

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin

II. Medizinische Klinik und Poliklinik (Onkologie, Hämatologie und
Knochenmarkstransplantation mit Sektion Pneumologie)

Direktor Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Identifikation neuer Strategien zur molekular zielgerichteten Therapie der
BCR-ABL-positiven Chronischen Myeloischen Leukämie:
Inhibition der Hypusinierungsmodifikation des eukaryontischen
Initiationsfaktors 5A mit Deoxyspergualin**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Tuhama Chahoud
aus Mönchengladbach

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 27.1.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Brümmendorf

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Evita Mohr

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Judith Dierlamm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Die chronische myeloische Leukämie	7
1.1.1 Das Philadelphia Chromosom	8
1.1.2 Physiologische Funktionen der Translokationspartner	8
1.1.3 Die <i>BCR-ABL</i> Translokation	9
1.1.4 BCR-ABL abhängige Signaltransduktionswege	10
1.1.5 Klinisches Bild und Stadieneinteilung der CML	11
1.2 Therapie	12
1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation	13
1.2.2 Interferon α	13
1.2.3 Imatinib (STI571)	13
1.2.4 Das Problem der Resistenzentwicklung	15
1.2.5 Neue BCR-ABL Inhibitoren	18
1.3 Polyamine	20
1.4 Hypusinierung als posttranslationale Modifikation von eIF5A	21
1.5 Deoxyspergualin	24
2. Fragestellung	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Zelllinien	28
3.1.1 Murine Zellen	28
3.1.2 Humane Zellen	28
3.2 Zellbiologische Methoden	29
3.2.1 Kultivierung der Zellen	29
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
3.2.3 Bestimmung der Zellzahl	30
3.3 Wachstumsfaktoren der Hämatopoese	30
3.4 Isolation von CD34 ⁺ Zellen	31
3.5 Proliferationsassays	32
3.5.1 Kurzzeitproliferationsassay mit DSG	32
3.5.2 Langzeitproliferationsassay mit DSG	32
3.5.3 Proliferationsassay mit Kombinationstherapie DSG+IM	33
3.5.4 Proliferationsassay mit CD34 ⁺ Zellen	34
3.7 Apoptose/Nekrose-Assay nach Nicoletti	37

4. Ergebnisse	38
4.1 Kurzzeitproliferationsassay	38
4.1.1 Murine Zelllinien.....	38
4.1.2 Humane Zelllinien	43
4.2 Langzeitproliferationsassay	45
4.2.1 Langzeitproliferationsassay der murinen Zelllinien	45
4.2.2 Langzeitproliferationsassay der humanen Zelllinien.....	49
4.2.3 Zusammenfassung der Langzeitproliferationsassays.....	51
4.3 Proliferationsassay mit Kombinationstherapie	52
4.3.1 Murine Zelllinien unter der Kombinationstherapie	53
4.3.2 Humane Zelllinien unter der Kombinationstherapie	58
4.4 FACS-Analyse	60
4.5 Zytotoxizitätsanalyse.....	62
4.6 Primärmaterial.....	66
4.6.1 Proliferation CD34 ⁺ Zellen unter DSG Monotherapie.....	66
4.6.2 Proliferation der CD34 ⁺ Zellen unter Kombinationstherapie	69
5. Diskussion	77
6. Zusammenfassung.....	82
7. Literaturverzeichnis	83
8. Danksagung	89
9. Lebenslauf	90
10. Eidesstattliche Versicherung	91
11. Anhang	92
11.1 Statistische Methoden.....	92
11.1.1 T-Test.....	92
11.1.2 Regressionsanalyse.....	92
11.2 Statistik Kurzzeitproliferationsassay	93
11.3 Statistik Langzeitproliferationsassay	95
11.4 Statistik Proliferationsassay Kombinationstherapie	101
11.5 Statistik FACS Analyse	102
11.6 Statistik Primärmaterial	103
11.6.1 DSG-Monotherapie CD34 ⁺ Zellen.....	103
11.6.2 Kombinationstherapie CD34 ⁺ Zellen	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Akzelerationsphase der CML
ATP	Adenosintriphosphat
BCR-ABL	Fusionsprotein, kodiert nach der Translokation t(9;22)
<i>BCR-ABL</i>	Fusionsgen, entstanden nach der Translokation t(9;22)
BK	Blastenkrise der CML
cABL	Physiologische zelluläre Tyrosinkinase
CD	Cluster of Differentiation
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	Chronische Phase der CML
CsA	Ciclosporin A
d	Tag
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DHH	Deoxyhypusin-Hydroxylase
DHS	Deoxyhypusin-Synthetase
Diff.BB	Differentialblutbild
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSG	Deoxyspergualin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF5A	Eukaryontischer Initiationsfaktor 5A
ELISA	Enzym-Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fätales Kälberserum
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HI	Hypusinierungsinhibitor
HIV	Human immunodeficiency virus
IC₅₀	Konzentration, die zu einer 50%igen Hemmung der Proliferation führt
IM	Imatinib
IRIS	International Randomized Study of Interferon and STI571
kDa	Kilo-Dalton
KMR	Komplette molekulare Remission

KMT	Knochenmarkstransplantation
KZyR	Komplette Zytogenetische Remission
LSZ	Leukämische Stammzelle
LZ	Leukozyten
MMR	Major Molecular Remission
MRD	Minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
m-RNA	Boten- (messenger) RNA
mZyR	Minor Zytogenetic Remission
MZyR	Minimal Zytogenetic Remission
NF-κB	Nuclear Factor Kappa of activated B-Cells (Transkriptionsfaktor)
NTx	Nierentransplantation
NW	Nebenwirkung
PBS	Phosphate Buffer Saline (Puffer)
Ph^{+/-}	Philadelphia positiv/negativ
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	Plated derived growth factor receptor
PI	Propidiumjodid
PZyR	Partielle Zytogenetische Remission
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RT	Reverse Transkriptase
RQ-PCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SZTx	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TZ	Thrombozyten

1. Einleitung

Krebserkrankungen gehören zu den führenden Todesursachen bei Erwachsenen in der westlichen Welt. Die Inzidenz und Prävalenz neoplastischer Erkrankungen nehmen mit steigendem Lebensalter der Bevölkerung kontinuierlich zu [31]. Während in der Diagnostik und Therapie zum Teil revolutionäre Fortschritte erzielt werden, bestehen nur bei wenigen Krebsarten Heilungschancen, und zwar insbesondere nur bei Therapiebeginn in frühen Krankheitsstadien. Einer der limitierenden Faktoren für die Entwicklung kurativer Therapiestrategien ist bisher das unvollständige Verständnis der molekularen und pathophysiologischen Mechanismen, die der Kanzerogenese, Metastasierung und Rezidivbildung zu Grunde liegen. Die chronische myeloische Leukämie ist zwar eine seltene, jedoch eine der am besten charakterisierten malignen Erkrankungen. Sie ist eine ausgezeichnete Modellerkrankung zum Verständnis von Zusammenhängen zwischen molekularen Veränderungen und der Entstehung von Krebserkrankungen.

1.1 Die chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie ist eine Erkrankung, die durch die maligne Transformation einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entsteht, und gehört neben Polycythaemia vera, Osteomyelofibrose und Essentielle Thrombozythämie zu den myeloproliferativen Erkrankungen (WHO-Klassifikation). Sie entsteht als Folge der malignen Transformation einer einzigen pluripotenten Stammzelle, welche sich in die lymphoide oder myeloische Richtung differenzieren kann. Charakteristisch für diese Erkrankung sind die zum Teil massiv erhöhten Leukozytenzahlen, ein Befund den Virchow bereits 1845 als „weißes Blut“ oder „Leukämie“ beschrieb. Die CML war die erste Neoplasie überhaupt, die mit einer definierten spezifischen chromosomalen Veränderung zweifelsfrei assoziiert werden konnte.

Etwa 15% aller Leukämien des Erwachsenen sind CML-Fälle. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 1,5/100000, mehr als die Hälfte der Patienten ist zum Diagnosezeitpunkt älter als 60 Jahre. Die Beobachtungshäufigkeit ist weltweit homogen, Männer sind ca. 1,4 mal häufiger betroffen als Frauen. Da kein konkordantes Auftreten der CML bei eineiigen Zwillingen beobachtet wurde, geht man von einer erworbenen Krankheit aus. Ein gehäuftes Auftreten von Leukämien, einschließlich der CML, beobachtet man bei vorangegangener Exposition zu hohen Dosen radioaktiver Strahlung sowie Röntgen- und Gammabestrahlung. Häufig sind jedoch keine prädisponierenden Faktoren eruierbar [25].

1.1.1 Das Philadelphia Chromosom

Das Philadelphia Chromosom wurde im Jahre 1960 an der University of Pennsylvania in Philadelphia erstmalig von Nowell und Hungerford beschrieben [48]. Die Entdeckung dieses kleinen Chromosoms, so sollte es sich in den folgenden Jahren herausstellen, war der Wegbereiter zum genaueren Verständnis der CML. Es galt im Folgenden zu klären, ob eine chromosomale Abnormalität in einem kausalen Zusammenhang mit einer spezifischen Form der Leukämie stehen könnte. Im Jahre 1972 konnte Rowley zeigen, dass das Philadelphia Chromosom das Produkt einer erworbenen reziproken chromosomalen Translokation t(9;22) der telomer-nahen Bereiche der langen Arme der Chromosomen 9 und 22, t(9;22) (q34;q11) darstellt [59]. Somit war die CML als erste neoplastische Erkrankung identifiziert, die eindeutig mit einer charakteristischen genetischen Abnormalität assoziiert ist. Diese neue Erkenntnis bedeutete einen Durchbruch im damaligen Verständnis der Krebsbiologie. Die genomischen Bruchpunkte wurden den Unterbanden 9q34.1 und 22q11.21 zugeordnet. Durch diese reziproke Translokation entstehen das verlängerte Chromosom 9q+ und das verkürzte Chromosom 22q-, welches das eigentliche Philadelphia Chromosom darstellt. Das neu entstandene Fusionsgen führt zu einer überexprimierten und unkontrollierten Tyrosinkinase-Aktivität, die dann als pathogenetisches Prinzip definiert wurde [43]. Die dysregulierte Tyrosinkinase phosphoryliert fortlaufend eine Reihe an Substraten, unter ihnen auch einige Schlüsselenzyme der intrazellulären Signaltransduktionswege. Die *BCR-ABL* Translokation ist jedoch auf das hämatopoetische System beschränkt und kann bei ca. 90% der CML Patienten nachgewiesen werden [25].

1.1.2 Physiologische Funktionen der Translokationspartner

BCR

Chromosom 22q11 trägt das Breakpoint Cluster Region-Gen (*BCR*-Gen).

Das 160-kd *BCR* Protein wird ubiquitär exprimiert. Das erste N-terminal gelegene Exon kodiert für eine Serin-Threonin Kinase. Substrate dieser Kinase sind das Bap-1 Protein und möglicherweise *BCR* selbst. Das Zentrum des Proteins enthält eine Region, die den Austausch von GTP gegen GDP stimuliert und so indirekt an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B beteiligt ist. Das C-terminale Ende weist eine GTPase Aktivität auf [13]. *BCR* kann an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert werden, besonders an Tyrosin 177, welches das Grb-2-Protein, einem wichtigen Substrat für die Aktivierung des Ras Signalweges, bindet. *BCR*- Knockout-Mäuse sind lebensfähig, die einzig deutlich erkennbare Veränderung im Phänotyp dieser Mäuse ist ein starker Anstieg von reaktivem Sauerstoff in durch Infektion aktivierten Neutrophilen [69].

ABL

Chromosom 9q34 enthält das Tyrosinkinase Gen *ABL*. Es handelt sich bei diesem Gen um das humane Homolog des *v-abl* Onkogens, welches für die transformierende Aktivität des murinen Abelson-Leukämievirus (A-MuLV) verantwortlich ist. Es kodiert eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase [12]. Humanes *ABL* ist ein ubiquitär exprimiertes 145-kd Protein mit 2 Isoformen, welche durch alternatives Splicing entstehen [38]. Drei unterschiedliche SRC Homologie Domänen (SH1-SH3) sind am NH₂-terminalen Ende des Proteins lokalisiert. Die SH1 Domäne trägt die TK-Funktion, SH2 und SH3 dienen der Interaktion mit anderen Proteinen, während prolin-reiche Sequenzen im Zentrum des Proteins mit CRK interagieren [12]. Die TK-Aktivität wird zellzyklusabhängig durch eine spezifische Interaktion mit dem Retinoblastoma Protein (Rb) und p53 reguliert. Das *ABL* Protein ist in diverse komplexe zelluläre Vorgänge involviert. Seine physiologischen Funktionen umfassen die Regulation von Zellzyklus und Apoptose, zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress und Signaltransduktion durch Integrin Signale. Insgesamt scheint *ABL* als wichtiges zelluläres Instrument zur Integration von Signalen intra- und extrazellulären Ursprungs zu dienen. Definitive Aussagen zur seiner Funktion können erst getroffen werden, wenn es gelingt, konditionierte *ABL*-Knockout Mäuse zu generieren, was leider bisher nicht gelungen ist. *ABL*-defiziente Mäuse sterben in der Neonatalphase an Thymus- und Milzatrophy sowie Lymphopenie [64], [68]

1.1.3 Die *BCR-ABL* Translokation

Der Bruchpunkt innerhalb des *ABL*-Gens kann in einem mehr als 300 kb großen Segment am 5' Ende des Gens erfolgen, meist im 175 kb großen ersten Introns. Im Gegensatz zu *ABL* weist das *BCR* Gen charakteristische Bruchstellen auf, die einer von 3 sogenannten Breakpoint Cluster Regions (BCR) zugeordnet werden können. Bei der überwiegenden Mehrheit der CML Patienten und bei ca. 1/3 der Ph⁺ ALL tritt die Bruchstelle innerhalb eines 5,8-kb Abschnitts auf, der die Exons 12-16 beinhaltet. Diese Bruchstelle wird als Major breakpoint cluster region (M-bcr) bezeichnet. Das chimäre Protein P210^{BCR-ABL} resultiert aus dieser Bruchvariante. Bei den restlichen Patienten findet sich der Bruchpunkt in der 54,4-kb Region zwischen dem alternativen Exons e2' und e2, als minor breakpoint cluster region (m-bcr) bezeichnet. Die daraus generierte mRNA wird in das 190-kd Protein P190^{BCR-ABL} translatiert. Eine vor Kurzem identifizierte dritte Bruchstelle (μ -bcr) führt zu 230-kd P230^{BCR-ABL}. Dieses Fusionsprotein ist mit der seltenen Ph⁺ chronischen neutrophilen Leukämie (CNL) assoziiert, welche sich durch einen indolenteren Krankheitsverlauf auszeichnet. Alle drei Fusionsproteine weisen eine überexprimierte TK-Aktivität im Vergleich zum nativen *ABL* Protein P145^{ABL} auf. Die Art des *BCR-ABL*-Fusionsproteins ist mit dem Phänotyp der CML assoziiert. Während die typische CML bei Vorliegen des P210^{BCR-ABL} beobachtet wird, ist die seltene P190^{BCR-ABL} CML durch Monozytose und fehlende Basophilie charakterisiert. Die P230^{BCR-ABL} CML, auch als chronische Neutrophilenleukämie (CNL) bezeichnet, ist mit einem indolenteren Krankheitsverlauf assoziiert.

1.1.4 BCR-ABL abhängige Signaltransduktionswege

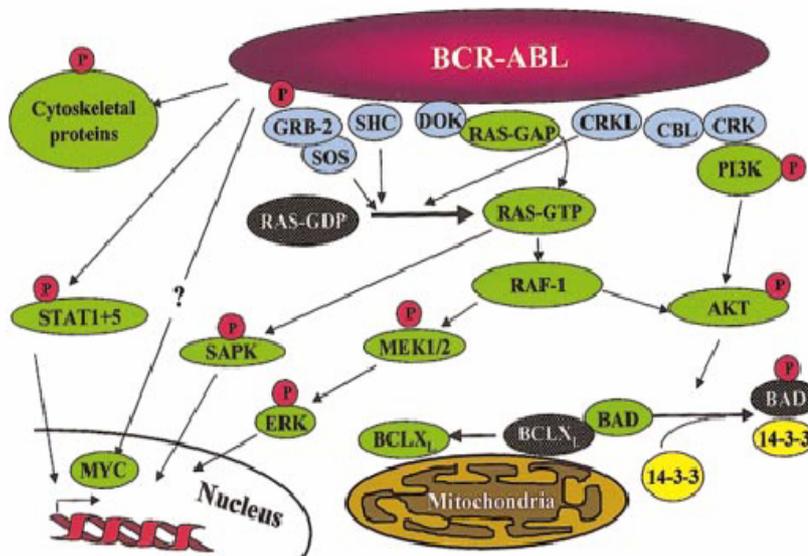


Abb.1 Aktivierte Signaltransduktionswege in *BCR-ABL* positiven Zellen, Quelle: [12]

Die BCR-ABL Expression führt zur Induktion vielfältiger Signalkomplexe, die an der leukämischen Transformation beteiligt sind:

- BCR-ABL bildet Komplexe mit dem Growth-factor-receptor binding protein 2 (GRB-2) und dem Nukleotid-Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS), über die das RAS-System aktiviert wird. GRB-2 dient als Adaptermolekül, das die Tyrosinkinase mit dem RAS-System verbindet.
- Das BCR-ABL bindende CRK-like Protein (CRKL) aktiviert im phosphorylierten Zustand den RAS- und den PI3-Kinase-Signalweg.
- BCR-ABL induziert eine Überexpression von c-myc und bedingt dadurch die Transformation von Fibroblasten.
- BCR-ABL wirkt wie ein Zytokinrezeptor indem er JAK (Januskinasen) und STATs (Signal-Transducer and activator of Transkription) aktiviert. Auf diese Weise werden JAKs angeregt, STAT Proteine zu phosphorylieren. Im phosphorylierten Zustand findet eine Translokation der STAT-Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern statt, wo sie die Transkription aktivieren.
- BCR-ABL beeinflusst Adhäsionsproteine wie Paxillin und bewirkt so eine vermehrte Zellfreisetzung in die Peripherie.

Als Folge der vielfältigen Interaktionen des BCR-ABL Proteins resultieren Effekte wie Hemmung der Apoptose, Aktivierung mitogener Signale, veränderte Adhäsionsfähigkeit zum Knochenmarksstroma und eine Deregulation inhibitorischer Proteine [25].

1.1.5 Klinisches Bild und Stadieneinteilung der CML

Unter klinischen Gesichtspunkten lässt sich die CML in 3 Phasen einteilen:

1. Chronische Phase (CP)

In diesem initialen Stadium der Erkrankung werden die meisten Patienten diagnostiziert. Es dauert unbehandelt 3-5 Jahre. Die Patienten sind meist asymptomatisch, Beschwerden äußern sich in Form von Splenomegalie, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Es findet eine massive Expansion des BCR-ABL⁺ Klons jedoch mit vollständig erhaltener Fähigkeit zur Differenzierung statt. Gleichzeitig vermehren sich myeloide Progenitorzellen im peripheren Blut. Das Blutbild zeigt eine Leukozytose um $150 \times 10^9/L$, Basophilie, Eosinophilie, Blasten repräsentieren i.d.R. < 2% des weißen Blutbildes. [45].

2. Akzelerationsphase (AP)

Die Übergangsphase kann bis zu einem Jahr dauern. Kennzeichnendes Merkmal ist die zunehmende Therapierefrakterität der Erkrankung. Dieses äußert sich in zunehmender Milzgröße und progredienter Leukozytose. Der Anteil der Blasten beträgt jetzt 10-19%. Thrombozytopenie und Basophilie sind weitere Befunde. Zusätzlich können neue klonale zytogenetische Abnormalitäten akquiriert werden [45].

3. Blastenkrise (BK)

Das Endstadium ist gekennzeichnet durch einen Arrest der hämatopoetischen Differenzierung. Unreife Blasten akkumulieren im Knochenmark, werden ins periphere Blut ausgeschwemmt und machen dort einen Anteil > 20% aus. Die normale Hämatopoese wird verdrängt. [45]

Der Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert sich rapide. Klinische Symptome werden der Thrombozytopenie, Anämie und Splenomegalie zugeschrieben.

Die Mechanismen, die den Übergang zur BK bewirken, sind komplex und noch nicht vollständig verstanden. Bisher bekannt sind der Differenzierungsarrest, genomische Instabilität, Telomerverkürzung und der Verlust von Tumor-Suppressor Funktionen.

1.2 Therapie

Die Einführung von TKI, allen voran Imatinib, hat eine neue Ära in der Therapie der CML eingeleitet. Die molekular-zielgerichtete Therapie befand sich in ihren Anfängen und fand in der Therapie der CML aufgrund signifikanter Erfolge breite Anwendung. Es gibt wichtige Gründe, ein strenges Therapiemonitoring vorzunehmen: Zum einen korreliert die Quantität an *BCR-ABL*-Transkripten invers zur Wahrscheinlichkeit der Krankheitsprogression, und zum anderen ist es immens wichtig Patienten zu identifizieren, die initial schlecht ansprechen oder eine sekundäre Resistenz entwickeln, um die Therapiestrategie zu überdenken und alternative Wege einzuschlagen. Für das Therapiemonitoring von Leukämiepatienten ist die Definition einiger Begrifflichkeit unerlässlich [18]:

- **Hämatologische Remission:**

Parameter: (Differential-) Blutbild

Komplett: TZ < 450 x 10⁹/L, LZ < 10 x 10⁹/L, Diff.BB: Keine unreifen Granulozyten und < 5% Basophile, Keine Splenomegalie.

- **Zytogenetische Remission:**

Parameter: Philadelphia-positive Metaphasen

Komplett: 0% (KZyR), Partiell: 1-35% (PZyR), Minor: 36-65% (mZyR),

Minimal: 66-95% (MZyR), Keine >95%.

- **Molekulare Remission:**

Parameter: *BCR-ABL*-Transkripte mittels PCR

Komplett: Keine Transkripte nachweisbar (KMR), Major: < 0,1% (MMR)

Das therapeutische Monitoring der Patienten sollten durch eine zytogenetische Untersuchung des KM bei Diagnosestellung und in 3-monatigen Intervallen bis zum Erreichen einer KZyR erfolgen. Hat ein Patient einmal eine komplette zytogenetische Remission erreicht, ist die sensitivste Methode zur Überwachung der Resterkrankung sicherlich das Monitoring der Anzahl an *BCR-ABL* Transkripten mittels RQ-PCR. Dabei bedeutet eine 2-log Reduktion an *BCR-ABL* Transkripten eine Ph-Negativität, eine 3-log Reduktion ist gleichbedeutend mit MMR. Wenn keine *BCR-ABL*-Transkripte mehr nachweisbar sind, entsprechend einer 4-5-log Reduktion der Transkripte, bedeutet dies eine komplette molekulare Remission (KMR).

1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation

Zwischen 1980 und 2000, d.h. vor der Marktzulassung von IM galt die allogene SZTx als Standardtherapie der neu diagnostizierten CML bei Patienten bis zum 50. Lebensjahr. Es ist wichtig sich vor Augen zu halten, dass die allogene SZTx trotz der tiefgreifenden Erfolge der molekularzielgerichteten medikamentösen Therapie die einzig kurative Therapieoption der CML ist und bleibt.

Bei jungen Patienten bietet sich ein myeloablatives Verfahren an. D.h. es erfolgt eine Konditionierung mittels einer Hochdosischemotherapie mit anschließender SZTx. Wesentliche limitierende Faktoren dieses Verfahrens sind das Alter des Patienten, Komorbiditäten und das Vorhandensein eines HLA-kompatiblen Spenders. Bei Patienten über 50 Jahre und solchen mit relevanten Begleiterkrankungen sollte eine nicht-myeloablative Konditionierung vorgezogen werden. Mittels standardisierter Risiko Scores kann eine Nutzen-Risiko Abwägung für den Patienten vorgenommen werden.

Im Verlauf der letzten Jahre ist, bedingt durch die Verfügbarkeit der TKI, weltweit ein deutlicher Rückgang der allogenen SZTx zur Therapie der CML zu verzeichnen. Heutzutage wird die Erstlinientherapie mit IM oder der Einschluss des Patienten in klinische Studien zur Behandlung mit anderen TKI in spezialisierten Zentren empfohlen [18].

1.2.2 Interferon α

Die Mehrheit der CML Patienten kommt für eine allogene SZTx nicht in Frage. In den frühen 1980er Jahren wurde IFN α eingeführt und galt als Therapie der Wahl bei Patienten, die nicht für eine allogene SZTx geeignet waren. IFN α war in der Lage, hämatologische und zytogenetische Remissionen zu induzieren [61]. Die Einführung von IM hat IFN α als primäre Therapie der CP komplett verdrängt.

1.2.3 Imatinib (STI571)

Bereits 1992 ergaben sich erste Anhalte für die Blockade der Tyrosinkinase Domäne in *BCR-ABL*-positiven K562 Zellen durch Substanzen aus der Gruppe der Tyrphostine [11]. 1998 wurde STI571 (früher CGP57148B) erstmals im Rahmen von Phase 1 Studien klinisch eingesetzt und es bestätigte sich als gut verträgliche potente Substanz mit selektiv antiproliferativer Wirkung auf *BCR-ABL*-positive Zellen bei CML Patienten, die resistent gegen IFN α waren [15]. Die IRIS Studie als multizentrische randomisierte internationale Phase 3 verglich den Effekt von IM vs. IFN α plus Cytarabin. In dieser Studie, die 1106 Patienten aus 16 Ländern einschloss, konnte 2003 die signifikante Überlegenheit von IM gezeigt werden [49]. Eine 5-Jahres Follow-up Studie bestätigte die Wirksamkeit der IM Erstlinientherapie durch das Erreichen einer kompletten zytogenetischen Remission in 87% der Fälle nach 60 Monaten [14].

Wirkmechanismus

IM ist ein Derivat der 2-Phenylaminopyrimidine. Es blockiert die Phosphorylierung von Tyrosinresten durch Besetzung der ATP-Bindungsstelle aller drei ABL-TK: BCR-ABL, c-ABL und v-Abl [3]. Außerdem inhibiert IM neben ABL auch das ABL-related gene (ARG), PDGFR α und β und den Rezeptor des humanen Stammzellfaktors (SCF) c-KIT [17]. Durch Hemmung dieser drei Kinasen ist IM effektiv in der Behandlung der *BCR-ABL*-positiven Leukämien, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und des hypereosinophilen Syndroms (HES). In *BCR-ABL* exprimierenden Zellen induziert es 3 wesentliche Effekte: Inhibition von BCR-ABL-Autophosphorylierung und Substratphosphorylierung, Proliferationshemmung und Apoptose. Im Gegensatz dazu werden Signaltransduktionswege von Insulin, IGF-1 und FGF nicht durch IM beeinflusst. IM hat weiterhin keinen Effekt auf FLT3, CSF-1-Rezeptor, die Nicht-Rezeptor TK SRC und JAK-2 [11]. Diese durch IM nicht affektierten Proteine sind Zielproteine anderer TKI und unterscheidet somit ihr Zielspektrum voneinander. Seine inhibitorischen Effekte erreicht IM durch partielle Besetzung der ATP-Bindungstasche des Enzyms. Dabei bindet und stabilisiert IM die inaktive, d.h. nicht ATP-bindende Form von BCR-ABL. Die Aktivität der Kinase hängt kritisch von der Konformation der Aktivierungsschleife (activation loop) ab. Diese Konformation wird im Falle von ABL von der Phosphorylierung des Tyrosinrests 393 innerhalb der Aktivierungsschleife bestimmt. Kristallographische Analysen konnten zeigen, dass im Komplex mit IM Tyr 393 nicht phosphoryliert vorliegt. Die Aktivierungsschleife schwenkt ins aktive Zentrum der Kinase und besetzt so den Zugang zu ihrem katalytischen Zentrum. Durch diesen Bindungsmodus von IM wird die Kinase in einer inaktiven Konformation gehalten und in ihrer Kinaseaktivität gehemmt. Zahlreiche Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kräfte bewirken eine gute Passgenauigkeit und die hohe Spezifität von IM [16].

Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

IM zeichnet sich durch eine schnelle und komplette orale Bioverfügbarkeit (98%) aus. Die Halbwertszeit beträgt ca. 20 Stunden, eine Eigenschaft, die die Rationale zur einmaligen täglichen Einnahme bot. Die Metabolisierung erfolgt hepatisch über das Cytochrom P450 System, hauptsächlich durch das Isoenzym CYP3A4 [39]. Eine Standarddosierung von 400 mg täglich per os wird derzeit als Startdosierung der CP empfohlen. Nach derzeitigem Wissenstand, sollte die IM Therapie bei einem initialen Ansprechen auf unbestimmte Zeit fortgeführt werden [18]. In zahlreichen Ph^+ Zelllinien konnte eine IC_{50} zwischen 0,1 bis $0,5\mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Nach 11 Jahren klinischer Erfahrung mit IM ist anzunehmen, dass ernsthafte Nebenwirkungen sehr selten sind. Im Allgemeinen ist festzustellen, dass Nebenwirkungen milde ausfallen und gut gemanagt werden können. Reversible hämatologische Toxizität zeigt sich bei einem nicht zu vernachlässigenden Anteil der behandelten Patienten in Form von Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie, gelegentlich auch Panzytopenie. Zahlreiche nicht-hämatologische Effekte wurden beschrieben. Sie äußern sich in

Form von Schwindel, Diarrhoe, periorbitale Ödeme, Hautausschläge, erhöhte Leberenzyme sowie Knochen- und Gelenkschmerzen [11] Die Entwicklung einer Kardiomyopathie unter IM Behandlung wurde in einigen Fällen beschrieben, die Zusammenhänge sind jedoch nicht eindeutig belegt [35].

1.2.4 Das Problem der Resistenzentwicklung

Der klinische Einsatz von TKI hat die Therapie der CML sicherlich revolutioniert. Morbidität und Mortalität der Erkrankung konnten in den folgenden Jahren deutlich gesenkt werden [14]. Obgleich die mit IM erzielten therapeutischen Erfolge unbestreitbar sind, so ist die Substanz doch nicht in der Lage, die leukämischen Stammzellen vollständig zu eliminieren, da diese nicht von BCR-ABL abhängig zu sein scheinen. Trotz der kompletten Inhibierung der *BCR-ABL* vermittelten CRKL-Phosphorylierung bleiben die LSZ viabel [70]. Diese Tatsache gewinnt dann an Relevanz, wenn man sich vor Augen hält, dass die CRKL-Phosphorylierung klinisch als Instrument genutzt wird, um die Effektivität einer TKI Therapie zu überwachen. Folglich ist durch das Monitoring der CRKL-Phosphorylierung keine Aussage über die weitere Existenz von LSZ möglich. Während ein hämatologisches Ansprechen in > 95% der Fälle erzielt werden kann, liegt ein molekulares Ansprechen, definiert als 3-log Reduktion der *BCR-ABL*-Transkripte, bei weniger als 5 % der Patienten vor [33]. Dies ist gleichbedeutend mit dem Fortbestehen eines Reservoirs an residualen leukämischen Zellen, die als Quelle für eine Krankheitsprogression bzw. ein Rezidiv dienen können. Die Erkenntnis, dass in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle eine minimale Resterkrankung (minimal residual disease) fortbesteht, trübte den initialen Optimismus. Maligne Progenitorzellen als Reservoir für Rezidiv- und Resistenzentwicklung spielen in der Pathogenese der CML eine zentrale Rolle, auch weil sie die Fähigkeiten akquiriert haben, sich den physiologischen Kontroll- und Reparaturmechanismen der Zelle zu entziehen und so ihr Langzeitüberleben zu sichern. Diese aberrante Entwicklung erreichen sie vor allem durch Deregulation der Apoptose [33]. Hinsichtlich der Resistenzentwicklung ist grundsätzlich die primäre Resistenz (Refrakterität) von der sekundären Resistenz, die weiter klassifiziert werden kann, zu unterscheiden. Letztere ist erworben und entwickelt sich nach einem initialen Ansprechen. Bei der primären Resistenz hat bereits initial kein Ansprechen auf IM stattgefunden. Die Ansprechrate und Dauer des Therapieerfolges sind hochgradig abhängig vom Stadium der Erkrankung, in dem die Therapie begonnen wurde. So steigt die Resistenzrate in fortgeschrittenen CML Stadien wie AP und BK deutlich an [18]. Ein sehr kleiner Anteil der neu diagnostizierten CML Patienten in CP erreicht unter IM Therapie, auch bei Dosissteigerung auf 600-800 mg/Tag, keine komplette hämatologische Remission, bzw. keine dauerhafte zytogenetische Remission. Gründe für diese primäre Resistenz können bisher noch undefinierte Mechanismen sein, die sich in der intrinsischen Heterogenität der Leukämie und in individuell unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften widerspiegeln. Die zelluläre

Aufnahme von IM geschieht über einen aktiven Prozess über hOCT1 (human organic cation transporter). Die Expression dieses Transporters variiert stark zwischen den verschiedenen Individuen. Außerdem ist IM ein Substrat für das P-Glykoprotein, dem Produkt des MDR-1 Gens (multidrug resistance gene). Folglich können hohe P-Glykoprotein Spiegel den Medikamentenabfluss erhöhen [18]. Sekundäre oder erworbene Resistenz ist im Gegensatz zur primären etwas besser verstanden. Es sind drei Hauptmechanismen der sekundären Resistenzentwicklung gegenüber TKI bekannt:

***BCR-ABL* Gen-Amplifikation**

Die Genamplifikation in IM resistenten leukämischen Zellen wurde initial in LAMA84R Zellen beschrieben, die in steigenden IM Konzentrationen kultiviert wurden [17]. Ein entscheidender Faktor bei dem Selektionsprozess war die Wahl von marginal aktiven IM- Konzentrationen unterhalb der IC_{50} . LAMA84R produzieren ca. 5 mal mehr BCR-ABL Protein als ihre elterlichen Zellen LAMA84. Die *BCR-ABL* Gen-Amplifikation war der verantwortliche Mechanismus für die BCR-ABL Überexpression. Leukämische Zellen, die das Zielprotein von IM überexprimieren, haben einen Selektionsvorteil und expandieren. Die Identifikation der Gen-Amplifikation als Resistenzmechanismus unterstreicht die große Abhängigkeit von BCR-ABL vermittelten Signalwegen, auch in fortgeschrittenen Krankheitsstadien [17].

***BCR-ABL* Gen-Mutation**

Punktmutationen in der *ABL*-Kinasedomäne des *BCR-ABL*-Gens stellen sich als häufigste Ursachen heraus, die zur Reaktivierung der Kinaseaktivität führen. Mehr als 90 unterschiedliche Punktmutationen sind bisher identifiziert worden, die mit unterschiedlichen Graden der IM-Resistenz assoziiert sind. Nach der Lokalisation können die Punktmutationen 4 Hauptgruppen zugeteilt werden:

1. Mutationen, die direkt die IM-Bindungstasche betreffen, z.B. den sog. „Gatekeeper“-Rest Thr315 (~25% aller Mutationen). Sie interagieren direkt mit dem Inhibitor über Wasserstoffbrücken oder Van der Waals Kräfte. In diese Gruppe gehören z.B. V289A, T315I und F317L [17].
2. Mutationen innerhalb der ATP-Bindungsschleife (= P-loop), eine hochkonservierten Region, die für die Phosphatbindung verantwortlich ist (~ 40%). Ein Beispiel für diesen Mutationstyp ist E255K. Mutationen im P-loop der Kinasedomäne sind mit einer IM Resistenz vergesellschaftet und bedingen eine schlechte Prognose [5].
3. Mutationen innerhalb der Aktivierungsschleife (activation loop) resultieren in einer IM-insensitiven Konformation (~5%).
4. Mutationen der katalytischen Dömäne (~25%).

