

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Pneumologie
Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg
Eppendorf
Universitäres Cancer Center Hamburg

Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

**„Wirkung des Hypusinierungsinhibitors
SAM486A
auf Bcr-Abl-positive und -negative
Leukämiezellen“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
verlegt von

Anna-Maria Werner
geboren in Bad Kreuznach
Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 17.12.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss:

- | | |
|----------------------|-------------------------------|
| der/die Vorsitzende: | Prof. Dr. med. T. Brümmendorf |
| 2. Gutachter/in: | Prof. Dr. med. J. Dierlamm |
| 3. Gutachter/in: | Prof. Dr. med. G. Sauter |

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1.	Leukämien.....	6
1.1.1.	Chronische myeloische Leukämie.....	6
1.1.2.	Phasen der chronischen myeloischen Leukämie	7
1.1.3.	Pathogenese der chronischen myeloischen Leukämie.....	9
1.1.4.	Therapie.....	11
1.2.	Imatinibresistenz	15
1.2.1.	Definition der Resistenz in Bezug auf Imatinib	15
1.2.2.	Gründe der Resistenzentwicklung.....	16
1.2.3.	Abhängigkeit der Resistenzentwicklung vom Stadium der CML.....	16
1.3.	Wirkung der Hypusinierungsinhibitoren.....	17
1.3.1.	Biosynthese der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin	17
1.3.2.	Die Rolle der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin	18
1.3.3.	Hypusinierung von eIF-5A.....	18
1.3.4.	Der indirekte Hypusinierungsinhibitor SAM486A	20
2	Fragestellung.....	22
3	Methoden und Materialien	23
3.1.	Zelllinien	23
3.2.	Wachstumsfaktoren der Hämatopoese.....	24
3.3.	Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung	26
3.4.	Isolation von CD34+ Zellen.....	27
3.5.	Kurzzeitproliferationsassay.....	28
3.6.	Langzeitproliferationsassay.....	28
3.7.	Durchflusszytometrie	29
3.7.1.	Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie	29
3.8.	Proliferationsassay mit Kombinationstherapie	30
3.9.	MTT-Assay (Zytotoxizitätstest).....	30
3.10.	Proliferationsassay mit CD34+ Zellen.....	31
3.10.1.	Monotherapie mit SAM486A.....	31
3.10.2.	Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A	32
3.11.	Statistische Methoden	32
4	Ergebnisse.....	33
4.1.	Vorversuch des Kurzzeitproliferationsassays	33
4.2.	Kurzzeitproliferationsassay.....	34
4.2.1.	Zusammenfassung des Kurzzeitproliferationsassays	40

4.3.	Langzeitproliferationsassay.....	41
4.3.1.	Murine Zelllinien.....	41
4.3.2.	Humane Zelllinien.....	44
4.3.3.	Zusammenfassung des Langzeitproliferationsassays	46
4.4.	Analyse der Apoptose-/ Nekroserate	46
4.5.	Proliferationsassay mit Kombinationstherapie	48
4.5.1.	Murine Zelllinien.....	48
4.5.2.	Humane Zelllinie.....	52
4.6.	MTT (Zytotoxizitätstest).....	55
4.7.	Primärmaterial.....	56
4.7.1.	Monotherapie mit SAM486A.....	56
4.7.1.1.	Gesunde CD34+ Spender	56
4.7.1.2.	Bcr-Abl-positive CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)	58
4.7.1.3.	Bcr-Abl-negativer CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose).....	59
4.8.1.	Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A	60
4.8.1.1.	Gesunde Spender von CD34+ Zellen	61
4.8.1.2.	Bcr-Abl-positive CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)	62
4.8.1.3.	Bcr-Abl-negativer CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose).....	64
5	Diskussion.....	66
6	Zusammenfassung	71
7	Abkürzungsverzeichnis	72
8	Literaturverzeichnis	74
9	Danksagung.....	80
10	Lebenslauf	81
11	Erklärung	82
12	Anhang.....	83
12.1.	Test auf Normalverteilung („David-Test“)	83
12.2.	T-Test für paarweise angeordnete Messwerte.....	85
12.3.	Lineare Regression.....	86
12.4.	„Student’sche Verteilung“	89
12.5.	Proliferationsassay mit Kombinationstherapie	90
12.6.	Proliferationsassay: SAM486-Monotherapie.....	96
12.7.	Proliferationsassay: Kombinationstherapie.....	97
12.8.	Analyse der apoptotischen –nekrotischen- Rate mittels der Durchflusszytometrie	99

1 Einleitung

Bösartige Tumoren stellen bei Erwachsenen der westlichen Welt neben kardiovaskulären Ereignissen die häufigste Todesursache dar. Mit steigendem Alter nimmt sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz für eine Tumorerkrankung zu [28]. Tumoren entstehen durch Entartung körpereigener Zellen. Die zugrunde liegende Störung beeinflusst häufig die Zellproliferation, wodurch die erkrankten Zellen im Vergleich zu den gesunden Zellen einen Wachstumsvorteil erlangen.

Bis zu ihrer Entstehung müssen Tumorzellen einen Entwicklungsprozess vollziehen, der als Kanzerogenese bezeichnet wird. Am Beginn der Tumorentstehung steht die **Initiation**. Wenn die Einwirkung einer Noxe zu einer irreversiblen Schädigung der DNA innerhalb einer Zelle führt und die zelleigenen Reparaturmechanismen den Defekt nicht beheben können, wird deren onkogene Potenz stimuliert. Diesem Prozess schließt sich eine **Latenzzeit** an, die bis zu zwanzig Jahren dauern kann. Sie stellt die Zeit zwischen Einwirkung der Noxe und der Manifestation des Tumors dar. Als **Promotion** wird der zellschädigende Prozess bezeichnet, der von einer initiierten onkogenen Potenz einer Zelle bis zu ihrer vollständigen Entartung überleitet. Die zur Promotion führenden Noxen (Promotoren) bedingen nach der Initiation häufig eine reversible Steigerung der Zellproliferation. Sie verkürzen die Latenzzeit bis zur Progressionsphase. Innerhalb der **Progression** kommt es zur irreversiblen Zellproliferation der geschädigten Zellklone. Der Primärtumor entwickelt sich somit aus einer einzelnen entarteten Zelle und entsteht durch monoklonales Wachstum. Im Laufe der Tumorprogression können weitere DNA-Veränderungen eintreten, wodurch in späteren Stadien ein polyklonales Wachstum möglich ist. Dieses kann die Metastasierungsfähigkeit des Tumors begünstigen, weil sich die Zellen optimal ihrer Umgebung anpassen können, indem sie zum Beispiel ihre Antigenität verlieren [4].

Unter den Risikofaktoren für eine Entartung finden sich [4, 5]:

- **Familiäre Disposition, Genetik**

Autosomal-dominant vererbte Veranlagung für das Mamma-, Kolon-, Endometrium- und Bronchialkarzinom sowie für das Nephroblastom und das maligne Melanom

Defekte (Punktmutation, chromosomale Translokation) in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen, Apoptose-regulierenden Genen, DNA-Reparaturmechanismen

- **Biologische Faktoren**
 - Onkogene Viren, wie zum Beispiel Papilloma- Herpes- und Oncornaviren
 - Tumorrisiko (zum Beispiel: malignes Lymphom) bei angeborenen, erworbenen oder medikamentös bedingten immunologischen Defekten
- **Chemische Faktoren**
 - Aromatische polyzyklische Kohlenwasserstoffe
 - Aromatische Amine
 - Nitrosamine
 - Anorganische Verbindungen wie Asbest
 - Aflatoxin
- **Strahlenexposition**
- **Weitere begünstigende Faktoren**
 - Lebensalter
 - Ernährung und Genussmittel

1.1. Leukämien

Bei Leukämien kommt es zu einer abnormen Proliferation eines leukozytären Zellstammes. Die Expansion eines malignen Zellklons führt zu einer generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark. Es kann zu einer Infiltration extramedullärer Organe sowie zu einer Ausschwemmung leukämischer Zellen in das Blut kommen.

Leukämien werden je nach beteiligtem Zelltyp in myeloische (Granulozyten) oder lymphatische (Lymphozyten) Formen und je nach Krankheitsverlauf in akute oder chronische Leukämien eingeteilt.

Die Inzidenz aller Leukämieformen bei Erwachsenen beträgt 2-8 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner, wobei sie sich gleichermaßen zu 50% auf akute sowie zu 50% auf chronische Verlaufsformen aufteilen [4].

1.1.1. Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale Störung der Hämatopoese und gehört in die Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen. Die CML repräsentiert ein wichtiges Beispiel für das Verständnis einer malignen Transformation. Sie ist die erste Tumorerkrankung, welche mit einer genetischen Abnormalität (reziproke Translokation) assoziiert ist und somit einer molekulargenetischen Therapie zugänglich ist [26].

Erstmals wurde dieses Krankheitsbild 1845 von Rudolf Virchow und John H. Bennett beschrieben. Virchow prägte zu dieser Zeit den Begriff des „Weißen Blutes“ aufgrund der sichtbaren Vermehrung der Leukozyten.

1960 konnten von P. Nowell und D. A. Hungerford neue Erkenntnisse bezüglich des Krankheitsbildes erschlossen werden. Sie beschrieben einen spezifischen chromosomalen Defekt in den leukämischen Zellen der Patienten, der nach dem Entdeckungsort als Philadelphia-Chromosom (Ph) bezeichnet wurde [21].

Im Jahre 1973 konnte das Zustandekommen des Philadelphia-Chromosoms von J. Rowley geklärt werden. Durch die Anwendung einer Bänderungstechnik wurde eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 nachgewiesen. Mitte der 80er Jahre konnte auf molekularer Basis gezeigt werden, dass das zelluläre Onkogen *abl* von Chromosom 9 in die Bruchpunktregion auf Chromosom 22 im Bereich des *bcr*-Gens transloziert (reziproke Translokation) wird. Durch die Zusammenlagerung einzelner Teile des *bcr*-Gens und des *abl*-Gens auf Chromosom 22 konnte schließlich 1986 das 210 kD schwere Bcr-Abl-Protein als Produkt des *BCR-ABL*-Gens nachgewiesen werden [9, 17, 18, 22].

Etwa 15% aller Leukämieformen sind chronische myeloische Leukämien. Die Inzidenz liegt bei einer Erkrankung auf 100.000 Einwohner pro Jahr mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50.-60. Lebensjahr. Männer sind 1,4-mal häufiger betroffen als Frauen.

Eine Häufung von Leukämien insbesondere der chronischen myeloischen Leukämien mit der reziproken Translokation konnte nach Atombombenabwürfen (Hiroshima, Nagasaki) durch die ionisierende Strahlung beobachtet werden, sowie nach langjähriger Exposition gegenüber aromatischen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Benzolverbindungen. Man geht davon aus, dass die malignen Vorläuferzellen oder leukämischen Stammzellen, die das *BCR-ABL*-Gen ausbilden, sich als Ergebnis von prädisponierenden genetischen und epigenetischen Ergebnissen entwickeln. Sie weisen Veränderungen bezüglich der Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen, der Proliferation, des Überlebens und im Prozess der Selbsterneuerung auf. In der Mehrzahl der Fälle bleibt die Ätiologie jedoch unbekannt [17, 18, 28]

1.1.2. Phasen der chronischen myeloischen Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie gliedert sich in die folgenden drei Phasen:

1. Chronische Phase

Die chronische Phase der CML bleibt häufig lange unbemerkt, da es sich um einen schleichenden Prozess in der Krankheitsentstehung handelt. Die Dauer dieser Phase kann drei bis sieben Jahre betragen. Die klinische Symptomatik ist davon abhängig, wie viele Zellen der granulozytären Reihe ausgereift sind [28, 32].

Folgende Kriterien sprechen für die chronische Phase [12]:

- Leukozytose (oft $> 30000/\mu\text{l}$)
- Anämie
- Thrombozytose
- Splenomegalie
- Hyperzelluläres Knochenmark mit Hyperplasie der Myelopoese
- Nachweis des Philadelphia-Chromosoms (*BCR-ABL*-Translokation)
- LDH-Erhöhung
- Allgemeinsymptome wie Fieber, Leistungsabfall, Gewichtsverlust und Nachtschweiß
- Ausschluss anderer myeloproliferativen Erkrankungen

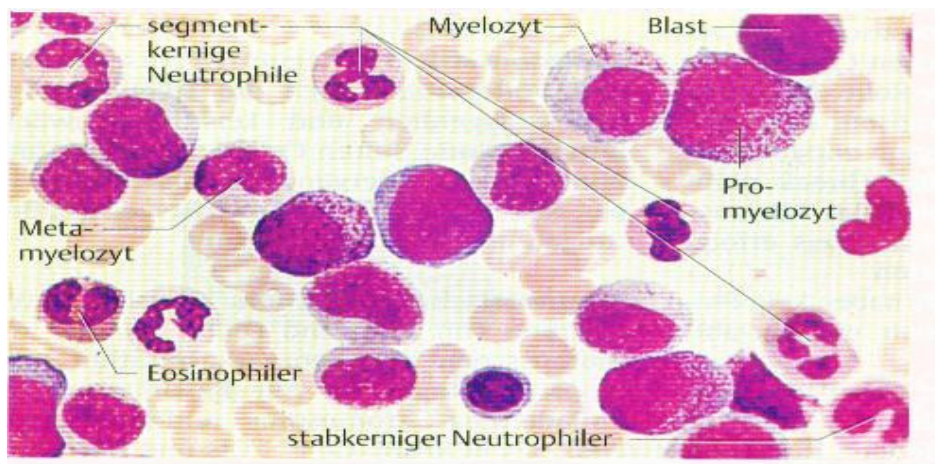


Abbildung 1: Blutausstrich einer CML, chronische Phase [14]

2. Akzelerationsphase

Die Akzelerationsphase stellt einen Übergang zwischen der chronischen Phase und dem Blastenschub dar. Sie dauert in der Regel 6-18 Monate. Typisch für die Akzelerationsphase ist die Progredienz der Erkrankung trotz Intensivierung der Therapie.

Kriterien der Akzelerationsphase sind bei der CML:

- Zunehmende Leukozytose
- Anämie
- Thrombozytopenie
- 10-30% Blasten im Blut und/oder Knochenmark
- Anstieg der Basophilen/ Eosinophilen $> 20\%$ im Blut
- Zunehmende Splenomegalie
- Fieber

3. Blastenphase

In 66% der Fälle kommt es zu einer myeloischen Blastenkrise mit Anstieg der Myeloblasten und Promyelozyten. 33% der Patienten entwickeln eine Blastenkrise mit einem lymphatischen Phänotyp (vor allem bei Interferon-Therapie). Der Verlauf dieser Phase gleicht einer akuten Leukämie.

Kriterien der Blastenphase:

- >30% Blasten im peripheren Blut
- >50% Blasten im Knochenmark
- Auftreten von extramedullären blastären Infiltrationen

1.1.3. Pathogenese der chronischen myeloischen Leukämie

Die klassische chronische myeloische Leukämie ist auf molekularer Ebene durch die reziproke Translokation (t(9; 22)(q34; q11) zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (Philadelphia-Chromosom) charakterisiert. Diese genetische Abnormalität lässt sich bei 95% der Patienten nachweisen. Der Nachweis erfolgt mittels konventioneller Zytologie und molekularbiologischen Methoden wie der FISH-Analyse oder PCR. 5% der CML-Patienten weisen keine *BCR-ABL*-Translokation auf. Die molekularen Mechanismen der Krankheitsentstehung der Bcr-Abl-negativen CML sind bisher noch unklar. Die Erkrankung wird zu der Gruppe der myeloproliferativen Syndrome gezählt [11].

Die Bruchpunkte auf dem Chromosom 9 liegen im Bereich des *ABL*-Protoonkogens und auf Chromosom 22 im Bereich des *BCR*-Gens. Die Zusammenlagerung einzelner Abschnitte beider Gene führt auf dem Chromosom 22 zur Bildung eines Fusionsgens mit intaktem *BCR*-Promotor. Dieses kodiert die Synthese eines Fusionsproteins mit erhöhter Tyrosinkinaseaktivität und proliferationsfördernder Wirkung [40].

Bei dem humanen *abl*-Protein, das dem *ABL*-Gen des Chromosoms 9 zuzuordnen ist, handelt es sich funktionell um eine Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die ubiquitär exprimiert, aber nur im Zellkern lokalisiert ist. Das 145-kD-Protein enthält drei regulatorische Domänen (*SH*₁, *SH*₂ und *SH*₃) sowie eine GTPase-Funktion. Die Domänen *SH*₂ und *SH*₃ regulieren Interaktionen zwischen dem *abl*-Protein und anderen Proteinen, wobei die *SH*₁-Domäne die eigentliche Tyrosinkinaseaktivität repräsentiert. Das Protein ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und wird selbst durch Interaktionen mit p53 und dem Retinoblastomprotein reguliert. Weiterhin nimmt das *abl*-Protein eine wichtige Rolle bei der Transduktion von Integrinsignalen ein, die für die Modulation von Zelladhäsionsprozessen bedeutungsvoll ist. Somit ist die zelluläre Adhäsion reduziert, wodurch die Anlagerung an das Knochenmarkstroma verhindert wird. Dadurch

werden keine Signale zur Reifungsinduktion empfangen und die Leukämiezellen erhalten einen Überlebensvorteil [10].

Das 160 kD-Protein des *BCR*-Gens von Chromosom 22 ist zytoplasmatisch lokalisiert und weist eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität auf, durch die eine Autophosphorylierung stattfindet. Weiterhin kann BCR an verschiedenen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Durch eine Phosphorylierung an Position 177 kann das GRB₂-Protein gebunden werden, welches ein Adapterprotein für die Aktivierung des ras-Signaltransduktionsweges ist.

Die Bruchpunkte im *BCR*-Gen sind auf drei „breakpoint-cluster regions“ begrenzt, wodurch Fusionsproteine unterschiedlicher Größe entstehen können. In einem Drittel der akuten myeloischen Leukämien und bei fast allen chronischen myeloischen Leukämien entsteht ein Fusionsprotein mit einem Gewicht von 210 kD. Die weiteren möglichen Fusionsproteine weisen ein Gewicht von 190 kD oder 230 kD auf. Die Art des Bcr-Abl-Fusionsproteins charakterisiert den Phänotyp der CML. So ist die CML mit einem 190-kD-Protein durch eine Monozytose und fehlende Basophilie gekennzeichnet. Dieser Krankheitsverlauf hat eine schlechte Prognose. Die CML mit einem 230 kD-Fusionsprotein weist eine Thrombozytose und ausgereifte Zellstufen auf [10, 40].

Bcr-Abl moduliert folgende intrazelluläre Signaltransduktionswege [10, 17]:

Bindung von Adapterproteinen wie GRB₂ und p62^{DOK}, GRB₂ führt über das SOS-Protein zur Aktivierung der ras-Signaltransduktionskaskade

Aktivierung der ras-Signaltransduktionskaskade durch direkte Phosphorylierung der Proteine SHC und CRKL

Phosphoryliertes SHC und CRKL sowie das über GRB₂ gebundene SOS-Protein kann die Phosphatidylinositol-3-Kaskade aktivieren

Überexpression des onkogenen Transkriptionsfaktor c-myc, der bei der malignen Transformation sowie der Apoptosekontrolle beteiligt ist

Beeinflussung von Zelladhäsionsmolekülen wie Paxillin und Talin, wodurch es zur vermehrten Zellausschwemmung aus dem Knochenmark kommt

Phosphorylierung der STAT-Proteine (STAT1, STAT5), die über eine Signaltransduktionskaskade zu einer Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL führt

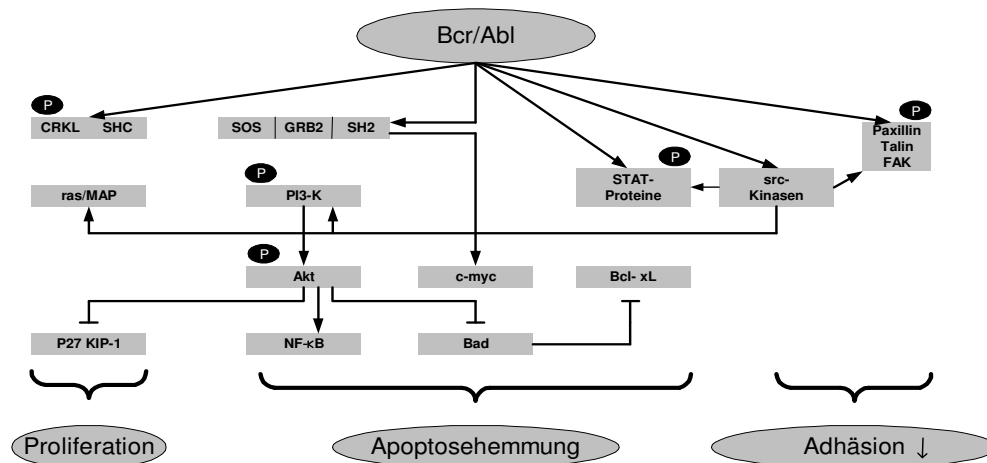


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bcr-Abl-modulierten Signaltransduktion (nach[12])

1.1.4. Therapie

Gegenwärtig bietet die allogene Stammzelltransplantation (SZT) weiterhin die einzige Möglichkeit eines kurativen Therapieansatzes. Durch die Einführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib ist die Indikation zur SZT relativiert worden. Gesamtziel der Therapie ist das Erreichen einer hämatologischen, zytogenetischen sowie idealerweise einer molekularen Remission. Klinisch finden folgende Wirkstoffe Anwendung [24, 41]:

- **Hydroxyharnstoff**

Hydroxyharnstoff ist ein S-phasenspezifischer Inhibitor der Ribonukleotidreduktase. Die Metabolisierung erfolgt zu 50% hepatisch, die Elimination zu 50% über die Niere. Initial wird mit 40 mg/kg Körpergewicht (KG) begonnen bis ein Leukozytenwert von 5000/ μ l erreicht wird. Als Erhaltungsdosis werden 20 mg/kg KG verabreicht. Als Nebenwirkungen werden Mukositis, unspezifische gastrointestinale Symptome sowie Hauttoxizität beobachtet. Die mittlere Überlebenszeit kann auf 48-56 Monate erhöht werden [12].

