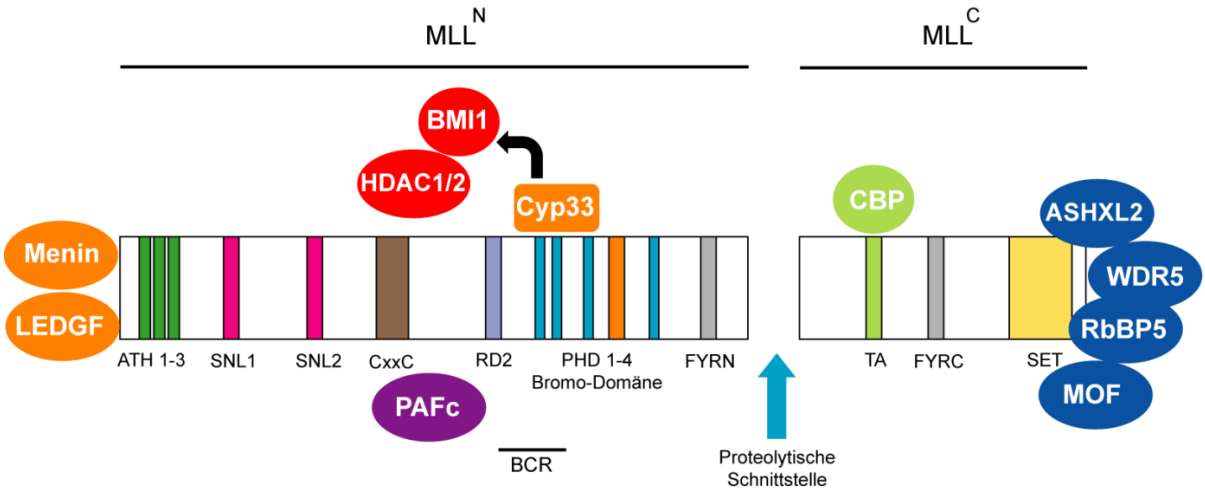


Abbildung 1-2 Aufbau der Histonmethyltransferase MLL und ihre Interaktion mit DNA und Proteinen. *Posttranslational wird das 500 kD große MLL Protein durch Taspase-1 in zwei Bereiche geteilt (MLL^N und MLL^C). Neben DNA-Bindestellen (ATH1-3, CxxC) besitzt MLL eine Vielzahl an Proteinbindestellen für Proteine, die seine Funktion unterstützen (z.B. MOF, ASHXL2, WDR5, RbBP5; PAFc) oder sich antagonistisch dazu verhalten (Cyp33, BMI1, HDACs), nach [29].*

Am Beginn des C-Terminus ist die sogenannte Transaktivator (TA)-Domäne lokalisiert, die wichtig für die Bindung des Transkriptions-Co-Aktivators *„CREB-binding* protein“ (CBP) ist [56]. Allen Trithorax-Proteinen gemeinsam ist die hoch-konservierte „*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*“ (SET)-Domäne, welche die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me) katalysiert [36, 37]. Dazu ist die Interaktion zwischen MLL und den Kernkomplexproteinen wie z.B. ASHXL2 wichtig,

denn durch diese erlangt es seine volle enzymatische Aktivität [57]. Die Rekrutierung der H4K16-Histon-Acetyltransferase „*males absent on the first*“ (MOF) verstärkt die Transkriptions-aktivierende Funktion von MLL durch Histon-Acetylierung im Bereich des *Hox*-Promotors [58].

1.2.3. Transformation durch MLL-Aberrationen

Kommt es zu einer MLL-Translokation, gehen viele wichtige Bereiche des MLL-Proteins verloren und werden durch andere ersetzt. Trotzdem handelt es sich nicht um eine „*loss-of-function*“-Aberration, denn das Vorhandensein eines Fusionspartners ist essentiell zur Leukämogenese [59-61]. Die Translokation verhindert in der Zelle, dass die Genexpression der *Hox*-Gene gestoppt wird und die Zellen endgültig differenzieren (Abbildung 1-3).

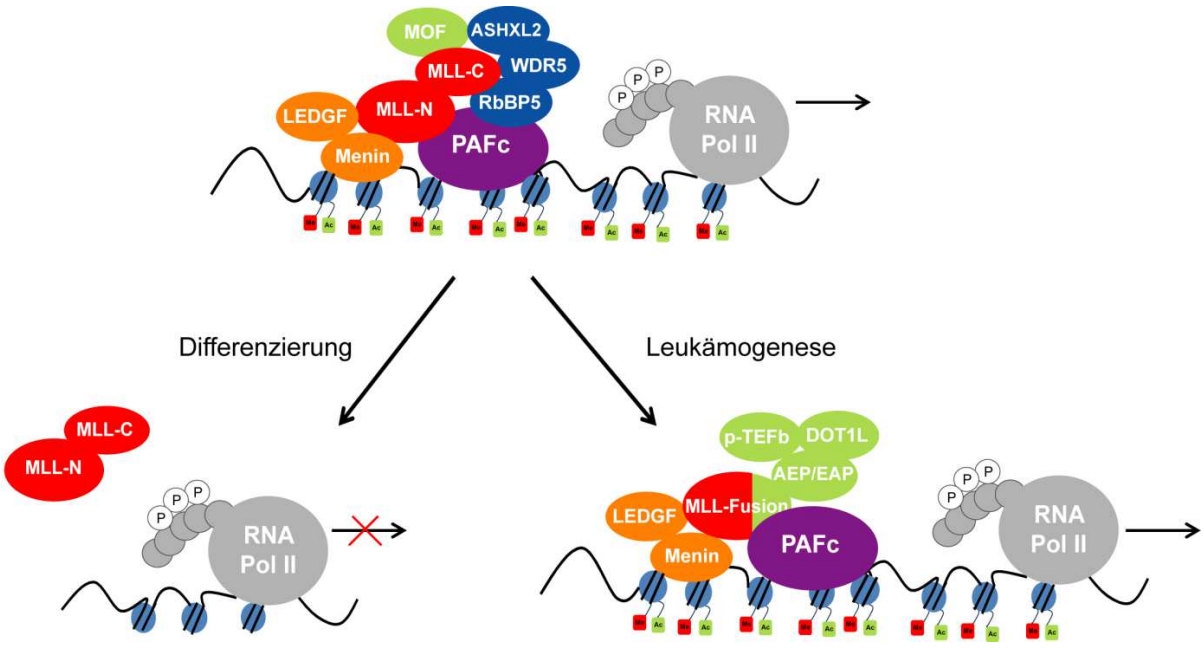


Abbildung 1-3 Transformation durch MLL-Translokationen in der Leukämie. *MLL interagiert in einem Makroproteinkomplex und führt durch Methylierung und durch Rekrutierung acetylierender Proteine zum Fortbestand der Hox-Genexpression. Löst sich dieser Komplex vom Hox-Genpromotorbereich, so kann die Zelle differenzieren. Im Fall der MLL-Fusionsproteine kommt es zur andauernden Hox-Genexpression und Entstehung von Leukämie, nach [29].*

Dazu tragen einerseits bestimmte Fusionspartner bei, die am Transkriptions-Elongations-Vorgang beteiligt sind [62] und andererseits der Verlust repressorischer

Domänen wie der Interaktion mit HDACs über Cyp33 [63]. Zudem werden weitere Histon-Methyltransferasen wie „*DOT1-like*“ (DOT1L) über die Translationsproteine rekrutiert und führen zu einem Fortbestand der *Hox*-Genexpression [64-66]. Wie genau die partielle Duplikation *MLL-PTD* zur Entstehung von Leukämie beiträgt, ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die Duplikation der DNA-bindenden Domänen zur Leukämogenese beitragen könnte [67, 68].

1.3. Zielgerichtete Therapien in der AML

Trotz der sehr großen Heterogenität der AML, ist die Standardtherapie für die meisten Patienten, unabhängig ihres genetischen Hintergrundes, gleich. Therapeutisch hat sich in den letzten Jahrzehnten wenig verändert, die Standardbehandlung besteht aus Therapieblöcken beginnend mit Anthracyclinen. Bei jungen Erwachsenen führt diese in 60–80% zu kompletter Remission [69, 70]. Da die AML jedoch eine Erkrankung ist, die besonders ältere Menschen betrifft, bereitet die hochdosierte Chemotherapie große Probleme, denn ältere Menschen tolerieren die intensiven Therapiestrategien häufig nicht [71]. Eine Möglichkeit, Therapien zu individualisieren, ist die gezielte Adressierung bestimmter fehlregulierter Signalwege in der Zelle. Welcher Signalweg oder welche Signalwege das sind, kann je nach genetischem Hintergrund sehr unterschiedlich sein. Zielgerichtete Therapien richten sich direkt gegen die biologischen Eigenschaften der Tumorzelle und sind in vielen Fällen weniger toxisch als eine klassische Chemotherapie. Ein vielversprechendes Beispiel ist die Entwicklung des Medikaments Gleevec® in der BCR-ABL$^+$ CML [72, 73]. Dieses Medikament richtet sich spezifisch gegen Zellen, die eine BCR-ABL Translokation und daher eine konstitutiv aktive ABL-Kinase aufweisen. In der CML wird Gleevec® inzwischen als Erstlinientherapie verwendet und hat die konventionelle Chemotherapie komplett ersetzt.

1.3.1. Fehlregulierte Signalwege in der AML

Auch in der AML sind fehlregulierte Signalwege bekannt und könnten ein geeignetes Ziel für spezifischere Therapien darstellen. Darunter fallen insbesondere Signalwege, die die Proliferation und das Überleben der Zellen beeinflussen und von denen die Tumorzelle aufgrund vorliegender Aberrationen abhängig ist. Ein Beispiel sind AML-Patienten, die eine aktivierende *FLT3*-Mutation tragen. Inzwischen gibt es viele klinische Studien zu spezifischen FLT3-Inhibitoren, deren Einsatz für Patienten mit *FLT3*-Mutation geeignet sein könnte [74], zum Beispiel AC220 (Quizartinib) [75-79]. Unterhalb fehlregulierter Rezeptortyrosinkinasen liegen wichtige Signalwege wie z.B. der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, der NF-κB-Signalweg [80] und der ERK-Signalweg. Desweiteren können in der AML auch Signalwege betroffen sein, die weniger Einfluss auf die Proliferation und mehr auf die Differenzierungsfähigkeit oder das Selbsterneuerungspotenzial der Zellen haben, wie z.B. der β-Catenin/Wnt [81-83] oder der Sonic Hedgehog-Signalweg [84, 85].

1.3.2. Die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade

In vielen Krebsarten, besonders in soliden Tumoren wie Brustkrebs, liegt eine Fehlregulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs vor [86-89]. In vorherigen Studien konnte eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs anhand der Phosphorylierung von AKT und mTOR in 50–80% aller untersuchten AML-Patienten gezeigt werden. Der Signalweg stellt somit ein potenzielles Ziel für spezifische Therapien dar. Unklar ist, welche Patienten besonders von einer PI3K/AKT/mTOR-gerichteten Therapie profitieren können und welche Patienten kein Ansprechen zeigen. Molekulare Marker wären von großem Interesse. Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3Ks) sind Lipidkinasen und wichtige Regulatoren des Zellwachstums, des Überlebens und der Zellmotalität. Man unterscheidet drei Klassen (PI3K I-III), wobei nur die Klasse I eine nachgewiesene Bedeutung in der Krebsentwicklung hat [90-92]. Die PI3K besteht aus zwei Untereinheiten, einer katalytischen p110 und einer regulatorischen Untereinheit p85 [93]. Sie kann über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert werden (Abbildung 1-4).

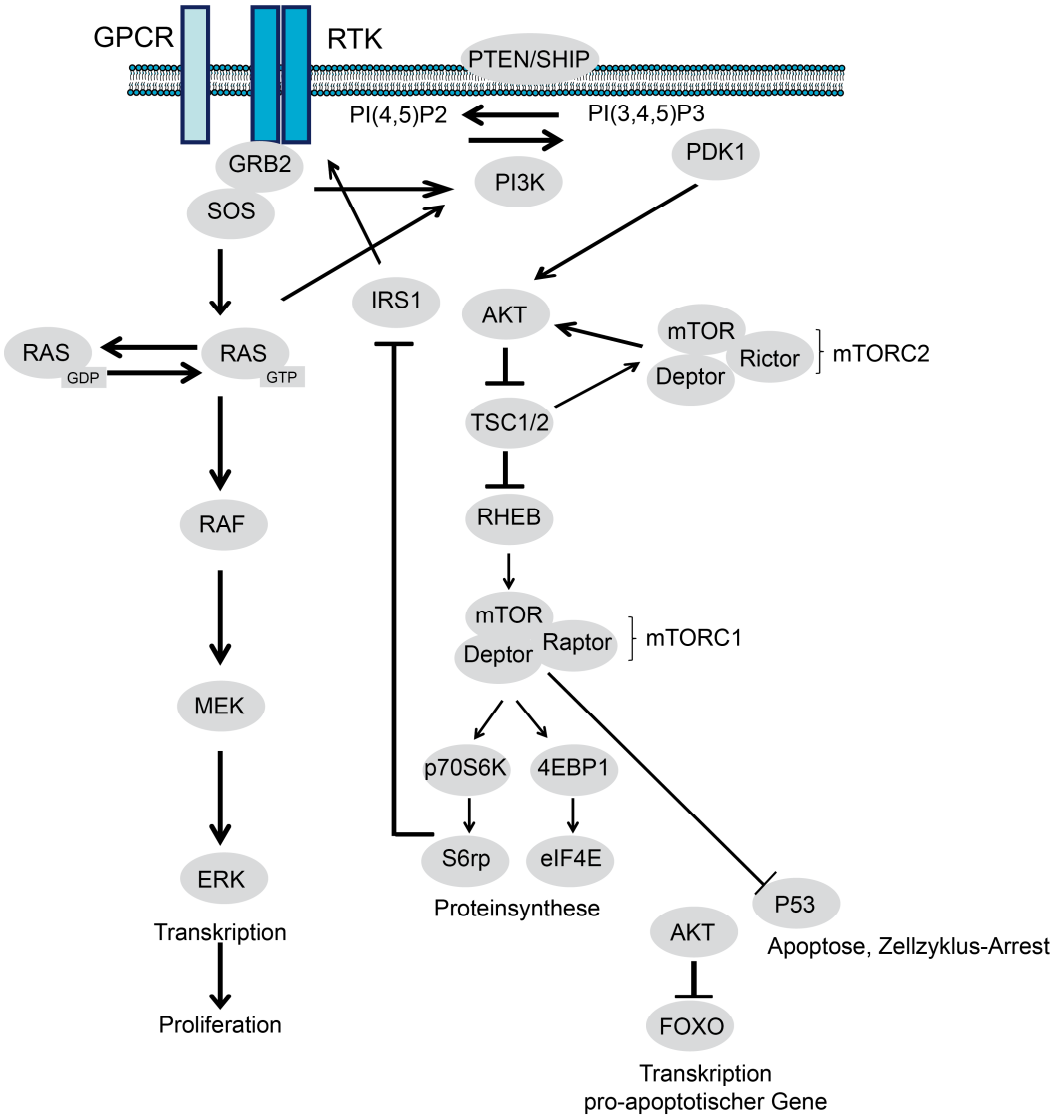


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs, nach [94, 95].

Die RTK wird durch Bindung an ihren jeweiligen Liganden in ihrer Konformation verändert und an Tyrosinen im intrazellulären Bereich phosphoryliert. Die PI3K kann entweder direkt über ihre *„src-homology“*-(SH2)-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine binden [96, 97] oder dies über Adaptorproteine wie *„growth factor receptor-bound protein 2“* (GRB2) tun [97] und dadurch aktiviert werden. Die aktivierte PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3). Über die Bindung ihrer Pleckstrin-Homologie-(PH)-Domäne an PIP_3 wird die Kinase AKT an die Membran rekrutiert und phosphoryliert [98, 99]. Für die vollständige Aktivierung benötigt AKT eine zweifache Phosphorylierung.

Dabei wird das Threonin^{308} von der „3-Phosphatidyl-abhängigen Kinase 1“ (PDK1), das Serin^{473} von der „*mammalian target of rapamycin kinase*“ (mTOR-Kinase) phosphoryliert. Bisher sind weit über 100 Substrate der AKT-Kinase identifiziert [100], jedes von ihnen mit einer wichtigen Funktion im Zusammenhang mit Wachstum und Apoptose der Zelle [101, 102]. Darunter sind z.B. die pro-apoptotischen Gene der Bcl-2-Familie BAD und BAX [103, 104], die durch die Phosphorylierung durch AKT inhibiert werden oder die „*Forkhead“*-Transkriptionsfaktoren [105]. Zudem reguliert AKT das NF-κB Signaling [106] und erhöht die Transkriptionsrate anti-apoptotischer Gene. AKT phosphoryliert die E3 Ubiquitin-Protein-Ligase *„Mouse double minute 2 homolog“* (Mdm2) und wirkt antagonistisch zur p53-vermittelten Apoptose [107]. Ein weiterer wichtiger Proteinkomplex innerhalb dieses Signalweges ist die mTOR-Kinase. Sie besteht aus zwei Komplexen (mTORC1 und mTORC2), die beide eine wichtige Rolle bei der RNA-Translation in Abhängigkeit äußerer Wachstumsfaktoren spielen. Unter den Zielsubstraten sind die p70S6Kinase (p70S6K), das ribosomale Protein S6 (S6rp) und der eukaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E). Antagonistisch zu der PI3K verhalten sich die Phosphatasen „*Phosphatase and tensin homolog*“ (PTEN) oder „*SH2 Domain-Containing Inositol-5'-Phosphatase 1*“ (SHIP1, exprimiert in hämatologischen Geweben). Beide dephosphorylieren PIP_3 zu PIP_2 und wirken somit inhibitorisch auf den Signalweg.

Ein indirekter Weg der PI3K/AKT/mTOR-Aktivierung durch RTKs ist der Weg über die kleine GTPase RAS [108]. Alle drei Isoformen von RAS (H-, N- und K-RAS) werden durch die Bindung von GTP in eine besondere Konformation versetzt und dadurch aktiviert. Der PI3K-Signalweg wird durch direkte Interaktionen zwischen der RAS-GTPase und der PI3K aktiviert [109, 110]. Die katalytischen PI3K-Untereinheiten p110 besitzen eine *„RAS-binding-domain“* (RBD). Mutationen in dieser Domäne beeinflussten in murinen neutrophilen Granulozyten die PI3K-Aktivierung und die Migration der Zellen [111]. Die Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen des Signalwegs sind sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. Es existieren innerhalb des Signalwegs auch negative Rückkopplungsschleifen. Eine bereits gut untersuchte ist die *„insulin-receptor-substrate-1“* (IRS-1) vermittelte Schleife [112, 113]. Durch sie kommt es bei einer Hemmung des mTORC zu einer IGF-1-stimulierten Phosphorylierung von AKT [112].

1.3.2.1. RAS/RAF/MEK/ERK

Neben dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg aktiviert RAS den RAF/MEK/ERK-Signalweg, ein weiterer bedeutender Signalweg in der Zelle. Bei allen drei Proteinen „*rapidly accelerated fibrosarcoma“* (RAF), „*mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase“ (*MEK) und „*extracellular signal regulated kinase*“ (ERK) handelte es sich um Kinasen, die sich in einer dreistufigen Phosphorylierungskaskade nacheinander aktivieren. Die RAF-Proteinfamilie (Raf-1, A-Raf, B-Raf) besteht aus Serin/Threonin-Kinasen, die an die Effektorregion der aktiven RAS-GTPase binden und somit an die Plasmamambran rekrutiert werden können. An der Membran lokalisiert, phosphorylieren RAF-Kinasen weitere Proteinkinasen wie z.B. MEK. Zu den wichtigsten Zielgenen von ERK zählen proliferationsaktivierende Gene, die durch ERK und seiner Rolle als Transkriptions-faktor, aktiv transkribiert werden.

1.3.2.2. Interaktionen zwischen PI3K/AKT/mTOR und RAS/RAF/MEK/ERK

Zwischen den beiden Signalkaskaden RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR existieren viele Interaktionsstellen, die zum Großteil noch nicht im Einzelnen in ihrer Funktion geklärt sind (Abbildung 1-5). Beide Signalwege können durch RAS aktiviert werden, unklar ist, welcher Signalweg in einer speziellen physiologischen Bedingung dominiert oder in wieweit die beiden parallel zueinander ablaufen. Interaktionen zwischen den beiden Signalkaskaden sind vor allem auf Ebene von RAF beschrieben. Beispielsweise kann RAF an Ser^{259} von AKT phosphoryliert und damit inhibiert werden. Der PI3K-Inhibitor LY294002 hemmt die RAF-vermittelte Proliferation in Zellen. Auch auf Ebene des mTORC1 sind Schnittstellen bekannt. Durch die mTORC1-Inhibition über RAD001 kommt es zu einer Aktivierung des ERK-Signalwegs. Die p70S6K kann neben mTOR auch von ERK aktiviert werden. Zudem wird das ribosomale Protein S6 sowohl von der p70S6K als auch von der p90RSK aktiviert. Die Aktivierung der letzteren ist ERK-abhängig [114].

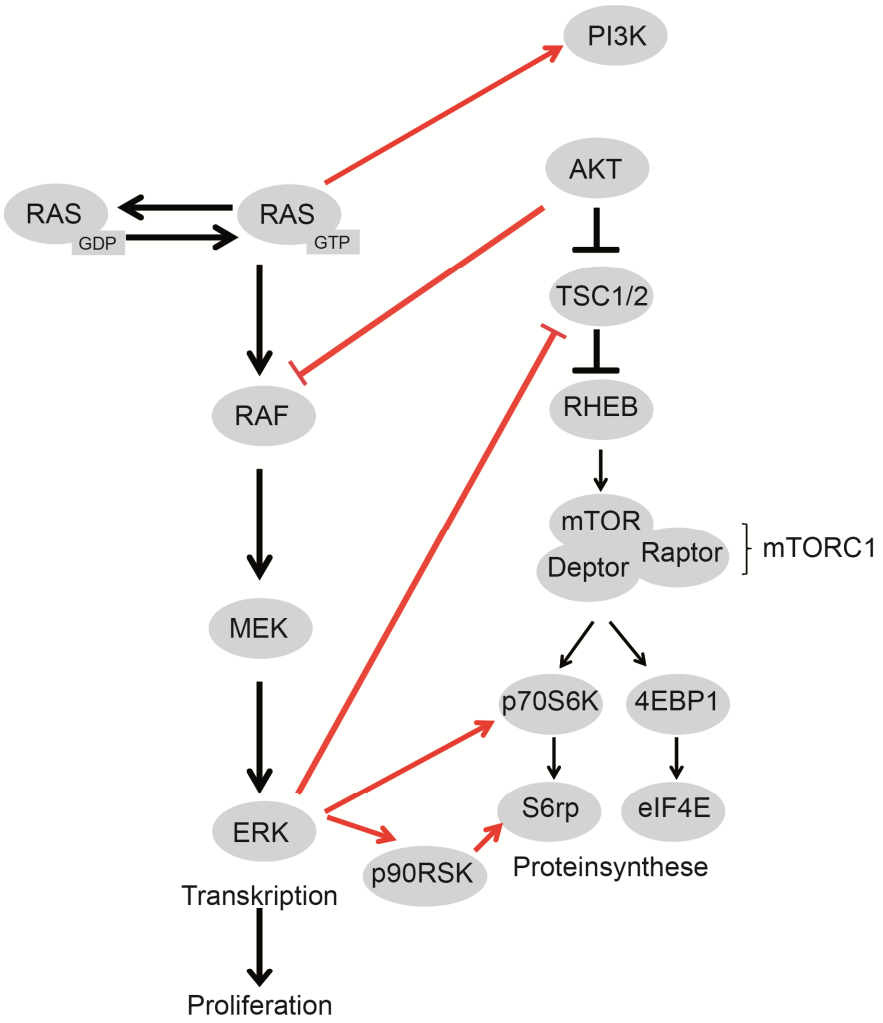


Abbildung 1-5 Darstellung der wichtigsten beschriebenen Interaktionen zwischen dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg, nach [108, 115].

1.3.2.3. Signalweg-aktivierende Mutationen in der AML

In der AML ist die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges das Ergebnis mehrerer Faktoren. Unter diesen sind aktivierende RTK-Mutationen von z.B. *FLT3* und *cKIT*, die in der AML mit einer Häufigkeit von 28% bzw. 4% vorliegen [116]. Weiterhin können aktivierende Mutationen in der kleinen GTPase RAS zur Aktivierung sowohl des PI3K- als auch des ERK Signalwegs führen. Auch diese sind in der AML beschrieben, wenn auch insgesamt in geringerer Frequenz von 12% [116]. Mutationen in Schlüsselgenen des PI3K Signalwegs wie der Gene *PI3K* [87], *AKT* [117] und *PTEN/SHIP* [118-120] selbst, sind in soliden Tumoren sehr häufig

[86, 87], in myeloischen Neoplasien hingegen nur in geringen Fallzahlen beschrieben [121-123]. Weiterhin sind autokrine und parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren wie „*insulin-growth factor 1*“ (IGF-1) [124-126] und „*vascular-endothelium-derived growth factor*“ (VEGF) [127] als aktivierende Mechanismen in der AML möglich.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine lebensbedrohliche maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Unbehandelt führt sie in kurzer Zeit zum Tod des Patienten. Sie wird aufgrund der Zytogenetik und der Molekulargenetik in verschiedene prognostische Gruppen unterteilt, die sich im Langzeitüberleben sehr unterscheiden. Besonders Patienten, die komplexe chromosomale Aberrationen oder eine bestimmte Translokation, z.B. unter Beteiligung des *MLL*-Gens, tragen, haben ohne risikoreiche Knochenmark-Transplantationen nur eine geringe Überlebenswahrscheinlichkeit. Trotz ihrer immensen Heterogenität hat sich die Standardbehandlung der AML in den letzten 40 Jahren kaum verändert. Hochdosis-Chemotherapien stellen jedoch vor allem die Hauptgruppe der Patienten, die der über 60-jährigen, vor eine große Herausforderung. Zielgerichtete Therapien sind in der AML-Therapie, wie auch bei anderen Tumorarten, von immer größerem Interesse. Eine Möglichkeit bietet der Einsatz spezifischer Inhibitoren, die sich gegen biologische Eigenschaften der Krebszelle richten. Als Ziele eignen sich hierfür in der Tumorzelle fehlregulierte Signalwege, von denen diese Zellen, nicht aber gesunde Zellen des Patienten, oft in hohem Maße abhängig sind und die deren Transformation bewirken oder aufrecht erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Signalweg-Abhängigkeit von primären humanen AML-Blasten untersucht. Eine essentielle Rolle des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs wurde über Apoptose-Versuche in primären AML-Blasten gezeigt. Da die Arbeit mit primärem Material gewisse Limitationen aufweist, folgten weitere Analysen in Zelllinien. Hierbei wurde die Wirkungsweise und Aktivität dreier PI3K/AKT/mTOR-adressierender Inhibitoren weiter charakterisiert. Durch das sehr heterogene Ansprechen der Zellen auf die Inhibitoren ergab sich zudem die Frage nach molekularen oder biochemischen Markern für ein Ansprechen der Zellen. Um das Wirkungsspektrum interessanter Substanzen umfassender zu untersuchen, wurde ein *in vivo*-Mausmodell etabliert. Inhibitoren gegen spezifische Signalwege sind bereits in klinischen Studien vertreten. Ihre Wirkung als Monotherapie war in der Vergangenheit jedoch oft begrenzt. Daher wurden mögliche ergänzende, synergistisch wirkende Mechanismen aufgezeigt. Diese könnten die Wirkungsweise einzelner Inhibitoren verbessern.

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurde mit den folgenden Geräten gearbeitet.

Tabelle 3-1 Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Analysenwaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Bakterien	Heraeus, Osterode
Bakterienschüttler Excella E25	Eppendorf, Hamburg
Drehroller Rollermix SRT6	Stuart, Staffordshire, UK
Entwicklermaschine	Kodak, Stuttgart
Expositionskassetten	Amersham Pharmacia, Freiburg
FACSCalibur	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Sorter Aria	Beckton Dickinson, Heidelberg
Geldokumentationskammer E-BOX VX5	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Heizblock BT 130-1	Heap Labor Consult, Bovenden
IVIS Lumina II Imaging System	PerkinElmer, Waltham, USA
Brutschrank CB 150 für Zellkultur	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer MR301	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle HF24M241	Siemens, München
Mörser aus Porzellan	Schubert & Weiss Omnilab, München
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Pipetten	Gilson, Limburg
Präzisionswaage 440-45	Kern & Sohn, Balingen
Probenkämme für SDS-PAGE	Invitrogen, Darmstadt
SDS-Gelelektrophoresekammer *(Xcell Sure Lock Mini cell)*	Invitrogen, Darmstadt
Spannungsgerät PowerPac300	BioRad, München

Spektralphotometer (Nanodrop1000)	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl
Thermocycler Peqstar	Peqlab, Erlangen
Thermoschüttler Compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge 3K30	LTF Labortechnik, Wasserburg
Vi-Cell XR Cell Analyzer	Beckman Coulter, Krefeld
Vortexer	Cenco, Breda, NL
Wasserbad M1003	GFL, Burgwedel

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 3-2 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Filterpipettenspitzen	VWR, Darmstadt
Fotofilme: Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Gel Blotting-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim
Nitrozellulose Transfermembran	Whatman, Dassel
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Gilson, Limburg
QIAshredder Säulen	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg
SDS-Gelkassetten	Invitrogen, Darmstadt
Skalpelle	Brandt, Wertheim
Sterilfilter	Millipore, Billerica, MA, USA
Serologische Einmalpipetten	Corning Incorporated, NY, USA
Vi-Cell 4 ml *Sample Vials*	Beckman Coulter, Krefeld
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (6 Vertiefungen)	Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturschalen (12, 48, 96-Vertiefungen)	Nunc, Thermo Fisher Scientific,
Zellsieb 45 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (5 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	BD Bioscience, Heidelberg

3.1.3. Chemikalien und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 3-3 Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Herstellerangaben

100 bp-Leiter	Promega, Madison, WI, USA
1 kb-Leiter	Promega, Madison, WI, USA
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Roth, Karslruhe
Agarose, Broad Range	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	BioRad, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Assay Reagenz	BioRad, München
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Coulter Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter, Krefeld
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Krefeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Luziferin	BIOMOL GmbH, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karslruhe
ECL Plus Detection Reagenz	Amersham, Freiburg
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt
FiColl-Histopaque-1077	GE Healthcare, München
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
G418 Sulfat	Calbiochem
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), murin	Immunotools, Friesoythe
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyroxypropyl-β-Cyclodextrin	Applichem

Interleukin-3 (IL-3), murin	Immunotools, Friesoythe
Interleukin-6 (IL-6), murin	Immunotools, Friesoythe
Insulin-Transferin-Selen (IST)	Gibco/Invitrogen, Karslruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Leibovitz-15 (L-15) Zellkulturmedium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MEM-α, Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methocult® H4434	StemCell Technologies, Grenoble, F
Methocult® M3534	StemCell Technologies, Grenoble, F
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karslruhe
N-Methyl-2-Pyrrolidon	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin – Streptomycin Lösung	Invitrogen, Darmstadt
Proteinmarker VI	Peqlab, Erlangen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach
Ponceau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polybren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenglycol-300 (PEG-300)	Applichem
Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Stammzellfaktor (SCF), murin	Immunotools, Friesoythe
Sodiumdodeclysulfat (SDS)	BioRad, München
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Tween-20	Merck, Darmstadt

SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen, Darmstadt

3.1.4. Kitsysteme

Tabelle 3-4 Verwendete Kitsysteme mit Herstellerangaben

DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Endofree Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
FIX & PERM® Cell Permeabilization Kit	LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA
MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland, ME, USA
RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St.Leon-Rot
RNase free DNAse Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.1.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 3-5 Verwendete Puffer und Lösungen mit Rezeptangaben

10x Blotpuffer Western Blot (5 l)	72,7 g Tris 6,6 g Glycin 0,5 g Natriumdodecylsulfat ad H_2O_{dest}
1x Blotpuffer Western Blot mit Methanol	80 ml 10x Blotpuffer 200 ml Methanol 720 ml H_2O_{dest}

10x Elektrophoresepuffer	151,5 g Tris 720 g Glycin 50 g Natriumdodelylsulfat 5 l H_2O_{dest}
HBS Puffer	5,7 g HEPES 8,2 g NaCl 0,1 g $Na_2HPO_3x2H_2O$ 50 ml H_2O_{dest}
5x KCM	5 ml 3 M KCl 4,5 ml 1 M $CaCL_2$ 7,5 ml 1 M $MgCl_2$
LB-Agar	32 g Agar 1 l H_2O_{dest}
$LB_{Ampicillin}$-Platten	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach
2x Proteinprobenpuffer (Lämmli-Puffer)	187,5 mM Tris 6% SDS 30% Glycin Spatelspitze Bromphenolblau
Ponceau-Lösung (100 ml)	0,5 g Ponceau S 1 ml Eisessig ad H_2O_{dest}

Stripping-Puffer (1 l)	7,5 g Tris 70 ml Mercaptoethanol 20 g Natriumdodecylsulfat ad H_2O_{dest}, pH 6.7
TAE-Puffer (5 l)	242,3 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure 18,6 g EDTA 2Na-2H_20 ad H_2O_{dest}
10x TBS (5 l)	12,1 g Tris 87,6 g NaCl ad H_2O_{dest}
TBS-T	100 ml 10x TBS 900 ml H_2O_{dest} 1% Tween-20
Tris-HCl 1,5 M (5 l)	908,5 g Tris ad $H_2O_{dest,}$ pH 6.8 bzw. 8.8
Zelllysepuffer (500 ml)	25 ml 1 M HEPES, pH 7.5 15 ml 5 M NaCl 2,5 ml 200 mM EGTA 100 ml 50% Glycerol 5 ml Triton X-100 2,1 g NaF 2,2 g $Na_4P_2O_7x10H_2O$ ad H_2O_{bidest}

3.1.6. Plasmide

Tabelle 3-6 Verwendete Expressionvektoren

Bezeichnung	Größe	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft
pMSCV-IRES-neo (pMSCVneo)	6,4 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Prof. Slany, Erlangen
pMSCVneo-Flag-MLL-ENL	11,1 kb	Retroviraler Expressionsvektor	Ampicillin	Prof. Slany, Erlangen

3.1.7. Oligonukleotide

Tabelle 3-7 Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung und den Expressionsnachweis von MLL-ENL

Bezeichnung	Sequenz 5´→3´	Verwendung
MLL-ENL_fwd1	ACAGCTGTCGGTGGCGCTT	Sequenzierung
MLL-ENL_fwd2	CTTCTGCTACGTTTCAGCAAGCCA	Sequenzierung
MLL-ENL_fwd3	TCAGGCTTCTGAGGAGATTCAGGT	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd4	GCCCTCTTCTGAGAGCTCCAAGATTT	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd5	AAAGCAACAGGGCGGAAGAAGT	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd6	TGCCTGAGGACTGTGGTGTTTGTA	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd7	GCAGGAGAATGCAGGCACTTTGAA	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd8	TTACCCACAATTCCACTCTCTGCC	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd9	AGACTCCAGCTCAGACTCAGACTT	Sequenzierung
MLL-ENL-fwd7x	AGGTCCAGAGCAGAGCAAACAGAA	Expressionsnachweis MLL-ENL
MLL-ENL-rev9x	TGACATTGAAGTGGCCAGTCTCCT	Expressionsnachweis MLL-ENL

fwd: „*forward"*, rev: „*reverse"*

3.1.8. Antikörper

Tabelle 3-8 Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB)

Primärantikörper	Art	Wirt	Hersteller	Verdünnung
α-β-Aktin	WB	Maus	Sigma-Aldrich	1:20000
α-AKT	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-B220-FITC	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
α-CD11b-PerCP-Cy™5.5	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
α-CD45-APC	F	Maus	BD Pharmingen™	1:10
α-CD117-PE	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
α-GAPDH	WB	Maus	Santa Cruz	1:10000
α-Gr-1-PE	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
IgG1-APC Isotyp Kontrolle	F	Maus	BD Pharmingen™	1:10
IgG2a-FITC Isotyp Kontrolle	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
IgG2b-PE Isotyp Kontrolle	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
IgG2b-PerCP™5.5 Isotyp Kontrolle	F	Ratte	BD Pharmingen™	1:100
IgG-Alexa647 Isotyp Kontrolle	F	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:50
Kaninchen IgG Isotyp Kontrolle	F	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:400
α-44/42 MAPK	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:2000
α-pS6rp ($Ser^{235/236}$)	F	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:50
α-pAKT (Ser^{473})	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-pMAPK Thr^{202}/Tyr^{204})	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-pS6K Thr^{389}	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-S6K	WB	Kaninchen	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-Tubulin	WB	Maus	Sigma-Aldrich	1:2000

Tabelle 3-9 Verwendete Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB)

Sekundärantikörper	Art	Wirt/Typ	Hersteller	Verdünnung
α-Kaninchen-HRP	WB	Ziege	Sigma-Aldrich	1:10000
α-Kaninchen-IgG FAB_2-Fragment-Alexa647	F	Maus	Cell Signaling/NEB	1:1000
α-Maus-HRP	WB	Ziege	Sigma-Aldrich	1:10000

3.1.9. Inhibitoren

Alle verwendeten Inhibitoren wurden in Pulverform bezogen und vor ihrer Verwendung in sterilem DMSO nach Herstellerangaben gelöst. Die Lösungen wurden anschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3-10 Verwendete Inhibitoren mit Wirkungsweise und Bezugsquelle

Bezeichnung	Wirkungsweise	Bezugsquelle
AC220	FLT3-Inhibitor	SelleckChem, Housten, TX, USA
AZD-6244	MEK1/2-Inhibitor	SelleckChem, Housten, TX, USA
BEZ-235	Dualer PI3K/mTOR-Inhibitor	SelleckChem, Housten, TX, USA
Cisplatin	Zytostatikum	SelleckChem, Housten, TX, USA
Cytarabin	Zytostatikum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Daunorubicin	Zytostatikum	Pfizer, Berlin
LDE-225	*Smoothened*-Inhibitor	Active Biochemicals, HongKong, China
MK-2206	AKT-Inhibitor	SelleckChem, Housten, TX, USA
PKF115-584	TCF/β-Catenin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rapamycin	mTORC1-Inhibitor	SelleckChem, Housten, TX, USA
Sorafenib	Multikinase-Inhibitor	Biocat GmbH, Heidelberg

3.1.10. Zellen und Nährmedien

Die hier angegebenen Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville) oder der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) als gefrorene Kultur bezogen. Phoenix Eco-Zellen wurden von der Firma Orbigen (San Diego, CA, USA) erworben.

Tabelle 3-11 Zelllinien mit Angabe der Herkunft und der Morpholgie

Name	**Organismus**	**Tumor / Gewebe**	**Morphologie**
Ba/F3	Murin aus BALB/C Mäusen	Pro-B Zellen	suspensiv
HL-60	Human	Akute myeloische Leukämie	suspensiv
K-562	Human	Chromische lymphoblastische Leukämie	suspensiv
MDA-MB-453	Human	Mamma-Karzinom	Semi-adhärent
MOLM-13	Human	Akute myeloische Leukämie	suspensiv
MV4-11	Human	Akute myeloische Leukämie	suspensiv
OCI-AML3	Human	Akute myeloische Leukämie	suspensiv
Phoenix Eco	Human	Embryonales Nierenepithel	adhärent
THP-1	Human	Akute myeloische Leukämie	suspensiv
WEHI-3B	Murin aus BALB/C Mäusen	Myelomonozytäre Leukämie	adhärent

3.1.11. Patientenproben

Im Falle aller verwendeten humanen AML-Patientenproben erfolgte auf eine Aufklärung des Patienten eine Einverständniserklärung in schriftlicher Form. Die Information zur Erkrankung des Patienten, zum Geschlecht und Alter des Patienten, zur FAB-Klassifizierung, zum Prozentsatz an Blasten, zur Zytogenetik und zum Mutationsstatus von *FLT3, NPM1*, *MLL*, *CEBPA* wurden im Rahmen der Routine-diagnostik im Labor für Leukämiediagnostik der LMU München erhoben und zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden für die *in vitro* Kurzzeitversuche immer frisch verwendet, für die Genexpressionsanalysen und die Mutationsanalysen wurde auf asservierte RNA bzw. DNA zurückgegriffen.

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherechia coli*-(*E.coli*-) Stamm DH5α verwendet. Die Bakterien wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 10-15 Kolonien gepickt, als Vorkultur in 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 im Schüttler bei 250 rpm und RT für 5 h inkubiert. Nach anschließendem Abkühlen auf Eis wurde die Bakterienkultur bei 4°C für 15 min bei 1000 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 64 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut bei 4°C und 1000 g für 15 min sedimentiert. Nach erneuter Resuspension des Zellpellets in 16 ml TB-Puffer, wurden 1,2 ml DMSO zugegeben und der Ansatz fünf bis sechsmal invertiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen für eine spätere Nutzung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.2. Chemische Transformation kompetenter E.coli Bakterien

Ein Aliquot zu 50 µl kompetenter *E.coli*-Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Für einen Ansatz wurde 1 µl Plasmid-DNA mit 14 µl Wasser und 10 µl 5xKCM gemischt und mit 25 µl kompetenten Bakterien versetzt. Die Zugabe von KCM bewirkt, dass die Bakterienzellmembran durchlässig wird und die Zelle damit in der Lage ist, Fremd-DNA wie z.B. Plasmidvektoren aufzunehmen. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz 20 min auf Eis und weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz bei 200 rpm und 37°C eine Stunde im Bakterienschüttler inkubiert. In dieser Zeit sind die Bakterien in der Lage, das über den Plasmidvektor aufgenommende Resistenzgen zu exprimieren, welches die spätere Selektion von transformierten Bakterien ermöglicht. Nach einer Stunde Inkubation wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und 100-150 µl der Kultur auf einer vorgewärmten, mit Ampicillin-versetzten LB-Platte (LB_{amp}) ausplattiert. Nach Inkuba-

tion bei 37°C über Nacht war es möglich, einzelne positive Bakterienkolonien für deren weitere Expandierung von der Platte zu picken.

3.2.1.3. Plasmid-DNA Präparation

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet.

Plasmid-Minipräparation mittels Qiagen Endofree Plasmid Mini Kit

Zur Isolation kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurde eine einzelne Kolonie am Abend von der Platte gepickt und über Nacht in 2 ml LB_{amp}-Medium bei 37°C und 200 rpm auf dem Bakterienschütler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *Qiagen Endofree Plasmid Mini Kit* aus den Bakterien isoliert und gelöst in EB-Puffer bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Plasmid-Maxipräparation mittels Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde eine einzelne Bakterienkolonie von der Platte gepickt und mit 2 ml LB-Medium als Vorkultur für ca. 8 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die gesamte Vorkultur wurde anschließend in einen Glaskolben mit 100 ml LB-Medium unter Zugabe des Selektionsantibiotikum Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus den expandierten Bakterien. Hierzu wurde das *Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration und Reinheit im Spektralphotometer Nanodrop1000 bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C zu je 20 µl Aliquots gelagert.

3.2.1.4. Analytischer Restriktionsverdau

Alle Plasmid-DNA Konstrukte wurden auf ihre Vektor- und Insertgröße sowie auf korrekte Orientierung des Inserts überprüft. Hierzu erfolgte ein analytischer Verdau

bei dem die Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und die entstehenden Produkte anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Ein Ansatz bestand aus folgenden Komponenten und wurde für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert.

Isolierte Plasmid-DNA [1µg]	x µl
Restriktionspuffer [10x]	1 µl
Restriktionsenzym [20000 U]	1 µl
ad steriles Wasser	20 µl

3.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei ist es durch Anlegen einer Spannung möglich, unterschiedliche DNA-Fragmente nach ihrer Größe bzw. der damit korrelierenden Ladung im elektrischen Feld aufzutrennen. Es wurden 1,5–2%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTAE-Puffer gelöst, kurz abgekühlt, mit SybrSafe versetzt (1:10.000) und in einen Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Abkühlen und Erhärten der Agarose wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gelegt und vollständig mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben wurden 1:6 mit DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die durch den Probenkamm geformten Taschen pipettiert. Zur Größenorientierung wurden die zu analysierenden Proben von einem DNA-Größenmarker flankiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer angelegten Spannung von 100 V. Das dem Agarosegel zugegebene SybrSafe interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und macht die aufgetrennten DNA-Fragmente dadurch sichtbar. Das Agarosegel wurde nach der Gelelektrophorese auf einem UV-Tisch mit einer Digitalkamera abfotografiert.

3.2.1.6. Extraktion genomischer DNA aus Zellen

Zur Extraktion genomischer DNA aus Zellen wurde das *Qiagen Blood & Tissue Kit* verwendet. Pro Ansatz wurden gemäß den Herstellerangaben maximal $2*10^6$ Zellen eingesetzt und lysiert. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und die

Konzentration und Reinheit im Spektralphotometer Nanodrop1000 bestimmt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die genomische DNA bei -20°C bzw. -80°C bei Zeiträumen von über drei Monaten gelagert.