Ogleich die Mutationstypen in unterschiedlichen Bereichen der TK lokalisiert sind, reduzieren viele die Bindungsaffinität von BCR-ABL für IM, resultierend in unterschiedlichen Resistenzgraden. Die Kinaseaktivität wird durch die Mutationen nicht aufgehoben, allerdings weisen einige Mutationen eine niedrigere enzymatische Aktivität auf als der BCR-ABL Wildtyp [17]. Die verschiedenen Mutationen werden mit unterschiedlichen Graden der Onkogenität im Vergleich zum BCR-ABL Wildtyp assoziiert. Es hat sich gezeigt, dass erhöhte Onkogenität mit gesteigerter Kinaseaktivität und erweitertem Transformationspotential korreliert. In diesem Sinne bildet T315I eine wichtige Ausnahme, da diese Mutation zwar erhöhte Onkogenität trotz reduzierter Kinaseaktivität für klassische ABL-Substrate aufweist [56]. T315I scheint klinisch die wichtigste Rolle zu spielen. Diese Mutation stellt eine therapeutische Herausforderung dar, da sie sich nicht nur komplette Resistenz gegenüber IM, sondern auch gegenüber sämtlichen TKI der 2. Generation wie Nilotinib und Dasatinib zeigt.

Zusätzliche zytogenetische Aberrationen

Die Akquisition zusätzlicher zytogenetischer Veränderungen im Verlauf wird als Parameter für eine steigende IM Resistenz gewertet und ist mit einer Krankheitsprogression assoziiert. Die Rolle der Aneuploidie in diesem Zusammenhang gilt als gesichert. Z.B. werden Trisomie 8 und 19 oder ein zweites Ph-Chromosom beobachtet. Weitere sekundäre Veränderungen, die eine Progression zur BK einleiten, sind beispielsweise Punktmutationen der Gene RAS und p53, Amplifikation von c-myc, Rearrangierungen und Deletionen [25].

Da IM die TK-Aktivität von BCR-ABL inhibiert, ist die Messung und Quantifizierung der TK-Aktivität ein geeignetes Instrument, um die Wirkung des TKI zu überwachen. Dies kann durch Enzymassays ermittelt werden, oder durch Analyse seiner Autophosphorylierung oder Phosphorylierung von geeigneten Substraten, wie z.B. CRKL erfolgen. Viele Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ein Krankheitsprogress mit dem Wiederauftreten eines voll aktiven BCR-ABL Proteins assoziiert ist. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich Resistenzen entwickeln, weil *BCR-ABL*-positive Zellen trotz IM-Therapie Mechanismen aktivieren, um ihre TK-Aktivität aufrecht zu erhalten, eher als dass sie unabhängig von *BCR-ABL* beeinflussten Signalwegen werden. Resistenzen entstehen somit, wenn Zellen Wege rekrutieren, um ausreichend *BCR-ABL*-Signale aufrecht zu erhalten [17].

1.2.5 Neue BCR-ABL Inhibitoren

Aufgrund des sich immer deutlicher als Problem in der Therapie der CML herausstellenden Phänomens der Resistenzentwicklung, wurden große Anstrengungen in der Weiterentwicklung neuer Substanzen investiert. Die Klasse der neuen Inhibitoren beinhaltet selektive ABL-Inhibitoren, duale Inhibitoren der ABL- und SRC-Kinasen, Aurora Kinase Inhibitoren und nicht-ATP-kompetitive Inhibitoren von BCR-ABL.

Nilotinib (AMN107)

Zielproteine von Nilotinib (Tasigna®), einem IM-ähnlichen Aminopyrimidinderivat sind ABL, PDGFR, KIT und EPHB4. Die Substanz ist ca. 30-fach potenter als IM in der Funktion als ABL-Inhibitor und weist eine höhere Affinität zu der ATP-Tasche des BCR-ABL-Onkoproteins auf. In Phase II Studien zeigte es seine Wirksamkeit gegen alle Mutationen mit Ausnahme der T315I. Die Y253H Mutante scheint auch relativ resistent gegen Nilotinib zu sein [70].

Dasatinib (BMS-354825)

Der Multikinaseinhibitor Dasatinib (Sprycel®) ist ein oral verfügbares Medikament, das eine ca. 300-fach höhere Aktivität als IM aufweist. Im Gegensatz zu IM und Nilotinib bindet Dasatinib an die aktive Konformation der ABL Kinasedomäne. Targets sind ABL, PDGFR, KIT, und Kinasen der SRC Familie. Die TK der Src Familie sind in multiple intrazelluläre Signaltransduktionswege involviert und beeinflussen so Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen. Da BCR-ABL SRC Kinasen aktiviert, liegt die Idee nahe, dass simultanes Targeting von ABL und SRC die IM-Resistenz überkommen kann [70]. Dasatinib wirkt auf die meisten IM resistenten Mutanten, mit der Ausnahme von T315I Mutation. Seit 2006 ist Dasatinib bei Resistenz oder Intoleranz gegen IM als Zweitlinientherapie zugelassen. Als mögliche Nebenwirkungen sind Neutropenie, Thrombozytopenie, gastrointestinale Symptome, Hautausschläge und insbesondere Perikard- und Pleuraergüsse beschrieben [56].

Bosutinib (SKI 606)

Das oral verfügbare 4-Anilino-3-Quinolincarbonitril-Derivat ist ein potenter dualer Inhibitor der ABL- und SRC TK. Im Gegensatz zu den vorangegangenen TKI übt es keine nennenswerte Hemmung auf KIT und PDGFR aus. Dieses engere Wirkspektrum kommt wahrscheinlich einem günstigerem Toxizitätsprofil *in vivo* zugute. Es kann im Gegensatz zu IM an die aktive und an die intermediäre Konformation von BCR-ABL binden. Eine wichtige Eigenschaft von Bosutinib ist seine signifikant überlegene Fähigkeit, die BCR-ABL TK in CD34⁺ CD38⁻ Progenitorzellen von unbehandelten CML Patienten zu hemmen. In Phase II Studien bestätigte es sich als nebenwirkungsarmes Medikament, insbesondere wurden keine Pleuraergüsse und Lungenödeme beobachtet [56].

Aurora Kinase Inhibitoren

Die humanen Aurora Kinasen AURKA, AURKB und AURKC sind mitotische Regulatoren und werden für die genomische Stabilität gebraucht. Sie sind essentiell für eine korrekte Zellzyklusprogression und somit auch für die Zellproliferation. Die Aurora Kinasen A und B werden im Krebsgewebe überexprimiert [56]. PHA-739358 als klinisch am weitesten entwickelte Substanz aus dieser Familie ist ein selektiver Inhibitor von ABL- und Aurora Kinasen A-C. Die Substanz zeigt starke antiproliferative und proapoptotische Effekte auf verschiedene *BCR-ABL*-positive und negative Zelllinien [19].

Eine Reihe weiterer TK- und Aurora Kinase Inhibitoren wie z.B. INNO-406, AZD0530 und MK-0457 befinden sich derzeit in der Entwicklung im Rahmen von klinischen Studien. Besonders vielversprechende Substanzen scheinen GNF-2 und ON012380 zu sein, die gegen ABL Domänen außerhalb der ATP-Bindungsstelle gerichtet sind [56].

Abgesehen von den weiterentwickelten TKI der zweiten Generation gewinnt die Identifikation direkter oder indirekter downstream targets von *BCR-ABL* eine immer größere Bedeutung in Hinsicht auf die Einführung neuer synergistisch wirkender Therapiekombinationen, um die Resistenzmechanismen zu umgehen.

1.3 Polyamine

Polyamine sind multivalente organische Kationen [66]. Sie greifen in zahlreiche zelluläre Prozesse durch Bindung an RNA, DNA, Nukleotridiphosphate und andere saure Moleküle ein.

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin sind essentiell für das normale Zellwachstum und ihr intrazellulärer Gehalt steigt mit zunehmender Zellproliferation [28]. Polyaminmangel äußert sich in reduzierter Zellproliferation und führt letztendlich zum Zelltod. Der Polyamingehalt von Zellen unterliegt der Regulation durch Biosynthese, Abbau, Wiederaufnahme und Exkretion [29]. Die Ornithin-Decarboxylase (ODC) stellt das Schlüsselenzym der Polyaminbiosynthese dar und ist zugleich Angriffspunkt für Regulationsmechanismen (Abb. 2). ODC hat eine für ein Enzym ungewöhnlich kurze Halbwertszeit von weniger als einer Stunde [60]. Eine zentrale Rolle bei der effektiven Regulation des Polyaminlevel spielt das Antienzym der ODC, kurz Antizyme [44]. Antizyme reduziert die Halbwertszeit weiter bis auf wenige Minuten und induziert so einen raschen Abbau der ODC. Polyamine bewirken eine negative Rückkopplung und somit Hemmung der ODC [34].

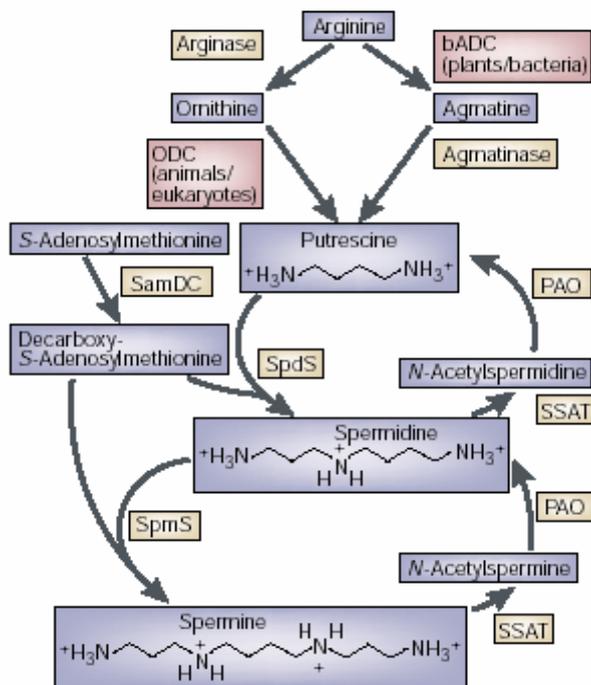


Abb.2 Biosynthese und Katabolismus der Polyamine, Quelle: [9]

Ausgangspunkt ist die Aminosäure Arginin. Das Enzym Ornithindecarboxylase (ODC) initiiert die Polyaminbiosynthese durch Produktion des Diamins Putrescin. Im nächsten Schritt wird eine Aminopropylgruppe vom Methionin durch Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin an Putrescin angehängt um Spermidin zu formen. Eine weitere Aminopropylgruppe wird an Spermidin angehängt und formt Spermin. An dieser Reaktion sind des weiteren zwei eigenständige Synthesen beteiligt: Spermidin Synthase (Spds) und Spermin Synthase (SpmS).

Zwar greifen die Polyamine in komplexe zelluläre Mechanismen ein, dennoch können ihre Aufgaben grob in zwei Hauptkategorien gegliedert werden: Zum einen sind sie essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität und zum anderen stimulieren Polyamine die Zellproliferation auf verschiedenen Wegen. Im folgenden sollen einige Polyaminfunktionen explizit genannt werden:

- Es wurde nachgewiesen, dass die Proteinbiosynthese generell in Gegenwart von Polyaminen durch unterschiedliche Angriffspunkte gesteigert ist. Diese proliferativen Effekte werden auf die Stimulation der Biosynthese von DNA, RNA und Proteinen u.a. durch Stimulation der ribosomalen 30 S Untereinheit zurückgeführt [28].
- Als kationische Verbindungen binden sie an DNA, RNA und Proteine und dienen so als Gegenionen zur Neutralisierung der negativen Ladungen der Nukleinsäuren [29].
- Blockierung und Modulierung von Ionenkanälen (Kalium-Einwärtsgleichrichter) und des NMDA-Rezeptors [28].
- Donatoren von modifizierenden Elementen der Hypusinierungsreaktion von eIF5A [55].
- Sie dienen als Transkriptionsregulatoren und als Duftstoffe [9].

Von den vielfältigen Funktionen der Polyamine gebührt ihrer Beteiligung an der Hypusinierung von eIF5A besonderes Interesse im Zusammenhang mit der Erforschung neuer Angriffspunkte bei der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie. Inwiefern die Hypusinierungsmodifikation als möglicher Angriffspunkt für zukünftige Therapieoptionen dienen könnte soll im Folgenden erläutert werden.

1.4 Hypusinierung als posttranslationale Modifikation von eIF5A

Der eukaryontische Initiationsfaktor 5A (eIF5A) ist insofern als herausragendes Protein anzusehen, als dass es das einzig bekannte Protein ist, das die posttranslational synthetisierte Aminosäure Hypusin enthält. EIF5A ist ein kleines (18 kDa) universell konserviertes Protein. Es handelt sich um ein sehr stabiles Protein mit einer Halbwertszeit $T_{1/2}$ von 7 Tagen [46]. Hypusiniertes eIF5A ist essentiell für die Zellviabilität in Säugetieren, Hefen und Archaeobakterien [54]. Es wurden beim Menschen zwei eIF5A Gene identifiziert: *eIF5A-1* und *eIF5A-2*. Die kodierten Isoformen sind zu 84% identisch aber werden in verschiedenen Geweben und einigen Tumorzelllinien unterschiedlich exprimiert. Eine Überexpression von eIF5A-2 mRNA in bestimmten Tumorzelllinien, z.B. Ovarialkarzinom und Kolorektales Karzinom deutet auf die mögliche Rolle von eIF5A-2 als potentielles Onkogen hin [7], [8]. eIF5A wurde ursprünglich als Translations-Initiationsfaktor charakterisiert, darauffolgende Studien konnten seine Rolle als generellen Initiationsfaktor jedoch nicht unterstützen [72]. Im Folgenden zeigte sich, dass eIF5A die Methionyl-Puromycin Synthese stimuliert, was auf seine Beteiligung bei der ersten Peptidbindung der Proteinbiosynthese hindeutet. Seine genaue Rolle bei der Proteinsynthese ist noch nicht vollständig geklärt, in der Literatur finden sich diesbezüglich bisher

kontroverse Angaben. Der Einfluss von eIF5A auf den Zellzyklus ist indirekt und äußert sich am ehesten durch Regulierung der Genexpression von Faktoren, die für den G1/S Übergang benötigt werden. Es gibt Hinweise dafür, dass diese Kontrolle der Expression auf dem Level der Translation stattfindet [72]. EIF5A ist ein zellulärer Kofaktor des HIV-1 Rev Trans Aktivator Proteins und ist auf diese Weise indirekt an der intrazellulären HIV Replikation beteiligt [4].

Neben seiner Beteiligung beim Rev- Shutteling dient dieses Protein auch der RNA Stabilität. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Abfall von aktivem eIF5A-Spiegel und der Akkumulation von decapped mRNA in Säugetierzellen [47].

Zur Erlangung seiner biologisch aktiven Form wird eIF5A einer posttranslationalen Modifikationsreaktion, der sogenannten Hypusinierung, unterzogen. Die Hypusinierungsreaktion ist essentiell für die physiologische Funktionsfähigkeit von eIF5A. In 2 enzymatischen Schritten wird die von den Polyaminen abgeleitete Aminosäure Hypusin [N^{ϵ} -(4-amino-2-hydroxybutyl)Lysin] synthetisiert und an das eIF5A-Vorläuferprotein angehängt. Im ersten Schritt katalysiert das Enzym Deoxyhypusin-Synthase (DHS) mit NAD^+ als Kofaktor den Transfer eines Aminobutylrestes von Spermidin als Donator auf die ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrestes (Lys50 in humanem eIF5A) des eIF5A-Precursor Moleküls [52]. Das Zwischenprodukt ist Deoxyhypusin [N^{ϵ} -(4-aminobutyl)Lysin]. Im zweiten Modifikationsschritt hydroxyliert das Enzym Deoxyhypusin-Hydroxylase (DHH) den angehängten 4-Aminobutylrest in einer Fe(II)-abhängigen Reaktion und komplettiert somit die Aktivierung von eIF5A (Abb. 3) Durch diese einzig bei eIF5A nachgewiesene posttranslationale Modifikation entsteht das reife eIF5A Endprodukt [54]. Der Spiegel an aktivem eIF5A ist stark abhängig vom Spermidin Gehalt der Zellen.

Die Hypusinierung von eIF5A beeinflusst auch das Verteilungsmuster des Proteins in der Zelle. Während der Precursor sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden ist, ist das hypusinierte reife Endprodukt primär zytoplasmatisch lokalisiert [40].

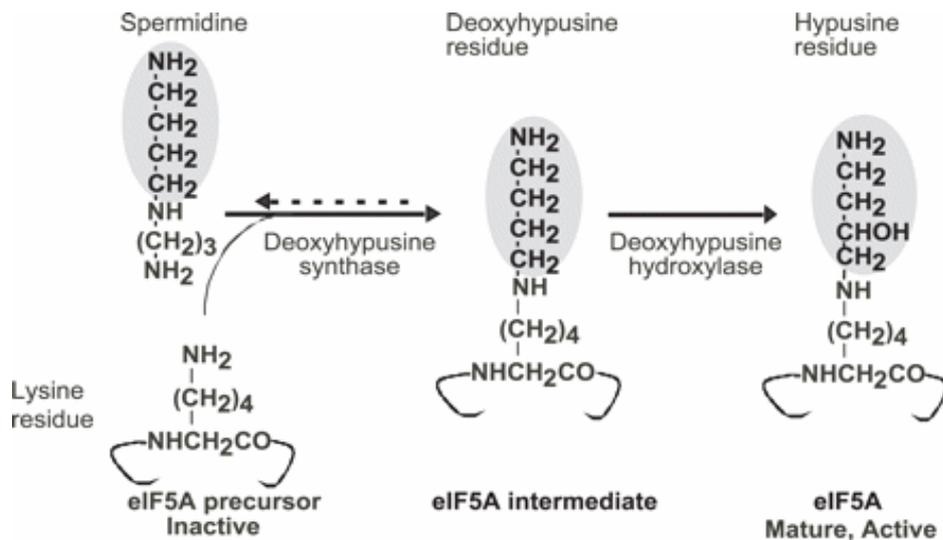


Abb. 3 Schema der Hypusinierungsschritte von eIF5A, Quelle: [53]

Der Hypusin-Syntheseweg hat sich in Eukaryonten entwickelt, dabei sind eIF5A, DHS und DHH hoch konserviert. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass der Erhaltung der zellulären Funktionen von eIF5A im Laufe der Evolution elementare Bedeutung zukommt. Ein herausragendes Merkmal der Hypusinierungsreaktion ist die strikte Spezifität der Hypusinierungsenzyme DHS und DHH zu ihrem Substrat, nämlich eIF5A [71],[32]. In Anbetracht dieser hochgradigen Spezifität und der für seine Funktionsfähigkeit unumgänglichen Hypusinierung, zeichnen sich eIF5A und die Enzyme der Hypusinbiosynthese als neue potentielle Zielstrukturen bei der Proliferationshemmung ab. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass eine Blockade der Hypusinierung zu gestörter Zellproliferation in unterschiedlichen Zelllinien (Park et al. 1997) und zu Zellzyklusarrest in der G1/S Phase führt [23], [54]. Es ist bemerkenswert, dass sowohl die Verfügbarkeit an reifem eIF5A als auch der zelluläre Gehalt an Polyaminen unabhängig voneinander die Zellproliferation hemmen. Diese Tatsache unterstreicht die Vermutung, dass sowohl eIF5A als auch Polyamine essentiell für Zellviabilität und Proliferation sind, jedoch unabhängig voneinander diese Vorgänge involviert sind [46]. Potente Inhibitoren der DHS und DHH, so haben mehrere Arbeiten gezeigt, bewirken starke antiproliferative Effekte auf Zellen und induzieren Zellzyklusarrest. N¹-guanyl-1,7-diaminoheptan (GC7), ein potenter und selektiver Inhibitor der DHS, entpuppte sich als Substanz mit generellen antiproliferativen Effekten, zeigte jedoch keinen Unterschied bezüglich seiner Wirksamkeit auf normale oder maligne Zellen [65]. Anhand eines gestörten Melanomwachstums in Mäusen konnte zum ersten Mal *in vivo* der antitumor-Effekt von GC7 nachgewiesen werden [30].

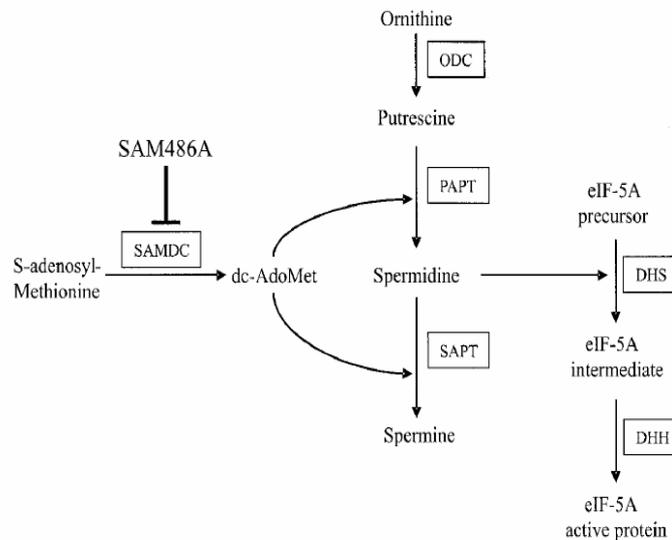


Abb.4 Schematische Darstellung der Wechselwirkung zwischen Polyaminen und eIF5A, Quelle [62].

1.5 Deoxyspergualin

Deoxyspergualin (DSG) wurde bereits 1984 beschrieben [67]. Es handelt sich um ein synthetisches Derivat des Spergualins, einer antibiotischen Substanz, die von *Bacillus laterosporus* produziert wird [67]. Anhand experimenteller Organtransplantationsversuche im Tiermodell wurden ihm immunsuppressive und antiproliferative Effekte zugeschrieben, außerdem löste die Substanz Apoptose in sich schnell teilenden Zellen aus [50]. DSG unterscheidet sich von anderen gängigen immunmodulierenden Medikamenten wie z.B. Cyclosporin A und FK506 sowohl strukturell als auch in seiner Wirkweise. Der genaue immunsuppressive Wirkmechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. DSG bindet bestimmte Hitzeschock Proteine (Hsp) wie z.B. Hsc70 und Hsp90 und inhibiert den nukleären Transport des Transkriptionsfaktors NF- κ B, eines für die Immunantwort wichtigen Regulationsfaktors [26]. Weitere Effekte von DSG auf die Immunantwort sind eine reduzierte Antikörperproduktion durch B-Zellen, Inhibition der IL-6- und TNF- α Produktion, sowie Unterdrückung der frühen B- und T-Zellentwicklung. CD4⁺ T-Zellen scheinen jedoch das vorrangige Angriffsziel zu sein, und so entfaltet DSG seine immunmodulierenden Effekte vorwiegend durch Hemmung der CD4⁺ T-Zell Expansion, indem es das Wachstum naiver aktivierter T-Zellen unterdrückt. Außerdem führte DSG-Behandlung zu erniedrigter IFN- γ Produktion durch TH-1 Effektorzellen [57]. Zellzyklusanalysen demonstrierten eine DSG-induzierte Blockierung der Zellzyklusprogression durch Hemmung des G1-S Übertritts. Es ist bekannt, dass der Spermidin Rest des DSG absolut notwendig für seine antiproliferativen Eigenschaften ist. DSG hemmt das Zellwachstum durch Inhibition der Polyaminbiosynthese, so sind in DSG-behandelten Leukämiezellen deutlich erniedrigte Level der Polyamine Spermidin, Spermin und Putrescin zu verzeichnen [24].

Es konnte gezeigt werden, dass bei DSG Behandlung muriner Mammakarzinom Zellen eine starke Hemmung der Zellproliferation und der Formation von aktivem eIF5A zu verzeichnen ist. Die Aktivität der DHS, dem ersten Enzym der Hypusinierungsreaktion, wird bereits bei niedrigen DSG-Konzentrationen gehemmt [47]. Die Akkumulation von decapped mRNA, einem Phänomen, das typischerweise mit dem Verlust von aktivem eIF5A assoziiert ist, war ein weitere Erkenntnis dieser Arbeit. Darüber hinaus wurde DSG eine Wirkung als Angiogenese Inhibitor zugeschrieben.

Klinische Anwendungsgebiete von DSG

DSG und seine Analoga wurden ursprünglich als antiproliferative Substanzen entwickelt und fanden bald darauf klinisch Einsatz als Immunsuppressiva. Multizentrische Phase II Studien über den Einsatz von DSG bei Nierentransplantationen begannen in Japan 1989. DSG war in der Lage, bei Patienten nach NTX 77,5% aller Abstoßungen zu beherrschen [1]. In diversen klinischen Studien präsentierte sich DSG als äußerst effektives Medikament in der Behandlung und der Prävention sowohl der frühen als auch der späten akuten Abstoßungsreaktion [6], [36]. DSG wurde auch zur Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen nach Leber- und Pankreastransplantationen erfolgreich eingesetzt [22], [21]. 1994 wurde DSG als Medikament zur Monotherapie von akuten Abstoßungsreaktionen nach NTX im asiatischen Raum zugelassen und Phase III Studien in den USA folgten. In einigen Fällen gibt es Hinweise dafür, dass DSG effektiver als andere Substanzen die Immunantwort unterdrücken kann, so wird DSG in einem Fallbericht als einzig wirksames Medikament in der Therapie einer akuten Graft-vs-Host Reaktion, die nicht auf CsA ansprach, beschrieben. In weiteren klinischen Studien bestätigte sich DSGs Wirkung als potentes Medikament zur Abwendung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation und verlängerte das Graftüberleben [20]. Neben seiner Anwendung als Immunsuppressivum nach Organtransplantationen kommt DSG auch bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen zum Einsatz. Im Mausmodell einer autoimmunen Enzephalomyelitis konnte DSG erfolgreich den Zeitpunkt der Symptommanifestation verzögern und den Schweregrad der Erkrankung mildern [26]. Bei Patienten mit therapierefraktärer Wegnerscher Granulomatose, die auf ein konventionelles Therapieregime (Cyclophosphamid plus Kortikosteroide) nicht ansprachen, wurde DSG erfolgreich eingesetzt und führte bei diesen Patienten zur Remission [63]. Bei therapierefraktären SLE-assoziierten Glomerulonephritiden zeigte sich DSG als sicheres und wirkungsvolles Medikament mit tolerablen Nebenwirkungen [41].

Pharmakokinetik und Nebenwirkungen

DSG hat ein Molekulargewicht von 469,91 und die Summenformel $C_{17}H_{37}N_7O_3 \cdot 3HCl$ [51].

Aufgrund seiner geringen Bioverfügbarkeit (<5%) muss DSG parenteral verabreicht werden. Nach intravenöser Gabe wird DSG schnell in biexponentieller Weise aus dem Plasma eliminiert. Die Halbwertszeit beträgt annähernd 2 Stunden. Weniger als 10% des aufgenommenen DSGs wird unverändert renal ausgeschieden, der Rest wird zu mindestens 7 inaktiven Metaboliten verstoffwechselt. DSG zeigt insgesamt ein tolerables Nebenwirkungsspektrum, es verursacht weder Nephro- noch Hepatotoxizität. Klinisch spielt die dosisabhängige reversible Knochenmarksdepression, die teilweise den Einsatz von Graulozyten Stimulationsfaktor (G-CSF) notwendig macht, eine Rolle. Das Blutbild normalisiert sich in der Regel bis spätestens 3 Wochen nach Beendigung der Therapie. Appetitverlust, Schwindel, Diarrhoe und Taubheitsgefühl im Gesicht sind weitere unter DSG Behandlung beobachtete unerwünschte Arzneimittelwirkungen [27].

2. Fragestellung

Seit 2001 ist IM unbestreitbar der Goldstandard in der Therapie der neu diagnostizierten CML in der chronischen Phase. Der initiale Enthusiasmus über den durchschlagenden Erfolg dieses Medikaments wurde durch die Beobachtung von Resistenzentwicklung gegen IM getrübt. Leider entwickeln sich Resistenzen insbesondere in den fortgeschrittenen Krankheitsstadien AP und BK, und resultieren in kurzen Remissionsdauern von lediglich 6-12 Monaten. Um das Problem der Resistenz zu beherrschen, ergibt sich die dringende Notwendigkeit, neue therapeutisch nutzbare *BCR-ABL*-abhängige Zielproteine zu identifizieren. In diesem Kontext gewinnt die Evaluation weiterer, bisher nicht näher charakterisierter *BCR-ABL*-abhängiger Effektorproteine eine große Bedeutung hinsichtlich ihrer Eignung als synergistisch wirksame Kombinationspartner. Vor diesem Hintergrund wurde das Proteinexpressionsmuster *BCR-ABL*-positiver Zellen unter der Behandlung mit IM mittels 2-D-Gelelektrophorese untersucht. Unter den 19 differentiell exprimierten Proteinen fand sich auch der eukaryontische Initiationsfaktor 5A, dessen Expression nach IM-Exposition vermindert war [2]. Das Protein eIF5A spielt eine Schlüsselrolle in Zellproliferation und Differenzierung. Seine Einzigartigkeit liegt darin begründet, dass es das einzig bekannte Protein ist, das zur Erlangung seiner biologischen Aktivität der Hypusinierungsreaktion unterzogen werden muss. Hypusinierungsinhibitoren haben antiproliferative Eigenschaften und eignen sich daher theoretisch als therapeutische Optionen zur Behandlung von Neoplasien. Diese theoretischen Grundlagen boten die Initiative zur Untersuchung des Effektes verschiedener HI in Kombination mit IM. Das Zusammenwirken von IM mit den HI Ciclopirox (CPX) bzw. GC7 auf *BCR-ABL*-positive und negative Zelllinien wurde bereits untersucht und präsentierte sich dabei als synergistisch wirkendes dosisabhängiges Konzept und zeichnete sich als möglicherweise vielversprechenden neuen Therapieansatz der *BCR-ABL* positiven Leukämie ab [2]. Es warf sich die Frage auf, ob und in wiefern eIF5A an der *BCR-ABL*-vermittelten malignen Transformation hämatopoetischer Zellen involviert ist. Ausgehend von diesen Daten erschien die Testung neuer HI hinsichtlich ihrer Kompatibilität als Kombinationspartner mit IM zur Therapie der CML sehr lohnenswert. Basierend auf diesen Überlegungen war das Ziel dieser Arbeit, den HI Deoxyspergualin als möglichen Kombinationspartner mit IM zur Behandlung der CML näher zu charakterisieren. Die Wirkung von DSG in Hinsicht auf Proliferation, Zellzyklusprogression und Zytotoxizität auf *BCR-ABL*-positive und negative Zelllinien und auf CD34⁺ Patientenmaterial wurde untersucht. Ein zentrales Anliegen war dabei zu prüfen, ob ein synergistisches dosisabhängiges Wirkungsprinzip bei der Kombination von DSG und IM vorliegt, d.h. ob eine Vorbehandlung von Zellen mit DSG diese für eine anschließende IM Applikation sensibilisiert. Besondere Bedeutung gewinnt dieser Aspekt bei dem Anliegen, die therapeutische Lücke bei den verschiedenen Mutationstypen zu verkleinern bzw. zu schließen. In Hinsicht auf die Resistenzentwicklungen und verschiedenen Mutationstypen lag ein besonderes Augenmerk auf das Ansprechen der T315I Mutation, die sich bisher komplett resistent gegen IM und alle TKI der 2. Generation darstellte.

3. Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Es wurden verschiedene murine und humane *BCR-ABL*-positive und *BCR-ABL*-negative Zelllinien verwendet.

3.1.1 Murine Zellen

Die murinen Zellen wurden mit unterschiedlichen Konstrukten transduziert, um die unten beschriebenen Mutationstypen zu erhalten. Sie wurden von N.P. Shah und C.L. Sawyers (University of California- Los Angeles) zur Verfügung gestellt.

- BaF3 Wildtyp: Die *BCR-ABL*-negative Zelllinie benötigt für ihr Wachstum und ihre Lebensfähigkeit Interleukin 3 (IL-3). Diese pro-B-Zellen wurden aus dem peripheren Blut einer BALB/c-Maus gewonnen. Bezugsquelle war die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Da keine *BCR-ABL*-Translokation vorliegt, zeigen diese Zellen kein Ansprechen auf IM. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 29,6 μ M [19].
- BaF3-p210 ist eine *BCR-ABL*-positive Zelllinie, die sehr sensitiv auf IM reagiert. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 0,9 μ M.
- BaF3-p210-M351T ist *BCR-ABL*-positiv und weist eine partielle IM-Resistenz auf. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 1,57 μ M.
- BaF3-p210-E255K ist eine *BCR-ABL*-positive stark IM-resistente Zelllinie. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 11,2 μ M.
- BaF3-p210-T315I ist ebenfalls *BCR-ABL*-positiv und ist komplett resistent gegenüber IM und allen TKI der 2. Generation wie z.B. Nilotinib und Dasatinib. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 18,39 μ M.

3.1.2 Humane Zellen

- **K562**: Die *BCR-ABL*-positive Zelllinie stammt aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen CML-Patientin mit myeloischer Blastenkrise [42]. Die Zelllinie wurde von der DSMZ bezogen. Es handelt sich um eine undifferenzierte multipotente hämatopoetische maligne Zelllinie. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 0,19 μ M [19].
- **HL60**: Die *BCR-ABL*-negative Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen Patientin mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M2) gewonnen und wurde von der DSMZ bezogen. In Kultur differenzieren sich bis zu 10% der Zellen spontan in Myelozyten, Metamyelozyten oder Neutrophile [10]. Da es sich um eine *BCR-ABL*-negative Zelllinie handelt, zeigen HL60 kein Ansprechen auf IM. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt bei 25,0 μ M [19]

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendeten Suspensionskulturen wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 50 U Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte in regelmäßigen Abständen (jeden 2. Bis 3. Tag). Dazu wurden die Zellen bei 1400 U/min. und 20°C für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Dichte ausgesät. Den Zellansätzen der wachstumsfaktor-abhängigen Zelllinie Ba/F3 wurde murines IL-3 in einer Konzentration von 1µl/10ml zugesetzt. Für die Kultivierung von CD 34-positiven Zellen wurde das Cell Gro SCGM serumfreie Medium, mit Zytokinen versetzt, verwendet.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Suspensionszellen wurde ein Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Zellsuspensionen, die nicht am selben Tag verarbeitet werden sollten, wurden zunächst bei -80°C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C bis zur Analyse gelagert. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Einfriermedium gemischt, sofort bei -80°C eingefroren und anschließend in den flüssigen Stickstoff überführt. Die Kryokonservierung unterhalb von -120°C unterbricht biochemische Vorgänge und somit den Stoffwechsel der Zellen. DMSO diente dabei als Gefrierschutzmittel, indem es die Kristallbildung und die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert. Es bindet und ersetzt das Zellwasser. Beim Auftauen der Zellen wurde auf den zytotoxischen Effekt von DMSO bei Temperaturen über 0°C durch zügiges Arbeiten geachtet. CD34⁺ Zellen wurden in einem serumfreien und Antibiotikum-freien Medium kultiviert. Das Wachstum und die Differenzierung der CD34⁺ Zellen ist abhängig von verschiedenen humanen Wachstumsfaktoren. Aus diesem Grund wurde dem Medium S-CSF (100ng/ml), Flt-3 Ligand (100 ng/ml), TPO (50 ng/ml), IL-3 und IL-6 (je 20 ng/ml) und G-CSF (20 ng/ml) zugegeben. Die Inkubation erfolgte in einer 95%-igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

Da der Auftauvorgang so schnell wie möglich erfolgen sollte, wurden die Kryo-Röhrchen mit der Zellsuspension direkt aus dem flüssigen Stickstoff bzw. dem -80°C Kühlschrank in das Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach dem Resuspendieren der Zellen im Auftaumedium wurden sie mit 1400 U/min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität erfolgte über Trypanblau-Färbung und die Neubauer Zählkammer.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der „Neubauer Zählkammer“. Dazu wurden 10 µl der jeweiligen Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:5 resuspendiert. Das verwendete Trypanblau färbt lediglich die toten Zellen, da vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff aktiv zu eliminieren. Nach der Vitalfärbung wurden die Zellen in die Neubauer-Zählkammer überführt und gezählt, es konnte zwischen dem Anteil der lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Die Zellkonzentration ergibt sich aus dem Produkt der Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Kammerfaktor (10^4). Dementsprechend lautet die Formel zur Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer:

Zellzahl / ml = (Anzahl der Zellen / Anzahl der ausgezählten Quadrate) x Verdünnung x 10^4 .