- **Interferon- α**

Interferon- α ist ein Glykoprotein, das die Induktion von Makrophagen, Zytokinen und Natürlichen Killerzellen bewirkt. Weiterhin führt es zu einer Genaktivierung und beeinflusst Stoffwechselfvorgänge, so dass antiproliferative Mechanismen, die das Wachstum der klonalen Hämatopoese hemmen, beobachtet werden können. Außerdem übt es indirekt eine Wirkung aus, die die Wachstumsregulation durch die Stromazellen beeinflusst. Über diese Mechanismen führt es bei 70-80% der Patienten zu einer stabilen hämatologischen Remission, in 5-10% der Fälle kann eine komplette zytogenetische Remission erreicht

werden. Die Initialdosis beträgt 3 Mio. IE pro Tag subkutan. In Kombination mit Hydroxyharnstoff kann die Effizienz sowie die Verträglichkeit verbessert werden. Als Nebenwirkungsspektrum treten grippeartige Symptome wie Fieber, Gliederschmerzen und Appetitlosigkeit sowie Knochenmarksdepression und Neuropathien auf. Die Nebenwirkungen können durch den Einsatz von pegyliertem Interferon- α minimiert werden [12].

- **Tyrosinkinaseinhibitor der ersten Generation: Imatinib (STI 571)**

Seit der Markteinführung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Abb. 3) im Jahre 2001 bildet diese Substanz die Primärtherapie in der chronischen Phase der CML. Imatinib (STI571) wurde von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelt.

Imatinib hemmt spezifisch eine Gruppe von Tyrosinkinasen. Dabei bindet es reversibel an die Bindungsstelle für ATP, wodurch die Autophosphorylierung der Kinasen sowie die Phosphorylierung der verschiedenen Proteine ausbleiben. Somit inhibiert es gezielt die Signaltransduktionswege des Bcr-Abl-Proteins durch Phosphorylierung der Aminosäure Tyrosin an Position 393. Dadurch wird das aktive Zentrum der Kinase blockiert und die katalytische Tasche erhält keinen Zugang zu Substraten. Die unveränderte Abl-Tyrosinkinase wird ebenfalls durch Imatinib gehemmt. Dies macht sich dadurch bemerkbar, dass die Hämatopoese der gesunden Stammzellen unter der Therapie erst zeitlich verzögert reexpandieren kann [2]. Imatinib hemmt neben der Abl- und Bcr-Abl-Tyrosinkinase noch weitere Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel c-Kit und den PDGF-Rezeptor. C-Kit ist in GIST-Tumoren überexprimiert, weshalb Imatinib auch bei dieser Tumorart zur Therapie zugelassen wurde.

Imatinib führt in der chronischen Phase der Erkrankung bei einem hohen Prozentsatz der Erkrankten zu einer hämatologischen und zytogenetischen Remission [40]. Weiterhin konnte ein Rückgang der im Verlauf der Erkrankung auftretenden Knochenmarkfibrose unter Imatinib detektiert werden. Imatinib kann ebenfalls bei Therapieversagen mit Interferon- α eingesetzt werden und führt in 60% dieser Fälle zur hämatologischen und zytogenetischen Remission.

Es wird mit einer Initialdosis von 400 mg pro Tag begonnen. Die Initialdosis sollte möglichst nicht in den ersten vier Therapiewochen reduziert werden.

Als Nebenwirkungen treten Diarrhöen, Übelkeit, Flüssigkeitsretention (Pleuraergüsse) sowie eine Dermatitis auf.

Die Therapie sollte kontinuierlich auch bei dem Erreichen einer kompletten zytogenetischen Remission fortgeführt werden. Es wird davon ausgegangen, dass ein kleiner Pool von leukämischen Stammzellen als Reservoir vorhanden bleibt, der sich bei Beendigung der Therapie durch den Verlust des Selektionsdrucks vermehren kann [17, 18].

Aufgrund von Resistenzbildungen gegen Imatinib ist es zur Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation gekommen. Insgesamt sind über siebenzig Punktmutationen in der Kinasedomäne von Bcr-Abl bekannt, die zur Imatinibresistenz führen. 60-70% der Mutanten werden durch den Austausch von folgenden Aminosäuren an der angegebenen Position der Aminosäuresequenz erzeugt: Gly 250, Tyr 253, Glu 255, Thr 315, Met 351, Phe 359. Patienten, die initial nicht auf eine Imatinibtherapie ansprechen, tragen zu 10-20% von diesen Mutationen den Typ T315I [40, 50]. Dort wurde die Aminosäure Threonin durch die Mutation gegen Isoleucin ausgetauscht. Isoleucin ist deutlich größer als Threonin und interferiert mit Imatinib an der ATP-Bindungstasche [17].

Die Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation sind in der Lage, diese Mutationen bis auf T315I zu inhibieren. Inzwischen treten gehäuft weitere Mutationen nach der Therapie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation auf [7].

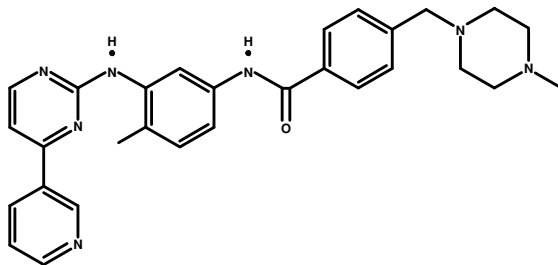


Abbildung 3: Strukturformel Imatinib nach [11]

- **Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation:**

- **Nilotinib (AMN 107):**

Nilotinib ist wie Imatinib ein Tyrosinkinaseinhibitor, der hinsichtlich der Inhibition des Bcr-Abl-Wildtyps zwanzig Mal potenter ist als Imatinib. Nilotinib bindet ATP-abhängig an den inaktiven Konformationszustand der ABL-Kinase. Es weist eine Wirkung bei imatinibresistenten Bcr-Abl-Mutationen auf. Der Einfluss auf die T315I-Mutation bleibt jedoch wie unter Imatinib und anderen Inhibitoren der zweiten Generation erfolglos. Nilotinib erzielt in allen Krankheitsphasen ein signifikantes Ansprechen [27, 30, 50].

Die Therapie erfolgt mit zweimal 400 mg täglich. Es kann bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsbild in einem hohen Prozentsatz eine hämatologische sowie zytogenetische Remission erreicht werden. Als Nebenwirkungen treten Hautausschlag, Juckreiz, Obstipation, Myelosuppression sowie eine transiente Erhöhung des indirekten Bilirubin-spiegels auf [40].

- **Dasatinib (BMS-354825):**

Dasatinib ist ein Multitarget-Tyrosinkinaseinhibitor, der nicht nur das Fusionsprotein Bcr-Abl inhibiert, sondern auch c-kit, Src-Kinasen, PDGF-Rezeptor und die Ephrin-

Rezeptor-Kinasen. Es wird bei Imatinibresistenz eingesetzt und ist 325-fach potenter als Imatinib hinsichtlich des Bcr-Abl-Wildtyps. In einer Phase II-Studie kam es in 35% der Fälle zu einem hämatologischen Ansprechen bei Patienten in der Blastenphase. Das mediane Überleben unter der Therapie beträgt 11,8 Monate [8]. In einer Phase II-Studie für Patienten der chronischen Phase kommt es unter der Therapie zu einer fünfzehn monatigen Progressionsfreiheit bei 90% der Patienten [27].

Therapeutisch werden 140 mg pro Tag verabreicht. Als Nebenwirkungen treten Myelosuppression mit einem Überwiegen der Thrombozytopenie, Übelkeit, Diarrhöen und periphere Ödeme, insbesondere Pleuraergüsse auf [20].

- **Bosutinib (SKI-606):**

Bosutinib wurde ursprünglich als Inhibitor der Src-Familie-Kinasen bei soliden Tumoren entwickelt. Es inhibiert die Autophosphorylierung von Abl-Kinasen und Src-Kinasen, welche ebenfalls in Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie überexprimiert werden. Durch die Verhinderung der Autophosphorylierung wird die Zellproliferation inhibiert. Allerdings wird nicht c-Kit und der PDGF-Rezeptor, woraus sich ein geringeres Spektrum an Nebenwirkungen ergibt.

Bosutinib ist es möglich alle imatinibresistenten Zellen, bis auf die Mutation T315I, in ihrem Wachstum zu hemmen. Somit kommt es bei dem Vorliegen einer Resistenz gegen Imatinib, Dasatinib und Nilotinib zum Einsatz.

In Phase I- und Phase II- Studien konnte eine effiziente Wirkung bei gut verträglicher Dosierung von 400-600 mg bei Bcr-Abl-positiven CML und Bcr-Abl-positiven ALL-Patienten festgestellt werden. An Nebenwirkungen traten milde Diarrhoen, Übelkeit und Erbrechen auf. Es werden keine Pleuraergüsse erzeugt, da der PDGF-Rezeptor nicht inhibiert wird [40].

- **Kombinationstherapie: Imatinib plus Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation**

Kombinationstherapien werden bei dem Versagen der Erstlinien Therapie mit Imatinib eingesetzt. Zytogenetische Untersuchungen zeigen bei einem Rezidiv häufig eine andere Punktmutation. Es wird davon ausgegangen, dass diese zweite Mutation von Beginn der Erkrankung neben der ersten Mutation vorlag. Durch die Erstlinientherapie kann der zweite Mutationstyp durch den medikamentös vermittelten Selektionsdruck heranwachsen. Um beide Mutationstypen eliminieren zu können, ist es sinnvoll eine Kombinationstherapie mit Imatinib und einem Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation durchzuführen. Dies ist durch die verschiedenen Bindungsarten der Zweitgenerationstyrosinkinaseinhibitoren möglich. Dasatinib beispielsweise bindet sowohl an aktive als auch an inaktive Bcr-Abl-Konformationen, während Imatinib nur an inaktive Konformationen bindet. Diese

Kombination aus Imatinib und Dasatinib führt zu einer signifikanten Reduktion von resistenten Mutationen. Die Mutation T315I bildet auch hier eine Ausnahme und spricht nicht auf die Therapie an [50].

- **Kinaseinhibitoren mit Aktivität gegen T315I (Inhibitoren der dritten Generation)**

An potenten T315I-Inhibitoren liegen Aurorakinaseinhibitoren, wie beispielsweise VX-680 PHA-680626 und PHA-739358 sowie der Inhibitor ONO12380 der Lyn-Kinase, vor. ONO12380 blockiert nicht die ATP-Bindungsstelle, sondern Bindungsstellen von anderen Substraten von Bcr-Abl. So konkurriert es mit CRKL und nicht mit ATP.

Aurorakinasen sind Serin/Threonin-Kinasen und spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung. Sie regulieren die korrekte Ausbildung der Mitosespindeln während der Zellteilung. PHA-680626 und PHA-739358 hemmen neben den drei Aurorakinasen auch die Bcr-Abl-Kinase. Beide Substanzen üben eine antiproliferative Wirkung sowohl auf humane als auch murine Bcr-Abl-positive und -negative Zelllinien aus, inklusive der imatinibresistenten Mutation T315I. Beide Inhibitoren verhindern die Phosphorylierung des Histons H3, was ein Marker für die Aktivität der Aurorakinasen A und B sowie die von CRKL (Zielprotein der Bcr-Abl-Kinase) ist. In einer Phase I-Studie, in der elf Patienten mit der Mutation T315I eingeschlossen wurden, konnten gute Ergebnisse mittels Aurorakinaseinhibitoren erzielt werden [19, 40].

1.2. Imatinibresistenz

1.2.1. Definition der Resistenz in Bezug auf Imatinib

Es wird die primäre von der sekundären Resistenz unterschieden:

Von **primärer** (intrinsische) **Resistenz** wird gesprochen, wenn die Imatinibtherapie von Beginn an kein Ansprechen aufweist.

Tritt ein Rezidiv nach initialem Ansprechen auf Imatinib ein, handelt es sich definitionsgemäß um eine **sekundäre** (erworbene) **Imatinibresistenz** [17].

Die Resistenzen unter der Imatinibtherapie werden weiterhin in folgende Untergruppen gegliedert [12]:

- **Hämatologische Resistenz**

Eine hämatologische Resistenz liegt in der chronischen Phase vor, wenn es nicht zu einer Normalisierung der peripheren Blutwerte kommt, eine Linksverschiebung des Blutbildes persistiert und eine Basophilie oder Splenomegalie weiter fortbesteht.

In der akzelerierten Phase und der Blastenkrise wird von einem hämatologischen Rezidiv gesprochen, wenn keine zweite chronische Phase oder ein Rezidiv nach initialem Ansprechen eintritt.

- **Zytogenetische Resistenz**

Eine zytogenetische Resistenz liegt vor, wenn es zu einem Verlust der guten zytogenetischen Remission, die bei $\leq 34\%$ Philadelphia-positiven Metaphasen vorliegt, kommt.

Weiterhin kann es bei dem Verlust der kompletten zytogenetischen Remission, die bei 0% Philadelphia-positiven Metaphasen vorliegt, zu einer zytogenetischen Resistenz kommen.

- **Molekulare Resistenz**

Eine gute molekulare Remission ist quantitativ als Reduktion der Bcr-Abl-Transkripte um mehr als drei Größenordnungen oder als Quotient $\text{Bcr-Abl/Abl} < 0,12\%$ definiert. Eine Resistenz liegt vor, wenn dieses nicht erreicht wird.

Eine komplette molekulare Remission liegt vor, wenn mittels real-time PCR keine nachweisbaren Bcr-Abl-Transkripte vorhanden sind. Eine molekulare Resistenz liegt dann vor, wenn es zu einem Anstieg der vorher nicht nachweisbaren Bcr-Abl-Transkripte kommt. Hier liegt quantitativ eine molekulare Resistenz beim Anstieg des Bcr-Abl/Abl-Quotienten um mehr als eine Größenordnung vor.

1.2.2. Gründe der Resistenzentwicklung

Es bestehen folgende Gründe der Resistenzentwicklung [17, 32, 40]:

- Mutation der Bcr-Abl-Tyrosinkinasedomäne, was zu einer Konformationsänderung der Kinase führt. Dadurch kommt es zu einem Verlust der Bindungsaffinität von Imatinib.
- Genomische Amplifikation von *BCR-ABL*, vor allem in der Blastenkrise
- Überexpression des Bcr-Abl-Proteins
- Gesteigerte Expression des P-Glykoproteins mit Induktion einer Multi-Drug-Resistenz (MDR)
- Zunahme der Autophosphorylierung von Bcr-Abl

1.2.3. Abhängigkeit der Resistenzentwicklung vom Stadium der CML

In der IRIS-Studie („International Randomized Study of Interferon and STI571“) wurde die Effektivität der Imatinibwirkung bei unbehandelten Patienten zu Beginn der chronischen Phase untersucht [9, 32]. Es konnte gezeigt werden, dass von 553 Patienten in dem frühen Stadium der Erkrankung lediglich fünf Prozent der Patienten gegen Imatinib resistent waren und kein An-

sprechen zeigten. Unter der Therapie bei Erstdiagnose erreichten unter Imatinib 87,1% eine komplette zytogenetische Remission, unter Interferon und Ara-C waren es 34,7% [32]. Im Verlauf der Therapie entwickelten weitere fünf Prozent eine Imatinibresistenz. Das Risiko einer primären Resistenz oder eines Rezidivs ist somit bei Patienten in einem frühen Krankheitsstadium gering [18]. In weiteren Studien [21] konnte gezeigt werden, dass die Resistenzrate gegen Imatinib in fortgeschrittenen Stadien der CML deutlich ansteigt.

1.3. Wirkung der Hypusinierungsinhibitoren

1.3.1. Biosynthese der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin

Die Synthese der Polyamine beginnt bei der Aminosäure L-Arginin. Sie wird durch das Enzym Arginase entweder im Harnstoffzyklus der Leber in Ornithin umgewandelt und in das Plasma freigesetzt oder auch intrazellulär in Ornithin verstoffwechselt [36, 47].

Der erste Schritt der Polyaminbiosynthese besteht in der Decarboxylierung des gebildeten Ornithins durch das Enzym Ornithindecarboxylase, wodurch es zu dem zweiwertigen Polyamin Putrescin wird. Putrescin wird durch die Putrescin-Aminopropyl-Transferase (PAPT) zu dem trivalenten Polyamin Spermidin umgewandelt. Als letzter Schritt der Polyaminbiosynthese wird eine weitere Aminopropylgruppe durch die Spermidin-Aminopropyl-Transferase (SAPT) auf Spermidin übertragen, wodurch das tetravalente Polyamin Spermin entsteht. Die jeweilige übertragene Aminopropylgruppe stammt von S-Adenosyl-Methionin (SAM) durch die katalytische Reaktion der S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase (SAMdc) [45].

Die Regulierung der Polyaminbiosynthese erfolgt durch die Schlüsselenzyme Ornithin-Decarboxylase und S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase [37, 52].

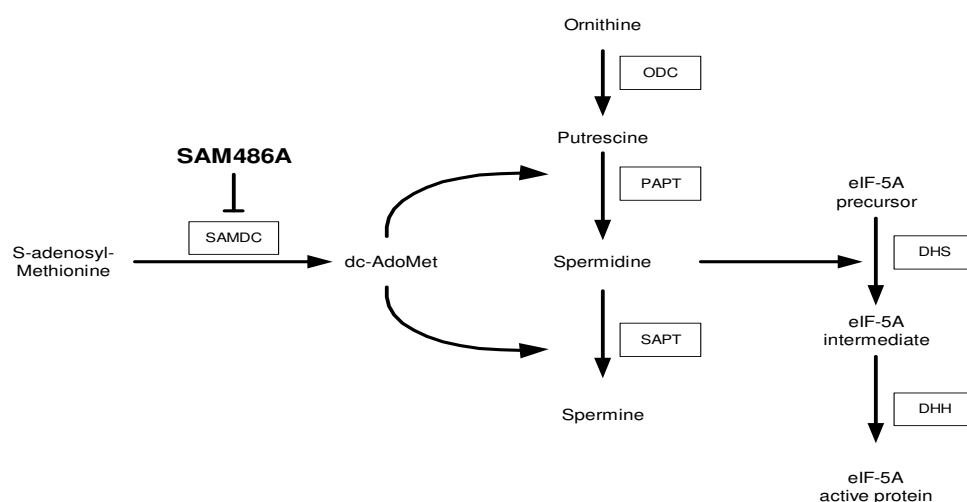


Abbildung 4: Polyaminbiosynthese nach [45]

1.3.2. Die Rolle der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin sind wichtig für das Zellwachstum und die Differenzierung. Wird die Aktivität des Schlüsselenzyms Ornithindecaboxylase gehemmt, kommt es zu einem Arrest der DNA-Replikation [47]. So korreliert der intrazelluläre Spermidinlevel mit der Zellproliferation, was therapeutisch genutzt werden kann. In einer Studie konnte belegt werden, dass die Polyamine mit verschiedenen Makromolekülen interagieren und somit die Zellfunktionen beeinflussen. Weiterhin induzieren Wachstumsstimuli die Polyaminbiosynthese, welche eine Voraussetzung für das Zellwachstum ist [36, 52].

In einer Phase I-Studie konnte in Leukozyten des peripheren Blutes von Patienten mit soliden Tumoren eine veränderte Polyaminhomöostase im Vergleich zu gesunden Zellen aufgezeigt werden. Es konnten in den erkrankten Zellen erhöhte Polyaminspiegel, sowie eine gesteigerte Aktivität der Schlüsselenzyme SAMdc und ODC gemessen werden [36]. Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass eine Reduktion von Spermidin indirekt zu einer verminderten eIF-5A-Aktivität führt, da der Deoxyhypusinsynthese das Substrat (Aminobutyl-Gruppe des Spermidins) entzogen wird. Durch den Mangel an eIF-5A kommt es zu einer verminderten Proteinbiosynthese, die eine Zytostase der Zellen induziert. Hierbei werden zwei Phasen unterschieden. In der akuten Phase kann Spermin die Zellfunktionen aufrecht erhalten ohne in Spermidin, dem eigentlichen Precursor für Hypusin, umgewandelt zu werden. Die späte Phase ist hypusinabhängig. Es muss Spermidin gebildet werden, um für den Hypusinierungsvorgang zur Verfügung zu stehen. Aufgrund der Erkenntnis, dass die akute Phase hypusinunabhängig ist, scheint eIF-5A eine lange Halbwertszeit zu besitzen, um die zellulären Funktionen lange aufrechtzuerhalten [23, 35, 47]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen von entzündlichen Prozessen wie der Sepsis und dem akuten Lungenversagen zu einem Anstieg des Polyaminpools kommt. Es wird vermutet, dass die Elevation der Polyamine für die Bereitstellung des eIF-5A induziert wird, welches eine Rolle bei der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren des Enzyms DHS einen antiinflammatorischen Effekt auslösen [25].

1.3.3. Hypusinierung von eIF-5A

Die Aminosäure Hypusin wurde 1971 entdeckt. Sie ist das Ergebnis einer posttranslationalen Modifikation des eukaryoten Initiationsfaktors 5A (eIF-5A) und an der Umwandlung eines inaktiven eIF-5A-Precursorproteins zu einer aktiven Hypusin-tragenden Form des eIF-5A beteiligt. Für diesen Prozess ist der Polyaminbiosynthese notwendig (Spermidin).