3.2.1.7. Extraktion von *messenger* RNA (mRNA) aus Zellen

Um mRNA aus Zellen zu gewinnen, wurde das *RNeasy Mini Kit* unter vorherigem Zellaufschluss mit Hilfe von QIAShredder Säulen verwendet. Pro Ansatz wurden gemäß den Herstellerangaben maximal $1*10^7$ Zellen eingesetzt und lysiert. Die isolierte RNA wurde bis zur ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.1.8. Reverse Transkription von mRNA in *copy* DNA (cDNA)

Zur Durchführung von Expressionsanalysen wurde die zuvor isolierte mRNA mit Hilfe des *RevertAid Premium-First-Strand cDNA Synthesis Kit* gemäß den Herstellerangeben in cDNA umgeschrieben.

Ein Ansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Isolierte mRNA [1µg]	x µl
dNTPs Mix [10mM]	1 µl
Oligo$(dT)_{18}$ Primer	1 µl
ad RNase freies Wasser	15 µl

Nach gründlichem Mischen des Ansatzes wurde dieser für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend die reverse Transkriptase mit dem geeigneten Enzympuffer zugegeben:

Vorheriger Ansatz	15 µl
RevertAid™ Premium Enzyme Mix	1 µl
5x RT Puffer	4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Der gesamte Ansatz wurde für 30 min bei 50°C inkubiert. In diesem Schritt wird die cDNA synthetisiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch 5 min

Inkubation bei 85°C denaturiert und die reverse Transkription dadurch beendet. Die hergestellte cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.1.9. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kette-Reaktion amplifiziert. Alle benötigten Reagenzien wurden von der Firma Peqlab (Erlangen) bezogen.

Folgender Standard-Ansatz wurde auf Eis vorbereitet und in PCR-Reaktionsgefäße überführt:

Template DNA [20-100ng]	x µl
dNTP Mix [10 mM]	2 µl
Forward Primer [10µM]	0,5 µl
Reverse Primer [10µM]	0,5 µl
10x Reaktionspuffer S	2,5 µl
$MgCl_2$ [25 mM]	0,75 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
ad Nuklease-freies Wasser	25 µl

Nach Mischen des Ansatzes durch Pipettieren wurden die Reaktionsgefäße in den Thermocycler überführt und die DNA mit folgendem Temperaturprogramm amplifiziert:

Vorgang	**Temperatur**	**Dauer**	**Anzahl der Zyklen**
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	einmalig
Denaturierung	95°C	45 s	40 Zyklen
Anlagerung der Primer	50-62°C *[1]	45 s	
Elongation	72°C	30 s - 2 min *[2]	
Abschließende Elongation	72°C	5 min	einmalig
Abkühlung	4°C	∞	

*[1] abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer

*[2] abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments (30 s pro 500 bp)

3.2.1.10. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Jede verwendete Plasmid-DNA wurde zur Qualitätskontrolle sequenziert, um die Richtigkeit des Konstrukts vor und während der experimentellen Arbeiten zu garantieren. Hierzu wurde die Plasmid-DNA mit entsprechenden Sequenzier-Primern zur Firma Sequiserv (Vaterstetten) geschickt. Nach Erhalt der dort ermittelten Sequenzen wurden diese auf eventuelle Sequenzabweichungen zur NCBI-Sequenz des Gens geprüft.

3.2.1.11. Erhebung der molekulargenetischen Daten

Von allen verwendeten humanen AML-Patientenproben lag die Information zur Zytogenetik und zum Mutationsstatus von *FLT3*, *NPM1*, *MLL, CEBPA* im Rahmen der Routinediagnostik im Labor für Leukämiediagnostik der LMU München vor. Der Mutationsstatus aller anderen Gene wurde im Rahmen einer Kooperation mit Dr. med. Klaus Metzeler (Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum der LMU, München) ermittelt. Eine zusätzliche Validierung der *RAS*-Mutationen erfolgte in Kooperation mit Dipl.-Ing. Tanja Hinrichsen und Oliver Wachter vom Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Klein & Rost (Martinsried). Bei der hierfür verwendeten Methode handelte es sich um eine gerichtete Sequenzierung vorgegebener und zuvor amplifizierter DNA-Abschnitte eines Gens, sogenannter Amplikons. Da bei dieser Sequenzierung nicht das ganze Gen sequenziert wird, sondern nur vorgegebene Teilbereiche, ist es möglich, eine sehr hohe Lesetiefe zu erreichen und auch kleinere Zellklone (mit Allelfrequenzen von bis zu 2%) zu detektieren. Weiterhin können mehrere Amplikons einer Probe parallel sequenziert werden. Die vorgegebenen Amplikons umfassen bereits bekannte *Hotspots* der jeweiligen Gene, d.h. Regionen des Gens, die häufig oder präferentiell von Mutationen betroffen sind.

Tabelle 3-12 Alphabetische Liste der Gene, die mittels Amplicon-Sequenzierung auf Mutationen untersucht wurden.

ASXL2	*CBL*	*FLT3*	*GATA2*
IDH1	*IDH2*	*KRAS*	*NPM1*
NRAS	*P53*	*RUNX1*	*SF3B1*
SRSF2	*TET2*	*U2AF1*	*WT1*

3.2.1.12. Erhebung der Genexpressionsanalysen

Die Genexpressionsanalysen zu den Genen *Ki-67* und *Evi-1* erfolgten mittels Microarrays (Affymetrix HG-U133 A/B und 2.0 plus oligonucleotide microarray) und wurden in Kooperation mit Dr. med. Tobias Herold (Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum der LMU München) durchgeführt und ausgewertet. Alle Hybridisierungsschritte wurden gemäß den Affymetrix Protokollen durchgeführt.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert und in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination durch Mykoplasmen untersucht.

3.2.2.1. Kultur adhärenter Zellen

Phoenix eco

Die humane Nierenepithel-Zelllinie Phoenix Eco wurde in DMEM-Medium unter Zugabe von 10% FKS und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert.
Um die Zellen zu ernten, wurde das Zellkulturmedium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5 ml Trypsin/EDTA gleichmäßig auf die Zellen gegeben und für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Der Ablösevorgang wurde durch Zusetzen von 7,5 ml Zellkulturmedium in der Kulturflasche beendet. Ein Teil der erhaltenen Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl zurückbehalten, die restlichen Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und für Experimente oder für die weitere Kultivierung erneut ausgesät.

Wehi-3B und Herstellung von Wehi-3B-konditioniertem Medium

Die murine myelomonozytäre Leukämie-Zelllinie WEHI-3B ist eine Interleukin-3 (IL-3) sekretierende Zelllinie und wurde in DMEM-Medium unter Zugabe von 10% FKS und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle drei Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet. Um die Zellen zu ernten, wurde das Medium abgenommen und für die

Gewinnung von konditioniertem Medium weiterverwendet. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit einem Zellschaber mechanisch von ihrem Untergrund abgelöst. Das zuvor abgenommene Medium wurde steril filtriert und diente als IL-3 Quelle für die Kultivierung der Ba/F3 Zelllinie.

Kultur von MDA-MB-453

Die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 wurde in L-15 Medium unter Zugabe von 10% FKS und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden gemäß der empfohlenen Angaben der DSMZ in einer Zellzahl von $4*10^6$ Zellen pro 80 cm^2 Fläche ausgesät und alle vier bis fünf Tage gesplittet. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen. Mit einem Zellschaber konnten die Zellen anschließend mechanisch von ihrem Untergrund abgelöst und für Experimente bzw. für eine erneute Aussaat verwendet werden. Die verwendeten Zellkulturflaschen besaßen gemäß den empfohlenen Angaben der DSMZ einen komplett verschließbaren Deckel, um die CO_2-Exposition zu reduzieren.

3.2.2.2. Kultur von Suspensionszellen

Primäre humane AML-Blasten

Die primären Leukämiezellen stammten aus dem Knochenmark von Patienten, die erstmalig an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt waren und zum Zeitpunkt der Abnahme mehr als 75% Blasten im Knochenmark aufwiesen. Die Patienten waren weder vorbehandelt noch aktuell in einer Behandlungsphase ihrer Erkrankung. Die primären Proben wurden im Labor für Leukämie-Diagnostik der LMU München aufbereitet. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die mononukleären Zellen aus der Probe isoliert und anschließend in Suspension an unser Labor übergeben. In einzelnen Fällen wurden die mononukleären Zellen in unserem Labor selbst isoliert. Im ViCell Zellzählgerät wurde die Zahl viabler Zellen bestimmt und mittels Durchflusszytometrie der Prozentsatz viabler Zellen. Die Zellen wurden nur bei einer Viabilität von mindestens 90% für Experimente verwendet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 GlutaMAX™ unter Zugabe von 20% FKS, 1 mM Natrium-

pyruvat, 6 µg/ml Insulin, 3 µg/ml Transferin, 4 ng/ml Selen, 50 µM Thioglycerol, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Gentamycin. Für die Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von $1*10^5$ Zellen pro 100 µl Medium in einer 96-Loch Mikrotiterplatte ausgesät.

Humane Leukämie-Zelllinien

Die verwendeten humanen Leukämie-Zelllinien wurden in RPMI-1640 GlutaMAX™ bzw. α-MEM (nur OCI-AML3) unter Zugabe von 20% FKS und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden gemäß der empfohlenen Angaben der DSMZ in einer Zellzahl von $0,1\text{-}1*10^6$ Zellen pro ml Medium ausgesät und alle 2-3 Tage gesplittet.

Murine Ba/F3 Zelllinie

Die murine pro-B Zelllinie Ba/F3 ist eine IL-3 abhängige Zelllinie und wurde in RPMI-1640 GlutaMAX™ unter Zugabe von 10% FKS, 10% Wehi-3B-konditioniertem Medium und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden gemäß den empfohlenen Angaben in einer Zelldichte von $0,04*10^6$ Zellen pro ml Medium ausgesät und alle zwei bis drei Tage gesplittet.

Murine MLL-ENL$^+$-immortalisierte Zelllinie

Die murinen *MLL-ENL*$^+$-immortalisierten Zellen wurde in RPM1-1640 GlutaMAX™ unter Zugabe von 20% FKS, 5 ng/ml IL-3 und 0,5% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $0,04*10^6$ Zellen pro ml Medium ausgesät und alle zwei bis drei Tage gesplittet.

3.2.2.3. Test auf Mykoplasmen

Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose Bakterien, die mit bloßem Auge unter dem Mikroskop nicht sichtbar sind. Laufende Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen von etwa vier Wochen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Hierzu wurde der *MycoAlert®-Assay* verwendet. Dieser Test ist in der Lage, die Aktivität von Mykoplasmen-Enzymen zu messen, deren

Aktivität zu einem Anstieg der ATP-Konzentration führt. Das entstehende ATP wird von dem Enzym Luziferase unter Emission von Licht verbraucht. In einem Luminometer wird die Lichtemission vor und nach Zugabe der Reagenzien gemessen. 25 µl des zu testenden Zellüberstandes wurden in eine weiße 96-Loch Platte pipettiert und 25 µl Reagenz R (Lysereagenz) zugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die erste Messung im Luminometer (Messung A) durchgeführt und die Werte für jeden Ansatz notiert. Im zweiten Schritt wurden dem Ansatz jeweils 25 µl Reagenz S (Substratreagenz) zugegeben, bei RT für 10 Minuten inkubiert und anschließend die zweite Messung (Messung B) im Luminometer durchgeführt. Für die Auswertung wird der Wert von Messung B durch den Wert der Messung A geteilt. Laut Herstellerangaben liegt bei einem Wert von >1 eine Kontamination mit Mykoplasmen vor. Liegt der Wert <1, ist eine Kontamination auszuschließen. Zellen, die mit Mykoplasmen kontaminiert waren, wurden nicht für weitere Versuche verwendet sondern sofort im Anschluss an die Messung entsorgt.

3.2.2.4. Transiente Transfektion von Zellen zur Herstellung retroviraler Partikel

Zur Herstellung retroviraler Partikel wurde die adhärente Verpackungszelllinie Phoenix Eco verwendet. Die transiente Transfektion erfolgte über $Ca_3(PO_4)_2$-DNA-Kopräzipitation. Einen Tag vor der Transfektion wurden 4,5 $*10^6$ Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde vier Stunden vor der Transfektion durch neues vorgewärmtes Medium ersetzt. Pro Ansatz wurden 15 µg Plasmid-DNA mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 450 µl aufgefüllt und 50 µl sterile 2 M $CaCl_2$-Lösung zugegeben. Diese DNA-Lösung wurde gemischt und tropfenweise mit 500 µl 2X HBS Puffer, pH 7,05 gemischt. Nach Vortexen des Ansatzes und einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die entstandenen DNA-Kalziumphosphat-Komplexe langsam auf die Zellen getropft und die Zellkulturschale anschließend leicht geschwenkt. Nach 12 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch frisches vorgewärmtes Medium ersetzt und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und durch 8 ml frisches Medium ersetzt. Der abgenommene Überstand wurde steril filtriert und zur Transduktion weiterverwendet („24 h Viren“). Nach weiteren

24 Stunden wurde erneut der Überstand von den Zellen abgenommen („48 h Viren“), steril filtriert und für die zweite Transduktionsrunde verwendet.

3.2.2.5. Stabile Transduktion von murinen hämatopoietischen Vorläuferzellen

Isolation muriner Knochenmarkszellen

Vier Tage vor der Knochenmarkisolation wurde den C57BL/6 Mäuse intraperitonal 150 mg 5-Fluorouracil (5-FU) pro kg Körpergewicht verabreicht. Die 5-FU Injektion bewirkt eine Anreicherung von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark der Mäuse. Die Mäuse wurden durch CO_2 narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Alle Eingriffe wurden gemäß den ethischen und gesetzlichen Richtlinien des Tierschutzgesetzes und nach schriftlicher Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Nummer 55.2.-1-54-2531-95-10). Zur Isolierung des Knochenmarks wurden Femur, Sternum und Tibia der Mäuse steril präpariert und in PBS/2%FKS auf Eis bis zur Isolierung aufbewahrt. Unter Zugabe von sterilem, eiskaltem PBS/2%FKS wurden die Knochen gemörsert, bis sie durchsichtig erschienen und das Knochenmark vollständig aus den Knochen in die Lösung übergegangen war. Das gemörserte Gewebe wurde anschließend steril durch ein Zellsieb filtriert, um gröbere Gewebestücke zu entfernen. Das sterile Filtrat wurde 10 Minuten bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in 20 ml sterilem Ammoniumchlorid aufgenommen, um die Erythrozyten aus dem Knochenmarksfiltrat zu entfernen. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden 30 ml PBS zugegeben und das Filtrat erneut bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 10 ml RPMI-1640 GlutaMAX™ unter Zugabe von 20% FKS aufgenommen. Im ViCell wurde die Zellzahl bestimmt und je $5*10^5$ Zellen wurden in 1 ml Aktivierungsmedium aufgenommen.

Aktivierungsmedium:

RPMI-1640 Glutamax
20% FKS
1% Penicillin/Streptomycin
100 µM β-Mercaptoethanol
100 ng/ml murines SCF
10 ng/ml murines IL-3
10 ng/ml murines IL-6

Pro Aussparung einer 96-Loch Spitzbodenplatte wurden je 200 µl Zellsuspension (entspricht $1*10^5$ Zellen) über Nacht inkubiert.

Retrovirale Transduktion

Je Transduktionsansatz wurden 1,8 ml der „24 h Viren“ in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 µl Polybren (Stock: 8 mg/ml) gemischt und $1*10^5$ Zellen in 200 µl Aktivierungsmedium zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 2,5 Stunden bei 2500 rpm und 35°C spinokuliert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Aktivierungsmedium aufgenommen und erneut über Nacht in einer 96-Loch Spitzbodenplatte inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen auf gleiche Weise mit den „48 h Viren“ spinokuliert. Im Anschluss an die zweite Spinokulierung wurden die Zellen ein weiteres Mal über Nacht in Aktivierungsmedium kultiviert.

Test auf Transformation der Zellen

Um die Transformation der Zellen durch die eingebrachte DNA zu zeigen, wurde ein sogenannter *Colony-forming Assay* durchgeführt. Für jedes Konstrukt (Leervektor pMSCVneo bzw. pMSCVneo-flag-MLL-ENL) wurden in je zwei Zellkulturschalen 40.000 Zellen in 1 ml Methylzellulose-Medium (Methocult M3534) unter Zugabe von 10 ng/ml GM-CSF und 0,75 mg/ml Selektionsantibiotikum G418 ausplattiert und unter Standardkulturbedingungen bei 37°C kultiviert. Sobald sich das Medium gelb anfärbte (als Zeichen des pH-Wert Anstiegs), wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien am Mikroskop ausgezählt und exemplarische Aufnahmen von den Kolonien gemacht. Um die Zellen aus dem Methylzellulose-Medium zu reisolieren, wurde die

Methyzellulose durch Zugabe von PBS verflüssigt und die entstandene Suspension wurde einmal mit RPMI-1640 GlutaMAX™ gewaschen. Nach Bestimmen der Zellzahl wurden je Ansatz erneut 20.000 Zellen in Methylzellulose-Medium ohne Selektionsmedium ausplattiert (zweite Runde der Replattierung). Das Replattieren wurde solange wiederholt, bis sich das Selbsterneuerungspotenzial der mit Leervektor transduzierten Zellen erschöpft hatte, d.h. bis diese Zellen nicht mehr in der Lage waren, Kolonien auszubilden. Die transformierten Zellen wurden nach drei Replattierungsrunden erneut aus der Methylzellulose isoliert und als Suspension in Kultur genommen.

Bestimmung des Immunphänotyps der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die hergestellten *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierten Zellen wurden zur Analyse ihrer Oberflächenmarker einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen. Hierbei wurden die Marker für cKit, Mac1 und B220 untersucht. Die Antikörperfärbungen erfolgten gemäß des beschriebenen Protokolls für die Färbungen von Oberflächenantigenen (3.2.2.9).

3.2.2.6. Messung viabler Zeller zur Ermittlung des Zellwachstums

Um das Zellwachstum von Zellen nach einem bestimmten Zeitraum bzw. nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen festzustellen, wurden die Zellen in einer definierten Zellzahl in einer 24-Loch Platte ausgesät. Die murinen Suspensionszellen wurden in einer Zelldichte von $0{,}04*10^6$ Zellen pro ml ausgesät, humane AML Zelllinien in einer Dichte von $0{,}5*10^6$ Zellen pro ml und die adhärenten Brustkrebszellen MDA-MB-453 in einer Dichte von $2{,}5*10^6$ pro cm^2. Nach der Aussaat wurden die Zellen entweder unbehandelt oder mit Substanzen behandelt für 72 Stunden kultiviert. Nach Ablauf des Zeitraums wurde die Zahl viabler Zellen mittels ViCell Zellzählung ermittelt. Hierbei wurden die Zellen für ca. 30 Sekunden mit Trypanblau inkubiert. Tote Zellen erschienen anschließend durch die Färbung blau, viable Zellen blieben ungefärbt, da der Farbstoff nur bei nicht intakter Zellmembran in das Zellinnere gelangt. So konnte der Prozentsatz an viablen Zellen und die genaue Zellzahl viabler Zellen eines Ansatzes bestimmt werden. Die Zellzahl in den

unbehandelten Kontrollen wurde bei der Auswertung als 100% dargestellt und die Zellzahl in den behandelten Ansätzen jeweils im Vergleich dazu angegeben.

3.2.2.7. Kurzzeit-Apoptose Assay mit primären Patientenproben und Zelllinien

Um die Apoptose und den Zelltod von primären AML Patientenproben oder Zelllinien nach Inkubation mit Inhibitoren zu bestimmen, wurden die Zellen in einer Dichte von $1*10^6$ Zellen pro ml in einer 96-Loch Spitzbodenplatte ausgesät. Die Viabiliät der Zellen wurde vor der Aussaat über eine Färbung der toten Zellen mit Propidium Iodid (PI) und des jeweiligen *Forward Scatter / Side Scatter*-Profils ermittelt. PI ist ein Farbstoff, der in die Nukleinsäuren der DNA interkaliert. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Zellmembran der Zellen nicht mehr intakt ist, die Zellen also nicht mehr viabel sind. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) korreliert mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) mit der Granularität der Zellen. Zellen, die sich in Apoptose befinden, sind kleiner und stark granulär und können dadurch mittels Durchflusszytometrie von viablen Zellen gut unterschieden werden. Die Zellen wurden nach dem einmaligem Waschen in PBS für mindestens 15 Minuten in einer PI-Lösung (1 µg/ml in PBS) im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie die toten PI^+ Zellen bestimmt. Eine primäre Probe bzw. Zelllinie wurde nur für ein Experiment verwendet, wenn mindestens 90% der Zellen zum Zeitpunkt der Aussaat viabel waren. Alle Inhibitoren (siehe Tabelle) waren zu Aliquots bei -80°C eingefroren und wurden kurz vor dem Ansetzen des Assays bei RT aufgetaut. Eventuell erforderliche Vorverdünnungen wurden in Medium oder PBS durchgeführt. Zur Minimierung der Toxizität betrug die maximale DMSO-Konzentration bei Substanzverdünnungen 0,1%. Direkt nach der Aussaat wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt und 24–72 Stunden kultiviert. Von jeder Substanz und jeder Konzentration wurden Duplikate angesetzt und die Werte gemittelt. Der Prozentsatz an toten Zellen wurde in den unbehandelten Kontrollansätzen alle 24 Stunden gemessen. Sobald die Kontrollansätze mehr als 50% tote Zellen beinhalteten, wurde die Kultivierung beendet und alle Ansätze (Behandlungen und Kontrollen) einer PI-Färbung und anschließenden durchfluss-zytometrischen Messung im FACS Calibur unterzogen.

Die spezifische Apoptoserate wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet und als Wert für die jeweiligen Behandlungen angegeben:

$$Spezifische\ Apoptose\ [\%] = \frac{\text{Apoptose der Behandlung [\%]} - \text{Apoptose der Kontrollen [\%]}}{\text{Apoptose der Kontrollen [\%]}} \text{ x } 100$$

3.2.2.8. Nachweis des klonogenen Potenzials nach Inhibition in Methylzellulose

Die Fähigkeit, in Methylzellulose-Medium unter Inhibition mit BEZ-235 Kolonien auszubilden, wurde in der Anwesenheit von DMSO (Vehikel) bzw. BEZ-235 in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Hierzu wurden die humanen AML-Zelllinien bzw. die *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierte murine Zelllinie in einer Zellzahl von $1*10^4$ in Methylzelluose-Medium in Duplikaten ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die entstandenen Kolonien wurden fünf bis sieben Tage später unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.2.2.9. Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie

Die Expression membrangebundener Proteine wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden pro Färbeansatz $1*10^6$ Zellen verwendet und vor Beginn der Färbung einmal mit PBS gewaschen. Der spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper wurde gemäß den Herstellerangaben in PBS oder speziellem Reagenz verdünnt. Bei jeder Färbung wurde zum Ausschluss unspezifischer Antikörper-alibindungen eine Isotypkontrolle des entsprechenden Antikörpers mitgeführt. Die Zellen wurden im Färbeansatz bzw. Isotypansatz resuspendiert und ca. 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 0,1% Natriumazid in PBS gewaschen und in 200 ml PBS aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im FACS Calibur. Bei Antikörper-Färbungen wurden nur lebende Zellen in die Auswertung eingeschlossen. Diese wurden durch ihr *Forward Scatter / Side Scatter*- Profil von toten und apoptotischen Zellen unterschieden. Die Quantifizierung positiver Zellen und die Intensität der Fluoreszenz erfolgte mit der Software FlowJo 7.6.5. Zur Berechnung der *Mean fluorescence*

intensity (MFI) wurde der geometrische Mittelwert der Probe durch den geometrischen Mittelwert der Isotypkontrolle geteilt und die Differenz angegeben.

3.2.2.10. Detektion von intrazellulären Proteinen mittels Durchflusszytometrie

Um intrazelluläre Proteine in Zellen mittels Durchflusszytometrie nachweisen zu können, ist es erforderlich, die Zellmembran vor der Exposition mit dem Antikörper zu fixieren und für den Antikörper zu permeabilisieren. Dies erfolgte unter Verwendung des *Fix&Perm Kits* von Invitrogen. Pro Ansatz wurden $1*10^6$ Zellen verwendet und vor Beginn der Färbung einmal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde anschließend so vollständig wie möglich durch Pipettieren abgenommen und das Zellpellet in 100 µl *Fixation Medium A* aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz in 95%PBS/5%FKS gewaschen und das entstandene Pellet in 100 µl *Permeabilization Medium B* aufgenommen. Der spezifische Antikörper bzw. der jeweilige Isotyp wurde in einer Verdünnung von 1:50 zugegeben und der Ansatz gut gevortext. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunklen bei RT wurde der Ansatz insgesamt zwei Mal in 95%PBS/5%FKS gewaschen und abschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im FACS Calibur. Es wurden nur lebende Zellen in die Auswertung eingeschlossen. Diese wurden durch ihr *Forward Scatter / Side Scatter*- Profil von toten und apoptotischen Zellen unterschieden. Die Quantifizierung positiver Zellen und die Intensität der Fluoreszenz erfolgte mit der Software FlowJo 7.6.5. Die Berechnung der *Mean fluorescence intensity* (MFI) erfolgte wie beschrieben.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Ganzzelllysaten wurden je Ansatz mindestens $1*10^7$ Zellen verwendet. Adhärente Zellen wurden vor der Lyse mit Trypsin/EDTA von ihrem Untergrund abgelöst. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lysepuffer je $1*10^7$ Zellen aufgenommen. Nach Resuspension der Zellen im Puffer wurden diese in einem 2 ml Reaktionsgefäß 30 Minuten bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um eine ausreichende Lyse der Zellen zu

gewährleisten. Zur Entfernung des Zelldebris wurde der Ansatz anschließend bei 13.000 rpm und 4°C 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Lysate bei -80°C gelagert und nicht öfter als dreimal verwendet, um eine Degradierung der Proteine durch häufiges Auftauen und Einfrieren zu verhindern.

3.2.3.2. Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Methode ermittelt. Die saure Lösung des Farbstoffs Coomassie® Brilliant Blue G-250 besitzt ein Absorptionsmaxiumum von 465 nm. Nach Bindung an basische und aromatische Gruppen eines Proteins erhöht sich dieses Absorptionsmaximun auf 595 nm. Die Intensität des Farbstoffs korreliert hierbei direkt mit der Proteinkonzentration in einem Lysat.
Das BioRad-Dye-Reagenz wurde 1:5 mit Wasser verdünnt. Je 980 µl dieser Lösung wurden in eine Küvette zu je 20 µl Lysatlösung (2 µl Lysat + 18 µl Wasser) bzw. 20 µl BSA-Proteinstandard (Standardlösungen von 200 µg/ml bis 1000 µg/ml) oder 20 µl Wasser (*Blank*) gegeben. Die Ansätze wurden nach fünfminütiger Inkubation in RT im Spektralphotometer gemessen und die absolute Proteinkonzentration durch Abgleich mit dem *Blank* und der Standardreihe ermittelt.

3.2.3.3. SDS-PAGE

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Größe durch eine polymerisierte Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid getrennt. Durch das im Probenpuffer und im Gel enthaltene SDS werden die Proteine denaturiert, mit negativen Ladungen besetzt und somit deren Eigenladung überdeckt. Nach Anlegen einer Spannung wandern die Proteine in Richtung Anode und werden dabei ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden hierzu in Gelkassetten gegossen. Durch Ammoniumpersulfat (APS) wurde die Polymerisation der Gele initiiert und Tetramethylethylendiamin (TEMED) diente als Katalysator dieser Reaktion. Zunächst wurde eine 7.5%-18%-ige Trenngellösung in die Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dessen Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, das 4%-ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein

Probenkamm eingesetzt. Wenn das Gel auspolymerisiert war, wurde es entweder direkt im Anschluss verwendet oder bis zu seiner Verwendung feucht für wenige Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert.
Die verwendeten Gellösungen waren wir folgt zusammengesetzt:

Trenngel (am Beispiel 12,5%)

H_2O_{dest}	1,52 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8	3 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,33 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel (4%)

H_2O_{dest}	3 ml
1,5 M Tris-HCl-Puffer, pH 6,8	1,25 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	0,65 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	25 µl
TEMED	5 µl

Vor dem Auftragen wurden alle Proben auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt, im Verhältnis 1:2 mit Lämmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden anschließend in die vom Kamm geformten Geltaschen gefüllt und von einem Größenmarker flankiert. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 40 mA im Sammelgel und bei 60 mA im Trenngel durchgeführt.

3.2.3.4. Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach der SDS-PAGE im elektrischen Feld vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese weist eine hohe Proteinaffinität auf. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt, jeweils mit drei angefeuchteten Filterpapieren flankiert und in die Blot-Apparatur gelegt. Der Transfer erfolgte nach der *semi-dry*-Methode für 90 Minuten bei 250 mA.

3.2.3.5. Spezifischer Proteinnachweis durch Antikörper

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine nachgewiesen werden. Die entstehenden Antigen-Antikörper Komplexe wurden über das Peroxidase-System durch die Umsetzung eines Chemilumineszenz-Substrates detektiert. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran durch die Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS-T für 60 Minuten bei RT blockiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Erstantikörper in 5% Milchpulver bzw. 5% BSA (je nach Herstellerangaben) in TBS-T inkubiert. Auf dreimaliges Waschen für je 15 Minuten mit TBS-T, folgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper. Dieser wurde ebenfalls in 5% Milchpulver bzw. 5% BSA in TBS-T verdünnt und war mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 15 Minuten mit TBS-T, konnte die Detektion mit Hilfe der ECL-Lösung (*enhanced chemiluminescence*) erfolgen. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran 5 min mit der ECL-Lösung inkubiert und anschließend luftblasenfrei in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Die Exposition erfolgte bei geschlossener Röntgenfilmkassette je nach Sensitivität des Antikörpers für 5 Sekunden bis 2 Minuten. Die Peroxidase katalysierte die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols und löste die Chemilumineszenz aus. Die Auswertung der Bandendicke erfolgte mit dem Programm Image J.

3.2.3.6. Strippen der Nitrocellulose-Membran

Um die Nitrocellulose-Membran mehrmals mit Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine zu inkubieren, müssen zuvor entstandene Protein-Antikörper-Interaktionen wieder aufgelöst werden. Hierzu wurde die Membran für 45 Minuten bei 56°C mit Stripping-Puffer auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 20 Minuten mit TBS-T gewaschen und erneut für 1 Stunde mit 5% Milchpulver bzw. 5% BSA in TBS-T blockiert. Anschließend konnte die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

3.2.4. *In vivo*-Behandlungsmodell

Um die *in vivo*-Aktivität ausgewählter Substanzen darzulegen, wurde ein Behandlungsmodell mit Xenograft-Mäusen etabliert. Alle Tierversuche wurden gemäß den ethischen und gesetzlichen Richtlinien des Tierschutzgesetzes und nach schriftlicher Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Nummer 55.2-1-54-2532-95-10).

Hierbei wurden Mäuse des immundefizienten Stamm NOD.Cg-Prdkc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/Sz, bekannt als NOD scid gamma (NSG), verwendet. Diesem Mausstamm fehlen ausgereifte B- und T-Zellen und die zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen ist deutlich vermindert. Die Tiere wurden in einem 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch CO_2-Begasung. Um in den Tieren eine Leukämie hervorzurufen, wurde die humane AML Zelllinie MOLM-13 in die Schwanzvenen von insgesamt 24 Mäusen injiziert. Die Zellen wurden vor der Injektion mit einem Lentivirus transduziert, um eine Expression des *green fluorescent protein* (GFP) und der *enhanced firefly* Luziferase (eFF) in den Zellen zu induzieren. Durch die Expression dieser beiden Proteine ist es möglich, die Zellen *in vivo* im lebenden Tier über Bildgebungsverfahren sichtbar zu machen und die Zellen *ex vivo* von murinen Zellen zu unterscheiden.

3.2.4.1. Herstellung transgener Xenograftzellen

Die verwendeten transgenen MOLM-13 Zellen wurden von Dr. Michela Carlet aus der Arbeitsgruppe von Prof. Irmela Jeremias unter S2-Bedingungen über lentivirale Transduktion hergestellt. Die Lentiviren wurden in HEK293T-Zellen produziert und die Zellen mit Virus und unter Zugabe von 8 µg/ml Polybren inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer Zellsortiermaschine nach *GFP*-Expression sortiert und für den Versuch zur Verfügung gestellt.

3.2.4.2. Injektion der transgenen Zellen

Die transgenen MOLM-13 Zellen wurden aus einer laufenden Kultur entnommen und am Tag vor der Injektion noch einmal per Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Expression untersucht. Für die Injektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in einer Zellzahl von $1*10^4$ Zellen in 200 µl steril filtriertem

PBS resuspendiert und je Maus $1*10^4$ Zellen intravenös in die Schwanzvene der Mäuse injiziert.

3.2.4.3. *In vivo*-Bildgebung

Die *in vivo*-Bilderhebung erfolgte im IVIS Lumina II Imaging System. Vor Aufnahme der Bilder wurden die Mäuse mit Isofluran anästhesiert und in Rückenlage an den Hinterextremitäten und über einen Inhalationsschlauch in der Apparatur fixiert. Als Substrat für die in den humanen Zellen exprimierte Luziferase wurde D-Luziferin (150 mg/kg Gewicht) intraperitoneal verabreicht. Die Aufnahme der Bilder erfolgte 8 Minuten nach der Injektion für die Dauer von 30 Sekunden. Die Bilder wurden anschließend mit der Living Image Software 4.X ausgewertet. Dabei wurde für die genaue Quantifizierung des Lichtsignales eine sogenannte *region of interest* (ROI) festgelegt. Während des laufenden Behandlungsversuchs wurde die *in vivo* Bildgebung zweimal wöchentlich durchgeführt.

3.2.4.4. *In vivo*-Behandlung

Die Behandlung mit den spezifischen Inhibitoren wurde ab dem dritten Tag nach Injektion der Zellen täglich für einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt. Zuvor wurde durch *in vivo* Bildgebung sichergestellt, dass die Verteilung des Biolumineszenz-Signals in allen Gruppen vergleichbar war.

Ansetzen der Lösungen

Die Substanzen wurden täglich frisch und unmittelbar vor der Verabreichung angesetzt. Die Konzentrationen der Ansätze wurden so gewählt, dass das Verabreichungsvolumen zwischen 150-220 µl pro Tier betrug. Der spezifische PI3K/mTOR Inhibitor BEZ-235 wurde steril zu je 10 mg Pulver in 200 µl des Lösemittels N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP) aufgenommen und durch dreimalige Sonifikation für je 15 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde durch Zugabe von 1,8 ml Polyethylenglycol-300 (PEG-300) und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes eine homogene Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt. Als Vehikelkontrolle wurde 10%NMP / 90%PEG-300 ohne BEZ-235 verwendet. Der

spezifische FLT3-Inhibitor AC220 wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in einer 22% Hydroxypropyl-β-cyclodextrin-Lösung (in sterilem Wasser) angesetzt. Hierzu wurden 10 ml der alle zwei Tage frisch angesetzten Lösung zu 10 mg AC200 Pulver zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren entstand eine homogene Lösung.

Orale Verabreichung der Substanzen

Vor jeder Verabreichung wurden alle Tiere gewogen und das jeweilige Verabreichungsvolumen berechnet. Die Dosis für BEZ-235 lag bei 45 mg/kg Körpergewicht und für AC220 bei 10 mg/kg Körpergewicht der Maus. Die Verabreichung erfolgte jeden Tag zur gleichen Uhrzeit oral unter Verwendung einer stumpfen Knopfkanüle.

3.2.4.5. Nachweis humaner Zellen mittels Durchflusszytometrie

Um den prozentualen Anteil humaner Zellen im Körper der Maus zu bestimmen und die Behandlungen mit der Vehikel-Gruppe zu vergleichen, wurden 15 Tage nach Injektion aus allen drei Versuchsgruppen zwei Tiere abgetötet und Knochenmark, Milz, Leber und peripheres Blut entnommen. Die Zellen aus dem Knochenmark wurden wie in 3.2.2.5 beschrieben isoliert. Zellen aus Milz und Leber wurden nach Homogensierung des entnommenen Organs durch ein Zellsieb (45 µm) vereinzelt, zweimal mit PBS gewaschen und in Zellkulturmedium aufgenommen. Peripheres Blut wurde unmittelbar nach der Euthanasie mit einer Spritze direkt aus dem Herz der Mäuse entnommen. Nach Isolierung und Aufbereitung der Zellen aus den jeweiligen Organen wurden die Zellen gezählt und mit je $1*10^6$ Zellen eine Antikörperfärbung gegen humanes CD45 durchgeführt. Der prozentuale Anteil an humanen Zellen zu der Gesamtheit humaner und muriner Zellen wurde ermittelt.

3.2.4.6. Nachweis der Signalweginhibition *in vivo*

Die Fähigkeit der Substanz, die humanen Zellen in der Maus zu erreichen und den adressierten Signalweg zu inhibieren, wurde in einem gesonderten Tierexperiment durchgeführt. In diesem Versuch wurden insgesamt sechs NSG-Mäusen erneut $1*10^4$ transgene MOLM-13 Zellen injiziert. 14 Tage nach Injektion, ein Zeitpunkt, an

dem ein deutliches Bildsignal in den Mäusen nachweisbar war, wurden vier der sechs Mäuse einmalig mit BEZ-235 behandelt während zwei Mäuse unbehandelt blieben. Ohne Behandlung und 6 Stunden bzw. 24 Stunden nach Behandlung wurden je zwei Tiere abgetötet, das Knochenmark der Tiere isoliert und eine Antikörper-Färbung gegen P-S6rp durchgeführt. Im Durchflusszytometer konnten die humanen Zellen im Knochenmark der Maus durch ihr *GFP*-Signal identifiziert werden und deren Fluoreszenzsignal durch P-S6rp Färbung ermittelt werden. Die errechnete MFI der behandelten Tiere wurde anteilig an dem MFI der unbehandelten Tiere angegeben.

3.3. Software

Folgende Programme kamen bei der Erhebung, Verarbeitung und Darstellung numerischer und graphischer Daten zum Einsatz:

Tabelle 3-13 Verwendete Software

Programm	**Anwendung**
Adobe Illustrator CS	Bildverarbeitung
CalcuSyn	Datenverarbeitung
CellQuest 3.3	Durchflusszytometrie
EndNote X6	Bibliographieerstellung
FlowJo 7.6.5	Durchflusszytometrie
ImageJ	Bildverarbeitung
Living Image Software 4.x	Bildverarbeitung
Microsoft Excel	Datenverarbeitung
Microsoft Power Point	Bildverarbeitung
Microsoft Word	Textverarbeitung
SigmaPlot 12.5	Datenverarbeitung, Statistik
Zeiss Axiovision 4.8	Bildaufnahme

3.4. Statistik

Die statistischen Erhebungen erfolgten je nach Hypothese mittels *One way ANOVA, Wilcoxon-Test, Log-Rank-Sum-Test, Chi^2-Test* oder ungepaartem t-Test.

Der p-Wert ist als zweiseitiger p-Wert angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p<0,05$ angenommen, eine marginale statistische Signifikanz bei $p<0,1$.

4. Ergebnisse

4.1. Sensitivität primärer AML-Patientenproben

In AML-Zellen wird häufig eine Deregulation von Signalwegen beobachtet, die sich im Fall von Wachstumsfaktorsignalwegen durch eine konstitutive Aktivierung des jeweiligen Signalwegs äußert. Als Folge zeigen sich die malignen Zellen häufig abhängig von diesem Signalweg hinsichtlich ihres Wachstums und ihres Überlebens. Um die Relevanz unterschiedlicher Signalwege zu untersuchen, wurden primäre Patientenproben von AML-Patienten mit spezifischen Inhibitoren und klassischen Zytostatika behandelt. Anschließend wurde die daraus resultierende Apoptoserate ermittelt. Als Schwellenwert für eine Induktion der Apoptose wurden 20% spezifische Apoptose für alle folgenden Experimente festgesetzt. Ziel war es, AML-Proben zu identifizieren, die sensitiv gegenüber spezifischen Inhibitoren und damit gegenüber zielgerichteter Therapie sind.

4.1.1. Heterogener genetischer Hintergrund verwendeter AML-Patientenproben

Die für die *in vitro* Versuche verwendeten Patientenproben wurden vom Labor für Leukämiediagnostik nach schriftlichem Einverständnis des Patienten zur Verfügung gestellt. Es handelte sich bei den Proben um frische Zellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut mit mindestens 70% Blasten. In der nachfolgenden Tabelle werden die für *in vitro* Apoptoseversuche verwendeten Proben dargestellt. Das Alter der Patienten lag bei 63 Jahren im Median (Spanne 18-79 Jahre) und 13 von 18 Patienten waren weiblich. Über Zellausstriche und anschließende Pappenheim-Färbung wurde die Morphologie der Zellen beurteilt und von einem Arzt des Labors für Leukämiediagnostik dem entsprechenden FAB-Typen zugeordnet. Fünf zu unterscheidende FAB-Typen (M0-M5) waren in dieser Kohorte repräsentiert. Der Anteil der Blasten wurde ebenfalls auf Basis der Morphologie bestimmt. Die Ermittlung von Genmutationen in den Genen *MLL, FLT3, NPM1* und *CEBPA* wurde auf cDNA-Ebene durchgeführt. Sechs aller analysierten Patientenproben wiesen eine chromosomale Aberration im *MLL*-Gen auf. Hierbei handelte es sich um drei Translokationen des *MLL*-Gens und um drei *MLL*-PTDs. Im *FLT3*-Gen zeigten acht der Patienten eine ITD-Mutation und weitere drei Patienten eine TKD-Mutation.

NPM1-Mutationen vom Typ A wurden in fünf Patienten gefunden, eine Mutation im CEBPA wurde in keiner der analysierten Proben nachgewiesen. Die Mutationen im *RAS*-Gen wurden über eine spezielle Sequenziermethode, dem sogenannten *„targeted amplicon sequencing“* erhoben. Hierbei wurden nur die *Hotspot*-Regionen mit den Exonen 2 und 3 untersucht. Fünf der analysierten 13 Proben trugen eine oder mehrere Mutationen im *NRAS* und *KRAS* Gen, alle betrafen die bekannten Regionen der Codons 12, 13 und 61.

Tabelle 4-1 Patientencharakteristika; n=18

#	Alter [Jahre]	G	Blasten	FAB	*MLL*	*FLT3*	*RAS*	*NPM1*	*CEBPA*	Art
1	68	M	80%	M1	WT	WT	NA	WT	WT	KM
2	45	W	83%	M4	MLL-PTD	ITD	NA	WT	NA	KM
3	53	W	88%	M0	WT	ITD	WT	NPM1c	WT	PB
4	20	W	95%	M5a	MLL-t	WT	WT	WT	NA	KM
5	77	W	76%	M2	WT	WT	*NRAS* G12D	NPM1c	NA	KM
6	60	W	80%	M2	WT	ITD	WT	NPM1c	NA	KM
7	58	W	77%	M1	MLL-PTD	ITD	WT	WT	WT	KM
8	65	W	87%	M1	WT	TKD	*NRAS* G12C	NPM1c	WT	KM
9	79	W	83%	M1	WT	WT	*NRAS* Q61R *KRAS* G12D	WT	WT	KM
10	73	W	80%	M5	MLL-t	WT	WT	WT	NA	KM
11	75	W	85%	NA	WT	ITD	WT	WT	WT	KM
12	61	M	88%	M1	WT	TKD	*NRAS* G12S	WT	NA	KM
13	78	W	84%	M4	WT	TKD	NA	NPM1c	WT	KM
14	76	W	71%	M2	WT	ITD	WT	WT	WT	PB
15	57	M	100%	M4	MLL-t	WT	*KRAS* G13D *KRAS* Q61H	WT	WT	KM
16	32	W	80%	M1	WT	WT	WT	WT	WT	KM
17	72	M	74%	M2	MLL-PTD	ITD	NA	WT	WT	KM
18	18	M	77%	M3	WT	ITD	NA	WT	WT	KM

G: Geschlecht, ITD: *internal tandem duplication* KM: Knochenmark, M: männlich, MLL-t: MLL-Translokation, MLL-PTD: *MLL partial tandem duplication*, NA: nicht analysiert, PB: peripheres Blut, TKD: *tyrosine kinase domain*, W: weiblich, WT: wildtypisch

4.1.2. Apoptose-Sensitivität primärer AML-Patientenproben

Die AML-Patientenproben wurden in einer Platte ausgesät und für 48–72 Stunden mit verschiedenen Inhibitoren und Zytostatika behandelt. Anschließend wurde ihre Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie gemessen. Tabelle 4-2 zeigt eine alphabetische Auflistung aller Inhibitoren und der verwendeten Konzentrationen. Diese wurden nach Literaturangaben ausgewählt und die entsprechende Quelle ebenfalls in der Tabelle angegeben.

Tabelle 4-2 Auflistung der Substanzen, die im in vitro Apoptoseversuch verwendet wurden.