3.3 Wachstumsfaktoren der Hämatopoese

Bei der Kultivierung der CD34⁺ Zellen wurden unterschiedliche rekombinant hergestellte Zytokine verwendet. Sie wurden von der Firma PeproTech bezogen. Folgende Informationen entstammen dem Peprotech Bestellkatalog.

- **Interleukin-3 (IL-3)**

IL-3 ist ein Spezies-spezifisches variabel glykosyliertes Zytokin. Dieser hämatopoetische Wachstumsfaktor vermittelt das Überleben, die Differenzierung und Proliferation von Progenitorzellen. IL-3 wird von T-Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen produziert und fördert die Thrombopoese, Phagozytose und die Antikörper-vermittelte zelluläre Immunabwehr. Eine immunmodulierende Rolle wird ihm über Aktivierung von Monozyten zugeschrieben. Viele der IL-3 vermittelten Effekte sind von einer Kostimulation seitens anderer Zytokine abhängig.

- **Interleukin-6 (IL-6)**

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immun- und Entzündungsreaktion spielt und diverse biologische Funktionen erfüllt. Es wird von T-Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten produziert. Es stimuliert B-Zell-Differenzierung und Antikörperproduktion, wirkt synergistisch mit IL-3 bei der Megakaryozyten-Entwicklung und Thrombozytenproduktion. Außerdem induziert es hepatische Akute-Phase Proteine und reguliert den Knochenstoffwechsel. Murines IL-6 ist wirkungslos auf humane Zellen.

- **Flt3-Ligand** (Fms-related tyrosine kinase 3 ligand)

Dieser Wachstumsfaktor reguliert die Proliferation der frühen Stadien der hämatopoetischen Zellen auf indirektem Weg, indem er synergistisch mit anderen CSFs und Interleukinen wirkt und so Wachstum und Differenzierung vermittelt. Humaner und muriner Flt3-Ligand weisen eine Kreuzreaktivität auf.

- **G-CSF** (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)
G-CSF wird klinisch nach KMT oder Chemotherapie eingesetzt, um die hämatologische Regeneration zu unterstützen. Dieser hämatopoetische Wachstumsfaktor stimuliert die Entwicklung von Progenitorzellen zu neutrophilen Granulozyten. Er wird von einer Vielzahl von Zellen wie z.B. Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Knochenmarksstroma als Antwort auf eine spezifische Stimulation produziert.
- **SCF** (Stem Cell Factor)
Der auch als c-Kit Ligand bezeichnete Wachstumsfaktor wirkt über Bindung an den c-Kit Rezeptor. SCF und c-Kit sind essentiell für das Überleben, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischen Zellen. Humaner SCF entfaltet nur geringe Wirkung auf Mauszellen, während muriner SCF volle Aktivität in humanen Zellen aufweist.
- **TPO** (Thrombopoetin)
TPO ist ein zelllinienspezifischer Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Reifung von Megakaryozyten stimuliert. Er bewirkt eine Erhöhung der zirkulierenden Level an Thrombozyten in vivo und wirkt so als wichtige Regulator des Thrombozytenpools. TPO wirkt über den c-mpl Rezeptor. Humanes und murines TPO weisen eine Kreuzreaktivität auf.

3.4 Isolation von CD34⁺ Zellen

Das angewendete Verfahren zur Gewinnung mononukleärer Zellen ist die Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll[®]. Zwecks der Isolation mononukleärer Zellen aus dem Vollblut der Patienten bzw. gesunden Spender wurde das Knochenmarksaspirat bzw. peripheres Blut in 50 ml Tubes mit 5 ml PBS und 2 ml EDTA oder 200 U/ml Heparin gegeben. Durch das Waschen des Primärmaterials mit RPMI 1640, 0,02 % Kollagenase B und 100 U/ml DNase kam es zur Lösung der Zellen. Diese wurden daraufhin in einem mit Puffer benetzten Präseparationsfilter gegeben. 35 ml der gewaschenen Zellsuspension wurden über eine Schicht mit 15 ml Ficoll[®] gelegt und 35 min bei 20°C in einer ungebremsten Zentrifuge bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Schicht vorsichtig entfernt, sodass die mittlere Schicht mit den mononukleären Zellen unberührt bleibt. Daraufhin wurden die Zellen entnommen und mit EDTA-angereichertem PBS gewaschen. Die Lösung wurde für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in einem Volumen von 300 µl Puffer/10⁸ Zellen resuspendiert. Zur Gewinnung der Fraktion CD 34-positiver Zellen wurde das indirekte „CD34 MicroBead Kit“ der Firma Miltenyi Biotecs verwendet. Seine wesentlichen Bestandteile sind:

- FcR-Blockierungsreagenz: humanes Immunglobulin
- Monoklonaler CD 34-Antikörper, der an ein Hapten gebunden ist: Maus IgG1-Isotyp
- Anti-Hapten Micro Beads

Das Kit wird zur Isolation von hämatopoetischen Stammzellen aus dem peripheren Blut, Knochenmark und Zellapherese verwendet. Mit dieser Methode kann ein Reinheitsgrad von 85-98% erzielt werden. Die selektive Isolation hämatopoetischer Vorläuferzellen ist durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD 34 möglich. Für die MACS[®] Separation werden die CD 34-positiven Zellen indirekt isoliert. Dies erfolgt mithilfe eines primär monoklonalen haptengebundenen Antikörpers. Außerdem wird ein anti-Hapten-AK, der an MACS MicroBead gekoppelt ist, verwendet. Auf diese Weise bindet der anti-Hapten-AK das Hapten, das durch vorherige Bindung an die CD 34⁺ Zellen gekoppelt ist. Das Isolationsverfahren in diesem Fall kann auf eine klassische Antigen (CD 34⁺)-Antikörper-Reaktion zurückgeführt werden.

3.5 Proliferationsassays

3.5.1 Kurzzeitproliferationsassay mit DSG

Beim Kurzzeitproliferationsassay wurde das Wachstumverhalten der verschiedenen murinen und humanen Zelllinien unter einer Behandlung mit DSG in verschiedenen Konzentrationsstufen für eine Dauer von 5 Tagen untersucht. In einer 24-Wellplatte mit flachem Boden wurden 1×10^4 Zellen/1ml/Well mit 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 4 μM und 8 μM DSG behandelt. Für jede Konzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kontrollzellen wurden mit dem DSG-Lösungsmittel behandelt. Nach der Medikamentenzugabe wurden die Zellen für 72 Std im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am Tag 3 erfolgte die erste Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet, um ihnen weiterhin ausreichende Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Nach dem Splitten wurde den Zellen frisches Medium mit der entsprechenden DSG Konzentration zugegeben. Am Tag 5 erfolgte die zweite Zellzahlbestimmung.

3.5.2 Langzeitproliferationsassay mit DSG

Beim Langzeitproliferationsassay wurde das Wachstumsverhalten der verschiedenen murinen und humanen Zelllinien unter einer DSG Behandlung mit 4 μM über einen Zeitraum von 13 Tagen untersucht. Die Festlegung der DSG Konzentration auf 4 μM beruhte auf den Beobachtungen des Kurzzeitproliferationsassays. Hier lag die gemittelte IC_{50} am Tag 5 bei ungefähr 4 μM . Die Kontrollzellen wurden mit dem DSG-Lösungsmittel behandelt. Dreifachbestimmungen der Kontrollzellen und der behandelten Zellen wurden angefertigt. Es wurden 5×10^4 Zellen/ml in 10 ml Kulturmedium in kleinen Kulturflaschen ausgesät und mit 4 μM DSG behandelt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte an den Tagen 3, 6, 8, 10, 13 der Behandlung. Nach der jeweiligen Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut auf die Ausgangszellzahl von 5×10^4 Zellen/ml

reduziert und in einer neuen Kulturflasche mit frischem DSG 4µM angereichertem Medium weiterkultiviert. Die Zellen die an den Tagen der Zellzahlbestimmung nicht weiterkultiviert wurden, wurden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen in 70% Ethanol fixiert. Die fixierten Zellen sollten der späteren FACS-Analyse dienen.

3.5.3 Proliferationsassay mit Kombinationstherapie DSG+IM

Tag 1, 2, 3 Kontrollzellen Vorbehandlung mit DSG 2 µM

K	0,039	0,156	0,625	2,5	10	K	0,039	0,156	0,625	2,5	10
K	0,039	0,156	0,625	2,5	10	K	0,039	0,156	0,625	2,5	10
K	0,039	0,156	0,625	2,5	10	K	0,039	0,156	0,625	2,5	10

Tab.1 Versuchsaufbau und Schema der IM-Applikation [µM] für die Kombinationstherapie.

Beim Proliferationsassay der Kombinationstherapie sollte das Wachstumsverhalten der verschiedenen murinen und humanen Zelllinie unter IM Monotherapie in ansteigender Konzentration im Vergleich mit der Kombinationstherapie bestehend aus 6 Tage Vorbehandlung mit DSG 4 µM und anschließender IM-Applikation in ansteigender Konzentration untersucht werden. Den Kontrollzellen wurde das Lösungsmittel von IM (H₂O:DMSO im Verhältnis 1:1) zugegeben, während ein anderer Teil der Zellen für 6 Tage mit DSG in einer Konzentration von 4 µM vorbehandelt wurde. Am 6.Tag wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen in 4 ml/Well in flachen 6-Well-Platten ausgesät und mit folgenden IM-Konzentrationen behandelt: K; 0,039 µM; 0,156 µM; 0,625 µM; 2,5 µM; 10 µM. Einzig die Zelllinie K562, die sehr empfindlich auf IM reagiert, wurde nach einem abweichenden IM-Schema behandelt: K; 0,039 µM; 0,078 µM; 0,156 µM; 0,3125 µM; 0,625 µM. Bei allen Zelllinie wurden für Tag 1, 2 und 3 separate Platten ausgesät, sodass für jeden Tag jeweils 3 Platten für die vorbehandelten Zellen (rot) und 3 Platten für die Kontrollzellen (schwarz) vorlagen. Insgesamt wurden also am 6. Tag 18 Platten nach oben aufgeführtem Schema ausgesät.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte 24, 48 und 72 Std nach IM-Zugabe. Dafür wurde an jedem Tag die Zellsuspension in jedem einzelnen Well gut resuspendiert und direkt im Anschluss in ein kleines Falcon Tube überführt. Die Falcon Tubes wurden für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 µl PBS aufgenommen und es wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt.

3.5.4 Proliferationsassay mit CD34⁺ Zellen

Es wurden CD34-positive Zellen von Gesunden Spendern und unbehandelten CML Patienten in der chronischen Phase hinsichtlich der Proliferation unter dem Einfluss einer DSG Monotherapie bzw. einer Kombinationstherapie DSG+IM untersucht.

Bei sämtlichen verwendeten Patientenmaterial lagen Einverständniserklärungen der Patienten zur Verwendung ihrer Zellen zu Forschungszwecken vor.

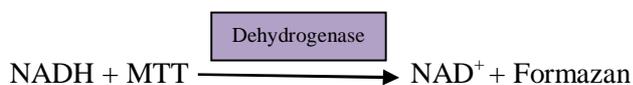
Für die DSG Monotherapie wurden die CD34 Zellen von 3 gesunden Spendern und 3 CML Patienten aufgetaut und in 15 ml Auftaumedium aus 60% RPMI und 40% FCS überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1500 rpm und 21°C zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend abgesaugt. Das verbliebene Zellpellet wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um serumfreie Zellen zu erhalten. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Es wurden 1×10^3 Zellen in 65 µl/Well ausgesät. Dazu wurde zytokinangereichertes (IL-3, IL-6, Flt3-Ligand, TPO, S-CSF und G-CSF) serumfreies Medium verwendet. Es folgte eine 12-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurde DSG in folgenden Konzentration nach in einem Mediumvolumen von 10 µl appliziert: K; 0,5 µM; 1 µM; 2 µM; 4 µM und 8µM DSG.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte an den Tagen 3, 6, 9 und 12 nach der DSG-Applikation. Um dem Abbau der Substanz in Lösung Rechnung zu tragen, wurde an den Tagen 3, 6 und 9 im Anschluss an die Zellzahlbestimmung jedes Well mit 85 µl frischem Wachstumsfaktoren-angereichertem Medium mit entsprechender DSG-Konzentration nachbehandelt.

Für die kombinierte Behandlung der CD34⁺ Zellen mit DSG und IM wurden die Zellen wie oben beschrieben aufgetaut und in zwei 96-Well-Platten mit einer Dichte von 1×10^3 Zellen in 70 µM/Well ausgesät. Nach einer Inkubation von 12 Std wurde eine Platte mit einer subapoptischen Konzentration von 2 µM DSG vorbehandelt, der Kontrollplatte wurde das Medikamentenlösungsmittel zugegeben. In beiden Fällen betrug das Pipettiervolumen 10 µl. Am 3. und am 6. Tag der Vorbehandlung wurde 85 µl bzw. 75 µl frisches, mit Wachstumsfaktoren angereichertes Medium appliziert. Die DSG-Platte wurde am 6. Tag zusätzlich mit 2 µM DSG nachbehandelt. Außerdem wurden beide Platten an Tag 6 mit 10 µl IM-Lösung nach folgendem Schema behandelt: K; 0,039 µM; 0,156 µM; 0,625 µM; 2,5 µM; 10 µM. Für jede IM-Konzentration erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Zellzahlbestimmung erfolgte 24, 48 und 72 Std nach IM-Zugabe.

3.6 MTT –Assay

Der MTT-Assay ist ein Zytotoxizitätsassay, der die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen misst, und zwar unabhängig davon, ob sie zum Analysezeitpunkt DNA synthetisieren oder nicht. Mittels dieses Assays wurde die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen unter Einfluss von IM in verschiedenen Konzentrationen als Monotherapie oder als Kombinationstherapie mit DSG in einer Konzentration von 4 µM bestimmt. Das schwach gelb gefärbte Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] wird von lebenden Zellen aufgenommen. Dabei wird es durch NADH in einer succinat-abhängigen Dehydrogenase-katalysierten Reaktion der aktiven Mitochondrien zum blau-violett gefärbten Formazan [1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan] reduziert.



Diese Reaktion ist irreversibel. Das Formazan bildet sich in Form kleiner Nadeln in der Zelle. Das Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) lysiert die Zellen und setzt dadurch das gebildete Formazan frei. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird anschließend photometrisch bei 570 nm am ELISA-Reader gemessen. Die Höhe der Absorption stellt sich dabei proportional zur mitochondrialen Aktivität der Zellen dar.

Zur Durchführung des Tests wurden die zu untersuchenden Zellen mit einer Dichte von 9×10^3 Zellen/Well in 150µl des Kulturmediums in 96-Well-Platten mit flachem Boden ausgesät. Nach einer Vorinkubation von 24 Std bei 37°C wurde die Zellsuspension der 6 Tage mit DSG 4 µM vorbehandelten und der Kontrollzellen mit 50µl der entsprechenden IM-Konzentration in steigender Konzentration versetzt. Jede Konzentrationsstufe wurde neunfach angesetzt. Jeweils 3 Wells mit Kulturmedium ohne Zellsuspension und Medikament dienten dabei als Hintergrund, sowie 3 Wells mit Zellsuspension ohne Medikament als Nullwert.

H ₂ O											
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O	K	0,039	0,078	0,156	0,31	0,625	1,25	2,5	5	10	H ₂ O
H ₂ O											

Tab.5 Pipettierschema IM-Konzentration [µM] für MTT-Assay, K: Kontrolle

Nach 48 Std Inkubation bei 37°C wurde jedem Well 10 µl einer 10 mg/ml MTT-Lösung zugesetzt. Anschließend folgte eine zweistündige Inkubation der Platten im Brutschrank. Zur Freisetzung des Formazans wurden 90 µl Lysispuffer (15% SDS in Dimethylformamid / Wasser 1:1 ; pH 4,5) pro Well zugegeben. Zum Schutz vor UV-Licht wurden die Platten in Alufolie gewickelt und über Nacht auf den Schüttler gestellt. Nach 24 Std wurde die Absorption der Proben mittels eines ELISA-Readers bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Dabei steht die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis proliferierender Zellen vor der MTT-Zugabe. Die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Bestimmung der IC₅₀ Konzentration für IM bzw. DSG+IM wurden mit Hilfe der CalcuSyn-Software (Biosoft, Cambridge, UK) analysiert.

3.7 Apoptose/Nekrose-Assay nach Nicoletti

Die durchflusszytometrische Bestimmung des programmierten Zelltodes (Apoptose) beruht auf der Messung des zellulären DNA-Gehaltes. Die FACS Analyse (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) beruht auf der Emission optischer Signale der Zelle bei der Passage eines Laserstrahls. Dabei wird das Licht je nach Eigenschaften der Zelle gestreut und mittels Detektoren registriert. Die Streuung des Lichtes ist abhängig von der Größe und der Granularität der Zellen. So ergibt sich, dass das Vorwärtsstreulicht (FSC: Forward Scatter) abhängig vom Volumen der Zellen ist und ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel ist. Das Seitwärtsstreulicht (SSC: Sideward Scatter) ist abhängig von der Granularität der Zellen und ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel. Während der Apoptose kommt es durch die Aktivierung endogener Nukleasen und anschließender enzymatischer Verdauung zur charakteristischen Fragmentierung der DNA in Bruchstücke oligonukleosomaler Größe und zur Freisetzung der DNA-Fragmente. Dies führt zum reduzierten DNA-Gehalt apoptotischer Zellpopulationen und zur Identifikation der zellulären DNA im Histogramm als Sub-G1-Peak [58]. Da die Durchflusszytometrie auch Informationen über die Zellzyklusverteilung proliferierender Zellen liefert, sind anhand dieser Methode auch Aussagen über die Zellzykluspezifität der Apoptose-induzierenden Substanz möglich. Der Färbung der Zellen geht eine Vorbehandlung mit Ethanol voraus. Die Fixierung der Zellen mit Ethanol ermöglicht eine Permeabilisierung der Kernmembran sowie eine Auflockerung des Chromatins und verbessert die Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes Propidium Iodid. Viable Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, die für kationische Farbstoffe wie PI nicht durchlässig ist, sodass erst beim Zelluntergang PI eindringen, und in die DNA interkalieren kann.

Zur Durchführung der FACS Analyse wurden die in 70% Ethanol fixierten Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/Probe mit je 1 ml PBS gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde nach dem 2. Waschvorgang in 300 μ l der DNA-Färbelösung bestehend aus 1 ml PBS, 25 μ l RNase, 10 μ l PI resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Anschließend folgte eine Inkubation der Proben mit der Färbelösung von mindestens 20 min lichtgeschützt auf Eis. Die Messung erfolgte am FACS-Calibur™ im FL-3 Kanal, bei dem das Emissionsmaximum von PI von 650 nm erfasst wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest-Software.

4. Ergebnisse

4.1 Kurzzeitproliferationsassay

Beim Kurzzeitproliferationsassay wurde das Proliferationsverhalten der verschiedenen *BCR-ABL*-positiven und -negativen murinen und humanen Zelllinien unter der Behandlung mit ansteigenden DSG-Konzentrationen (0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 4 μM ; 8 μM) über einen Zeitraum von 5 Tagen beobachtet.

4.1.1 Murine Zelllinien

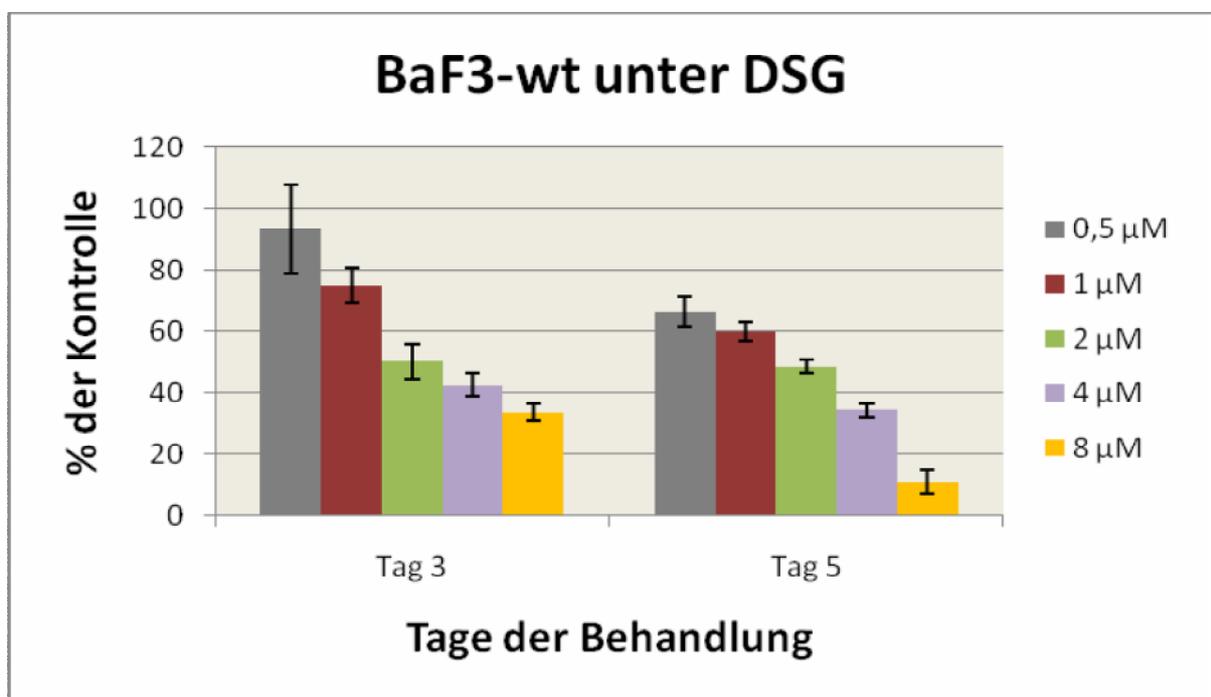


Abb. 5 Proliferation BaF3-wt unter verschiedenen DSG-Konzentrationen.

BaF3-wt: BaF3-wt ist eine *BCR-ABL*-negative Zelllinie, die nur IL3-abhängig proliferieren kann. Bereits am 3. Behandlungstag kommt es zu einer deutlichen dosisabhängigen Proliferationshemmung ab einer Konzentration von 1 μM DSG. Der t-Tests bestätigt die signifikante Proliferationshemmung ab einer DSG Konzentration von 1 μM an Tag 3 ($p=0,008$). Ansteigende DSG-Konzentrationen bewirken hoch signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den DSG-exponierten Zellen und den entsprechenden Kontrollzellen des jeweiligen Tages (Anhang Tab.1a). Die gemittelte IC_{50} liegt am 3. und am 5. Behandlungstag bei 2 μM . Die Tatsache, dass trotz der fehlenden *BCR-ABL*-Expression dieser Zelllinie eine eindeutige dosisabhängige Proliferationshemmung unter ansteigenden DSG-Konzentrationen zu beobachten ist, legt die Vermutung nahe, dass die antiproliferativen Effekte der Substanz nicht *BCR-ABL*-assoziiert sind.

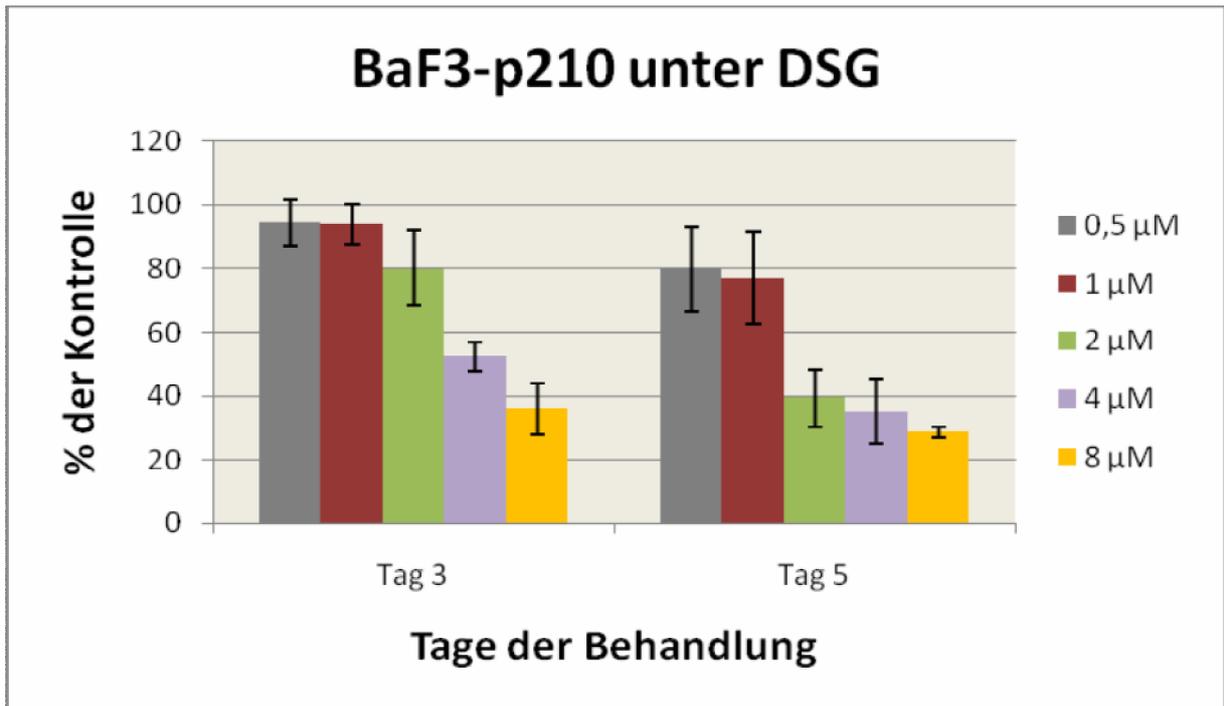


Abb.6 Proliferation BaF3-p210 unter verschiedenen DSG-Konzentrationen.

BaF3-p210: Die *BCR-ABL*-positive Zelllinie BaF3-p210 zeigt bereits ab dem 3. Behandlungstag eine dosisabhängige Proliferationshemmung unter der Behandlung mit ansteigenden DSG-Konzentrationen. Signifikante Unterschiede in der Zellzahl verglichen mit den entsprechenden Kontrollzellen zeigen sich an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 4 µM ($p=0,003$) und an Tag 5 ab einer DSG-Konzentration von 2 µM ($p=0,003$); (Anhang Tab.1b). Die IC_{50} an Tag 3 liegt bei ungefähr 4 µM und an Tag 5 bei 2 µM. BaF3-p210 ist eine *BCR-ABL*-exprimierende Zelllinie, die hoch sensibel auf IM reagiert ($IC_{50} \sim 0,9 \mu\text{M}$). Auf die DSG-Behandlung reagiert diese Zelllinie ebenfalls mit einer deutlichen dosisabhängigen Zellzahlreduktion.

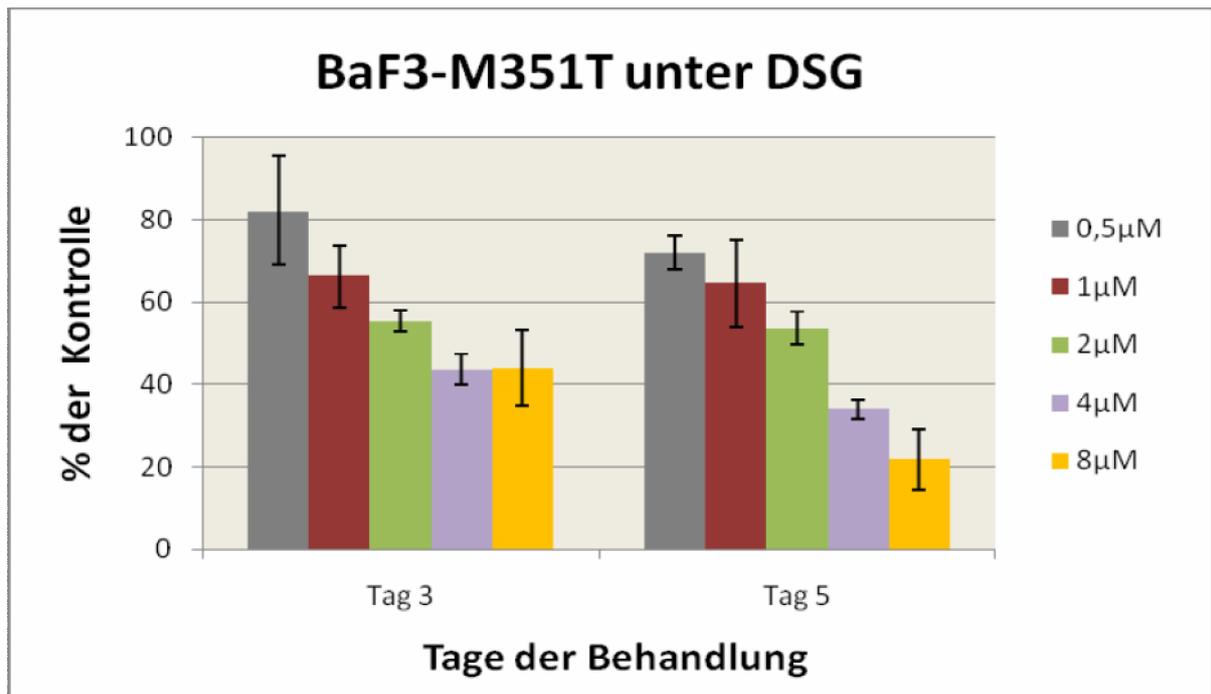


Abb.7 Proliferation BaF3-M351T unter verschiedenen DSG-Konzentrationen.

BaF3-M351T: Die *BCR-ABL*-positive Zelllinie BaF3-M351T zeigt eine eindeutige dosisabhängige Zellzahlreduktion bereits ab dem 3. Tag der Behandlung. Eine signifikante Proliferationshemmung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen tritt an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 1 µM ($p = 0,005$) und an Tag 5 bereits ab einer DSG Konzentration von 0,5 µM ($p = 0,008$) auf (Anhang Tab. 1c). Die IC_{50} am 3. und am 5. Behandlungstag liegt bei ca. 2 µM. BaF3-M351T reagiert trotz einer partiellen Resistenz noch relativ sensibel auf IM ($IC_{50} \sim 1,57$ µM). Die partielle IM-Resistenz hat allerdings keine Auswirkungen auf das Ansprechen dieser Zelllinie auf die DSG-Behandlung. Es zeigen sich hochsignifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen bereits ab 1 µM DSG am 3. Behandlungstag.

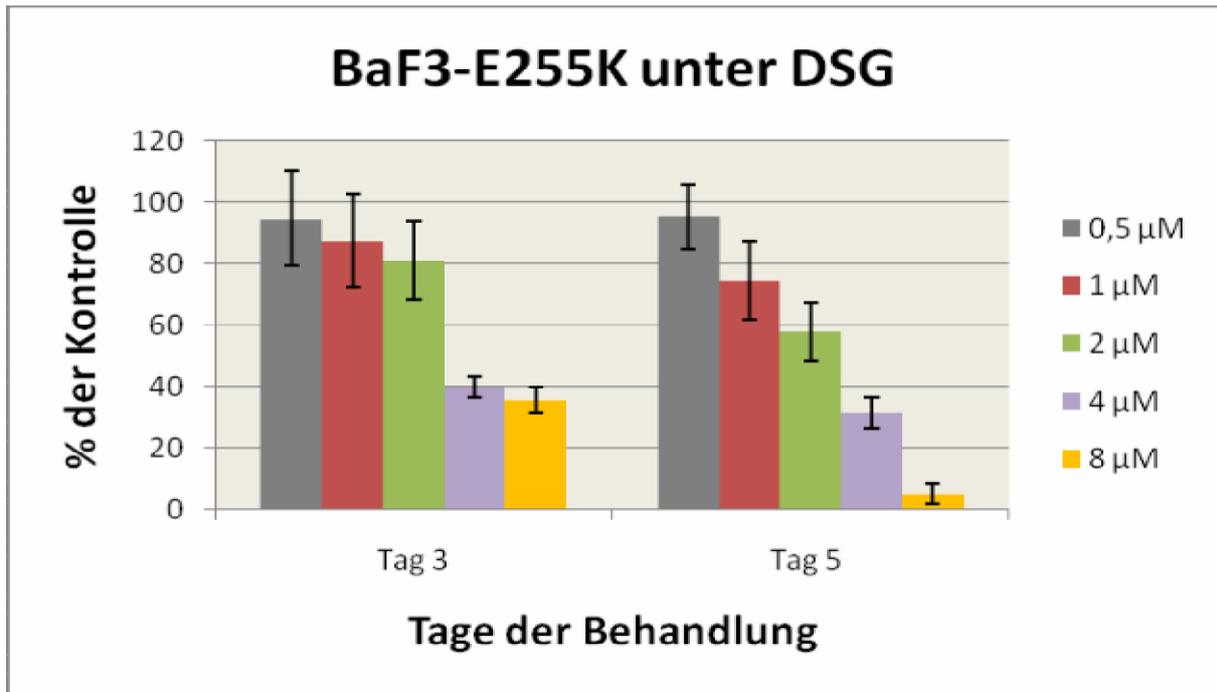


Abb.8 Proliferation BaF3-E255K unter verschiedenen DSG-Konzentrationen

BaF3-E255K: Die *BCR-ABL*-positive Zelllinie BaF3-E255K zeigt ebenfalls eine dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation ab dem 3. Behandlungstag. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle treten an Tag 3 erst ab einer DSG-Konzentration von 8 µM auf ($p=0,04$) auf (Anhang Tab. 1d). An Tag 5 der Behandlung sind signifikante Wachstumsunterschiede ab einer DSG-Konzentration von 2 µM zu beobachten ($p=0,008$). Die gemittelte IC_{50} liegt an Tag 3 bei ungefähr 3 µM und an Tag 5 liegt die IC_{50} bei 2 µM. Trotz der deutlichen IM-Resistenz von BaF3-E255K ($IC_{50} \sim 11,2$ µM) zeigen sich auch bei dieser Zelllinie deutliche DSG-induzierte Wachstumsunterschiede im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollzellen.