Hypusin wird in zwei enzymatischen Schritten gebildet:

- NAD⁺-abhängige Übertragung einer Aminobutylgruppe von dem Polyamin Spermidin auf die ε-Gruppe eines einzelnen spezifischen Lysins (Lys50) in dem eIF-5A
- Hydroxylierung des Lysins in dem eIF-5A

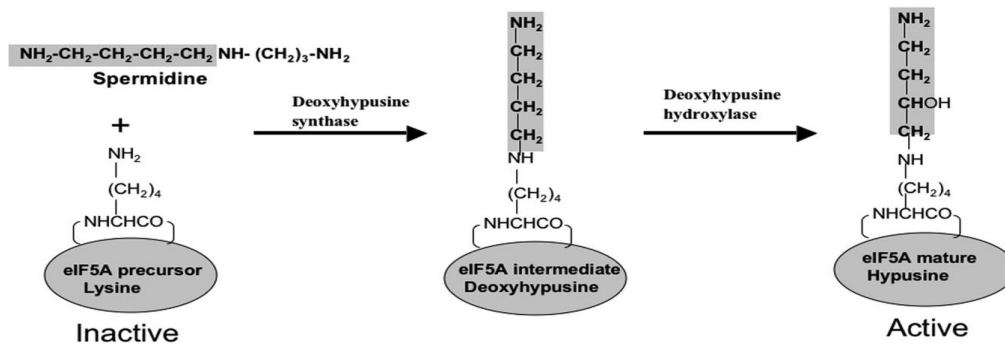


Abbildung 5: Hypusinierung des eIF-5A [6]

Diese beiden Reaktionen werden durch zwei Enzyme katalysiert. Der erste Schritt wird durch die Deoxyhypusinsynthase (DHS) begünstigt und der zweite Schritt durch die Deoxyhypusinhydroxylase (DHH). EIF-5A repräsentiert das einzige bisher bekannte Protein, das durch die posttranslationale Hypusinierung aktiviert wird [6, 36, 45].

EIF-5A ist an folgenden Funktionen beteiligt:

- Der Initiationsfaktor ist essentiell für die Proliferation aller Zellen, da er eine wesentliche Rolle in der Proteinbiosynthese (Translation) spielt. Er liegt vermehrt in sich schnell teilenden Zellen, wie Tumorzellen vor [23, 35].
- Ihm wird eine Bedeutung bei dem Export von mRNA aus dem Zellkern zugeschrieben.
- Er begünstigt die Neurogenese und ist an der Ausbildung von Synapsen im Hippocampus beteiligt. Dem eIF-5A wird eine Bedeutung bei der Entstehung des Langzeitgedächtnisses zugeschrieben. Im Alter nimmt die Konzentration von eIF-5A ab, was im Zusammenhang mit der Verschlechterung der Gedächtnisleistung stehen könnte [31].
- Der Initiationsfaktor kontrolliert die p53-vermittelte Apoptose und bietet einen Apoptose-schutz vor TNF- α [25].
- EIF-5A ist an der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten sowie an der Aktivierung der entzündlichen Reaktion gesunder Zellen beteiligt [25].
- EIF-5A ist an der Reifung von dendritischen Zellen beteiligt [47].

1.3.4. Der indirekte Hypusinierungsinhibitor SAM486A

Der indirekte Hypusinierungsinhibitor S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase-Inhibitor (SAM486A) wurde von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelt. SAM486A greift in den Stoffwechsel der Polyamine ein und führt zu einer Verminderung von Spermidin, welches an der Aktivierung des eukaryoten Initiationsfaktors 5A beteiligt ist (Abb. 4, 6). Durch die Reduktion des Spermidingehaltes wird die Hypusinierung des eIF-5A indirekt verhindert und ein antiproliferativer Effekt auf die Zellen ausgeübt, da die Proteinbiosynthese unterbunden wird. Direkte Hypusinierungsinhibitoren blockieren im Gegensatz zu SAM486A Enzyme, die unmittelbar an dem Vorgang der Hypusinierung beteiligt sind (DHH, DHS).

SAM486A ist eine Weiterentwicklung von älteren Hypusinierungsinhibitoren. Als Vorläufer ist 5'-[[Z]-4-Amino-2-butyl]-methylamino}-5'-deoxyadenosin (AbeAdo) als potenter, selektiver und irreversibler SAMdc-Inhibitor, bekannt. Diese Substanz erbrachte jedoch *in vivo* keinen Antitumoreffekt. Dies wurde hypothetisch damit erklärt, dass es zu einer Akkumulation von Putrescin in hohen Leveln kam, wodurch die Funktion der höheren Polyamine ersetzt werden könnte. Zu der ersten Generation von Hypusinierungsinhibitoren zählt weiterhin Methylglyoxal-bis-guanylhydrazon (MGBG). MGBG weist einen antitumor und antileukämischen Effekt auf, wirkt jedoch nicht sehr spezifisch auf SAMdc. In einem Vergleich konnte ein Selektivitätsindex von 1000 für SAM486A in Bezug auf die Inhibierung des Enzyms SAMdc ermittelt werden. Für MGBG lässt sich ein Wert unter 1 ermitteln. Unter der Therapie mit MGBG kam es zu schweren Nebenwirkungen, die sich durch Interaktionen mit mitochondrialen Funktionen erklären ließen [52].

SAM486A ist die freie Base von 4-(Aminoiminomethyl)-2,3-dihydro-1-H-inden-1-1-diaminomethylenhydrat. Es ist 200-fach aktiver als die Vorläufersubstanzen. Es zeigt keine Interaktionen mit den mitochondrialen Funktionen und zeigt ein geringes Nebenwirkungsspektrum im Vergleich zu den vorherigen Hypusinierungsinhibitoren. SAM486A führt bei verschiedenen Tumorzelllinien und metastasierten Tumoren zu einer Wachstumsinhibition. Die IC_{50} liegt selbst bei Zellen mit MDR im mikromolaren Bereich (0,1 μ M bis 5 μ M). Eine dosislimitierende Toxizität in Form der Myelosuppression tritt bei einer Gabe von 102,4 mg/m²/Tag auf. Dies entspricht einer Plasmakonzentration von 11 μ M und überschreitet deutlich die IC_{50} für die Wachstumsinhibition der Tumorzellen *in vitro* [46, 52].

Weiterhin konnten sowohl additive als auch synergistische Effekte in der Kombinationstherapie mit 5-Fluorouracil, Cisplatin und Eflornithin (ODC-Inhibitor) aufgezeigt werden. Hierbei wird SAM486A in einer Dosis bis 400 mg/m² Körperoberfläche pro Zyklus gut toleriert. Die Wiederholung eines Zyklus erfolgt alle vier Wochen. Dabei tritt keine kumulative Toxizität auf, die zum Abbruch des Zyklus führt. Ab einer Dosis von 550 mg/m² pro Zyklus tritt eine unkomplizierte reversible Granulozytopenie auf. Bezüglich der Therapie des fortgeschrittenen kolo-

rektalen Karzinoms mit 5-Fluorouracil und SAM486A wird in 30% der Fälle eine partielle Remission und in 35% eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht [49, 52].

Als Nebenwirkungsprofil tritt in milder Form Übelkeit, Erbrechen und Fatigue auf. Bei der Verabreichung von kurzen hochdosierten Gaben kommt es zur Neutropenie, sowie zu akuten respiratorischen und kardialen Symptomen wie Hyperämie, Tachykardie, Zyanose und Dyspnoe. Bei Langzeitgaben kam es zu morphologischen Veränderungen an der Leber und dem Herzen [42, 46, 52].

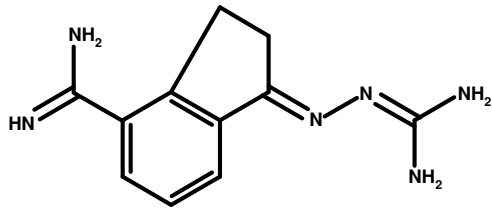


Abbildung 6: Strukturformel SAM486A (nach [45])

2 Fragestellung

Die Zulassung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib brachte 2001 einen Durchbruch in der Therapie der Bcr-Abl-positiven chronischen myeloischen Leukämie. Es ergaben sich jedoch schnell Resistenzen gegen den Tyrosinkinaseinhibitor, weshalb nach neuen therapeutischen Zielstrukturen (Targets) geforscht werden muss.

Neben der Entwicklung von Zweitgenerationen der Tyrosinkinaseinhibitoren wurden neue direkte und indirekte Bcr-Abl-abhängige Targets identifiziert, die zu einer Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien beitragen könnten.

In einer Studie wurden Bcr-Abl-positive K562-Zellen mit und ohne Imatinib kultiviert und Unterschiede in der Proteinexpression mittels der 2-dimensionalen-Gelelektrophorese analysiert, um neue zelluläre Bcr-Abl-downstream Targets zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass unter 19 verschiedenen Proteinen der eukaryote Initiationsfaktor 5A in den mit Imatinib behandelten Zellen vermindert exprimiert wird [1].

Der Initiationsfaktor spielt eine wesentliche Rolle in der Proteinbiosynthese, die für die Zellproliferation essentiell und in Leukämiezellen erhöht ist. EIF-5A stellt das bisher einzige bekannte Protein dar, das durch eine posttranslationale Hypusinierung aktiviert wird und durch das Eingreifen in den Polyaminstoffwechsel mittels Hypusinierungsinhibitoren gehemmt werden kann [23, 35, 47, 52].

Hypusinierungsinhibitoren wirken auf Zellen antiproliferativ und bieten somit einen wirkungsvollen Angriffspunkt in der Therapie von bösartigen Erkrankungen. Bezüglich der chronischen myeloischen Leukämie konnte ein synergistischer Effekt zwischen Imatinib und dem Hypusinierungsinhibitor Ciclopirox in der Kombinationstherapie der Bcr-Abl-positiven K562-Zellen gezeigt werden. Somit wurde postuliert, dass die Bcr-Abl-Aktivität eine Voraussetzung für den synergistischen Effekt zwischen Imatinib und Hypusinierungsinhibitoren zu sein scheint [1]. Um weitere therapeutische Möglichkeiten in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie zu schaffen, wird in dieser Arbeit die Wirkung des indirekten Hypusinierungsinhibitors SAM486A (S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylaseinhibitor) auf Bcr-Abl-positive sowie Bcr-Abl-negative Leukämiezellen in vitro untersucht. Es wird anhand von humanen (K562, HL60) und murinen Leukämiezelllinien (Ba/F3+IL3) mit unterschiedlichen Mutationen (Ba/F3-p210, Ba/F3-p210-E255K, Ba/F3-p210-T315I) sowie anhand von Primärmaterial (CD34+ Zellen) in verschiedenartig gestalteten Versuchen getestet, ob SAM486A eine Bcr-Abl-abhängige Wirkung zeigt und ob es in Kombination mit Imatinib einen synergistischen antiproliferativen Effekt aufweist. Im Hinblick auf die Resistenzenentwicklungen gegen Imatinib und das nicht Ansprechen einiger Mutationen auf Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation, wird ein besonderes Augenmerk auf die Wirkung des Hypusinierungsinhibitors SAM486A bezüglich der resistenten Zelllinien Ba/F3-p210-E255K und Ba/F3-p210-T315I gelegt.

3 Methoden und Materialien

3.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden murine und humane Bcr-Abl-positive sowie Bcr-Abl-negative Leukämiezellen verwendet.

Morphologisch handelt es sich bei den murinen Zellen um einzelne runde Suspensionszellen. In ihrer Wachstumsphase bilden sie Ausziehungen. Unter der Behandlung mit Imatinib werden diese Zellen größer, runder und bilden keine Ausziehungen mehr, woran der inhibitorische Effekt der Substanz morphologisch in Erscheinung tritt.

Zu den Bcr-Abl-positiven murinen Zellen gehören die mittels retrovirale Transduktion hergestellten Ba/F3-p210, Ba/F3-p210-E255K und Ba/F3-p210-T315I, die von N. P. Shah und C. L. Sawyers (University of California- Los Angeles) bereitgestellt wurden. Trotz der Ausbildung des Philadelphia-Chromosoms reagiert nur Ba/F3-p210 sensitiv auf Imatinib. Die Mutante Ba/F3-p210-E255K ist partiell imatinibsensitiv, wobei die Zelllinie Ba/F3-p210-T315I durch ihre Mutation an der Position 315 der Tyrosinkinase kein Ansprechen auf Imatinib zeigt. Als Bcr-Abl-negative murine Zelllinie dient Ba/F3+IL-3. Diese Zellen sind Interleukin-3-abhängige pro-B-Zellen, die aus dem peripheren Blut der BALB/c-Maus gewonnen wurden. Durch das Fehlen des Philadelphia-Chromosoms sprechen diese Zellen nicht auf Imatinib an.

Als humane Bcr-Abl-positive Zelllinie wurden die Zellen K562 aus der Blastenkrise einer CML in den Versuchen eingesetzt. Es handelt sich morphologisch um einzelne große, runde Suspensionszellen. Sie tragen das Philadelphia-Chromosom mit dem Fusionsgen *BCR-ABL* b3-a2. Die Zellen reagieren sensitiv in Form einer Proliferationshemmung auf eine Imatinibtherapie.

Die humanen runden Suspensionszellen HL60 dienen als Bcr-Abl-negative Vergleichszellen. Sie wurden aus dem peripheren Blut eines Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML FAB M2) gewonnen. Sie tragen kein Philadelphia-Chromosom und sprechen somit nicht auf Imatinib an.

Die Zelllinien Ba/F3+IL-3, K562 und HL60 wurden von DSMZ (Bielefeld, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Das Kulturmedium bestand sowohl für die murinen als auch für die humanen Zellen aus 90% RPMI 1640 und 10% FBS (fötales Rinderserum). Zusätzlich wurden jeweils nicht-essentielle Aminosäuren (2 mM) und Natriumpyruvat (1 mM) zugegeben. Zur Prophylaxe von bakteriellen Verunreinigungen dienten Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 mg/ml). Die Zellen erhielten dreimal wöchentlich frisches Medium. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Zum Einfrieren von Suspensionszellen wurde ein Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt. Die Kryokonservierung unterhalb von -120°C unterbricht biochemische Vorgänge und somit den Stoffwechsel der Zellen. Als Gefrierschutzmittel diente Dimethylsulfoxid, indem es die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die partielle Dehydratation des Zytoplasmas verhindert. Es bindet und ersetzt das Zellwasser. Bei dem Auftauen der Zellen wurde auf den zytotoxischen Effekt der Substanz bei Temperaturen über 0°C geachtet.

Die CD34+ Zellen wurden in einem serumfreien Medium kultiviert. Die Zellen benötigten für das Wachstum und die Differenzierung verschiedene humane Wachstumsfaktoren. Es wurden zu dem Medium S-CSF (100 ng/ml), Flt-3 Ligand (100 ng/mL), TPO (50 ng/mL), IL-3 und IL-6 (jeweils 20 ng/ml) und G-CSF (20 ng/mL) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 .

3.2. Wachstumsfaktoren der Hämatopoese

Das zu sehende Schema gibt einen Überblick über die Entwicklung und Differenzierung der Blutzellen. Ausgangspunkt ist die pluripotente Stammzelle, deren Proliferation durch den Stammzellfaktor (SCF) angeregt wird und zur Bildung von Vorläuferzellen führt. Die Entwicklung der Blutzellen wird durch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren wie c-Myb, PU.1 und E2A gesteuert. Wenn die Richtung der Entwicklung zu den bestimmten Blutzellen festgelegt ist, regulieren Zytokine (Interleukine) und koloniestimulierende Faktoren die weitere Differenzierung (IL-2, 3, 5, 7, 15, G-CSF, M-CSF, TPO, EPO).

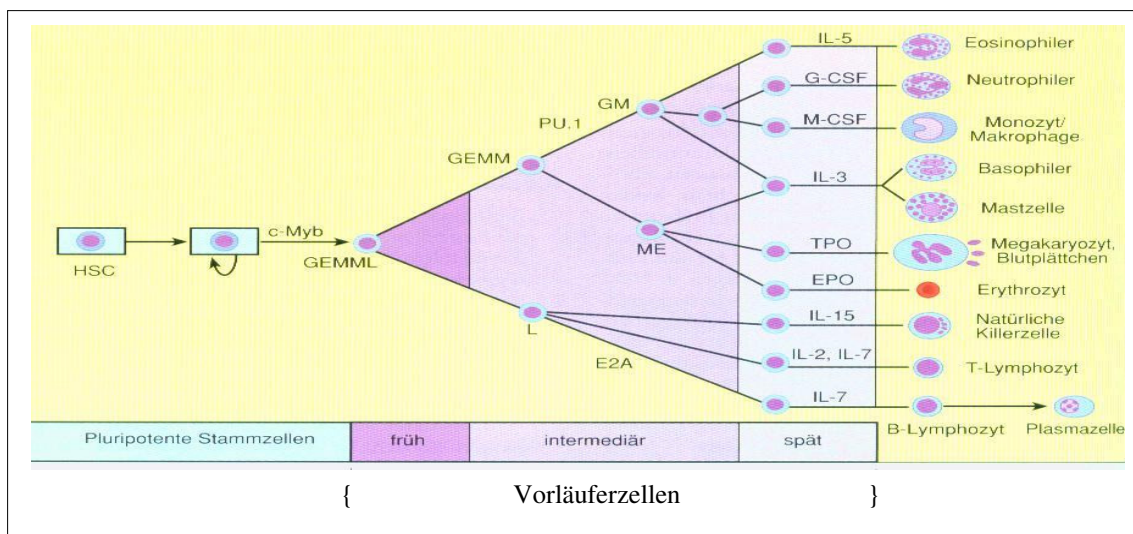


Abbildung 7: Ablaufschema der Hämatopoese [5]

Die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine wurden rekombinant hergestellt. Bei der Kultivierung der CD34+ Zellen wurden zur Stimulierung des Wachstums und der Differenzierung folgende humane Wachstumsfaktoren eingesetzt [5]:

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

Interleukin-3 ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Differenzierung und Proliferation der Vorläuferzellen der Megakaryozyten, Makrophagen, Eosinophilen, Basophilen und Mastzellen fördert. Es wird in vivo von T-Zellen, Mastzellen und den Eosinophilen gebildet. Es erhöht die Thrombopoese, Phagozytose und die antikörpervermittelte Immunabwehr. Weiterhin aktiviert es die Monozyten und besitzt somit eine immunmodulatorische Wirkung.

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

Interleukin-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das eine sehr wichtige Rolle bei der Abwehr durch die Regulierung der immunologischen und inflammatorischen Antwort spielt. Es wird von T-Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten gebildet und erfüllt verschiedene biologische Funktionen. Es stimuliert die B-Zell-Differenzierung und Antikörperproduktion. Weiterhin induziert es die Expression von Akute Phase Proteinen und reguliert den Knochenstoffwechsel.

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

Der Flt3-Ligand ist ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation der frühen hämatopoetischen Zellen reguliert. Der Flt3-Ligand bindet an Zellen, die den Flt3-Rezeptor exprimieren. Der Ligand selbst stimuliert nicht die Proliferation, sondern bewirkt einen synergistischen Effekt mit anderen CSFs und den Interleukinen hinsichtlich der Wachstumsinduktion und Differenzierung.

- **G-CSF** (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)

G-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Entwicklung der Vorläuferzellen zu den Neutrophilen und ausgereiften Zellen stimuliert. Es wird in den verschiedensten Zellen, wie den Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und im Stroma des Knochenmarks gebildet. Es wird klinisch nach Knochenmarktransplantationen und Chemotherapien zur schnelleren hämatopoetischen Regeneration eingesetzt.

- **SCF** (Stem Cell Factor)

SCF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der seine Aktivität über den Signalweg des c-Kit-Rezeptors ausübt. SCF und c-Kit sind essentiell für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen.

- **TPO** (Thrombopoetin)

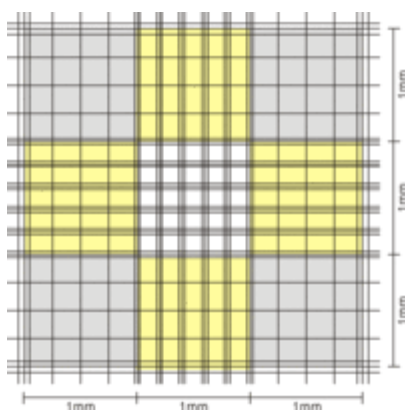
TPO ist ein zelllinienspezifischer Wachstumsfaktor, der in der Leber, den Nieren und im Skelettmuskel gebildet wird. Es stimuliert die Proliferation der Megakaryozyten und fördert die Zirkulation ansteigender Thrombozytenlevel.

3.3. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte, in deren Mitte zwei quadratische Felder definierter Größe zur Zellzahlbestimmung vorhanden sind. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Trypanblau nur die Zellmembran nekrotischer beziehungsweise apoptotischer Zellen durchdringen kann und diese Zellen somit blau färbt.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der zu zählenden Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau resuspendiert (1:5-Verdünnung). 10 µl dieses Zellsuspensions-Farbstoffgemisches wurden entnommen und in den definiert hohen Zwischenraum der Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Die zwei quadratischen Felder im Mittelfeld der Glasplatte wurden getrennt voneinander betrachtet. Jedes quadratische Feld besteht aus 3x3 Großquadraten (Abb. 8). Die Anzahl der Zellen wurde nur in den vier grauen Großquadraten bestimmt.



Aus der Gesamtzellzahl der vier Quadrate, dem Verdünnungsfaktor sowie einem Kammerfaktor wurde der Mittelwert bestimmt. Daraus folgte:

$$\text{Zellzahl/ml} = Z/4 \times 10^4$$

(Z: Zellzahl der vier Großquadrate, 10^4 : Kammerfaktor)

Abbildung 8: Neubauer Zählkammer, (nach Wikipedia)

3.4. Isolation von CD34+ Zellen

Zu der Isolation von CD34+ Zellen wird das „indirekte CD34 MicroBead Kit“ von der Firma Miltenyi Biotecs verwendet. Es beinhaltet drei wesentliche Bestandteile:

- FcR-Blockierungsreagenz: Humanes Immunglobulin
- Monoklonaler CD34-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 der Zellapherese verwendet. Die Zellen können mit einer Reinheit von 85-98% mittels dieser Methode aus dem vorliegenden Material gewonnen werden.