Bezeichnung	**Wirkungsweise**	**Konzentrationen**	**Quelle**
BEZ-235	Dualer PI3K/mTORC1/2-Inhibitor	0,25 µM, 1 µM, 4 µM	[128, 129]
Cisplatin	Zytostatikum	0,1 µM, 1 µM	[130]
Cytarabin	Zytostatikum	1 µM, 25 µM	[131, 132]
Daunorubicin	Zytostatikum	0,1 µM, 1 µM	[132-134]
LDE-225	*Smoothened*-Antagonist	0,2 µM, 1 µM, 5 µM	[135]
MK-2206	AKT-Inhibitor	0,25 µM, 1 µM, 4 µM	[136-138]
PKF115-584	TCF/β-Catenin-Inhibitor	0,33 µM, 1 µM, 3,3 µM	[139, 140]
Rapamycin	mTORC1-Inhibitor	1 µM	[141]
Sorafenib	Multikinase-Inhibitor	10 µM, 20 µM	[131, 142]

Zur Kontrolle wurden die Proben nicht nur mit den spezifischen Inhibitoren verschiedener Signalwege behandelt, sondern auch in jedem Experiment mit klassischen Zytostatika. Bei Daunorubicin (DNR) und Cytarabin (AraC) handelte es sich hierbei um Zytostatika, die in der AML-Therapie große Anwendung finden. Cisplatin ist ein Zytostatikum, das vor allem in der Therapie solider Tumore verwendet wird (Abbildung 4-1). DNR und AraC zeigten eine Apoptose-Induktion mit einem Median von 23,3% und 19,2% für die jeweils niedrigste Konzentration von 0,1 µM bzw. 1 µM. Die Wahl einer höheren Konzentration erhöhte die spezifische Apoptose auf bis zu 67,6% (für 1 µM DNR) bzw. 50,8% (für 25 µM AraC). Das Spektrum der spezifischen Apoptose war für beide Substanzen sehr groß. Für DNR umfasste die spezifische Apoptose bei 1 µM Werte von -4,5% bis zu 97,7%, bei einer gewählten AraC-Konzentration von 25 µM Werte von -7,5 bis zu 97,6%. Während manche Proben sehr sensitiv waren, zeigten sich andere komplett resistent. Cisplatin zeigte in den getesteten Proben nur eine sehr geringe Apoptose-Induktion. Lediglich

bei einer Probe kam es bei einer Konzentration von 1 µM zu einem Wert spezifischer Apoptose, der den gewählten Schwellenwert von 20% überschritt. Sorafenib, ein Multikinase-Inhibitor der u.a. für die Therapie der AML zugelassen ist, inhibiert neben der RAF Kinase weiterhin vor allem die RTK FLT3. Für beide gewählten Konzentrationen (10 µM und 20 µM) wurde eine starke Apoptose-Induktion von bis zu 95% beobachtet. Die Patientenproben, die eine Mutation im *FLT3*-Gen trugen, zeigten sich gegenüber Sorafenib marginal sensitiver mit einem Median von 50,5% vs. 22,6% spezifischer Apoptose bei einer Konzentration von 20 µM (p=0,10; nicht gezeigte Daten).

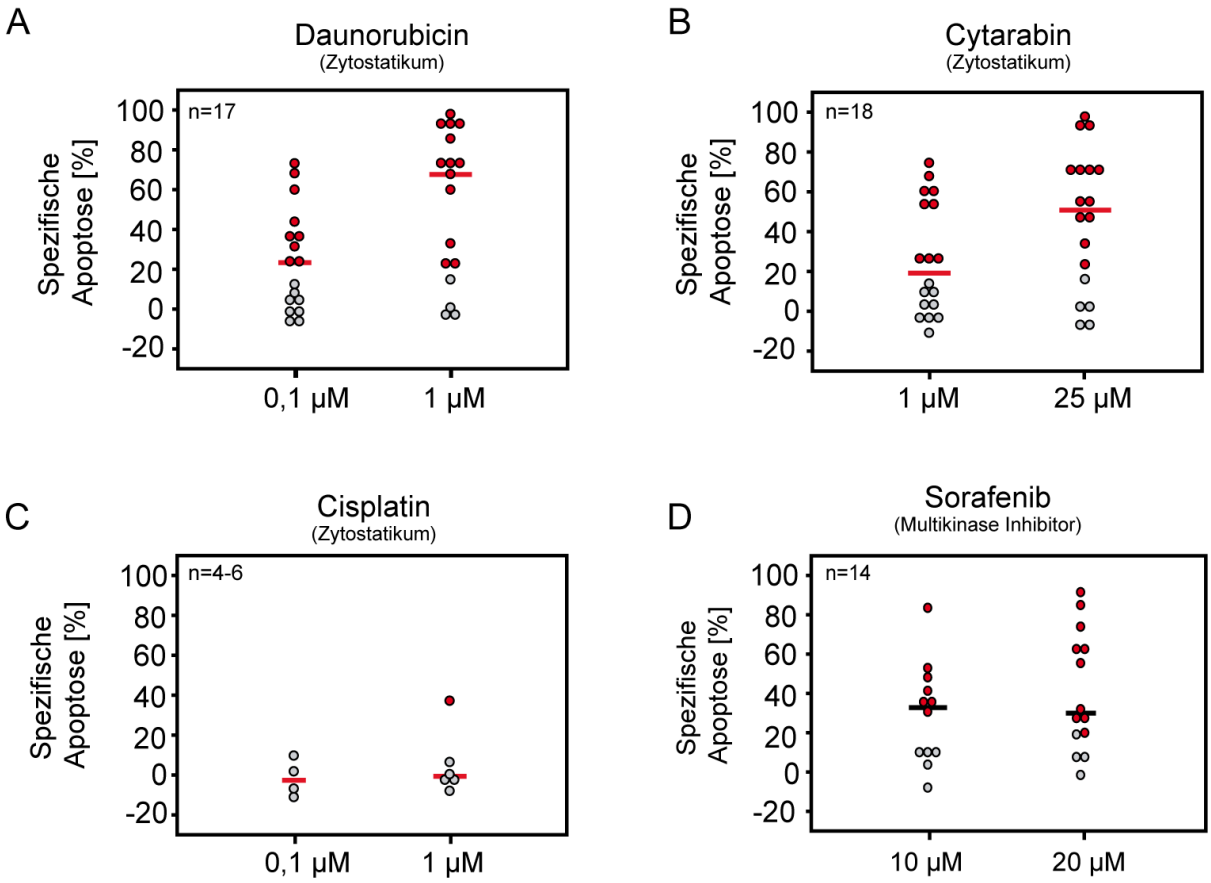


Abbildung 4-1 Apoptose-Sensitivität primärer AML-Proben in vitro. *Induktion spezifischer Apoptose in primären AML-Proben durch klassische Zytostatika und den Multikinase-Inhibitor Sorafenib. Die Apoptose der Blasten wurde mittels FSC/SSC-Analyse und PI-Färbung nach 48-72 Stunden Inkubation ermittelt. In rot sind alle Proben, deren spezifische Apoptose mehr als 20% beträgt. Der rote Balken zeigt den jeweiligen Median der spezifischen Apoptose an (n=4-18).*

4.1.3. Apoptose-Sensitivität primärer AML-Patientenproben gegenüber spezifischen Inhibitoren *in vitro*

Über die Verwendung der in der AML-Therapie gebräuchlichen Substanzen im Apoptoseversuch konnte dieser validiert werden. Von weiterem Interesse waren die Effekte, die Inhibitoren spezifischer Signalwege in den AML-Blasten auslösen konnten (Abbildung 4-2).

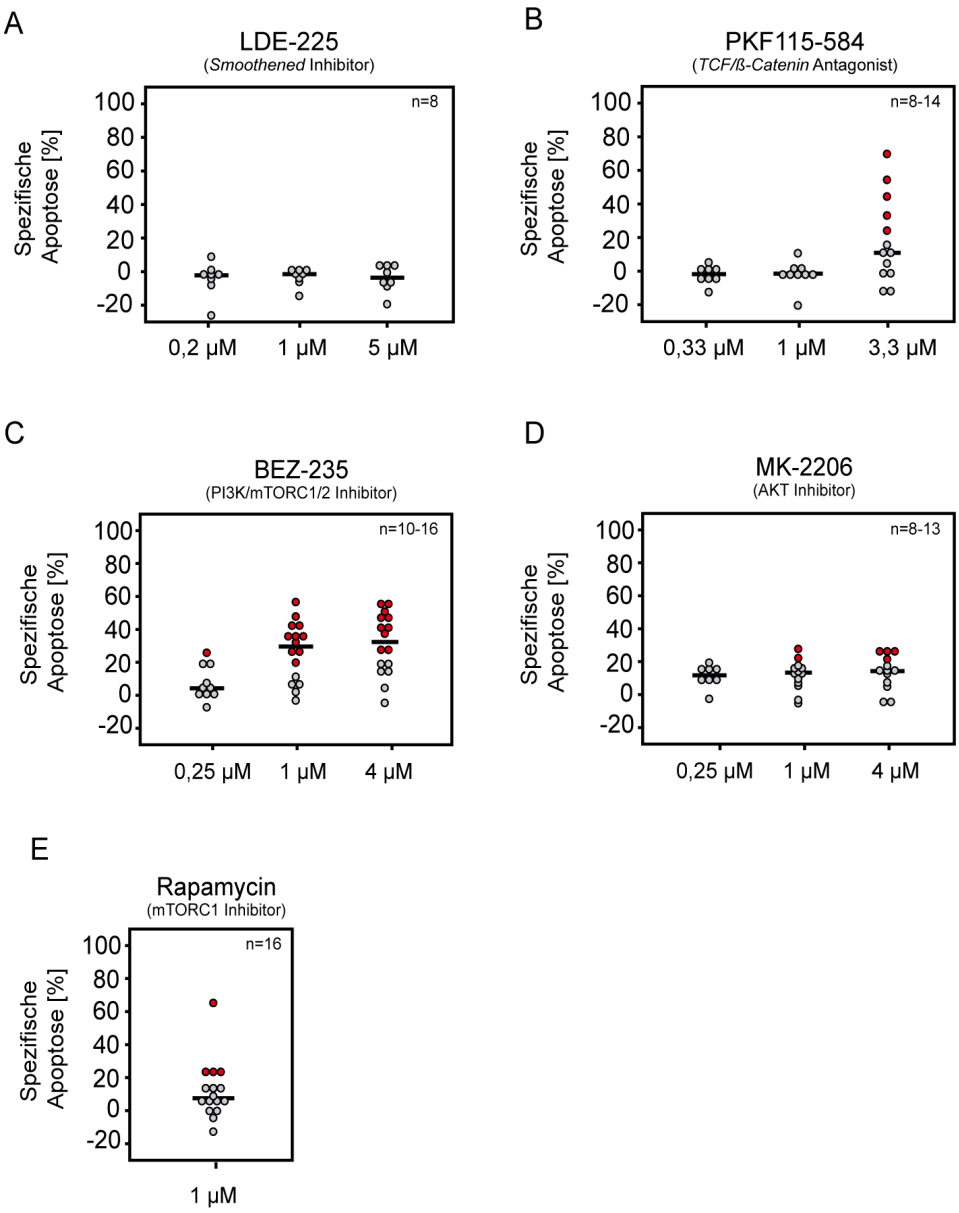


Abbildung 4-2 Apoptose-Sensitivität primärer AML-Proben gegenüber spezifischen Inhibitoren. *Induktion von spezifischer Apoptose in primären AML-Proben durch fünf verschiedene Inhibitoren. Die Apoptose der Proben wurde mittels FSC/SSC-Analyse und PI-Färbung nach 48-72 Stunden Inkubation ermittelt. In rot sind alle Proben, deren spezifische Apoptose mehr als 20% beträgt. Der schwarze Balken zeigt den jeweiligen Median der spezifischen Apoptose an (n=8-16).*

Die duale Inhibition der PI3-Kinase (PI3K) und der mTOR-Komplexe 1 und 2 (mTORC1/2) durch BEZ-235 zeigte in den Konzentrationen 1 µM und 4 µM eine nachweisbare Apoptose-Induktion in den primären AML-Blasten. Der Median lag hier bei 29,6% bzw. 32,2% für die jeweilige Konzentration. Die niedrigste gewählte Konzentration (0,25 µM) erreichte eine spezifische Apoptose von 4,2% im Median. Dieser Wert lag unter der festgesetzten Schwelle und nach zehn Proben wurde keine weitere Probe unter Verwendung einer Konzentration von 0,25 µM untersucht. Der AKT-Inhibitor MK-2206 und der mTORC1-Inhibitor Rapamycin erreichten mit nur wenigen Proben in den gewählten Konzentrationen die 20%-Schwelle. LDE-225 ist ein Inhibitor des *Smoothened*-Rezeptors, der eine wichtige Rolle im *Sonic Hedgehog*-Signalweg spielt. Eine Inhibition dieses Rezeptors bewirkte in diesem Versuch in keiner der gewählten Konzentrationen eine Apoptose-Induktion. Der TCF/β-Catenin-Antagonist PKF115-584 induzierte spezifische Apoptose bis zu 70% in 5/14 primären Blasten in der höchsten gewählten Konzentration von 3,3 µM, während bei niedrigeren Konzentrationen keine Apoptose-induzierende Wirkung zu beobachten war. Zusammenfassend zeigte der duale PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ-235 in primären AML-Blasten die stärkste Apoptose-Induktion und seine Wirkungsweise und sein Wirkungsspektrum wurde im Folgenden näher charakterisiert.

4.1.4. Spontanapoptose unbehandelter AML-Patientenproben

Die Durchführung funktioneller Versuche mit primären AML-Blasten ist schwierig, da die Zellen in Kultur innerhalb weniger Tage sterben. Primäre Blasten können ohne Behandlung bereits nach 72 Stunden eine Spontanapoptose von bis zu 80% aufweisen. Für die Auswertungen wurden daher nur Proben verwendet, deren Spontanapoptose nach der Behandlungszeit unterhalb von 50% lag. Wenn Zellen sich bereits ohne Behandlung im Zustand des Zelltodes befinden, könnte dies deren Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren erhöhen. Um eine erhöhte Sensitivität aufgrund hoher Spontanapoptose für die Behandlung mit BEZ-235 auszuschließen, wurde die Spontanapoptose mit der spezifischen Apoptose nach Behandlung mit 4 µM BEZ-235 korreliert (Abbildung 4-3 A). Die Höhe der spezifischen Apoptose durch die Behandlung war nicht abhängig von der Spontanapoptose der Zellen durch die *ex vivo*-Kultivierung. Auch zwischen den Proben, die BEZ-235 resistent waren,

d.h. weniger als 20% spezifische Apoptose aufwiesen, und den BEZ-235 sensitiven Proben ließ sich kein Unterschied feststellen (43,9% vs. 35,8%; Abbildung 4-3 B).

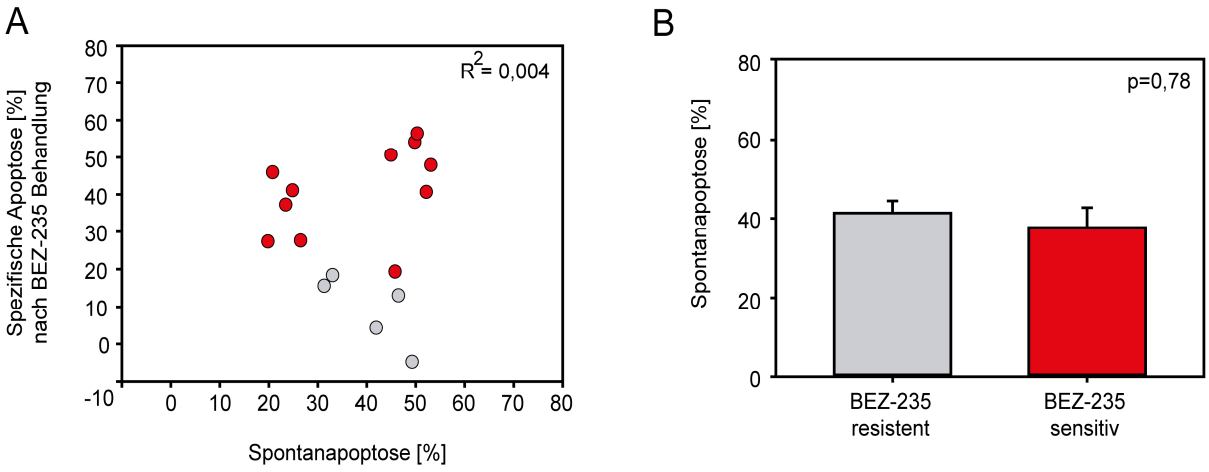


Abbildung 4-3 Zusammenhang zwischen Spontanapoptose und Apoptose-Induktion nach Behandlung mit BEZ-235. *A) Die Apoptose-Induktion in primären AML Proben nach der Behandlung mit 4 µM BEZ-235 im Vergleich zur jeweiligen Spontanapoptose der unbehandelten Kontrollproben. In rot sind die BEZ-235 sensitiven Proben hervorgehoben. Es ließ sich keine signifikante Korrelation feststellen (R^2=0,00474). B) Die Spontanapoptose der BEZ-235 resistenten (in grau) und der BEZ-235 sensitiven Proben (in rot) im Vergleich. Es zeigte sich kein signifikanter Unterscheid zwischen den beiden Gruppen bzgl. der Apoptose unbehandelter Zellen (p=0,78).*

4.1.5. Sensitivität und genetischer Hintergrund

Die Sensitivität gegenüber BEZ-235 wurde an insgesamt 16 AML-Proben untersucht. Eine Sensitivitätsschwelle von 20% wurde für alle Apoptoseversuche festgelegt und gemäß dieser Schwelle sensitive und resistente Proben definiert. Es konnten 16 Proben in elf sensitive und fünf resistente Proben unterteilt werden. Von diesen wurde der Mutationsstatus für Wachstumsfaktor-relevante Gene wie *FLT3* und *RAS* sowie für die Gene *MLL* und *NPM1* untersucht und mit deren Sensitivität gegenüber BEZ-235 verglichen. Ein eventuell bestehender Zusammenhang zwischen genetischem Hintergrund und Sensitivität zum Treffen einer Sensitivitätsvorhersage für AML-Patienten sollte so ermittelt werden. Über den Vergleich von Sensitivität gegenüber BEZ-235 und dem genetischen Hintergrund der Proben bezogen auf Mutationen in den Genen *MLL, FLT3, RAS* und *NPM1* konnte kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden (Abbildung 4-4). Auffallend war, dass sich alle fünf Proben, die eine Mutation bzw. eine Translokation im *MLL*-Gen aufwiesen, sensitiv gegenüber BEZ-235 zeigten. *RAS*-mutierte Patientenproben waren ebenso

häufiger in der sensitiven Kohorte vertreten (45% vs. 20%). Für die *NPM1*-mutierten Proben verhielt sich dies gegenteilig. Hier trugen aus den elf BEZ-235 sensitiven Patienten nur 15% (2/11) eine *NPM1*-Mutation während es in der resistenten Kohorte 60% (3/5) Patienten waren. Für Mutationen im *FLT3*-Gen zeigte sich keine tendenzielle Zugehörigkeit zu einer der beiden Kohorten (65% vs. 60%). Aufgrund der geringen Probenzahl ließ sich keine statistische Signifikanz berechnen.

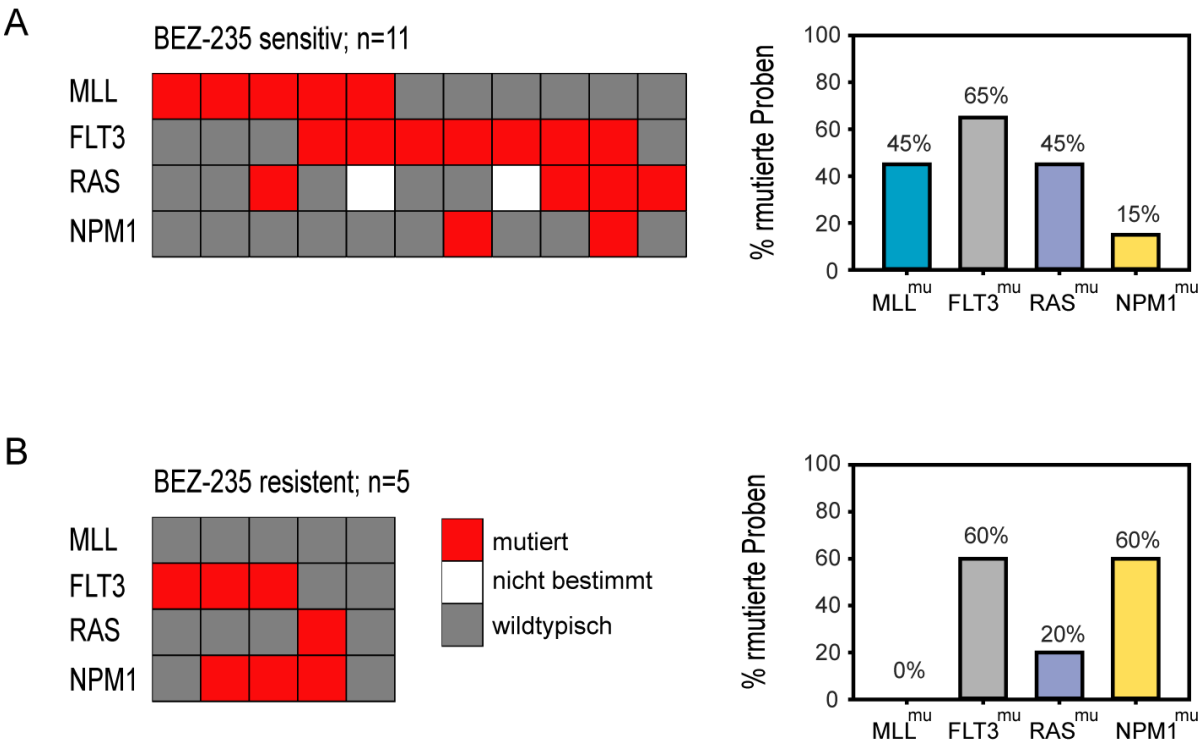


Abbildung 4-4 Zusammenhang zwischen genetischem Hintergrund und Sensitivität gegenüber BEZ-235. *Die BEZ-235-Sensitivität der 16 AML Patientenproben wurde mit ihrem genetischen Hintergrund korreliert. Hierbei repräsentiert jede Spalte einen Patienten mit seinem jeweiligen Mutationsstatus in den vier Genen MLL, RAS, FLT3 und NPM1. A) Darstellung der elf BEZ-235 sensitiven Proben B) Darstellung der fünf BEZ-235 resistenten Proben (mu: mutiert).*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Sensitivität der *MLL*-mutierten Proben höher war, als die der *MLL*-Wildtyp (*MLL*-WT) Proben. Dazu wurde die spezifische Apoptose der *MLL*-mutierten Proben nach dualer PI3K/mTOR-Inhibition sowie nach Einzelinhibition von AKT und mTORC1 den *MLL*-WT Proben gegenüber gestellt (Abbildung 4-5). Im Median zeigte sich durch Behandlung mit allen drei Inhibitoren eine höhere spezifische Apoptoserate in *MLL*-mutierten Patientenproben (BEZ-235 17,1% vs. 34,8%; MK-2206 8,2% vs. 17,3%, Rapamycin 4,5% vs. 12,8%).

Diese war für die Einzelinhibition von AKT durch MK-2206 signifikant mit einem p-Wert von 0,009 für die gewählte Konzentration von 1 µM. Im Fall von Rapamycin zeigte sich eine marginale Signifikanz mit einem p-Wert von 0,07.

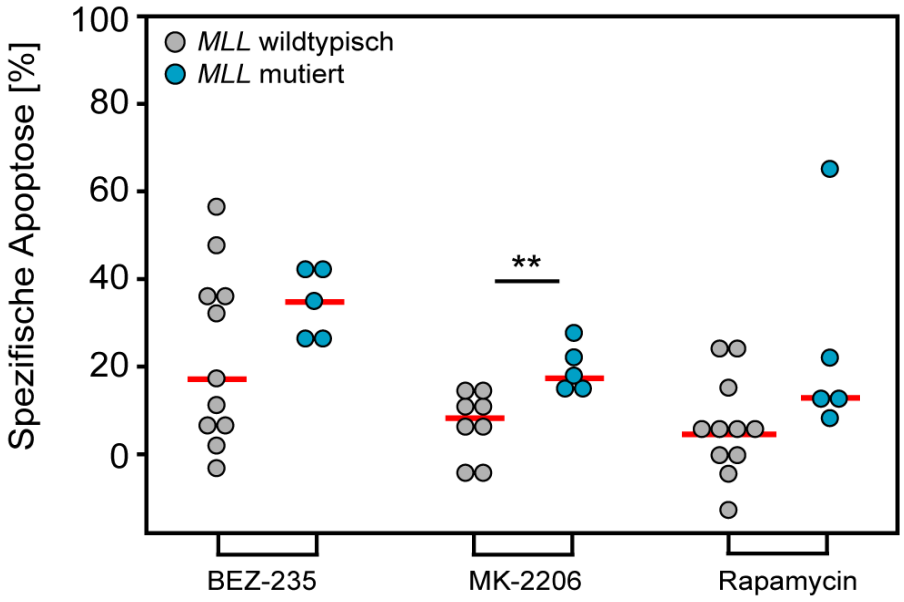


Abbildung 4-5 Apoptoserate in MLL-mutierten AML Patientenproben. *Dargestellt ist die spezifische Apoptoserate [%] nach Inhibition mit dem dualen Inhibitor BEZ-235 [1 µM] und den beiden Einzelinhibitoren MK-2206 [1 µM] und Rapamycin [1 µM]. Verglichen wurden elf MLL-mutierte (in blau) mit fünf MLL-WT Patientenproben (in grau). Die roten Balken zeigen den Median an. ** p<0,01.*

Eine Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs beeinflusst neben der Apoptose-Induktion vor allem die Proliferation der Zellen. Unterschiedliche Proliferationsaktivität zwischen *MLL*-mutierten und *MLL*-WT Proben könnte auch erklären, dass Proben sensitiver auf die Behandlung mit Signalweginhibitoren reagieren. Die *MLL*-mutierte AML ist als eine aggressive und schnell proliferierende Leukämie beschrieben. Daher wurde die Expression von Ki-67, einem Marker für Proliferation, in 514 AML-Patientenproben mit bzw. ohne *MLL*-Mutation analysiert und verglichen. In Abbildung 4-6 ist die Expression in Log2-Intensitäten dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kohorten festgestellt werden (p=0,28). Daher ist davon auszugehen, dass die hohe Sensitivität der *MLL*-mutierten Proben nicht auf eine höhere Proliferationsaktivität zurückzuführen ist.

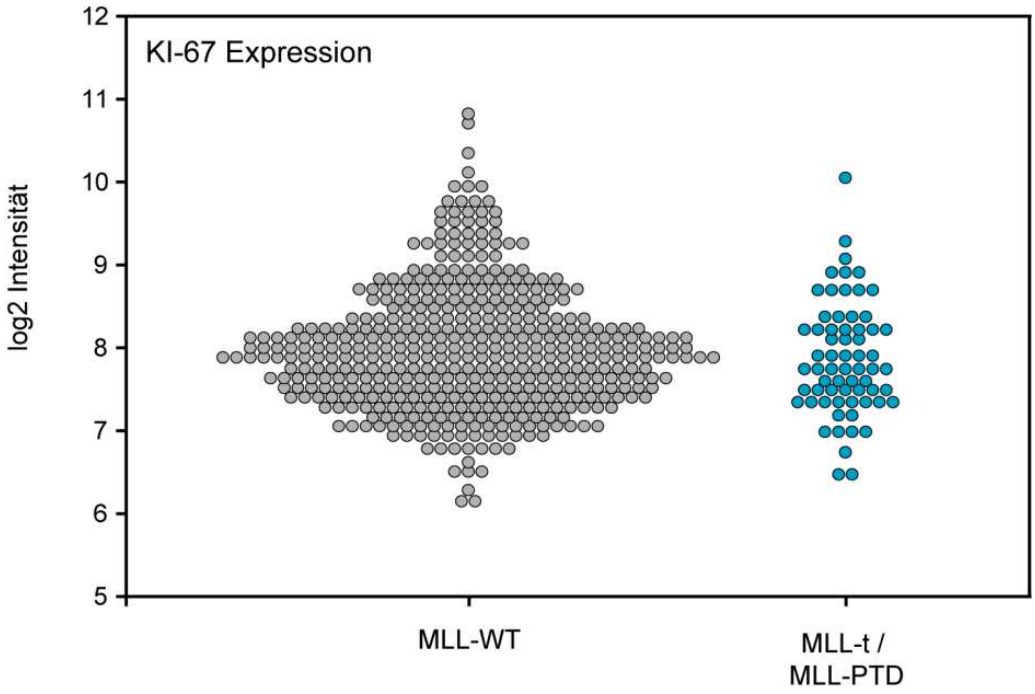


Abbildung 4-6 Ki-67-Expression in AML-Patientenproben. *In 514 AML-Patientenproben wurde mittels Microarray die KI-67-Expression gemessen und ein Vergleich von MLL-Wildtyp (grau) zu MLL-mutierten Proben (blau) dargestellt. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden (p=0,28). MLL-PTD: MLL-partial tandem duplication, MLL-t: MLL-Translokation, MLL-WT: MLL-Wildtyp.*

Weiterhin wurde die Spontanapoptoserate von *MLL*-mutierten mit *MLL*-WT Patientenproben verglichen. Die Spontanapoptose der jeweiligen Proben könnte sich ebenso auf die spezifische Apoptose auswirken. Je höher die Spontanapoptose ist, desto geringer erscheint der Effekt des Inhibitors oder je höher die Spontanapoptose ist, desto sensibler reagieren die Zellen auf zusätzliche Inhibition und gehen verstärkt in Apoptose. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Spontanpoptose von *MLL*-WT zu *MLL*-mutierten Proben festgestellt werden (Abbildung 4-7). Sie betrug durchschnittlich 40,1% für *MLL*-WT und 36,7% für *MLL*-mutierte Patientenproben (p=0,65).

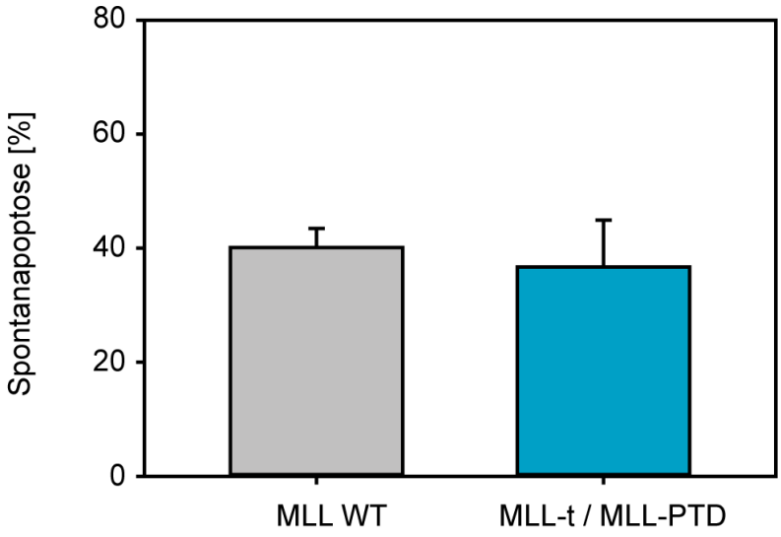


Abbildung 4-7 Spontanapoptose von MLL-mutierten und MLL-WT Patientenproben. *Die Spontanapoptose der unbehandelten Zellen wurde zum Endzeitpunkt nach 48 h bis 72 h mittels FACS ermittelt und zwischen MLL-WT und MLL-mutierten Patientenproben verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterscheid festgestellt werden. WT: Wildtyp, MLL-t: MLL-Translokation, MLL-PTD: MLL-partial tandem duplication.*

Es wurde für alle weiteren verwendeten Inhibitoren untersucht, ob sich die spezifische Apoptose zwischen den beiden Kohorten *MLL*-WT bzw. *MLL*-mutierte Proben voneinander unterscheidet (Abbildung 4-8). Dabei wurde geprüft, ob es sich um einen Effekt handelt, der spezifisch auf der Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs beruht oder um eine generelle Hypersensitivität *MLL*-mutierter Proben. Für keine der gewählten Substanzen war ein Unterschied in der Sensitivität zwischen den *MLL*-WT und den *MLL*-mutierten Proben ersichtlich. Diese Analyse wurde für alle gewählten Konzentrationen durchgeführt und die jeweiligen p-Werte ermittelt. Die p-Werte sind in Tabelle 4-3 angegeben.

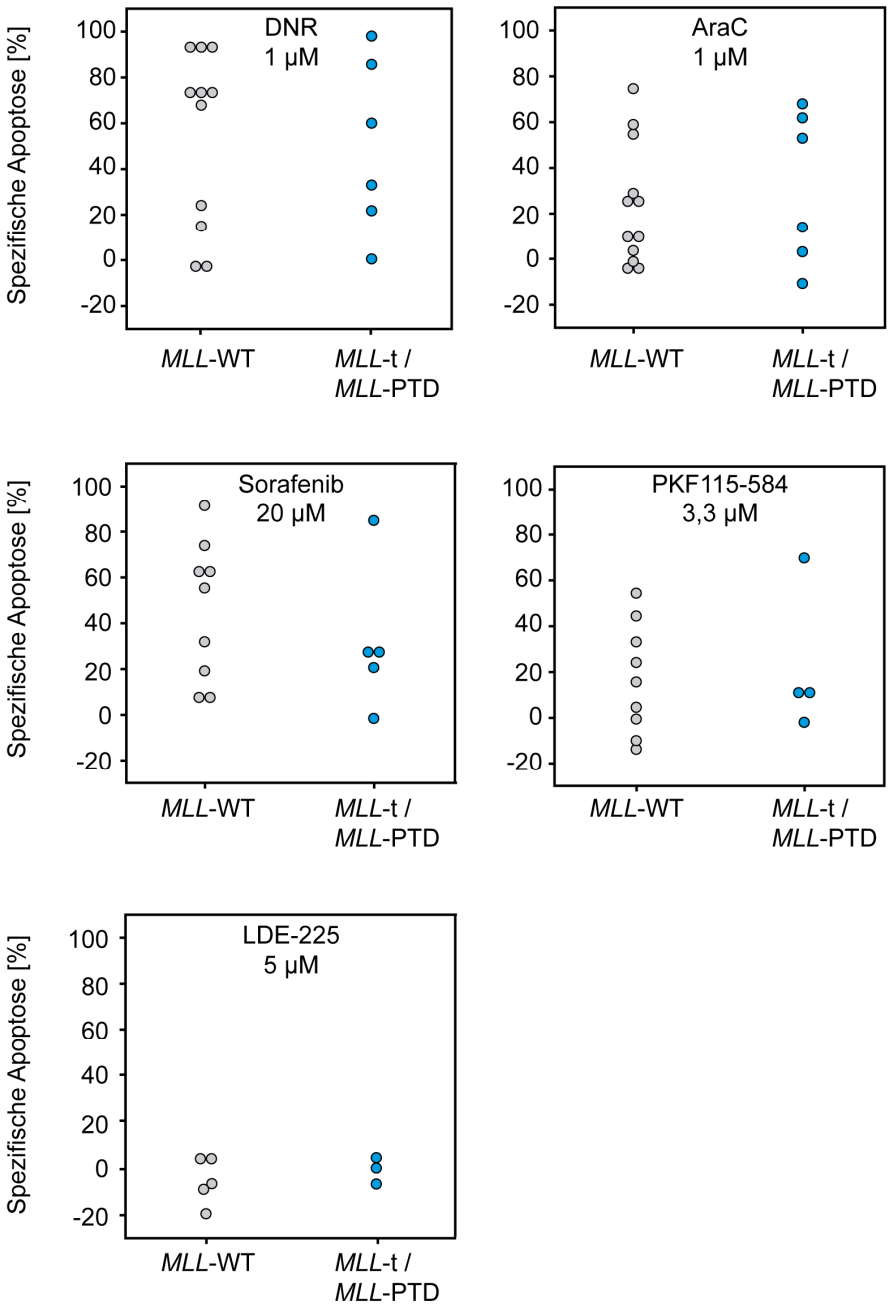


Abbildung 4-8 Vergleich von MLL-WT und MLL-mutierten AML-Patientenproben hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedener Inhibitoren und Zytostatika. *Die spezifische Apoptose nach Behandlung mit den beiden Zytostatika DNR und AraC und spezifischen Inhibitoren ist für die höchste gewählte Konzentration je Substanz dargestellt. Verglichen wurden MLL-WT (in grau) mit MLL-mutierten AML Patientenproben (in blau). MLL-PTD: MLL-partial tandem duplication, MLL-t: MLL-Translokation, MLL-WT: MLL-Wildtyp.*

Tabelle 4-3 Statistischer Vergleich zwischen der spezifischen Apoptose von MLL-WT und MLL-mutierten Proben nach Behandlung mit Inhibitoren verschiedener Signalwege und in verschiedenen Konzentrationen.

Substanz	Konzentration	p-Wert MLL^{wt} vs. MLL^{mu}	Signifikanz
MK-2206 [µM]	0,25	0,301	n.s.
	1	**0,009** ↑	**
	4	**0,005** ↑	**
Rapamycin [µM]	1	0,070	n.s.
BEZ-235 [µM]	0,25	0,667	n.s.
	1	0,229	n.s.
	4	0,310	n.s.
DNR [µM]	0,1	0,336	n.s.
	1	0,809	n.s.
AraC [µM]	1	0,584	n.s.
	25	0,741	n.s.
Sorafenib [µM]	10	0,484	n.s.
	20	0,431	n.s.
PKF115-584 [µM]	0,33	0,214	n.s.
	1	0,128	n.s.
	3,3	0,733	n.s.
LDE-225 [µM]	0,2	0,712	n.s.
	1	0,218	n.s.
	5	0,491	n.s.

Im Fall der AKT-Inhibition durch MK-2206 konnte für die beiden Konzentrationen 1 µM und 4 µM eine signifikant höhere spezifische Apoptose in *MLL*-mutierten Patientenproben nachgewiesen werden (p=0,009 bzw. p=0,005). Die Unterschiede nach Behandlung mit 1 µM Rapamycin zeigten eine marginale Signifikanz mit einem p-Wert von 0,07.

4.2. Sensitivität humaner Zelllinien

Die Arbeit mit primären AML-Patientenproben ist durch mehrere Faktoren limitiert. Das ist erstens die Limitation in der Verfügbarkeit der Proben, zweitens die schlechte Kultivierbarkeit der meisten Proben über einen Zeitraum von drei Tagen und drittens die Tatsache, dass diese Proben nur sehr wenig in Kultur proliferieren. Eine Aussage über eine proliferationshemmende Wirkung einer Substanz ist daher nicht möglich. Im Folgenden wurden die Effekte der PI3K/AKT/mTOR-Inhibition daher in humanen myeloischen Leukämie-Zelllinien weiter untersucht. Hierzu wurden sechs Zelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund ausgewählt. Da der Zusammenhang zwischen *MLL*-Mutationen und erhöhter Sensitivität näher untersucht werden sollte, wurden drei Zelllinien mit einer *MLL*-Translokation, drei Zelllinien ohne *MLL*-Mutation gegenübergestellt. Der in der Literatur beschriebene genetische Hintergrund der Zelllinien wurde über Sequenzierung validiert. Hierbei wurde der Mutationsstatus folgender Gene analysiert: *KRAS, NRAS, FLT3, CBL, RUNX1, ASXL1, TET2, GATA2, U2AF1, SRSF2, SF3B1, WT1, NMP1, IDH1, IDH2* und *TP53*. In Tabelle 4-4 sind alle Gene dargestellt, die in mindestens einer der Zelllinien mutiert waren.

Tabelle 4-4 Genetischer Hintergrund der verwendeten myeloischen Zelllinien. *Dargestellt sind die verwendeten sechs Zelllinien mit ihrem FAB Subtyp und ihrem Mutationsstatus in den Genen MLL, FLT3, CBL, NRAS, KRAS, p53, NPM1 und DNMT3A. MLL-mutierte Zelllinien sind blau, MLL-WT Zelllinien sind grau hinterlegt.*

	FAB	MLL	FLT3	CBL	NRAS	p53	NPM1	DNMT3A
MOLM-13	M5	**MLL-AF9**	**ITD**	**409del**	WT	WT	WT	WT
MV4-11	M5	**MLL-AF4**	**ITD**	WT	WT	**R248W**	WT	WT
THP-1	M5	**MLL-AF9**	WT	WT	**G12D**	**R174fs*3**	WT	WT
OCI-AML3	M4	WT	WT	WT	WT	WT	**NPM1c**	**R882C**
K-562	CML	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HL-60	M2	WT	WT	WT	**Q61L**	**1182del**	WT	WT

CML: chronic myeloid leukemia, del: Deletion, FAB: French-American-British classification,
ITD: internal tandem duplication, WT: wildtypisch

4.2.1. Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch BEZ-235, MK-2206 und Rapamycin

Anhand von Western Blot und Durchflusszytometrie wurden die Phosphorylierung und damit die Aktivierung verschiedener Schlüsselproteine des Signalwegs nach Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor untersucht.

4.2.1.1. Inhibition der Kinasen AKT und S6 im Western Blot

Repräsentativ sind in Abbildung 4-9 die Western Blot-Analysen in der Zelllinie THP-1 dargestellt. Die Zellen wiesen eine hohe basale Aktivierung des Signalwegs auf. Die Kinasen AKT und S6 waren in unbehandelten Zellen deutlich phosphoryliert (Abbildung 4-9).

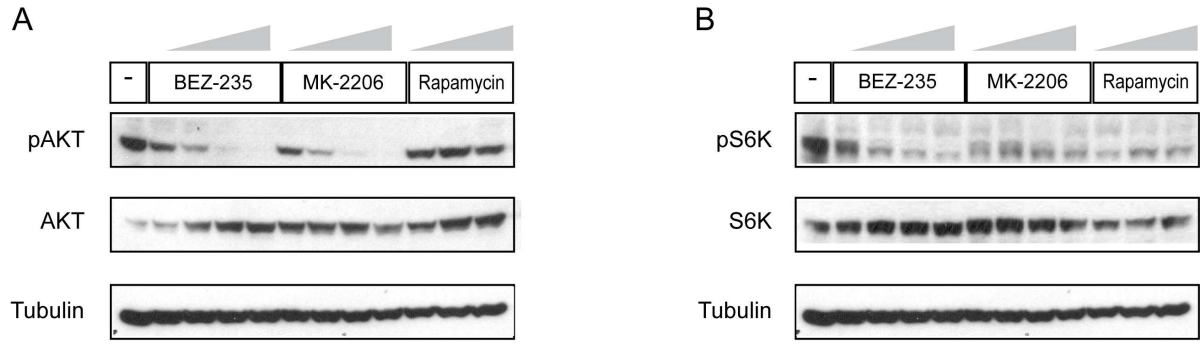


Abbildung 4-9 Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in THP-1 Zellen. *THP-1 Zellen wurden für 6 Stunden mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert. Konzentrationen BEZ-235 und MK-2206: 15,6 nM, 62,5 nM, 250 nM und 1000 nM; Konzentrationen Rapamycin 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Aus den Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Aktivierung der Proteine S6K und AKT über Immunblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle wurden β-Aktin bzw. Tubulin verwendet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.*

Der duale PI3K/mTOR-Inhibitor bewirkte die konzentrationsabhängige Dephosphorylierung der beiden Kinasen AKT und S6. Die komplette Dephosphorylierung von AKT wurde erst ab einer Konzentration von 0,25 µM BEZ-235 erreicht, während die vollständige Hemmung der S6-Kinase bereits bei einer Konzentration von 62,5 nM beobachtet wurde. Der AKT-Inhibitor MK-2206 bewirkte die vollständige Dephosphorylierung ab einer Konzentration von 1 µM, während die S6-Kinase weiterhin leicht phosphoryliert vorlag. Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin verhinderte

die Aktivierung und Phosphorylierung des direkten Zielproteins S6 Kinase, während er keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT zeigte.

4.2.1.2. Messung der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 mittels Durchflusszytometrie

Am Beispiel von MOLM-13 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie-Messung dargestellt (Abbildung 4-10). MOLM-13 Zellen wiesen ein hohes Maß an basaler Phosphorylierung des S6 Proteins auf. Die Phosphorylierung ließ sich durch BEZ-235 als auch durch MK-2206 und Rapamycin deutlich reduzieren. Die Phosphorylierung des S6 Proteins erfolgt unmittelbar nach der Aktivierung des mTOR Komplexes und kann auch über AKT-unabhängige Signalwege stattfinden. Daher ist die Reduktion nach mTORC1-Inhibition durch Rapamycin und nach dualer Inhibition der PI3K und des mTORC1/2 durch BEZ-235 am Stärksten.