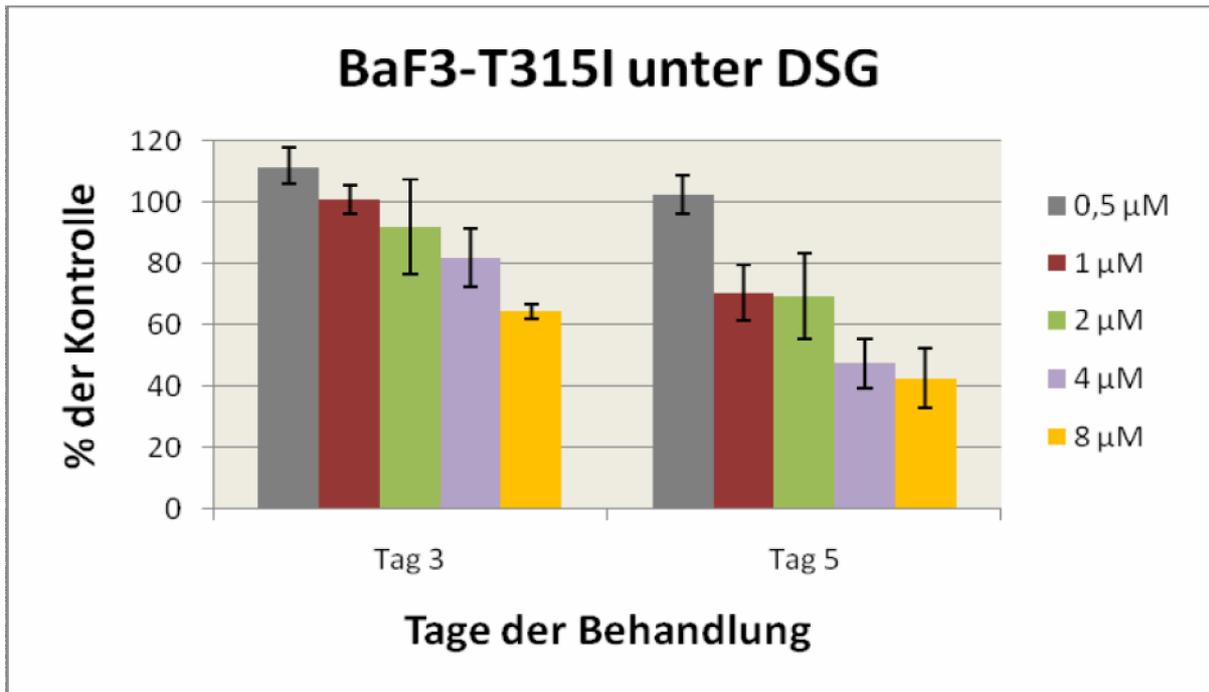


Abb.9 Proliferation BaF3-T315I unter verschiedenen DSG-Konzentrationen

BaF3-T315I: Diese Zelllinie zeigt wie die anderen murinen Zelllinien eine dosisabhängige Proliferationshemmung unter der Behandlung mit ansteigenden DSG-Konzentrationen. Signifikante Werte ergeben sich an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 4 µM ($p=0,03$) und an Tag 5 bereits ab einer DSG-Konzentration von 1 µM ($p=0,01$); (Anhang Tab.1e). Die IC_{50} liegt an Tag 3 bei einer DSG-Konzentration von über 8 µM und an Tag 5 bei einer DSG-Konzentration von ca. 4 µM. Diese *BCR-ABL*-positive Zelllinie ist durch eine komplette IM-Resistenz gekennzeichnet ($IC_{50} \sim 30 \mu\text{M}$). Mit diesem Hintergrund ist es besonders interessant festzustellen, dass diese Mutante vergleichbar sensitiv auf die DSG-Applikation reagiert, wie die partiell resistenten bzw. sensitiven Zelllinien.

4.1.2 Humane Zelllinien

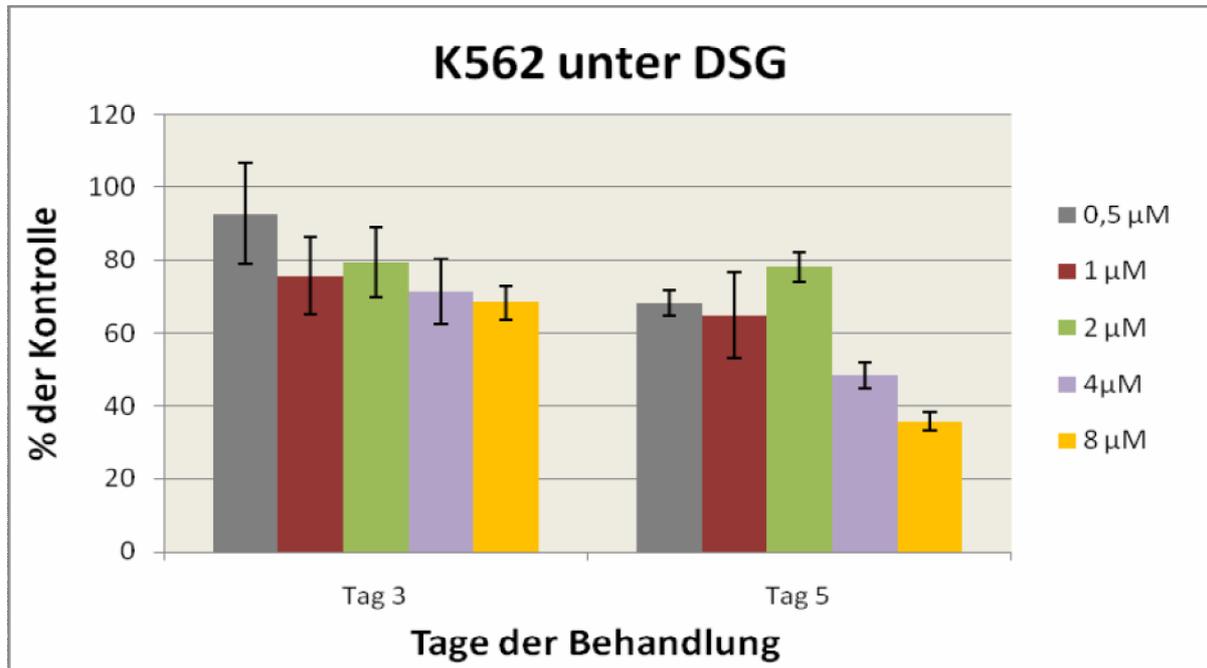


Abb.10 Proliferation K562 unter verschiedenen DSG-Konzentrationen

K562: Im Vergleich zu den murinen Zelllinien scheint die humane *BCR-ABL*-positive Zelllinie K562 etwas weniger sensitiv auf die DSG-Behandlung zu reagieren. Dieses äußert sich an höheren IC_{50} -Werten an den beobachteten Behandlungstagen. Die IC_{50} an Tag 3 liegt bei über 8 µM und an Tag 5 bei 4 µM. Signifikante Wachstumsunterschiede auf niedrigem Niveau treten an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 1 µM ($p=0,02$) auf, an Tag 5 ergeben sich für alle DSG Konzentrationen signifikante Wachstumsunterschiede zur Kontrolle (Anhang Tab.1 f).

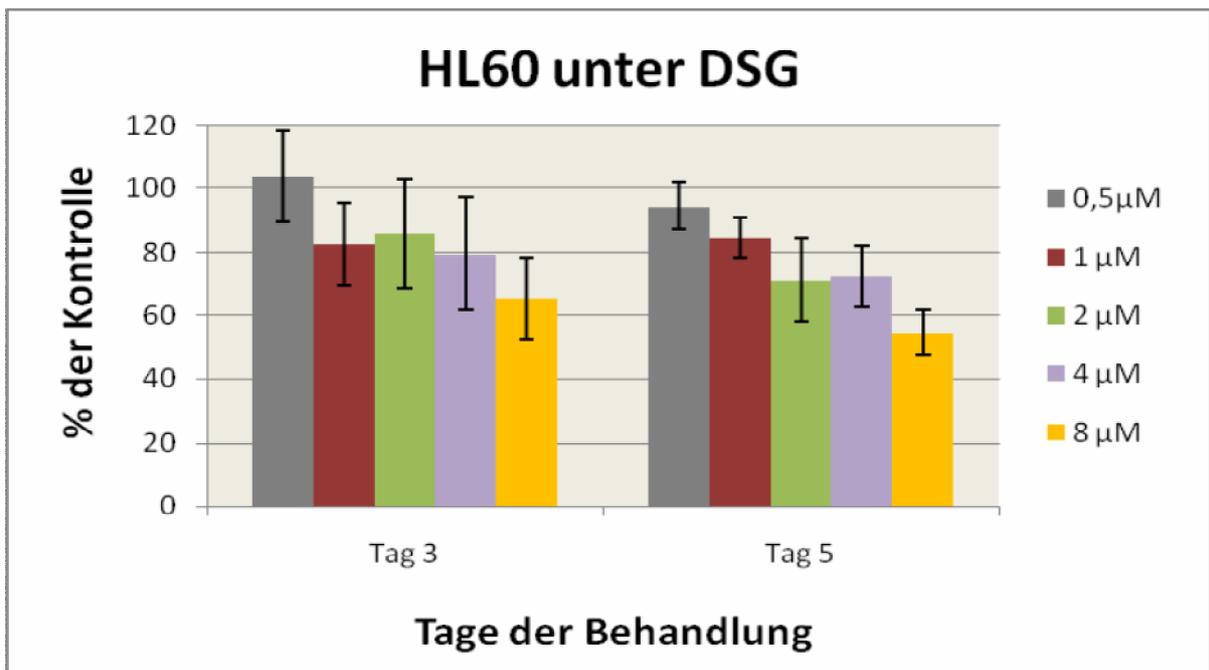


Abb.11 Proliferation HL60 unter verschiedenen DSG-Konzentrationen

HL60: Auch diese *BCR-ABL*-negative humane AML-Zelllinie zeigt im Vergleich zu den murinen Zelllinien eine geringer ausgeprägte dosisabhängige Proliferationshemmung. Dieses manifestiert sich in IC_{50} Werten an beiden beobachteten Tagen bei $> 8 \mu\text{M}$. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen treten am 3. Behandlungstag lediglich bei einer DSG-Konzentration von $8 \mu\text{M}$ auf ($p=0,01$). Am 5. Behandlungstag treten signifikante Unterschiede ab einer DSG-Konzentration von $2 \mu\text{M}$ auf ($p=0,03$); (Anhang Tab. 1g). Wenn auch weniger prominente Effekte als bei den murinen Zelllinien erzielt werden, so ist durch DSG ein gewisse dosisabhängige Proliferationshemmung bei diesen IM-insensiblen Zellen zu erzielen.

4.2 Langzeitproliferationsassay

Der Langzeitproliferationsassay diente der Beobachtung der Proliferationsdynamik der murinen und humanen Zelllinien über einen Zeitraum von 13 Tagen.

4.2.1 Langzeitproliferationsassay der murinen Zelllinien

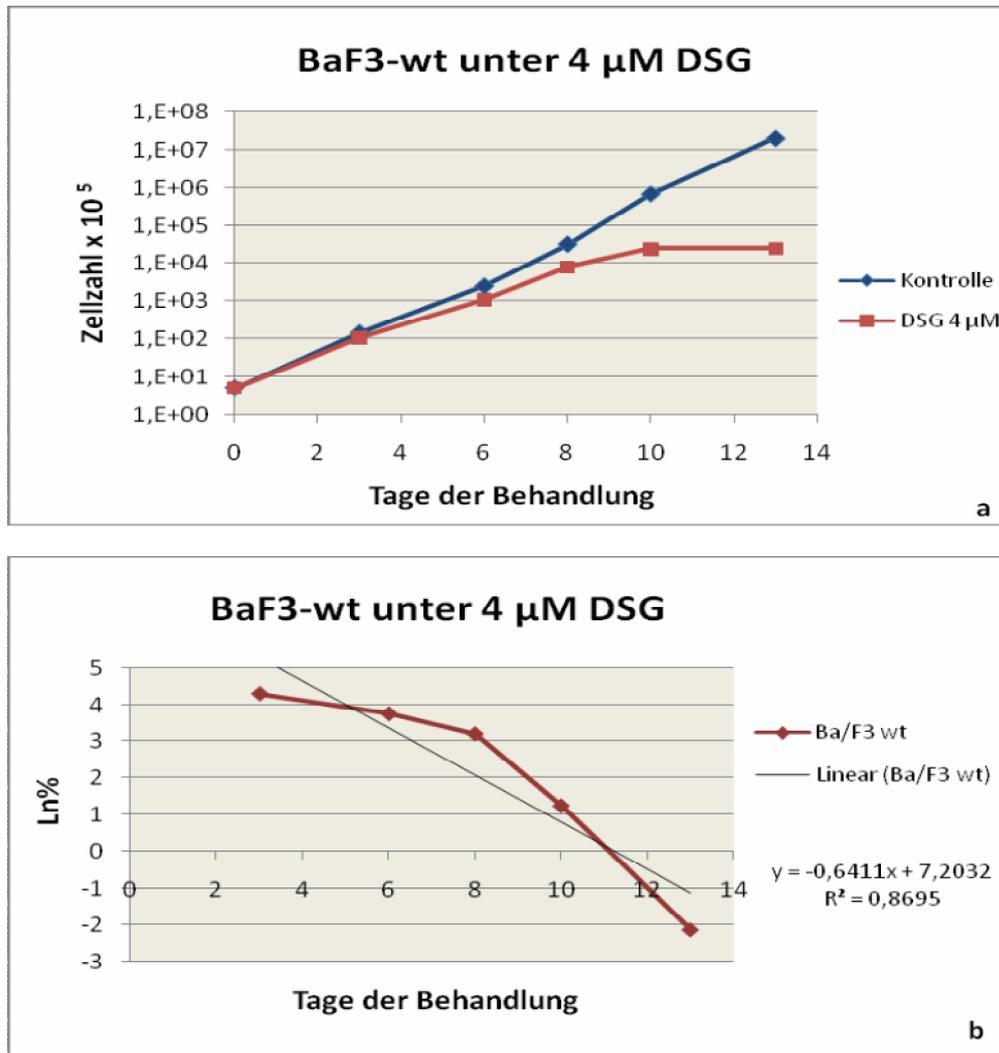


Abb.12 Langzeit-Proliferation BaF3-wt unter 4 µM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

BaF3-wt: Die Wachstumskurve der mit 4 µM DSG behandelten BaF3-wt Zellen beginnt sich ab dem 3. Behandlungstag von der Wachstumskurve der Kontrollzellen zu unterscheiden. Im weiteren Verlauf zeigen beide Kurven deutlich auseinander weichende Verläufe. Die Wachstumskinetik der DSG-behandelten Zellen zeigt einen deutlich trägeren Verlauf verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen. Mit Hilfe der Regressionsanalyse (Anhang 7.3) lässt sich feststellen, dass die Zellzahl täglich um 47,3% abnimmt. Diese Zellzahlreduktion ist signifikant im Vergleich zu den Kontrollzellen ($p=0,02$). Vereinbar mit den Ergebnissen des 5-Tages-Proliferationsassays lässt sich also feststellen, dass es im Verlauf einer Langzeitbehandlung der *BCR-ABL*-negativen Wildtyp-Zelllinie mit 4 µM

DSG zu einer signifikanten Zellzahlreduktion kommt, und zwar unabhängig von der *BCR-ABL*-Expression.

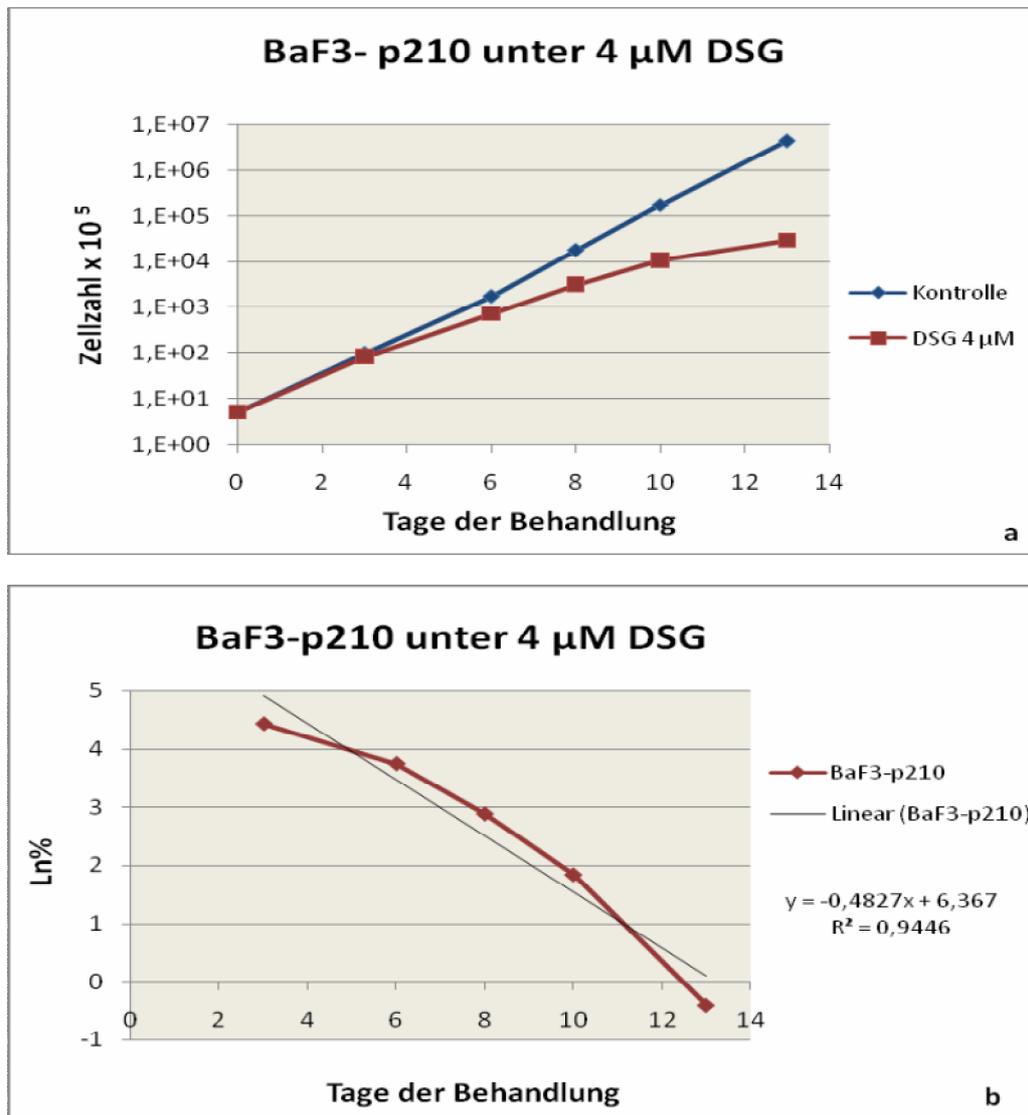


Abb.13 Langzeit-Proliferation BaF3-p210 unter 4 μM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

BaF3-p210: Wie bei der vorangegangenen Zelllinie divergiert die Wachstumskurve der mit 4 μM DSG vorbehandelten BaF3-p210 Zellen ab dem dritten Behandlungstag von der Wachstumskurve der unbehandelten Kontrollzellen. Die langsamere Wachstumskinetik zeigt sich insbesondere im weiteren Verlauf an einer zunehmenden Abflachung der Wachstumskurve. Die Regressionsanalyse ergibt eine durchschnittliche Zellzahlreduktion um 38,3 % im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,006$); (Anhang 7.3). BaF3-p210 als *BCR-ABL*-positive stark IM-sensible Zelllinie zeigt demzufolge eine ähnliche Wachstumsdynamik unter der DSG-Behandlung wie die *BCR-ABL*-negativen BaF3-wt-Zellen.

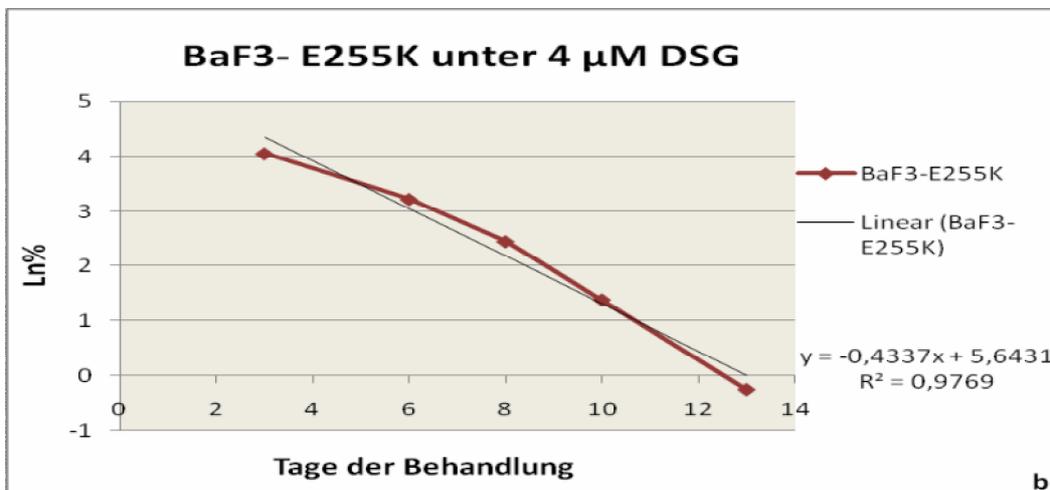
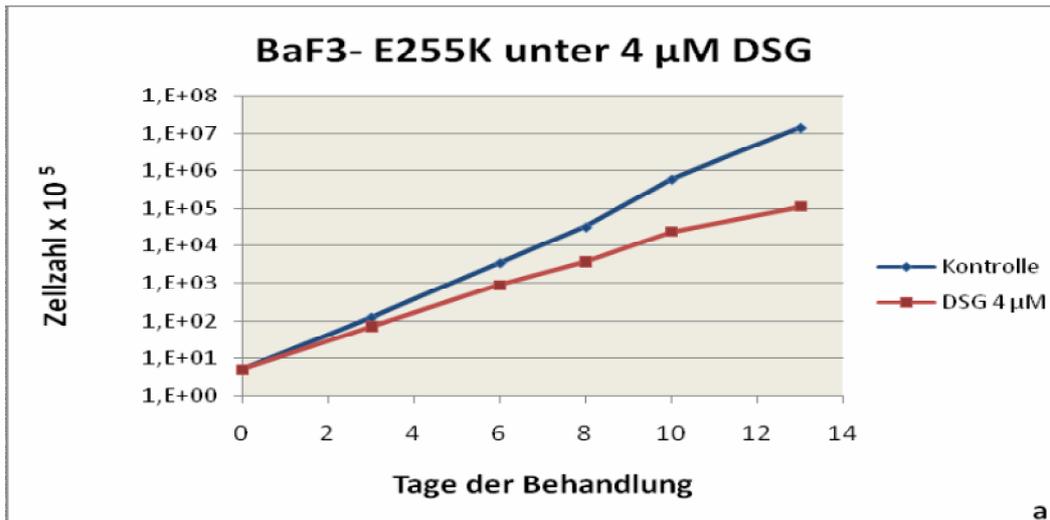


Abb. 14 Langzeit-Proliferation BaF3-E255K unter 4 μM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

BaF3-E255K: Bereits ungefähr ab dem ersten bis zweiten Behandlungstag beginnen die Proliferationskurven der mit 4 μM vorbehandelten und der unbehandelten Kontrollzellen auseinander zu weichen. Auch hier verdeutlicht sich die DSG-induzierte Proliferationshemmung in zunehmend auseinander weichenden Wachstumskurven. Am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 13) liegt die Zellzahl der behandelten BaF3-E255K um 2 log-Stufen niedriger als die der Kontrollzellen. Die Regressionsanalyse ergibt eine tägliche Zellzahlreduktion um 35,2% im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,002$); (Anhang 7.3).

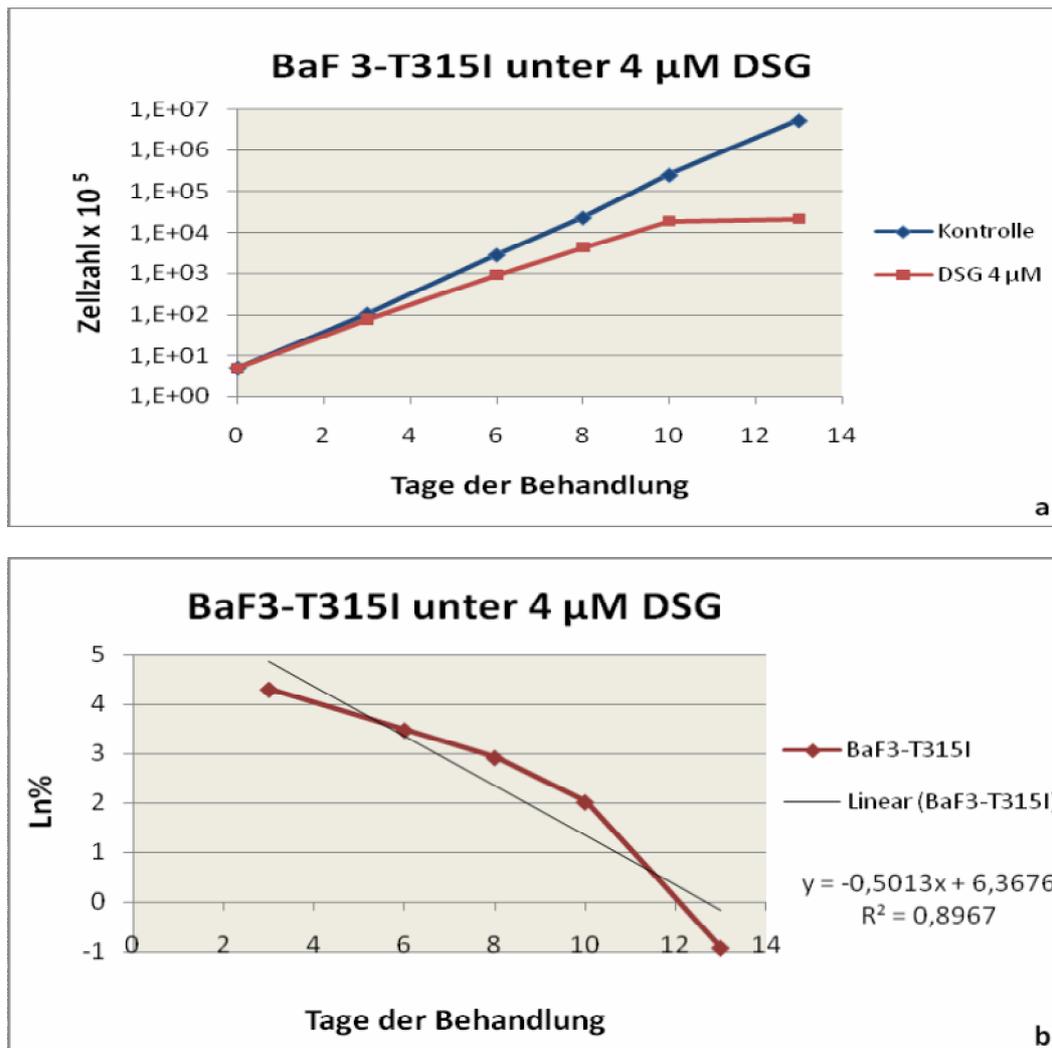


Abb. 15 Langzeit-Proliferation BaF3-T315I unter 4 μM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

BaF3-T315I: Die Wachstumsdynamik der BaF3-T315I steht im Einklang mit den anderen vorweg beschriebenen murinen Zelllinien. Auch bei dieser *BCR-ABL*-positiven komplett IM-resistenten Zelllinie weichen die Proliferationskurven der behandelten und unbehandelten Zellen mit zunehmender Expositionsdauer der Substanz immer deutlicher auseinander. Die Wachstumskurve der 4 μM DSG behandelten BaF3-T315I zeigt gegen Ende des Beobachtungszeitraums einen annähernd plateauförmigen Verlauf. An Tag 13 liegt die Zellzahl der behandelten Zellen um ca. 2 log-Stufen niedriger als die der Kontrollzellen. Die Regressionsstatistik ergibt eine tägliche durchschnittliche Zellzahlreduktion um 39,4% im Verlauf der Behandlung ($p=0,015$); (Anhang 7.3). Bei dieser hochgradig TKI-resistenten Mutanten, bei der IM keinerlei spezifische Effekte im Sinne einer Proliferationshemmung zeigt, können durch 4 μM DSG deutliche antiproliferative Effekte erzielt werden.

4.2.2 Langzeitproliferationsassay der humanen Zelllinien

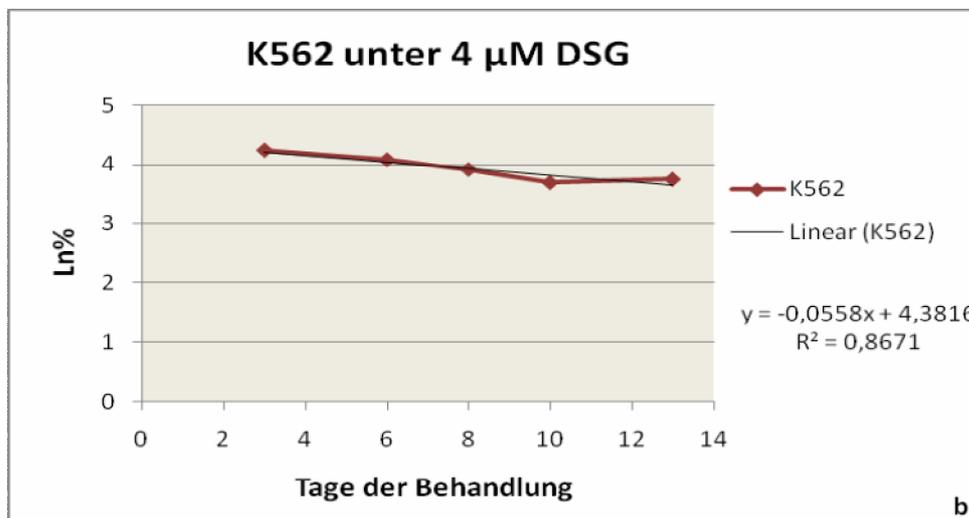
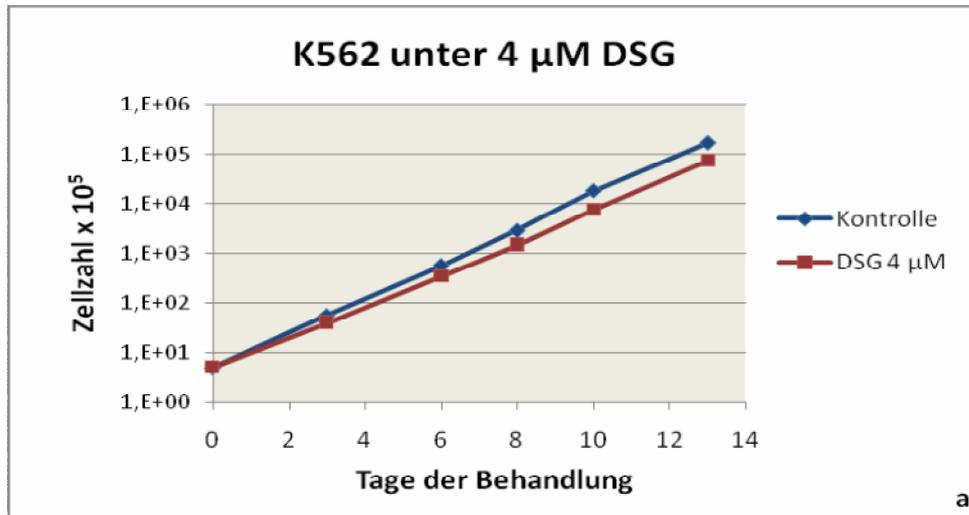


Abb. 16 Langzeit-Proliferation K562 unter 4 µM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

K562: Die Wachstumskinetik der humanen Zelllinien unterscheidet sich deutlich von den murinen Zelllinien. Schon bei erster flüchtiger Betrachtung der Wachstumskurven fällt deren geringere Divergenz auf. Zwar beginnen die Proliferationskurven ca. ab dem 2. Tag auseinander zu weichen, der Unterschied bleibt jedoch auch mit zunehmender Behandlungsdauer deutlich geringer als bei den murinen Zelllinien. Auffallend ist die insgesamt trägere Wachstumsdynamik der humanen Zellen im Vergleich zu den Mauszellen. Am Ende des Beobachtungszeitraums liegt die Zellzahl der Kontrollzellen um die 5. Log-Stufe, während bei den murinen Zellen die 7. Log-Stufe erreicht wird, entsprechend einer Zellzahl von über 1×10^7 Zellen. An Tag 13 der Behandlung beträgt die Zellzahl der Kontrollzellen bei K562 nur ungefähr das 2,4-fache der DSG-behandelten Zellen, während bei den murinen Zellen der Unterschied ungefähr 2 log-Stufen betrug. Die Regressionsanalyse (Anhang 7.3)

bestätigt die geringer ausgeprägte Proliferationshemmung und ergibt eine tägliche durchschnittliche Zellzahlreduktion von 5,42% im Verlauf der Behandlung ($p=0,02$).

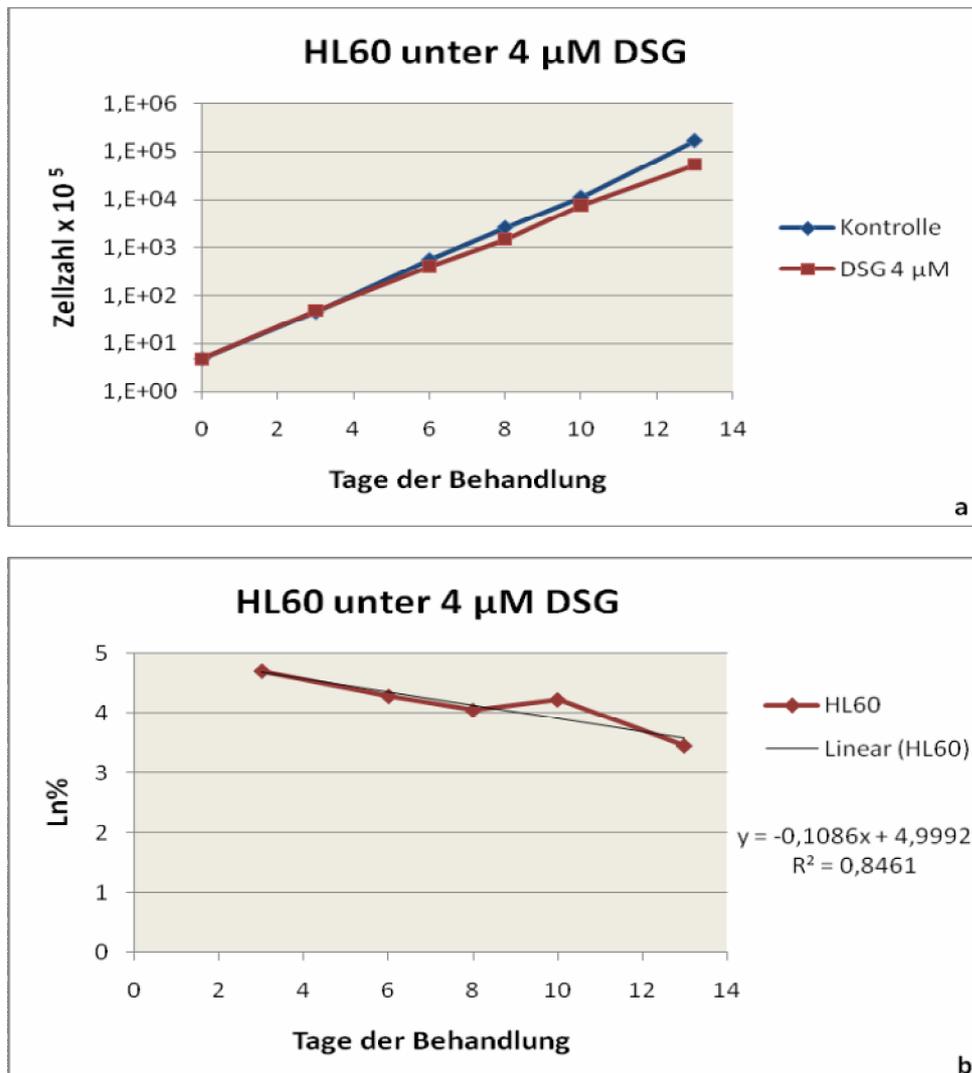


Abb.17 Langzeit-Proliferation HL60 unter 4 μ M DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen
a: Zellzahlen logarithmisch; b: Regressionsanalyse

HL60: Die zweite untersuchte humane Zelllinie HL60 zeigt eine ähnliche Wachstumsdynamik wie K562. Die am Ende des Beobachtungszeitraums erreichten Zellzahlen bewegen sich auf einem ähnlichen Niveau wie bei K562. Ein sichtbares Auseinanderweichen der Wachstumskurven von behandelten und unbehandelten Zellen ist hier allerdings erst später zu verzeichnen, ca. ab dem 5. Behandlungstag. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen des Kurzzeitproliferationsassays. Die Regressionsanalyse ergibt eine durchschnittliche tägliche Zellzahlreduktion um 10,3% im Verlauf der Behandlung ($p=0,03$); (Anhang 7.3).