Die Isolation der hämatopoetischen Vorläuferzellen ist durch ihre Expression des Oberflächenmoleküls CD34 möglich. Mononukleäre Zellen werden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll^R gewonnen.

Für die MACS^R Separation werden die CD34+ Zellen indirekt isoliert. Dies geschieht mithilfe eines primär monoklonalen Antikörpers, der an ein Hapten gebunden ist und an die Zellen bindet. Weiterhin wird ein anti-Hapten-Antikörper, der an MACS MicroBead gekoppelt ist, verwendet. Somit bindet der anti-Hapten-Antikörper das Hapten, an das die CD34+ Zellen durch vorherige Bindung gekoppelt sind. Die so vorbehandelten Zellen werden anschließend zur Gewinnung in eine Separationssäule überführt. Somit werden die Zellen mittels einer klassischen Antigen (CD34+ Zellen)-Antikörperreaktion isoliert.

Für die routinemäßige Isolation der CD34+ Zellen wurde das Knochenmark in 50 ml Tubes mit 5 ml PBS und 2 ml EDTA oder 200 U/ml Heparin gegeben. Zum Lösen der Zellen wurde die Lösung im Überschuss mit RPMI 1640, das mit 0,02% Kollagenase B und 100 U/ml DNase angereichert wurde, gewaschen. Die Zellen wurden in einen mit Puffer benetzten Präseparationsfilter gegeben. 35 ml der gewaschenen Zellsuspension wurden über eine Schicht mit 15 ml Ficoll gelegt und 35 Minuten bei 20°C in einer ungebremsten Zentrifuge mit 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die obere Schicht vorsichtig abgenommen, so dass die mittlere Schicht mit den mononukleären Zellen unberührt bleibt. Anschließend wurden die Zellen entnommen und mit EDTA angereichertem PBS gewaschen. Die Lösung wurde für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in einem Endvolumen von 300 µl Puffer pro 10⁸ Zellen resuspendiert.

3.5. Kurzzeitproliferationsassay

In dem Kurzzeitproliferationsassay wurden die eingesetzten Zellen für fünf Tage mit SAM486A behandelt.

In einer 24-Wellplatte mit flachem Boden wurden je Well 1×10^4 Zellen einer Zelllinie pro ml ausgesät und mit folgenden SAM486A-Konzentrationen behandelt.

Kontrolle	0,0625 μM	0,125 μM	0,25 μM	0,5 μM	1 μM
Kontrolle	0,0625 μM	0,125 μM	0,25 μM	0,5 μM	1 μM
Kontrolle	0,0625 μM	0,125 μM	0,25 μM	0,5 μM	1 μM

Tabelle 1: Pipettierschema der SAM486A-Konzentrationen

Die Kontrollzellen erhielten statt SAM486A das Lösungsmittel ddH₂O. Nach der Behandlung wurde die 24-Wellplatte mit den Zellen für 72 Stunden in einen Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% gelagert.

Nach 72 Stunden erfolgte die erste Bestimmung der Zellzahlen mittels Trypanblaufärbung. An diesem Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet, um den Zellen ein ungestörtes Wachstum zu gewährleisten. Es wurde frisches Medium mit den entsprechenden SAM486A-Konzentrationen nach dem oben abgebildeten Schema zugegeben. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die nächste Zellzahlbestimmung, womit der Versuch endete.

3.6. Langzeitproliferationsassay

In dem Langzeitproliferationsassay wurden die Zellen für zwei Wochen kultiviert und mit 1 μM SAM486A behandelt.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro ml in 10 ml Medium ausgesät und für 13 Tage kultiviert. Es erfolgte eine dreifach Bestimmung der Kontrollzellen sowie der behandelten Zellen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte an den Tagen 3, 6, 8, 10 und 13 der Behandlung. Bei der jeweiligen Zellzählung wurden die Zellen auf die Ausgangszellzahl von 5×10^4 Zellen pro ml reduziert und in einer neuen Kulturflasche mit frischem Medium weiterkultiviert, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. An dem achten Tag wurden die Zellen, die nicht weiterkultiviert wurden in 70% Ethanol zur späteren FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) fixiert.

3.7. Durchflusszytometrie

Das Prinzip der FACS-Messung (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zellen, wenn diese innerhalb des Gerätes durch eine Kapillare fließen und im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl passieren. Bei dem Passieren des Laserstrahls wird das Licht je nach Eigenschaft der Zelle gestreut und mittels Detektoren registriert. Die Streuung des Lichts ist abhängig von der Größe der Zellen und ihrer Granularität. So ist das Vorwärtsstreulicht (FSC=Forward Scatter) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zellen ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC=Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle abhängt.

3.7.1. Apoptosenachweis mittels Durchflusszytometrie

Zum Nachweis des programmierten Zelltodes, der Apoptose, sowie der Nekrose wurde die Zellzyklusanalyse herangezogen. Diese Methode beruht auf der Feststellung, dass bei apoptotischen beziehungsweise nekrotischen Zellen eine Fragmentierung der chromosomalen DNA durch Endonukleasen einsetzt. Die entstehenden DNA-Bruchstücke verlassen den Zellkern, sodass apoptotische und nekrotische Zellen einen niedrigeren nuklearen DNA-Gehalt aufweisen im Vergleich zu intakten Zellen mit diploidem oder hyperploidem Chromosomensatz. Man spricht von sub-G₁-Zellen.

Durch Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) kann der DNA-Gehalt im Durchflusszytometer gemessen werden. Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellmembran, welche für kationische Farbstoffe wie PI nicht durchlässig ist. Im Rahmen des Zellsterbens rupturiert die Zellmembran, so dass PI eindringen und in doppelsträngigen DNA und einzelsträngige RNA interkalieren kann. Die Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid ist proportional zu dem DNA-Gehalt der Zelle und lässt somit die Unterscheidung zwischen apoptotischen Zellen mit subdiploidem Chromosomensatz und lebenden Zellen mit diploidem oder hyperploidem Chromosomensatz zu [43].

Die in 70% Ethanol fixierten Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und bei 2000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und das Zellpellet nach dem zweiten Waschvorgang in 300 µl der DNA-Färbelösung (1 ml PBS, 25 µl RNase, 10µl PI) resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen zur FACS-Analyse überführt. Es erfolgte eine Inkubation der DNA-Färbelösung von mindestens 20 Minuten Dauer auf Eis. Die Messung wurde durchflusszytometrisch am FACS-Calibur™ im FL-3 Kanal durchgeführt, um das Emissionsmaximum von Propidiumjodid von 650 nm zu erfassen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest-Software.

3.8. Proliferationsassay mit Kombinationstherapie

Pro Zelllinie wurden zwei 24-Wellplatten mit flachem Boden benötigt. In der ersten Platte wurden 1×10^5 der unvorbehandelten Zellen pro ml Medium ausgesät. In der zweiten Platte wurden 1×10^5 Zellen pro ml Medium ausgesät, die sechs Tage mit $1 \mu\text{M}$ SAM486A vorbehandelt wurden.

Die Behandlung mit Imatinib erfolgte auf beiden Platten gleichermaßen nach folgendem Schema:

Kontrolle	0,039 μM	0,156 μM	0,625 μM	2,5 μM	10 μM
Kontrolle	0,039 μM	0,156 μM	0,625 μM	2,5 μM	10 μM
Kontrolle	0,039 μM	0,156 μM	0,625 μM	2,5 μM	10 μM

Tabelle 2: Pipettierschema für die Imatinibzugabe der unvorbehandelte Zellen

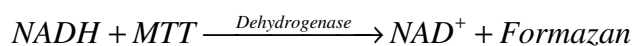
Die Kontrollzellen erhielten jeweils das Lösungsmittel von Imatinib, einem Gemisch aus gleichen Anteilen von H_2O und DMSO.

Die Zellzahlbestimmung beider Platten erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach der Imatinibzugabe.

3.9. MTT-Assay (Zytotoxizitätstest)

Mittels dieses Tests kann die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen unter dem Einfluss spezifischer Substanzen bestimmt werden.

Der Zytotoxizitätstest beruht darauf, dass das gelbe MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] von den lebenden Zellen aufgenommen und in den aktiven Mitochondrien mittels der Succinatdehydrogenase nach der folgenden Reaktionsgleichung zu dem blau-schwarz aussehenden Formazan [1-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan] reduziert wird.



Das Formazan wird durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aus den Zellen freigesetzt, indem das SDS die Zellen lysiert. Die Intensität der Formazanbildung wird photometrisch bei 570 nm mit Hilfe des ELISA-Readers gemessen. Die Höhe der Absorption ist proportional zur mitochondrialen Aktivität der Zellen.

An dem ersten Tag wurden die zu untersuchenden Zellen in flache 96-Well-Platten mit einer Zellzahl von 9×10^3 Zellen pro Well in einem Mediumvolumen von 150 μl ausgesät [1, 2]. Die für sechs Tage mit SAM486A vorbehandelten Zellen erhielten vor dem Aussäen nochmals $1 \mu\text{M}$ SAM486A. Die Zellen wurden zur Inkubation für zwei Stunden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 gelagert. Anschließend wurden die unbehandelten sowie die vorbehandelten Zellen

mit 50 µl der entsprechenden Imatinibkonzentration in aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Die Einwirkzeit des Medikaments betrug 72 Stunden. Somit ergab sich folgendes Pipettierschema:

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

Tabelle 3: Pipettierschema für Imatinib, K: Kontrollzellen

Nach 72 Stunden Behandlung wurden 10 µl MTT pro Well zu den Zellen gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Zur Freisetzung des Formazans wurden 90 µl Lysispuffer in jedes Well pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden zum Schutz vor UV-Licht in Alufolie gewickelt und über Nacht auf einen Schüttler gestellt. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der Intensität der Formazanlösung am Photometer bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm. Die Intensität der Farbentwicklung stand im direkten Verhältnis zur Anzahl der lebenden Zellen vor der MTT-Zugabe. Die Auswertung der Messung erfolgte mit Hilfe der Calcsyn-Software.

3.10. Proliferationsassay mit CD34+ Zellen

3.10.1. Monotherapie mit SAM486A

Die CD34+ Zellen von je zwei gesunden, zwei Bcr-Abl-positiven und einem Bcr-Abl-neagtiven CML-Patienten wurden aufgetaut und in 15 ml Auftaumedium bestehend aus 60% RPMI und 40% FCS überführt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1500 rpm und 21°C zentrifugiert, sodass der Überstand anschließend verworfen werden konnte. Das Zellpellet wurde zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, um serumfreie Zellen zu gewinnen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

Es wurden 1×10^3 Zellen pro Well in 75 µl zytokinangereicherten serumfreien Medium (IL-3, IL-6, Flt-3, TPO, S-CSF und G-CSF) ausgesät und für 10 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Die Behandlung mit SAM486A erfolgte nach dem angegebenen Schema in einem Mediumvolumen von 25 µl:

Kontrolle	0,25 µM	0,5 µM	1 µM	2 µM	4 µM
Kontrolle	0,25 µM	0,5 µM	1 µM	2 µM	4 µM
Kontrolle	0,25 µM	0,5 µM	1 µM	2 µM	4 µM

Tabelle 4: Pipettierschema für SAM486A, CD34+ Zellen

Am fünften Tag wurde 100 µl frisches Medium mit entsprechender SAM486A-Konzentration zugegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte an den Tagen 3, 6, 8 und 10 nach dem Aussäen.

3.10.2. Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A

Analog der Monotherapie wurden die CD34+ Zellen aufgetaut und auf zwei 96-Wellplatten mit 1×10^3 Zellen pro Well in 175 µl zytokinangereichertem Medium ausgesät und für 10 Stunden in den Brutschrank gestellt. Eine Platte wurde für sechs Tage mit einer subapoptotischen Konzentration von 0,5 µM SAM486A vorbehandelt, die andere Platte blieb für sechs Tage unbehandelt. Die subapoptotische Konzentration von 0,5 µM SAM486A wurde aus den erhobenen Daten der Monotherapie abgeleitet. Am fünften Kulturtag wurden 100 µl des mit Zytokinen angereicherten Mediums zu den Zellen gegeben. Die vorbehandelten Zellen erhielten das Medium mit 0,5 µM SAM486A. Am sechsten SAM486A-Behandlungstag wurde Imatinib nach dem angegebenen Schema in einem Mediumvolumen von 15 µl zugegeben.

Kontrolle	0,039 µM	0,156 µM	0,625 µM	2,5 µM	10 µM
Kontrolle	0,039 µM	0,156 µM	0,625 µM	2,5 µM	10 µM
Kontrolle	0,039 µM	0,156 µM	0,625 µM	2,5 µM	10 µM

Tabelle 5: Pipettierschema für Imatinib

Es erfolgten Zellzahlbestimmungen mittels Trypanblaufärbung 24, 48 und 72 Stunden nach der Imatinibzugabe.

3.11. Statistische Methoden

Zur Auswertung der Versuche wurden der „T-Test für paarweise angeordnete Messwerte“ sowie die „Regressionsanalyse“ verwendet.

Der T-Test diente zur Auswertung des Kurzzeitversuchs, der FACS-Analyse, der Kombinationstherapie der etablierten Zelllinien und der Auswertung der Versuche mit dem Patientenmaterial. Das statistische Signifikanzniveau beträgt für alle Versuche 5%. Somit müssen bei der Auswertung der Versuche mit dem T-Test P-Werte $\leq 0,05$ vorliegen, um einen statistisch signifikanten Unterschied in den jeweiligen Behandlungsoptionen aufzeigen zu können.

Die Regressionsanalyse wurde zur statistischen Interpretation des Langzeitproliferationsassays herangezogen. Bei der Regressionsanalyse wurde der berechnete Wert $|v|$ betrachtet. Um hier statistisch signifikante Unterschiede (5% Signifikanzniveau) zwischen den Kontrollzellen und den mit SAM486A behandelten Zellen zu detektieren, muss $|v|$ Werte $\geq 2,78$ annehmen. Weitere Erläuterungen zu den jeweiligen statistischen Modellen befinden sich im Anhang.

4 Ergebnisse

4.1. Vorversuch des Kurzzeitproliferationsassays

Zu Beginn der Versuchsreihen wurde ein Kurzzeitproliferationsassay mit einem relativ breiten Bereich der SAM486A-Konzentrationen durchgeführt, um den Wirkungsbereich von der Substanz zu ermitteln.

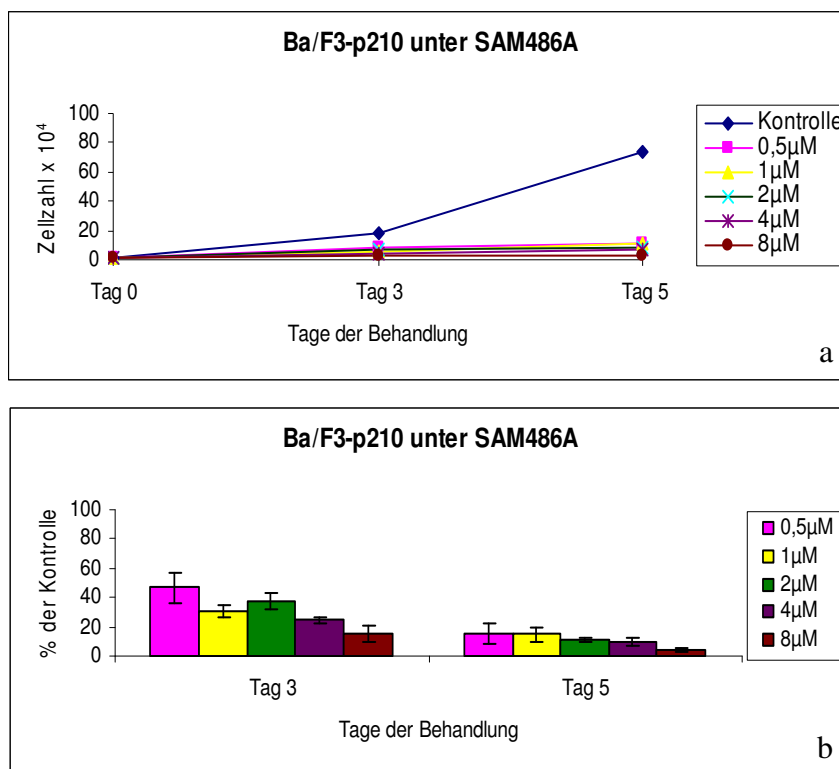


Abbildung 9:
Vorversuch
Kurzzeitproliferations-
assay Ba/F3-p210
unter SAM486A

9 a: Wachstumskurven
9 b: % der Kontrolle

Es wurden SAM486A-Konzentrationen von 0,5 µM bis 8 µM gewählt. Die Zellzahl wurde schon bei 0,5 µM SAM486A erheblich reduziert (Abb. 9a, b). Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen betrug an dem dritten Tag der Behandlung bei 0,5 µM SAM486A 46,67% und bei 8 µM 15,56%.

Die Zellzahl wurde zeitabhängig gesenkt und erreichte an dem fünften Behandlungstag bei 0,5 µM 14,77% und bei 8 µM 4,55%.

Anhand dieser Daten wurde als SAM486A-Höchstkonzentration 1 µM für die folgenden Versuche gewählt. Die Konzentrationsstufen stellen jeweils Verdopplungen der niedrigsten Konzentrationsstufe dar.

4.2. Kurzzeitproliferationsassay

• Ba/F-3+ IL3

Mit zunehmender SAM486A-Konzentration kam es an dem fünften Tag der Behandlung zu einer kontinuierlichen dosisabhängigen Zellzahlreduktion (Abb. 10a).

An dem dritten Behandlungstag war lediglich bei 0,5 μM und 1 μM eine Zellzahlabnahme auf 70% im Vergleich zu den Kontrollzellen zu verzeichnen (Abb. 10b). An diesem Tag lag kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den Kontrollzellen und den SAM486A behandelten Zellen vor ($P > 0,05$).

An dem fünften Tag der Behandlung traten signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich der Kontrollzellen mit den 0,5 μM ($P=0,018$) sowie 1 μM ($P=0,013$) SAM486A behandelten Zellen auf (Tab. 6).

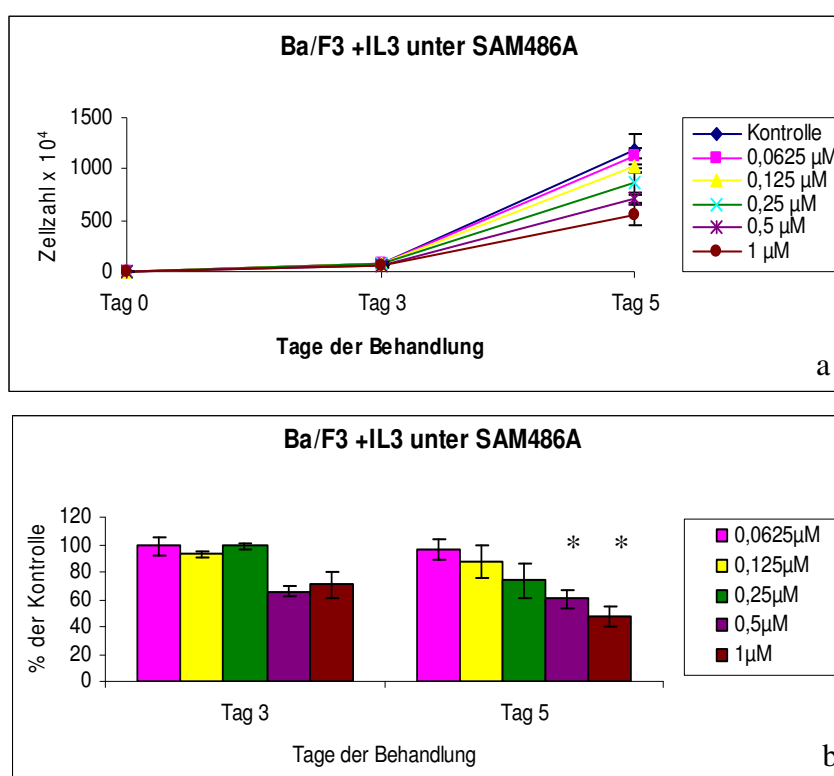


Abbildung 10:

Kurzzeitproliferationsassay Ba/F-3+IL3 unter SAM486A, *:Signifikanz

10a: Wachstumskurven

10b: % der Kontrolle

Es ergaben sich folgende P-Werte für die einzelnen Konzentrationsstufen mithilfe des T-Tests.

Ba/F3+IL3	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,697	0,525
0,125 μM	0,109	0,259
0,25 μM	0,338	0,076
0,5 μM	0,213	0,018
1 μM	0,105	0,013

Tabelle 6: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzzeitversuch, Ba/F3+IL3

- **Ba/F3-p210**

Auch bei dieser Zelllinie war eine konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion festzustellen (Abb. 11a). Diese wurde vor allem an dem fünften Behandlungstag deutlich. Wurde die Zellzahl der behandelten Zellen in Bezug zu der Anzahl der Kontrollzellen gesetzt, ist mit zunehmender SAM486A-Konzentration ein stufenförmiger Abfall der Zellzahl zu erkennen (Abb. 11b).

Für diese Zelllinie ergab sich an dem fünften Behandlungstag ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den Kontrollzellen und den mit 1 μM SAM486A behandelten Zellen ($P=0,039$). Hier sank die Zellzahl auf 44,14% ab im Vergleich zu den Kontrollzellen. Bei den restlichen Konzentrationsstufen sowie dem dritten Behandlungstag konnte kein signifikanter Unterschied in den Wachstumsraten der behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden (Tab. 7).