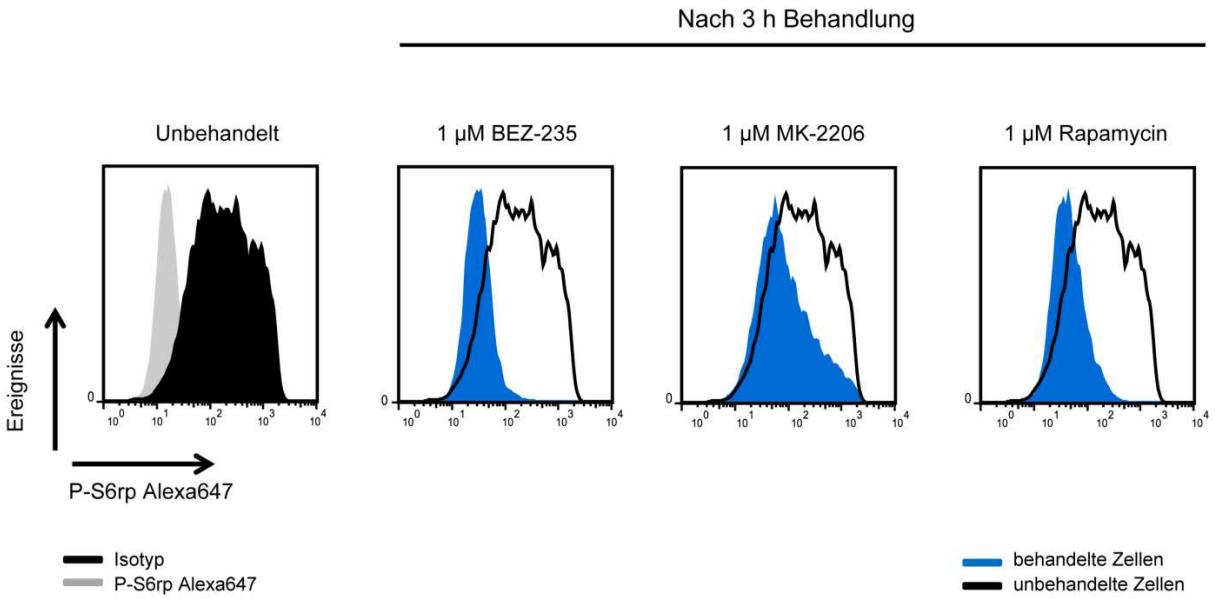


Abbildung 4-10 Durchflusszytometrie-Messung nach P-S6rp Antikörper-Färbung in MOLM-13 Zellen. *Die Zellen wurden unbehandelt oder nach 3 h Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor fixiert und mit einem P-S6rp-Antikörper gefärbt. Mittels Durchflusszytoemtrie konnte der jeweilige MFI Ratio ermittelt werden. Links sind in grau die Isotypkontrolle und in schwarz die gefärbten unbehandelten Zellen dargestellt. In den weiteren drei Spalten sind in schwarz erneut die unbehandelten Zellen und in blau die jeweiligen Inhibitor-Behandlungen im Vergleich zu sehen.*

4.2.1.3. Die basale Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in humanen Zelllinien

Mit Hilfe von Western Blot und Durchflusszytometrie-Analysen wurde die basale Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in den Zelllinien miteinander verglichen, um eventuelle Unterschiede in der Aktivität des Signalwegs zu detektieren.

Basale AKT-Phosphorylierung

Die basale Signalwegaktivierung wurde anhand des Phosphorylierungslevels von AKT zwischen den Zelllinien miteinander verglichen (Abbildung 4-11). Als Maß für die Aktivierung des Signalwegs wurden die Ratios von phosphoryliertem zu gesamten AKT mittels der Software Image J ermittelt. Die basale AKT-Phosphorylierung war in drei *MLL*-rearrangierten Zelllinien signifikant höher als in drei *MLL*-WT Zelllinien. Als Positivkontrolle für eine starke Signalwegaktivierung wurden Lysate der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 verwendet. Diese Zelllinie trägt eine aktivierende *PIK3CA*-Mutation und wies die höchste AKT-Phosphorylierung auf.

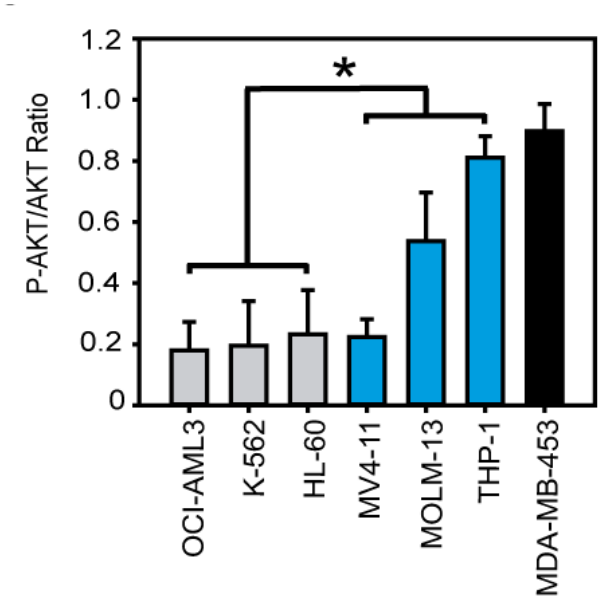


Abbildung 4-11 Basale Signalwegaktivierung in humanen Zelllinien. *Die Bandenintensität wurde mittels Image J quantifiziert und der Ratio zwischen Phospho-Protein und Gesamtprotein gebildet. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. *p<0,5.*

Basale Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6

In allen sechs verwendeten Zelllinien ließ sich ein basaler Level an P-S6rp nachweisen (Abbildung 4-12).

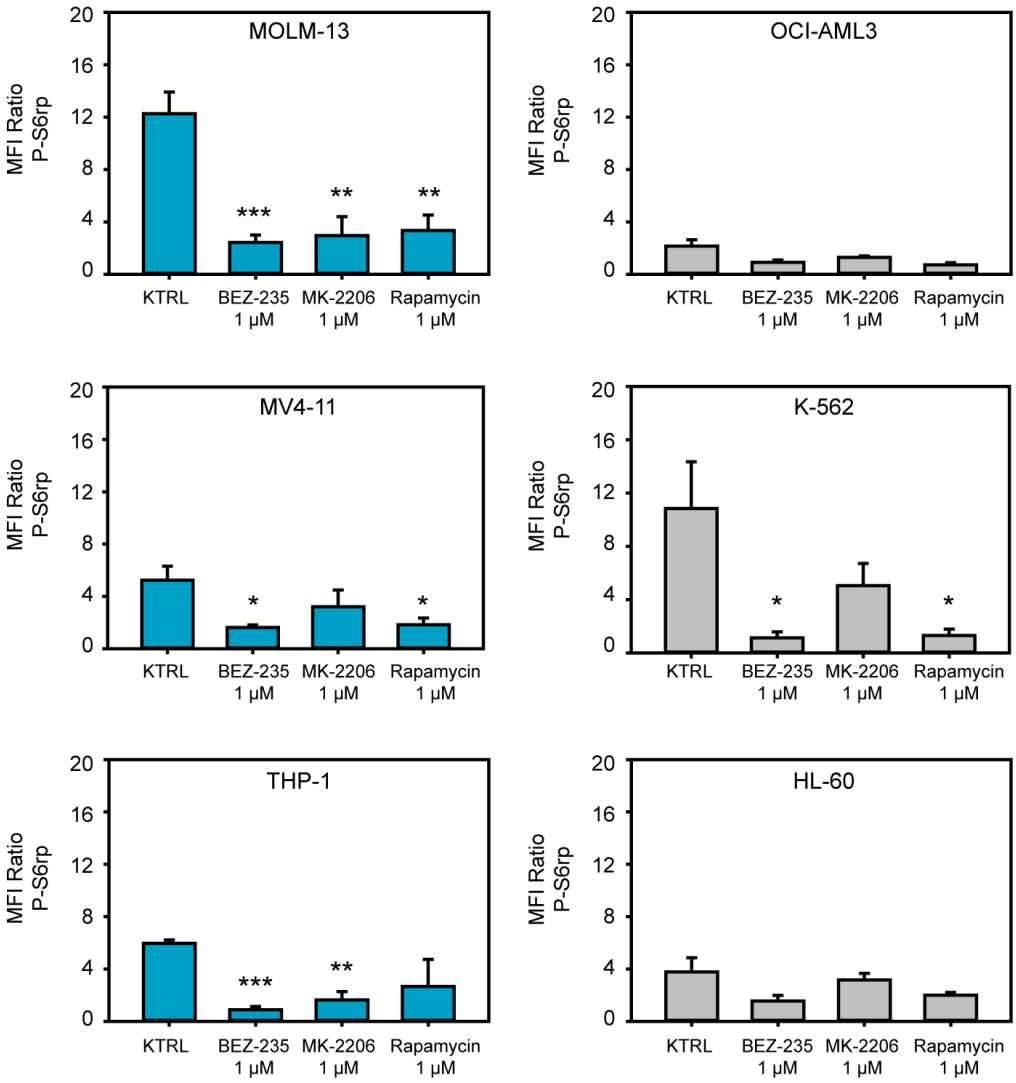


Abbildung 4-12 Durchflusszytometrie-Messung nach P-S6rp Antikörper-Färbung in humanen Leukämie-Zelllinien nach Behandlung mit Inhibitoren. *Die Zellen wurden unbehandelt oder nach 3 h Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor fixiert und mit einem P-S6rp-Antikörper gefärbt. Mittels FACS konnte der jeweilige MFI Ratio ermittelt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des MFI Ratio von mindestens drei unabhängigen Experimenten. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.*

Dieser war unterschiedlich hoch in den einzelnen Zelllinien. Ein Unterschied zwischen *MLL*-WT und *MLL*-mutierten Zelllinien konnte nicht festgestellt werden. Die Zelllinie K-562, eine *MLL*-WT Zelllinie wies neben der *MLL*-mutierten Zelllinie

MOLM-13 die höchste basale Phosphorylierung des Proteins auf. In den beiden Zelllinien OCI-AML3 und HL-60, die die niedrigste basale Aktivität aufwiesen, konnte durch die Behandlung mit den Inhibitoren zwar eine tendenzielle aber keine signifikante Reduktion der Aktivierung nachgewiesen werden.

4.2.2. Apoptose-Induktion nach Inhibition des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs

Zur Bestimmung der spezifischen Apoptose wurden die humanen Zelllinien mit aufsteigenden Inhibitor-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die spezifische Apoptose der Zellen mittels FSC/SSC und PI-Färbung im FACS ermittelt. Es wurden sowohl drei Konzentrationen des dualen Inhibitors BEZ-235 als auch drei bis vier Konzentrationen der Einzelinhibitoren ausgewählt und miteinander verglichen.

4.2.2.1. Apoptose-Induktion nach dualer PI3K/mTORC-Inhibition

Der duale PI3K/mTORC1/2-Inhibitor BEZ-235 zeigte ab einer Konzentration von 1 µM spezifische Apoptose in *MLL*-rearrangierten Zelllinien (Abbildung 4-13). Durch Wahl einer höheren Konzentration konnte die Apoptose weiter gesteigert werden. Hier wurde in der Konzentration von 4 µM ein Wert von 55,6% spezifischer Apoptose in MOLM-13 Zellen erreicht. Die gleiche Behandlung bewirkte in den *MLL*-WT Zelllinien eine deutlich geringere Induktion von Apoptose. In OCI-AML3 und K-562 konnte nur in der höchsten Konzentration von 4 µM eine statistisch signifikante Apoptose-Induktion beobachtet werden. Diese betrug jedoch maximal 16,1%. HL-60 Zellen hingegen waren gegenüber der BEZ-235-Behandlung resistent und zeigten auch bei 4 µM keine signifikante Induktion von Apoptose.

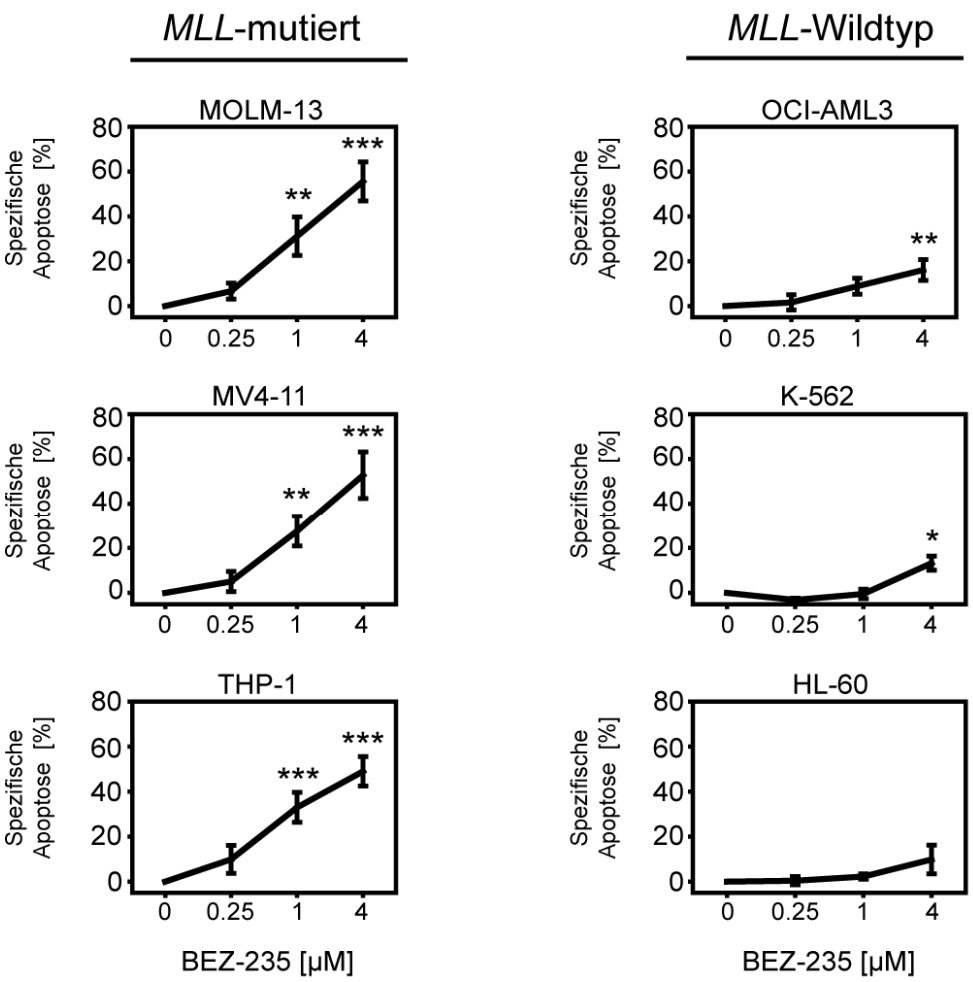


Abbildung 4-13 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit dem PI3K/mTORC1/2-Inhibitor BEZ-235. *Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem dualen PI3K/mTORC1/2-Inhibitor BEZ-235 behandelt. Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels Durchflusszytometrie-Analyse bestimmt und deren statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. In der linken Spalte sind drei MLL-mutierte Zelllinien zu sehen, in der rechten drei Zelllinien mit MLL-WT Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.*

4.2.2.2. Apoptose-Induktion nach alleiniger AKT-Inhibition

Behandelte man die Zellen mit MK-2206, einem Einzelinhibitor von AKT, wurde nur in zwei der drei *MLL*-mutierten Zelllinien MOLM-13 und THP-1, und dies nur bei der höchsten gewählten Konzentration von 8 µM, Apoptose induziert (Abbildung 4-14). Der Anstieg auf 61,3% spezifische Apoptose bei der Konzentration 8 µM in MOLM-13 Zellen war sehr sprunghaft. Für THP-1 Zellen hingegen konnte eine gleichmäßigere Dosis-Wirkungskurve beobachtet werden.

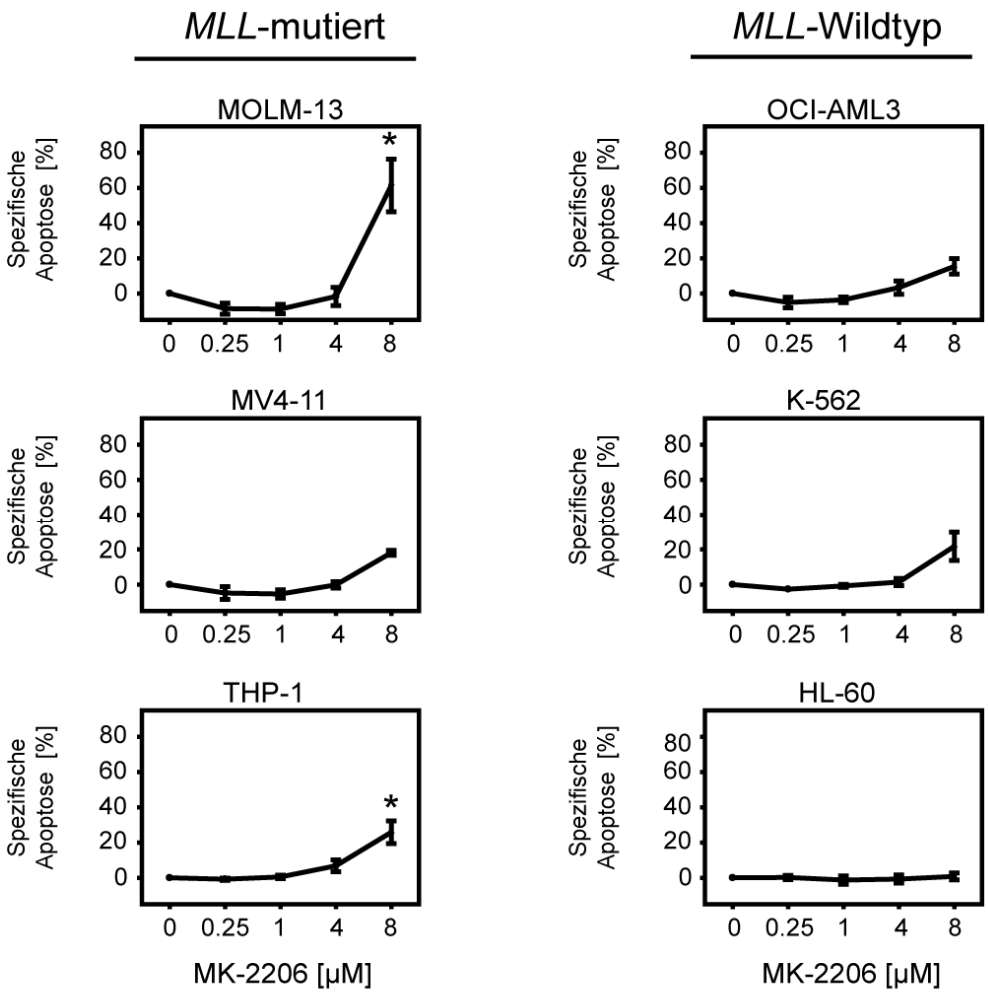


Abbildung 4-14 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit dem AKT-Inhibitor MK-2206. *Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem AKT Inhibitor MK-2206 behandelt. Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels Durchflusszytometrie-Analyse bestimmt und deren statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. In der linken Spalte sind drei MLL-mutierte Zelllinien zu sehen, in der rechten drei Zelllinien mit MLL-WT Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. *p<0,05*

4.2.2.3. Apoptose-Induktion nach alleiniger mTORC1-Inhibition

Die Behandlung mit dem Einzelinhibitor des mTORC1, Rapamycin, zeigte in keiner der drei gewählten Konzentrationen eine Induktion von Apoptose. Dies galt sowohl für die *MLL*-mutierten als auch für die *MLL*-WT Zelllinien. In drei Zelllinien (MOLM-13, THP-1 und HL-60) konnte sogar eine verringerte Apoptose, also ein Viabilitätsvorteil in den behandelten Zellen beobachtet werden. Dieser war statistisch signifikant und konnte für die beiden Konzentrationen 0,1 µM und 1 µM beobachtet werden.

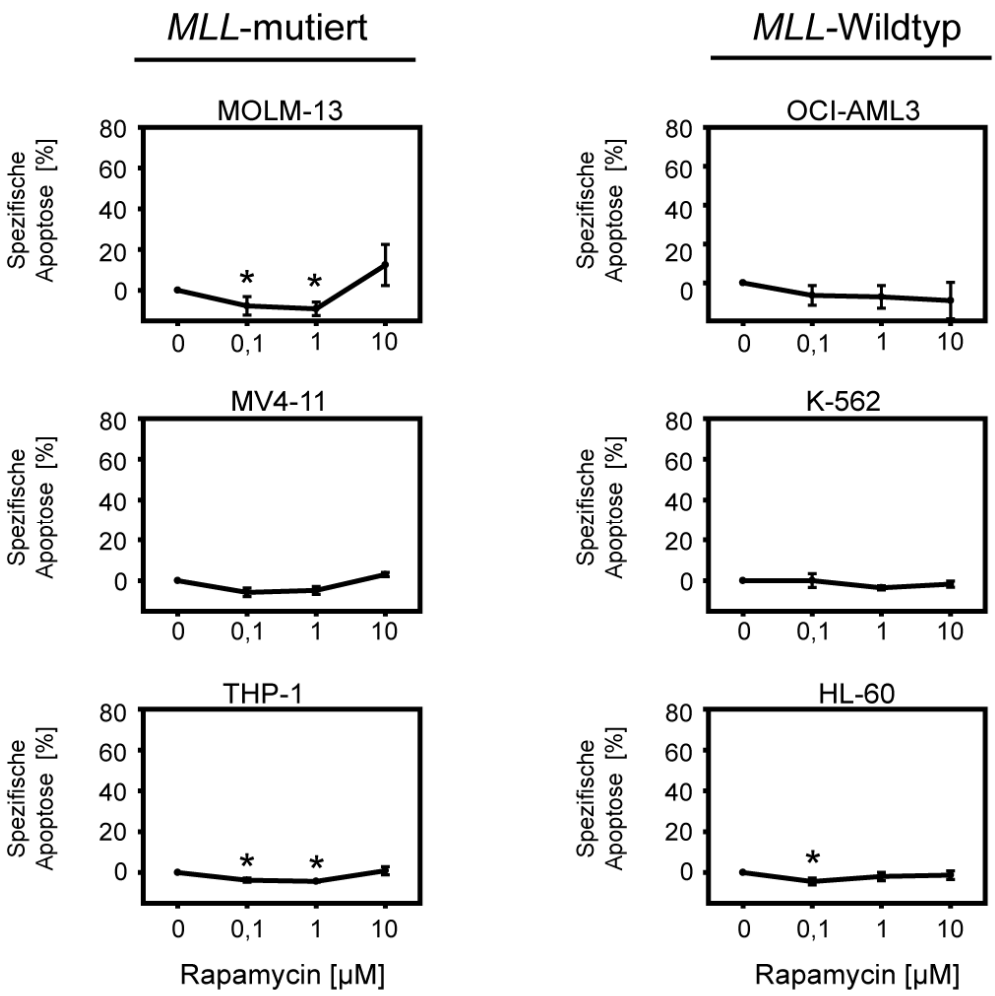


Abbildung 4-15 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit dem mTORC1-Inhibitor Rapamycin. *Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem mTORC1 Inhibitor Rapamycin behandelt. Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels FACS Analyse bestimmt und deren statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. In der linken Spalte sind drei MLL-mutierte Zelllinien zu sehen, in der rechten drei Zelllinien mit MLL-WT Expression. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. *p<0,05*

4.2.3. Proliferationsinhibition nach Inhibition des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs

Neben der Induktion von Apoptose wurde auch die Inhibition des Zellwachstums untersucht. Dies ist wie bereits in Absatz 4.2 beschrieben mit primären AML-Patientenproben nicht möglich, da sich diese in Kultur *ex vivo* nur sehr selten teilen.

Um die Proliferation verschiedener Zelllinien miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, dass sich diese ungefähr gleich schnell teilen, d.h. ähnliche Verdopplungsraten haben. Daher wurden alle sechs verwendeten Zelllinien ausgesät

und nach 72 Stunden ihre Zellzahl ermittelt. So konnten Unterschiede in den Verdopplungsraten erfasst werden.

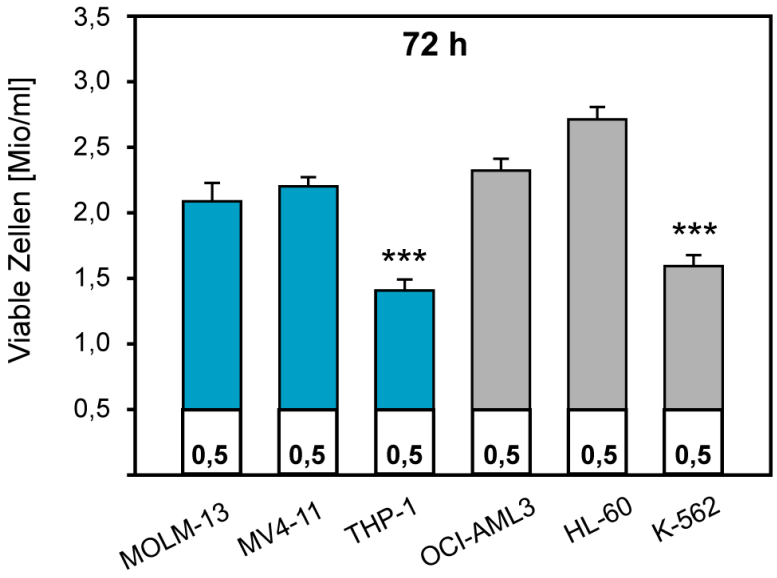


Abbildung 4-16 Ermittelte Zahl viabler Zellen nach 72 h für alle sechs verwendeten humanen Zelllinien. *Am Tag 0 wurden je Zelllinie 0,5*10^6 Zellen/ml ausgesät und nach 72 Stunden wurde über den Ausschluss toter Zellen nach Trypanblau-Färbung die Zahl viabler Zellen ermittelt. In blau sind die drei MLL-mutierten Zelllinien, in grau die MLL-WT Zelllinien hervorgehoben. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Mittels ANOVA wurden signifikante Unterschiede in der Zellzahl ermittelt. ***p<0,001.*

Nach einer Wachstumszeit von 72 Stunden hatte sich die Zellzahl bei vier der sechs ausgewählten Zelllinien um das 4,2- bis 5,4-fache des Ausgangswertes erhöht. Bei THP-1 und K-562 war die Proliferationsrate signifikant reduziert ($p<0,001$). Die Zellzahl dieser Zellen erreichte nach 72 Stunden das 2,8- bzw. das 3,2-fache der Ausgangszellzahl. In den folgenden Analysen zur Proliferationsinhibition wurden die beiden Zelllinien von der Ermittlung des Konzentrationswertes, der zur halbmaximalen Inhibition führt (IC_{50}), daher ausgeschlossen.

Um den Einfluss einer dualen PI3K/mTORC1/2-Inhibition in den Zelllinien zu überprüfen, wurden vier Zelllinien mit der Substanz BEZ-235 behandelt und deren Zellzahl vor und nach der Behandlung bestimmt. Das Wachstum der unbehandelten Zellen wurde als 100% angegeben und die Zellzahl der behandelten Zellen dazu in Relation gesetzt. Abbildung 4-17 zeigt die Abnahme der Zellzahl mit steigender BEZ-235-Behandlung in allen vier Zelllinien. Mittelte man die Werte der beiden *MLL-*

mutierten und die Werte der beiden *MLL*-WT Zelllinien, so ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die erreichte Zellzahl war in *MLL*-mutierten Zelllinien in allen gewählten Konzentrationen geringer. Bei der niedrigsten Konzentration von 62,5 nM war eine signifikante Reduktion der Zellzahl zu vermerken. Auch der ermittelte IC_{50}-Wert, der Wert, bei der der halbmaximale Inhibitionseffekt der Substanz vorliegt, lag in diesen Zelllinien um ein 6- bis 20-faches niedriger (155,4 nM und 161,1 nM vs. 462,5 nM und 2237,4 nM).

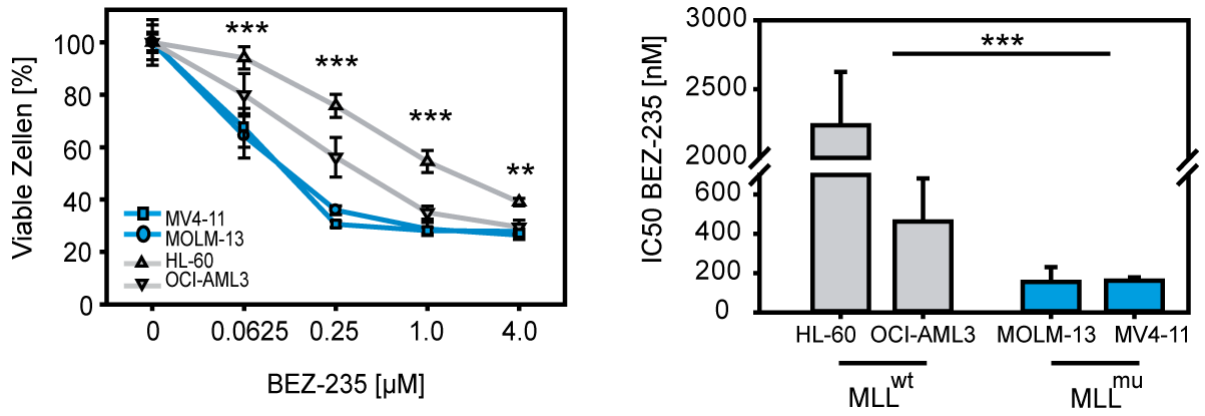


Abbildung 4-17 Proliferationsinhibition durch Behandlung mit BEZ-235. *Die Zelllinien wurden an Tag 0 ausgesät und über einen Zeitraum von 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BEZ-235 inkubiert. Die Zahl viabler Zellen wurde über automatisierte Zellzählung unter Ausschluss von toten Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanzen wurden zwischen den beiden Kohorten MLL-mutiert und MLL-WT errechnet und angegeben. **p<0,01, ***p<0,001. Unter Verwendung des Programms Calcusyn wurde der IC_{50}-Wert für BEZ-235 in den Zelllinien ermittelt. In blau sind Zelllinien dargestellt, die eine MLL-Translokation tragen, in grau MLL-WT Zelllinien. mu: mutiert, wt: wildtypisch.*

Im Vergleich zu einer dualen PI3K/mTORC1/2-Inhibition wurde die Proliferation bei Einzelinhibitoren von AKT und mTORC1 betrachtet. Eine Reduktion der Proliferation konnte hier erst durch Behandlung mit deutlich höheren Konzentrationen (Konzentrationen im µM-Bereich) erzielt werden (Abbildung 4-18). Die für BEZ-235 beobachteten Unterschiede zwischen *MLL*-mutierten und *MLL*-WT Zelllinien waren auch für MK-2206 zu beobachten. Insgesamt bewirkte eine AKT-Inhibition mittels MK-2206 jedoch nur eine moderate Abnahme des Zellwachstums. Die Einzelinhibition des mTORC1 mittels Rapamycin erzielte in keiner der verwendeten Konzentrationen eine deutliche Proliferationsreduktion, ein IC_{50}-Wert konnte daher nicht

ermittelt werden. Trotzdem zeigten sich auch für diese Substanz signifikante Unterschiede zwischen *MLL*-mutierten und *MLL*-WT Zelllinien.

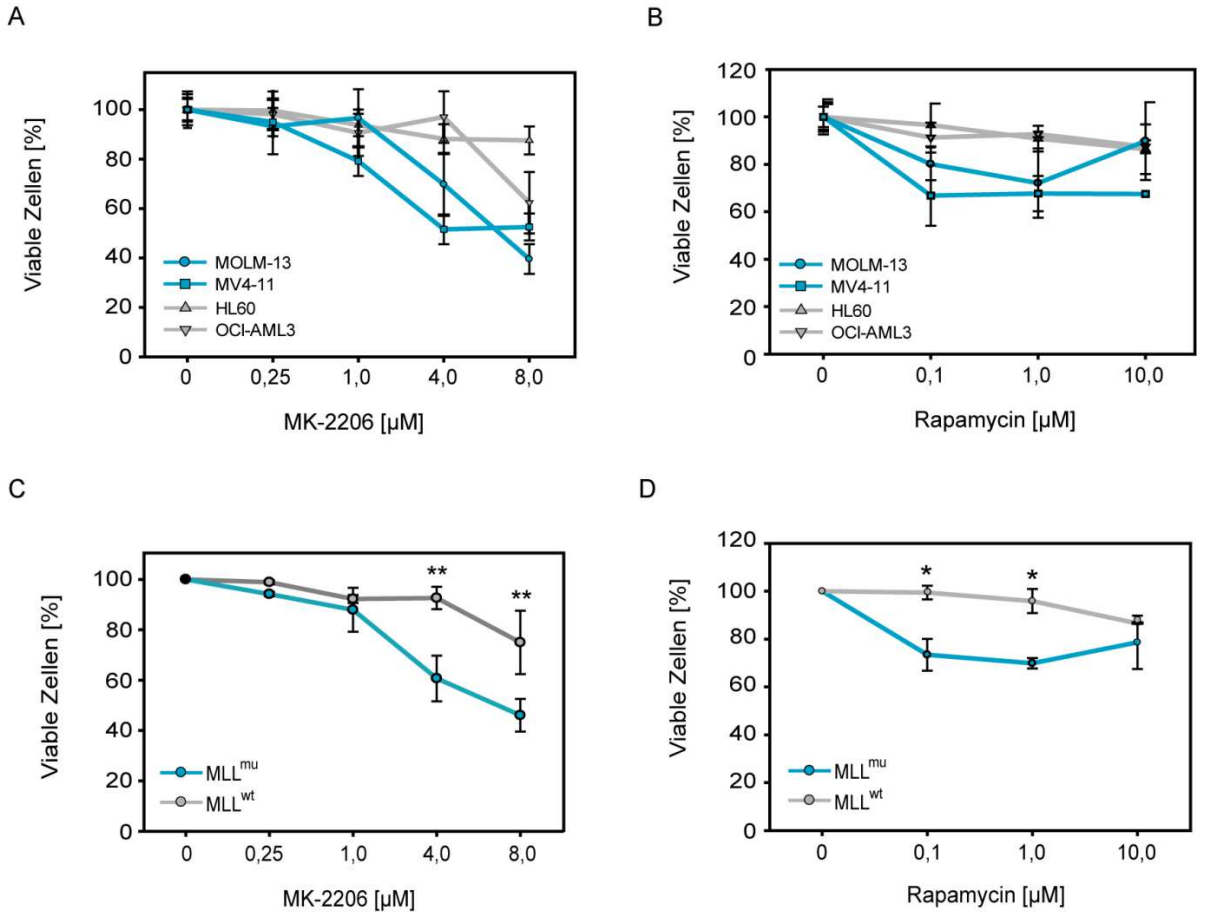


Abbildung 4-18 Proliferationsinhibition durch Behandlung mit MK-2206 bzw. Rapamycin. *Die Zelllinien wurden an Tag 0 ausgesät und über einen Zeitraum von 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen MK-2206 bzw. Rapamycin inkubiert. A)+B) Die Zahl viabler Zellen wurde über automatisierte Zellzählung unter Ausschluss von toten Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die unbehandelten Kontrollen wurden als 100% angegeben. C)+D) Die Werte der Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 bzw. OCI-AML und HL-60 wurden gemittelt. Statistische Signifikanzen wurden zwischen den beiden Kohorten MLL-mutiert und MLL-WT errechnet und angegeben. *p<0,05, **p<0,01.*

4.2.4. Korrelation zwischen Signalwegs- und Proliferationsinhibition in der *PI3K*-mutierten Brustkrebszelllinie MDA-MB-453

Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 trägt die *PIK3CA* H1047R Mutation, die einen konstitutiv aktivierten PI3K/AKT/mTOR-Signalweg zur Folge hat. Die Zelllinie wurde mit dem jeweiligen Inhibitor für einen Zeitraum von 6 Stunden kultiviert und anschließend die Aktivierung von AKT und der S6K über Ganzzelllysate und Immunblot-Analyse untersucht (Abbildung 4-19).

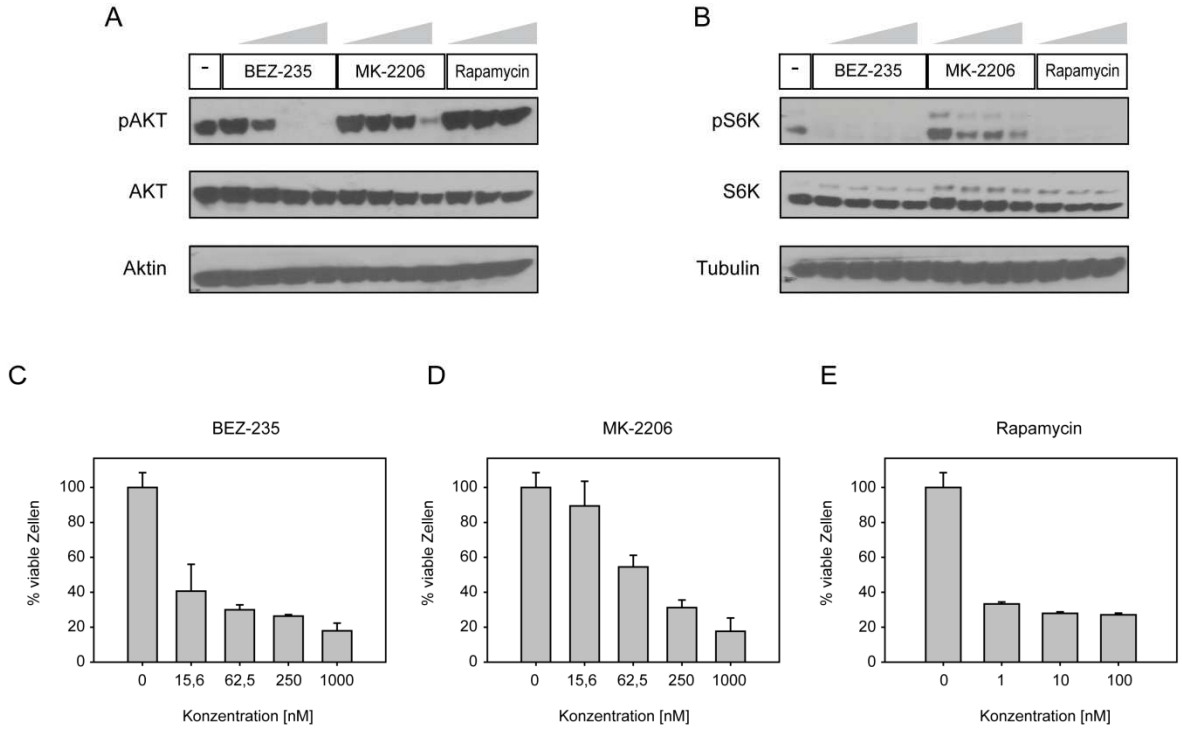


Abbildung 4-19 Konzentrationsabhängige Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 und deren Korrelation mit einem funktionellen Proliferationsversuch. *A)+B) Die Zellen wurden für 6 Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert Konzentrationen BEZ-235 und MK-2206: 15,6 nM, 62,5 nM, 250 nM und 1000 nM; Konzentrationen Rapamycin 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Aus den Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Aktivierung der Proteine AKT und S6K über Immunblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin bzw. Tubulin verwendet. C)+D)+E) Für den Proliferationversuch wurden die Zellen ausgesät und nach Adhärenz am darauffolgenden Tag für 5 Tage mit den Inhibitoren inkubiert. Die Zahl viabler Zellen wurde über automatisierte Zellzählung unter Ausschluss von toten Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die unbehandelten Kontrollen wurden als 100% angegeben.*

AKT war ab einer BEZ-235-Konzentration von 62,5 nM sichtbar und ab 250 nM vollständig dephosphoryliert. Der AKT-Inhibitor MK-2206 erreichte die vollständige AKT-Hemmung erst bei einer Konzentration von 1 µM. Rapamycin führte zu keiner

Dephosphorylierung von AKT, sondern erhöhte den Level an phosphorylierter AKT im Vergleich zu unbehandelten Zellen zusätzlich (Abbildung 4-19A). Die S6K konnte bereits bei BEZ-235-Konzentrationen von 62,5 nM vollständig dephosphoryliert und inaktiviert werden. MK-2206 bewirkte eine geringe aber keine vollständige Hemmung, auch nicht bei einer Konzentration von 1 µM. Rapamycin, der mTORC1-Inhibitor, hemmte die Phosphorylierung der S6K bereits bei einer Konzentration von 1 nM vollständig (Abbildung 4-19B). Um die Korrelation zwischen der Hemmung auf biochemischer Ebene und den phänotypischen Auswirkungen im Zellkontext zu untersuchen, wurden anschließend Proliferationsversuche mit gleichen Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 4-19C-E). Hierbei wurde keine direkte Korrelation zwischen der Hemmung von AKT und der Zellproliferation beobachtet. AKT zeigte sich bei einer BEZ-235-Konzentration von 15,6 nM noch immer deutlich stark phosphoryliert, die Proliferation der Zellen hingegen war jedoch schon um die Hälfte reduziert (Abbildung 4-19C). Weiterhin führte Rapamycin in keiner der gewählten Konzentrationen zu einer Dephosphorylierung von AKT, die Proliferation war jedoch trotzdem stark inhibiert. Eine Korrelation zwischen biochemischer Inhibition des Proteins und dem direkten zellphänotypischen Korrelat konnte im Fall der S6K beobachtet werden. BEZ-235 dephosphorylierte die S6K in allen Konzentrationen vollständig, auch die Proliferation reduzierte sich bereits nach Inkubation mit der niedrigsten Konzentration von 15,6 nM um 50%. Eine Hemmung der S6K erfolgte erst bei einer MK-2206-Konzentration von 62,5 nM und auch die Proliferation war erst ab dieser Konzentration signifikant reduziert. Rapamycin erreichte mit einer Konzentration von 1 nM eine komplette Dephosphorylierung, auch die Proliferation war bei dieser Konzentration bereits um ca. 75% gehemmt.

4.3. Wirkung der PI3K/mTOR-Inhibition auf eine *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierte Zelllinie (MLL-ENL ICs)

4.3.1. Etablierung der Zelllinie

Vorläuferzellen aus dem murinen Knochenmark können über retrovirale Transduktion von *MLL-ENL* cDNA in eine immortalisierte Zelllinie transfomiert werden. Die Zellen stammten aus dem 5-FU mobilisierten Knochenmark von C57BL/6 Mäusen und wurden retroviral infiziert. Anschließend wurde ein Transformationstest mittels Replattierung durchgeführt. Zellen, die durch das eingebrachte Fusionsgen transformiert sind, werden migrationsdefizient, behalten ihr Selbsterneuerungspotenzial und bilden in semisolidem Methylzellulose-Medium Kolonien aus. Nicht transformierte Zellen verlieren diese Fähigkeit und beginnen, sich auszudifferenzieren und zu sterben. Diese Selektion erfolgt gewöhnlich bereits nach drei Replattierungen in Methylzellulose-Medium.

4.3.1.1. Transformation der Zellen

In Abbildung 4-20 ist gezeigt, dass die murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen, die das Konstrukt *MLL-ENL* aufgenommen hatten, erfolgreich transformiert wurden. Ihr Selbsterneuerungspotenzial blieb über drei Replattierungen erhalten und die Anzahl an Kolonien erhöhte sich während der Replattierungsrunden. Zellen, die hingegen den Leervektor ohne Fusionsgen integrierten, verloren ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und bildeten nach drei Runden keine Kolonien in der Methylzellulose mehr aus. Die Anzahl an Kolonien nahm über die Replattierungsrunden hinweg ab. In der ersten Plattierung wurde dem Methylzellulose-Medium G418 zugesetzt. Die positiv infizierten Zellen verloren durch das integrierte Neomycin-Resistenzgen ihre Empfindlichkeit und die uninfizierten Zellen starben durch G418-Zugabe. Die Kolonienanzahl der mit Leervektor infizierten Zellen war in der ersten Ausplattierung deutlich höher als die der Zellen mit Fusionsgen. Die Transfektionseffizienz lag hier um ein sechsfaches höher (298 Kolonien vs. 47 Kolonien), war aber mit ca. 1,5% positiven Zellen insgesamt sehr niedrig.