4.2.3 Zusammenfassung der Langzeitproliferationsassays

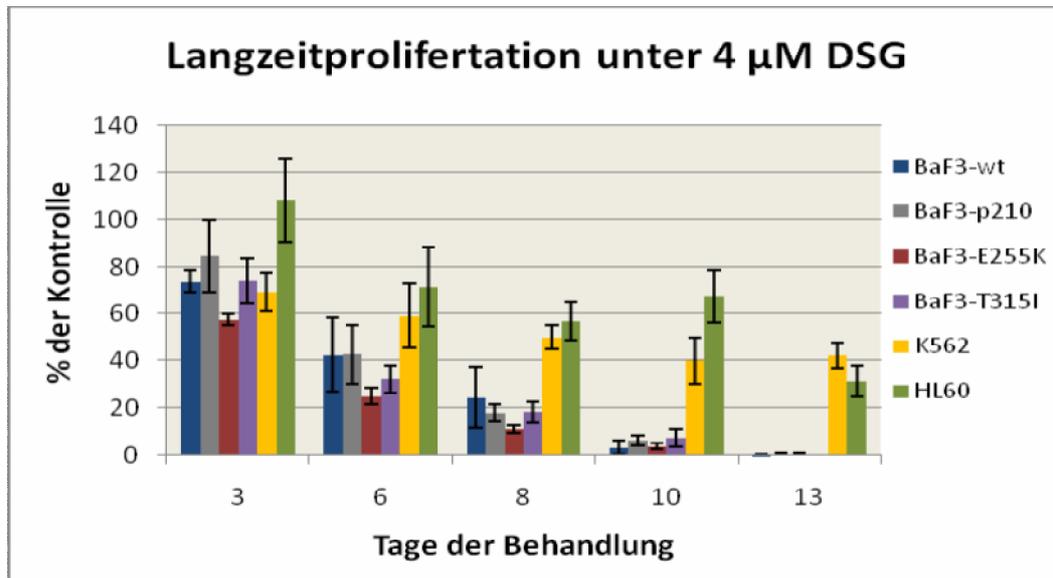


Abb.18 Übersichtsdarstellung aller Zelllinien unter 4 µM DSG über einen Zeitraum von 13 Tagen

Zusammenfassend lässt sich bei der Langzeitbehandlung der unterschiedlichen Zelllinien mit 4 µM DSG feststellen, dass murine und humane Zelllinien ein unterschiedliches Proliferationsmuster zeigen. Es wird deutlich, dass alle vier untersuchten murinen Zelllinien ähnlich auf die DSG-Behandlung reagieren. Bei allen kann eine signifikante DSG-induzierte Proliferationshemmung nachgewiesen werden, und zwar unabhängig von der Ausprägung des Merkmals *BCR-ABL*, dem Grad der Imatinibresistenz oder der Art der Punktmutation. Bei den humanen Zelllinien entfaltet DSG zwar auch signifikante antiproliferative Effekte, diese bewegen sich aber auf einem deutlich niedrigeren Niveau als bei den murinen Zelllinien. Auch bei den humanen Zelllinien scheinen die antiproliferativen Effekte nicht *BCR-ABL*-abhängig zu sein.

4.3 Proliferationsassay mit Kombinationstherapie

Das zentrale Anliegen bei der Durchführung des Proliferationsassays unter der Kombinationstherapie aus IM +/- DSG war die Klärung der Frage nach synergistischen Effekten zwischen beiden Substanzen. Es galt festzustellen, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit einer subapoptotischen DSG-Konzentration in Höhe von 4 μ M über einen Zeitraum von 6 Tagen diese für eine anschließende IM-Behandlung sensibilisieren würde. Um zu beurteilen, ob der erbrachte Effekt der Kombinationstherapie nicht einzig, bzw. vorwiegend auf den Einzeleffekt einer der Substanzen (IM bzw. DSG) beruht, müssen die Ergebnisse der Kombinationstherapie (rot) mit denen der IM-Monotherapie (blau) bzw. der DSG-Monotherapie (grün) verglichen werden. Die besseren antiproliferativen Effekte einer Kombinationstherapie im Vergleich zur IM Monotherapie ist auch unter Einbeziehung der vorangegangenen Ergebnisse offensichtlich. Da die Überlegenheit der Kombinationstherapie im Vergleich zur IM Monotherapie bei der Betrachtung aller Diagramme eindeutig zu erkennen ist, wurde eine statistische Analyse nur für den auf den ersten Blick weniger offensichtlichen Vergleich zwischen der Kombinationstherapie vs. DSG 4 μ M angestellt. Die Auswertung erfolgte für 3 Messzeitpunkte, nämlich 24h (Tag1), 48h (Tag2) und 72h (Tag3) nach IM-Applikation. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse des ersten Messzeitpunkts graphisch dargestellt. Besonderes Interesse galt hier der partiell IM-resistenten Zelllinie BaF3-M351T und der stark IM-resistenten Zelllinie BaF3-E255K. Bei den *BCR-ABL*-negativen Zelllinien BaF3-wt und HL60 sind keine synergistischen Effekte zu erwarten, antiproliferative Effekte sind hier ausschließlich auf den DSG-Effekt zurückzuführen.

4.3.1 Murine Zelllinien unter der Kombinationstherapie

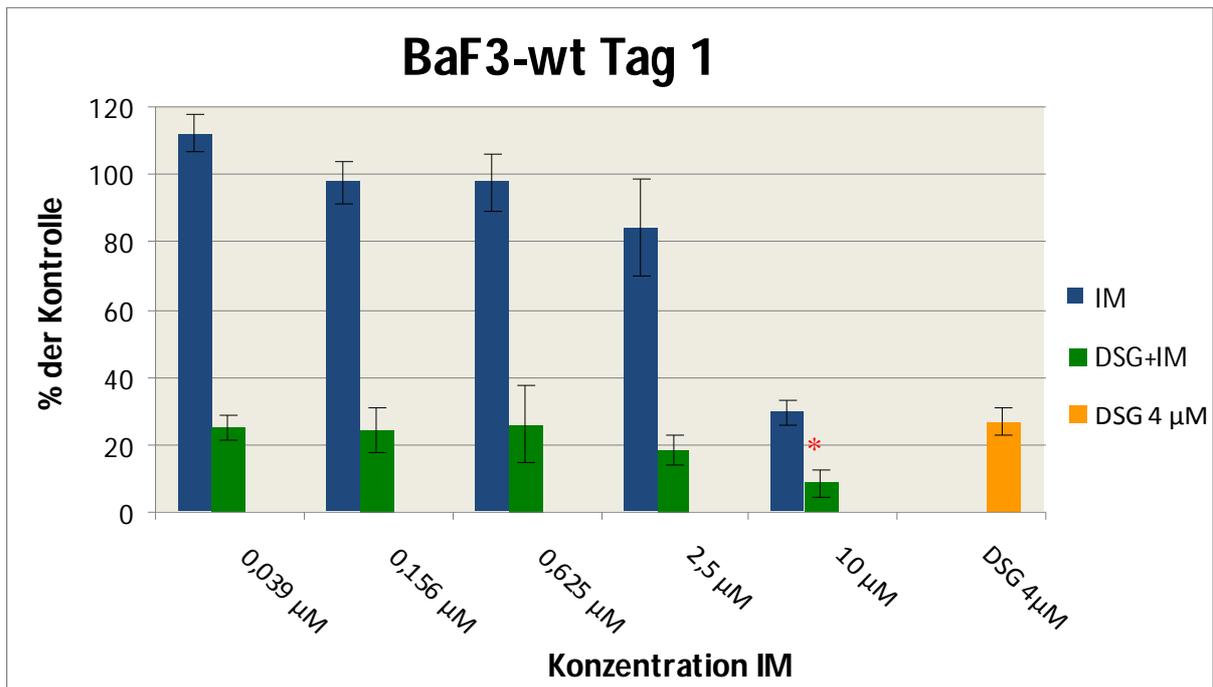


Abb.19 Proliferation BaF3-wt 24 Std nach IM-Behandlung in ansteigender Konzentration; * Signifikanz

BaF3-wt: Wie bei dieser *BCR-ABL*-negativen Zelllinie zu erwarten ist, zeigt IM bis einschließlich einer Konzentration von 2,5 µM keine nennenswerte Zellzahlreduktion. Der Abfall auf 29,4 % bei 10 µM ist am ehesten auf unspezifische toxische IM-Effekte bei dieser hohen Konzentration zurückzuführen. Vergleicht man die Ergebnisse der Kombinations- (rot) mit denen der DSG 4 µM-Monotherapie (grün) so fällt auf, dass sich diese kaum voneinander unterscheiden. DSG als Monotherapie führt an Tag 1 bereits zu einer Zellzahlreduktion auf 26,8%. An Tag 2 und Tag 3 nach IM-Zugabe sind die bei der Kombinationstherapie beobachteten Effekte ebenfalls durch reine DSG Effekte zu erklären.

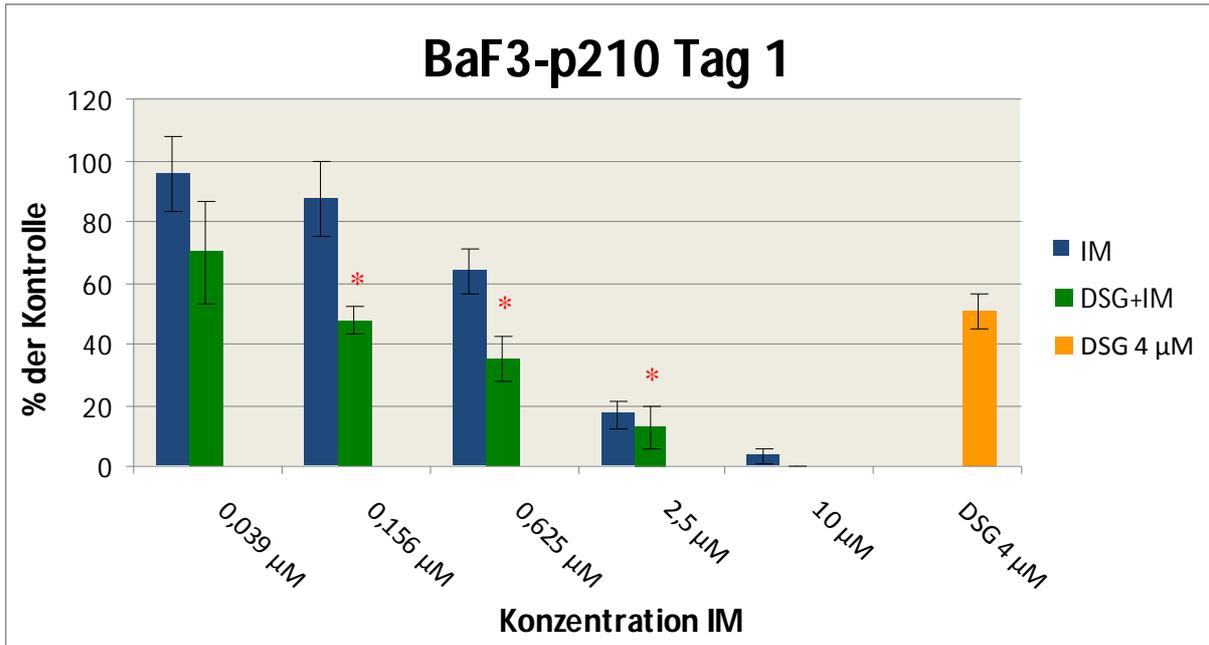


Abb.20 Proliferation BaF3-p210 24 Std nach IM-Behandlung in steigender Konzentration; * Signifikanz

BaF3-p210: Aufgrund ihrer ausgeprägten IM-Sensibilität ist BaF3-p210 eine Zelllinie, die sich gut zur Untersuchung synergistischer Effekte zwischen IM und DSG eignet. Wie zu erwarten, kommt es unter IM zu einer dosisabhängigen Zellzahlreduktion. Die IC_{50} für IM nach 48 Std. liegt hier vereinbar mit der Literatur bei ca. $0,6 \mu\text{M}$. Unter der Kombinationstherapie kommt es bereits an Tag 1 ab einer IM-Konzentration von $0,625 \mu\text{M}$ zu einer statistisch signifikanten Zellzahlreduktion auf 35 % ($p=0,04$); (Anhang Tab.2 b) im Vergleich zur Monotherapie mit $4 \mu\text{M}$ DSG (51%). Dieser Trend setzt sich an Tag 2 und Tag 3 fort. Die erzielten Ergebnisse der Kombinationstherapie beruhen hier auf additiven Effekten der beiden Einzelsubstanzen.

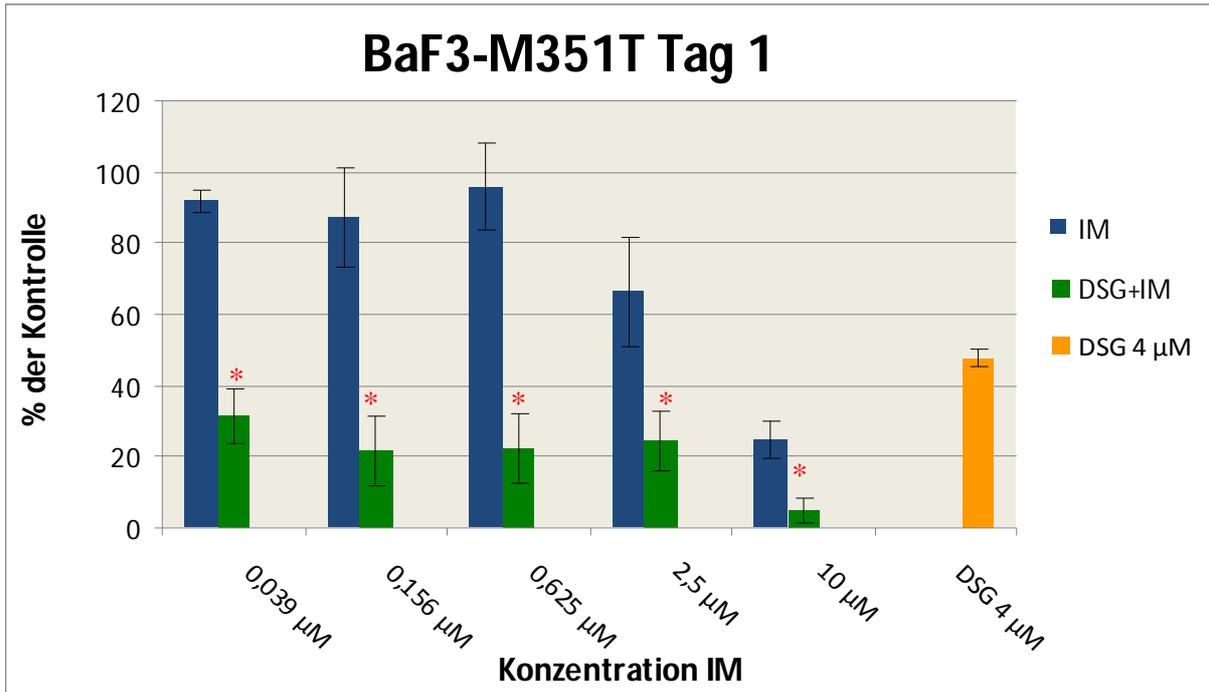


Abb.21 Proliferation BaF3-M351T 24 Std nach IM-Behandlung in steigender Konzentration; * Signifikanz

BaF3-M351T: Bereits ab dem ersten Tag nach IM-Zugabe kommt bei der Kombinationstherapie bei allen Konzentrationsstufen zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur DSG Monotherapie (Anhang Tab.2 c). Allein durch DSG 4 µM wird die Zellzahl an Tag 1 auf 47,6% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert (grüner Balken). Die Kombination aus DSG plus IM reduziert diese weiter dosisabhängig auf Werte zwischen 32% bei 0,039 µM und 5% bei 10µM. An Tag 2 und 3 verhält es sich ähnlich, wobei schon die DSG Monotherapie beachtliche Zellzahlabnahmen auf 6,5 % bzw. 2,3% erbringt. Über die starke Proliferationshemmung durch die DSG-Monotherapie hinaus erreicht die Kombinationstherapie weitere statistisch signifikante Effekte ab dem 1. Behandlungstag.

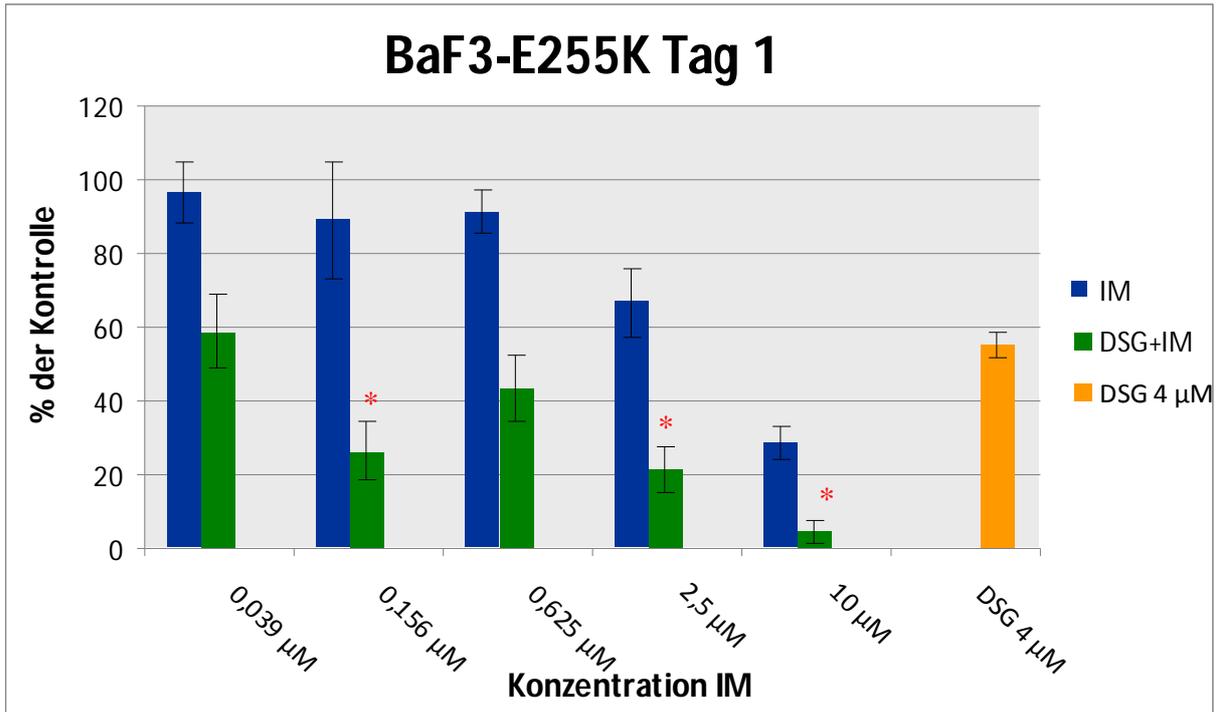


Abb.22 Proliferation BaF3-E255K 24 Std nach IM-Behandlung in steigender Konzentration; * Signifikanz

BaF3-E255K: Die hochgradig IM-resistente Zelllinie BaF3-E255K zeigte ebenfalls ab dem ersten Tag signifikant niedrigere Zellzahlen unter der Kombinationstherapie. Ab einer Konzentration von 0,156µM kommt es zu einem statistisch signifikanten Effekt ($p=0,004$) bei der Kombinationstherapie (Anhang Tab.2 d). Der Trend zeigt sich dahingehend, dass der Effekt der DSG-Monotherapie mit 55% an Tag 1 durch die Kombinationstherapie ab der zweit-niedrigsten Konzentrationsstufe übertroffen wird.

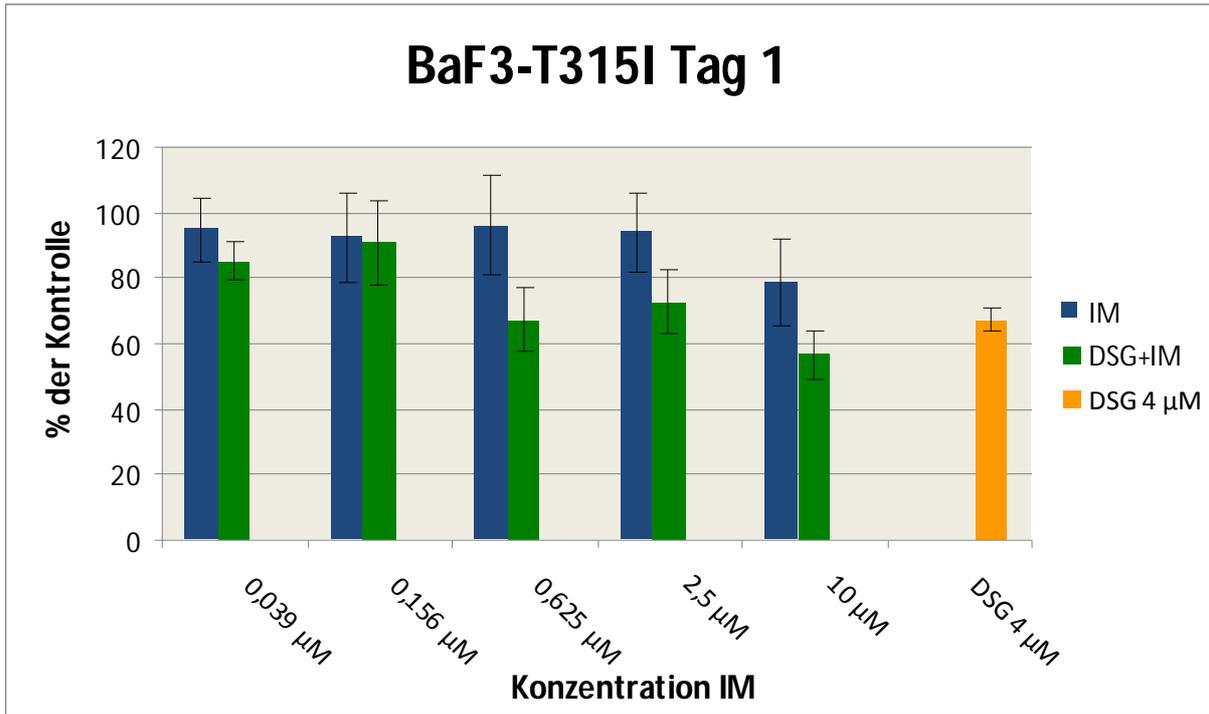


Abb.23 Proliferation BaF3-T315I 24 Std nach IM-Behandlung in ansteigender Konzentration; * Signifikanz

BaF3-T315I: Zelllinien, die auf eine der Einzelsubstanzen nicht ansprechen, lassen folglich auch keine synergistischen Effekte bei einer Kombinationstherapie erwarten. Diese Tatsache kann anhand der komplett IM-resistenten Mutation BaF3-T315I veranschaulicht werden. IM erbringt selbst in der höchsten Dosierung nach 24 Std keine nennenswerten Effekte. Auch die Kombinationstherapie erbringt gegenüber den Einzelsubstanzen an Tag 1 keine signifikanten Vorteile (Anhang Tab.2 e). Ab Tag 2 unterscheidet sich die Kombinationstherapie zwar deutlich von der IM-Monotherapie, diese Effekte sind jedoch ausschließlich auf den selektiven DSG-Effekt zurückzuführen. Zu keinem Zeitpunkt der Behandlung sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kombinationstherapie und der DSG-Monotherapie zu verzeichnen.

4.3.2 Humane Zelllinien unter der Kombinationstherapie

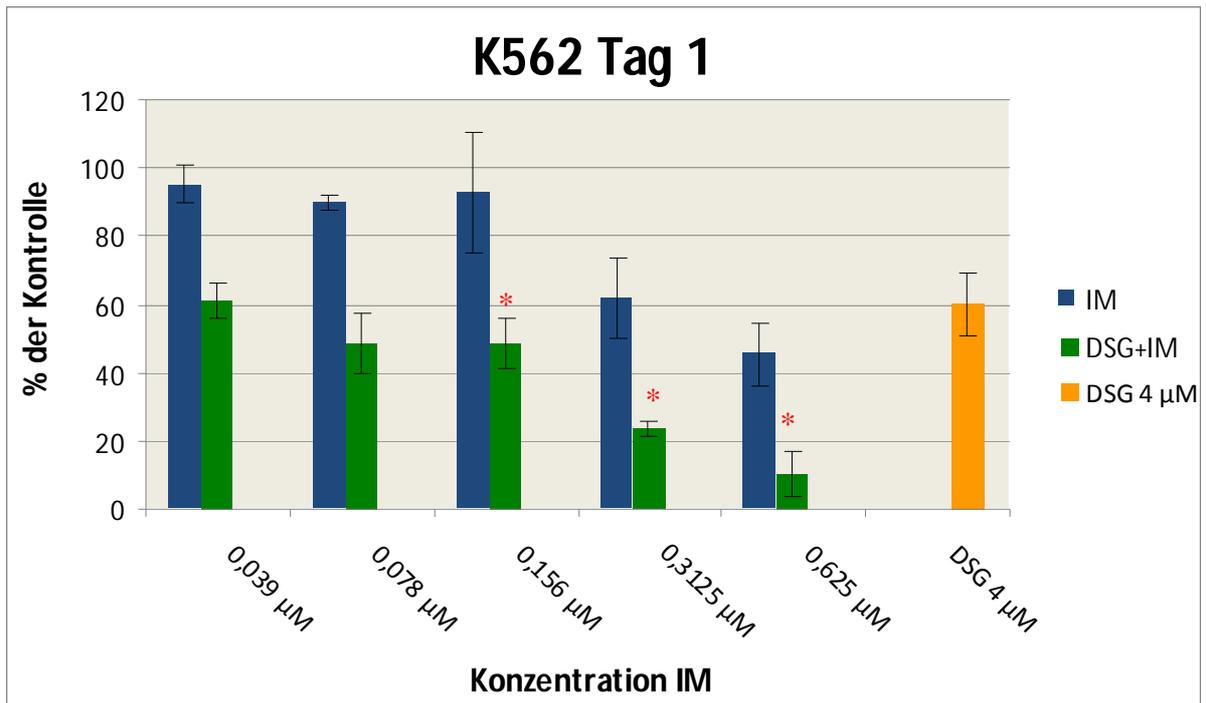


Abb.24 Proliferation K562 24 Std nach IM-Behandlung in ansteigender Konzentration; * Signifikanz

K562: Die humane *BCR-ABL*-positive Zelllinie K562 ist ausgesprochen IM-sensitiv, ihre IC_{50} nach 48 Std. wird in der Literatur bei ca. $0,2\mu\text{M}$ angegeben. Dieser Wert kann hier in einem ähnlichen Rahmen reproduziert werden (IC_{50} $0,156\mu\text{M}$ an Tag 2). Die DSG-Therapie reduziert die Zellzahl an Tag 1 nach IM-Zugabe- entsprechend einer 7-tägigen DSG-Exposition- auf 60%. An den folgenden Tagen auf 48% (Tag 2) bzw. 37% (Tag 3). Es ergeben sich ab dem ersten Behandlungstag ab einer Konzentration von $0,31\mu\text{M}$ statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kombinationstherapie und der DSG Monotherapie ($p=0,003$). Dieser Trend setzt sich an den folgenden Behandlungstagen weiter fort; (Anhang Tab.2 f).

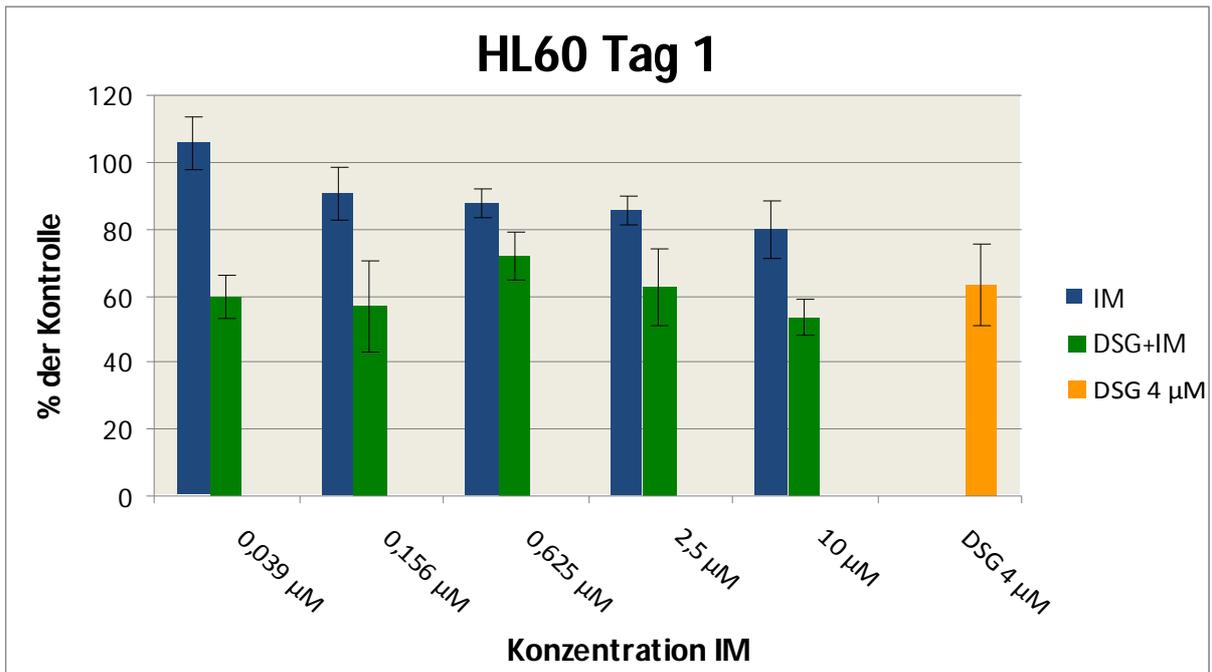


Abb.25 Proliferation HL60 24 Std nach IM-Behandlung in ansteigender Konzentration; * Signifikanz

HL60: Die *BCR-ABL*-negative AML-Zelllinie HL60 reagiert nicht sensibel auf eine IM Behandlung, somit sind folglich bei diesem Versuch keine synergistischen Effekte zu erwarten. IM zeigt nach 24 Std selbst bei 10 µM kaum Effekte im Sinne einer Zellzahlreduktion. DSG Monotherapie reduziert die Zellzahl an Tag 1 auf 63%, im weiteren Verlauf stagnieren die Werte bei 60% an Tag 2 und 68 % an Tag 3. Diese Beobachtung deckt sich hervorragend mit den Beobachtungen des Langzeitversuchs, aus dem bereits ersichtlich wurde, dass HL60 Zellen weniger sensitiv auf eine DSG-Behandlung reagieren als z.B. die murinen Zelllinien. Die Effekte der Kombinationstherapie übertreffen die DSG Monotherapie nicht, es sind dementsprechend keine synergistischen Effekte zu beobachten. Die signifikanten Werte bei 10 µM an Tag 2 und Tag 3 sind durch toxische Effekte zu erklären.

4.4 FACS-Analyse

Der Apoptose/Nekrose-Assay nach Nicoletti diente der Quantifizierung der Apoptose bzw. Nekrose der Zellen unter der Behandlung mit 4 μM DSG. Wie unter 3.7 beschrieben, wurde die Zellzyklusanalyse an Tag 3, Tag 8 und Tag 13 der DSG-Langzeitbehandlung durchgeführt. Da sich bis Tag 8 keine relevanten Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen zeigte, sind im folgenden nur die Daten für Tag 13 gezeigt. Exemplarisch werden zwei Histogramme von Tag 13 gezeigt. Es folgt eine zusammenfassende Darstellung für alle untersuchten Zelllinien.