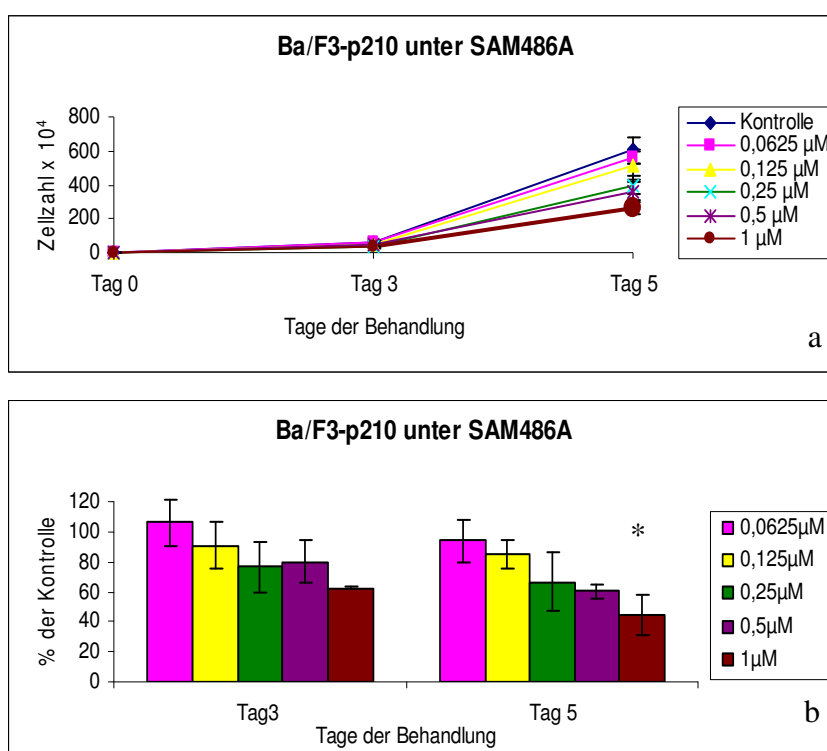


Abbildung 11:

Kurzzeitproliferationsassay Ba/F3-p210 unter SAM486A, *:Signifikanz

11a: Wachstumskurve

11b: % der Kontrolle

Ba/F3-p210	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,716	0,553
0,125 μM	0,448	0,125
0,25 μM	0,191	0,122
0,5 μM	0,181	0,322
1 μM	0,148	0,039

Tabelle 7: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzzeitversuch, Ba/F3-p210

• Ba/F3-p210-E255K

Bei dieser Zelllinie zeigte sich eine ausgeprägte Zellzahlabnahme mit steigender SAM486A-Konzentration. Im Gegensatz zu den vorherigen Zelllinien war hier ab Tag drei der Behandlung eine signifikante konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion zu verzeichnen (Tab. 8). An dem dritten Behandlungstag waren bei 1 μM SAM486A lediglich 35% ($P=0,029$) der Zellen vital im Vergleich zu den Kontrollzellen. An dem fünften Behandlungstag betrug die Anzahl der vitalen Zellen bei 1 μM SAM486A 20,5% ($P=0,004$) (Abb. 12b).

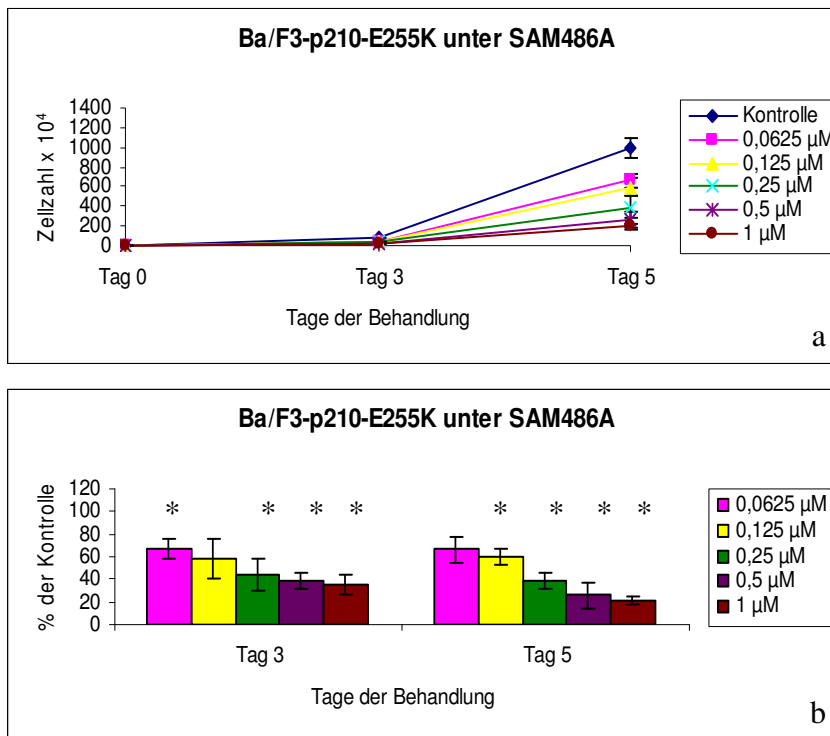


Abbildung 12:

Kurzzeitproliferationsassay

Ba/F3-p210-E255K

unter SAM486A,

*: Signifikanz

12a: Wachstumskurven

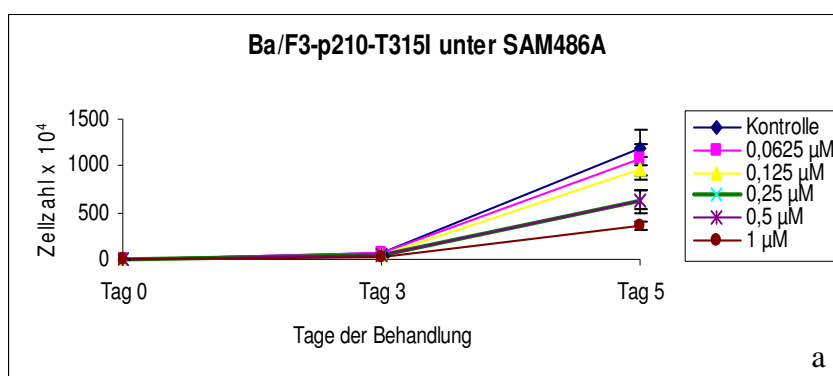
12b: % der Kontrolle

Ba/F3-p210-E255K	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,019	0,052
0,125 μM	0,092	0,020
0,25 μM	0,022	0,012
0,5 μM	0,004	0,034
1 μM	0,029	0,004

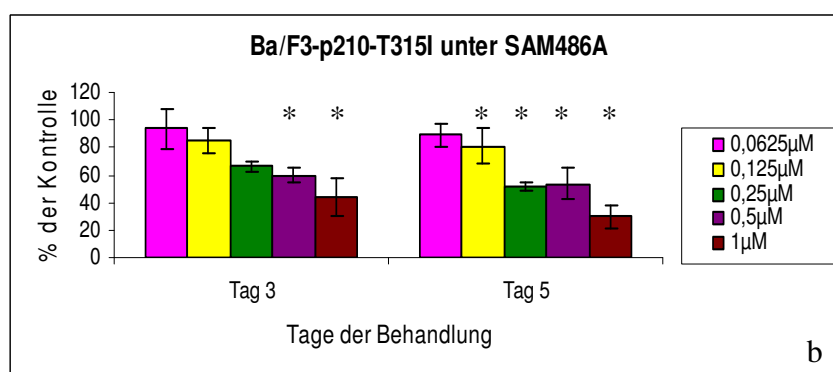
Tabelle 8: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzzeitversuch, Ba/F3-p210-E255K

• Ba/F3-p210-T315I

Bei der Zelllinie Ba/F3-p210-T315I waren, wie bei den Ba/F3-p210-E255K, sowohl an den Behandlungstagen drei und fünf deutliche dosisabhängige Zellzahlverminderungen bei steigender SAM486A-Konzentration zu verzeichnen (Abb. 13a). An dem dritten Behandlungstag fiel der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bei 1 μM SAM486A auf 44% ab, am fünften Behandlungstag auf 30% (Abb. 13b). Statistisch signifikante Werte lagen an Tag drei der Behandlung bei den Konzentrationsstufen 0,5 μM ($P=0,009$) und 1 μM ($P=0,039$) vor. An dem fünften Behandlungstag wurde die Zellproliferation der mit SAM486A behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen stark eingeschränkt. Es ergaben sich statistisch signifikante Werte ab einer SAM486A-Konzentrationsstufe von 0,125 μM (Tab. 9).



a



b

Abbildung 13:

Kurzzeitproliferationsassay

Ba/F3-p210-T315I unter SAM486A,

*: Signifikanz

13a: Wachstumskurven

13b: % der Kontrolle

Ba/F3-p210-T315I	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,560	0,742
0,125 μM	0,120	0,147
0,25 μM	0,115	0,004
0,5 μM	0,009	0,036
1 μM	0,039	0,015

Tabelle 9: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzzeitversuch, Ba/F3-p210-T315I

- **HL60**

Bei dieser Bcr-Abl-negativen Zelllinie konnte an dem fünften Behandlungstag nur ein geringer Unterschied der Zellzahlen in Abhängigkeit von der SAM486A-Konzentrationsstufe aufgezeigt werden (Abb. 14a).

An dem dritten Behandlungstag sank die Zellzahl bei 1 μM SAM486A auf 66,67% ($P=0,004$) im Vergleich zu den Kontrollzellen ab. An dem fünften Behandlungstag wurden signifikante Wachstumsunterschiede durch die SAM486A-Behandlung ab der Konzentrationsstufe 0,5 μM SAM486A erreicht. Die Zellzahl wurde bei 0,5 μM auf 71,52% ($P=0,015$) und bei 1 μM auf 52,43% ($P=0,017$) gesenkt (Tab. 10).

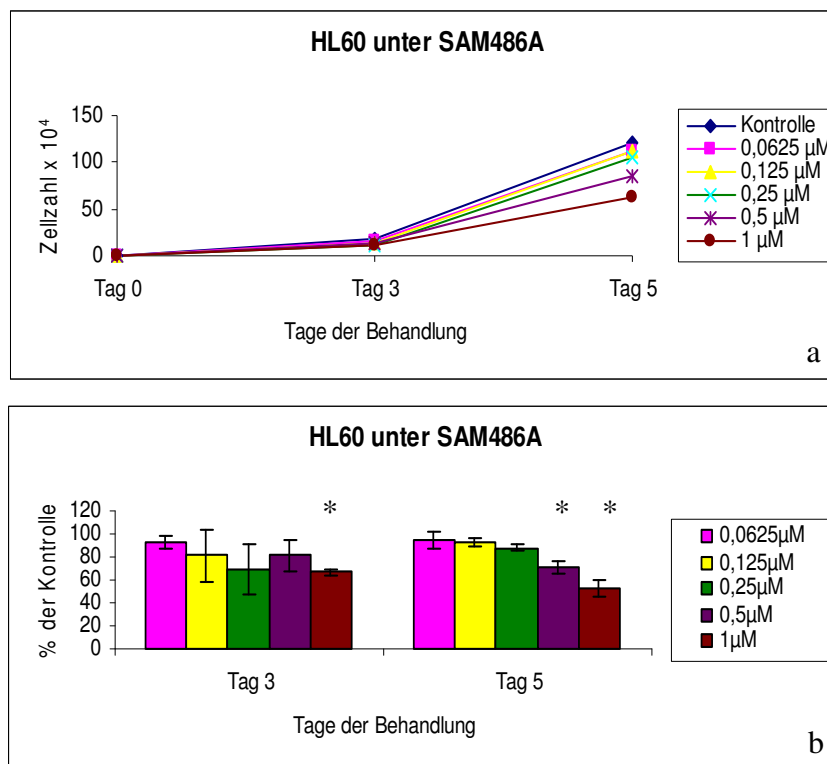


Abbildung 14:
Kurzeitproliferations-
assay HL60
unter SAM486A,
*: Signifikanz

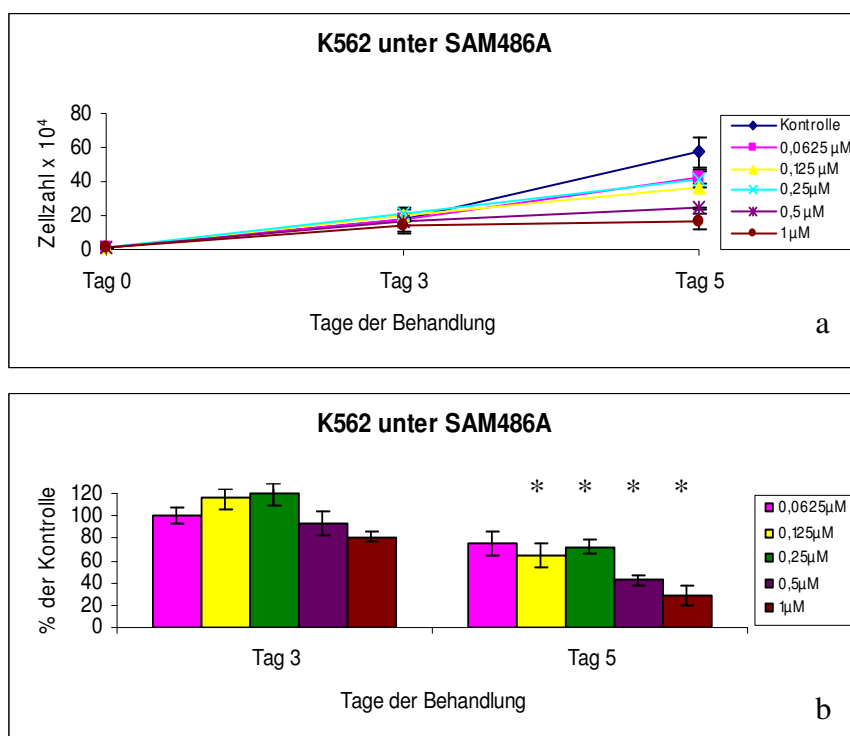
14a: Wachstumskurven
14b: % der Kontrolle

HL60	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,667	0,308
0,125 μM	0,084	0,244
0,25 μM	0,184	0,304
0,5 μM	0,331	0,015
1 μM	0,004	0,017

Tabelle 10: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzeitversuch, HL60

- **K562**

Diese Bcr-Abl-positive Zelllinie zeigte ein sensibles Ansprechen auf die SAM486A-Therapie. Es konnte ein zeitlicher und konzentrationsabhängiger Abfall der Zellzahlen beobachtet werden (Abb. 15a, b). An dem dritten Behandlungstag wurde die Zellzahl unter der Behandlung mit 1 μM SAM486A auf 80% ($P=0,347$) gesenkt (Abb. 15b). An dem fünften Behandlungstag trat eine deutliche dosisabhängige Zellzahlreduktion auf. Der Anteil der vitalen Zellen betrug bei 0,5 μM 42,3%, bei 1 μM SAM486A 28,5% (Abb. 15b). An diesem Behandlungstag lagen für alle SAM486A-Konzentrationen signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen vor (Tab.11).



K562	P (Tag 3)	P (Tag 5)
0,0625 μM	0,924	0,077
0,125 μM	0,363	0,040
0,25 μM	0,232	0,025
0,5 μM	0,898	0,004
1 μM	0,347	0,019

Tabelle 11: P-Werte für den dritten und fünften Behandlungstag, Kurzzeitversuch, K562

4.2.1. Zusammenfassung des Kurzzeitproliferationsassays

Im Folgenden sind alle Zelllinien zusammenfassend parallel dargestellt:

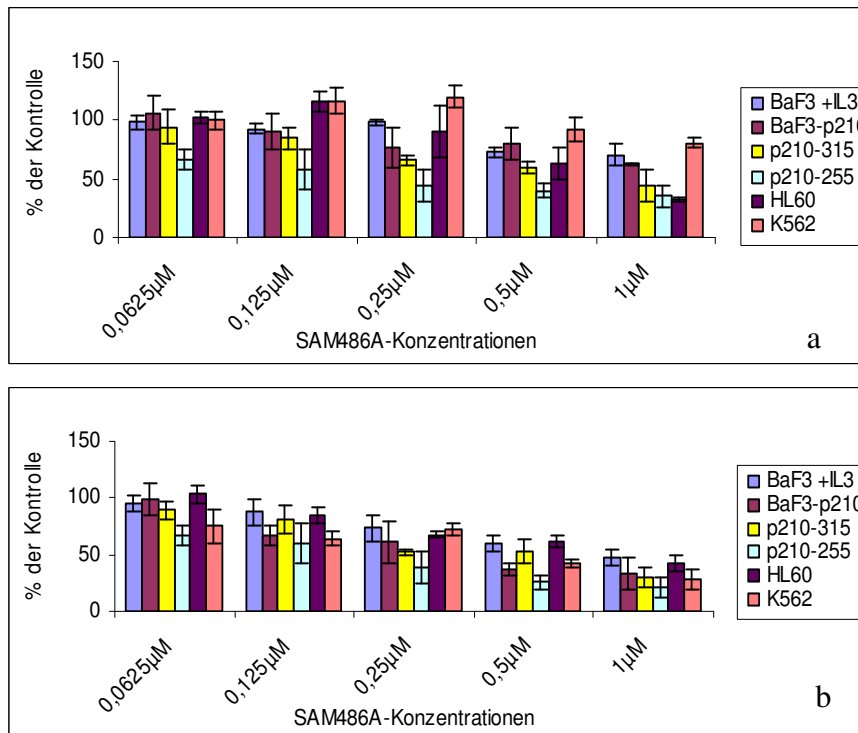


Abbildung 16:
„Prozent der Kontrolle“ des Kurzzeitproliferationsassays, alle Zelllinien

16a: Dritter Tag der Behandlung mit SAM486A

16b: Fünfter Tag der Behandlung mit SAM486A

Im Überblick ist ersichtlich, dass es unter der SAM486A-Therapie an dem dritten Behandlungstag erst ab 0,5 μM SAM486A zu einer geringen Zellzahlreduktion der jeweiligen Zelllinien kam (Abb. 16a). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie Ba/F3-p210-E255K, welche ab einer Konzentration von 0,0625 μM ($P=0,019$) signifikant inhibiert wurde. An dem fünften Behandlungstag (Abb. 16b) kam es bei allen Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Zellzahlreduktion. Die Bcr-Abl-negativen Zelllinien Ba/F3+IL3 und HL60 zeigten im Vergleich zu den Bcr-Abl-positiven Zelllinien ein geringes Ansprechen auf die SAM486A-Therapie.

4.3. Langzeitproliferationsassay

Zunächst wurden die Zelllinien einzeln für sich betrachtet. Es erfolgte der Vergleich zwischen den Wachstumskurven (Regressionsgeraden) der unbehandelten Kontrollzellen mit den 1 μM SAM486A behandelten Zellen. Statistisch signifikante Werte lagen vor, wenn $|t| \geq 2,78$ betrug (siehe Anhang Kapitel 12.3).

4.3.1. Murine Zelllinien

- **Ba/F3+IL3**

Die absolute Zellzahl der Kontrollzellen betrug am Ende des Versuchs $8,87 \times 10^{11}$ Zellen, die der SAM486A behandelten Zellen $1,76 \times 10^{11}$ Zellen. Der Wachstumsunterschied wurde ab dem sechsten Behandlungstag deutlich. Hier wiesen die SAM486A behandelten Zellen eine statistisch signifikant niedrigere Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen auf ($|t|=5,43$) (Abb.17).

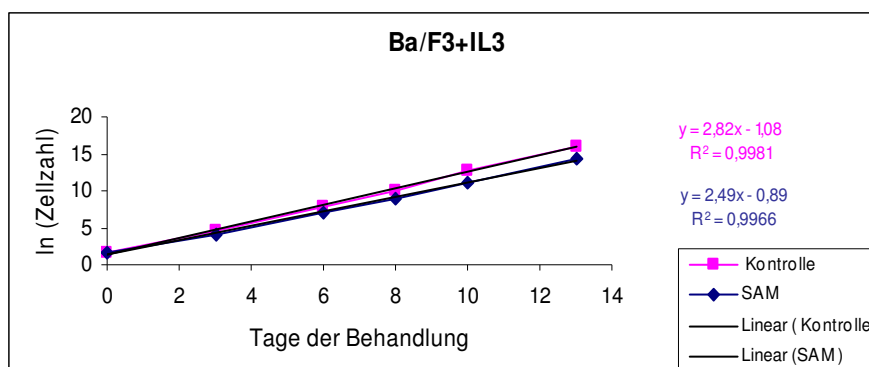


Abbildung 17:
Regressionsanalyse
Ba/F3+IL3

- **Ba/F3-p210**

Bei dieser Zelllinie ließ sich der größte Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen der Kontrollzellen und den behandelten Zellen unter den murinen Zelllinien aufzeigen. Die absolute Zellzahl der Kontrollzellen lag am Ende des Versuchs bei $4,6 \times 10^{10}$ Zellen, die der behandelten Zellen bei $3,5 \times 10^9$ (Abb. 18). Der Wert zur Prüfung der statistischen Wahrscheinlichkeit betrug $|t|=6,22$ und somit bestand ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den beiden Zellpopulationen.

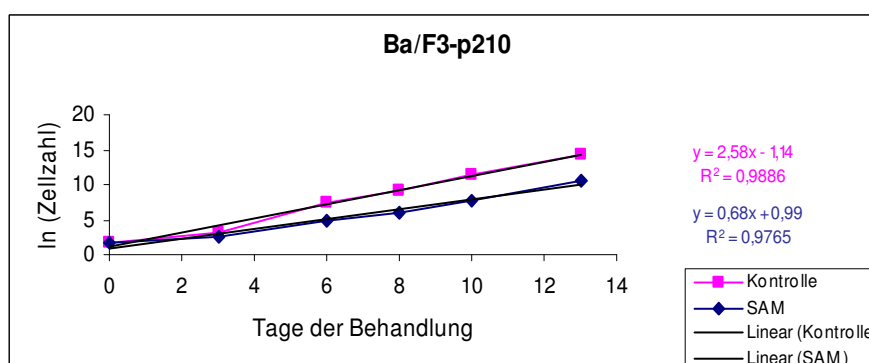


Abbildung 18:
Regressionsanalyse
Ba/F3-p210

- **Ba/F3-p210-E255K**

Bei dieser Zelllinie divergierten die Zellzahlen der beiden Zellpopulationen ab dem vierten Behandlungstag. Die absolute Zellzahl der Kontrollzellen lag an dem dreizehnten Behandlungstag bei $7,9 \times 10^{11}$ Zellen, die der behandelten Zellen bei $1,8 \times 10^9$ (Abb. 19). Auch hier lag ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den behandelten Zellen und den Kontrollzellen vor ($|v| = 13,45$).