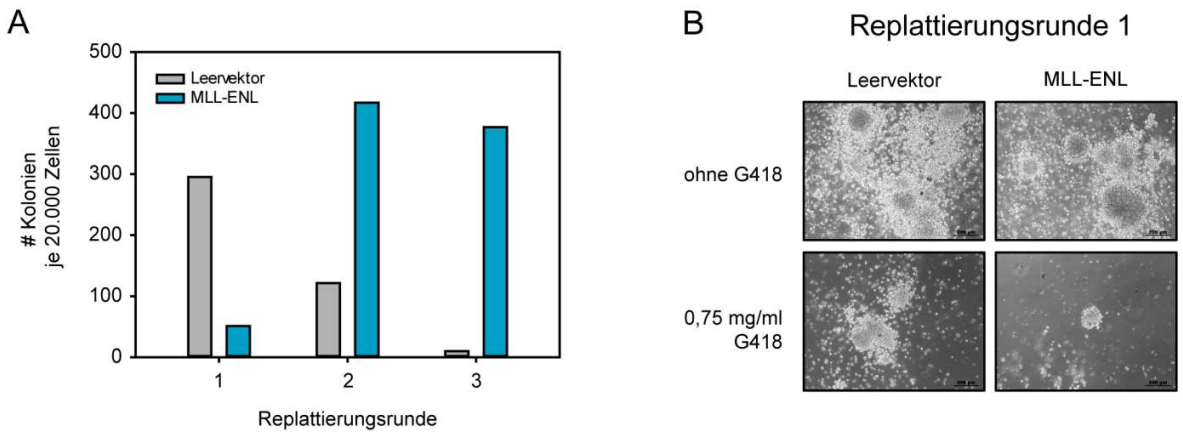


Abbildung 4-20 Transformierendes Potenzial von MLL-ENL in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen. *A) Je 20.000 Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Leervektor (grau) bzw. der MLL-ENL cDNA (blau) in Methylzellulose ausplattiert. Nach 5 Tagen wurden die Anzahl an Kolonien gezählt, die Zellen isoliert und erneut 20.000 Zellen ausplattiert. B) In der ersten Ausplattierung wurde dem Medium G418 als Selektionsmedium zugegeben. Zur Kontrolle wurden je Konstrukt auch Zellen ohne G418 ausplattiert. Gezeigt sind Mikroskopieaufnahmen von Platten mit und ohne G418 im Vergleich. Vergrößerung 10x.*

4.3.1.2. *MLL-ENL*-Expressionsnachweis

Zum Nachweis der *MLL-ENL*-Expression in den immortalisierten Zellen wurden Primer so ausgewählt, dass sie die Bruchpunkt-Region der beiden Gene *MLL* und *ENL* umspannen. Nur im Fall einer vorliegenden Translokation kann in einer PCR ein Amplifikationsprodukt entstehen. Als Positivkontrolle wurde die Plasmid-DNA $pMSCV_{neo}$ -MLL-ENL amplifiziert und im Gel aufgetragen (Abbildung 4-21).

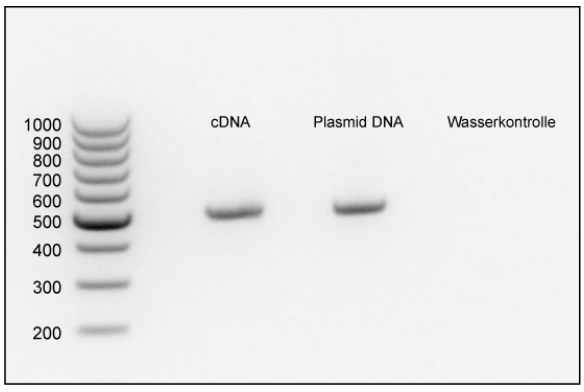


Abbildung 4-21 Expressionsnachweis MLL-ENL in transduzierten Zellen. *Aus transduzierten Zellen wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nach Amplifikation durch PCR mit MLL-ENL spezifischen Primern wurde das Amplifikat in einem Agarosegel aufgetragen und nach Auftrennung fotographiert. Als Positivkontrolle diente die Plasmid-DNA des $pMSCV_{neo}$-MLL-ENL. Spalte 1: 100 bp DNA-Größenmarker, Spalte 2: cDNA der MLL-ENL Zellen, Spalte 3: Plasmid DNA, Spalte 4: Wasserkontrolle der PCR.*

4.3.1.3. Expression der beschriebenen Oberflächenmarker

Murine hämatopoetische Vorläuferzellen, die mit *MLL-ENL* transfomiert werden, zeichnen sich durch die Expression von Oberflächenmarker wie cKIT aus. Um zu überprüfen, ob es sich um erfolgreich transformierte Zellen handelt, wurde die Expression der Oberflächenmarker cKIT, Mac1 und B220 mittels FACS überprüft. Hierzu wurden sowohl die eigens transduzierten Zellen gemessen (Abbildung 4-22A) als auch Zellen, die im Labor von Prof. Slany (Lehrstuhl für Genetik, Universität Erlangen) hergestellt und als Positivkontrolle zur Verfügung gestellt wurden (Abbildung 4-22B). In beiden Zelllinien war sowohl die beschriebene Expression von Mac1, einem Marker für myeloische Zellen (besonders Monozyten) als auch die Expression von cKIT, einem Marker für primitive Zellen, auf der Zelloberfläche nachweisbar. Die Expression von B220, einem Marker für B-Zellen ist nicht beschrieben und konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden.

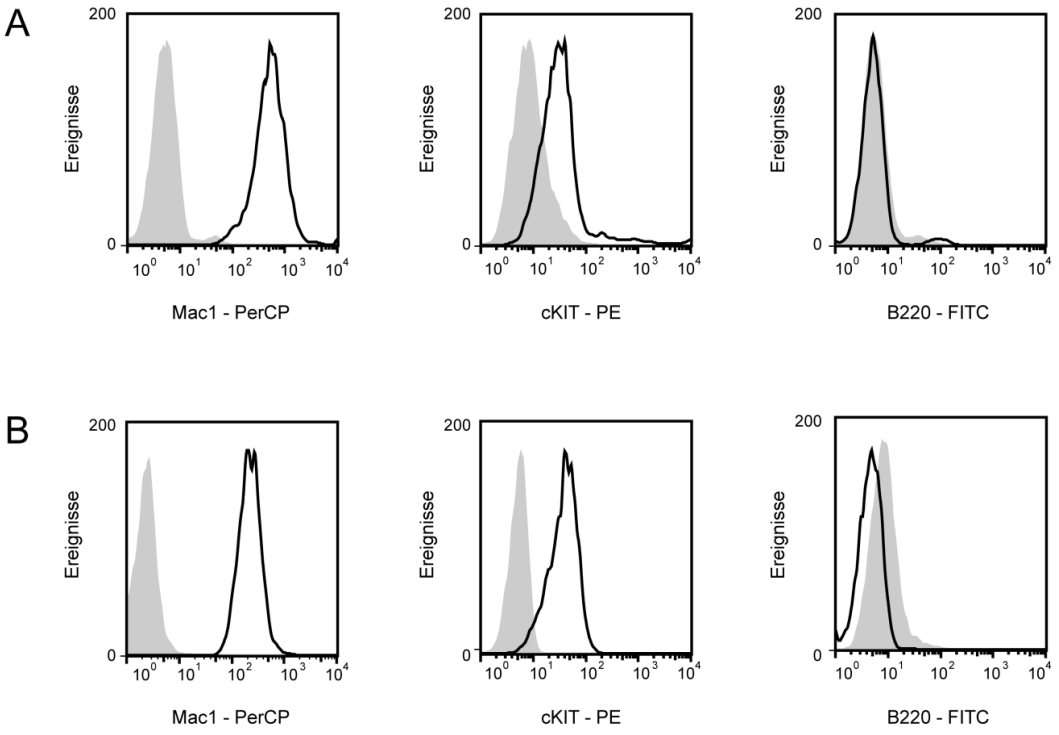


Abbildung 4-22 Expression der Oberflächenmarker cKIT, Mac1 und B220 auf MLL-ENL transduzierten Zellen. *A) Expression auf eigens transduzierten Zellen B) Expression auf Zellen, die im Labor von Prof. Slany transduziert und zum Vergleich zur Verfügung gestellt wurden. In grau dargestellt ist die Isotypkontrolle. Gezeigt ist eine repräsentative Messung von drei unabhängigen Messungen.*

4.3.2. Sensitivität der *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierten Zelllinie gegenüber der PI3K/AKT/mTOR-Inhibition

Als zusätzliches Zellmodell wurde eine murine Zelllinie generiert, die durch die Expression des Onkogens *MLL-ENL* transformiert und immortalisiert wurde. Dadurch sollte die Wirkung einer PI3K/AKT/mTOR-Inhibition isolierter auf die *MLL-ENL* transformierten AML-Zelllinien untersucht werden. Die humanen *MLL*-mutierten Zelllinien wiesen alle noch zusätzliche Mutationen im RTK-Signalweg auf und eine Trennung war daher schwer möglich. Die Behandlung mit den drei ausgewählten Inhibitoren wurde durch einen Test auf Selbsterneuerungspotenzial in Methylzellulose-Medium, in einem Apoptose-Assay und einem Proliferations-Assay untersucht.

4.3.2.1. Analyse des Selbsterneuerungspotenzials

Um das Selbsterneuerungspotenzial von Zellen zu testen, wurde ein sogenannter ΔCFC(*colony-forming cells*)-Test durchgeführt (Abbildung 4-23). Es ist bei diesem Versuch möglich, die Substanzen homogen im Medium zu lösen und mit den Zellen auszuplattieren. Nach fünf Tagen wurde gezählt, wie viele Kolonien sich aus den ausplattierten Zellen ausgebildet hatten. Von 10.000 Zellen, die ohne Behandlung kultiviert wurden, bildeten 1.270 Zellen neue Kolonien aus. War dem Medium zusätzlich BEZ-235 zugesetzt, kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Kolonienzahl. Diese war bereits ab einer Konzentration von 62,5 nM signifikant. Bei einer Konzentration von 1 µM bildete sich keine Kolonie aus. Wurde dem Medium und den Zellen der AKT-Inhibitor MK-2206 zugesetzt, bildeten sich bei allen gewählten Konzentrationen noch immer Kolonien aus den Zellen aus. Lediglich bei der höchsten Konzentration von 1 µM war eine signifikante Reduktion auf 822 Kolonien zu beobachten. Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin reduzierte das Selbsterneuerungspotenzial der Zellen konzentrationsabhängig. Eine Konzentration von 100 nM reduzierte die Anzahl der Kolonien von 1.270 auf 792 Kolonien. Eine weitere Konzentrationserhöhung reduzierte die Zahl zunehmend auf 296 Kolonien bei einer Konzentration von 10 µM.

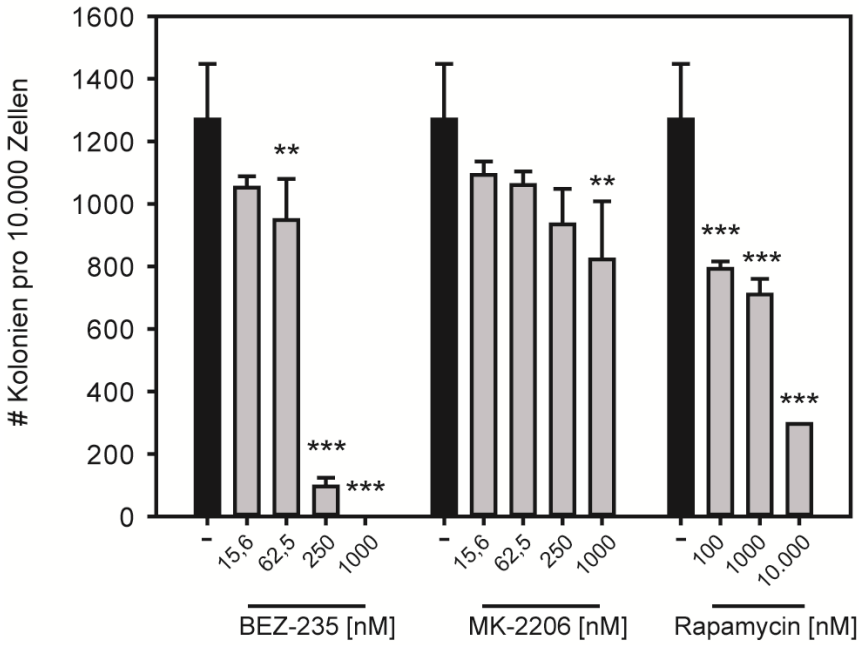


Abbildung 4-23 Reduziertes Selbsterneuerunsgpotenzial in murinen MLL-ENL-immmortalisierten Zellen durch PI3K/AKT/mTOR-Inhibition. *Pro Ansatz wurden 10.000 Zellen in Zytokin-haltigem Methylzellulose-Medium ausplattiert und die Anzahl der Kolonien nach 5 d unter dem Mikroskop gezählt. Dem Medium war entweder DMSO (Kontrollen: -) oder die jeweilige Substanz in aufsteigenden Konzentrationen zugesetzt. Es wurden pro Versuch immer Dupletts angesetzt und der Mittelwert aus diesen gebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.*

4.3.2.2. Apoptose-Induktion und Wachstumsinhibition

Analog zu den Versuchen mit humanen myeloischen Zelllinien wurden die Apoptose-Induktion und die Proliferationsinhibition durch BEZ-235-Behandlung auch in den murinen Zelllinien untersucht (Abbildung 4-24). Zur Induktion von Apoptose waren in den murinen Zelllinien weitaus geringere Konzentrationen nötig. Ab 31,2 nM BEZ-235 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der spezifischen Apoptose. Das Wachstum war auch hier in einer geringeren Konzentration inhibiert, signifikant war die Inhibition bereits in einer Konzentration von 7,8 nM. Die hergestellten murinen *MLL-ENL*$^{+}$-ICs wachsen nur in Anwesenheit von Interleukin-3 (IL-3). Da der Rezeptor für IL-3 ebenfalls die PI3K-Signalkaskade aktiviert, könnten diese Effekte nicht ausschließlich auf die *MLL-Rearrangement*$^{+}$-Leukämie zurückzuführen sein, sondern auch auf deren IL-3-Abhängigkeit. Daher wurden die Proliferations- und die Apoptoseversuche mit nativen Ba/F3-Zellen wiederholt. Bei dieser Zelllinie handelte es sich ebenfalls

um eine murine Zelllinie hämatopoetischen Ursprungs, die in Abhängigkeit von IL-3 wächst. Die Ergebnisse wurden untereinander verglichen, um mögliche Effekte der IL-3-Rezeptor-Hemmung zu identifizieren (Abbildung 4-24).

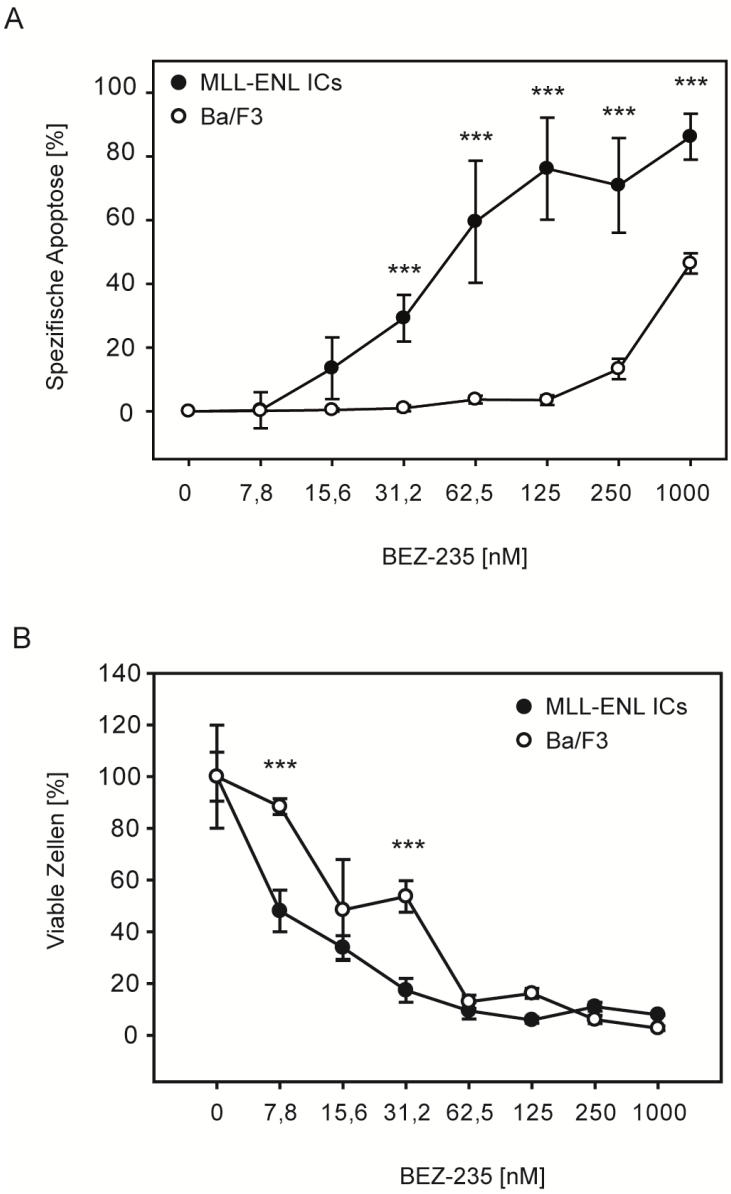


Abbildung 4-24 Wachstumsinhibition und Apoptose-Induktion durch BEZ-235 in MLL-ENL ICs im Vergleich zu nativen Ba/F3-Zellen. *Die Zelllinien wurden an Tag 0 ausgesät und über einen Zeitraum von 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen BEZ-235 inkubiert. A) Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels FACS Analyse bestimmt und deren statistische Signifikanz im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. B) Die Zahl viabler Zellen wurde über automatisierte Zellzählung unter Ausschluss von toten Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die unbehandelten Kontrollen wurden als 100% angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standard-fehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. **p<0,01, ***p<0,001.*

Während die Proliferation in beiden Zelllinien ähnlich stark durch BEZ-235 inhibiert wurde, konnten erhebliche Unterschiede in der Apoptose-Induktion festgestellt werden (Abbildung 4-24). BEZ-235 führte in nativen Ba/F3 Zellen erst ab einer Konzentration von 1000 nM zu einer signifikanten Apoptose-Induktion. Die MLL-ENL$^+$-ICs hingegen zeigten eine deutlich konzentrationsabhängige Induktion von Apoptose, die bei 31,2 nM signifikant höher lag als in den unbehandelten Zellen.

4.4. *In vivo*-Therapiemodell

Die duale Inhibition der PI3K und des mTORC1/2 zeigte in primären AML-Patientenproben und in murinen sowie humanen myeloischen Leukämiezelllinien eine Apoptose-induzierende und Proliferations-inhibierende Wirkungsweise. Daher sollte die Effizienz dieser Substanz auch *in vivo* getestet werden. Hierzu wurde ein AML-Xenograft-Mausmodell verwendet. Bei diesem Modell wurden immunsupprimierten NSG-Mäusen humane Leukämiezellen (MOLM-13; MLL-AF9$^+$/FLT3-ITD$^+$) intravenös appliziert. Diese wuchsen im Knochenmark an und verbreiteten sich bei zunehmender Erkrankung auch im peripheren Blut und Organen wie der Milz und der Leber analog zur Leukämie im Menschen. Die folgenden *in vivo* Arbeiten fanden in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Irmela Jeremias (Helmholtz Zentrum München) statt. Das Mausmodell wurde in ihrer Arbeitsgruppe etabliert und als Therapiemodell zur Verfügung gestellt.

4.4.1. Modelletablierung und Versuchsplan

Um die Zellen im lebenden Tier beobachten und *ex vivo* von murinen Zellen unterscheiden zu können, wurden diese über lentivirale Transduktion mit einem Konstrukt transfiziert, das die cDNA zur Kodierung für *green fluorescent protein* (GFP) und *enhanced firefly luciferase* (eFF Luc) trägt. Dadurch ist sowohl der Nachweis *ex vivo* über *GFP* mittels Durchflusszytometrie durchführbar als auch der Nachweis der Zellen im lebenden Tier über Biolumineszenz-Bildgebungsverfahren. Abbildung 4-25 zeigt den Nachweis der *GFP*-Expression in den transgenen MOLM-13 Zellen vor der Injektion in die Mäuse. Trotz zweimaliger Sortierung waren nicht 100% der Zellen *GFP*$^+$, jedoch mit über 87% der Großteil der Zellen.

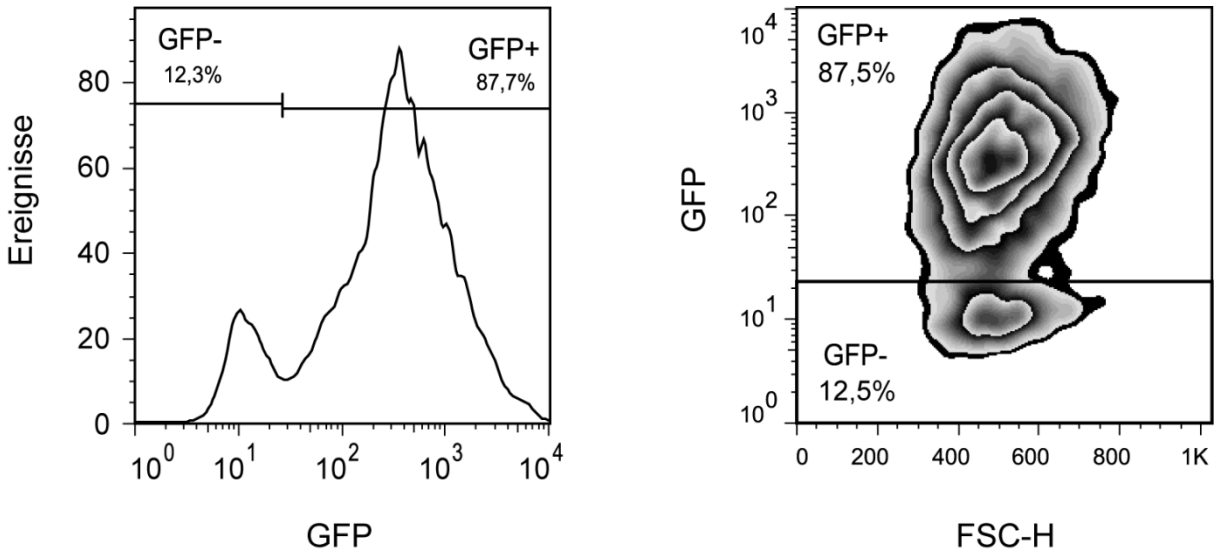


Abbildung 4-25 GFP-Expression in MOLM-13 Zellen. *Nach lentiviraler Transduktion wurde die Expression von GFP mittels Durchflusszytometrie überprüft. Gezeigt ist die Messung am Tag der Zellinjektion in NSG-Mäuse.*

Unter Verwendung dieses Modells wurde ein Therapieversuch erarbeitet. Insgesamt wurden 24 Mäuse verwendet, die zu je acht Tieren in drei Versuchsgruppen (Vehikel, BEZ-235 und Kontrollsubstanz AC220) unterteilt wurden. Abbildung 4-26 zeigt ein Schema des *in vivo* Versuches mit Hervorhebung der wichtigsten Zeitpunkte.

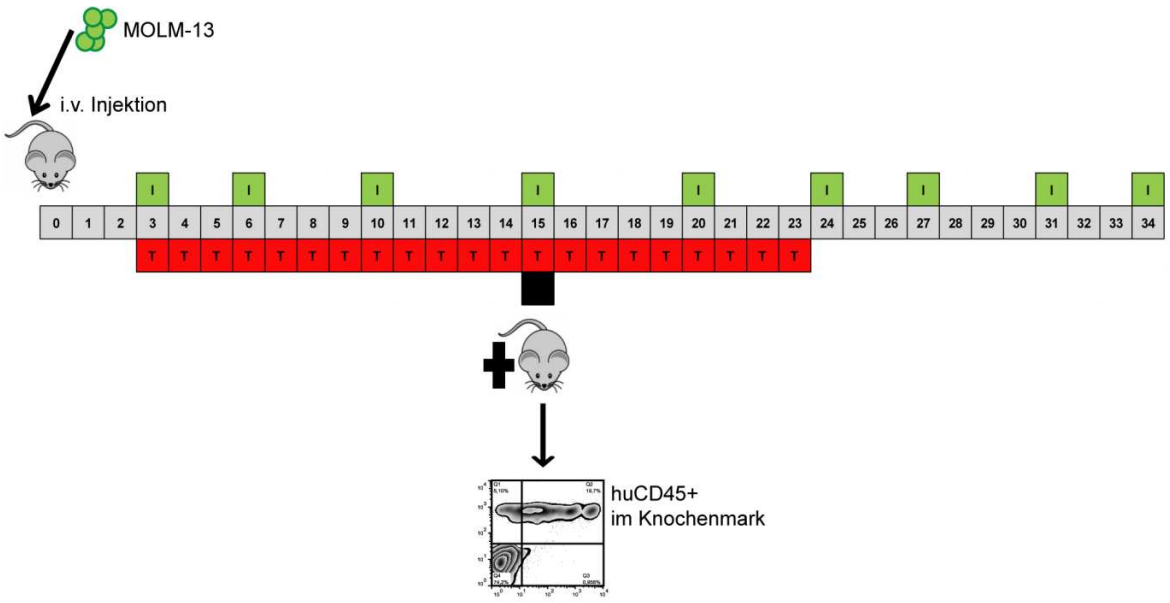


Abbildung 4-26 Schema des in vivo Therapieversuchs. *Am Tag 0 wurden die Zellen in insgesamt 24 Mäuse injiziert. Nach drei Tagen wurden die Mäuse zum ersten Mal einer Messung ihres Biolumineszenzsignals unterzogen, dem sogenannten „Imagen" (englisch; I). An Tag drei nach Injektion der Zellen begann die 21-tägige Therapie mit den Inhibitoren bzw. Vehikelsubstanz (T). Zehn Tage nach Injektion wurden aus jeder Gruppe zwei Tiere getötet und ex vivo im FACS die Infiltration mit humanen Zellen im Knochenmark gemessen.*

Während des gesamten Versuches wurde der Zustand jedes einzelnen Tieres nach den aufgeführten Kriterien beurteilt (Tabelle 4-5). Die Tiere wurden im Fall von Schmerzen oder besonderen Auffälligkeiten unter Narkose getötet, um das Leid für die Tiere zu minimieren.

Tabelle 4-5 Abbruchkriterien *Für jedes Kriterium gab es entsprechend dessen Ausprägung Punkte. Bei Erreichen von 2 Punkten wurde der Versuch für das Tier abgebrochen. P:Punkt*

Kriterium/Ausprägung	Nicht vorhanden	Mittel	Hoch
Gewichtsverlust	<10%: **0 P.**	10%< x <15%: **0,5 P.**	>15%: **2 P.**
Allgemeinzustand	Normal: **0 P.**	Beeinträchtigt:**0,5 P.**	Deutlich beeinträchtigt: **2 P.**
Futter- bzw. Wasseraufnahme	Normal: **0 P.**	Normal: **0 P.**	Beeinträchtigt: **2 P.**
Infektion	Keine: **0 P.**	Keine: **0 P.**	Vorhanden: **1 P.**
Konjunktivitis	Keine: **0 P.**	Gering: **0,5 P.**	Deutlich: **1 P.**
Fell	Normal: **0 P.**	Struppig: **1 P.**	entfällt
Neurologische Auffälligkeiten	Keine: **0 P.**	Gering: **0,5 P.**	Deutlich: **2 P.**
Bauchumfang	Normal: **0 P.**	Gering vergrößert **1 P.**	Stark vergrößert **2 P.**

4.4.2. Leukämie-Entwicklung in Xenograft-Mäusen

Um die Aussagekraft der Unterschiede in der Biolumineszenz und der Penetration durch humane Zellen zu validieren, war es wichtig, dass die Ausgangssignale und die Ausgangsverfassung der Tiere zwischen den Gruppen vergleichbar waren. Hierzu wurden drei Tage nach Injektion der Zellen das Gewicht der Tiere sowie das Biolumineszenz-Signal verglichen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen (Abbildung 4-27).

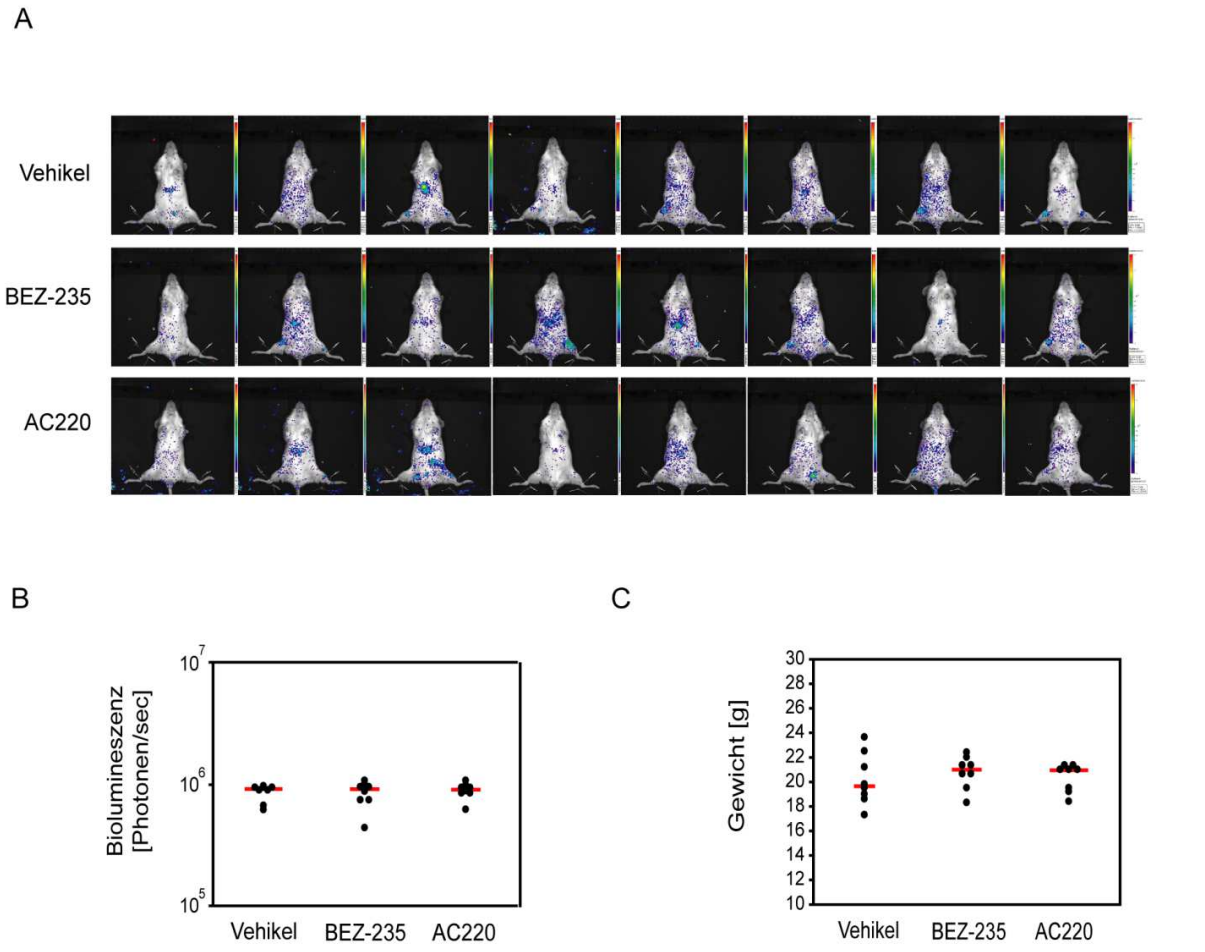


Abbildung 4-27 Biolumineszenzsignal und Gewicht in den Therapiegruppen zum Start der Therapie an Tag drei nach Injektion (3 dpi). *A) Biolumineszenzaufnahmen aller 24 Tiere drei Tage nach Injektion. B) Quantifizierung des Biolumineszenzsignals und Vergleich zwischen den drei Therapiegruppen. Der rote Balken stellt den Median der jeweiligen Gruppe dar. C) Das Gewicht aller 24 Tiere mit Anzeigen des Medians durch einen roten Balken.*

4.4.3. Leukämieausbreitung während der Therapie

Am dritten Tag nach Injektion der Zellen begann die Therapie der Mäuse. Die Substanzen wurden einmal täglich direkt nach Lösen der Substanzen oral über eine Knopfsonde verabreicht. Dies geschah über einen Zeitraum von 21 Tagen ohne Unterbrechung.

4.4.3.1. *In vivo*-Monitoring

Um die Ausbreitung der humanen Zellen in der Maus zu beobachten, wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen (siehe Abbildung 4-26) einer Messung ihres Biolumineszenz-Signals unterzogen. In Abbildung 4-28 sind die Aufnahmen eines repräsentativen Tieres je Gruppe gezeigt.

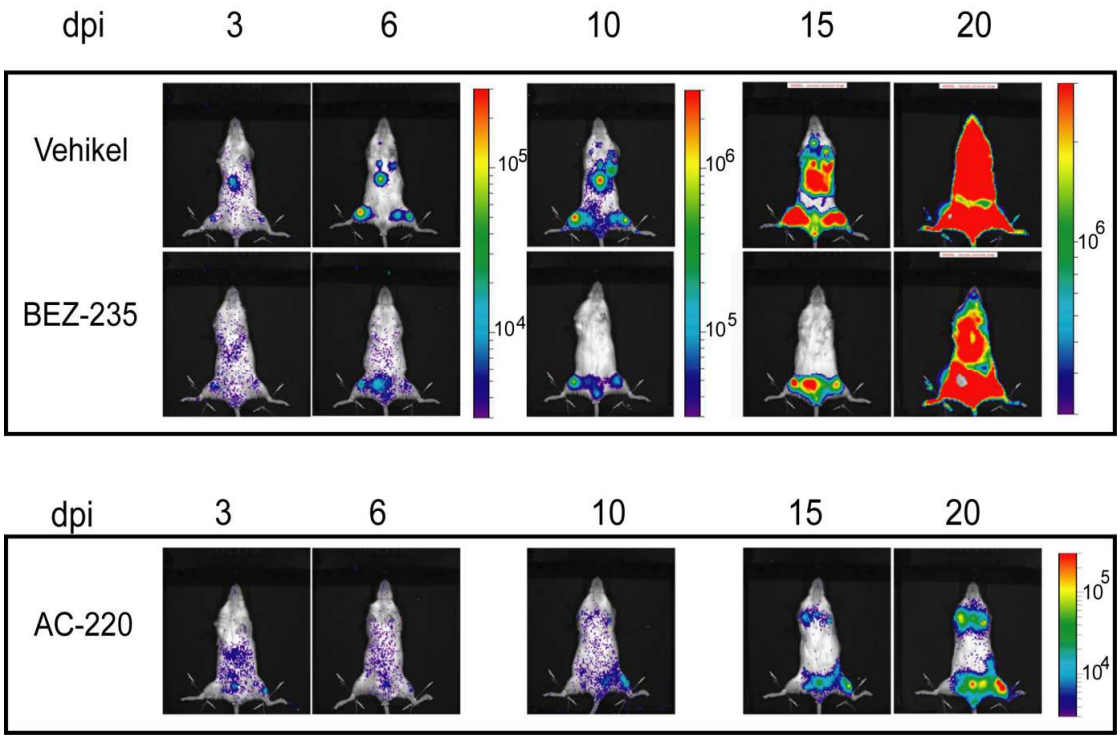


Abbildung 4-28 Leukämieausbreitung in behandelten Mäusen. *Das Biolumineszenzsignal der Tiere wurde in regelmäßigen Abständen abgebildet. Dargestellt sind die Aufnahmen von je einem repräsentativen Tier aus jeder Gruppe an verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion der Zellen. Zu beachten sind die Skalen, die sich in der Vehikel- und BEZ235-behandelten Gruppe ändern, nicht jedoch in der AC220-Gruppe. dpi: Tage nach Injektion (englisch: days post injection).*

In der Vehikelgruppe war eine deutlich schnellere Ausbreitung der Leukämiezellen in den Mäusen zu beobachten. Die Therapie mit BEZ-235 verlangsamte das Wachstum der Zellen, war jedoch nicht in der Lage, dieses komplett aufzuhalten oder die entstandene Tumorlast zu reduzieren. In den Anfangsphasen der Therapie war der Unterschied im Biolumineszenzsignal signifikant (Abbildung 4-29 A). Im weiteren Verlauf glichen sich die Signale jedoch an. Die Kontrollsubstanz dieses Versuchs war der FLT3-Inhibitor AC220. Von diesem war bereits eine hohe *in vivo* Aktivität für die gewählte Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht in diesem Modell beschrieben [79]. Die Substanz diente hier als wichtige Positivkontrolle für die Verabreichungsmethode. AC220 hatte wie erwartet in diesem Modell eine sehr hohe Effizienz. Das Tumorwachstum zeigte sich deutlich verlangsamt, wenn auch für diese Substanz keine komplette Stabilisation oder eine Regression zu verzeichnen war.

4.4.3.2. Quantifizierung der Tumorlast

Eine weitere Möglichkeit die Tumorlast der Mäuse zu quantifizieren, stellte die Ermittlung der humanen Zellen im murinen Knochenmark dar. Diese konnten durch ihre *GFP*-Expression und durch ihre Expression von humanem CD45 (huCD45) von murinen Zellen unterschieden werden (Abbildung 4-29). Fünfzehn Tage nach Injektion der Zellen wurden aus jeder Gruppe zwei Mäuse abgetötet, deren Knochenmark isoliert und die Zellen mit einem CD45-Antikörper markiert. Im FACS konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz humaner Zellen im Knochenmark von Vehikel-behandelten Mäusen am Höchsten war. Eine der beiden Mäuse verfügte zu dem Zeitpunkt schon über 24,8% huCD45$^+$ Zellen im Knochenmark. Die beiden BEZ-235-behandelten Tiere zeigten eine deutlich niedrigere Infiltration mit Werten von 3,5% und 4,7% humanen Zellen. Die Infiltrationsraten der AC220-behandelten Mäuse betrugen lediglich 0,3% und 1,3%.

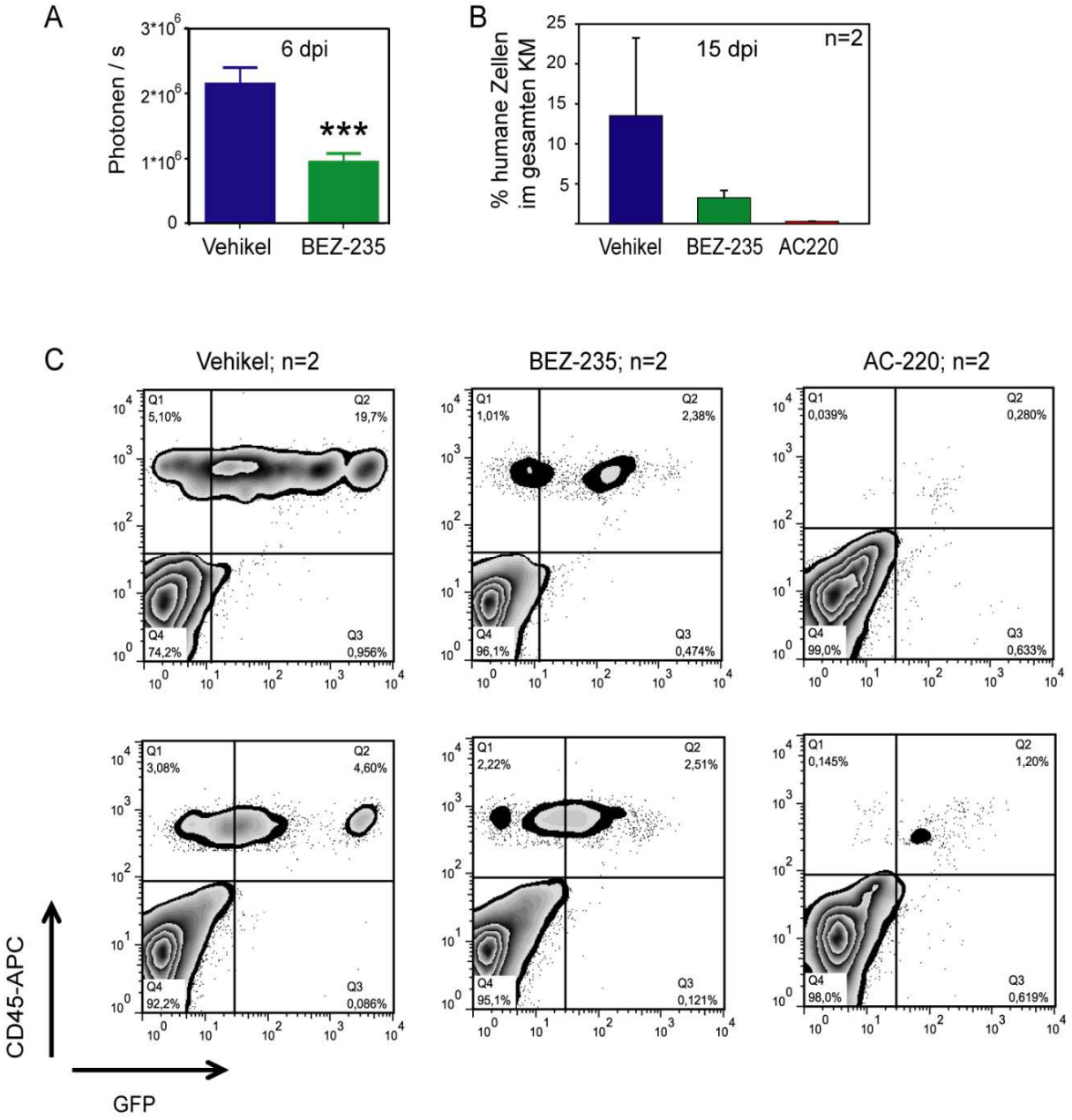


Abbildung 4-29 Infiltration des murinen Knochenmark durch humane Zellen. *A) Quantifizierung der Biolumineszenzsignale am sechsten Tag nach Injektion (6 dpi) in der Vehikel-behandelten und in der BEZ-235-behandelten Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aller Tiere. ***p<0,001 B)+C) 15 Tage nach Injektion (15 dpi) wurden je Gruppe zwei Tiere ex vivo auf den Prozentsatz humaner Zellen untersucht. Hierzu wurde das Knochenmark mit einem Antikörper gegen humanes CD45 gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je zwei Tieren (B) bzw. die FACS-Profile jedes analysierten Tieres (C).*

Aufgrund der reduzierten Tumorlast und der verzögerten Ausbreitung der humanen Zellen, lebten die mit BEZ-235- und AC220-behandelten Tiere signifikant länger als die Tiere, die nur die Vehikelsubstanz erhielten. Dies ist dem Kaplan-Meier-Plot in

Abbildung 4-30 zu entnehmen. Dargestellt sind nur die Tiere, die an den Folgen der Leukämie erkrankten und daraufhin nach den in Tabelle 4-5 dargelegten Kriterien abgetötet werden mussten.

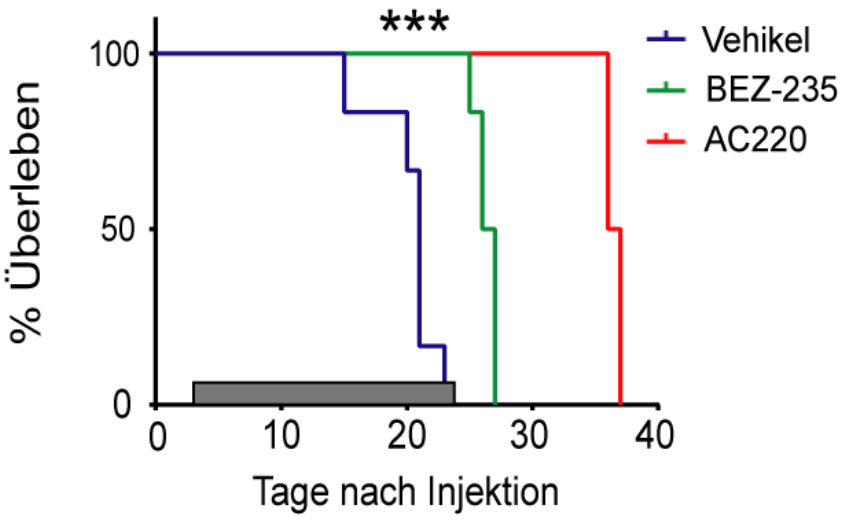


Abbildung 4-30 Kaplan-Meier-Plot zur Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere im Therapieversuch. *Dargestellt sind die Überlebenskurven der drei Behandlungsgruppen. Tiere, die nicht an den Folgen der Leukämie gestorben sind, sind nicht dargestellt (n=20). Der graue Balken weist auf die Behandlungszeit von 21 Tagen hin.*

4.4.4. Inhibition des Signalwegs *in vivo*

Um zu zeigen, dass die Substanz BEZ-235 *in vivo* die Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs inhibiert, wurden sechs Mäusen erneut Zellen injiziert und nach angewachsener Leukämie mittels FACS-Färbung die MFI Ratio von P-S6rp, einem Zielprotein von BEZ-235, ermittelt. Zwei Mäuse wurden nicht therapiert, vier Mäusen wurde je 6 Stunden bzw. 24 Stunden vor der Knochenmarkisolierung, 45 mg/kg BEZ-235 oral verabreicht (Abbildung 4-31). Der P-S6rp MFI Ratio der nicht behandelten Tiere wurde als Vergleichsmaßstab mit 100% angegeben, die Ratio der behandelten Tiere wurden dazu in Prozent angegeben. Sechs Stunden nach der Gabe von BEZ-235 reduzierte sich die Phosphorylierungsintensität von S6rp um ca. 50% der basalen Intensität. Weitere 18 Stunden später erreichte die Intensität jedoch sogar deutlich mehr als das Ausgangsniveau. Es scheint zu einem kompensatorischen Mechanismus gegen die Inhibition der PI3K und des mTORC1/2

gekommen zu sein. Eine Verabreichung der Substanz alle 24 Stunden war daher minimal erforderlich. Die Therapieeffekte könnten durch häufigere Gaben eventuell erhöht werden. Jedoch war die Art der Verabreichung für die Tiere ein großer Stressfaktor und es wurde daher auf einen Wiederholungsversuch mit häufigeren Verabreichungen verzichtet.