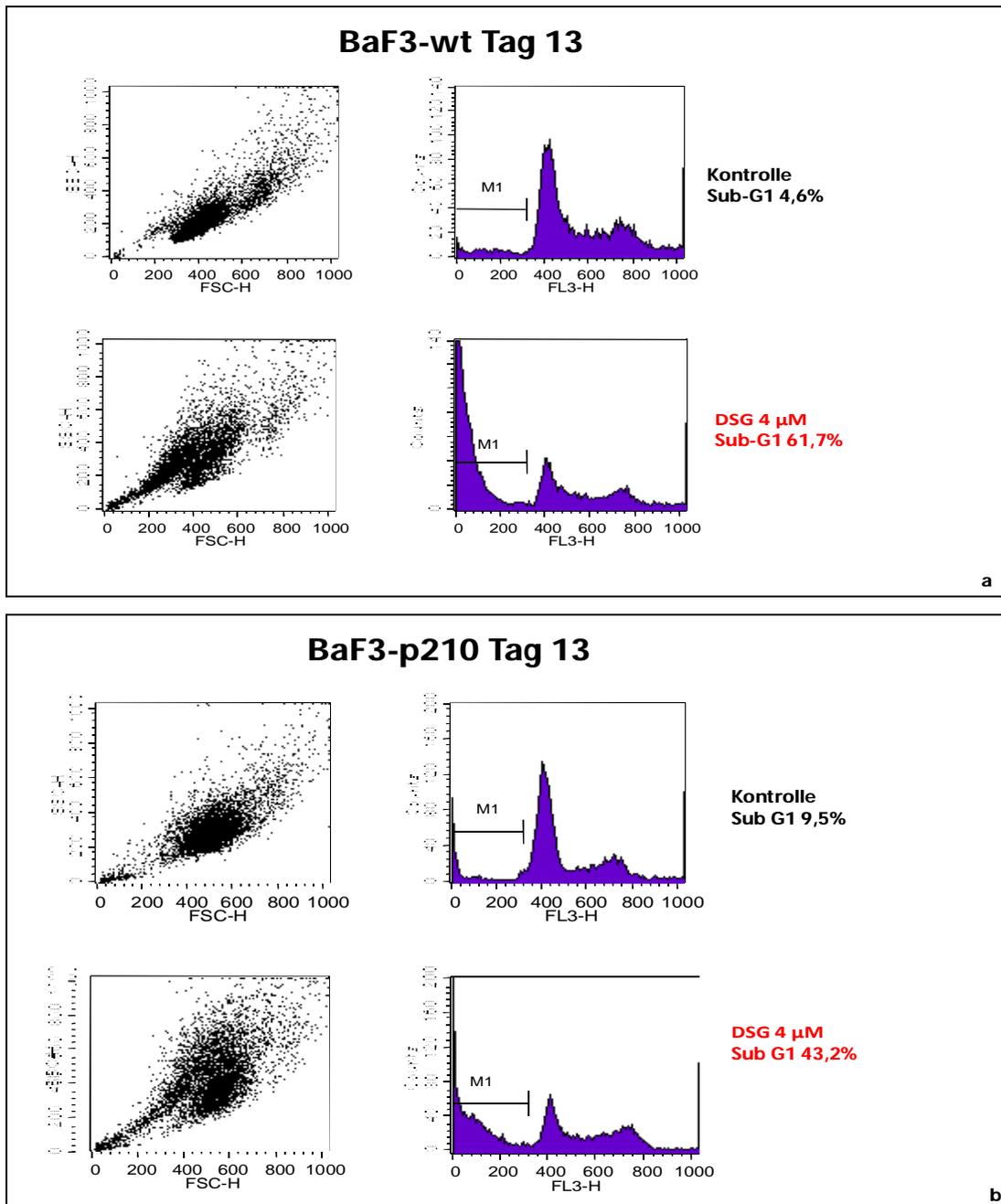


Abb.26 Histogramme der FACS-Analyse mittels PI Färbung an Tag 13 DSG 4 μM versus Kontrolle
a: BaF3-wt; b: BaF3-p210

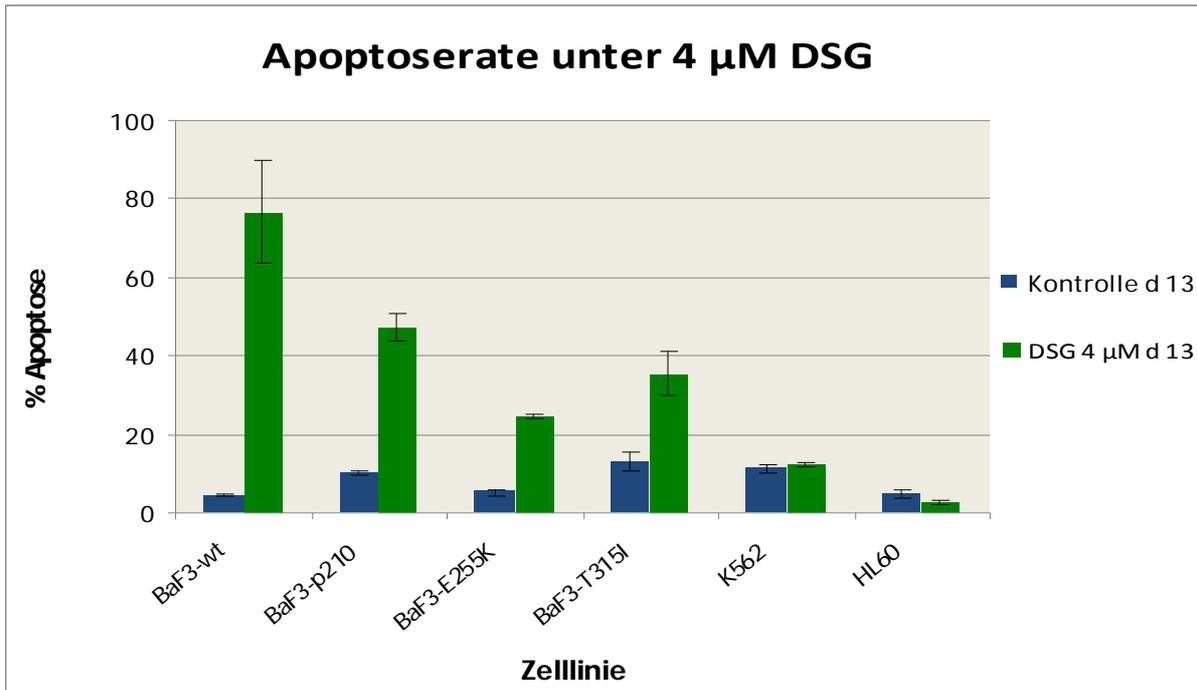


Abb.27 Übersicht der Apoptoseraten aller Zelllinien an Tag 13 unter 4 µM DSG im Vergleich zur Kontrolle

Die Zunahme der Apoptose-/Nekroserate der DSG-behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen manifestiert sich erst im späteren Verlauf der Behandlung. An den Tagen 3 und 8 ist keine, bzw. nur eine geringfügige Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). An Tag 13 allerdings zeigen die murinen Zelllinien allesamt einen hochsignifikanten Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen. BaF3-wt steht dabei an der Spitzenposition mit 76,6% ($p=0,001$), gefolgt von BaF3-p210 mit 47,2% ($p=0,00006$), BaF3-T315I mit 35,5% ($p=0,003$) und BaF3-E255K mit 24,6% ($p=0,0001$); (Anhang Tab. 3). Die Zelllinien BaF3-wt und BaF3-p210 zeigen bereits an Tag 8 statistisch signifikant höhere Apoptoseraten bei den mit 4 µM behandelten Zellen. Die Prozentzahlen bewegen sich allerdings auf einem deutlich niedrigeren Niveau als am späteren Messzeitpunkt. Das Verhältnis der Apoptoserate der Kontrolle zu DSG 4 µM an Tag 8 liegt bei BaF3-wt bei 1,9% : 5% ($p=0,003$), bei BaF3-p210 ist es 6,4% : 11% ($p=0,003$). Bei diesen Ergebnissen muss man sich allerdings vor Augen halten, dass es sich hierbei zwar um statistische Signifikanzen handelt, diese sind allerdings sicherlich nicht biologisch signifikant. Bei den humanen Zelllinien ist zu keinem Zeitpunkt ein nennenswerter Anstieg der Apoptoserate behandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu verzeichnen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass an Tag 8 noch kein nennenswerter Anstieg der Apoptose/Nekrose-rate der murinen Zelllinien festzustellen ist. An Tag 13 steigt die Apoptoserate der murinen Zelllinien signifikant an, und zwar unabhängig vom Vorhandensein einer *BCR-ABL*-Translokation und vom Mutationsstatus. Bei den humanen Zelllinien hingegen lässt sich ein solche Reaktion nicht nachweisen.

4.5 Zytotoxizitätsanalyse

Der unter 3.6 beschriebene MTT-Assay diente der Analyse der zytotoxischen Potenz der Substanz DSG in Monotherapie und in Kombination mit IM. Mittels dieses Tests kann zwischen viablen und toten Zellen unterschieden werden. Ziel dieses Versuchs ist die Ermittlung der IC_{50} (die Konzentration des Inhibitors, bei der 50% der Zellen unter der Behandlung noch leben und metabolisch aktiv sind) für IM, DSG und deren Kombination. Besonderes Interesse lag dabei an der Klärung der Frage, ob die Kombinationstherapie synergistische Effekte zeigt, d.h. ob die IC_{50} bei der Kombination DSG+IM im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie signifikant reduziert werden kann und über additive Effekte der Einzelsubstanzen hinausgeht. Die Abnahme der IC_{50} unter der Kombinationstherapie könnte als eine Sensibilisierung der Zellen im Rahmen der Vorbehandlung gedeutet werden.

Da nur solche Zelllinien synergistische Effekte erwarten lassen, die sensitiv auf beide Einzelsubstanzen reagieren, werden im Folgenden auch nur diese Zelllinien demonstriert.

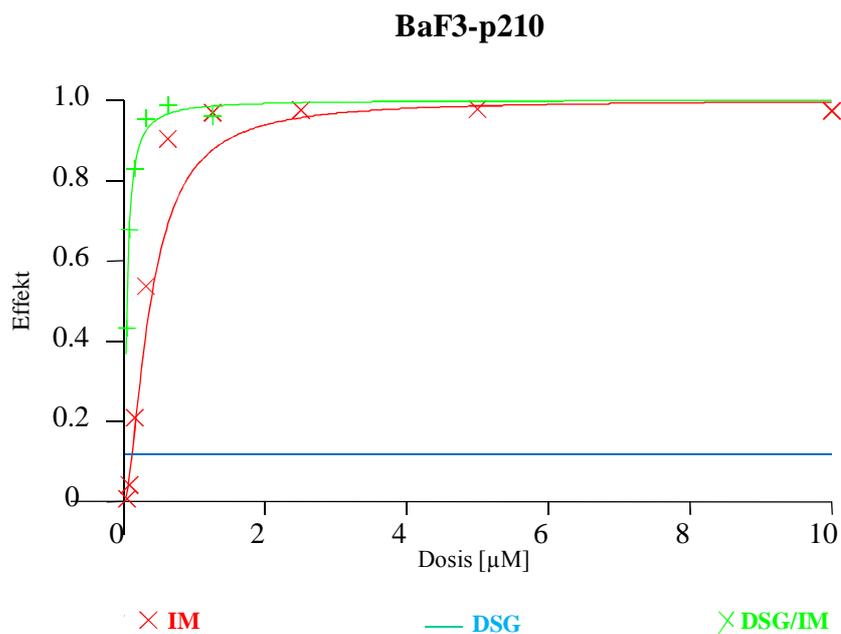


Abb.28 Dosis-Effekt Kurven für BaF3-p210
IM IC_{50} 0,38 μM (rot); DSG/IM IC_{50} 0,04 μM (grün); Dosis-Effekt für DSG=0,12 \pm 0,07 (blau)

Die äußerst IM-sensible *BCR-ABL*-positive Zelllinie BaF3-p210 bringt durch ihre biologischen Eigenschaften gute Voraussetzungen für den Nachweis eines evtl. vorhandenen Synergismus. In dem hier durchgeführten Versuch ergab sich für die IM-Monotherapie eine IC_{50} von 0,38 μM . Die Dosis-Effekt-Kurve für IM zeigt einen typischen Verlauf mit einem relativ steilen Anstieg im niedrigen Konzentrationsbereich, bedingt durch die hohe Sensibilität der Zellen gegenüber der Substanz. Ab ca.

3 μM wird ein Plateau erreicht, das sich bis zur maximalen Konzentration durchzieht. Für die 6 Tage mit DSG vorbehandelten Zellen ergibt sich eine Kurve, die deutlich früher (d.h. bei niedrigeren Konzentrationen) und steiler ansteigt, und das Plateau dementsprechend früher erreicht als die Kurve der IM-Monotherapie (Abb. 28). Der alleinige Effekt der DSG Behandlung ist anhand der blauen Linie zu erkennen. Der Dosis-Effekt für DSG liegt bei $0,12 (\pm 0,07)$. Durch eine 6-tägige Vorbehandlung der Zellen mit $4 \mu\text{M}$ DSG wird die IC_{50} von $0,38\mu\text{M}$ der IM-Monotherapie auf $0,04\mu\text{M}$ für die Kombinationstherapie reduziert. Folglich wird die IC_{50} durch eine Vorbehandlung der Zellen mit DSG um den Faktor 10 reduziert. Somit ist bei dieser Zelllinie festzustellen, dass die Vorbehandlung der Zellen mit $4\mu\text{M}$ DSG diese für die anschließende IM Behandlung sensibilisiert, erkennbar an einer 10-fach niedrigeren IC_{50} als bei der Monotherapie. Diese Beobachtung könnte für synergistische Effekte zwischen den Einzelsubstanzen sprechen. .

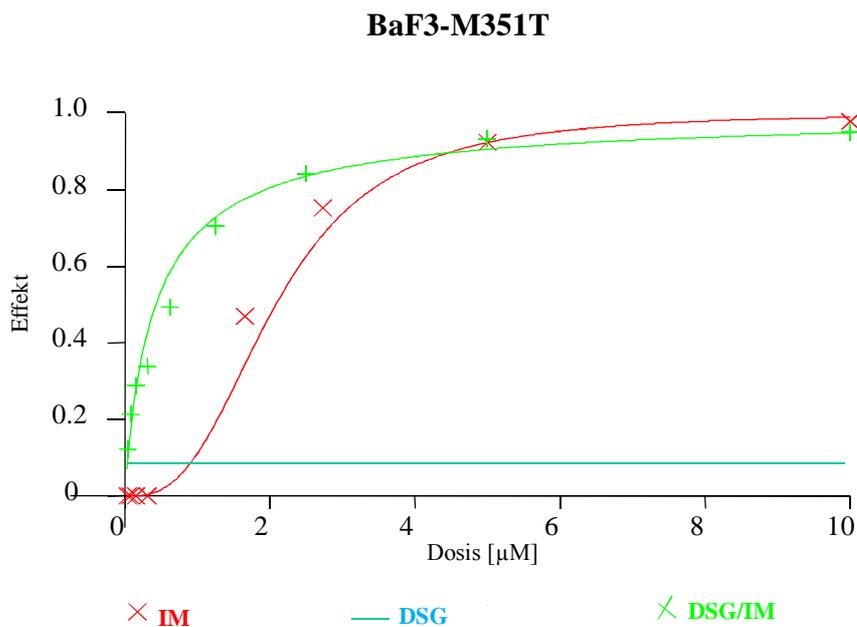


Abb.29 Dosis-Effekt Kurven für BaF3-M351T
 IM IC_{50} $2,1 \mu\text{M}$ (rot); DSG/IM IC_{50} $0,4 \mu\text{M}$ (grün); Dosis-Effekt für DSG= $0,08 \pm 0,03$ (blau)

BaF3-M351T ist eine relativ IM-sensible Mutation, an deren Beispiel synergistische Effekte ebenfalls gut demonstriert werden können. In den niedrigen Konzentrationsbereichen zeigen sich für IM zunächst noch keine Effekte. Ab ca. $1\mu\text{M}$ beginnt ein relativ steiler Anstieg der Kurve, die dann ab ca. $5 \mu\text{M}$ ein Plateau erreicht. Die hier ermittelte IC_{50} liegt bei $2,1\mu\text{M}$. Die Dosis-Effekt-Kurve der mit DSG vorbehandelten Zellen zeigt einen deutlich früher einsetzenden und steileren Anstieg mit

früherem Plateaubereich. Der DSG-Dosis-Effekt liegt bei 0,08 ($\pm 0,03$). Die IC_{50} für die IM-Monotherapie (2,1 μM) kann durch eine DSG-Vorbehandlung der Zellen annähernd um den Faktor 5 reduziert werden und liegt dann bei 0,4 μM . Auch bei dieser Zelllinie könnte dieses Reaktionsmuster durch Synergismus zu erklären sein.

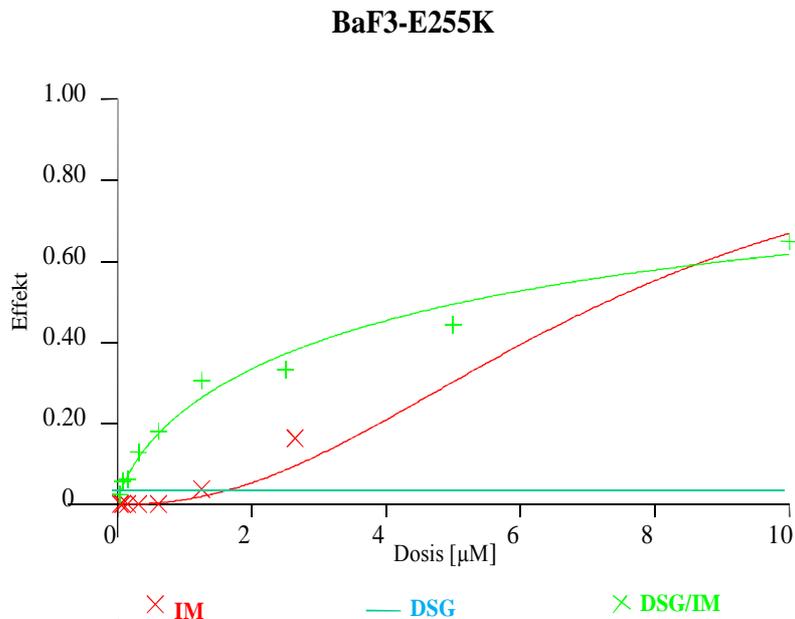


Abb.30 Dosis-Effekt Kurven für BaF3-E255K
 IM IC_{50} 7,3 μM (rot); DSG/IM IC_{50} 5,2 μM (grün); Dosis-Effekt für DSG=0,05 \pm 0,04 (blau)

BaF3-E255K ist eine stark IM-resistente Zelllinie, die nur noch eine geringe Restsensibilität gegenüber der Substanz zeigt. Die Dosis-Effekt Kurve der IM-Monotherapie zeigt einen typischen Verlauf für IM resistente Zellen, erkennbar an einem trägen Anstieg der Kurve, die erst bei toxisch hohen Konzentrationen von 10 μM ein angedeutetes Plateau erahnen lässt. Die Dosis-Effekt Kurve der DSG-vorbehandelten Zellen zeigt einen offensichtlich steileren Anstieg in den niedrigen Konzentrationsbereichen, erreicht aber maximal nur eine affektierte Fraktion von 0,6. Der DSG-Monoeffekt liegt bei 0,05 (\pm 0,04). Die IC_{50} der Kombination liegt bei 5,2 μM und wird durch die DSG-Vorbehandlung lediglich um den Faktor 1,4 reduziert. In diesem Fall scheint eine DSG-Vorbehandlung der ohnehin stark IM-resistenten Zellen keine bedeutende Sensibilisierung für die anschließende IM-Behandlung zu erbringen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Tatsache, dass synergistische Effekte um so stärker zu erwarten sind, je sensibler die Zellen für die einzelnen Kombinationspartner sind.

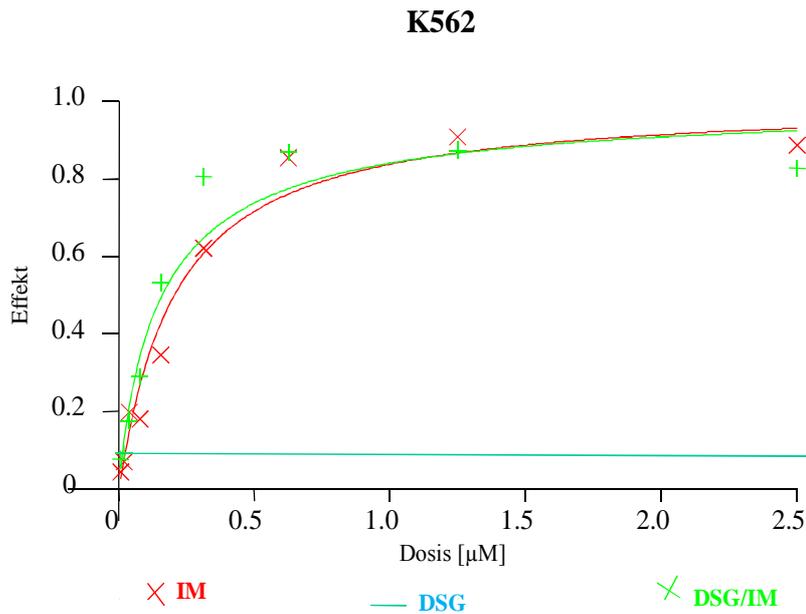


Abb.31 Dosis-Effekt Kurven für K562
 IM IC_{50} 0,2 μ M (rot); DSG/IM IC_{50} 0,16 μ M (grün); Dosis-Effekt für DSG=0,09 \pm 0,04 (blau)

Die humane *BCR-ABL*-positive Zelllinie K562 ist hochgradig IM-sensibel. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit niedrigeren IM-Konzentrationen (maximal 2,5 μ M IM) als bei den vorweg beschriebenen Zelllinien durchgeführt. Die hier ermittelte IC_{50} liegt bei 0,2 μ M und deckt sich annähernd mit dem in der Literatur zu findenden Wert von 0,19 μ M nach 48 Std. [19]. Dieser Wert kann durch eine DSG-Vorbehandlung nicht wesentlich reduziert werden. (0,16 μ M).

Zusammenfassend kann man bei Betrachtung der Ergebnisse des MTT-Assays folgendes feststellen:

- Bei den murinen *BCR-ABL*-positiven und IM-sensitiven Zelllinien zeigen sich synergistische Effekte zwischen IM und DSG.
- Der Synergismus ist das Ergebnis einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber IM im Rahmen einer 6-tägigen DSG-Vorbehandlung mit 4 μ M und äußert sich in einer Reduktion der IC_{50} .
- Die synergistischen Effekte sind umso ausgeprägter, je höher die Sensibilität der Zelllinie gegenüber IM ist.

4.6 Primärmaterial

4.6.1 Proliferation CD34⁺ Zellen unter DSG Monotherapie

4.6.1.1 Gesunde Spender

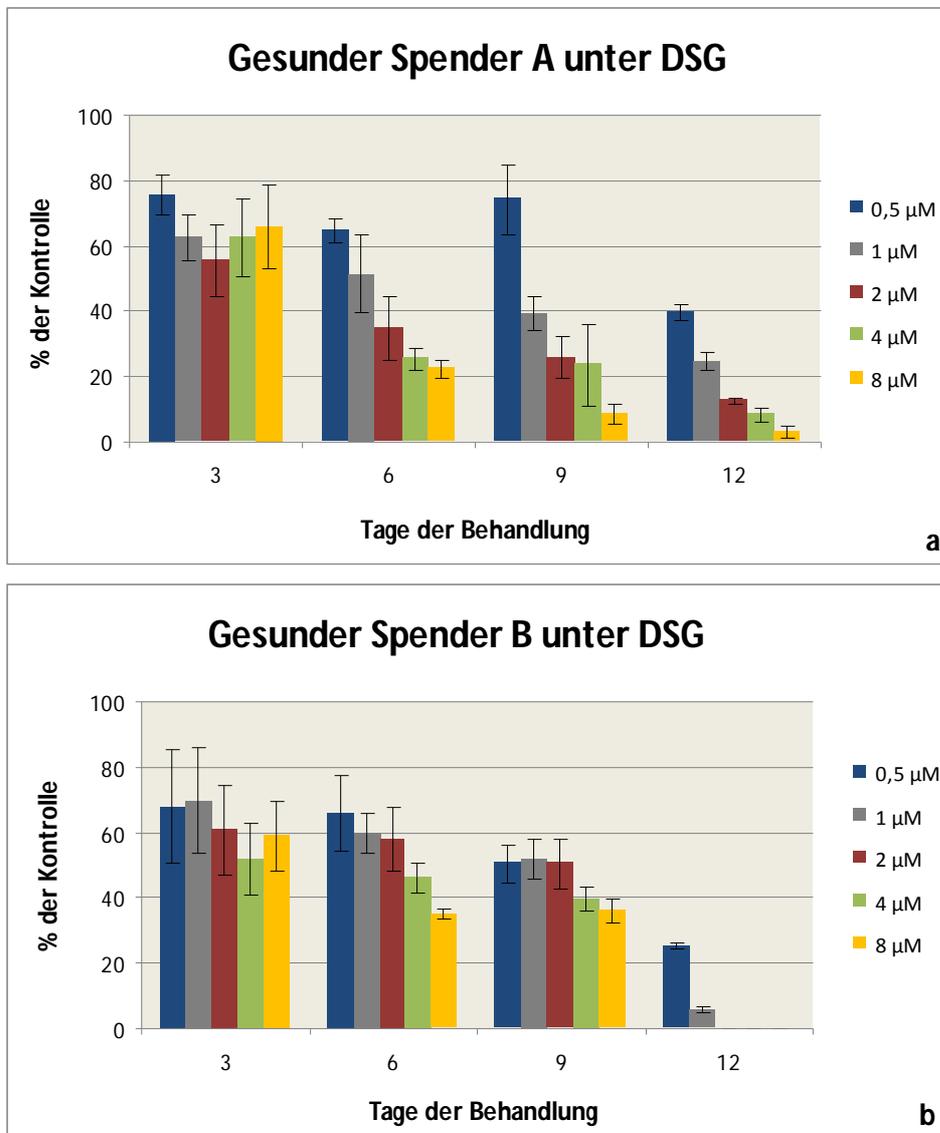


Abb.32 Proliferation Gesunde Spender unter DSG-Behandlung in ansteigender Konzentration.

Die DSG Monobehandlung der CD34-positiven Zellen gesunder Spender lässt eine konzentrations- und zeitabhängige Proliferationshemmung erkennen. Bei beiden gesunden Spendern sind am 3. Behandlungstag noch keine relevanten Zellzahlunterschiede zwischen den verschiedenen DSG-Konzentrationen erkennbar. Deutliche konzentrationsabhängige Zellzahlunterschiede manifestieren sich bei beiden Spendern ab dem 6. Behandlungstag. Beim Spender A liegt die IC_{50} an Tag 6 bei 1 μ M und sinkt mit zunehmender Expositionsdauer der Zellen auf unter 0,5 μ M. Die Zellzahlen des entsprechenden Tages sind bei Spender A ab dem 3. Behandlungstag bereits bei der niedrigsten DSG Konzentration signifikant niedriger als die Kontrollzellen des jeweiligen Tages ($p=0,03$); (Anhang

Tab.4 a). Beim Gesunden Spender B liegt die IC_{50} an Tag 6 bei 4 μ M DSG. Am 12. Behandlungstag sind nur noch bei den 2 niedrigsten DSG-Konzentrationen viable Zellen zu finden. Bei diesem Spender treten signifikante Zellzahlunterschiede im Vergleich zur Kontrolle an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 2 μ M auf ($p=0,04$). Mit zunehmender Expositionsdauer und ansteigenden DSG-Konzentrationen ergeben sich durchweg hochsignifikante Werte (Anhang Tab.4 b).

4.6.1.2 CML-Patienten

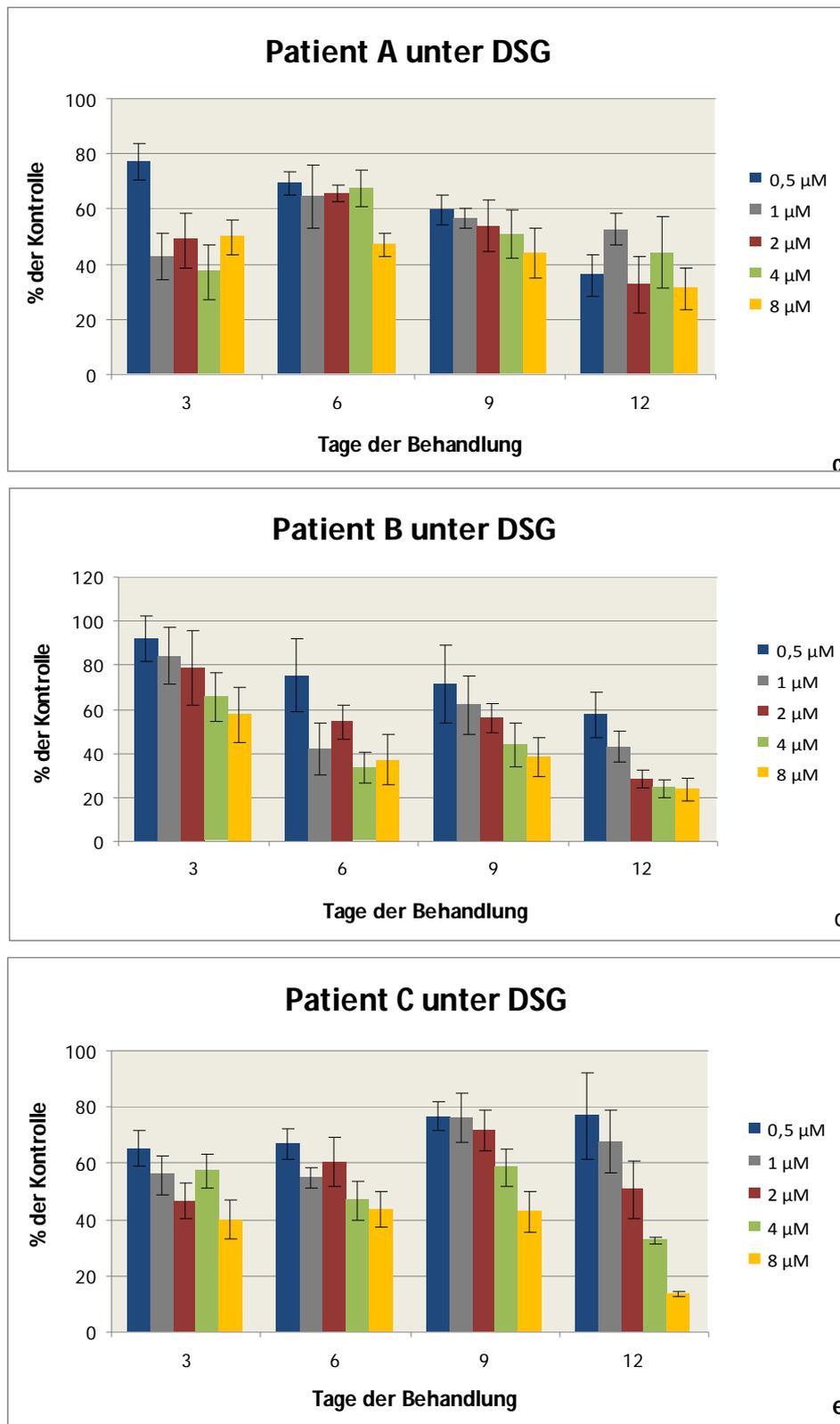


Abb.33 CML-Patienten unter DSG-Behandlung in ansteigender Konzentration.

Patient A zeigt unter der Behandlung mit ansteigenden DSG-Konzentrationen an Tag 3 ab einer DSG-Konzentration von 1 μM signifikant niedrigere Zellzahlen als die entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen ($p=0,01$). Für alle höheren Konzentrationen an Tag 3 und für alle Konzentrationen der folgenden Beobachtungstage ergeben sich signifikant niedrigere Zellzahlen unter der DSG-Behandlung (Anhang Tab.4 c). Die IC_{50} liegt an Tag 6 bei 8 μM und sinkt im weiteren Verlauf der Behandlung auf unter 0,5 μM an Tag 12.

Patient B zeigt sogar deutlicher den konzentrations- und zeitabhängigen Charakter der Zellzahlreduktion. Signifikante Zellzahlunterschiede im Vergleich zur Kontrolle ergeben sich an Tag 3 erst bei einer DSG-Konzentration von 8 μM ($p=0,04$), an den folgenden Beobachtungstagen ergeben sich mit 2 Ausnahmen (0,5 μM Tag 6 $p=0,08$ und Tag 9 $p=0,13$) durchweg signifikant niedrigere Zellzahlen unter der DSG-Behandlung (Anhang Tab.4 d). Die IC_{50} an Tag 6 liegt bei 2 μM und sinkt bis zum 12. Behandlungstag auf unter 0,5 μM .

Patient C demonstriert bereits am 3. Behandlungstag für sämtliche DSG-Konzentrationen signifikant niedrigere Zellzahlen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Trend setzt sich an den folgenden Beobachtungstagen kontinuierlich fort. Die IC_{50} an Tag 6 liegt bei 4 μM und erreicht an Tag 12 einen Wert von 2 μM .

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl die gesunden Spender als auch die CML-Patienten sensibel auf eine DSG-Monotherapie in ansteigenden Konzentrationen reagieren. Das Ansprechen auf die Substanz äußert sich in einer sowohl konzentrations- als auch zeitabhängigen Proliferationshemmung. Signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen traten in beiden Gruppen bereits ab dem 3. Behandlungstag auf. Somit lässt sich abschließend feststellen, dass übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proliferationsassays der murinen und humanen Zelllinien, die antiproliferative Potenz der Substanz nicht von der Ausprägung des Merkmals *BCR-ABL* in Zusammenhang zu stehen scheint.

4.6.2 Proliferation der CD34⁺ Zellen unter Kombinationstherapie

Analog zum Proliferationsassay der Kombinationstherapie der humanen und murinen Zelllinien (siehe 4.3) war das Anliegen dieses Versuchs der Frage nachzugehen, ob eine Kombinationstherapie bestehend aus DSG plus IM effektiver auf die CD 34-positiven Zellen wirkt als die Monotherapie mit einem der Kombinationspartner. Die Frage nach synergistischen Effekten zwischen den Substanzen erscheint bei der Untersuchung von Patientenmaterial, hier in Form CD34⁺ Zellen besonders lohnenswert. Wie bei dem Referenzversuch mit murinen und humanen Zelllinien wurde die Zellzahl 24 Std (Tag 1), 48 Std (Tag 2) und 72 Std (Tag 3) nach IM-Zugabe bestimmt. Im folgenden sind zur Beurteilung des Effekts im Verlauf dieser Zeitspanne Tag 1 und Tag 3 graphisch dargestellt. Tag 1 kann als Vergleich mit dem Verhalten der Zelllinien herangezogen werden, und Tag 3 dient der Feststellung des Effektes im Verlauf.

4.6.2.1 Gesunde Spender

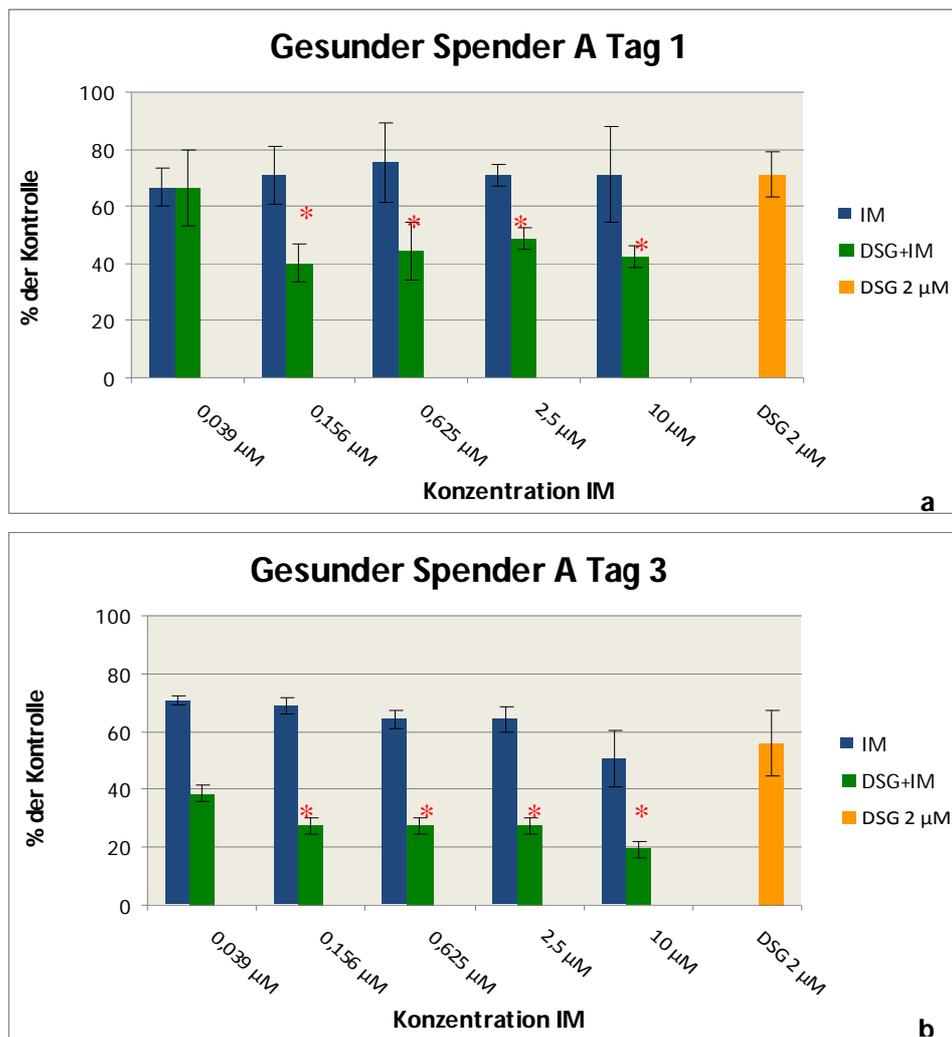


Abb.34 Proliferation gesunder Spender A unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Gesunder Spender A: Die IM-Monotherapie in ansteigender Konzentration (blaue Balken) bewirkt beim gesunden Spender A an Tag 1 der Behandlung noch keine dosisabhängige Zellzahlreduktion. Der Anteil viabler Zellen bewegt sich bei allen IM-Konzentrationen um 70% (Abb.34 a). Dahingegen lässt die Kombinationstherapie an Tag 1 einen dosisabhängigen Abwärtstrend der Proliferation erkennen. Hier sinkt der Anteil viabler Zellen von 67% bei der niedrigsten IM-Konzentration auf 42 % bei der höchsten. Dieser Trend setzt sich im Verlauf fort. An Tag 3 wird eine 50%ige Zellzahlreduktion im Vergleich zur Kontrolle durch die IM-Monotherapie nicht erreicht, während die Kombinationstherapie bereits ab der niedrigsten Konzentration eine Zellzahlreduktion auf 38,5% erbringt (Abb.34 b). Im weiteren Verlauf reduziert sich dieser Anteil stetig. Signifikante Unterschiede in der Zellzahl im Vergleich zwischen der Kombinationstherapie und der DSG 2 µM- Monotherapie manifestieren sich bereits am ersten Tag nach IM-Zugabe bei einer Konzentration von 0,156 µM ($p=0,006$) und persistieren im weiteren Verlauf (Anhang Tab.5 a). Die Effekte der Kombinationstherapie gehen jedoch nicht über additive Effekte der Einzelsubstanzen hinaus.