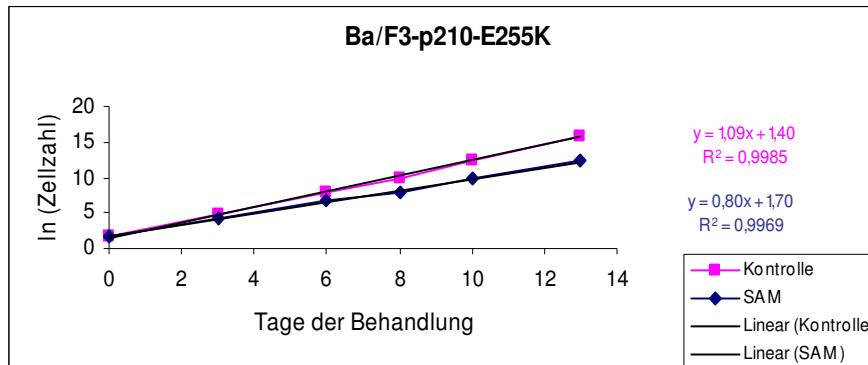


Abbildung 19:
Regressionsanalyse
Ba/F3-p210-E255K

- **Ba/F3-p210-T315I**

Bei der Zelllinie Ba/F3-p210-T315I erfolgte ab dem zweiten Behandlungstag eine deutliche Inhibition der Zellproliferation bei den SAM486A behandelten Zellen. Ab diesem Zeitpunkt divergierten die Zellzahlen. Am Ende des Versuchs lag die absolute Zellzahl der Kontrollzellen bei $4,9 \times 10^{10}$ Zellen, die der mit SAM486A behandelten Zellen bei $8,3 \times 10^9$ Zellen (Abb. 20). Auch hier bestand ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den beiden Zellpopulationen ($|v| = 8,75$).

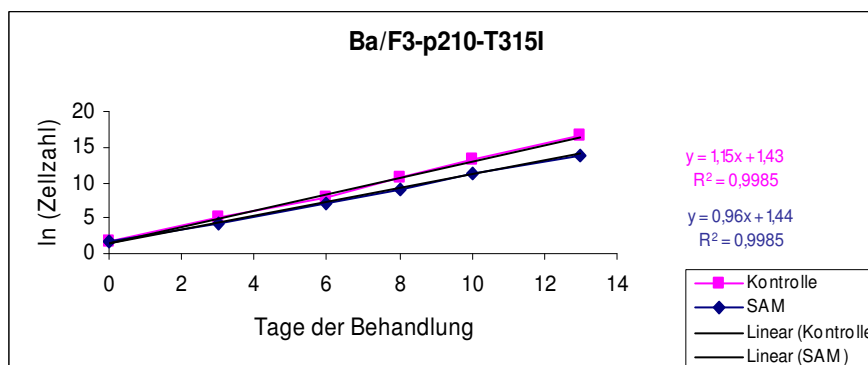


Abbildung 20:
Regressionsanalyse
Ba/F3-p210-T315I

Weiterhin erfolgte der Vergleich zwischen der murinen Bcr-Abl-negativen Zelllinie Ba/F3+IL3 mit den jeweiligen Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinien. Es wurden ausschließlich die mit SAM486A behandelten Zellen betrachtet, um das Ansprechen auf die SAM486A-Behandlung zu analysieren.

Ba/F3+IL3 versus Ba/F3-p210

In der Abbildung 21 wurde der Vergleich der Zellzahlen in Form der Regressionsgeraden von Ba/F3+IL3 mit Ba/F3-p210 dargestellt. Die behandelten Zellpopulationen wiesen von Beginn des Versuchs an eine unterschiedliche Zellproliferationsrate auf. Es bestätigte sich das sensitivere Ansprechen der Bcr-Abl-positiven Ba/F3-p210 auf die SAM486A-Behandlung ($|v|=10,52$).

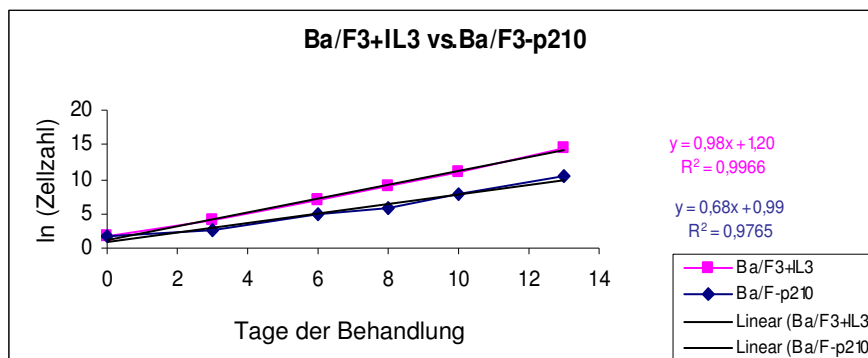


Abbildung 21:
Regressionsanalyse
Ba/F3+IL3 vs.
Ba/F3-p210

- **Ba/F3+IL3 versus Ba/F3-p210-E255K**

Die Zellpopulationen der mit SAM486A behandelten Ba/F3+IL3 und Ba/F3-p210-E255K wiesen bis zu dem sechsten Behandlungstag ähnliche Zellzahlen auf (Abb. 22). Ab dem sechsten Behandlungstag divergierten sie und die Zellen der Ba/F3-p210-E255K ($3,07 \times 10^{10}$ Zellen) erreichten am letzten Messzeitpunkt eine deutlich geringere absolute Zellzahl im Vergleich zu den Ba/F3+IL3 ($1,76 \times 10^{11}$ Zellen). Es lag ein signifikant sensitiveres Ansprechen der Ba/F3-p210-E255K im Vergleich zu den Ba/F3+IL3 auf SAM486A vor ($|v|=6,18$).

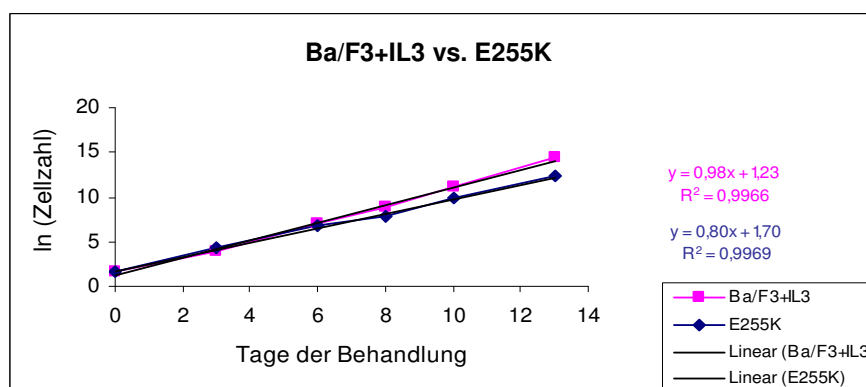


Abbildung 22:
Regressionsanalyse
Ba/F3+IL3 vs.
Ba/F3-p210-E255K

- **Ba/F-3+IL3 versus Ba/F3-p210-T315I**

Bei dem Vergleich der Zellwachstumsraten der behandelten Bcr-Abl-negativen Zelllinie Ba/F3+IL3 mit der behandelten Bcr-Abl-positiven Zelllinie Ba/F3-p210-T315I fiel der identische Kurvenverlauf auf. Es ließ sich nur ein geringer Unterschied zwischen den absoluten Zellzahlen der beiden Zelllinien aufweisen (Abb. 23). Der berechnete Wert $|v|$ beträgt 0,95 und bestätigt, dass es keinen signifikanten Wachstumsunterschied zwischen den beiden Zelllinien unter der SAM486A-Therapie gibt.

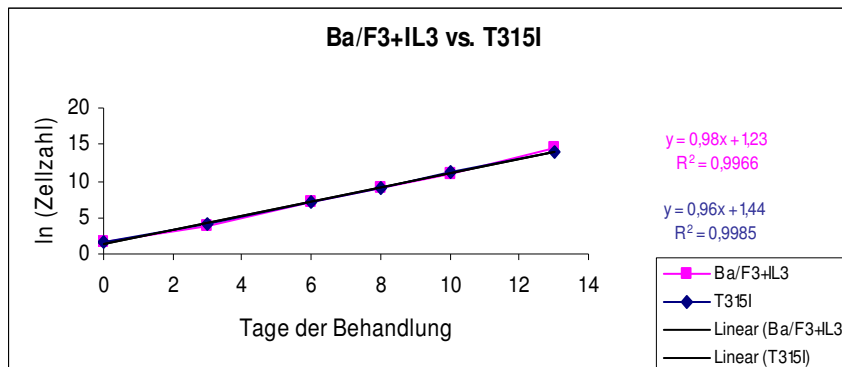


Abbildung 23:
Regressionsanalyse
Ba/F3+IL3 vs.
Ba/F3-p210-T315I

4.3.2. Humane Zelllinien

- **HL60**

Bei der Bcr-Abl-negativen humanen Zelllinie HL60 lag ein geringer Unterschied zwischen der Wachstumsrate der Kontrollzellen und der der behandelten Zellen vor. Bis zum vierten Behandlungstag wiesen beide Zellpopulationen ähnliche Zellzahlen auf (Abb. 24). Die absolute Zellzahl der Kontrollzellen betrug am Ende des Versuchs $1,14 \times 10^{10}$ Zellen, die der behandelten Zellen $5,52 \times 10^9$ Zellen. Es ließ sich ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen ermitteln ($|v| = 7,51$) und zeigt, dass SAM486A auch bei den Bcr-Abl-negativen Zellen zu einer Inhibition der Zellproliferation führt.

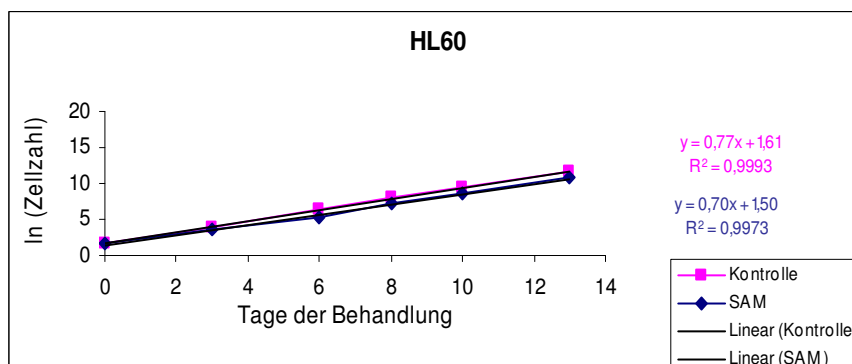


Abbildung 24:
Regressionsanalyse
HL60

- **K562**

Im Vergleich zu der Bcr-Abl-negativen Zelllinie HL60 divergierten die beiden Zellpopulationen der Zelllinie K562 ab dem dritten Behandlungstag in ihrer Wachstumsrate (Abb. 25). Die absolute Zellzahl der unbehandelten Zellen betrug am Ende des Versuchs $1,43 \times 10^{10}$ Zellen, die der behandelten Zellen $2,175 \times 10^8$ ($|v| = 32,14$).

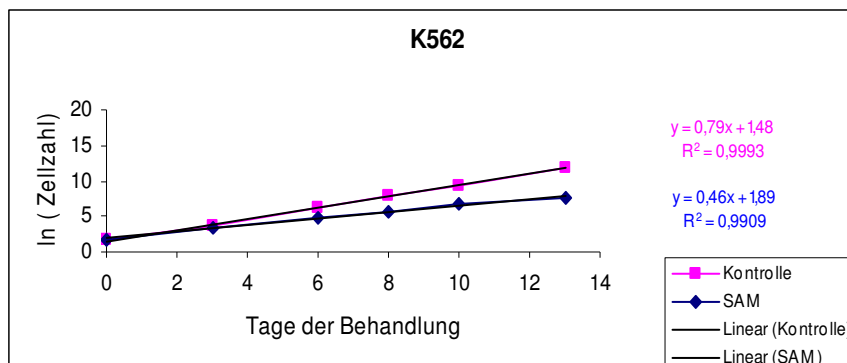


Abbildung 25:
Regressionsanalyse
K562

- **HL60 versus K562**

Im Weiteren erfolgte der direkte Vergleich der mit $1 \mu\text{M}$ SAM486A behandelten Zelllinien HL60 mit K562. Die Zellzahlen der beiden Zelllinien wichen ab dem dritten Behandlungstag zunehmend mehr auseinander. Es konnte eine unterschiedliche Wachstumsdynamik durch den Einfluss von SAM486A zwischen der Bcr-Abl-negativen Zelllinie HL60 und der Bcr-Abl-positiven Zelllinie K562 festgestellt werden. Die Zellzahlen lagen am Ende der zweiwöchigen Therapie um 3,1 Logarithmusstufen auseinander (Abb. 26). Die absolute Zellzahl der mit $1 \mu\text{M}$ SAM486A behandelten K562 lag zu diesem Zeitpunkt bei $2,175 \times 10^8$ Zellen. Die Zellzahl der Zelllinie HL60 lag im Vergleich dazu bei $5,52 \times 10^9$ Zellen. Das sensitivere Ansprechen der Bcr-Abl-positiven Zelllinie K562 auf SAM486A wurde statistisch mit dem berechneten Wert $|v|$ von 13,0 bestätigt.

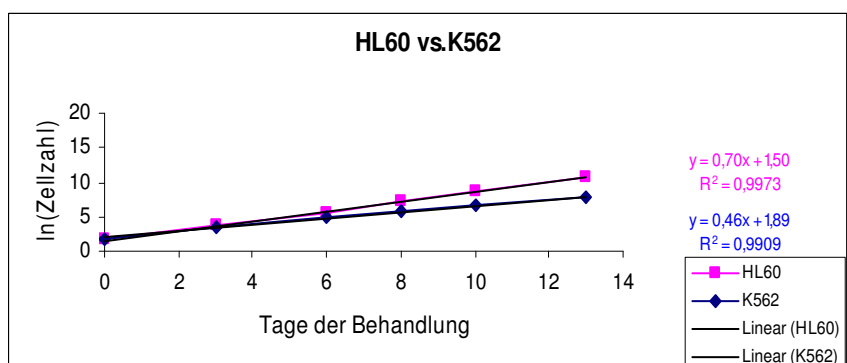


Abbildung 26:
Regressionsanalyse
HL60 vs. K562

4.3.3. Zusammenfassung des Langzeitproliferationsassays

Nachfolgend sind alle Zelllinien des Langzeitversuchs parallel dargestellt. Hier konnte sowohl bei den Bcr-Abl-positiven als auch bei den Bcr-Abl-negativen Zelllinien eine zeitliche und konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion verzeichnet werden. Wie in dem Kurzzeitproliferationsassay ergab sich auch hier, dass die Bcr-Abl-negativen Zelllinien Ba/F3+IL3 und HL60 am geringsten in ihrer Zellproliferation gehemmt wurden und die Bcr-Abl-positiven Zelllinien ein sensitiveres Ansprechen auf SAM486A aufwiesen (Abb. 27).

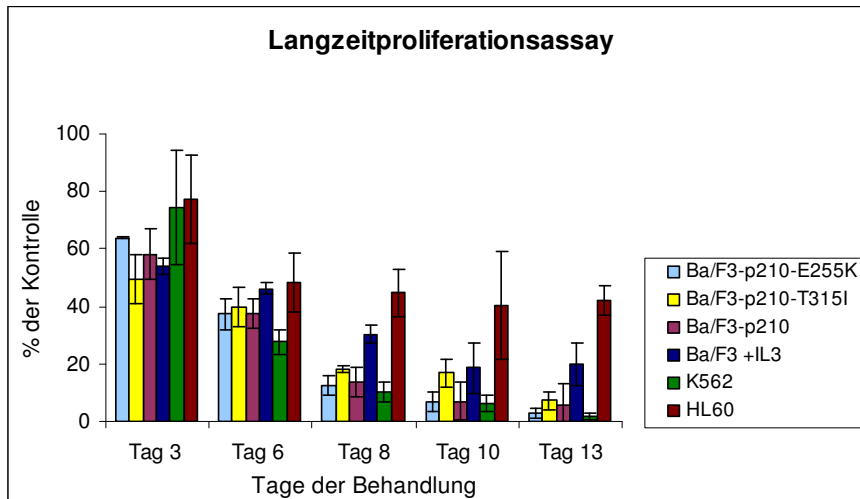


Abbildung 27:
Übersicht aller Zelllinien des Langzeitproliferationsassays unter $1\mu\text{M}$ SAM486A
Darstellung in % der Kontrolle

4.4. Analyse der Apoptose-/ Nekroserate

• Murine Zelllinien

Die Apoptose-/ Nekroserate der unbehandelten Bcr-Abl-negativen Zelllinie Ba/F3+IL3 unterschied sich nicht im Vergleich zu den für acht Tage mit $1\mu\text{M}$ SAM486A behandelten Zellen (Abb. 28). Die Kontrollzellen wiesen eine Apoptose-/ Nekroserate von 3,1% auf, die behandelten Zellen von 3,03% ($P=0,940$). Bei der Bcr-Abl-positiven Zelllinie Ba/F3-p210 ergaben sich 5,9% Apoptose/ Nekrose für die Kontrollzellen und 12,03% für die behandelten Zellen. Hier lag ein signifikanter Unterschied in der Apoptose-/ Nekroserate bezüglich der SAM486A-Behandlung vor ($P=0,021$). Für die Zelllinie Ba/F3-p210-E255K ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Apoptose-/ Nekroserate. Die unbehandelten Zellen wiesen eine Rate von 5,64% auf, die mit SAM486A behandelten Zellen eine Rate von 14,71% ($P=0,042$). Für die Zelllinie Ba/F3-p210-T315I ergab sich keine Signifikanz im Vergleich zwischen den Apoptose-/ Nekroseraten ($P=0,061$).

Weiterhin wurde ein Vergleich zwischen den Bcr-Abl-negativen Ba/F3+IL3 und den Bcr-Abl-positiven murinen Zellen bezüglich der Apoptose-/ Nekroserate der SAM486A behandelten Zellen vorgenommen. Es ergab sich in jedem Vergleich ein signifikanter Unterschied, so dass

SAM486A bei den Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinien verstärkt eine Apoptose/ Nekrose induziert im Vergleich zu der Bcr-Abl-negativen Zelllinie Ba/F3+IL3 (Ba/F3+IL3 vs. p210: $P=0,018$; Ba/F3+IL3 vs. Ba/F3-p210-E255K: $P=0,009$; Ba/F3+IL3 vs. T315I: $P=0,011$) (Abb. 28, siehe Anhang 12.8).

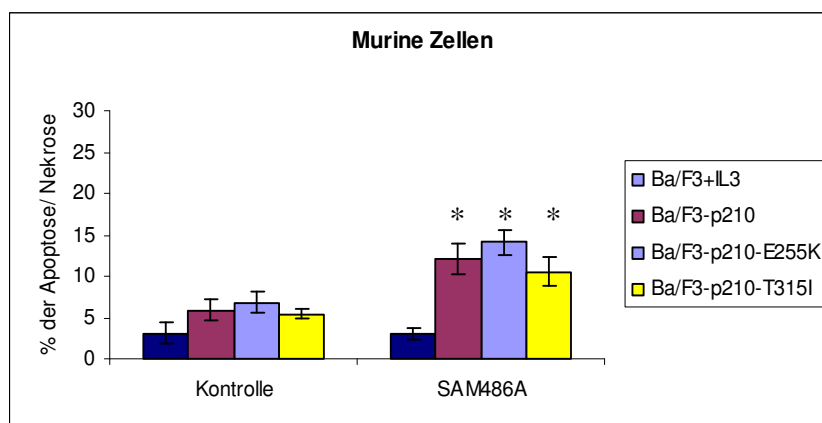


Abbildung 28:

FACS-Analyse der murinen Zelllinien unter $1\mu\text{M}$ SAM486A nach acht Tagen Behandlung, *: Signifikanz

• Humane Zelllinien

In dem nachfolgenden Säulendiagramm wurden die erhobenen Daten für die humanen Zelllinie HL60 und K562 dargestellt (Abb. 29). Für die Bcr-Abl-negative Zelllinie HL60 ergab sich bei den Kontrollzellen eine Apoptose/ Nekroserate von 11,3% und bei den SAM486A behandelten Zellen von 19,07% ($P=0,059$). Bei der Bcr-Abl-positiven Zelllinie K562 wurde ein Wert von 7,63% Apoptose/ Nekrose bei den Kontrollzellen und 17,19% bei den behandelten Zellen ($P=0,298$) gemessen. In dem direkten Vergleich der behandelten HL60 mit den behandelten K562 konnte kein Unterschied hinsichtlich der Apoptose/ Nekroserate festgestellt werden ($P=0,797$) (Abb.29, siehe Anhang 12.8).