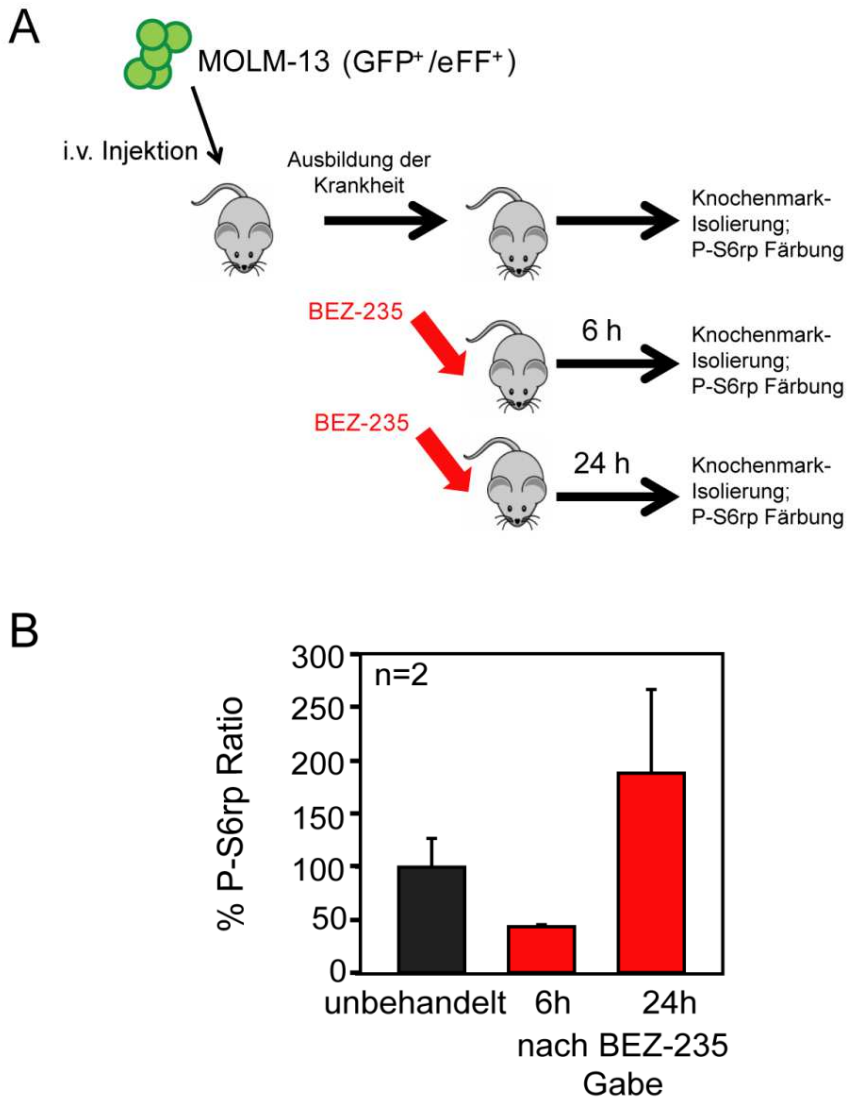


Abbildung 4-31 Nachweis der inhibitorischen Aktivität von BEZ-235 im murinen Knochenmark. *A) Dargestellt ist das Versuchsschema. Hierbei wurden je vier Mäuse mit angewachsener Leukämie mit BEZ-235 behandelt und 6 Stunden bzw. 24 Stunden nach Behandlung das Knochenmark isoliert und eine Färbung gegen P-S6rp durchgeführt. Zwei Kontrolltiere wurden nicht behandelt. B) Dargestellt sind die Mittelwerte aus den beiden Tieren mit Standardabweichung. Die P-S6rp MFI-Ratio der Kontrolltiere wurde 100% gesetzt und die MFI-Ratio der behandelten Tiere im Vergleich dazu angegeben. h: Stunde, i.v.: intravenös.*

4.4.5. Veträglichkeit der Therapie

Substanzen, die als Therapeutikum entwickelt werden, dürfen Nebenwirkungen haben. Diese sollten jedoch den Nutzen des Therapeutikums und dessen Einsetzbarkeit nicht zu sehr beschränken. In der Medikamentenentwicklung wird daher die maximal tolerierbare Dosis gesucht. Für den Therapieversuch mit Xenograft-Mäusen wurden Konzentrationen gewählt, die für die jeweilige Substanz in der Literatur bereits beschrieben wurden [79, 143-145]. In diesem Modell wurde die Verträglichkeit bzw. die Tolerierbarkeit der Dosis anhand des Gewichtes und des Allgemeinzustandes der Tiere beobachtet. Ein Gewichtsverlust von weniger als 10% des Gesamtgewichts wurde als tolerierbar eingestuft. In Abbildung 4-32 sind die Gewichtsverläufe der drei Therapiegruppen dargestellt. In keiner der Gruppen kam es zu Gewichtsverlusten von mehr als 10% während des Therapiezeitraumes.

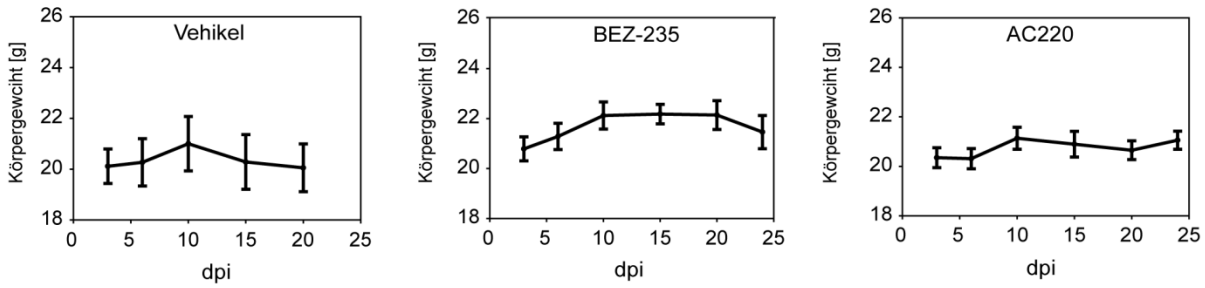


Abbildung 4-32 Gewichtsentwicklung der drei Therapiegruppen während des Versuchs. *Das Gewicht der Tiere wurde regelmäßig erhoben und über den Zeitraum des Versuchs beobachtet. Dargestellt dpi: Tage nach Injektion.*

Während des Behandlungszeitraums verstarben insgesamt vier Mäuse an den Folgen der Verabreichung bzw. an Nebenwirkungen der Substanzen. Hierbei handelte es sich um ein Tier aus der Vehikelgruppe, das unmittelbar nach der ersten Applikation aus unbekannter Ursache verstarb. Bei den anderen drei Tieren handelte es sich um Tiere aus der AC220-Gruppe. Diese Tiere wiesen unmittelbar nach der Luziferase-Verabreichung im Rahmen der *in vivo*-Bildgebung starke innere Blutungen auf. Beim Öffnen der Bauchdecke konnten große Blutmengen innerhalb des Bauchraumes dieser Tiere festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass diese Tiere durch die Nadel der Spritze im Bauchraum leicht verletzt wurden. Hierbei kam es zu einer Blutung, die sich wahrscheinlich aufgrund mangelhafter Blutgerinnung

nicht stoppen ließ und zum Tod der Tiere führte. In einer klinischen Studie zu AC220 in der AML ist verminderte Blutplättchenbildung, die sogenannte Thrombozytopenie, als eine Nebenwirkung dieser Substanz beschrieben. Die Thrombozytopenie könnte die gestörte Blutgerinnung der Tiere erklären und es würde sich demzufolge um eine Nebenwirkung der Substanz AC220 handeln. In der Gruppe der BEZ-235 behandelten Tiere verstarb kein Tier an Nebenwirkungen oder Folgen der Verabreichung.

4.5. Mögliche Erklärung für die hohe Sensitivität der *MLL*-mutierten AML

Bisher konnte keine direkte Erklärung für den Zusammenhang zwischen *MLL*-Rearrangements und Empfindlichkeit gegenüber PI3K/mTOR-Inhibition dargelegt werden. Daher sollten im Folgenden mögliche Mechanismen untersucht werden.

4.5.1. Expression des Transkriptionsfaktors Evi-1 in *MLL*-rearrangierten Patientenproben

Der Chromosomenbereich, in dem der Transkriptionsfaktor Evi-1 liegt, kann von chromosomalen Aberrationen betroffen sein. In diesem Bereich liegen häufig Inversionen und Translokationen vor, die dazu führen, dass Evi-1 in hohem Maße exprimiert wird. Ein beschriebenes Zielgen von Evi-1 ist die Phosphatase PTEN und dessen Promotorregion. Die Bindung von Evi-1 in diesem Bereich führt zu einer Repression der *PTEN*-Transkription und somit zur Aufhebung des negativ regulatorischen Einflusses der Phosphatase auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Daher wurde dessen Expression in 350 AML-Patienten mit unterschiedlichem zytogenetischem Hintergrund mittels Microarray analysiert. Dies erfolgte in Kooperation mit Dr. med. Tobias Herold. Das Expressionsniveau *MLL*-rearrangierter Patienten liegt signifikant höher als das der Patienten mit zytogenetisch normaler AML (CN-AML) ($p<0,001$) oder mit häufigen Aberrationen wie z.B. t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16) oder einer 5q-Deletion. Lediglich die Patienten mit inv(3) oder t(3;3) zeigten ein vergleichbar hohes Expressionsniveau ($p=0,12$ für Vergleich mit t(9;11)(p22;q23). Bei diesen handelt es sich um Patienten, die auf Chromosom 3 im Evi-Lokus Aberrationen aufweisen. Nicht alle *MLL*-rearrangierten Patienten wiesen

eine erhöhte Expression auf. Stattdessen konnten zwei Gruppen mit jeweils basaler und erhöhter Expression unterschieden werden.

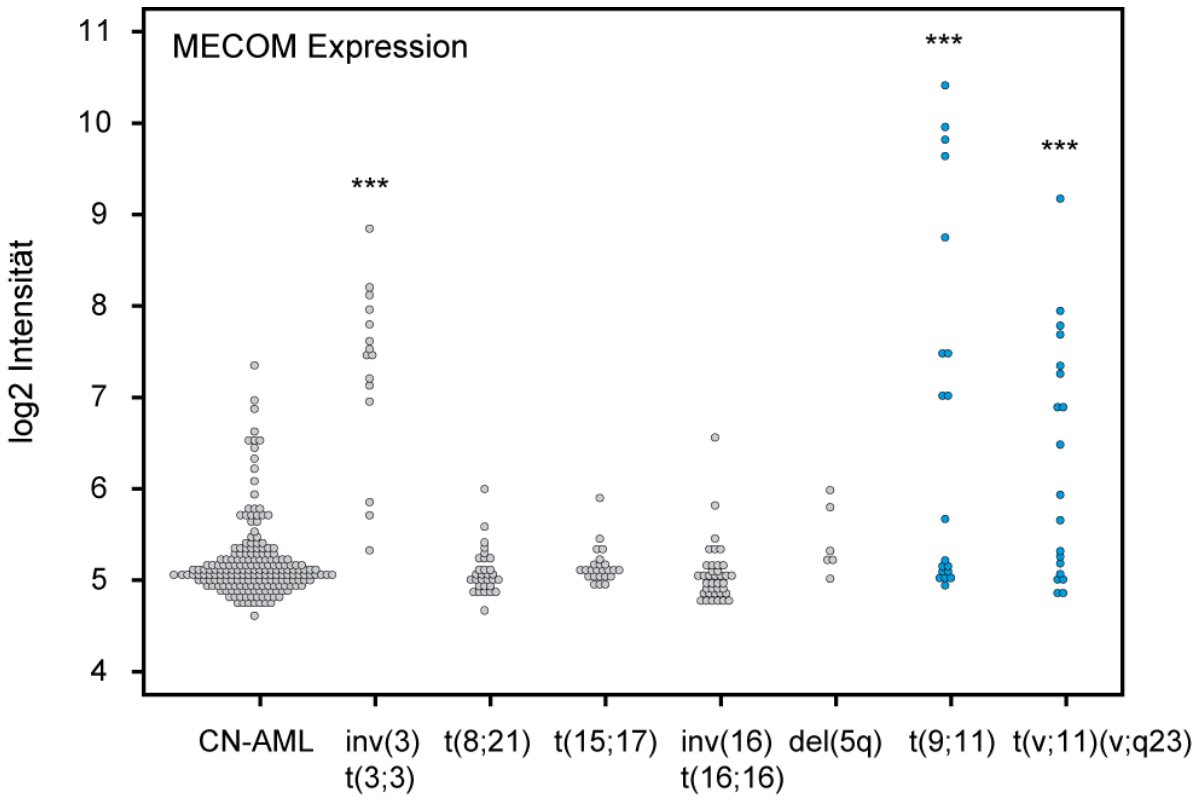


Abbildung 4-33 Expression des MECOM-Lokus in AML-Patientenproben. *In insgesamt 350 AML-Patientenproben wurde die Genexpression des MECOM-Lokus analysiert. Zu diesem Lokus gehört auch Evi-1. Die Patienten wurden nach verschiedenem zytogenetischem Hintergrund unterteilt und die Expression verglichen. In blau sind alle Patienten markiert, die eine MLL-Translokation tragen. CN: zytogenetisch normal, del:Deletion, inv:Inversion, t:Transloaktion. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.*

4.5.2. Mutationen in Wachstumsfaktor-Signalwegen

Da nicht alle *MLL*-rearrangierten Patienten eine hohe *Evi-1* Expression aufweisen, sollten noch weitere mögliche Mechanismen einer erhöhten Sensitivität untersucht werden. Dabei wurde das Augenmerk auf begleitende Mutationen gelegt, die in dieser Kohorte eventuell gehäufter auftreten und eine Sensitivität begünstigen könnten. In 38 *MLL*-rearrangierten AML-Patienten wurde untersucht, welche begleitenden Mutationen diese aufwiesen. Der Mutationsstatus von 16 Leukämie-relevanten Genen wurde über *„targeted amplicon sequencing“* analysiert (Auswahl der Gene siehe Tabelle 3-12 in Material & Methoden). In 15/38 Patienten wurde eine

Mutation in *KRAS* und in weiteren 7/38 Patienten eine Mutation in *NRAS* detektiert, was einer Mutationshäufigkeit von 39,5% für *KRAS* bzw. 18,4% für *NRAS* entspricht. Es wurden *FLT3*-Mutationen in sechs Patienten (15,7%) und *CBL* Mutationen in zwei Patienten (5,2%) gefunden. Andere Leukämie-relevante Genmutationen waren in dieser AML-Kohorte selten. In 38 Patienten wurden drei *ASXL1* Mutationen, zwei Mutationen in *RUNX1* und jeweils eine Mutation in *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2* und *U2AF1* detektiert. In den weiteren sechs untersuchten Genen wurde keine Mutation detektiert.

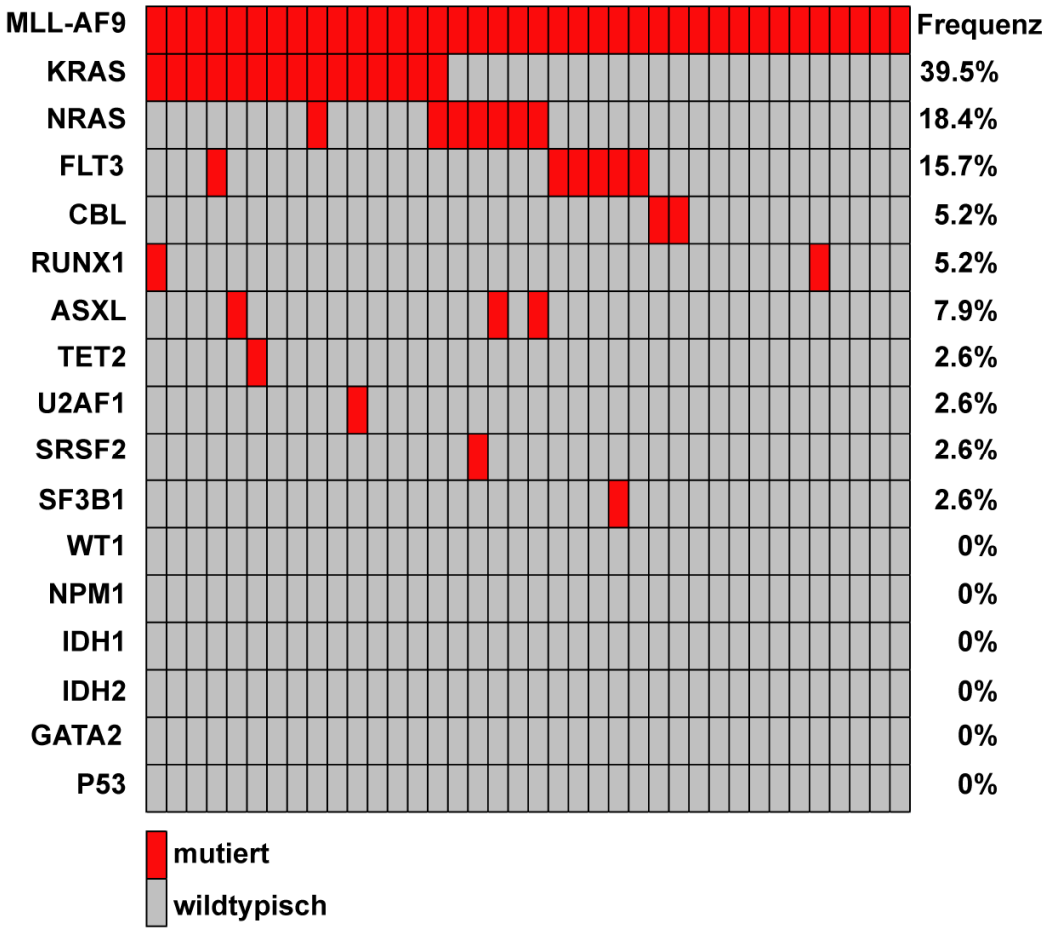


Abbildung 4-34 Mutationsanalysen in AML Patienten mit MLL-AF9 Translokation (n=38). *Mittels targeted amplicon sequencing wurde der Mutationsstatus von 16 Leukämie-assoziierten Genen von AML Patientenproben untersucht (eine Spalte repräsentiert einen Patienten). In der äußeren rechten Spalte ist die jeweilige Mutationsfrequenz des Gens aufgezeigt. Die mutierten Proben sind rot hervorgehoben (sonst grau).*

Um zu überprüfen, ob die hohe Mutationsrate für *RAS* und weitere Wachstumsfaktorsignal-relevanten Gene wie *FLT3* und *CBL* ein Charakteristikum für *MLL*-rearrangierte AML ist, wurden diese Gene in einer Gruppe von 125 CN-AML Patienten unter Verwendung der gleichen Methode sequenziert (Abbildung 4-35). Die Mutationsfrequenz von *RAS* lag in dieser Gruppe signifikant niedriger mit 31/125 mutierten Proben (24,8%; p<0,001). Betrachtet man die Verteilung genau, so zeigt sich eine vergleichbare Mutationsrate für *NRAS* (18,4% vs. 19%), jedoch eine weitaus niedrigere Mutationsrate für *KRAS* (39,5% vs. 9%, p<0,001). *FLT3*-Mutationen waren in der CN-AML Kohorte signifikant häufiger vertreten (37% vs. 15,7%, p<0,05), *CBL*-Mutationen vergleichbar häufig zu *MLL*-rearrangierten Proben 5,2% vs. 5%).

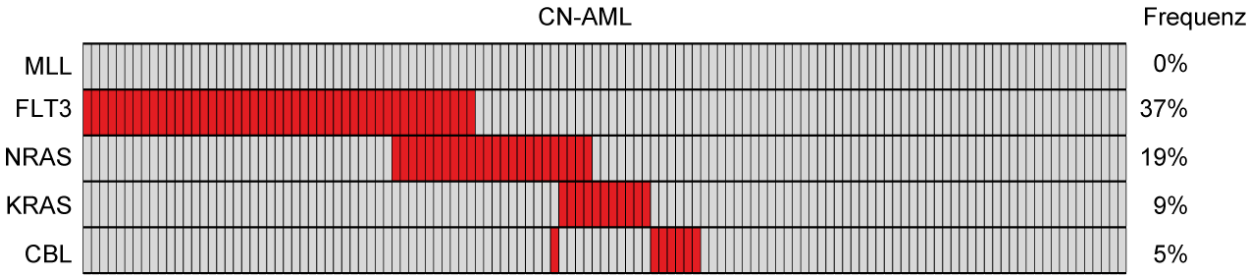


Abbildung 4-35 Mutationsanalysen in zytogenetisch normaler AML (n=125). *Mittels targeted amplicon sequencing wurde der Mutationsstatus von FLT3, RAS und CBL untersucht (eine Spalte repräsentiert einen Patienten). In der äußeren rechten Spalte ist die jeweilige Mutationsfrequenz des Gens aufgezeigt. Die mutierten Proben sind in rot hervorgehoben (sonst grau).CN: cytogenetically normal.*

4.6. Kombination der PI3K/mTORC1/2-Inhibition mit einem MEK-Inhibitor

Die duale PI3K/mTORC1/2-Inhibition zeigte antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte in AML-Patientenproben, in murinen sowie in humanen myeloischen Leukämiezelllinien. Die alleinige Wirkung dieser Inhibition wäre im Patienten jedoch nicht ausreichend, um eine bestehende Leukämielast zu reduzieren. Dazu scheint die Abhängigkeit der Zellen von diesem Signalweg nicht groß genug zu sein. In der Literatur sind Resistenzmechansimen beschrieben, die sich nach Inhibition isolierter Signalwege in der Zelle ausbilden. Darunter zum Beispiel auch der Wechsel der Zelle auf alternative Signalwege. Daher wurde in dieser Arbeit auch die Kombination mit einem MEK1/2–Inhibitor untersucht. Der ERK-Signalweg ist wie der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auch an der Proliferation von Zellen und der Expression anti-apoptotischer Gene beteiligt. Besonders in Zellen, die eine *RAS*-Mutation aufweisen, könnte dieser Weg eine bedeutende Rolle spielen.

4.6.1. Kreuzaktivierung des PI3K/AKT/mTOR bzw. des ERK-Signalwegs

Auf Proteinebene wurde analysiert, ob die AML-Zelllinien MOLM-13 und THP-1 bei einer PI3K-Inhibition auf den ERK-Signalweg „ausweichen“. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit BEZ-235 bzw. AZD-6244 inkubiert und anschließend die Proteinphosphorylierung von AKT, S6K sowie von ERK im Western Blot untersucht. Gleichzeitig wurden weitere Ansätze mit einer Kombination aus BEZ-235 und dem MEK-Inhibitor AZD-6244 behandelt.

In Abbildung 4-36 ist das Ergebnis des Western Blots für die Zelllinie MOLM-13 zu sehen. Die 24-stündige Inkubation mit BEZ-235 führte in allen drei Konzentrationen zu einer Dephosphorylierung der Proteine S6K und AKT. Gleichzeitig stieg die Phosphorylierung von ERK durch diese Behandlung konzentrationsabhängig an. Bereits in der geringsten BEZ-235-Konzentration von 62,5 nM war eine stärkere ERK-Phosphorylierung nachweisbar. Wurden die Zellen für 24 Stunden mit dem MEK-Inhibitor AZD-6244 behandelt, konnte keine reduzierte Phosphorylierung von ERK beobachtet werden. Auch in diesem Fall konnte eine stärkere Phosphorylierung des alternativen Signalweges gezeigt werden. Die Phosphorylierung von AKT stieg durch die ERK-Inhibition an, nicht jedoch die von S6K. Kombinierte man die beiden

Inhibitoren BEZ-235 und AZD-6244 wurde die Phosphorylierung aller drei Proteine konzentrationsabhängig gehemmt.

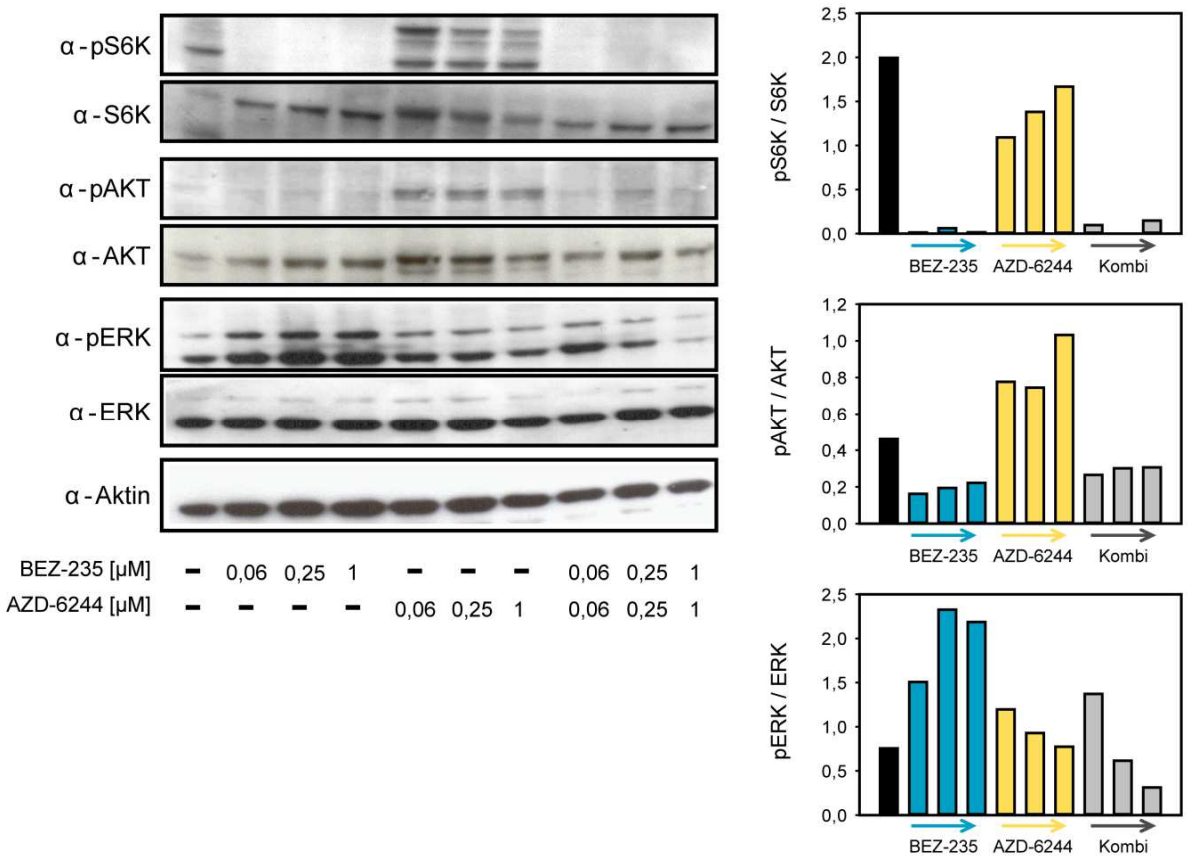


Abbildung 4-36 Inhibition von S6K und AKT und stärkere Phosphorylierung von ERK in MOLM-13 Zellen. *MOLM-13 Zellen wurden für 24 Stunden mit BEZ-235 (blau), AZD-6244 (gelb) bzw. beiden in Kombination (grau) inkubiert. Aus den Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Aktivierung der Proteine S6K, AKT und ERK über Immunblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Anschließend wurde die Bandenintensität mittels Image J quantifiziert und der Ratio zwischen Phospho (p)-Protein und Gesamtprotein gebildet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.*

Die gleiche Behandlung wurde in einer weiteren AML Zelllinie, den THP-1 Zellen, durchgeführt (Abbildung 4-37). Das Ergebnis konnte in diesen Zellen bestätigt werden. Hier war der MEK-Inhibitor AZD-6244 jedoch dazu in der Lage, die Dephosphorylierung von ERK über einen Zeitraum von 24 Stunden aufrechtzuerhalten.

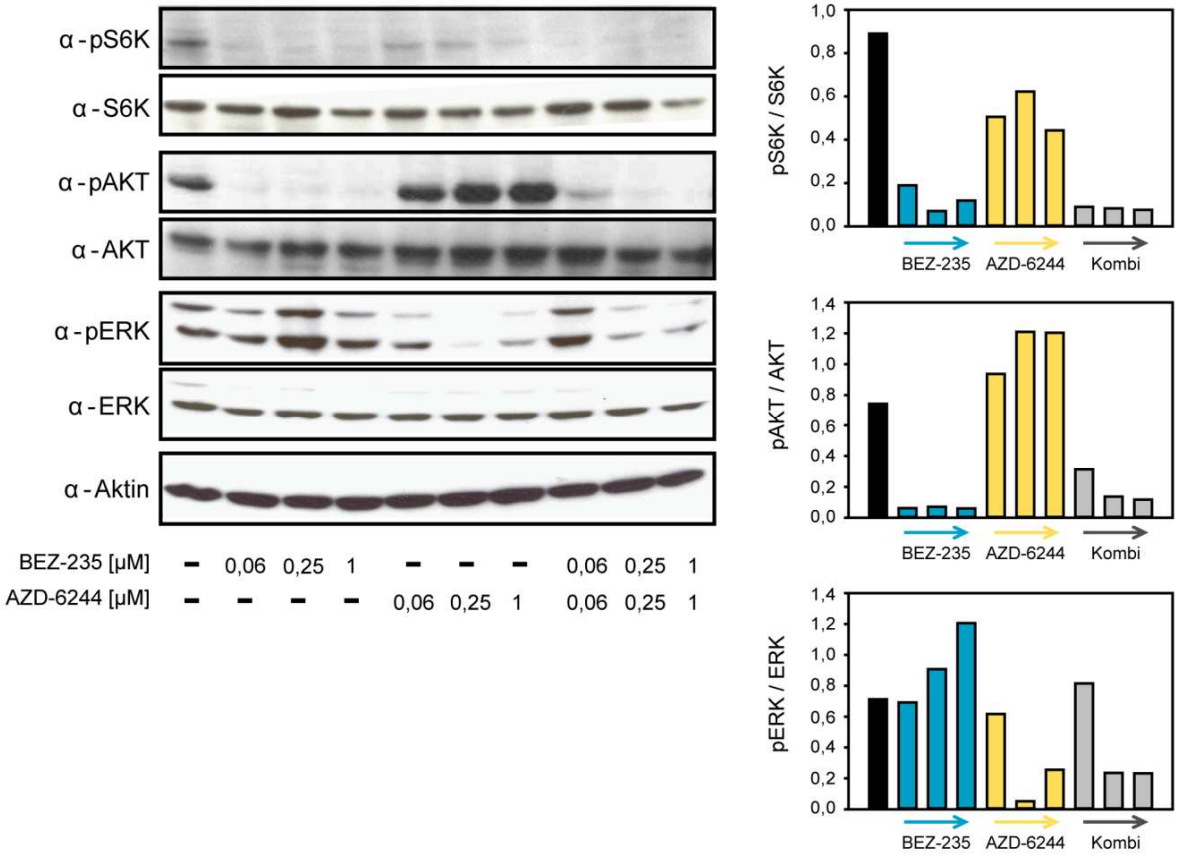


Abbildung 4-37 Inhibition von S6K und AKT und stärkere Phosphorylierung von ERK in THP-1 Zellen. *THP-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit BEZ-235 (blau), AZD-6244 (gelb) bzw. beiden in Kombination (grau) inkubiert. Aus den Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Aktivierung der Proteine S6K, AKT und ERK über Immunblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet.Anschließend wurde die Bandenintensität mittels Image J quantifiziert und der Ratio zwischen Phospho (p)-Protein und Gesamtprotein gebildet. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.*

Um zu überprüfen, ob der Effekt bereits nach 6 h oder erst nach 24 h auftritt, wurde eine Zeitkurve für die Kreuzaktivierung der beiden Signalwege durchgeführt. Abbildung 4-38 zeigt die Ergebnisse für eine ausgewählte Konzentration (1 µM) beider Substanzen und der Kombination in THP-1 Zellen.

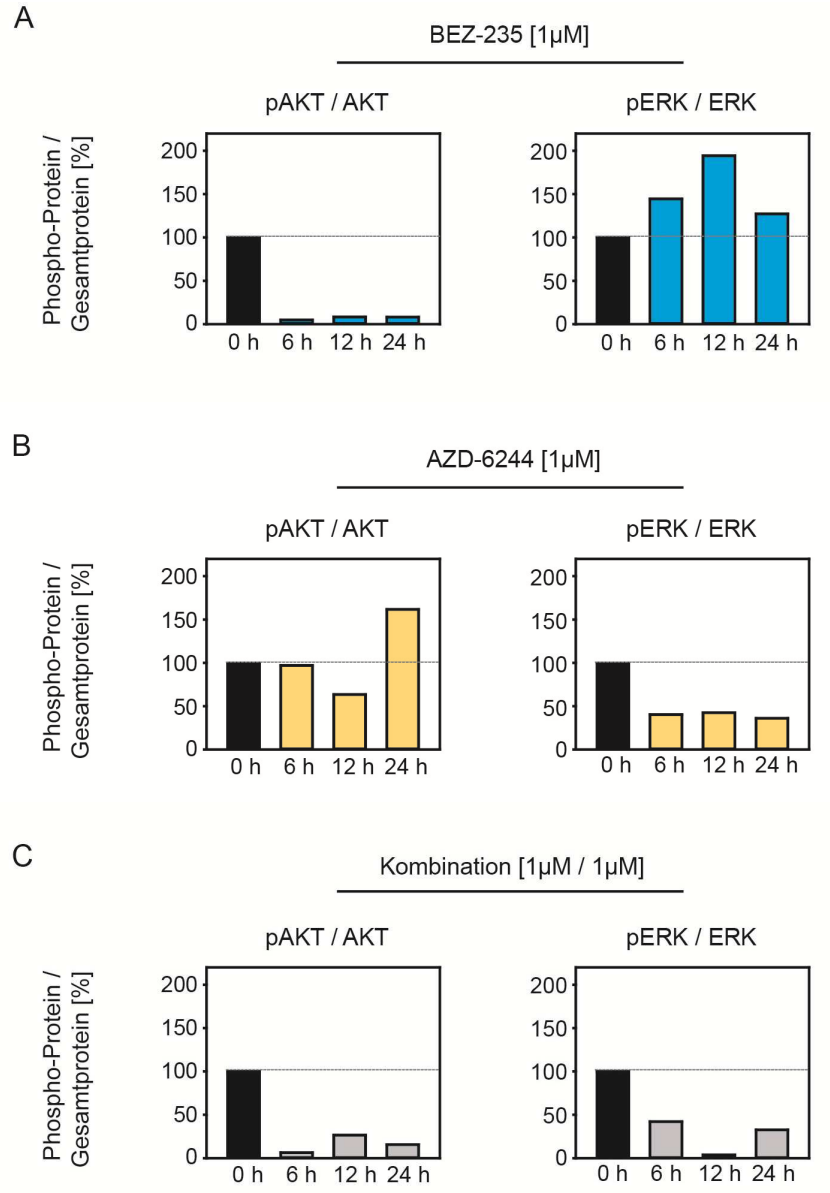


Abbildung 4-38 Dephosphorylierung von AKT bzw. ERK durch Behandlung mit BEZ-235, AZD-6244 bzw. beiden in Kombination.*THP-1 Zellen wurden für 0, 6, 12 bzw. 24 Stunden mit BEZ-235 (blau), AZD-6244 (gelb) bzw. beiden in Kombination (grau) inkubiert. Aus den Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt und die Aktivierung der Proteine AKT und ERK über Immunblot-Analyse untersucht. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin verwendet. Anschließend wurde die Bandenintensität mittels ImageJ quantifiziert und der Ratio zwischen Phospho (p)-Protein und Gesamtprotein gebildet. Gezeigt ist die Bandenquantifizierung eines repräsentativen Western Blots. Die gestrichelte Linie hebt den Phosphorylierungslevel der unbehandelten Zellen hervor.*

Durch die Einzelinhibition mit BEZ-235 bzw. AZD-6244 konnte nach allen drei gewählten Zeitpunkten eine Dephosphorylierung der Zielproteine nachgewiesen werden (Abbildung 4-38 A links bzw. Abbildung 4-38 B rechts). Behandelte man die Zellen nur mit BEZ-235 zeigte sich bereits nach 6 Stunden eine stärkere Phosphorylierung von ERK. Behandelte man die Zellen nur mit dem MEK-Inhibitor AZD-6244, konnte eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT erst nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Die Kombination aus 1 µM BEZ-235 und 1 µM AZD-6244 führte zu allen Zeitpunkten zu einer deutlichen Dephosphorylierung von AKT und ERK.

4.6.2. Synergistische Effekte durch PI3K/mTOR und MEK-Inhibition

Im Western Blot zeigte sich eine Kreuzaktivierung der beiden Signalwege RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTOR durch die Hemmung des jeweils alternativen Signalwegs. Die Kreuzaktivierung wurde durch Kombination des PI3K/mTOR- und des MEK-Inhibitors verhindert. In Folge dessen untersuchten wir die Effekte einer Kombination auch in einem phänotypischen Kontext (Abbildung 4-39).

Sechs humane myeloische Zelllinien wurden 72 Stunden in einer Konzentrationsreihe von BEZ-235, AZD-6244 oder in einer Kombination beider kultiviert. Anschließend wurde die spezifische Apoptose mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der MEK-Inhibitor AZD-6244 induzierte in keiner Konzentration Apoptose in den Zelllinien. Das Ansprechen auf die Kombination war sehr heterogen in den Zelllinien. In der höchsten gewählten Konzentrationskombination von jeweils 4 µM BEZ-235 bzw. AZD-6244 zeigte sich in allen Zelllinien ein Synergismus der Substanzen, die Apoptoserate war stark erhöht. In MOLM-13, THP-1 und HL-60 Zellen zeigten niedrigere Konzentrationskombinationen von jeweils 0,25 µM BEZ-235 bzw. AZD-6244 bereits synergistische Effekte.

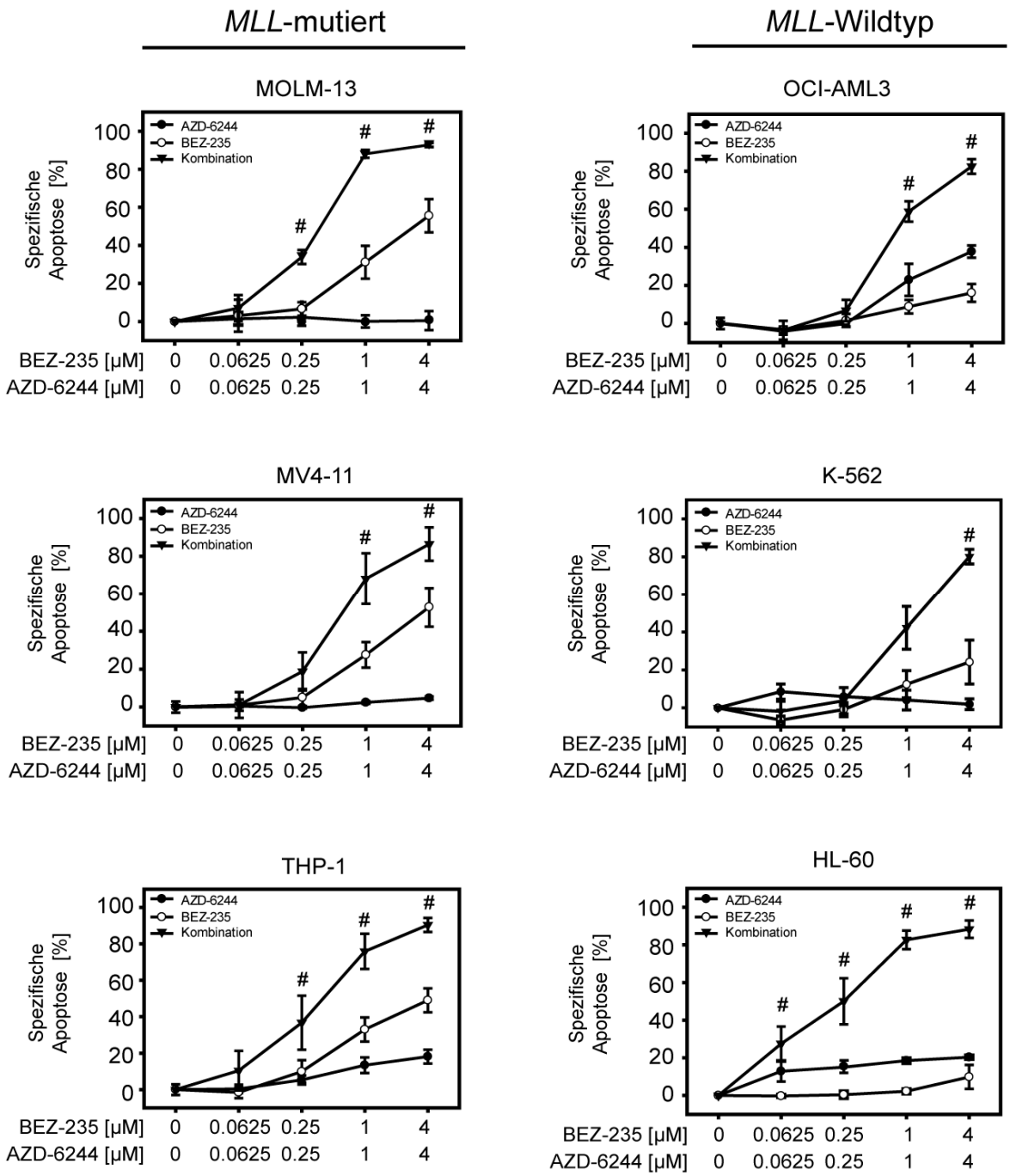


Abbildung 4-39 Kombination von BEZ-235 und AZD-6244 in humanen myeloischen Leukämie-Zelllinien. *Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ-235, dem MEK-Inhibitor AZD-6244 bzw. einer Kombination aus beiden behandelt. Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels Durchflusszytometroe bestimmt. Synergistische Effekte wurden mittels Calcusyn berechnet und entsprechend markiert (#). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Versuchen.*

Eine gleichzeitige Inhibition des PI3K/AKT/mTOR- und des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs mittels BEZ-235 und AZD-6244 konnte zudem einmalig in einer primären AML-Probe durchgeführt werden (Abbildung 4-40). Bei dieser AML-Probe handelte es sich um eine Patientenprobe mit *MLL-AF10*-Rearrangement und einer *KRAS* G12D-Mutation.

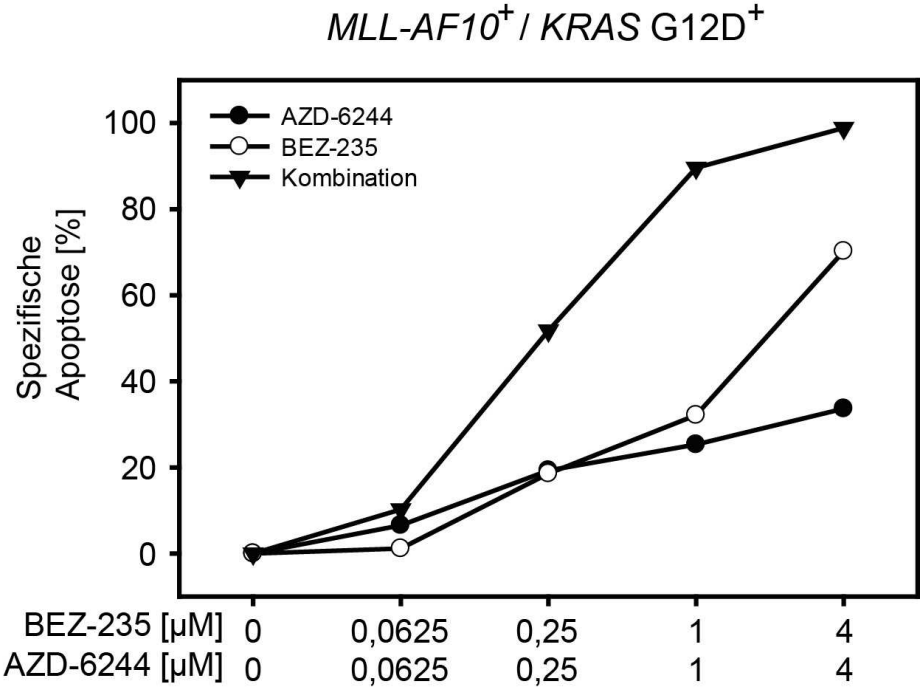


Abbildung 4-40 Kombination von BEZ-235 und AZD-6244 in einer primären AML-Patientenprobe. *Die Zellen wurden im Duplett über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ-235, dem MEK-Inhibitor AZD-6244 bzw. einer Kombination aus beiden behandelt. Ihre spezifische Apoptose wurde nach diesem Zeitraum mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert des Dupletts.*

Die Zellen wurden 72 Stunden in einer Konzentrationsreihe von BEZ-235, AZD-6244 oder in einer Kombination beider kultiviert. Anschließend wurde die spezifische Apoptose mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der MEK-Inhibitor AZD-6244 induzierte ab einer Konzentration von 1 µM spezifische Apoptose von 25%, die sich durch die Wahl einer höheren Konzentration von 4 µM leicht auf 33% erhöhen ließ. BEZ-235 zeigte bereits ab einer Konzentration von 250 nM eine deutliche Apoptose-Induktion von 51%, die durch Wahl höherer Konzentrationen noch deutlich zunahm (bis zu 70% bei 4 µM). Das Ansprechen auf die Kombination war vergleichbar mit der in THP-1 Zellen. Ab einer Konzentration von 250 nM BEZ-235 bzw. AZD-6244

zeigten sich bereits deutliche Mehreffekte in der Apoptose-Induktion für die Kombination im Vergleich zu den Einzelinhibitionen (52% spezifische Apoptose vs. jeweils 19%). Die Induktion spezifischer Apoptose konnte durch Wahl höherer Konzentrationen weiter gesteigert werden (90% bei Kombination von je 1 µM BEZ-235 und 1 µM AZD-6244 vs. 32% für 1 µM BEZ-235 bzw. 25% für 1 µM AZD-6244). Eine statistische Signifikanz bzw. ein Wert für den sogenannten *„combination index“* konnte nicht ermittelt werden, da es sich um eine einzelne Messung handelte.