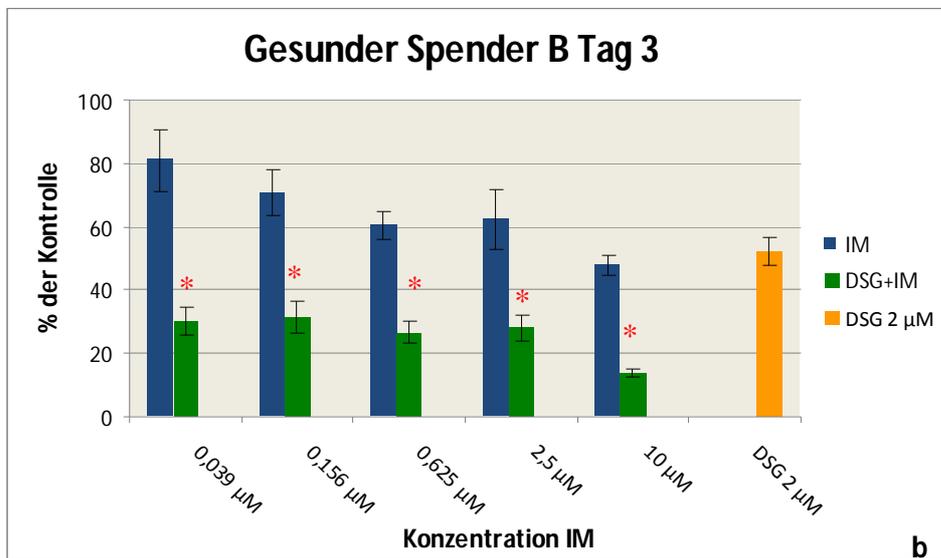
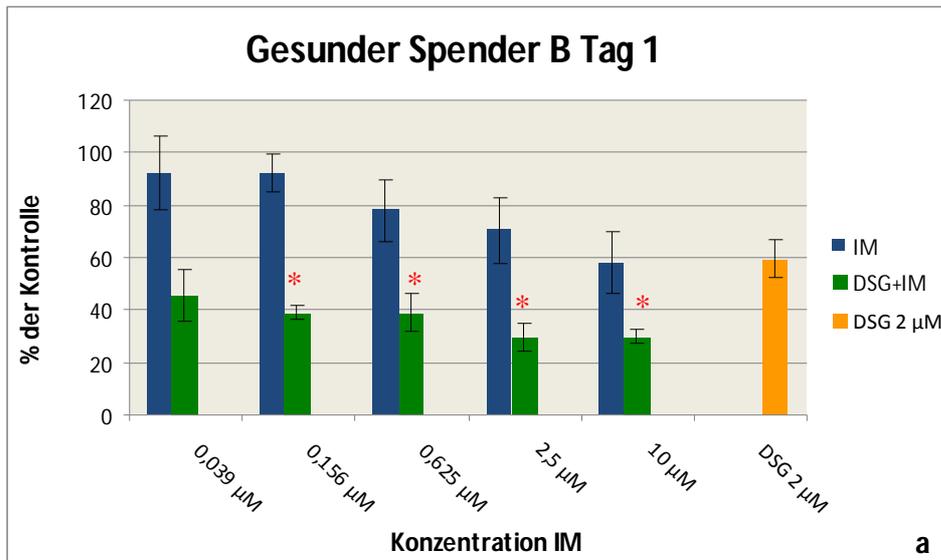


Abb.35 Proliferation Gesunder Spenders B unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Gesunder Spender B: Beim gesunden Spender B zeigt die IM-Monotherapie an Tag 1 einen dosisabhängigen Abwärtstrend, der sich anhand einer sinkenden Zellzahl unter steigender IM-Konzentration äußert. Von 92% bei 0,039 µM sinkt der Anteil viabler Zellen mit steigender Konzentration auf 58% bei 10 µM (Abb.35 a). Unter der Kombinationstherapie sinkt dieser Anteil von 45% (0,039µM) auf 30% (10µM). D.h. der Anteil lebender Zellen unter der Kombinationstherapie im Vergleich zu Monotherapie bewegt sich auf einem deutlich niedrigeren Niveau. An Tag 3 finden sich bei den mittleren IM Konzentrationen lediglich um 30% viable Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Ab Tag 1 und einer IM-Konzentration von 0,156 µM ($p=0,01$) erbringt der Vergleich zwischen der Monotherapie mit DSG 2 µM und der Kombinationstherapie über den gesamten Beobachtungszeitraum und bei allen weiteren Konzentrationen signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (Anhang Tab.5 b). Die Effekte der Kombinationstherapie sind mit additiven Effekten der Einzelsubstanzen vereinbar.

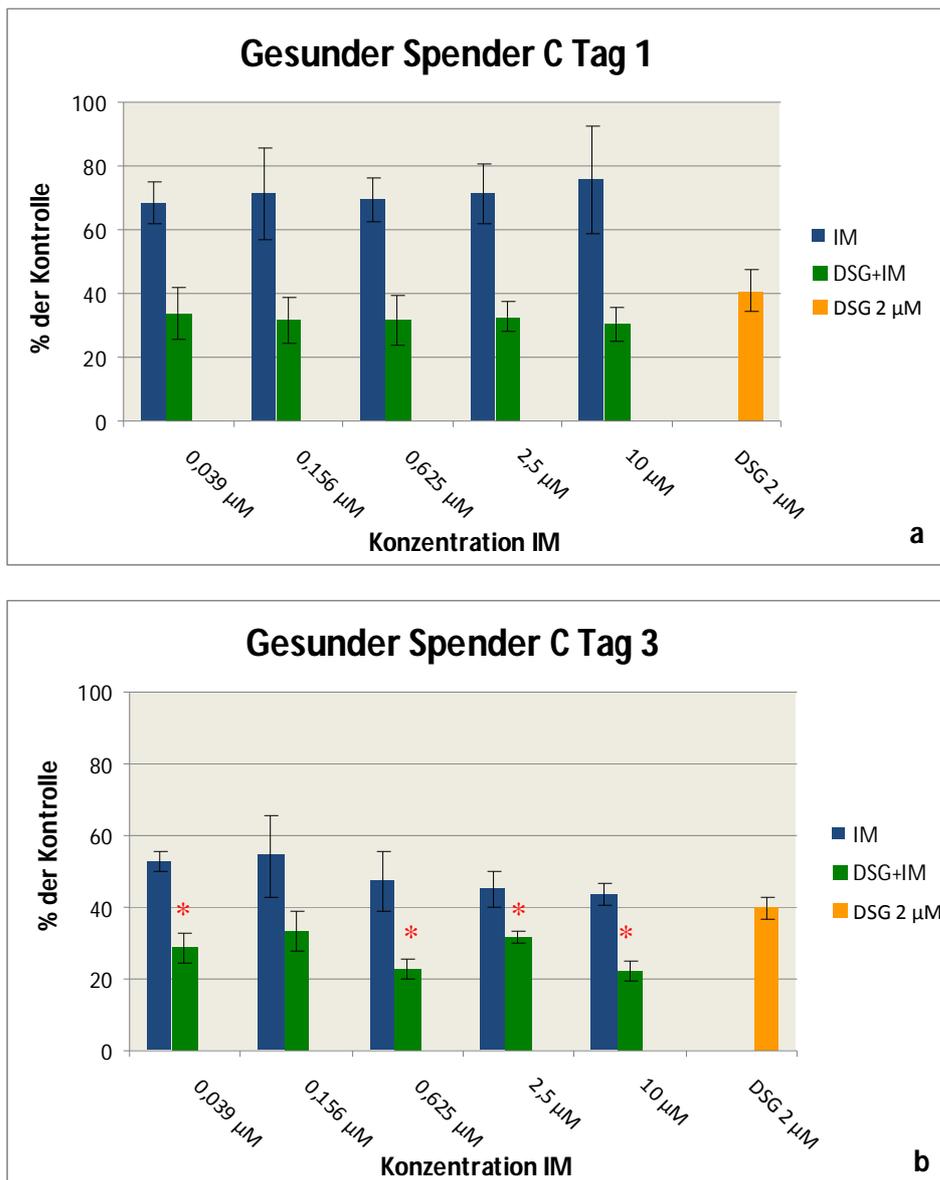


Abb.36 Proliferation Gesunder Spender C unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Gesunder Spender C: Beim gesunden Spender C erbringt die IM-Monotherapie an Tag 1 keine dosisabhängigen antiproliferativen Effekte. Der Anteil lebender Zellen schwankt bei allen getesteten IM-Konzentrationen um 70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und ist somit zeitabhängig, also der Expositionsdauer zuzuschreiben. Die Kombinationstherapie an Tag 1 erreicht zwar mit Werten um 30% deutlich niedrigere Anteile lebender Zellen, zeigt jedoch auch kein dosisabhängiges Geschehen. Beim Vergleich der Ergebnisse der Kombinationstherapie mit denen der DSG 2 μM Monotherapie wird deutlich, dass der antiproliferative Effekt überwiegend durch DSG alleine bedingt ist, da DSG in Monotherapie bereits eine Reduktion auf 40% erreicht (Abb.36 a). Für Tag 1 lassen sich folglich keine statistisch signifikanten Werte beim Vergleich beider Gruppen feststellen. An Tag 3 vergrößern sich die Unterschiede zwischen der Kombinationstherapie und der DSG Monotherapie,

sodass statistisch signifikante Werte erreicht werden (Anhang Tab.5 c). Dieses Geschehen setzt sich weiter fort, sodass an Tag 3 die Kombinationstherapie beiden Monotherapien deutlich überlegen ist. Bei diesem gesunden Spender lässt sich somit abschließend feststellen, dass statistisch signifikante Wachstumsunterschiede erst am dritten Behandlungstag zu verzeichnen sind und diese ebenfalls auf additiven Effekten der Einzelsubstanzen beruhen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den CD34⁺ Zellen aller drei gesunden Spender die Kombinationstherapie aus DSG 2 μ M und IM in ansteigender Konzentration der Monotherapie überlegen ist. Bei den gesunden Spendern A und B zeigt sich die Überlegenheit der Kombinationstherapie bereits an Tag 1 bei der zweit-niedrigsten IM Konzentration, und beim gesunden Spender C ab Tag 2. Die erzielten Effekte der Kombinationstherapie übertreffen die der Einzelsubstanzen deutlich, was sich in statistisch signifikanten Wachstumsunterschieden äußert. Diese Effekte der Kombinationstherapie bewegen sich ausschließlich auf additivem Niveau, sodass hier kein Synergismus zwischen den Einzelsubstanzen nachweisbar ist.

4.6.2.2 CML-Patienten

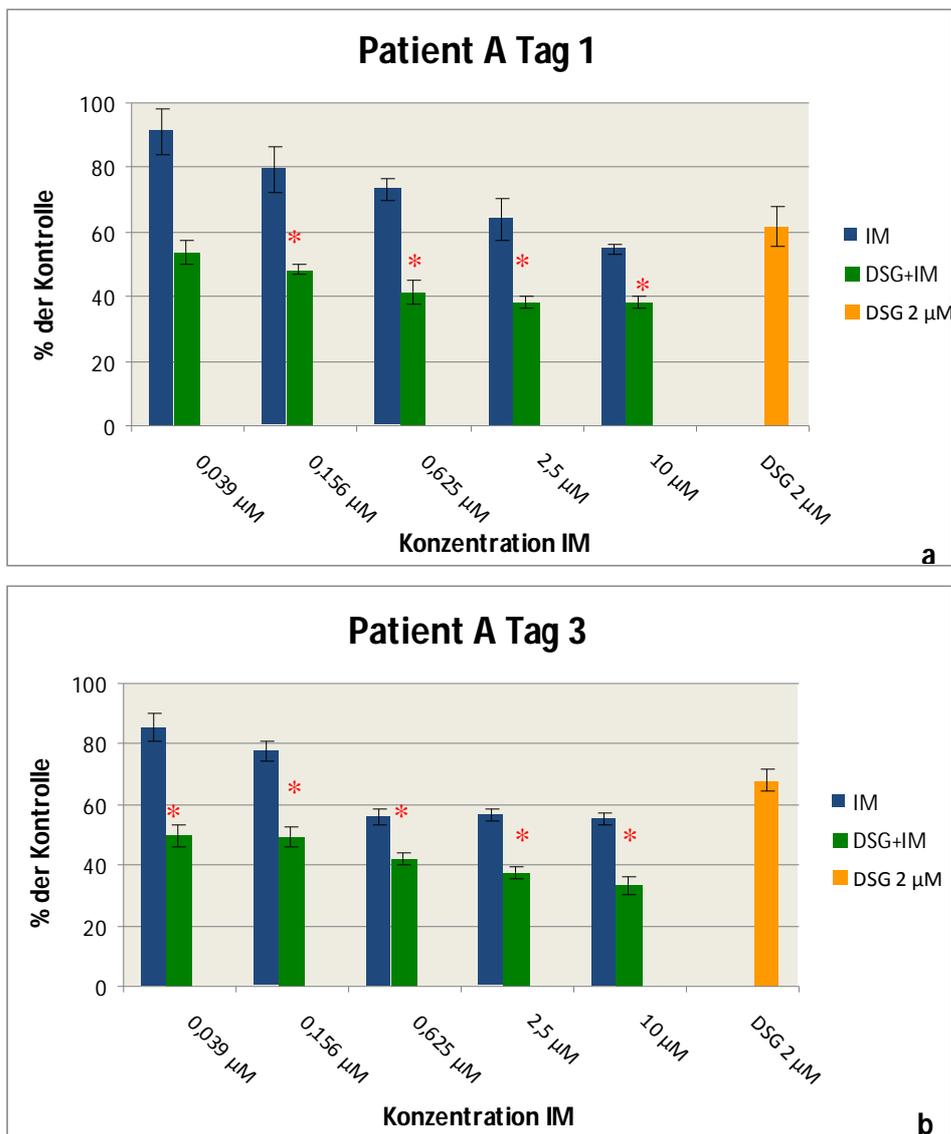


Abb.37 Proliferation Patient A unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Patient A: Die IM Monotherapie zeigt bei Patient A an Tag 1 eine dosisabhängige Reduktion des Anteils viabler Zellen von 91% bei der niedrigsten Konzentration auf 55% bei 10 µM. Die Kombinationstherapie erbringt an Tag 1 deutlich stärkere Effekte, erkennbar an einer Reduktion von initial 54% bei 0,039 µM auf 38 % bei 10 µM. Diese Entwicklung setzt sich im weiteren Behandlungsverlauf fort und demonstriert die Überlegenheit der Kombinationstherapie. Diese ist an Tag 1 ab einer IM-Konzentration von 0,156 µM beiden Monotherapien statistisch signifikant überlegen (Anhang Tab.5 d). Somit zeigt dieser CML Patient ein mit den gesunden Spendern vergleichbares Reaktionsmuster auf die Kombinationstherapie. Auch bei der Behandlung *BCR-ABL*-positiver CD34⁺ Zellen dieses Patienten mit DSG und IM in Mono- und in Kombinationstherapie sind die erzielten Effekte auf additive Effekte der Einzelsubstanzen zurückzuführen.

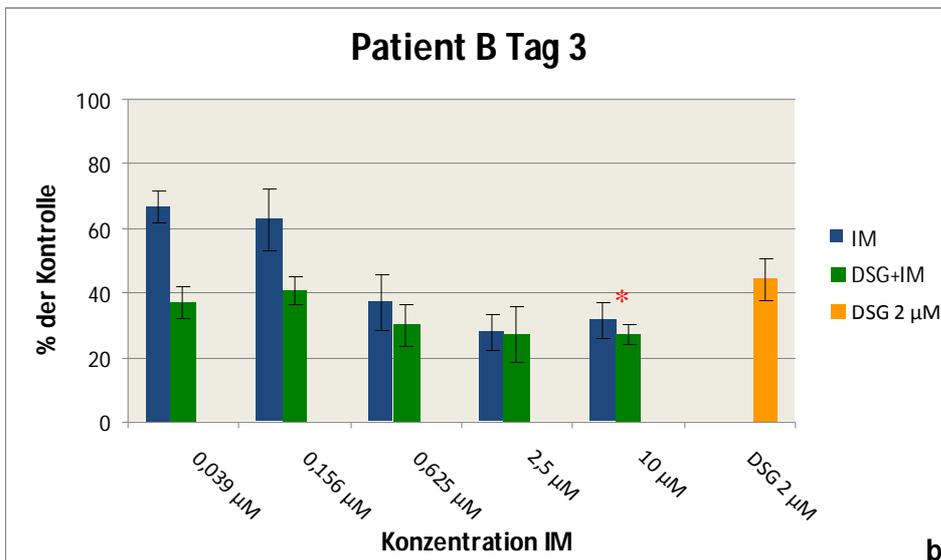
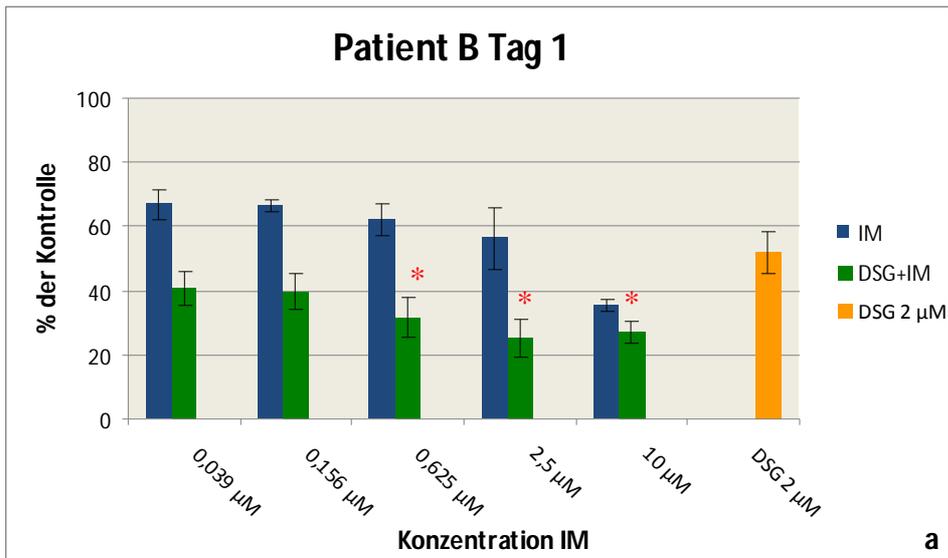


Abb.38 Proliferation Patient B unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Patient B: Bei Patient B ist die Kombinationstherapie an Tag 1 der Monotherapie ab einer IM Konzentration von 0,625 µM statistisch überlegen ($p=0,02$). Diese Entwicklung ist an Tag 2 nur punktuell nachzuweisen (Anhang Tab.5 e) und findet sich an Tag 3 lediglich bei einer Konzentration von 10 µM, wobei bei dieser hohen Konzentration am ehesten von unspezifischen toxischen Effekten auszugehen ist.

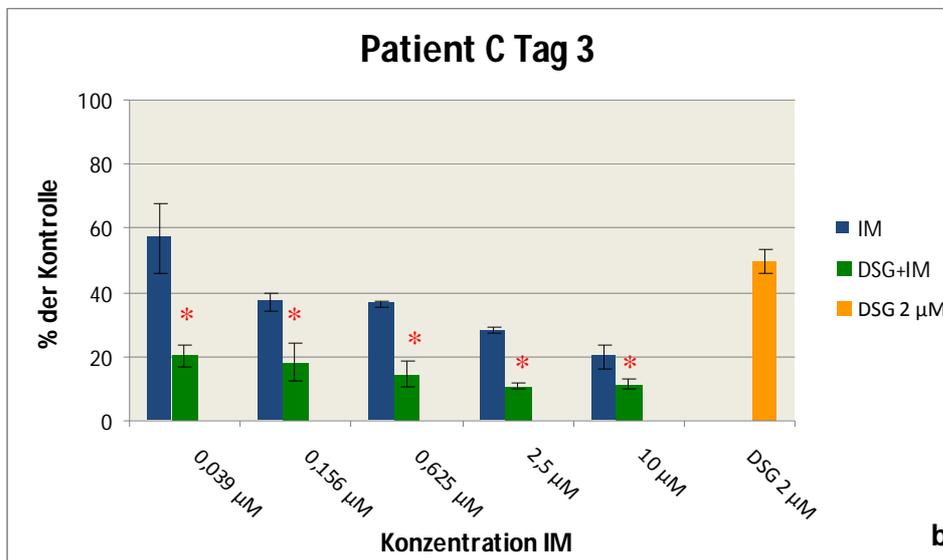
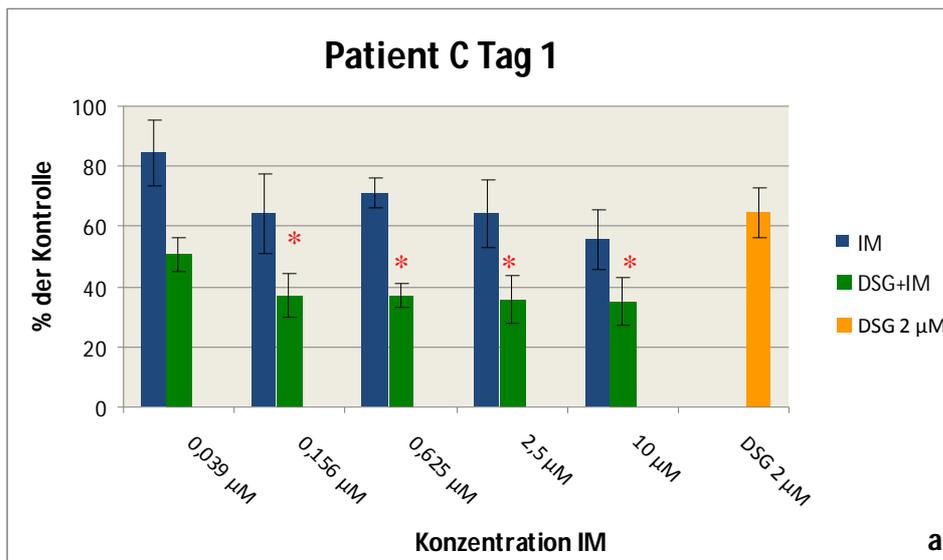


Abb.39 Proliferation Patient C unter der Kombinationstherapie
a: Tag 1; b: Tag 3 nach IM-Behandlung; * Signifikanz

Patient C: Patient C reagiert an Tag 1 auf die IM Monotherapie in ansteigender Konzentration mit einem Abfall des Anteils viabler Zellen von 84% bei 0,039 µM auf 56% bei 10 µM. Die Kombinationstherapie erbringt deutlich stärkere Effekte erkennbar an Prozentzahlen die sich zwischen 51% bei 0,039 µM und 35% bei 10 µM bewegen. Für Tag 1 bestätigen statistisch signifikante Werte ab einer Konzentration von 0,156 µM ($p=0,01$) die Überlegenheit der Kombinationstherapie. Für Tag 2 lassen sich statistisch signifikante Werte nur punktuell bei 0,625 ($p=0,02$) und 10 µM ($p=0,02$) nachweisen. An Tag 3 fällt der Anteil lebender Zellen unter der Kombinationstherapie auf Werte von 20% bei der niedrigsten Konzentration und 11% bei 10 µM. Die hochsignifikanten P-Werte dieses Tages (Anhang Tab.5 f) unterstreichen die Überlegenheit der Kombinationstherapie und zeigen auf, dass dieser Effekt nicht einer der Einzelsubstanzen zuzuschreiben ist, sondern auf den Effekt der Kombination beider Substanzen beruht.

5. Diskussion

Die letzten paar Jahrzehnte erbrachten beachtenswerte Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie vieler Krebsentitäten. Diese neu gewonnenen Erkenntnisse boten eine breite Plattform für die Entwicklung zielgerichteter molekularer Therapiestrategien. Durch die Identifikation der molekularen Grundlagen vieler Malignome hat sich der Fokus der Krebsforschung in Richtung der Charakterisierung und Evaluation solcher Substanzen verschoben, welche selektiv Proteine der Signaltransduktion der transformierten Krebszellen inhibieren.

Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) als hämatologische Modellerkrankung handelt es sich um ein sehr gut erforschtes und etabliertes Modell, anhand dessen der Zusammenhang zwischen molekularer Veränderung und zielgerichteter Therapie exemplarisch vorgestellt werden kann.

Imatinib als erster Tyrosinkinaseinhibitor seiner Generation hat sicherlich den entscheidenden Fortschritt in der Therapie der *BCR-ABL*-positiven Leukämie erbracht. Entsprechend wird IM in internationalen Therapieempfehlungen als Standardtherapie für die Erstlinientherapie der CML empfohlen. Zytogenetische Ansprechraten von über 80 % wurden daraufhin erreicht und zeigten sich in einem signifikant verbesserten Patientenüberleben [14]. Trotz der guten Wirksamkeit und Verträglichkeit von IM zeichnete sich die Resistenzentwicklung zunehmend als Herausforderung in der Praxis ab. Die Imatinibresistenz stellte sich bald als klinisch relevantes Problem heraus, das die Langzeiterfolge insbesondere in fortgeschrittenen Krankheitsstadien limitierte. Im klinischen Alltag wird der unbestreitbare Erfolg von IM leider durch 3 Hauptprobleme, die sich im Laufe der Behandlung mit *BCR-ABL*-Inhibitoren ergeben, kompromittiert:

- Limitierter Therapieerfolg in Hinsicht auf das erreichte Ansprechen und auf seine Dauer in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (AP/BK).
- Primäre oder erworbene Resistenz gegen IM.
- Persistenz einer minimalen Resterkrankung (MRD) aufgrund eingeschränkter Effekte von IM auf schlummernde leukämische Stammzellen.

Unter Patienten, die in der CP mit IM behandelt werden, wird die Resistenzrate auf 1-5 % pro Jahr geschätzt- mit steigender Häufigkeit im Verlauf der Behandlung [37].

Versuche zur Optimierung der Zielproteininhibition von *BCR-ABL*-Mutanten führten zur Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren der 2. Generation wie z.B. Nilotinib, Dasatinib und Bosutinib [70], [56]. Im Zuge der neuen Welle an TKI mit erweitertem Spektrum der Zielproteininhibition zeigte sich bei den meisten Mutationen gute Wirksamkeit bei akzeptablem Nebenwirkungsprofil. Trotz der vielversprechenden klinischen Ergebnisse bei diversen *BCR-ABL*-Mutationstypen wird die häufig beobachtete T315I-Mutation von keiner dieser neu entwickelten Substanzen effektiv inhibiert. Da jedoch T315I als Hauptmechanismus der Resistenz gegen TKI der 2. Generation angesehen wird, liegt natürlich die große Herausforderung der Zukunft in der Entwicklung von Substanzen, die in der Lage sind, auch diese therapeutisch bisher schwer fassbare Mutation zu kontrollieren.

So wertvoll und auch in Zukunft unverzichtbar die Therapie mit BCR-ABL-Inhibitoren auch sein mag, so sollte man sich auch die Defizite bzw. Grenzen dieser Therapiestrategie vor Augen halten:

1. Gemäß der IRIS-Studie scheint das Erreichen einer kompletten zytogenetischen Remission (KZyR) der wichtigste prognostische Faktor zu sein. Über den Stammzellecharakter der CML herrscht Einigkeit. Das elementare Problem der Therapie mit allen BCR-ABL-Inhibitoren liegt darin, dass sämtliche Substanzen latent ruhende leukämische Stammzellen nicht affektieren. Diese LSZ entgehen somit der Therapie und bieten ein Reservoir für die Rezidivbildung. Die Suche nach Strategien zur Verbesserung der Rate an kompletten molekularen Remissionen steht deswegen im Fokus der zielgerichteten Therapie für CML-Patienten. Es gilt Therapieregimes zu finden, die den Pool an LSZ zu Beginn der Therapie verkleinern oder sogar eliminieren, um so die potentielle Quelle für Rezidivbildung bestenfalls zu eliminieren.
2. Der Beginn einer oralen Therapie mit TKI bedeutet in der Regel eine kontinuierliche und lebenslange Einnahme dieser Medikamente. Neben einer hohen Compliance seitens des Patienten spielt auch die Selektion von Resistenzen eine wichtige Rolle. Die Gefahr, einen initial (sub-)resistenten Klon so zu selektionieren und heranzuzüchten steigt mit der Einnahmedauer zunehmend an.
3. Die T315I Mutation stellt eine besondere Herausforderung dar, da sie komplett resistent gegenüber IM und sämtlichen TKI der 2. Generation ist. Ein vielversprechender Schritt in Hinsicht auf diese klinisch relevante und bisher schwer zu kontrollierende Mutation wurde durch die Beschreibung des Aurora-Kinase-Inhibitors PAH-739358 unternommen. Dieser duale „small molecule inhibitor“ zeigte in experimentellen Studien gute Wirksamkeit gegen T315I [19].

Die Konfrontation mit diesen Hürden der CML-Therapie verdeutlichte zunehmend die Notwendigkeit der Suche nach neuen unterstützenden bzw. ergänzenden Therapieoptionen zusätzlich zu IM. Zweifelsfrei wird IM ein fester und elementarer Bestandteil der CML-Therapie bleiben, doch aus dem bisher genannten wird ersichtlich, dass IM und seine weiterentwickelten Abkömmlinge alleine nicht ausreichen werden, die Krankheit CML mit ihren Komplikationen in den Griff zu bekommen. Angetrieben durch diese Überlegungen gewinnt die Identifikation neuer alternativer BCR-ABL-abhängiger Effektorproteine als potentielle Angriffspunkte in der CML-Therapie immer mehr an Bedeutung.

Bei der Analyse des Proteinexpressionsmusters von IM-behandelten K562 Zellen mittels 2-D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass unter anderem die Expression des Proteins eIF5A vermindert war [2]. Dieses Protein spielt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation und – Differenzierung und muss einer einzigartigen Hypusinierungsmodifikation unterzogen werden. In zwei enzymatischen Schritten wird die Aminosäure Hypusin gebildet und an das inaktive eIF5A Vorläuferprotein angehängt, um so das biologisch aktive Endprodukt zu bilden. Die Beobachtung der

verminderten eIF5A-Expression unter IM-Behandlung warf die Frage nach der Rolle dieses Proteins bei der *BCR-ABL*-vermittelten malignen Transformation hämatopoetischer Zellen auf. Es gab Grund zur Annahme, dass IM seine antiproliferativen Effekte zumindest teilweise durch Hemmung der *BCR-ABL*-vermittelten eIF5A-Überexpression ausübt. Ausgehend von dieser Arbeit erscheint die Hypusinierungsinhibitor mittels pharmakologischer Substanzen also ein interessanter Ansatz zur Ergänzung der konventionellen CML-Therapie mit TKI.

Basierend auf diesen Überlegungen bot sich die Rationale zu dieser Arbeit. Das Ziel dieser medizinischen Dissertationsarbeit war es zu eruieren, ob additive oder sogar synergistische Effekte durch die Behandlung verschiedener Zellen mit IM in Kombination mit dem Hypusinierungsinhibitor Deoxyspergualin detektiert werden können. Die Verwendung muriner Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus bot dabei die exzellente Möglichkeit, den Effekt dieser Therapie in Abhängigkeit von der Ausprägung des Merkmals *BCR-ABL* zu testen. Besonders interessant war für uns das Verhalten der hochresistenten Zelllinie BaF3-T315I zu evaluieren.

Zunächst wurde der Effekt der Deoxyspergualin-Monotherapie in verschiedenen Konzentrationsstufen auf das Proliferationsverhalten von *BCR-ABL*-positiven und –negativen Zelllinien untersucht. Es zeigte sich bei allen untersuchten Zelllinien eine sowohl dosisabhängige als auch zeitabhängige Komponente der Proliferationshemmung. Bei allen murinen Zelllinien kam es, unabhängig vom *BCR-ABL*-Status, bereits ab dem 3. Behandlungstag zu einer dosisabhängigen Proliferationshemmung mit signifikanten Unterschieden zur Kontrolle. Die humanen Zelllinien hingegen wiesen am 3. Behandlungstag noch kein dosisabhängiges Reaktionsverhalten auf, erst an Tag 5 trat dieses auf, jedoch reagierten sie weniger sensitiv als die murinen Zellen. Die Erkenntnisse des Kurzzeitproliferationsassays wurden im Langzeitproliferationsassay weiter ausgeführt. Es bestätigte sich die vom Merkmal *BCR-ABL* und vom Mutationstyp unabhängige Proliferationshemmung der murinen Zelllinien, bei den humanen Zellen waren die Effekte ebenfalls *BCR-ABL*-unabhängig-deutlich geringer ausgeprägt. Die Überlegenheit der DSG-Therapie bei den murinen Zelllinien spiegelte sich auch in den Ergebnissen der FACS-Analyse wieder. Hier konnte nur für die Mauszellen eine signifikant höhere Apoptoserate am 13. Behandlungstag nach DSG-Therapie mit 4 μ M nachgewiesen werden. Um die Frage nach möglichen synergistischen Effekten zwischen den Substanzen IM und DSG zu klären, analysierten wir das Proliferationsverhalten und das Zytotoxizitätsverhalten unter einer Kombinationstherapie bestehend aus 6 Tage DSG-Vorbehandlung in einer Höhe von 4 μ M und anschließender IM-Applikation in ansteigender Dosierung. Bei der Evaluation von synergistischen Effekten ist es von grundlegender Bedeutung sich vor Augen zu führen, dass Synergismus als Ergebnis einer präexistenten Sensibilität einer Zelllinie gegenüber beiden zu untersuchenden Einzelsubstanzen resultiert. Folglich sind synergistische Effekte nur bei solchen Zelllinien zu erwarten, die jeweils auf IM und DSG sensibel reagieren. Dies ist gleichbedeutend damit, dass *BCR-ABL*-negative Zelllinien und BaF3-T315I als absolut IM-resistenter Vertreter physiologischerweise keine synergistischen Effekte erwarten lassen. Unter dem

beschriebenen Behandlungsschema konnte für die murinen *BCR-ABL*-positiven Zellen BaF3-p210, BaF3-M351T und BaF3-E255K sowohl in Hinsicht auf Proliferation als auch auf Zytotoxizitätsverhalten ein Synergismus nachgewiesen werden. Insbesondere der MTT-Assay demonstrierte eindrücklich den Synergismus zwischen DSG und IM bei diesen Zelllinien. Dieser äußerte sich als Reduktion der IC_{50} , die umso ausgeprägter war, je höher die Restsensibilität der Zelllinie gegenüber IM ist. Während bei BaF3-p210 durch die DSG-Vorbehandlung eine zehnfach niedrigere IC_{50} resultierte, lag bei BaF3-M351T die IC_{50} um den Faktor 5 niedriger, und bei BaF3-E255K betrug dieser Faktor lediglich 1,4. Anhand dieser Ergebnisse kann man darauf schließen, dass die Zellen durch die DSG-Vorbehandlung für die darauffolgende IM-Applikation sensibilisiert wurden, und zwar umso stärker, je höher ihre physiologische Sensibilität gegenüber IM ursprünglich ist. Um unsere Daten auf primäres Patientenmaterial auszudehnen, wurde die Effizienz von DSG im Mono- und in Kombinationstherapie mit IM in CD34-positiven Zellen von CML-Patienten in der chronischen Phase der Erkrankung untersucht. Bei der analog zu den Zelllinien durchgeführten Kombinationstherapie bestehend aus 6-tägiger DSG-Vorbehandlung in Höhe von 2 μ M und anschließender IM-Applikation in ansteigender Konzentration zeigte sich sowohl bei den gesunden Spendern als auch bei den 3 CML-Patienten signifikant niedrigere Zellzahlen bei der DSG-Vorbehandlung als bei den Kontrollzellen. Hier ähnelte das Proliferationsverhalten der Zellen von gesunden Spendern dem der CML Patienten sehr, sodass in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zelllinien kein *BCR-ABL*-abhängiges Reaktionsmuster nachgewiesen werden konnte.