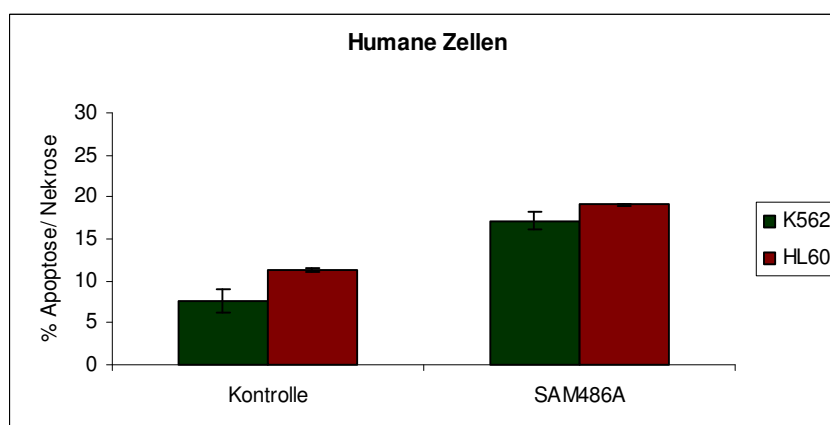


Abbildung 29:

FACS-Analyse der humanen Zelllinien unter $1\mu\text{M}$ SAM486A nach acht Tagen Behandlung,

4.5. Proliferationsassay mit Kombinationstherapie

In diesem Versuch wurde geklärt, ob ein synergistischer Effekt zwischen Imatinib und SAM486A vorliegt. Die subapoptotische SAM486A-Konzentration betrug $1 \mu\text{M}$ für den folgenden Versuch. Die zugehörigen statistischen Daten sind den Tabellen im Anhang zu entnehmen. Für die Kombinationstherapie wurde ein Teil der Zellen für sechs Tage mit SAM486A vorbehandelt. Die Anzahl der Vorbehandlungstage sowie die subapoptotische SAM486A-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ wurden aus dem Langzeitversuch ermittelt. Dort ist aus dem Verlauf der Wachstumskurven zu sehen, dass die Zellproliferation erst ab dem sechsten Behandlungstag und einer SAM486A-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ relevant gehemmt wurde.

Bei der Auswertung wurden jeweils die beiden Monotherapien mit der Kombinationstherapie bestehend aus Imatinib und SAM486A verglichen, um gezielt eine Aussage zu treffen, ob ein Synergismus zwischen den beiden Medikamenten vorliegt oder ob die Wirkung alleine durch SAM486A bedingt ist.

4.5.1. Murine Zelllinien

- **Ba/F3+IL3**

Die Bcr-Abl-negative Zelllinie Ba/F3+IL-3 reagierte nicht sensibel auf die Imatinibtherapie. Die Kombinationstherapie bewirkte bei dieser Zelllinie eine zeitliche, aber keine konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion. An dem zweiten Behandlungstag lagen die Zellzahlen im Bereich der Imatinibkonzentrationen von $0,156 \mu\text{M}$ ($P=0,004$) bis $2,5 \mu\text{M}$ ($P=0,04$) im statistisch signifikanten Bereich (Abb. 30b). An dem dritten Tag nach der Behandlung lagen ähnliche Daten vor. Hier sank die Zellzahl bei der niedrigsten Konzentrationsstufe der Kombinationstherapie auf $59,39\%$ ab ($P=0,021$) (Abb. 30c).

Die SAM486A-Monotherapie bewirkte eine zeitliche Zellzahlreduktion auf $93,15\%$ am ersten Messtag und auf $55,10\%$ am dritten Messzeitpunkt. Anhand der Zellzahlreduktion unter der SAM486A-Monotherapie im Vergleich zu der Kombinationstherapie war ersichtlich, dass die proliferationshemmende Wirkung der Kombinationstherapie überwiegend durch SAM486A vermittelt wurde. Es ergaben sich keine signifikanten Daten bei dem Vergleich der Kombinationstherapie mit der SAM486A-Monotherapie (siehe Anhang Tab. 21).

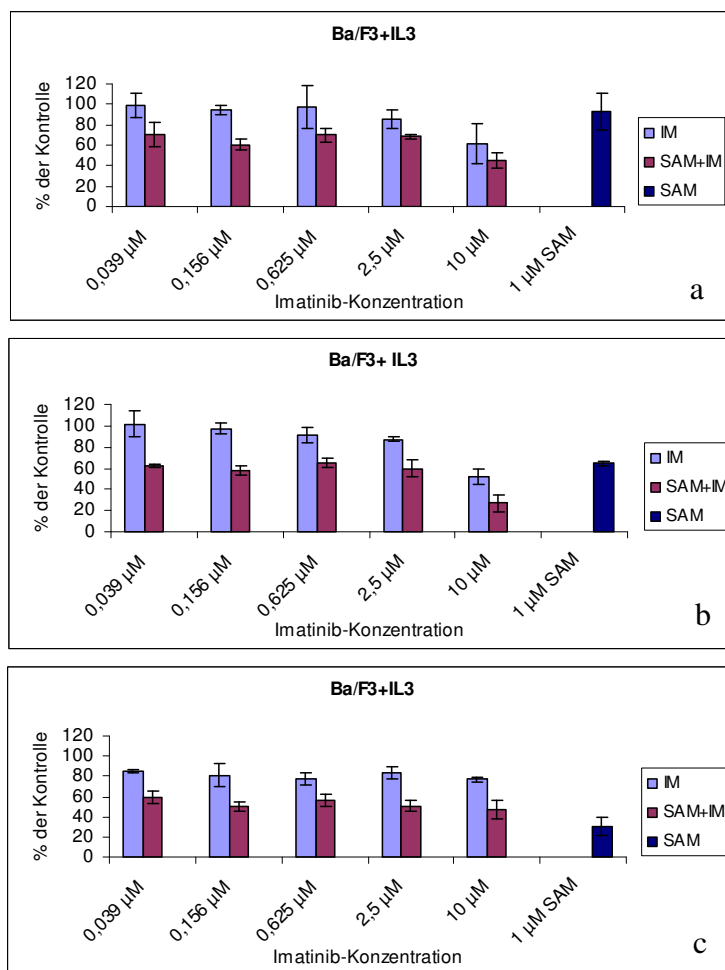


Abbildung 30:
Kombinationstherapie
Ba/F3+IL3

30a: Tag 1 nach Imatinibzugabe
30b: Tag 2 nach Imatinibzugabe
30c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

• Ba/F3-p210

Diese Bcr-Abl-positive Zelllinie zeigte ein sensibles Ansprechen auf die Imatinibbehandlung. Es erfolgte ein konzentrationsabhängiger, stufenförmiger Abfall der Zellzahlen über die drei Messzeitpunkte. Die Zellzahlen fielen an dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe von 90,7% (0,039 µM) auf 10,47% (10 µM) im Vergleich zu den Kontrollzellen ab. An dem zweiten Behandlungstag lagen bei 2,5µM Imatinib 0,72% vitale Zellen vor und am dritten Behandlungstag waren es 0,24%.

In der Kombinationstherapie kam es ebenfalls zu einer stufenförmigen Reduktion der Zellzahlen. Hier wurde der Anteil der vitalen Zellen am ersten Tag nach der Imatinibtherapie von 53,49% (0,039 µM) auf 10,47% (10 µM) gesenkt. Am zweiten Tag nach der Behandlung fiel der Anteil der vitalen Zellen bei 2,5 µM auf 0,99% und am dritten Messzeitpunkt auf 0,48% ab. Statistisch signifikante Werte konnten bei der Konzentrationsstufe 0,156µM ermittelt werden. Hier wurde die Zellzahl im Vergleich zu der Imatinibtherapie auf 47,67% (P=0,03) am zweiten Tag der Behandlung reduziert. An dem dritten Tag erreichte die Zellzahl der Kombinationstherapie 55,26% (P=0,014). Der Vergleichswert der Imatinibtherapie lag hier bei 72,83%. Die alleinige SAM486A-Therapie bewirkte eine Verminderung der Zellzahl auf maximal 57,63% (Abb. 31 a-c). Es lag eine signifikante Zellzahlreduktion zugunsten der

Kombinationstherapie im Vergleich zu der SAM486A-Monotherapie an den ersten beiden Behandlungstagen vor (siehe Anhang Tab. 23).

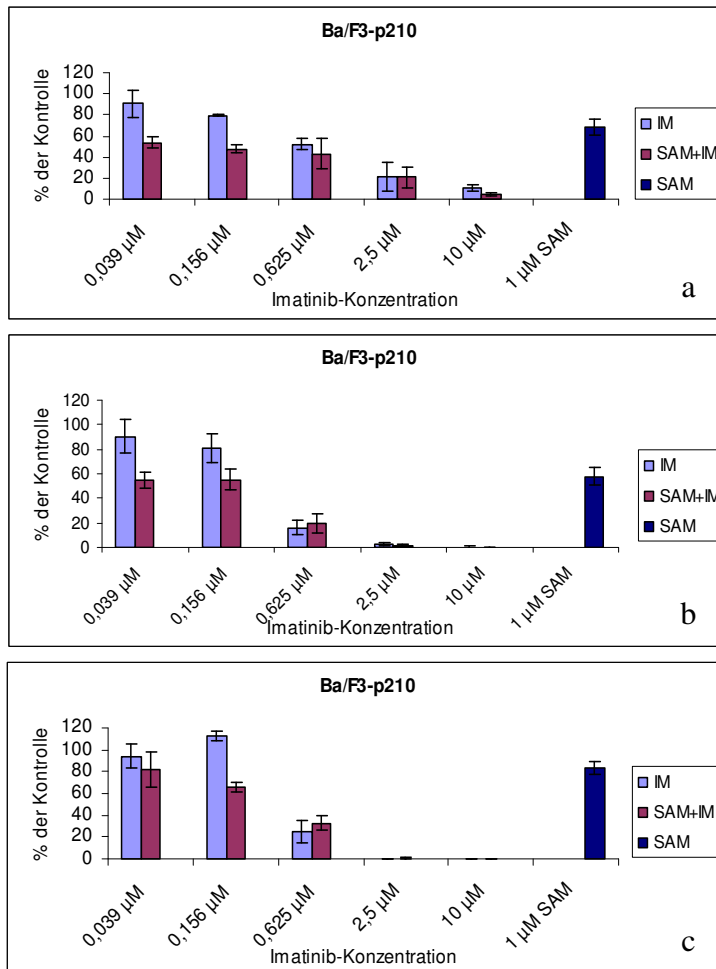


Abbildung 31:

Kombinationstherapie

Ba/F3-p210

31a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

31b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

31c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

• Ba/F3-p210-E255K

Die Bcr-Abl-positive Zelllinie Ba/F3-p210-E255K wies durch ihre Mutation eine partielle Imatinibresistenz auf, was sich in dem Verlauf der Zellzahlen widerspiegelte. An dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe sank die Zellzahl bei der Imatinibtherapie auf 79,45% ab. Eine Ausnahme bildete die toxische Imatinibkonzentration von 10 µM. Hier lag die Zellzahl bei 39,73% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 32a). An dem zweiten und dritten Tag nach der Imatinibzugabe konnte nur eine geringe Zellzahlreduktion ermittelt werden. Es wurden Werte bei den Konzentrationsstufen bis 2,5 µM von durchschnittlich 70% erreicht (Abb. 32b, c).

Die Zellzahlen der Kombinationstherapie lagen an allen drei Messzeitpunkten deutlich unter den Zellzahlen der Imatinibtherapie. An dem ersten Messzeitpunkt lag ein konzentrations- und zeitabhängiger Abfall der Zellzahl vor. Es wurden Werte von 73,61% (0,039 µM) bis 33,33% (10 µM) erreicht (Abb. 31a). An dem zweiten Tag nach der Imatinibbehandlung fiel die Zellzahl auf 33,33% (P=0,012) bei 2,5 µM im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen

ab (Abb. 31b). An dem dritten Tag betrug der Anteil der vitalen Zellen bei 2,5 μ M Imatinib 25,31% (P=0,02) (Abb. 32c).

Die alleinige SAM486A-Therapie bewirkte eine Zellzahlreduktion am ersten Messzeitpunkt auf 68,49%, am zweiten Tag auf 46,76% und am dritten Tag nach der Behandlung auf 29,23% (Abb. 32a-c). Die proliferationshemmende Wirkung der Kombinationstherapie wurde an dem zweiten und dritten Behandlungstag von SAM486A ausgeübt (Abb. 32b, c). Bei dem Vergleich der Daten der Kombinationstherapie mit den Daten der SAM486A-Monotherapie, traten vereinzelt signifikante Werte auf (siehe Anhang Tab. 25).

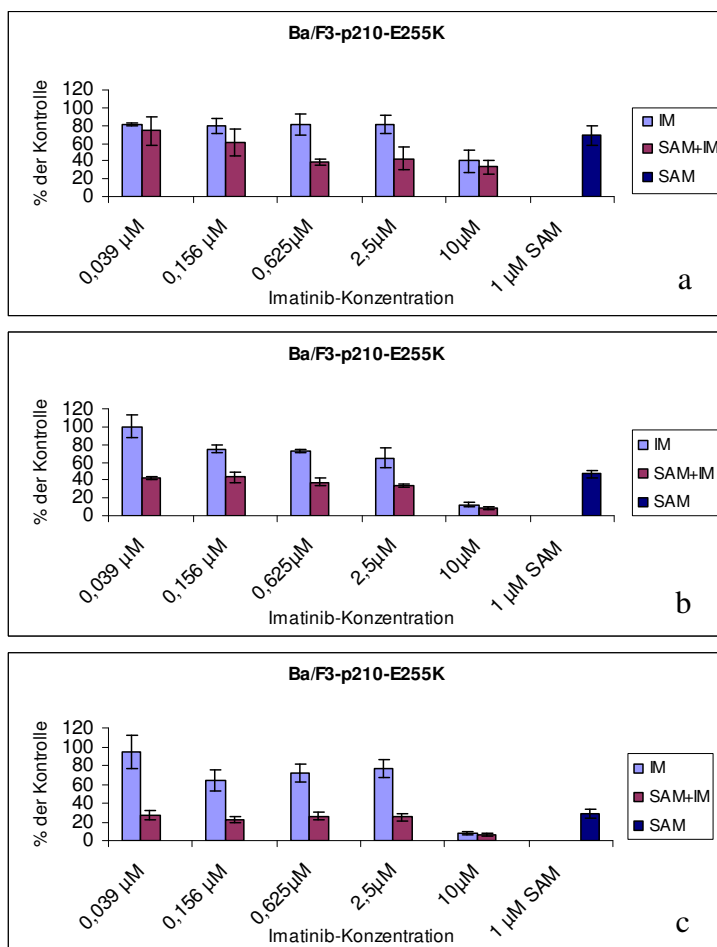


Abbildung 32:
Kombinationstherapie
Ba/F3-p210-E255K

32a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

32b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

32c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

• Ba/F3-p210-T315I

Bei der Zelllinie Ba/F3-p210-T315I lag durch die Mutation eine sehr hohe Imatinibresistenz vor. Dies wurde durch die Zellzahlen der Imatinibtherapie an allen drei Messzeitpunkten bestätigt. An den ersten beiden Tagen nach der Imatinibzugabe fiel die Zellzahl erst ab einer Imatinibkonzentration von 2,5 μ M auf 88,03% (Abb. 33a) beziehungsweise 94,25% (Abb. 33b) ab. An dem dritten Tag sank die Zellzahl unter der Imatinibtherapie auf maximal 76,05% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ab.

Die Kombinationstherapie lieferte deutlich geringere Zellzahlen im Vergleich zu der Imatinibtherapie. An dem ersten Messzeitpunkt lagen die Zellzahlen der Kombinationstherapie

unter denen der beiden Monotherapien. An dem zweiten Tag nach der Imatinibzugabe wurden die Zellzahlen durchschnittlich auf 50%, an dem dritten Messzeitpunkt bei 33% gesenkt. Der Effekt der Kombinationstherapie auf die Zellen wurde an diesen Behandlungstagen von SAM486A vermittelt, da die Mutation T315I Imatinib keinen Angriffspunkt bietet. Somit kann nicht von einem synergistischen Effekt der beiden Substanzen gesprochen werden.

Die SAM486A-Monotherapie bewirkte eine Zellzahlreduktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen am dritten Messzeitpunkt auf 37,25%. Hier zeigte sich ein sehr sensibles Ansprechen der imatinibresistenten Zelllinie Ba/F3-p210-T315I auf den Hypusinierungs-inhibitor SAM486A.

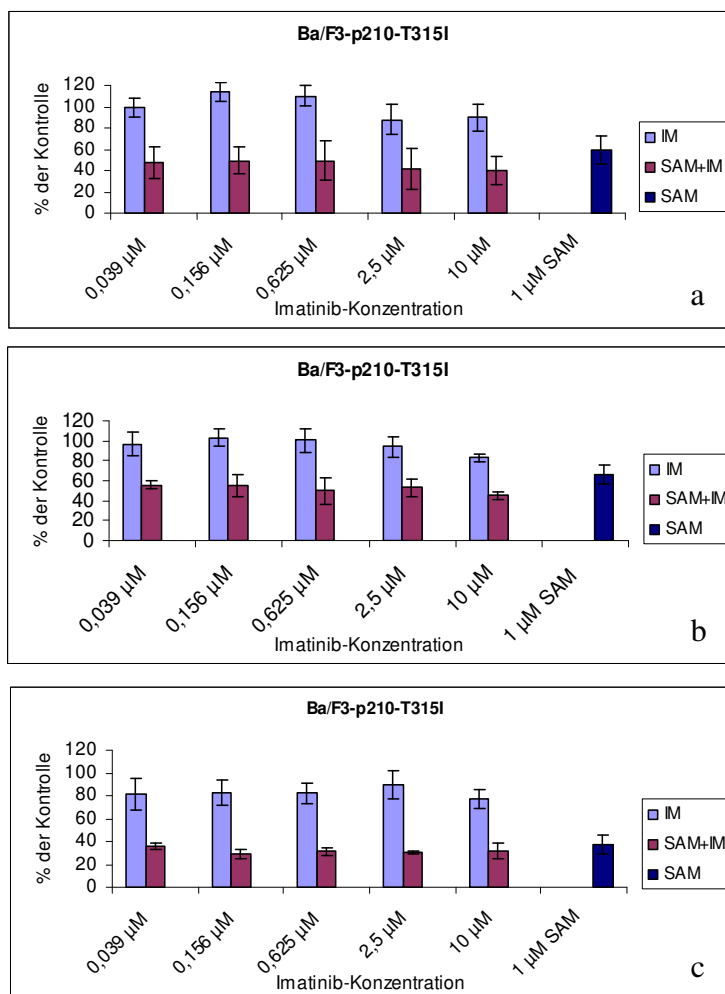


Abbildung 33:
Kombinationstherapie
Ba/F3-p210-E255K

33a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

33b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

33c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

4.5.2. Humane Zelllinie

- **HL60**

Diese Bcr-Abl-negative Zelllinie sprach nicht auf eine Imatinibtherapie an (Abb. 34a-c). Die Zellzahlen der Kombinationstherapie wiesen minimal geringere Werte auf. Bei der mittleren Konzentration von 0,625 µM Imatinib wurden Zellzahlen an dem zweiten Messzeitpunkt von 79,36% (P=0,525), an dem dritten Messzeitpunkt von 70,91% (P=0,15) erreicht (Abb. 34b, c).

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kombinationstherapie im Vergleich mit den beiden Monotherapien aufweisen (siehe Anhang Tab. 28, 29). Anhand der Zellzahlabnahme an dem zweiten und dritten Behandlungstag konnte ein deutlicher proliferationshemmender Effekt zugunsten der Kombinationstherapie aufgezeigt werden. Die Zellzahlen der Kombinationstherapie lagen durchschnittlich 15% unter denen der beiden Monotherapien (Abb. 34b, c). Die SAM486A-Monotherapie bewirkte eine Zellzahlreduktion an dem letzten Messzeitpunkt auf 86,97% (Abb. 34c).

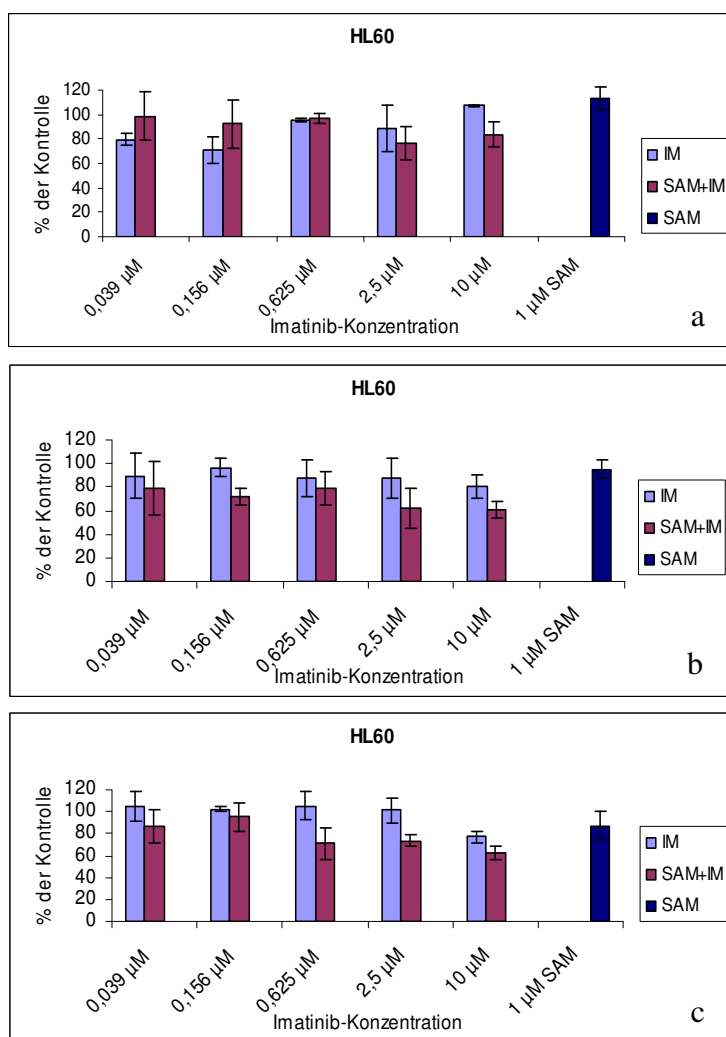


Abbildung 34:
Kombinationstherapie HL60

34a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

34b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

34c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

• K562

Die Bcr-Abl-positive Zelllinie K562 zeigte über alle drei Messzeitpunkte ein sensibles Ansprechen auf alle drei Behandlungsoptionen. An dem zweiten und dritten Behandlungstag wurde die Zellzahl durch die Imatinibbehandlung stark gesenkt. Der Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen betrug an dem zweiten Tag bei 0,039 µM 64,42% und wurde zunehmend konzentrationsabhängig auf 5,52% (2,5 µM) gesenkt (Abb. 35b). An dem dritten Behandlungstag existierten nur noch 0,38% (0,0625 µM) der vitalen Zellen (Abb. 35c). Die IC₅₀ nach 48 Stunden betrug für Imatinib 0,14 µM (Abb. 35b).