5. Diskussion

5.1. *In vitro*-Sensitivität primärer AML-Blasten gegenüber spezifischen Signalwegsinhibitoren

Ziel unserer Studie war es, die Rolle verschiedener Signalwege in der AML aufzuzeigen. Hierzu wurden Signalwege untersucht, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Leukämie beschrieben sind. Dazu gehören sowohl Signalwege, die wichtig zum Erhalt des Selbsterneuerungspotenzials gesunder und maligner hämatopoetischer Stamm- und Vorkäuferzellen sind (β-Catenin/Wnt, *Sonic-Hedgehog*), als auch Signalwege, die zur Proliferation und zum Überleben maligner Zellen beitragen (PI3K/AKT/mTOR, ERK). Weitere Analysen in humanen und murinen myeloischen Leukämie-Zelllinien und in einem Xenograft-Mausmodell ergänzen die Arbeiten mit primärem Material.

5.1.1. Etablierung des *in vitro* Apoptose Readout-Systems

Die Analyse primärer AML-Blasten erlaubt die dem Patienten am nächsten stehenden Erkenntnisse. Häufig limitiert eine diskontinuierliche Materialverfügbarkeit die Arbeit mit diesen Proben. Trotzdem ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, Analysen zur Ermittlung der Sensitivität mit 18 frischen primären AML-Patientenproben unterschiedlichen genetischen Hintergrunds durchzuführen. Um zu überprüfen, wie valide der Apoptosenachweis in diesen Analysen ist, wurden alle Proben mit den klassischen Zytostatika Daunorubicin und AraC und dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib behandelt, die in der AML-Therapie zum Standardregime gehören. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an bereits publizierten *in vitro*-Daten und an Plasmalevel-Konzentrationen, die im Rahmen klinischer Studien erhoben wurden. Um die Aussagekraft der Analysen zu erhöhen, war es wichtig, Konzentrationen zu verwenden, die klinisch relevant sind, d.h. im Patienten auch erreicht werden können. Analog zu vorherigen Studien konnte eine Induktion von Apoptose durch das Zytostatikum AraC in einem Großteil der AML-Patientenproben hervorgerufen werden [131, 132]. Die jeweilige Antwortrate der Zellen in beiden Studien ist miteinander vergleichbar. Auch das in der AML-Induktionstherapie verwendete Anthracyclin Daunorubicin zeigte sich analog zu

publizierten Daten [133, 134] in unserer Studie in den gewählten Konzentrationen als stark Apoptose-induzierend. Besonders für AraC ist die hohe Effektivität insofern überraschend, da AraC gemäß seiner beschriebenen Wirkungsweise nur zytotoxische Effekte in sich teilenden Zellen verursachen kann [146]. Die Blasten müssten demnach *in vitro* noch dazu in der Lage sein, sich zu teilen. Cisplatin wird als Zytostatikum in der Therapie solider Tumore verwendet und zeigte keine Induktion von Apoptose in AML-Blasten. Auch dies belegt die Validität und Aussagekraft der Analysen. Als weitere ergänzende Positivkontrolle wurde der Multikinase-Inhibitor Sorafenib verwendet, der in soliden Tumoren aber auch in der AML-Therapie klinische Anwendung findet. Sorafenib hemmt neben RAF-1, B-RAF und VEGFR2 auch die Rezeptortyrosinkinase FLT3, die in der AML in mehr als 30% aller zytogenetisch normalen (CN)-AML Mutationen aufweist. Die gewählten Konzentrationen wurden in verschiedenen Studien als klinisch relevant eingestuft [131, 142] und führten abhängig von der Konzentration in 7–10 / 14 Patientenproben zu einer spezifischen Apoptose von mehr als 20%. Ähnliche Resultate wurden auch in anderen Studien erreicht. Unklar bleibt, ob Sorafenib in Patienten mit *FLT3*-Mutation höhere Effektivität besitzt als in Patienten, die ein Wildtyp-*FLT3* tragen [147, 148]. In unserer Studie konnten wir analog zur Studie von Hu *et al.* eine marginale Signifikanz für die höhere Sensitivität von *FLT3*-mutierten Patienten beobachten [131].

5.1.2. Signalwege zur Selbsterneuerung in der AML

Die Bedeutung des β-Catenin/Wnt-Signalwegs in der AML wurde in mehreren Studien beschrieben [149]. Der Signalweg ist konstitutiv aktiviert, obwohl typische Mutationen in Schlüsselgene wie „*Adenomatous polyposis coli*“ (*APC)* in der AML nicht beschrieben sind [83]. Vor allem balancierte Translokationen tragen zur Aktivierung des Signalwegs in AML-Zellen bei [81]. In einer Studie von Minke *et al.* wurde in AML-Blasten ein IC_{50}-Wert von 0,3–0,9 µM für den TCF/β-catenin Antagonisten PKF115-584 ermittelt [140]. Auch in humanen AML Zelllinien lag dieser Wert im submikromolaren Bereich. Weitere Studien zeigten für PKF115-584 und andere Inhibitoren ebenfalls eine Apoptose-Induktion im submikromolaren Bereich in neoplastischen Zellen. In unseren Versuchen konnten wir mittels PKF115-584 in 5/13

primären AML-Blasten eine spezifische Apoptose-Induktion von mehr als 20% zeigen, jedoch erst bei einer Konzentration von 3,3 µM. Im Gegensatz zur Studie von Minke *et al.* und Versuchen von Gandhirajan *et al.* in CLL-Zelllinien [139], verwendeten wir jedoch mit der Bestimmung apoptotischer und nekrotischer Zellen über Durchflusszytometrie ein weniger sensitives *„read-out“*-System. In den oben genannten Studien von Minke und Gandhirajan wurden die angegebenen IC_{50}-Werte mit Hilfe eines sogenannten ATP-Assays ermittelt. Hierfür wird der ATP-Gehalt der Zellen indirekt über eine ATP-abhängige Lumineszenz-Reaktion gemessen und gilt als Nachweis metabolischer Aktivität. Der Zusammenhang zwischen Zellwachstum, Zellviabilität und ATP-Verbrauch wurde von Crouch *et al.* [150] gezeigt.

Eine Studie von Ok *et al.* zeigte die aberrante Aktivität des *Sonic-Hedgehog*-Signalwegs in der AML [151]. In der ALL wird das Selbsterneuerungspotenzial von ALL-Zellen durch den Einsatz von *Hedgehog*-Inhibitoren herabgesetzt. Dies wurde in einem Transplantationsversuch in Mäusen gezeigt [152]. Inzwischen befindet sich der Inhibitor LDE-225 in der klinischen Phase II für Patienten mit refraktärer bzw. rückfälliger akuter Leukämie (Studie NCT01826214, www.clinicaltrails.gov). *In vitro* Daten zu LDE-225 in hämatopoetischen Erkrankungen gibt es bis dato keine. In unserer Studie verwendeten wir daher Konzentrationen, die sich aus Melanomstudien ableiteten. In der höchsten gewählten Konzentration von 5 µM wurde keine Apoptose-Induktion beobachtet. Diese Konzentration führt zu einer Reduktion der *„Patched“ (PTCH1)*-Expression, was für eine vollständige Inhibition des *Sonic-Hedgehog*-Signalwegs spricht [135]. *„Patched“* ist der Co-Rezeptor des *„Smoothened“*-Rezeptors und für die Bindung des Liganden zuständig. Da es sich hierbei um einen Signalweg handelt, der sich nicht als direkt Apoptose-induzierend sondern eher erhaltend auf das Selbsterneuerungspotential zeigt [152, 153], ist unser *„read-out“*-System für einen solchen Inhibitor eventuell nur mäßig geeignet, induzierte Effekte in Zellen aufzuweisen.

5.1.3. PI3K/AKT/mTOR-Inhibition

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist einer der am Häufigsten fehlregulierten Signalwege in menschlichen Tumoren [86-89]. Mutationen in Schlüsselgenen des Signalweges sind in soliden Tumoren sehr häufig verantwortlich für die konstitutive Aktivierung des Signalwegs [86, 87]. Dies können aktivierende Mutationen in der PI3K selbst sein (z.B. *PIK3CA* H1047R) [87], Mutationen in der AKT-Kinase (*AKT* E17K) [117] und Deletionen im negativen Regulator PTEN bzw. SHIP1 [118-120]. In hämatopoetischen Erkrankungen sind Mutationen der PI3K, der AKT-Kinase und der negativen Regulatoren PTEN und SHIP nur selten beschrieben [121-123, 154]. Trotzdem zeigen 50-80% aller AML Patienten eine konstitutive Aktivierung des Signalwegs [155-158]. Zur spezifischen Inhibition einzelner Schlüsselproteine innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs sind inzwischen viele kleinmolekulare Inhibitoren entwickelt und getestet worden [156, 159, 160]. Es kommen stets neue dazu, die sich in ihrer Spezifität und ihrer Wirkung auch in nanomolarem Konzentrationsbereich weiter verbessern. In unserer Studie wurden Inhibitoren verwendet, zu denen bereits publizierte Daten zu ihrer Wirksamkeit in anderen Tumorentitäten verfügbar waren und die sich in der klinischen Entwicklung oder bereits in der Zulassung befinden. Zur Einzelinhibition der AKT-Kinase wurde MK-2206 gewählt, ein neu entwickelter allosterischer Inhibitor der Firma Merck [136, 161, 162]. Rapamycin ist ein klassischer allosterischer Inhibitor des mTORC1, der bereits im Rahmen seiner immunsuppressiven Wirkung für die klinische Anwendung zugelassen ist. Bei BEZ-235 handelt es sich um einen ATP-kompetitiven Inhibitor, der sowohl PI3K als auch mTORC1 und mTORC2 inhibiert. Dies gelingt durch den sehr ähnlichen Aufbau der ATP-Bindetasche der adressierten Kinasen. Die Spezifität dieses Inhibitors wurde in einer Studie von Maira *et al.* gezeigt [163]. Rezeptortyrosinkinasen wie FLT3, cKIT und VEGFR sowie Serin/Threonin-Kinasen wie AKT werden erst in Bereichen von über 10 µM durch die Substanz inhibiert, während der biochemische IC_{50}-Wert für die PI3K zwischen durchschnittlich 6 nM (p110α, δ, γ) und 75 nM (p110β) lag.

Die drei verwendeten Inhibitoren zeigten in primären AML-Patientenproben unterschiedlichen genetischen Hintergrunds ein breites Spektrum zytotoxischer Aktivität. In Einklang mit vorherigen Studien bewirkte der duale Inhibitor höhere zytotoxische Effekte als die Inhibition einzelner Schlüsselproteine innerhalb des

Signalwegs [112]. Wir unterteilten die Patientengruppen nach ihrem Ansprechen auf BEZ-235 in resistente und sensitive Proben. Diese Unterteilung beruhte auf einer Grenze von 20%-Apoptose-Induktion in der Probe. Anschließend korrelierten wir die Sensitivität mit dem genetischen Hintergrund der Proben. Auffällig war, dass alle *MLL*-rearrangierten Patientenproben sensitiv gegenüber der BEZ-235-Behandlung waren, während zur Gruppe der resistenten Proben keine *MLL*-rearrangierte Probe gehörte. Die Frequenz für *RAS*-Mutationen lag in der sensitiven Kohorte ebenfalls höher. Im Vergleich der spezifischen Apoptose nach BEZ-235, MK-2206 und Rapamycin-Behandlung konnten wir zeigen, dass die Apoptose-Induktion in *MLL*-rearangierten Proben tendenziell höher lag als in *MLL*-WT Proben. Dies war nicht auf eine höhere Spontanapoptose in diesen Zellen zurückzuführen. Eine höhere Empfindlichkeit dieser Zellen durch eine höhere Proliferationsrate konnte durch die Analyse der Ki67-Expression ausgeschlossen werden. Ki67 ist ein Proliferations-marker, der in der Tumordiagnostik zur Bestimmung des proliferativen Potenzials eines Tumors vor allem für solide Tumore verwendet wird [164-166]. Der dabei erhobene Ki67-„Labeling Index“ beruht auf immunhistochemischen Färbungen fixierten Tumorgewebes und ist laut einer aktuellen Studie direkt vergleichbar mit der Ki67-Genexpression [167].

Da es bei der Verwendung von frisch isolierten AML-Blasten schnell zu Materialengpässen kommt, wurden weitere Studien mit Zelllinien angeschlossen. Zudem ist es schwierig, AML-Blasten *ex vivo* zu kultivieren selbst wenn sie von einer aggressiven hochproliferativen Erkrankung abstammen [168]. Substanzeffekte, die sich als zytostatisch und weniger als zytotoxisch darstellen, können nicht untersucht werden. AML-Blasten teilen sich *ex vivo* nur unter speziellen Kulturbedingungen. Dazu gehören z.B. die Verwendung eines murinen Stromazell-Feederlayers und die Zugabe eines Zytokincocktails. Unter diesen optimierten Bedingungen ist es möglich, die Zellen längere Zeit in Kultur zu halten ohne dass sie sterben, die Teilungsrate ist hingegen mit maximal vier Teilungen in 28 Tagen noch immer sehr niedrig [168].

In humanen myeloischen Zelllinien und in einer *PI3K*-mutierten Brustkrebszelllinie zeigten wir eine vollständige Signalweginhibition in allen Inhibitor-Konzentrationen, die für die phänotypischen Analysen verwendet wurden. Hierbei zeigte sich eine Dephosphorylierung von AKT in höheren (1 µM) und eine Dephosphorylierung der S6-Kinase in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen (ab 15,6 nM). In sechs

verschiedenen humanen myeloischen Leukämiezelllinien, drei davon mit *MLL*-Rearrangement, konnte bestätigt werden, dass Zellen, die ein *MLL*-Rearrangement tragen, eine höhere Sensitivität aufweisen. Dies wurde vor allem in den Apoptose-Induktionsversuchen deutlich, in denen selbst in der höchsten Konzentration von BEZ-235 in den *MLL*-wildtypischen Zelllinien nur eine sehr moderate (OCI-AML3 und K-562) bzw. keine Apoptose (HL-60) induziert wurde. In Experimenten zur Proliferationsinhibition wurde deutlich, dass BEZ-235 in weitaus geringeren Konzentrationen von unter 100 nM eine deutliche antiproliferative Wirkung zeigt. Die zytostatische Wirkung konnte in allen Zelllinien beobachtet werden, jedoch analog zur Apoptose-Induktion, besonders in den *MLL*-rearrangierten Zelllinien, in denen der IC_{50}-Wert deutlich niedriger lag. Chapuis *et al.* veröffentlichten 2010 eine *in vitro* Studie zur Anwendung von BEZ-235 in der myeloischen Leukämie und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen [128]. In einem 3[H]-Thymidin-Pulsexperiment wurden IC_{50}-Werte von BEZ-235 im Bereich von 25 nM bis 45 nM in MOLM-14 und MV4-11 Zellen ermittelt. Eine Induktion der Apoptose wurde in vier AML Patientenproben und in den MV4-11 Zellen beobachtet. Hier stieg die Zahl der AnnexinV$^+$-Zellen bei einer Konzentration von 1 µM BEZ-235 von 4% auf 53% nach 48 Stunden Inkubation. Niedrigere Konzentrationen induzierten analog zu unserer Studie keine Apoptose in den analysierten Zellen. Ein wichtiges Kontrollexperiment wurde in gesunden CD34$^+$-Zellen durchgeführt, in denen bei 1 µM BEZ-235 keine Apoptose induziert werden konnte, was gegen „*off-target*"-Effekte der Substanz in dieser Konzentration spricht. Unsere Studie, sowie die Studie von Chapuis in der AML und die Studie von Schult in der t-ALL [129], zeigt eine eher zytostatische als zytotoxische Wirkung des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors in der akuten Leukämie. Chapuis *et al.* legen in ihrer Studie kein Augenmerk auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Zellen und deren Sensitivität. Da sie, im Gegensatz zu ihren Analysen zur Inhibition des Signalwegs, keine Daten zur *MLL*-Wildtyp Zelllinie OCI-AML3 in ihren Proliferations- und in ihren Apoptoseversuchen zeigen, kann hinsichtlich dieses Aspekts kein Vergleich zu der Studie von Chapuis erfolgen. Auch der genetische Hintergrund der verwendeten AML-Patientenproben ist unklar. Hier liefert unsere Studie eine wichtige Ergänzung zum möglichen Anwendungsspektrum PI3K/mTOR-gerichteter Therapien in der AML.

Im Gegensatz zur dualen PI3K/mTORC1/2-Inhibition zeigte die Einzelinhibition von AKT durch MK-2206 deutlich schwächere Effekte. In den primären AML-Blasten wurde bei einer Konzentrationen von 1–4 µM nur in wenigen Proben Apoptose induziert. Die Zelllinien zeigten sich in diesen Konzentrationen resistent gegenüber der Inhibition. Erst in einer Konzentration von 8 µM wirkte MK-2206 in MOLM-13 und THP-1 Apoptose-induzierend und die Proliferation wurde signifikant gehemmt. In B-Vorläufer ALL-Zelllinien und primärem Patientenmaterial beobachteten Neri *et al.* erst ab Konzentrationen von 10–15 µM MK-2206 eine signifikante Reduktion der Zellviabilität im MTT-Assay [138]. Diese Daten stehen gemeinsam mit unseren Ergebnissen in starkem Kontrast zu einer in diesem Jahr veröffentlichten Studie zu MK-2206 in präklinischer und frühklinischer Entwicklung in der AML-Therapie [137]. Konopleva *et al.* zeigten eine Apoptose-Induktion in AML-Zelllinien bei einer Konzentration von 5 µM und eine deutliche Proliferationsinhibition in geringeren Konzentrationen. In den Zelllinien lagen die IC_{50}-Werte für MK-2206 in dieser Studie bei 1 µM (OCI-AML3), 1,1 µM (MOLM-13), 3,9 µM (MV4-11) und 4,5 µM (THP-1). Diese Daten sind direkt mit unseren vergleichbar, da hier das gleiche *„readout"*-System, nämlich die Zählung viabler Zellen nach 72-stündiger Inkubation, sowie die gleichen Zelllinien verwendet wurden. Wie sich die große Diskrepanz zu den Arbeiten von Konopleva erklären lässt, bleibt unklar. Die verwendeten Zelllinien wurden für unsere Versuche direkt über die DSMZ bezogen und in ihrer Identität über Mutationsanalysen geprüft. Im Western Blot konnten wir eine vollständige Inhibition der AKT-Kinase in den verwendeten Konzentrationen feststellen. In der *PIK3CA*-mutierten Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 waren deutliche antiproliferative Effekte des Inhibitors MK-2206 zu beobachten. Dies zeigt, dass es zu keinem Problem beim Lösen und Verdünnen der Substanz kam. Höhere MK-2206 Konzentrationen wären vermutlich auch in unserem System dazu in der Lage, größere antileukämische Wirkung zu erzielen. Unklar bleibt, inwieweit höhere Konzentrationen der Substanz noch spezifisch aktiv gegen die AKT Kinase sind. Dazu sind nach aktuellem Erkenntnisstand keine Daten bekannt.

Die Einzelinhibition des mTORC1 durch Rapamycin führte in einem Viertel der AML Patientenproben zu einer signifikanten Apoptose-Induktion, wohingegen die gleiche Konzentration von 1 µM in den Zelllinien sogar zu einer leichten, aber signifikanten Verbesserung der Zellviabilität führte. Auch in den Analysen zur Zellproliferation

zeigte sich das Zellwachstum in dem gewählten Konzentrationsspektrum von 0,1 µM–10 µM nur mäßig reduziert. Ähnlich zu MK-2206 steht dies der vollständigen Dephosphorylierung der Zielproteine S6K und S6rp in diesen Konzentrationen gegenüber. Auch hier bestätigte die Kontrollzelllinie MDA-MB-453 die prinzipielle Wirksamkeit der Substanz. Die Inhibition des Zellwachstums korrelierte mit der Dephosphorylierung der S6K.

Dass Einzelinhibition deutlich geringere Effektivität als duale Inhibition zeigt, könnte unter anderem an verschiedenen negativen Feedback-Schleifen innerhalb des Signalwegs liegen. Eine bereits untersuchte ist die *„insulin-receptor-substrate-1“* (IRS-1) vermittelte Schleife [112, 113]. Durch sie kommt es bei einer Hemmung des mTORC zu einer IGF-1 stimulierten Phosphorylierung von AKT [112]. Dies könnte den positiven Einfluss geringer Rapamycin-Konzentrationen auf das Zellüberleben erklären.

Ziel dieser Studien war es außerdem einen Marker zu identifizieren, der mit dem Ansprechen auf die duale PI3K/mTOR-Inhibition korreliert. Durch Analysen der basalen Aktivität des Signalwegs über Western Blot und FACS konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen basaler Aktivität des Signalwegs und dem Ansprechen auf Signalwegsinhibition festgestellt werden. Lediglich zeigte sich ein Trend zur höheren Phosphorylierung der AKT-Kinase und der S6-Kinase in empfindlichen Zelllinien. Dies sollte auch in primären Proben durchgeführt werden, um validere Schlussfolgerungen treffen zu können.

5.2. *In vitro* Sensitivität muriner *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierter Zellen

Die verwendeten humanen Zelllinien weisen neben dem *MLL*-Rearrangement zusätzliche Mutationen auf (siehe Tabelle 4-4). Daher wurde eine murine Zelllinie etabliert, die allein durch ein *MLL-ENL*-Rearrangement transformiert und immortalisiert wurde. Das retrovirale *MLL-ENL* Modell wurde von 1997 von Lavau *et al.* etabliert und veröffentlicht und findet seitdem breite Anwendung für verschiedene Fragstellungen [61]. Frisch isolierte murine Knochenmarkszellen wurden dafür mittels Retroviren transfiziert und deren transformierendes Potenzial anschließend über Replattierungen in Methylzellulose-haltigem Medium überprüft. Die Zellen waren dazu in der Lage, nach jeder neuen Plattierung in diesem Medium Kolonien aus

unreifen myeloischen Vorläuferzellen zu bilden, die Transformation verlief erfolgreich. Die Expression des Fusionstranskripts konnte über RT-PCR nachgewiesen werden. Die Anzahl an gebildeten Kolonien nach drei Replattierungen war in unserem Versuch vergleichbar mit der Anzahl an Kolonien, die in anderen Studien zu *MLL-ENL* und *MLL-AF9* genannt wurden [53, 61, 169]. Passend zu veröffentlichten Daten [169-172] exprimierten die Zellen die Marker cKIT und den spezifisch myeloischen Marker Mac-1, zeigten jedoch keine Expression des lymphatischen B-Zell-Markers B220 auf der Oberfläche. Nach drei Replattierungen wuchsen die Zellen in Suspensionskultur und konnten zum Test auf Fortbestand ihres Selbsterneuerungspotenzials erneut mit oder ohne Inhibitoren ausplattiert werden. Das Selbsterneuerungspotenzial definiert sich über die Anzahl an gebildeten Kolonien und war durch die duale Inhibition deutlich eingeschränkt. Vergleichbar mit den Ergebnissen in humanen myeloischen Leukämiezelllinien wurde in den immortalisierten Zellen Apoptose induziert, jedoch nur im Fall dualer PI3K/mTOR-Inhibition. Die Proliferation wurde sowohl durch duale Inhibition als auch durch alleinige mTORC1-Inhibition signifikant reduziert. Letzteres steht in Kontrast zu den Proliferationsdaten in humanen myeloischen Zelllinien, in denen keine Proliferationsinhibition erfolgte. Die AKT-Inhibition alleine scheint nicht dazu in der Lage zu sein, die Proliferation der Zellen zu beeinflussen. Eventuell hätten auch hier höhere Konzentrationen des AKT-Inhibitors MK-2206 einen Effekt ausgelöst. Da die hergestellten murinen Zelllinien in Kultur in Abhängigkeit von IL-3 wachsen, könnten die starken Effekte der PI3K/mTOR-Inhibition auch teilweise der Hemmung des essentiellen IL-3-Rezeptor-Signalwegs geschuldet sein. Der Hauptmechanismus der Signalweiterleitung nach Bindung von IL-3 ist neben der Aktivierung des JAK/STAT5-Signalwegs, auch die SH2/RAS/ERK und die PI3K/AKT/mTOR-Aktivierung [173]. Zum Vergleich wurden die Experimente daher auch mit der IL-3 abhängigen murinen pro-B Zelllinie BA/F3 durchgeführt. Während die Proliferation in nahezu gleichem Maß reduziert wurde, wies die Apoptose eine Spezifität für die *MLL-ENL*$^{+}$-immortalisierten Zellen auf. Insgesamt schienen die antileukämischen Effekte des dualen Inhibitors und Rapamycins selektive Effekte gegen *MLL*-rearrangierte Leukämie darzustellen.

5.3. *In vivo* Aktivität des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors im Xenograft Mausmodell

Die antitumorale Wirkung von BEZ-235 *in vivo* wurde in verschiedenen Mausmodellen mit soliden Tumoren gezeigt [144, 163, 174, 175]. In der Mehrzahl dieser Studien wurden subkutane Mausmodelle verwendet, in denen Zelllinien der jeweiligen Tumorentität oder primäres Tumormaterial [145, 176] subkutan in immunkomprimierte Nacktmäuse oder NSG-Mäuse injiziert werden. Das Tumorwachstum kann in diesen Modellen relativ leicht anhand des Tumordurchmessers ermittelt werden, die hohe Praktikabilität ist der große Vorteil dieser Modelle [177, 178]. Die Lokalisation der Tumorzellen, die Umgebung und die Biologie des Tumors bleiben jedoch hoch artifiziell. Daher etablierten wir für unser Therapiemodell ein orthotopes Xenograft-Mausmodell. Hierbei werden primäre Patientenproben oder leukämische Zelllinien intravenös in eine immunkomprimierte Mausstammlinie, wie NSG, verabreicht. Für die AML und ALL gezeigt, verbreiten sich diese Zellen im Körper der Maus ähnlich einer Leukämie im Menschen [179, 180] mit bevorzugtem Anwachsen im Knochenmark mit Ausschwemmung ins periphere Blut und in die lymphatischen Organe wie Milz und Leber. Da diese Tumore systemisch und nicht lokal unter der Haut lokalisiert sind, ist der Nachweis der Tumorlast im lebenden Tier in diesem Modell durch reines Tasten nicht möglich. Die Tumorzellen müssen vor ihrer Injektion genetisch manipuliert werden. Durch lentivirale Transduktion gelingt die Expression von *GFP* und *eFFLuc* in den Leukämie-Zellen, was ein *in vivo*-Bildgebungsverfahren ermöglicht [181-183]. Der große Vorteil ist die sehr niedrige Sensitivitätsschwelle, bei der je nach Wahl der Luziferase unter 1.000 Zellen in der Maus detektiert werden können [181]. Das hier verwendete Modell beruhte nicht auf dem Einsatz primärer Blasten sondern der humanen *MLL-AF9*$^+$*/FLT3-ITD*$^+$ Zelllinie MOLM-13. Die Zellen wuchsen bevorzugt im Knochenmark an, bevor sie ins periphere Blut ausgeschwemmt wurden und anschließend weitere Organe infiltrierten. Die Behandlung mit BEZ-235 begann drei Tage nach Injektion der Zellen zu einem Zeitpunkt, an dem bereits eine vergleichbar große Tumorlast in allen Tieren mittels Biolumineszenz zu detektieren war. Trotz der eher niedrigen Tumorlast, zeigte sich das Auswachsen der Leukämie zu Beginn des Therapiefensters zwar verzögert, die Substanz war jedoch nicht dazu in der Lage, eine bereits manifestierte Tumorlast zu reduzieren. Dieses Ergebnis steht in Einklang zu der Mehrzahl der veröffentlichten Daten aus *in vivo*

Studien zu soliden Tumoren, in denen das Voranschreiten des Tumorwachstums zwar reduziert wurde, jedoch nie komplett aufgehalten oder der Tumor zurückgedrängt werden konnte [184-186]. Kim *et al.* beobachteten in einem pleomorphen Sarkom-Mausmodell große Unterschiede in der Wirksamkeit von BEZ-235 in Abhängigkeit der initialen Tumorgröße [175]. Sie empfehlen eine Anwendung von BEZ-235 nur im Rahmen einer minimalen Resterkrankung, in der eine sehr geringe Tumorlast vorhanden ist. Vermutlich ist die PI3K/mTOR-Inhibition nicht ausreichend, um eine Regression etablierter Tumore herbeizuführen. Studien zur Inhibition des Signalwegs mittels immunhistochemischen Färbungen an fixiertem Tumormaterial deuten auf ein Maximum der BEZ-235 Aktivität 1–6 Stunden nach Verabreichung hin. Nach 24 Stunden hingegen ist ein kompletter Rückgang der Signalwegsinhibition zu verzeichnen [163, 176]. Diese Daten wurden auch in unserem Modell über *ex vivo* Färbungen gegen P-S6rp im Knochenmark bestätigt. Nach einer 50%-Inhibition des P-S6rp Signals im FACS 6 Stunden nach Verabreichung lag die Aktivität 24 Stunden nach Verabreichung sogar höher als in den unbehandelten Tieren. Dies deutet auf eine Art Kompensationsmechanismus hin, durch den die Zelle der Inhibition gegensteuert. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von S6rp auch durch ERK-abhängige Kinasen wie p90RSK erfolgt [114]. Maira *et al.* stellten in einem subkutanen Prostata-Mausmodell eine sehr schnelle Aufnahme der Substanz in der Leber fest. In ihren pharmakokinetischen Analysen erreichte die Substanz einen *„steady-state“*-Level von 0,6 µM nach drei bis fünf Tagen bei täglicher Verabreichung [163]. Laut unseren *in vitro* Daten wäre diese Konzentration ausreichend, um in der verwendeten Zelllinie eine komplette Proliferationsinibition zu erzielen. Wie hoch die Konzentration in den Tumorzellen ist, ist bei gleicher Verabreichungsdosis zwischen subkutanen und orthotropen Xenograft Modellen jedoch nur schwer vergleichbar, da die Lokalisation des Tumors und die Stelle der Substanzverabeichung sich unterscheiden. Rahmani *et al.* veröffentlichten 2013 eine Studie, in der sie eine *in vivo* Testung von ABT-737 und von BEZ-235 unter Verwendung eines U937-abgeleiteten Xenograftmodells durchführten. In ihrer Studie zeigte BEZ-235 alleine keine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums. Da wir in unseren Studien jedoch zeigen konnten, dass nicht alle myeloischen Leukämie-Zelllinien eine Sensitivität gegenüber BEZ-235 aufweisen, sind die Unterschiede vermutlich in der verwendeten Zelllinie begründet. Die Zelllinie U937 stammt zudem nicht von einer

myeloischen Leukämie sondern von einem Lymphom mit Expression myeloischer Marker ab. Als Kontrolle für die orale Verabreichungsform verwendeten wir in unsere Studie AC220, einen selektiven FLT3-Inhibitor [75-79]. Da die MOLM-13 Zelllinie eine *FLT3*-ITD Mutation trägt, konnten starke Effekte dieser Substanz erwartet werden. In einem MV4-11 abgeleiteten subkutanen Modell wurde die starke *in vivo*-Aktivität für die verwendete Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht bereits gezeigt [79] und auch in unserem Modell bestätigt. Der FLT3-Inhibitor zeigte in unserer Studie zwar eine deutliche Reduktion der Leukämieprogression, konnte jedoch die Leukämie ebenfalls nicht vollständig aufhalten. Länger andauernde Therapien mit AC220 oder Sorafenib erzeugen in *FLT3*-ITD$^+$ Zellen häufig Resistenzmutationen in definierten Bereichen des *FLT3*-Gens, was für die klinische Anwendung große Probleme bereitet [187, 188]. In unseren Zellen konnten wir keine der bekannten Resistenzmutationen im *FLT3*-Gen feststellen (nicht gezeigte Daten). Die Therapie mit BEZ-235 wurde von den Mäusen trotz täglicher oraler Gabe über einen Zeitraum von 21 Tagen ohne Pause gut toleriert. Für die Behandlung mit AC220 hingegen konnten Nebenwirkungen beobachtet werden. Während das Gewicht unverändert blieb, verloren wir innerhalb der 21 Tage drei Tiere durch abdominale Blutungen. In den klinischen Phasen I und II wurde Thrombozytopenie als eine der häufigsten Grad 3/4 Nebenwirkungen in 15–21% der AC220-behandelten Patienten beobachtet [75, 77]. Es ist anzunehmen, dass die Tiere aufgrund mangelnder Gerinnungsfähigkeit durch die Einstichstelle der Nadel bei intraperitonaler Luziferinverabreichung verblutet sind. Da in dieser Studie keine Blutentnahmen für die Bestimmung von Gerinnungsfaktoren durchgeführt wurden, bleibt die Annahme spekulativ.

5.4. Verschiedene Mechanismen zur erhöhten Sensitivität *MLL*-rearrangierter Proben

In myeloischen Zelllinien konnten wir eine höhere AKT-Phosphorylierung in *MLL*-rearrangierten Zellen im Vergleich zu *MLL*-Wildtyp Zellen nachweisen. Dies wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Kampen *et al.* ebenfalls beschrieben [189]. Über Proteom-Profiling identifizierten sie in ihrer Studie im ersten Schritt Proteinaktivierungsprofile *MLL*-rerrangierter AML (n=9) im Vergleich zu gesundem

Knochenmark (n=5). Diese wurde in einem zweiten Schritt mit nicht-*MLL*-rearrangierten AML-Proben (n=5) verglichen, um die Spezifität für das *MLL*-Rearrangement aufzuzeigen. Hier fanden sie spezifische Phosphorylierungsmuster für AKT, CREB, RSK, STAT3 und MEK. Inzwischen gibt es einige wenige Studien, die einen möglichen Zusammenhang zwischen *MLL*-Rearrangements und der Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs aufzeigen. Ein beschriebener Mechanismus ist die Überexpression des Proto-Onkogens Evi-1. Der Transkriptionsfaktor Evi-1 ist auf Chromosom 3 lokalisiert und spielt eine nachgewiesene Rolle in der Leukämogenese *MLL*-rearrangierter AML [190-192]. Die Überexpression wird häufig durch Translokationen und Inversionen des Chromosoms 3 verursacht und ist assoziiert mit einer schlechten Prognose [193]. In einer großen Patientenkohorte wurde eine Evi-1-Überexpression in 43% aller *MLL*-rearrangierter AML-Patienten gezeigt. Über Microarray-Analysen bestätigten wir eine signifikante Überexpression in 38 *MLL*-rearrangierten Patientenproben im Vergleich zur Evi-1-Expression anderer zytogenetischer Gruppen. Yoshimi *et al.* demonstrierten in einem Mausmodell, dass Evi1 ein direkter Regulator der *PTEN*-Expression ist und diese bei Überexpression hemmt. Somit wird die negative Regulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch Evi-1 aufgehoben [190]. *In vivo* wurden Evi-1$^+$ leukämische Mäuse für die Behandlung mit Rapamycin sensitiviert. Neben dem Mechanismus einer PI3K/AKT/mTOR-Aktivierung über Evi-1 verfolgten wir zudem die Hypothese, dass begleitende Mutationen, die zur Aktivierung von Wachstumsfaktor-Signalwegen führen, eine gesteigerte Sensitivität *MLL*-rearrangierter AML hervorrufen könnten. Mutationen in der kleinen GTPase RAS sind in der AML mit einer Frequenz von ca. 11% (NRAS) bzw. 5% (KRAS) beschrieben worden [194, 195]. In unseren Analysen konnten wir eine höhere Frequenz in zytogenetisch normaler AML feststellen, die durch die Wahl alternativer Sequenziermethoden zu erklären ist. In vorherigen Studien wurden Mutationen über Sanger-Sequenzierung ermittelt, die eine weitaus geringere Tiefe erreicht und mit der es nicht möglich ist, Allelfrequenzen von unter 10% zu detektieren. Im veröffentlichten Cancer Genome Atlas wurden die Mutationsdaten über Exomsequenzierung erhoben [194]. Hierbei wird im Gegensatz zu unserer Amplicon-basierten Methode das gesamte Exom sequenziert, dies jedoch auch mit einer geringeren Sequenziertiefe. Der Unterschied der *RAS*-Mutationsfrequenz zwischen zytogenetisch normaler AML und *MLL*-rearrangierter AML war deutlich und

für die AML in Erwachsenen zu dem Zeitpunkt nicht bekannt. In späteren Studien von 2012 und 2013 wurde die *RAS*-Mutationsrate in *MLL*-rearrangierter AML bestätigt [196, 197]. Wir fanden Mutationen in den klassischen *Hotspot*-Exonen 12, 13 und 61. Diese Mutationen sind als aktivierende Mutationen beschrieben [195, 198-202]. Aktivierte RAS-GTPasen bleiben unabhängig von aktivierten Rezeptor-tyrosinkinasen in einem GTP-gebundenen Zustand und aktivieren neben dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Welcher Signal-weg im jeweiligen Zustand dominiert, ist nicht genau geklärt. Beide Signalwege ergänzen sich in ihrer Proliferation-und Überlebensunterstützenden Wirkung in der Zelle. Patienten, die ein *MLL*-Rearrangement und eine *RAS*-Mutation tragen, könnten daher von gerichteter Therapie gegen den PI3K-Signalweg profitieren, da sie aufgrund des genetischen Hintergrunds von diesem Signalweg abhängiger sind als andere Zellen.

5.5. Kreuzaktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalwegs

Der duale Inhibitor BEZ-235 war *in vivo* in der Lage, die Leukämieausbreitung zu Beginn des Therapiefensters zu verzögern, konnte eine manifestierte Tumorlast jedoch nicht mehr reduzieren. In Absatz 5.3. wurde bereits dargelegt, dass Resistenzmechanismen bei zielgerichteten Therapien auftreten können, die den Einsatz dieser Substanzen in der klinischen Anwendung als Monotherapie erschweren. Ein inzwischen gut untersuchtes Beispiel sind die in Absatz 5.3. erwähnten Resistenzmutationen im *FLT3*-Gen, die durch Monotherapie mit einem FLT3-Inhibitor entstehen und in der klinischen Anwendung zu Problemen führen. Neben der Entwicklung von Resistenzmutationen besitzen Krebszellen auch andere Resistenzmechanismen. In einer Brustkrebsstudie wurde beschrieben, dass die Behandlung mit BEZ-235 zu einer erhöhten JAK2/STAT5-Aktivierung führt, die der PI3K/mTORC1/2-Inhibition entgegensteuert und die Proliferationsfähigkeit der Zelle aufrechterhält [203]. Wir fanden ähnliche Mechanismen auch in myeloischen Zell-linien. Über Western Blot Analysen konnten wir zeigen, dass eine mehrstündige Inkubation mit BEZ-235 in myeloischen Leukämiezelllinien zu einer gesteigerten Aktivierung von ERK führt. Diese war konzentrations- und zeitabhängig zu beobachten. Umgekehrt erhöhte die Inhibition des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs

auch die Phosphorylierung von AKT. Die Zellen sind dazu in der Lage, unter Inhibition ihres präferentiellen Signalwegs auf den alternativen Signalweg zu wechseln, um ihr Proliferationspotenzial aufrechtzuerhalten. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die limitierte Wirksamkeit von Inhibitoren eines Signalwegs geben. Aufgrund dieser Tatsache vermuteten wir einen Mehreffekt der PI3K/mTORC1/2-Inhibition, wenn diese mit einem MEK-Inhibitor kombiniert wird. Über Western Blot konnten wir zeigen, dass die Kombination beider Substanzen eine Kreuzaktivierung verhindert. Analog dazu zeigte die Kombination in einigen Zelllinien auch eine deutlich synergistische Wirkung in den Apoptoseversuchen. Hier konnten keine Unterscheide zwischen *MLL*-rearrangierten und *MLL*-Wildtyp Zelllinien festgestellt werden. Dies bedeutet, dass auch Zelllinien, die nicht empfindlich gegenüber einer PI3K/mTOR-Inhibition sind, durch eine Kombination mit dem MEK-Inhibitor sensitiviert werden können. Unterschiedliche Zelllinien haben unterschiedliche Präferenzen für proliferations- und überlebensfördernde Signalwege, nutzen jedoch nie ausschließlich einen davon. Aufgrund limitierter Materialverfügbarkeit konnte bisher nur in einer primären AML-Patientenprobe eine Kombinationsstudie erfolgen. Die Analyse weiterer Patientenproben wäre eine wichtige Ergänzung zu den humanen Zelllinien.

6. Ausblick

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, handelt es sich bei der AML um eine sehr heterogene Erkrankung, die sich in ihrer Prognose für den einzelnen Patienten stark unterscheiden kann. Die Prognose ist abhängig von Faktoren wie dem Alter und den zytogenetischen und molekulargenetischen Aberrationen. Trotz der großen Heterogenität wird die Mehrheit der Patienten nach einem gemeinsamen Standardschema therapiert. Die „personalisierte Therapie“ will dies ändern. Die Erkenntnis über Oberflächenmarker, Genexpressionsmuster und genetischem Hintergrund des Patienten soll nicht nur zur Erstellung einer Diagnose und der Prognose genutzt werden, sondern soll es ermöglichen, die Therapie an den Patienten anzupassen und an diesen Merkmalen auszurichten. Bei soliden Tumoren finden sich bereits einige Vorstöße in diese Richtung. Brustkrebspatienten, die eine Überexpression des EGF-Rezeptors HER2 auf der Oberfläche der Tumorzelle aufweisen, werden über eine Immuntherapie mit dem HER2-Antikörper Herceptin® behandelt. Dieser kann in Kombination mit einer Chemotherapie oder als alleiniger Wirkstoff verabreicht werden [204, 205]. Ähnlich dazu können Patienten mit Darmkrebs, bei denen eine Überexpression des EGFR nachweisbar ist, mit dem Antikörper Erbitux® behandelt [206]. Im Lungenkrebs sind Aberrationen im FGFR häufig. Neuste Studien zeigen, dass der Wirkstoff PD173074 diese Zellen gezielt adressiert [207, 208]. Bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems ist das Medikamt Gleevec® das prominenteste Beispiel. CML-Patienten mit einer konstitutiv aktivierten ABL-Kinase werden als Erstlinientherapie mit diesem spezifischen Inhibitor therapiert [72, 73]. Häufige Ziele personalisierter Therapien sind Oberflächenrezeptoren, die konstitutiv aktiviert oder überexprimiert sind. Aber auch abwärts gelegene Proteine können eine Zielstruktur für Therapien darstellen. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg stellt neben dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg ein Beispiel dar. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs in der AML zu beobachten ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien bestätigten dies. Primäre AML-Blasten sowie murine und humane myeloische Leukämie-Zelllinien mit *MLL*-Rearrangements zeigten ein stark reduziertes Wachstum und die Initiation des Zelltods, wenn sie mit dem dualen PI3K/mTOR Inhibitor BEZ-235 behandelt wurden. *In viv*o zeigte die Substanz bei

täglicher oraler Verabreichung im Mausmodell ebenfalls antileukämische Wirkung. Es war jedoch nicht möglich, eine bereits vorhandene Tumorlast zurückzudrängen, lediglich ein verlangsamtes Wachstum konnte erreicht werden. Leukämie wird jedoch meist erst diagnostiziert, wenn im Patienten bereits eine sehr hohe Tumorlast vorliegt. Vermutlich wäre BEZ-235 nicht dazu in der Lage, die Tumorlast in dem Maße zu reduzieren, wie es einer Chemotherapie gelingt. Als Erstlinientherapie wäre der Wirkstoff daher ungeeignet. Hochdosis-Chemotherapie verhilft jungen AML-Patienten zu einem besseren Ansprechen und erhöhtem Langzeitüberleben, ältere Menschen tolerieren die hohen Dosen häufig nicht mehr. Eine Kombinationstherapie von BEZ-235 mit Zytostatika wäre denkbar. In der „*minimal residual disease*“ (MRD) - Situation zeigt sich der Patient in der morphologisch kompletten Remission, residuale Tumorzellen existieren jedoch häufig noch und führen zum Rückfall der Erkrankung. Auch in diesem Fall sind Einsatzmöglichkeiten für diesen Inhibitor denkbar.