In der Literatur sind bereits einige Hypusininierungsinhibitoren beschrieben worden. Ciclopirox (CPX) und N¹-guanyl-1,7-diaminiheptan (GC7) haben gute antiproliferative *BCR-ABL*-unabhängige Effekte auf humane leukämische Zelllinien gezeigt. Synergistische Effekte zwischen den HI und IM waren erwartungsgemäß auf *BCR-ABL*-positive Zelllinien beschränkt [2]. Aufgrund nicht ausreichender in-vivo erreichbarer Wirkspiegel eignen sich diese Substanzen jedoch nicht für den klinischen Einsatz. eIF5A ist ein sehr stabiles Protein mit langer Halbwertszeit von $T_{1/2} > 7$ Tage. Die Langlebigkeit des Proteins äußert sich u.a. darin, dass nach 24 Std. Behandlung von FM3A Zellen mit dem HI GC7 zwar die Formation von aktivem eIF5A zu 90% inhibiert wurde, die Zellproliferation zu diesem Zeitpunkt aber nicht beeinflusst wurde [46]. Ausgehend davon, dass ab dem Zeitpunkt der Hypusininierungsinhibition mittels DSG, bedingt durch seine lange HWZ, noch für mehrere Tage aktives eIF5A vorhanden ist, scheint es nicht verwunderlich, dass die Proliferationshemmung erst mit einer gewissen Latenz eintritt. Der verzögerte Eintritt der Proliferationshemmung ab dem 3. Behandlungstag konnte übereinstimmend mit Nishimura et al. im 3-Tageproliferationsassay bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). DSG zielt auf den gleichen Angriffspunkt der Hypusininierungsmodifikation wie GC7, beide inhibieren das erste Enzym der Hypusininierungsreaktion DHS. Es wird vermutet, dass DSG mit Aminosäureresten im aktiven Zentrum von DHS reagiert und so kovalente Bindungen formt. Die benötigte DSG-Konzentrationen zur Enzymhemmung sinkt graduell mit der Dauer der Präinkubation und es resultieren relativ geringe zelluläre DSG-

Konzentrationen (15-150 μM) [47]. Angaben in der Literatur zum möglichen Einsatz von DSG in der Leukämitherapie und auch zu seiner Rolle bei der Hypusinierungsmodifikation sind rar. DSG wird im asiatischen Raum vor allem als Immunsuppressivum eingesetzt. Gusperimus[®], so sein generischer Name, wird klinisch erfolgreich zur Abwendung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen und zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Zur Therapie der therapierefraktären Wegenerschen Granulomatose wurde DSG in einer Konzentration von 0,5 mg/Kg KG/d eingesetzt [63]. In klinischen Studien über Abstoßungsreaktionen nach NTX wurde DSG in einer Dosierung von 3 bzw. 5 mg/Kg KG verabreicht und führte in 79% de Fälle zur Remission. In dieser Dissertationsarbeit wurden DSG-Konzentrationen zwischen 0,5-8 μM eingesetzt. Die in-vivo erreichbaren Medikamentenspiegel unter einer solchen Dosierungsbreite sind zur weiteren Evaluation von DSG als möglichen Kombinationspartner in der CML-Therapie von besonderem Interesse. Die Tatsache, dass DSG bereits in vielen Ländern, zwar mit anderer Indikationsstellung, jedoch mit guter Erfahrung klinisch eingesetzt wird, könnte dieses Medikament als potentiellen Kombinationspartner mit IM favorisieren. Die Nebenwirkungen sind tolerabel und es wird insgesamt gut vertragen.

Aufgrund seines immensen Erfolges ist es nach derzeitigem Kenntnisstand undenkbar, dass IM als Erstlinientherapie der CML durch ein alternatives Medikament ersetzt werden könnte. Das leider zunehmend ernst zu nehmende Problem der Resistenzentwicklung stellt die Erkundung neuer potentieller Kombinationspartner zusätzlich zu IM immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Wünschenswerte Eigenschaften eines neuen Kombinationsmedikamentes sind neben guter Verträglichkeit und geringen Nebenwirkungen auch ein möglichst spezifischer Angriffspunkt. In unserem Fall bedeutet dies ein selektives Wirken auf *BCR-ABL*-positive Zellen, während gesunde Zellen nicht beeinflusst würden. Ziel der Kombinationstherapie ist das Erreichen einer zumindest zytogenetischen Remission in kürzerer Zeit als bisher und die Beherrschung der tückischen T315I Mutation. Die unspezifischen DSG-Effekte in Kombination mit den spezifischen IM-Effekten scheinen geeignet zu sein, um die therapeutische Lücke, bedingt durch latent existierende leukämische Stammzellen und verschiedenen Resistenzmechanismen, zu schließen. Der unspezifische DSG-Effekt ist vergleichbar mit den derzeit verwendeten Zytostatika in der Onkologie, die ebenfalls unspezifische Effekte auf proliferierende Zellen entfalten.

Der HI Deoxyspergualin vereint bereits einige der genannten wünschenswerten Eigenschaften in sich. Neben einem günstigen Nebenwirkungsprofil ist es auch effektiv gegen alle Mutationen der Tyrosinkinasedomäne einschließlich T315I. Die langjährige klinische Erfahrung mit dem Medikament spricht zusätzlich für seinen bedenkenlosen Einsatz. Zwar erfüllt DSG das Kriterium der *BCR-ABL*-Spezifität nicht, dennoch bietet die Substanz einige Vorzüge, für die sich eine weitere Evaluation für seine Tauglichkeit in der CML-Therapie lohnen würde.

6. Zusammenfassung

Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ist heutzutage der Goldstandard in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie. Seit 2001 ist er zur Erstlinientherapie der CML zugelassen. Die unbestreitbar signifikanten Erfolge dieses selektiven *BCR-ABL*-Inhibitors werden allerdings durch das Problem der Resistenzentwicklung getrübt. Das Ziel bei der Anwendung neuerer therapeutischer Substanzen ist die Beherrschung der Resistenzentwicklungen und die Elimination des Pools latenter leukämischer Stammzellen, beides Gründe für primäres Therapieversagen bzw. Rezidiventwicklung. TKI der 2. Generation fanden bald klinische Anwendung, allerdings vermochten sie die relevante T315I-Mutation nicht zu beherrschen. Nachdem das Protein eIF5A als vielversprechender Angriffspunkt für eine molekular zielgerichtete Therapie beschrieben wurde, scheint es lohnenswert, der Rolle dieses Proteins bei der CML weiter auf den Grund zu gehen. EIF5A spielt eine zentrale Rolle in zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung. Die Besonderheit dieses Proteins besteht in der posttranslationalen Hypusinierungsreaktion, der es unterzogen werden muss, um seine biologische Aktivität zu erlangen. Ausgehend davon, liegt die Vermutung nahe, dass die Inhibition der Hypusinierungsmodifikation von eIF5a ein interessanter Ansatz sein könnte, um die Expansion, vor allem entarteter Zellen wie z.B. Leukämiezellen einzudämmen.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Hypusinierungsinhibitors Deoxyspergualin auf das Proliferationsverhalten, die Zytotoxizität und Zellzyklusprogression von leukämischen Zelllinien und primärem Patientenmaterial untersucht. Von besonderem Interesse war die Wirkung von DSG auf die IM-resistenten Mutationen, allen voran BaF3-T315I und die Abhängigkeit des Ansprechens von der Ausprägung des Merkmals *BCR-ABL*. Zusammenfassend lieferte diese Arbeit folgende Erkenntnisse:

- DSG entfaltet gute antiproliferative Effekte auf *BCR-ABL* positive und -negative Zelllinien sowie auf primäres Patientenmaterial in Form CD34⁺ Zellen.
- Die signifikant höhere Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus DSG+IM beruht auf additive Effekte der Einzelsubstanzen.
- Murine Zelllinien sprechen in Hinsicht auf Proliferation und Apoptoseinduktion sensibler auf DSG an als die humanen Zelllinien.
- Die Wirkung der Substanz ist nicht von der Expression des *BCR-ABL*-Fusionsgens abhängig.
- DSG ist gut wirksam gegen alle untersuchten Mutationen der Tyrosinkinasedomäne inklusive der klinisch relevanten und problembehafteten T315I-Mutation.

In Anbetracht dieser Ergebnisse rückt DSG trotz seiner unselektiven Wirkung in Hinsicht auf die *BCR-ABL*-Expression in den Kreis potentieller Kombinationspartner mit IM. Insbesondere die Kombination aus spezifischen IM-Effekten und unspezifischen DSG-Effekten könnte bei weiterer Evaluation dazu beitragen, die bisherigen Probleme und Grenzen der CML-Therapie zu beherrschen. Aufgrund der genannten Eigenschaften könnte DSG dazu beitragen, neue Möglichkeiten zur effektiveren Therapie der chronisch myeloischen Leukämie zu eröffnen.

7. Literaturverzeichnis

1. Amemiya H, Suzuki S, Ota K, Takahashi K, Sonoda T, Ishibashi M, Omoto R, Koyama I, Dohi K, Fukuda Y, .: A novel rescue drug, 15-deoxyspergualin. First clinical trials for recurrent graft rejection in renal recipients
Transplantation 1990;49(2):337-343.
2. Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, Hartmann U, Kammer W, Copland M, Brassat U, Priemer M, Hauber I, Wilhelm T, Schwarz G, Kanz L, Bokemeyer C, Hauber J, Holyoake TL, Nordheim A, Brummendorf TH: Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach.
Blood 2007;109(4):1701-1711.
3. Bartolovic K, Balabanov S, Hartmann U, Komor M, Boehmler AM, Buhring HJ, Mohle R, Hoelzer D, Kanz L, Hofmann WK, Brummendorf TH: Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro
Blood 2004;103(2):523-529.
4. Bevec D, Hauber J: Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function
Biol Signals 1997;6(3):124-133.
5. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T: Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis
Blood 2003;102(1):276-283.
6. Braun N, Wernet D, Schnaidt M, Bevan DJ, Viebahn R, Risler T: Successful treatment of accelerated vascular rejection in a highly immunised renal transplant recipient with immunoadsorption and 15-deoxyspergualin
Transpl Int 2004;17(7):384-386.
7. Clement PM, Henderson CA, Jenkins ZA, Smit-McBride Z, Wolff EC, Hershey JW, Park MH, Johansson HE: Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2
Eur J Biochem 2003;270(21):4254-4263.
8. Clement PM, Johansson HE, Wolff EC, Park MH: Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells.
FEBS J 2006;273(6):1102-1114.
9. Coffino P: Regulation of cellular polyamines by antizyme
Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2(3):188-194.
10. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds
Proc Natl Acad Sci U S A 1978;75(5):2458-2462.

11. Deininger M, Buchdunger E, Druker BJ: The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia
Blood 2005;105(7):2640-2653.
12. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia.
Blood 2000;96(10):3343-3356.
13. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A: Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac.
Nature 1991;351(6325):400-402.
14. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA: Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.
N Engl J Med 2006;355(23):2408-2417.
15. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL: Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia
N Engl J Med 2001;344(14):1031-1037.
16. Fischer T: Der Signalhemmer Imatinib Mesilat (STI571)- Wirkprinzip und klinische Anwendung.
UNI-MED Science, 2002.
17. Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galietta A, Rostagno R, Scapozza L: Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias
Lancet Oncol 2003;4(2):75-85.
18. Goldman JM: How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era
Blood 2007;110(8):2828-2837.
19. Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brummendorf TH: Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I
Blood 2008;111(8):4355-4364.
20. Gores PF: Deoxyspergualin: clinical experience. Transplant Proc 1996;28(2):871-872.
21. Groth CG: Deoxyspergualin in allogeneic kidney and xenogeneic islet transplantation: early clinical trials. Ann N Y Acad Sci 1993;685:193-195.
22. Groth CG, Ohlman S, Ericzon BG, Barkholt L, Reinholt FP: Deoxyspergualin for liver graft rejection. Lancet 1990;336(8715):626.

23. Hanauske-Abel HM, Park MH, Hanauske AR, Popowicz AM, Lalande M, Folk JE: Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta* 1994;1221(2):115-124.
24. Hibasami H, Tsukada T, Suzuki R, Takano K, Takaji S, Takeuchi T, Shirakawa S, Murata T, Nakashima K: 15-Deoxyspergualin, an antiproliferative agent for human and mouse leukemia cells shows inhibitory effects on the synthetic pathway of polyamines. *Anticancer Res* 1991;11(1):325-330.
25. Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R: Chronische myeloische Leukämie- Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie. UNI-Med Science, 2004.
26. Holcombe H, Mellman I, Janeway CA, Jr., Bottomly K, Dittel BN: The immunosuppressive agent 15-deoxyspergualin functions by inhibiting cell cycle progression and cytokine production following naive T cell activation *J Immunol* 2002;169(9):4982-4989.
27. Hughes SE, Gruber SA: New immunosuppressive drugs in organ transplantation. *J Clin Pharmacol* 1996;36(12):1081-1092.
28. Igarashi K, Kashiwagi K: Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271(3):559-564.
29. Igarashi K, Kashiwagi K: Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J* 1999;344 Pt 3:633-642.
30. Jasiulionis MG, Luchessi AD, Moreira AG, Souza PP, Suenaga AP, Correa M, Costa CA, Curi R, Costa-Neto CM: Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth *Cell Biochem Funct* 2007;25(1):109-114.
31. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
32. Kang KR, Kim YS, Wolff EC, Park MH: Specificity of the deoxyhypusine hydroxylase-eukaryotic translation initiation factor (eIF5A) interaction: identification of amino acid residues of the enzyme required for binding of its substrate, deoxyhypusine-containing eIF5A. *J Biol Chem* 2007;282(11):8300-8308.
33. Kavalchik E, Goff D, Jamieson CH: Chronic myeloid leukemia stem cells *J Clin Oncol* 2008;26(17):2911-2915.
34. Kay JE, Lindsay VJ: Control of ornithine decarboxylase activity in stimulated human lymphocytes by putrescine and spermidine *Biochem J* 1973;132(4):791-796.
35. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force

T: Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate.
Nat Med 2006;12(8):908-916.

36. Kyo M, Ichikawa Y, Fukunishi Y, Hanafusa T, Nagano S, Takahara S, Ishibashi M, Okuyama A, Ihara H, Fujimoto N, .: Histopathological classification and clinical effects of kidney transplant rejection treated with 15-deoxyspergualin
Transplant Proc 1995;27(1):1012-1013.
37. Lahaye T, Riehm B, Berger U, Paschka P, Muller MC, Kreil S, Merx K, Schwindel U, Schoch C, Hehlmann R, Hochhaus A: Response and resistance in 300 patients with BCR-ABL-positive leukemias treated with imatinib in a single center: a 4.5-year follow-up.
Cancer 2005;103(8):1659-1669.
38. Laneuville P: Abl tyrosine protein kinase. Semin Immunol 1995;7(4):255-266.
39. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, Gathmann I, Wang Y: Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study
Blood 2008;111(8):4022-4028.
40. Lee SB, Park JH, Kaevel J, Sramkova M, Weigert R, Park MH: The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A
Biochem Biophys Res Commun 2009;383(4):497-502.
41. Lorenz HM, Grunke M, Wendler J, Heinzl PA, Kalden JR: Safety of 15-deoxyspergualin in the treatment of glomerulonephritis associated with active systemic lupus erythematosus
Ann Rheum Dis 2005;64(10):1517-1519.
42. Lozzio CB, Lozzio BB: Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome
Blood 1975;45(3):321-334.
43. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON: Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.
Science 1990;247(4946):1079-1082.
44. Matsufuji S, Miyazaki Y, Kanamoto R, Kameji T, Murakami Y, Baby TG, Fujita K, Ohno T, Hayashi S: Analyses of ornithine decarboxylase antizyme mRNA with a cDNA cloned from rat liver.
J Biochem 1990;108(3):365-371.
45. Melo JV, Barnes DJ: Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nat Rev Cancer 2007;7(6):441-453.
46. Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K, Igarashi K: Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation
Biochem J 2005;385(Pt 3):779-785.
47. Nishimura K, Ohki Y, Fukuchi-Shimogori T, Sakata K, Saiga K, Beppu T, Shirahata A, Kashiwagi K, Igarashi K: Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic

translation initiation factor 5A (eIF5A) by deoxyspergualin
Biochem J 2002;363(Pt 3):761-768.

48. Nowell PC, Hungerford DA: Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.
J Natl Cancer Inst 1960;25:85-109.
49. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.
N Engl J Med 2003;348(11):994-1004.
50. Odaka C, Toyoda E, Nemoto K: Immunosuppressant deoxyspergualin induces apoptotic cell death in dividing cells
Immunology 1998;95(3):370-376.
51. Ohlman S, Zilg H, Schindel F, Lindholm A: Pharmacokinetics of 15-deoxyspergualin studied in renal transplant patients receiving the drug during graft rejection.
Transpl Int 1994;7(1):5-10.
52. Park JH, Wolff EC, Folk JE, Park MH: Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase
J Biol Chem 2003;278(35):32683-32691.
53. Park MH: The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)
J Biochem 2006;139(2):161-169.
54. Park MH, Lee YB, Joe YA: Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation
Biol Signals 1997;6(3):115-123.
55. Park MH, Wolff EC, Folk JE: Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation?
Trends Biochem Sci 1993;18(12):475-479.
56. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J: Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors
Nat Rev Drug Discov 2007;6(10):834-848.
57. Ramos EL, Nadler SG, Grasela DM, Kelley SL: Deoxyspergualin: mechanism of action and pharmacokinetics.
Transplant Proc 1996;28(2):873-875.
58. Riccardi C, Nicoletti I: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry
Nat Protoc 2006;1(3):1458-1461.
59. Rowley JD: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.
Nature 1973;243(5405):290-293.

60. Russell D, Snyder SH: Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;60(4):1420-1427.
61. Sawyers CL: Chronic myeloid leukemia *N Engl J Med* 1999;340(17):1330-1340.
62. Schäfer B, Hauber I, Bunk A: Inhibition of Multidrug-Resistant HIV-1 by interference with cellular S-Adenosylmethionine Decarboxylase Activity. *The Journal of Infectious Diseases* 2006;11(7):773-781.
63. Schmitt WH, Birck R, Heinzel PA, Gobel U, Choi M, Warnatz K, Peter HH, van der Woude FJ: Prolonged treatment of refractory Wegener's granulomatosis with 15-deoxyspergualin: an open study in seven patients *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(6):1083-1092.
64. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP: Mice homozygous for the ablm1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 1991;65(7):1165-1175.
65. Shi XP, Yin KC, Ahern J, Davis LJ, Stern AM, Waxman L: Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. *Biochim Biophys Acta* 1996;1310(1):119-126.
66. Tabor CW, Tabor H: Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984;53:749-790.
67. Takeuchi T: [Spergualin a novel antitumor antibiotic produced by *Bacillus laterosporus*] 16. *Gan To Kagaku Ryoho* 1984;11(12 Pt 2):2633-2639.
68. Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC: Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 1991;65(7):1153-1163.
69. Voncken JW, van SH, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, .: Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 1995;80(5):719-728.
70. Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob SW, Hochhaus A, Griffin JD: Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia *Nat Rev Cancer* 2007;7(5):345-356.
71. Wolff EC, Kang KR, Kim YS, Park MH: Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification *Amino Acids* 2007;33(2):341-350.
72. Zanelli CF, Valentini SR: Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* 2007;33(2):351-358.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr.med. Carsten Bokemyer, Klinikdirektor der II. Medizinischen Klinik und Prof. Dr. med. Tim Brümmendorf, Leiter der Arbeitsgruppe für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation im Labor für Telomer- und Stammzellbiologie erstellen zu können.

Danken möchte ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Brümmendorf für die freundliche Aufnahme in ihre Gemeinschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr.med. Artur Gonarewicz für interessante Diskussionen, Anregungen und die engagierte Hilfe bei Schwierigkeiten im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedanken.

Ebenfalls besonderen Dank an Dr. rer. nat. Ute Brassat für ihre Unterstützung bei methodischen Fragestellungen.

Danke an Herrn Eik Vettorazi aus dem Zentrum für Biometrie für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 2. April 1982 in Mönchengladbach

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1989-1993 Grundschule Damaskus/Syrien und Trittau/Schleswig-Holstein.

1993-2002 Helene-Lange Gymnasium Rendsburg

2002 Abitur am Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg (Note 1,8)

Universitäre Ausbildung

2002 Beginn des Medizinstudiums am UKE Hamburg

2004 Ärztliche Vorprüfung; Note: gut (2,3)

Seit 2007 Dissertation Experimentelle Dissertationsarbeit in der II. Medizinischen Klinik unter der Leitung von Prof. Dr. med. Tim Brümmendorf

Famulaturen

2005 Gastroenterologie, Asklepios Klinik Altona

2006 Hämatologie und Onkologie, Asklepios Klinik St. Georg
Gynäkologie und Geburtshilfe, Semmelweis Frauenklinik Wien

2007 Pneumologische Praxis Dr. Sabine Busch, Hamburg Altona

2008 Praktisches Jahr

1. Terial: Chirurgie, Asklepios Klinik Altona

Herzchirurgie Toronto General Hospital

2. Terial: Innere Medizin, Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

3. Terial: Anästhesie, Albertinen Krankenhaus Hamburg

2009 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung; Note: sehr gut (1,5)

Seit 9/2010 Assistenzärztin UKE III. Medizinische Klinik Nephrologie

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Erscheinungsjahr), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Tuhama Chahoud

Hamburg, den 10.August 2010

11. Anhang

11.1 Statistische Methoden

11.1.1 T-Test

Gibt die Teststatistik eines Student'schen t-Tests zurück. Es wird getestet, ob zwei Stichproben aus zwei Grundgesamtheiten mit demselben Mittelwert stammen. Es wurde ein zweiseitiger Test für zwei Stichproben gleicher Varianz durchgeführt.

Dieses Analysetool führt einen t-Test für zwei Stichproben durch. Bei diesem Test wird davon ausgegangen, dass die beiden Datensätze aus Verteilungen mit gleichen Varianzen stammen. Er wird als homoskedastischer t-Test bezeichnet. Mithilfe dieses t-Tests können Sie bestimmen, ob die beiden Stichproben wahrscheinlich aus Verteilungen mit gleichen Erwartungswerten der Zufallsvariablen stammen.

Der t-TEST verwendet die Daten aus Matrix1 und Matrix2, um eine nicht negative t-Kenngröße zu berechnen. Der vom t-TEST zurückgegebene Wert ist, wenn Seiten=2 ist, doppelt so groß wie der Wert, der zurückgegeben wird, wenn Seiten=1 ist, und entspricht der Wahrscheinlichkeit eines größeren absoluten Werts der t-Kenngröße unter der Annahme "identische Mittelwerte der Grundgesamtheiten".

11.1.2 Regressionsanalyse

Für die statistische Auswertung des Langzeitproliferationsassays wurde die Regressionsanalyse herangezogen. Das Regressionsanalysetool führt lineare Regressionsanalysen unter Verwendung der Methode der "kleinsten Quadrate" durch, um durch eine Reihe von Beobachtungen eine Gerade zu führen. Es wird analysiert, welchen Einfluss die Werte einer oder mehrerer unabhängiger Variablen auf eine einzelne abhängige Variable haben.

11.2 Statistik Kurzzeitproliferationsassay

a. BaF3-wt

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,52	0,03
1 μM	0,008	0,02
2 μM	0,001	0,008
4 μM	0,0002	0,003
8 μM	0,0001	0,001

b. BaF3-p210

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,53	0,15
1 μM	0,49	0,12
2 μM	0,11	0,003
4 μM	0,003	0,003
8 μM	0,002	0,001

c. BaF3-M351T

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,11	0,008
1 μM	0,005	0,011
2 μM	0,001	0,001
4 μM	0,0003	0,0002
8 μM	0,001	0,0003

d. BaF3-E255K

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,83	0,63
1 μM	0,62	0,06
2 μM	0,46	0,01
4 μM	0,053	0,001
8 μM	0,04	0,0002

e. BaF3-T315I

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,04	0,54
1 μM	0,79	0,01
2 μM	0,42	0,02
4 μM	0,03	0,0005
8 μM	0,0001	0,001

f. K562

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,43	0,01
1 μM	0,02	0,02
2 μM	0,02	0,04
4 μM	0,01	0,002
8 μM	0,001	0,001

g. HL60

DSG [μM]	Tag 3	Tag 5
0,5 μM	0,68	0,40
1 μM	0,10	0,05
2 μM	0,24	0,03
4 μM	0,13	0,02
8 μM	0,01	0,002

Tab.1 P-Werte der Kurzzeitproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Signifikante Werte sind rot dargestellt.

11.3 Statistik Langzeitproliferationsassay

BaF3-wt

Regressionsanalyse BaF3-wt

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,93
Bestimmtheitsmaß	0,87
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,83
Standardfehler	1,09
Beobachtungen	5

ANOVA

	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	23,84	23,84	19,98	0,02
Residue	3	3,58	1,19		
Gesamt	4	27,42			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	7,20	1,25	5,78	0,01	3,23	11,17	3,23	11,17
Tage	-0,64	0,14	-4,47	0,02	-1,10	-0,18	-1,10	-0,18

0,53

47,3%

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für LnProzent</i>	<i>Residuen</i>
1	5,28	-0,98
2	3,36	0,40
3	2,07	1,13
4	0,79	0,45
5	-1,13	-1,00

BaF3-p210

Regressionsanalyse BaF3-p210

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,97
Bestimmtheitsmaß	0,94
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,93
Standardfehler	0,51
Beobachtungen	5

ANOVA					
	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	13,51	13,51	51,11	0,01
Residue	3	0,79	0,26		
Gesamt	4	14,31			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	6,37	0,59	10,85	0,00	4,50	8,24	4,50	8,24
Tage	-0,48	0,07	-7,15	0,01	-0,70	-0,27	-0,70	-0,27
	0,62							
	38,29%							

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für LnProzent</i>	<i>Residuen</i>
1	4,92	-0,48
2	3,47	0,28
3	2,51	0,39
4	1,54	0,31
5	0,09	-0,49

BaF3-E255K

Regressionsanalyse BaF3-E255K

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,99
Bestimmtheitsmaß	0,98
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,97
Standardfehler	0,29
Beobachtungen	5

ANOVA

	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	10,91	10,91	126,76	0,00
Residue	3	0,26	0,09		
Gesamt	4	11,17			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	5,64	0,33	16,85	0,0005	4,58	6,71	4,58	6,71
Tag	-0,43	0,04	-11,26	0,0015	-0,56	-0,31	-0,56	-0,31
	0,65							
	35,19%							

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für lnProzent</i>	<i>Residuen</i>
1	4,34	-0,29
2	3,04	0,18
3	2,17	0,27
4	1,31	0,08
5	0,01	-0,25

BaF3-T315I

Regressionsanalyse BaF3-T315I

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,95
Bestimmtheitsmaß	0,90
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,86
Standardfehler	0,75
Beobachtungen	5

ANOVA

	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	14,58	14,58	26,04	0,01
Residue	3	1,68	0,56		
Gesamt	4	16,26			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	6,37	0,85	7,45	0,005	3,65	9,09	3,65	9,09
Tage	-0,50	0,10	-5,10	0,01	-0,81	-0,19	-0,81	-0,19
	0,61							
	39,43%							

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für LnProzent</i>	<i>Residuen</i>	<i>Standardisierte Residuen</i>
1	4,86	-0,56	-0,86
2	3,36	0,12	0,18
3	2,36	0,56	0,86
4	1,35	0,66	1,02
5	-0,15	-0,78	-1,20

K562

Regressionsanalyse K562

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,93
Bestimmtheitsmaß	0,87
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,82
Standardfehler	0,10
Beobachtungen	5

ANOVA					
	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	0,18	0,18	19,57	0,02
Residue	3	0,03	0,01		
Gesamt	4	0,21			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	4,38	0,11	39,98	0,00003	4,03	4,73	4,03	4,73
Tage	-0,06	0,01	-4,42	0,02	-0,10	-0,02	-0,10	-0,02
	0,95							
	5,42%							

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für LnProzent</i>	<i>Residuen</i>
1	4,21	0,03
2	4,05	0,03
3	3,94	-0,02
4	3,82	-0,13
5	3,66	0,09

HL60

Regressionsanalyse HL60

<i>Regressions-Statistik</i>	
Multipler Korrelationskoeffizient	0,92
Bestimmtheitsmaß	0,85
Adjustiertes Bestimmtheitsmaß	0,79
Standardfehler	0,20
Beobachtungen	5

ANOVA

	<i>Freiheitsgrade (df)</i>	<i>Quadratsummen (SS)</i>	<i>Mittlere Quadratsumme (MS)</i>	<i>Prüfgröße (F)</i>	<i>F krit</i>
Regression	1	0,68	0,68	16,49	0,03
Residue	3	0,12	0,04		
Gesamt	4	0,81			

	<i>Koeffizienten</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>t-Statistik</i>	<i>P-Wert</i>	<i>Untere 95%</i>	<i>Obere 95%</i>	<i>Untere 95,0%</i>	<i>Obere 95,0%</i>
Schnittpunkt	5,00	0,23	21,51	0,00	4,26	5,74	4,26	5,74
Tage	-0,11	0,03	-4,06	0,03	-0,19	-0,02	-0,19	-0,02

0,90

10,29%

AUSGABE: RESIDUENPLOT

<i>Beobachtung</i>	<i>Schätzung für LnProzent</i>	<i>Residuen</i>
1	4,67	0,01
2	4,35	-0,08
3	4,13	-0,09
4	3,91	0,30
5	3,59	-0,14

11.4 Statistik Proliferationsassay Kombinationstherapie

a. BaF3-wt

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,62	0,042	0,27
0,156 μM	0,59	0,15	0,07
0,625 μM	0,91	0,04	0,31
2,5 μM	0,07	0,36	0,47
10 μM	0,005	0,000002	0,0002

b. BaF3-p210

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,13	0,32	0,18
0,156 μM	0,49	0,23	0,07
0,625 μM	0,04	0,01	0,001
2,5 μM	0,002	0,004	0,0002
10 μM	0,0001	0,003	0,0002

c. BaF3-M351T

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,03	0,09	0,01
0,156 μM	0,01	0,04	0,003
0,625 μM	0,01	0,07	0,01
2,5 μM	0,01	0,001	0,01
10 μM	0,0001	0,0003	0,0003

d. BaF3-E255K

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,73	0,39	0,27
0,156 μM	0,004	0,07	0,04
0,625 μM	0,10	0,21	0,04
2,5 μM	0,001	0,01	0,02
10 μM	0,00004	0,003	0,004

e. BaF3-T315I

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,01	0,16	0,20
0,156 μM	0,04	0,07	0,07
0,625 μM	1,00	0,86	0,26
2,5 μM	0,44	0,29	0,62
10 μM	0,09	0,50	0,11

Tab.2 T-Test für die Kombinationstherapie der Zelllinien. Vergleich zwischen DSG+IM (rote Balken) und DSG 4 μM (grüner Balken). Signifikante Werte sind rot dargestellt.

f. K562

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,89	0,02	0,10
0,078 μM	0,18	0,03	0,01
0,156 μM	0,16	0,01	0,001
0,3125 μM	0,003	0,001	0,0001
0,625 μM	0,002	0,0005	0,0001

g. HL60

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,68	0,05	0,67
0,156 μM	0,58	0,13	0,43
0,625 μM	0,35	0,17	0,91
2,5 μM	0,94	0,08	0,18
10 μM	0,26	0,001	0,02

Tab.2 T-Test für die Kombinationstherapie der Zelllinien. Vergleich zwischen DSG+IM (rote Balken) und DSG 4 μM (grüner Balken).

11.5 Statistik FACS Analyse

Zelllinie	Tag 3	Tag 8	Tag 13
BaF3-p210	0,04	0,003	0,000
BaF3- wt	0,20	0,003	0,001
BaF3-E255K	0,22	0,25	0,000
BaF3-T315I	0,45	0,35	0,003
K562	0,58	0,41	0,11
HL60	0,32	0,35	0,04

Tab.3 P-Werte des T-Tests zur FACS-Analyse. Vergleich der 4 μM DSG-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen des entsprechenden Tages. Signifikante Werte sind rot dargestellt.

11.6 Statistik Primärmaterial

11.6.1 DSG-Monotherapie CD34⁺ Zellen

a. Gesunder Spender A

DSG [μM]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
0,5 μM	0,03	0,02	0,03	0,0001
1 μM	0,008	0,01	0,0005	6,6E-05
2 μM	0,008	0,003	0,0003	2,9E-05
4 μM	0,02	0,001	0,0009	2,7E-05
8 μM	0,03	0,0009	6,2E-05	2,2E-05

b. Gesunder Spender B

DSG [μM]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
0,5 μM	0,08	0,03	0,004	0,0002
1 μM	0,09	0,009	0,004	6,0E-05
2 μM	0,04	0,01	0,005	4,7E-05
4 μM	0,02	0,003	0,002	4,7E-05
8 μM	0,02	0,001	0,001	4,7E-05

c. Patient A

DSG [μM]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
0,5 μM	0,16	0,003	0,03	0,001
1 μM	0,01	0,01	0,02	0,002
2 μM	0,02	0,001	0,02	0,001
4 μM	0,01	0,004	0,02	0,004
8 μM	0,02	0,0003	0,01	0,001

d. Patient B

DSG [μM]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
0,5 μM	0,57	0,08	0,13	0,007
1 μM	0,32	0,002	0,05	0,001
2 μM	0,24	0,002	0,02	0,0003
4 μM	0,06	0,0004	0,01	0,0003
8 μM	0,04	0,001	0,007	0,0003

e. Patient C

DSG [μM]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12
0,5 μM	0,01	0,01	0,006	0,14
1 μM	0,005	0,002	0,02	0,04
2 μM	0,002	0,008	0,006	0,009
4 μM	0,005	0,002	0,001	0,001
8 μM	0,002	0,003	0,0004	0,001

Tab.4 T-Test DSG-Monotherapie in ansteigender Konzentration bei CD34⁺ Zellen.
Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle des entsprechenden Tages.
Signifikante Werte sind rot dargestellt.

11.6.2 Kombinationstherapie CD34⁺ Zellen

a. Gesunder Spender A

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,64	0,002	0,06
0,156 μM	0,006	0,002	0,01
0,625 μM	0,02	0,001	0,01
2,5 μM	0,01	0,002	0,01
10 μM	0,004	0,0004	0,005

b. Gesunder Spender B

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,11	0,008	0,003
0,156 μM	0,01	0,002	0,006
0,625 μM	0,03	0,001	0,001
2,5 μM	0,005	0,001	0,002
10 μM	0,003	0,0000	0,0001

c. Gesunder Spender C

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,3	0,01	0,02
0,156 μM	0,17	0,01	0,16
0,625 μM	0,19	0,07	0,002
2,5 μM	0,15	0,11	0,02
10 μM	0,1	0,003	0,002

d. Patient A

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,12	0,04	0,004
0,156 μM	0,02	0,007	0,003
0,625 μM	0,007	0,004	0,001
2,5 μM	0,003	0,0004	0,0002
10 μM	0,003	0,0004	0,0002

e. Patient B

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,08	0,06	0,21
0,156 μM	0,07	0,67	0,47
0,625 μM	0,02	0,02	0,05
2,5 μM	0,01	0,06	0,05
10 μM	0,004	0,003	0,02

f. Patient C

IM [μM]	Tag 1	Tag 2	Tag 3
0,039 μM	0,07	0,16	0,001
0,156 μM	0,01	0,06	0,001
0,625 μM	0,006	0,02	0,0005
2,5 μM	0,01	0,13	0,0001
10 μM	0,01	0,02	0,0001

Tab.5 T-Test für die Kombinationstherapie CD 34⁺ Zellen. Vergleich zwischen DSG+IM (rote Balken) und DSG 2 μM (grüner Balken). Signifikante Werte sind rot dargestellt.