7. Zusammenfassung

In der akuten myeloischen Leukämie (AML) sind wachstums- und überlebensfördernde Signalwege der Zelle als Folge molekulargenetischer und zytogenetischer Aberrationen häufig fehlreguliert. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist ein Beispiel für einen Signalweg, der in vielen Tumorentitäten eine Rolle spielt und auch in der AML zeigen 50-70% aller Patienten eine konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs. Daher stellt er eine vielversprechende Angriffsstelle für zielgerichtete Therapien dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in der AML untersucht. Hierbei wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Analysen durchgeführt. In primären AML-Blasten sowie in murinen und humanen AML-Zelllinien konnte ein großes Spektrum zytotoxischer Wirkung für kleinmolekulare Inhibitoren von AKT (MK-2206), mTORC1 (Rapamycin) und des dualen PI3K/mTOR-Inhibitors (BEZ-235) beobachtet werden. Der duale Inhibitor zeigte im Vergleich zu den Einzelinhibitoren in allen Modellsystemen die größte Aktivität. Besonders solche Proben, die ein *MLL*-Rearrangement trugen, zeigten sich sensitiv gegenüber dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ-235. Unter Verwendung eines AML-Xenograft-Mausmodells als *in vivo*-Behandlungsmodell konnten das Tumorwachstum sowie die Tumorlast signifikant reduziert und das Überleben der Tiere insgesamt verlängert werden. Zur näheren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen *MLL*-Rearrangements und erhöhter Sensitivität gegenüber BEZ-235 wurde in 38 *MLL-AF9*$^+$ AML-Patientenproben und in 125 AML-Patientenproben mit normalem Karyotyp (NK) ein sogenanntes *„Targeted amplicon sequencing“* zur Detektion Leukämie-relevanter Mutationen durchgeführt. In 76% der Patienten waren zusätzliche Mutationen in Genen detektierbar, die im Zusammenhang mit der Wachstumsfaktors-Signalgebung eine Rolle spielen (darunter Mutationen in *RAS*, *FLT3* und *CBL*). Besonders auffällig war die große Häufigkeit an *RAS*-Mutationen, die in der *MLL-AF9*$^+$-Kohorte mit 58% signifikant höher lag als in der Kohorte mit NK-AML (25%). Die Assoziation der *MLL*-Rearrangements und der hohen Mutationsrate in Genen, die wichtige Funktionen in der Wachstumsfaktor-Signalgebung spielen, könnte eine Erklärung für die hohe Sensitivität gegenüber kleinmolekularen Inhibitoren gegen den PI3K-Signalweg sein. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Patienten mit einem *MLL*-

Rearrangement eine hohe Expression des Proto-Onkogens *Evi-1* aufweisen. Im Falle einer Überexpression aktiviert der Transkriptionsfaktor Evi-1 den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg über die direkte Repression von PTEN. In der Vergangenheit zeigten verschiedene Studien mit kleinmolekularen Inhibitoren, dass die Zellen über verschiedene Resistenzmechanismen verfügen, darunter Resistenzmutationen oder eine verstärkte Signalgebung über alternative Signalwege. In humanen AML-Zelllinien konnte in dieser Arbeit eine Kreuzaktivierung des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs nach Behandlung mit BEZ-235 beobachtet werden. Umgekehrt war die Signalgebung über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg erhöht durch Inhibition von MEK mit dem Inhibitor AZD-6244. Eine Kombination von BEZ-235 und AZD-6244 war dazu in der Lage, die Kreuzaktivierung aufzuheben und hoch synergistische Effekte in der Induktion von Apoptose hervorzurufen. In einer primären AML-Patientenprobe mit *MLL-AF10*-Rearrangement und einer *KRAS* G12D-Mutation konnte dies bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeiten weisen einen potenziellen therapeutischen Nutzen der PI3K/AKT/mTOR-Inhibition in der AML auf, besonders für die Kohorte mit *MLL*-Rearrangement und zusätzlicher Mutation in einem Gen, das für die Wachstumsfaktor-Signalgebung wichtig ist. Die Kombination mit Substanzen, die alternative Signalwege wie z.B. den ERK-Signalweg inhibieren, könnte die therapeutische Aktivität PI3K/AKT/mTOR-gerichteter Therapien in der AML noch weiter verbessern.

8. Abstract

In acute myeloid leukemia (AML), several signaling pathways are deregulated as a consequence of mutations and cytogenetic abnormalities. Among them is the PI3K/AKT/mTOR signaling axis which is constitutively activated in 50–70% of all AML patients. Thus, this signaling axis is seen as a promising target for improved targeted therapies. In this thesis, the relevance of the PI3K/AKT/mTOR axis in AML was examined using *in vitro* and *in vivo* models. By analyzing primary AML samples, human and murine myeloid leukemia cell lines, a wide spectrum of cytotoxic activity for single small molecule inhibitors of AKT (MK-2206), mTORC1 (Rapamycin) and of a dual PI3K/mTORC1/2 inhibitor (BEZ-235) was observed. Especially cells carrying an *MLL*-rearrangement had a high sensitivity towards dual PI3K/mTORC1/2-inhibition. Using an AML xenograft mouse model as an *in vivo* treatment model, significantly delayed tumor progression, reduced tumor load and prolonged survival in mice treated with a dual PI3K/mTOR inhibitor was observed. Targeted amplicon sequencing was performed in 38 *MLL-AF9* rearranged AML patient samples and 125 cytogenetically normal-(CN-) AML patient samples. In 76% additional mutations in growth factor-signaling (GFS)-related genes (such as *RAS, FLT3* and *CBL*) were found. Especially mutations in *RAS* occurred in a high frequency of 58% compared with 25% in CN- AML patient samples. The association of *MLL*-rearrangements and the high frequency rate for mutations in GFS-related genes could explain a higher sensitivity of *MLL*-rearranged samples. By microarray analysis we detected a high expression of the proto-oncogene *Evi-1*, which, if it is overexpressed, activates PI3K/AKT/mTOR signaling. In myeloid leukemia cell lines we observed a cross-activation of RAS/RAF/MEK/ERK-signaling after BEZ-235 treatment. Vice-versa, PI3K/AKT/mTOR signaling was increased after treatment with the MEK-inhibitor AZD-6244. Combination treatment with both BEZ-235 and AZD-6244 could overcome this cross-activation and highly synergistic effects in apoptosis could be observed. Those data were also confirmed in one patient sample carrying an *MLL-AF10*-rearrangement and an additional *KRAS* G12D mutation. Our data implicate a possible therapeutic benefit of PI3K/AKT/mTOR inhibition in AML especially in the *MLL*-rearranged and GFS-mutated subgroup. Combination of PI3K/mTOR inhibitors

with drugs inhibiting rescue pathways such as the ERK pathway could improve the therapeutic efficacy of targeted therapies in AML.

9. Referenzen

1. *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* , B. Robert Koch-Institut, Editor. 2006.
2. Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttmann-Schweiger, N., Caspritz, S., Cernaj, J., Dahm, S., Ernst, A., Folkert, J., Franke, M., Haberland, J., Hansmann, J., Kanzhöfer, K., Kraywinkel, K., Krieghoff-Hennung, E., Kunz, B., Laudi, A., Luttmann, S., Penzkofer, A., Meisegeier, S., Richter, M., Schönfeld, I., Stegmaier, C., Stöcker, M., Treml, K., Wienecke, A., Wittenberg, K., Wolf, U., *Krebs in Deutschland 2009/2010.* Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013.
3. Steffen, B., et al., *The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia.* Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **56**(2): p. 195-221.
4. Vardiman, J.W., et al., *The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.* Blood, 2009. **114**(5): p. 937-51.
5. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group.* Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
6. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.* Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
7. Mrozek, K., N.A. Heerema, and C.D. Bloomfield, *Cytogenetics in acute leukemia.* Blood Rev, 2004. **18**(2): p. 115-36.
8. Grimwade, D., *The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia.* Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(3): p. 497-529.
9. Slovak, M.L., et al., *Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study.* Blood, 2000. **96**(13): p. 4075-83.
10. Suciu, S., et al., *Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial.* Blood, 2003. **102**(4): p. 1232-40.
11. Cornelissen, J.J., et al., *Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom?* Blood, 2007. **109**(9): p. 3658-66.
12. Basara, N., et al., *Early related or unrelated haematopoietic cell transplantation results in higher overall survival and leukaemia-free survival compared with conventional chemotherapy in high-risk acute myeloid leukaemia patients in first complete remission.* Leukemia, 2009. **23**(4): p. 635-40.

13. How, J., et al., *The prognostic impact of FLT3-ITD and NPM1 mutations in patients with relapsed acute myeloid leukemia and intermediate-risk cytogenetics.* Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e116.
14. Bacher, U., et al., *Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients.* Blood, 2008. **111**(5): p. 2527-37.
15. Schlenk, R.F., et al., *Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2008. **358**(18): p. 1909-18.
16. Whitman, S.P., et al., *Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study.* Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7233-9.
17. Liu, Y., et al., *Prognostic significance of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: A meta-analysis.* Mol Clin Oncol, 2014. **2**(2): p. 275-281.
18. Falini, B., et al., *Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.* N Engl J Med, 2005. **352**(3): p. 254-66.
19. Falini, B., et al., *Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features.* Blood, 2007. **109**(3): p. 874-85.
20. Dohner, K., et al., *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations.* Blood, 2005. **106**(12): p. 3740-6.
21. Schnittger, S., et al., *Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype.* Blood, 2005. **106**(12): p. 3733-9.
22. Frohling, S., et al., *CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations.* J Clin Oncol, 2004. **22**(4): p. 624-33.
23. Preudhomme, C., et al., *Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA).* Blood, 2002. **100**(8): p. 2717-23.
24. Liersch, R., et al., *Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults - biological significance and clinical use.* Br J Haematol, 2014. **165**(1): p. 17-38.
25. Thirman, M.J., et al., *Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.* N Engl J Med, 1993. **329**(13): p. 909-14.
26. Tkachuk, D.C., S. Kohler, and M.L. Cleary, *Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias.* Cell, 1992. **71**(4): p. 691-700.
27. Djabali, M., et al., *A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias.* Nat Genet, 1992. **2**(2): p. 113-8.
28. Krivtsov, A.V. and S.A. Armstrong, *MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development.* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 823-33.
29. Muntean, A.G. and J.L. Hess, *The pathogenesis of mixed-lineage leukemia.* Annu Rev Pathol, 2012. **7**: p. 283-301.
30. Meyer, C., et al., *New insights to the MLL recombinome of acute leukemias.* Leukemia, 2009. **23**(8): p. 1490-9.

31. Meyer, C., et al., *The MLL recombinome of acute leukemias in 2013.* Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2165-76.
32. Avet-Loiseau, H., et al., *Amplification of the 11q23 region in acute myeloid leukemia.* Genes Chromosomes Cancer, 1999. **26**(2): p. 166-70.
33. Reddy, K.S., et al., *Segmental amplification of 11q23 region identified by fluorescence in situ hybridization in four patients with myeloid disorders: a review.* Cancer Genet Cytogenet, 2001. **126**(2): p. 139-46.
34. Caligiuri, M.A., et al., *Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations.* Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 370-3.
35. Basecke, J., et al., *The MLL partial tandem duplication in acute myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 2006. **135**(4): p. 438-49.
36. Milne, T.A., et al., *MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1107-17.
37. Nakamura, T., et al., *ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1119-28.
38. Ringrose, L. and R. Paro, *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins.* Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 413-43.
39. Yu, B.D., et al., *MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10632-6.
40. Yu, B.D., et al., *Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice.* Nature, 1995. **378**(6556): p. 505-8.
41. Jude, C.D., et al., *Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors.* Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 324-37.
42. Hsieh, J.J., E.H. Cheng, and S.J. Korsmeyer, *Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression.* Cell, 2003. **115**(3): p. 293-303.
43. Hsieh, J.J., et al., *Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(1): p. 186-94.
44. Yokoyama, A., et al., *The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis.* Cell, 2005. **123**(2): p. 207-18.
45. Yokoyama, A. and M.L. Cleary, *Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes.* Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 36-46.
46. Grembecka, J., et al., *Molecular basis of the mixed lineage leukemia-menin interaction: implications for targeting mixed lineage leukemias.* J Biol Chem, 2010. **285**(52): p. 40690-8.
47. Cierpicki, T., et al., *Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia.* Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(1): p. 62-8.
48. Erfurth, F.E., et al., *MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7517-22.
49. Allen, M.D., et al., *Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histone methyltransferase.* EMBO J, 2006. **25**(19): p. 4503-12.

50. Birke, M., et al., *The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(4): p. 958-65.
51. Milne, T.A., et al., *Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis.* Mol Cell, 2010. **38**(6): p. 853-63.
52. Muntean, A.G., et al., *The PAF complex synergizes with MLL fusion proteins at HOX loci to promote leukemogenesis.* Cancer Cell, 2010. **17**(6): p. 609-21.
53. Chen, J., et al., *Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization.* Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6199-207.
54. Chang, P.Y., et al., *Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription.* J Mol Biol, 2010. **400**(2): p. 137-44.
55. Hom, R.A., et al., *Molecular mechanism of MLL PHD3 and RNA recognition by the Cyp33 RRM domain.* J Mol Biol, 2010. **400**(2): p. 145-54.
56. Ernst, P., et al., *MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(7): p. 2249-58.
57. Dou, Y., et al., *Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components.* Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(8): p. 713-9.
58. Dou, Y., et al., *Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF.* Cell, 2005. **121**(6): p. 873-85.
59. DiMartino, J.F., et al., *The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10.* Blood, 2002. **99**(10): p. 3780-5.
60. DiMartino, J.F., et al., *A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL.* Blood, 2000. **96**(12): p. 3887-93.
61. Slany, R.K., C. Lavau, and M.L. Cleary, *The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 122-9.
62. Mohan, M., et al., *Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis.* Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 721-8.
63. Muntean, A.G., et al., *The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation.* Blood, 2008. **112**(12): p. 4690-3.
64. Bernt, K.M., et al., *MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L.* Cancer Cell, 2011. **20**(1): p. 66-78.
65. Deshpande, A.J., et al., *Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l.* Blood, 2013. **121**(13): p. 2533-41.
66. Nguyen, A.T., et al., *DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis.* Blood, 2011. **117**(25): p. 6912-22.
67. Martin, M.E., et al., *Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells.* Cancer Cell, 2003. **4**(3): p. 197-207.
68. Whitman, S.P., et al., *DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication.* Blood, 2008. **112**(5): p. 2013-6.
69. Estey, E. and H. Dohner, *Acute myeloid leukaemia.* Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-907.

70. Lowenberg, B., J.D. Griffin, and M.S. Tallman, *Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 82-101.
71. Stapnes, C., et al., *Targeted therapy in acute myeloid leukaemia: current status and future directions.* Expert Opin Investig Drugs, 2009. **18**(4): p. 433-55.
72. Savage, D.G. and K.H. Antman, *Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy.* N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 683-93.
73. Gora-Tybor, J. and T. Robak, *Targeted drugs in chronic myeloid leukemia.* Curr Med Chem, 2008. **15**(29): p. 3036-51.
74. Knapper, S., *The clinical development of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia.* Expert Opin Investig Drugs, 2011. **20**(10): p. 1377-95.
75. Altman, J.K.F., J.M.; Pratz, K.W.; Trone, D.; Gammon, G.; Cortes, J.E. and Tallman M.S., *Results Of a Phase 1 Study Of Quizartinib (AC220, ASP2689) In Combination With Induction and Consolidation Chemotherapy In Younger Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia* 55th ASH Annual Meeting, 2013. **Abstract 623**.
76. Kampa-Schittenhelm, K.M., et al., *Quizartinib (AC220) is a potent second generation class III tyrosine kinase inhibitor that displays a distinct inhibition profile against mutant-FLT3, -PDGFRA and -KIT isoforms.* Mol Cancer, 2013. **12**: p. 19.
77. Levis, M.J.P., A.E.; Dombret, H.; Döhner, H.; Steffen, B.; Rousselot, P.; Martinelli, G.; Estey, E.H.; Burnett, A.K.; Gammon, G.; Trone, D.; Leo, E. and Cortes E.J., *Final Results of a Phase 2 Open-Label, Monotherapy Efficacy and Safety Study of Quizartinib (AC220) in Patients with FLT3-ITD Positive or Negative Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia After Second-Line Chemotherapy or Hematopoietic Stem Cell Transplantation* 54th ASH Annual Meeting, 2012.
78. Ostronoff, F. and E. Estey, *The role of quizartinib in the treatment of acute myeloid leukemia.* Expert Opin Investig Drugs, 2013. **22**(12): p. 1659-69.
79. Zarrinkar, P.P., et al., *AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML).* Blood, 2009. **114**(14): p. 2984-92.
80. Guzman, M.L., et al., *Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells.* Blood, 2001. **98**(8): p. 2301-7.
81. Muller-Tidow, C., et al., *Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2890-904.
82. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells.* Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-14.
83. Simon, M., et al., *Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia.* Oncogene, 2005. **24**(14): p. 2410-20.
84. Lu, F.L., et al., *Sonic hedgehog antagonists induce cell death in acute myeloid leukemia cells with the presence of lipopolysaccharides, tumor necrosis factor-alpha, or interferons.* Invest New Drugs, 2013. **31**(4): p. 823-32.
85. Zhao, C., et al., *Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia.* Nature, 2009. **458**(7239): p. 776-9.

86. Ligresti, G., et al., *PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches.* Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1352-8.
87. Samuels, Y., et al., *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers.* Science, 2004. **304**(5670): p. 554.
88. Kang, S., A.G. Bader, and P.K. Vogt, *Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 802-7.
89. Kang, S., et al., *Mutated PI 3-kinases: cancer targets on a silver platter.* Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 578-81.
90. Engelman, J.A., *Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 550-62.
91. Hawkins, P.T., et al., *Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells.* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 647-62.
92. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme.* Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
93. Klippel, A., et al., *The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2675-85.
94. Martelli, A.M., et al., *Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway.* Leukemia, 2011. **25**(7): p. 1064-79.
95. Park, S., et al., *Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia.* Haematologica, 2010. **95**(5): p. 819-28.
96. Domchek, S.M., et al., *Inhibition of SH2 domain/phosphoprotein association by a nonhydrolyzable phosphonopeptide.* Biochemistry, 1992. **31**(41): p. 9865-70.
97. Pawson, T., *Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems.* Cell, 2004. **116**(2): p. 191-203.
98. Datta, K., et al., *Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells.* J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30835-9.
99. Scheid, M.P., P.A. Marignani, and J.R. Woodgett, *Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6247-60.
100. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream.* Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
101. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival.* Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 177-82.
102. Franke, T.F., *PI3K/Akt: getting it right matters.* Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6473-88.
103. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
104. Gardai, S.J., et al., *Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis in neutrophils.* J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21085-95.
105. Zhang, X., et al., *Akt, FoxO and regulation of apoptosis.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.

106. Dan, H.C., et al., *Akt-dependent regulation of NF-{kappa}B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK.* Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1490-500.
107. Ogawara, Y., et al., *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53.* J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21843-50.
108. Castellano, E. and J. Downward, *Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase.* Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **346**: p. 143-69.
109. Orme, M.H., et al., *Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in Drosophila.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1298-302.
110. Pacold, M.E., et al., *Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma.* Cell, 2000. **103**(6): p. 931-43.
111. Suire, S., et al., *Gbetagammas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1303-9.
112. Tamburini, J., et al., *Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways.* Blood, 2008. **111**(1): p. 379-82.
113. Chapuis, N., et al., *Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody.* Haematologica, 2010. **95**(3): p. 415-23.
114. Roux, P.P., et al., *RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation.* J Biol Chem, 2007. **282**(19): p. 14056-64.
115. Castellano, E. and J. Downward, *RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway.* Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 261-74.
116. Cancer Genome Atlas Research, N., *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
117. Carpten, J.D., et al., *A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer.* Nature, 2007. **448**(7152): p. 439-44.
118. Keniry, M. and R. Parsons, *The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy.* Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5477-85.
119. Garcia, J.M., et al., *Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer.* Genes Chromosomes Cancer, 2004. **41**(2): p. 117-24.
120. Goel, A., et al., *Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers.* Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3014-21.
121. Kim, M.S., et al., *Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias.* Br J Cancer, 2008. **98**(9): p. 1533-5.
122. Luo, J.M., et al., *Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2003. **17**(1): p. 1-8.
123. Bousquet, M., et al., *Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia.* Br J Haematol, 2005. **131**(3): p. 411-3.
124. Doepfner, K.T., O. Spertini, and A. Arcaro, *Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia*

cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. Leukemia, 2007. **21**(9): p. 1921-30.
125. Tazzari, P.L., et al., *The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion.* Leukemia, 2007. **21**(5): p. 886-96.
126. Wahner Hendrickson, A.E., et al., *Expression of insulin receptor isoform A and insulin-like growth factor-1 receptor in human acute myelogenous leukemia: effect of the dual-receptor inhibitor BMS-536924 in vitro.* Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7635-43.
127. Bohm, A., et al., *Targeting of mTOR is associated with decreased growth and decreased VEGF expression in acute myeloid leukaemia cells.* Eur J Clin Invest, 2009. **39**(5): p. 395-405.
128. Chapuis, N., et al., *Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(22): p. 5424-35.
129. Schult, C., et al., *The dual kinase inhibitor NVP-BEZ235 in combination with cytotoxic drugs exerts anti-proliferative activity towards acute lymphoblastic leukemia cells.* Anticancer Res, 2012. **32**(2): p. 463-74.
130. Duarte, V.M., et al., *Curcumin enhances the effect of cisplatin in suppression of head and neck squamous cell carcinoma via inhibition of IKKbeta protein of the NFkappaB pathway.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**(10): p. 2665-75.
131. Hu, S., et al., *Activity of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with cytarabine in acute myeloid leukemia.* J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(11): p. 893-905.
132. Xie, C., et al., *Panobinostat enhances cytarabine and daunorubicin sensitivities in AML cells through suppressing the expression of BRCA1, CHK1, and Rad51.* PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79106.
133. Bai, H., et al., *Involvement of miR-21 in resistance to daunorubicin by regulating PTEN expression in the leukaemia K562 cell line.* FEBS Lett, 2011. **585**(2): p. 402-8.
134. Jordheim, L.P., et al., *Sensitivity and gene expression profile of fresh human acute myeloid leukemia cells exposed ex vivo to AS602868.* Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(1): p. 97-105.
135. O'Reilly, K.E., et al., *Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo.* Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(11): p. 1429-50.
136. Hirai, H., et al., *MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**(7): p. 1956-67.
137. Konopleva, M.Y., et al., *Preclinical and Early Clinical Evaluation of the Oral AKT Inhibitor, MK-2206, for the Treatment of Acute Myelogenous Leukemia.* Clin Cancer Res, 2014.
138. Neri, L.M., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential.* Leukemia, 2014. **28**(4): p. 739-48.
139. Gandhirajan, R.K., et al., *Small molecule inhibitors of Wnt/beta-catenin/lef-1 signaling induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo.* Neoplasia, 2010. **12**(4): p. 326-35.

140. Minke, K.S., et al., *Small molecule inhibitors of WNT signaling effectively induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells.* Eur J Haematol, 2009. **82**(3): p. 165-75.
141. Xu, Q., J.E. Thompson, and M. Carroll, *mTOR regulates cell survival after etoposide treatment in primary AML cells.* Blood, 2005. **106**(13): p. 4261-8.
142. Rahmani, M., et al., *The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis in highly imatinib mesylate-resistant bcr/abl+ human leukemia cells in association with signal transducer and activator of transcription 5 inhibition and myeloid cell leukemia-1 down-regulation.* Mol Pharmacol, 2007. **72**(3): p. 788-95.
143. Bhende, P.M., et al., *The dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, is efficacious against follicular lymphoma.* Leukemia, 2010. **24**(10): p. 1781-4.
144. Cao, P., et al., *Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BEZ235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts.* Br J Cancer, 2009. **100**(8): p. 1267-76.
145. Santiskulvong, C., et al., *Dual targeting of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin using NVP-BEZ235 as a novel therapeutic approach in human ovarian carcinoma.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2373-84.
146. Cohen, S.S., *The mechanisms of lethal action of arabinosyl cytosine (araC) and arabinosyl adenine (araA).* Cancer, 1977. **40**(1 Suppl): p. 509-18.
147. Crump, M., et al., *A randomized phase I clinical and biologic study of two schedules of sorafenib in patients with myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: a NCIC (National Cancer Institute of Canada) Clinical Trials Group Study.* Leuk Lymphoma, 2010. **51**(2): p. 252-60.
148. Zhang, W., et al., *Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia.* J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(3): p. 184-98.
149. Khan, N.I. and L.J. Bendall, *Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis.* Histol Histopathol, 2006. **21**(7): p. 761-74.
150. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity.* J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-8.
151. Ok, C.Y., R.R. Singh, and F. Vega, *Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms.* Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 2-11.
152. Lin, T.L., et al., *Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926.* PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15262.
153. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles.* Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
154. Tibes, R., et al., *PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation.* Br J Haematol, 2008. **140**(3): p. 344-7.
155. Grandage, V.L., et al., *PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways.* Leukemia, 2005. **19**(4): p. 586-94.
156. Martelli, A.M., et al., *Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous*

leukemia therapy: from bench to bedside. Curr Med Chem, 2007. **14**(19): p. 2009-23.
157. Min, Y.H., et al., *Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable.* Leukemia, 2003. **17**(5): p. 995-7.
158. Xu, Q., et al., *Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation.* Blood, 2003. **102**(3): p. 972-80.
159. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery.* Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.
160. Polak, R. and M. Buitenhuis, *The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia.* Blood, 2012. **119**(4): p. 911-23.
161. Lindsley, C.W., *The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation: a 2009 update.* Curr Top Med Chem, 2010. **10**(4): p. 458-77.
162. Pal, S.K., et al., *Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer.* Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(11): p. 1355-66.
163. Maira, S.M., et al., *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1851-63.
164. Potemski, P., et al., *Ki-67 expression in operable breast cancer: a comparative study of immunostaining and a real-time RT-PCR assay.* Pathol Res Pract, 2006. **202**(7): p. 491-5.
165. Wiesner, F.G., et al., *Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients.* Breast, 2009. **18**(2): p. 135-41.
166. Yerushalmi, R., et al., *Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential.* Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 174-83.
167. Yamamoto, S., et al., *Clinical relevance of Ki67 gene expression analysis using formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer specimens.* Breast Cancer, 2013. **20**(3): p. 262-70.
168. Krupka, C., et al., *CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell-engaging antibody AMG 330.* Blood, 2014. **123**(3): p. 356-65.
169. Lavau, C., et al., *Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL.* EMBO J, 1997. **16**(14): p. 4226-37.
170. Somervaille, T.C. and M.L. Cleary, *Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia.* Cancer Cell, 2006. **10**(4): p. 257-68.
171. Bach, C., et al., *Alterations of the CxxC domain preclude oncogenic activation of mixed-lineage leukemia 2.* Oncogene, 2009. **28**(6): p. 815-23.
172. Cozzio, A., et al., *Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors.* Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3029-35.
173. Reddy, E.P., et al., *IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2532-47.
174. Blaser, B., et al., *Antitumor activities of ATP-competitive inhibitors of mTOR in colon cancer cells.* BMC Cancer, 2012. **12**: p. 86.

175. Kim, S., et al., *Efficacy of phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors in a primary mouse model of undifferentiated pleomorphic sarcoma.* Sarcoma, 2012. **2012**: p. 680708.
176. Shoji, K., et al., *Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37431.
177. Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice.* Cancer Chemother Pharmacol, 1989. **24**(3): p. 148-54.
178. Ehrhardt, H., et al., *Optimized anti-tumor effects of anthracyclines plus Vinca alkaloids using a novel, mechanism-based application schedule.* Blood, 2011. **118**(23): p. 6123-31.
179. Liem, N.L., et al., *Characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia xenograft models for the preclinical evaluation of new therapies.* Blood, 2004. **103**(10): p. 3905-14.
180. McCormack, E., O. Bruserud, and B.T. Gjertsen, *Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives.* Leukemia, 2005. **19**(5): p. 687-706.
181. Terziyska, N., et al., *In vivo imaging enables high resolution preclinical trials on patients' leukemia cells growing in mice.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52798.
182. Lyons, S.K., *Advances in imaging mouse tumour models in vivo.* J Pathol, 2005. **205**(2): p. 194-205.
183. O'Neill, K., et al., *Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research.* J Pathol, 2010. **220**(3): p. 317-27.
184. Manara, M.C., et al., *NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas.* Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 530-40.
185. Migliardi, G., et al., *Inhibition of MEK and PI3K/mTOR suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in patient-derived xenografts of RAS-mutant colorectal carcinomas.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(9): p. 2515-25.
186. Roberts, P.J., et al., *Combined PI3K/mTOR and MEK inhibition provides broad antitumor activity in faithful murine cancer models.* Clin Cancer Res, 2012. **18**(19): p. 5290-303.
187. Kesarwani, M., E. Huber, and M. Azam, *Overcoming AC220 resistance of FLT3-ITD by SAR302503.* Blood Cancer J, 2013. **3**: p. e138.
188. Smith, C.C., et al., *Activity of ponatinib against clinically-relevant AC220-resistant kinase domain mutants of FLT3-ITD.* Blood, 2013. **121**(16): p. 3165-71.
189. Kampen, K.R., et al., *Insights in dynamic kinome reprogramming as a consequence of MEK inhibition in MLL-rearranged AML.* Leukemia, 2014. **28**(3): p. 589-99.
190. Yoshimi, A., et al., *Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins.* Blood, 2011. **117**(13): p. 3617-28.
191. Lugthart, S., et al., *High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated.* Blood, 2008. **111**(8): p. 4329-37.
192. Ho, P.A., et al., *High EVI1 expression is associated with MLL rearrangements and predicts decreased survival in paediatric acute myeloid leukaemia: a*

report from the children's oncology group. Br J Haematol, 2013. **162**(5): p. 670-7.
193. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., et al., *High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients.* Blood, 2003. **101**(3): p. 837-45.
194. The Cancer Genome Atlas Research, N., *Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia.* N Engl J Med, 2013.
195. Ward, A.F., B.S. Braun, and K.M. Shannon, *Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies.* Blood, 2012. **120**(17): p. 3397-406.
196. Chandra, P., et al., *Acute myeloid leukemia with t(9;11)(p21-22;q23): common properties of dysregulated ras pathway signaling and genomic progression characterize de novo and therapy-related cases.* Am J Clin Pathol, 2010. **133**(5): p. 686-93.
197. Grossmann, V., et al., *High incidence of RAS signalling pathway mutations in MLL-rearranged acute myeloid leukemia.* Leukemia, 2013.
198. Chen, C.C., et al., *Computational analysis of KRAS mutations: implications for different effects on the KRAS p.G12D and p.G13D mutations.* PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55793.
199. Chou, F.S., et al., *N-Ras(G12D) induces features of stepwise transformation in preleukemic human umbilical cord blood cultures expressing the AML1-ETO fusion gene.* Blood, 2011. **117**(7): p. 2237-40.
200. Wang, J., et al., *Nras(G12D/+) promotes leukemogenesis by aberrantly regulating hematopoietic stem cell functions.* Blood, 2013. **121**(26): p. 5203-7.
201. Zhao, S., et al., *KRAS (G12D) Cooperates with AML1/ETO to Initiate a Mouse Model Mimicking Human Acute Myeloid Leukemia.* Cell Physiol Biochem, 2014. **33**(1): p. 78-87.
202. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review.* Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
203. Britschgi, A., et al., *JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer.* Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 796-811.
204. Bria, E., et al., *Impact of neoadjuvant single or dual HER2 inhibition and chemotherapy backbone upon pathological complete response in operable and locally advanced breast cancer: Sensitivity analysis of randomized trials.* Cancer Treat Rev, 2014. **40**(7): p. 847-856.
205. Boix-Perales, H., et al., *The European Medicines Agency Review of Pertuzumab for the Treatment of Adult Patients With HER2-Positive Metastatic or Locally Recurrent Unresectable Breast Cancer: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use.* Oncologist, 2014. **19**(7): p. 766-773.
206. Maiello, E., et al., *Cetuximab: clinical results in colorectal cancer.* Ann Oncol, 2007. **18 Suppl 6**: p. vi8-10.
207. Katoh, M., *Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review).* Int J Oncol, 2008. **33**(2): p. 233-7.
208. Pardo, O.E., et al., *The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo.* Cancer Res, 2009. **69**(22): p. 8645-51.

10. Anhang

10.1. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
α	Anti, Alpha
A	Ampère, Alanin
abnl	abnormal
ad	auffüllen auf
AKT	Protein Kinase B
ALL	akute lymphoblastische Leuämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
ATCC	engl. *„American Type Culture Collection“*
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBF	engl. *„core binding factor”*
CBL	engl. *„casitas B-lineage lymphoma protein”*
CBP	engl. *„CREB-Binding Protein“*
C/EBPα	engl. *„CCAATT/enhancer binding protein α”*
CLL	chromische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
Cyp33	Cyclophilin 33
del	Deletion
dest	destilliert
DMEM	engl. *„Dulbecco´s Modified Eagle Medium”*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. „deoxyribonucleid acid”
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

DOT1L	engl. *„DOT1-like “*
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	engl. *„enhanced chemoluminescence”*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eFFLuc	eng. *„enhanced firefly luciferase”*
EGFR	engl. *„epidermal growth factor receptor”*
ELN	engl. *„european leukemia net”*
ERK	engl. „*extracellular signal-regulated kinases“*
F	FACS
FAB	engl. *„Frensh-American-British”*
FACS	engl. *„fluorescence activated cell sorter”*
FGFR	engl. „*fibroblast growth factor receptors”*
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FLT3	engl. *“fibroblast-macrophage stimulating factor receptor (FMS)-like tyrosine kinase 3”*
fwd	engl. „forward”
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GFP	engl. *„green fluorescent protein”*
GM-CSF	engl. *„granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor”*
h	Stunde
H_2O	Wasser
HBS	engl. *„hepes-buffered saline solution”*
HDAC	Histondeacetylase
Hox	engl. *„homeobox”*
HRP	engl. *„horseradish peroxidase”*
IGF	engl. *„insulin growth factor”*
igG	Immunglobulin G
inv	Inversion
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6

IRES	engl. *„internal ribosomal entry site”*
IRS	engl. *„insulin-receptor-substrate”*
ITD	engl. *„internal tandem duplication”*
K	Lysin
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIT	Stammzellfaktor-Rezeptor
l	Liter
LEDGF	engl. *„lens epithelium-derived growth factor”*
M	Molar (mol/l)
MAPK	engl. *„mitogen-activated protein kinase”*
mg	Milligramm
min	Minute
MLL	engl. *„Mixed lineage leukemia”*
MOF	engl. *„males absent in the first”*
MSCV	engl. *„murine stem cell virus”*
mTORC	engl. *„mammalian target of rapamycin complex”*
NaCl	Natriumchlorid
neo	Neomycin
NMP	N-Methyl-2-Pyrrolidon
NPM1	Nucleophosmin-1
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	engl*. „phosphat buffer saline”*
PCR	engl. *„polymerase chain reaction”*
PDGFR	engl. *„platelet-derived growth factor receptor”*
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylen-Glykol
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Propidiumiodid

PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PTD	engl. *„partial tandem duplication"*
PTEN	engl. *„Phosphatase and Tensin homolog"*
RAF	engl. *„rapidly accelerated fibrosarcoma"*
RAS	engl. *„Rat sarcoma"*
RBD	engl. *„Ras-binding domain"*
rev	engl. *„reverse"*
rh	rekombinant human
RNA	engl. *„ribodeoxynucleid acid"*
rpm	engl. *„rounds per minute"*
RPMI	engl. *„Roswell Park Memorial Institute"*
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S6rp	ribosomales Protein S6
SB1	engl. *„SETA binding protein 1"*
SCF	engl. *„stem cell factor"*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SET	engl. „*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax*"
Ser	Serin
s	Sekunde
SHIP-1	engl. *„SH2 Domain-Containing Inositol-5'-Phosphatase 1"*
SOS	engl. *„son of sevenless"*
t	Translokation
Thr	Threonin
TKD	Tyrosinkinasedomäne
U	engl. *„unit"*
UV	ultraviolett
V	Volt

VEGF	engl. *„vascular endothelial growth factor”*
VEGFR	engl. *„vascular endothelial growth factor receptor”*
WB	engl. „Western Blot”
WHO	engl. *„World Health Organization”*
WT	Wildtyp
µ	Mikro
°C	Grad Celsius
%	Prozent

10.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des wildtypischen MLL-Proteins, der MLL-Fusionsproteine und der partiellen MLL-Duplikation (MLL-PTD). 4
Abbildung 1-2 Aufbau der Histonmethyltransferase MLL und ihre Interaktion mit DNA und Proteinen.. 6
Abbildung 1-3 Transformation durch MLL-Translokationen in der Leukämie. 7
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und des RAS/RAF/MEK/ERK-Signalwegs, nach [94, 95]. 10
Abbildung 1-5 Darstellung der wichtigsten beschriebenen Interaktionen zwischen dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und dem RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg, nach [108, 115]..... 13
Abbildung 4-1 Apoptose-Sensitivität primärer AML-Proben in vitro. 56
Abbildung 4-2 Apoptose-Sensitivität primärer AML-Proben gegenüber spezifischen Inhibitoren. 57
Abbildung 4-3 Zusammenhang zwischen Spontanapoptose und Apoptose-Induktion nach Behandlung mit BEZ-235. 59
Abbildung 4-4 Zusammenhang zwischen genetischem Hintergrund und Sensitivität gegenüber BEZ-235. 60
Abbildung 4-5 Apoptoserate in MLL-mutierten AML Patientenproben. 61
Abbildung 4-6 Ki-67-Expression in AML-Patientenproben. 62
Abbildung 4-7 Spontanapoptose von MLL-mutierten und MLL-WT Patientenproben. 63
Abbildung 4-8 Vergleich von MLL-WT und MLL-mutierten AML-Patientenproben hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber verschiedener Inhibitoren und Zytostatika. 64
Abbildung 4-9 Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in THP-1 Zellen. 67
Abbildung 4-10 Durchflusszytometrie-Messung nach P-S6rp Antikörper-Färbung in MOLM-13 Zellen. 68
Abbildung 4-11 Basale Signalwegaktivierung in humanen Zelllinien. 69
Abbildung 4-12 Durchflusszytometrie-Messung nach P-S6rp Antikörper-Färbung in humanen Leukämie-Zelllinien nach Behandlung mit Inhibitoren. 70
Abbildung 4-13 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit BEZ-235... 72
Abbildung 4-14 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit MK-2206. . 73
Abbildung 4-15 Apoptose in sechs myeloischen Leukämie-Zelllinien nach Inkubation mit Rapamycin. 74
Abbildung 4-16 Ermittelte Zahl viabler Zellen nach 72 h für alle sechs verwendeten humanen Zelllinien. 75
Abbildung 4-17 Proliferationsinhibition durch Behandlung mit BEZ-235. 76
Abbildung 4-18 Proliferationsinhibition durch Behandlung mit MK-2206 bzw. Rapamycin. 77
Abbildung 4-19 Konzentrationsabhängige Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 und deren Korrelation mit einem funktionellen Proliferationsversuch. 78

Abbildung 4-20 Transformierendes Potenzial von MLL-ENL in murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen. 81
Abbildung 4-21 Expressionsnachweis MLL-ENL in transduzierten Zellen. 81
Abbildung 4-22 Expression der Oberflächenmarker cKIT, Mac1 und B220 auf MLL-ENL transduzierten Zellen. 82
Abbildung 4-23 Reduziertes Selbsterneuerunsgpotenzial in murinen MLL-ENL-immmortalisierten Zellen durch PI3K/AKT/mTOR-Inhibition. 84
Abbildung 4-24 Wachstumsinhibition und Apoptose-Induktion durch BEZ-235 in MLL-ENL ICs im Vergleich zu nativen Ba/F3-Zellen. 85
Abbildung 4-25 GFP-Expression in MOLM-13 Zellen. 87
Abbildung 4-26 Schema des in vivo Therapieversuchs. 88
Abbildung 4-27 Biolumineszenzsignal und Gewicht in den Therapiegruppen zum Start der Therapie an Tag drei nach Injektion (3 dpi). 89
Abbildung 4-28 Leukämieausbreitung in behandelten Mäusen. 90
Abbildung 4-29 Infiltration des murinen Knochenmark durch humane Zellen. 92
Abbildung 4-30 Kaplan-Meier-Plot zur Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere im Therapieversuch. 93
Abbildung 4-31 Nachweis der inhibitorischen Aktivität von BEZ-235 im murinen Knochenmark. 94
Abbildung 4-32 Gewichtsentwicklung der drei Therapiegruppen während des Versuchs. 95
Abbildung 4-33 Expression des MECOM-Lokus in AML-Patientenproben. 97
Abbildung 4-34 Mutationsanalysen in AML Patienten mit MLL-AF9 Translokation (n=38). 98
Abbildung 4-35 Mutationsanalysen in zytogenetisch normaler AML (n=125). 99
Abbildung 4-36 Inhibition von S6K und AKT und stärkere Phosphorylierung von ERK in MOLM-13 Zellen. 101
Abbildung 4-37 Inhibition von S6K und AKT und stärkere Phosphorylierung von ERK in THP-1 Zellen. 102
Abbildung 4-38 Dephosphorylierung von AKT bzw. ERK durch Behandlung mit BEZ-235, AZD-6244 bzw. beiden in Kombination. 103
Abbildung 4-39 Kombination von BEZ-235 und AZD-6244 in humanen myeloischen Leukämie-Zelllinien. 105
Abbildung 4-40 Kombination von BEZ-235 und AZD-6244 in einer primären AML-Patientenprobe. . 106

10.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Einteilung der prognostischen Risikogruppen nach der ELN-Klassifikation. 2
Tabelle 3-1 Verwendete Geräte mit Herstellerangabe 17
Tabelle 3-2 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben 18
Tabelle 3-3 Verwendete Chemikalien und Lösungen mit Herstellerangaben 19
Tabelle 3-4 Verwendete Kitsysteme mit Herstellerangaben 21
Tabelle 3-5 Verwendete Puffer und Lösungen mit Rezeptangaben 21
Tabelle 3-6 Verwendete Expressionvektoren 24
Tabelle 3-7 Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung und den Expressionsnachweis von MLL-ENL 24
Tabelle 3-8 Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB) 25
Tabelle 3-9 Verwendete Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie (F) und Western Blot (WB) 26
Tabelle 3-10 Verwendete Inhibitoren mit Wirkungsweise und Bezugsquelle 26
Tabelle 3-11 Zelllinien mit Angabe der Herkunft und der Morpholgie 27
Tabelle 3-12 Alphabetische Liste der Gene, die mittels Amplicon-Sequenzierung auf Mutationen untersucht wurden. 33
Tabelle 3-13 Verwendete Software 50
Tabelle 4-1 Patientencharakteristika; n=18 54
Tabelle 4-2 Auflistung der Substanzen, die im in vitro Apoptoseversuch verwendet wurden. 55
Tabelle 4-3 Statistischer Vergleich zwischen der spezifischen Apoptose von MLL-WT und MLL-mutierten Proben nach Behandlung mit Inhibitoren verschiedener Signalwege und in verschiedenen Konzentrationen. 65
Tabelle 4-4 Genetischer Hintergrund der verwendeten myeloischen Zelllinien. 66
Tabelle 4-5 Abbruchkriterien 88

11. Danksagung

Vielen Dank…

- an meinen Betreuer Prof. Dr. Karsten Spiekermann, der es mir ermöglichte, meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Von ihm und seiner Gruppe habe ich in den letzten Jahren sehr viel gelernt.
- an Prof. Dr. Irmela Jeremias und Dr. med. Werner Olipitz für ihre Ideen und für die wissenschaftlichen Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- der gesamten Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Irmela Jeremias, die durch die enge Kooperation eine wichtige Anlaufstelle für mich war und die es mir ermöglicht hat, unsere Studien mit *in vivo*-Daten zu bereichern. Mein besonderer Dank geht an Sebastian und Volker für die große Unterstützung in allen Bereichen und die vielen schönen gemeinsamen Momente vor dem FACS, im Tierstall und in der Küche.
- an Dr. med. Klaus Metzeler, Dr. med. Tobias Herold, Dipl. Ing. Tanja Hinrichsen und Prof. Dr. Robert Slany für die Bereitstellung von Vektoren, für die gute Zusammenarbeit und die interessanten Ergebnisse, die sie zu diesem Projekt beigetragen haben.
- meinen ehemaligen und aktuellen Laborkollegen Harald, Verena, Diana, Steffi, Anna, Hanna, Judith L., Daniel, Judith H., Julia B., Werner, Julia G., Jutta und Belay für die tolle Atmosphäre und die immerwährende gegenseitige Unterstützung im Labor und außerhalb der Arbeit. Ebenso danke ich der gesamten KKG Leukämie für das gute Arbeitsklima und den wissenschaftlichen Austausch.
- an alle Kollegen des Labor für Leukämiediagnostik der LMU München für die stete Versorgung mit Proben.
- an Dr. Ursula Mittnacht und Dr. Sebastian Tiedt für die ausführliche Korrektur meiner Arbeit.
- an meinen Mann Christoph und an meine Familie für ihre liebevolle Unterstützung und den großen Rückhalt, den sie mir geben.