Die Zellzahlen der Kombinationstherapie lagen an dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe auf gleicher Höhe wie die Zellzahlen der alleinigen Imatinibtherapie. Hier betrug der Anteil der vitalen Zellen durchschnittlich 40% (Abb. 35a). An dem zweiten Messzeitpunkt lag der Anteil der vitalen Zellen bei 28,22% (0,039 μ M, P=0,018) im Vergleich zu der Imatinibtherapie. Die Signifikanz setzte sich am dritten Messzeitpunkt fort. Hier betrug die Zellzahl der Kombinationstherapie bei 0,039 μ M 22,35% (P=0,038).

Der Anteil der vitalen Zellen lag unter der SAM486A-Therapie am ersten Behandlungstag bei 57,47% und sank über 42,94% auf 30,68% am dritten Tag ab. Es lagen nur vereinzelte signifikante Daten zwischen den Wachstumsraten der Kombinationstherapie und denen der SAM486A-Monotherapie vor (siehe Anhang Tab. 31).

In den niedrigen Konzentrationsstufen konnte ein proliferationshemmender Effekt zugunsten der Kombinationstherapie aufgezeigt werden. Die Zellzahlen der Kombinationstherapie lagen bei 0,039 μ M und 0,156 μ M deutlich unter denen der beiden Monotherapien. Bei höheren Konzentrationsstufen wurde die Inhibition der Zellproliferation durch Imatinib vermittelt.

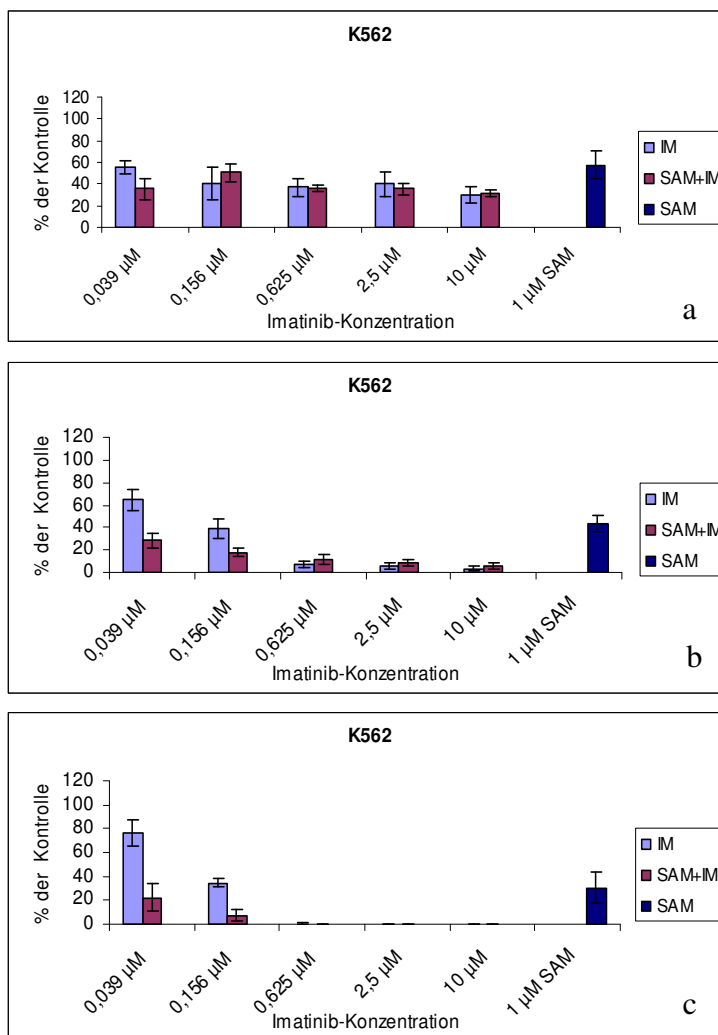


Abbildung 35:

Kombinationstherapie K562

35a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

35b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

35c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

4.6. MTT (Zytotoxizitätstest)

Mithilfe dieses Tests kann zwischen lebendigen und toten Zellen unter dem Einfluss spezifischer Substanzen unterschieden werden. Ziel der Versuchsdurchführung war es, die IC_{50} (mittlere Konzentration des Inhibitors, bei der 50% der Zellen unter der Behandlung leben) für eine Behandlung mit Imatinib, SAM486A und deren Kombination zu ermitteln.

Da sich in Vorversuchen (siehe Ergebnisse des Langzeitversuches) gezeigt hatte, dass die anti-proliferative Wirkung von SAM486A erst ab dem sechsten Behandlungstag wesentliche Effekte zeigt, wurden neben den unbehandelten Zellen zusätzlich SAM486A-vorbehandelte Zellen (sechs Tage) eingesetzt, um einen möglichen Synergismus mit Imatinib festzustellen.

Die IC_{50} -Daten für Imatinib sind in der Literatur für eine Einwirkzeit von 48 Stunden angegeben, weshalb die Einzelmessungen für Imatinib, SAM486A und der Kombinationstherapie jeweils nach 48 Stunden nach dem etablierten Versuchsaufbau erfolgen sollten. Somit ist es nicht möglich gewesen eine Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A nach dem etablierten Versuchsprotokoll durchzuführen. In der Monotherapie mit SAM486A konnte in diesem kurzen Zeitraum keine gewünschte Wirkung erzielt werden. Weiterhin konnten leider keine verwertbaren Ergebnisse durch den Einsatz der SAM486A vorbehandelten Zellen erhoben werden.

Als Beispiel der durchgeführten MTT's wird die Behandlung der Zelllinie Ba/F3-p210 mit Imatinib gezeigt. Hier ergab sich für die Zelllinie Ba/F3-p210 unter der Imatinibbehandlung eine IC_{50} von 0,23 μ M. Für die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden ebenfalls die in der Literatur angegebenen IC_{50} -Daten für die Imatinibbehandlung ermittelt.

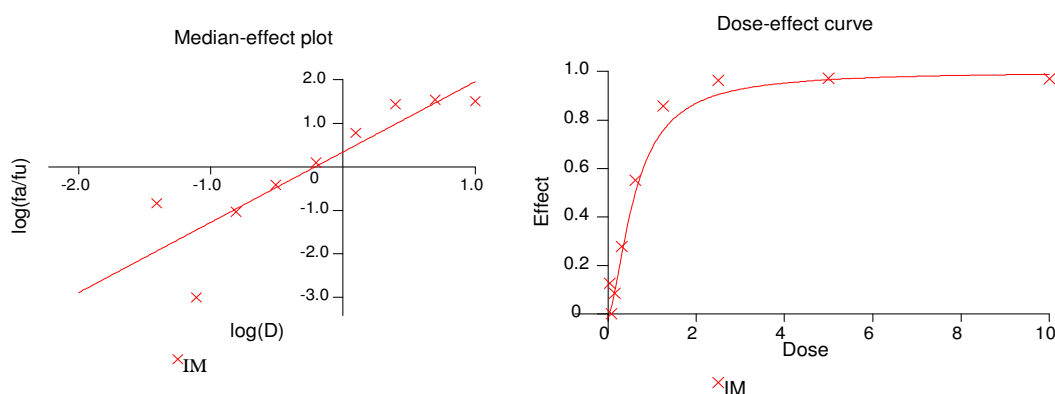


Abbildung 36: MTT mit Ba/F3-p210 unter Imatinib

4.7. Primärmaterial

4.7.1. Monotherapie mit SAM486A

4.7.1.1. Gesunde CD34+ Spender

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten diente der Feststellung, ob eine durch SAM486A bedingte signifikante zeitliche und konzentrationsabhängige Zellzahlabnahme im Verlauf des Versuchs eintritt.

• Patient 1

Ab einer Konzentration von 1 μM SAM486A lag eine relevante zeitliche und konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion durch SAM486A vor (Abb. 37a, b). Ab dieser Konzentration fiel die Zellzahl vitaler Zellen von 70,83% am dritten Behandlungstag auf 16,41% (P=0,027) an dem zehnten Behandlungstag ab. Bei der Therapie mit 2 μM SAM486A wurden die Zellen an dem dritten Behandlungstag auf 25% gesenkt. Im zeitlichen Verlauf sank die Zellzahl am letzten Behandlungstag weiter auf 2,34% (P=0,008). Bei der Höchstkonzentration von 4 μM SAM486A lagen am Versuchsende 0,78% vitale Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vor (Abb. 37b).

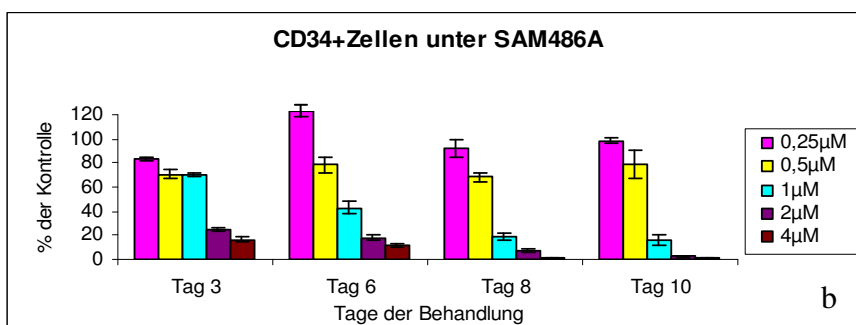
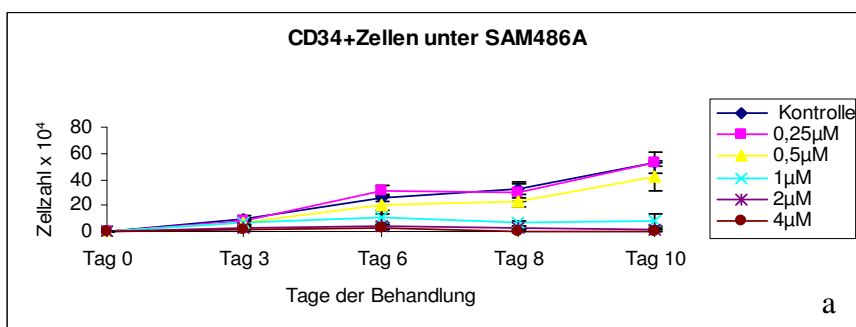


Abbildung 37:

SAM486A-Therapie,
CD34+ Zellen,

Patient 1

37a: Wachstumskurven

37b: % der Kontrolle

Patient 1	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μM	0,432	0,262	0,627	0,299
0,5 μM	0,335	0,263	0,004	0,130
1 μM	0,000	0,099	0,031	0,027
2 μM	0,026	0,039	0,018	0,008
4 μM	0,062	0,022	0,001	0,000

Tabelle 12: P-Werte, Vergleich unbehandelter Zellen mit SAM486A-Behandlung, Rot: Signifikanz

• Patient 2

Bei diesem Patienten konnte anhand der Zellzahlreduktion der zeitliche und konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt von SAM486A bezüglich der Zellproliferation erkannt werden (Abb. 38a, b).

Eine deutliche Zellzahlreduktion trat ab 1 μM SAM486A ein. Hier wurde die Zellzahl der vitalen Zellen am dritten Behandlungstag auf 50% reduziert und lagen am zehnten Behandlungstag bei 24,16% ($P=0,041$). Bei den nächsten beiden höheren Konzentrationen wurden die Zellzahlen weiter in ihrem Wachstum gehemmt. So lagen bei der Höchstkonzentration von 4 μM SAM486A am zehnten Behandlungstag lediglich 0,37% ($P=0,001$) vitale Zellen vor (Abb. 38b). An Tag drei der Behandlung trat bei der höchsten Konzentrationsstufe ein signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf. Hier betrug der prozentuale Anteil der vitalen Zellen 11,36%. An den folgenden Behandlungstagen lagen ab 1 μM SAM486A durchgehend signifikante Unterschiede in der Zellproliferation vor (Tab. 13).

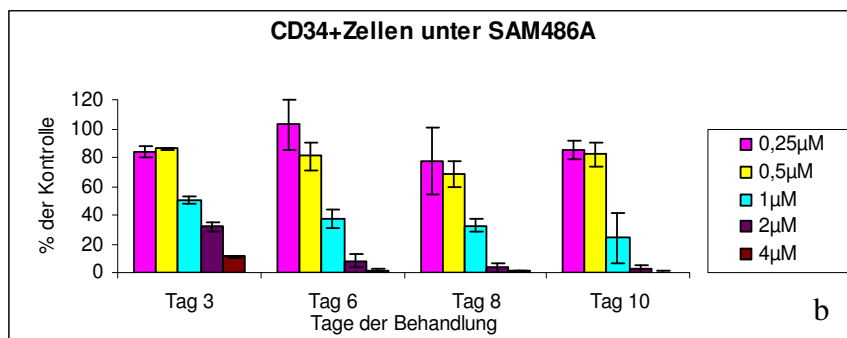
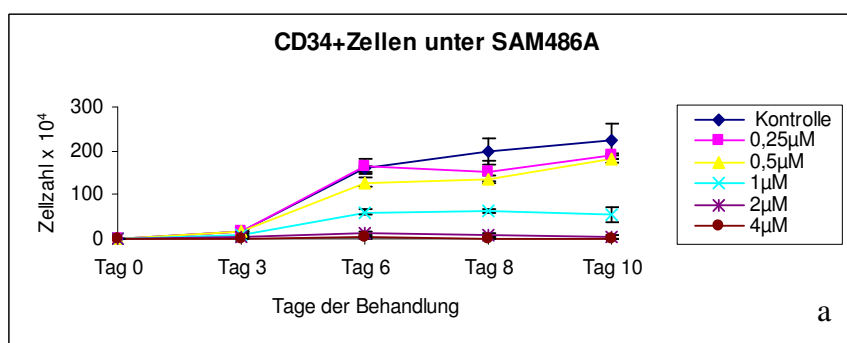


Abbildung 38:
SAM486A-Therapie,
CD34+ Zellen,
Patient 2

38a: Wachstumskurven
38b: % der Kontrolle

Patient 2	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μM	0,297	0,833	0,222	0,236
0,5 μM	0,340	0,035	0,079	0,252
1 μM	0,100	0,006	0,004	0,041
2 μM	0,061	0,007	0,013	0,024
4 μM	0,008	0,006	0,001	0,001

Tabelle 13: P-Werte, Vergleich unbehandelter Zellen mit SAM486A-Behandlung, Rot: Signifikanz

4.7.1.2. Bcr-Abl-positive CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)

• Patient 3

Anhand der Zellzahlreduktion konnte eine zeitliche und konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion, durch SAM486A vermittelt, auf die Bcr-Abl-positiven Zellen aufgezeigt werden (Abb. 39a, b). Ab dem dritten Behandlungstag befanden sich auch hier ab 1 μM SAM486A signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. So lagen an dem dritten Behandlungstag bei 1 μM SAM486A 33,33% vitale Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen vor. Bei den beiden höheren Konzentrationsstufen konnten am dritten Behandlungstag 41,67% (2 μM SAM486A) und 27,78% (4 μM SAM486A) der vitalen Zellen detektiert werden (Abb. 39b).

Die Zellzahl bei 4 μM SAM486A stieg lediglich bis Tag 10 von einer Ausgangszellzahl von $0,1 \times 10^4$ auf $1,25 \times 10^4$ Zellen ($6,58 \times 10^5$ Kontrollzellen an Tag 10) an (Abb. 39a). Die zugehörigen statistischen Daten sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

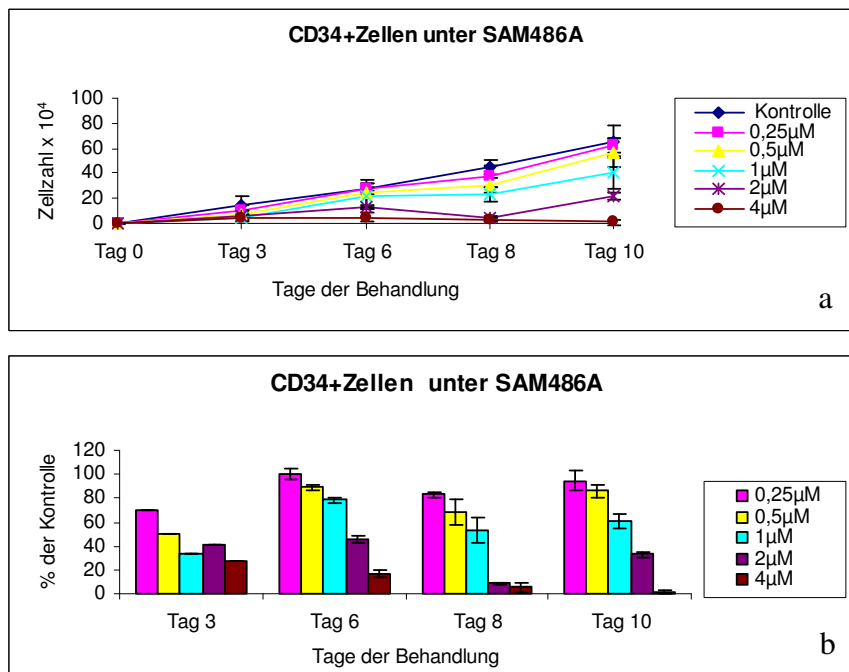


Abbildung 39:

SAM486A-Therapie,
CD34+ Zellen,
Patient 3

39a: Wachstumskurven

39b: % der Kontrolle

Patient 3	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μM	0,432	0,262	0,627	0,926
0,5 μM	0,335	0,263	0,004	0,130
1 μM	0,000	0,099	0,031	0,027
2 μM	0,026	0,039	0,018	0,008
4 μM	0,062	0,022	0,001	0,001

Tabelle 14: P-Werte, Vergleich unbehandelter Zellen mit SAM486A-Behandlung, Rot: Signifikanz

• Patient 4

Bei diesem Patienten war eine Inhibition der Zellproliferation ab dem sechsten Behandlungstag deutlich zu erkennen. Es ließ sich auch hier ein klarer Zusammenhang zwischen der Abnahme

der Zellzahl und der Höhe der SAM486A-Konzentration sowie der Einwirkungszeit der Substanz erkennen (Abb. 40). Bei 1 μM SAM486A lagen bei diesem Bcr-Abl-positiven CML-Patienten an dem dritten Behandlungstag 69,57% vitale Zellen vor. Diese werden auf 35,11% ($P=0,010$) am zehnten Behandlungstag reduziert. Bei 4 μM SAM486A nahm die Zellzahl von 21,74% an Tag drei der Therapie auf 11,7% am Ende des Versuchs ab (Abb. 40b). An dem dritten Behandlungstag war lediglich bei der höchsten Konzentrationsstufe von 4 μM ($P=0,004$) eine Signifikanz festzustellen. An den folgenden Behandlungstagen stieg der signifikante Wachstumsunterschied von Messzeitpunkt zu Messzeitpunkt um jeweils eine niedrigere Konzentrationsstufe an. Die zugehörigen statistischen Daten sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

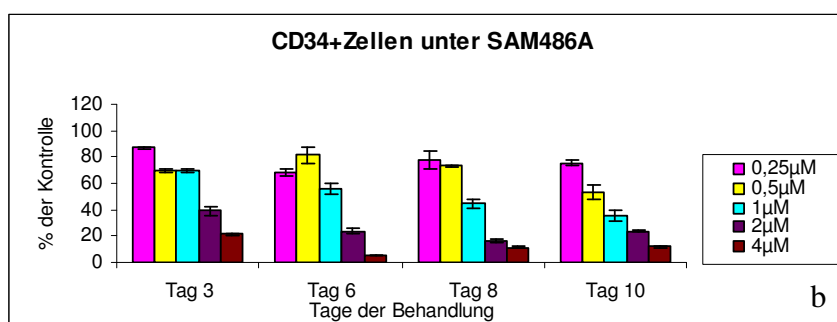
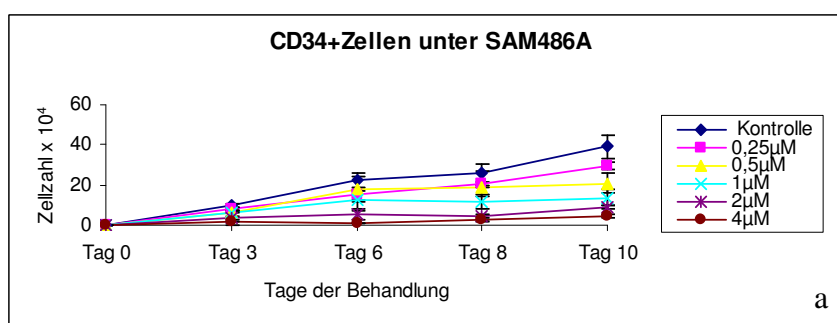


Abbildung 40:
SAM486A-Therapie,
CD34+ Zellen,
Patient 4

40a: Wachstumskurven
40b: % der Kontrolle

Patient 4	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μM	0,423	0,021	0,097	0,159
0,5 μM	0,053	0,515	0,073	0,009
1 μM	0,100	0,156	0,016	0,010
2 μM	0,178	0,047	0,021	0,003
4 μM	0,004	0,001	0,004	0,000

Tabelle 15: P-Werte, Vergleich unbehandelter Zellen mit SAM486A-Behandlung, Rot: Signifikanz

4.7.1.3. Bcr-Abl-negativer CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)

• Patient 5

Auch bei dem Bcr-Abl-negativen CML-Patienten zeigte sich eine zeitliche und konzentrationsabhängige Zellzahlreduktion (Abb. 41a, b). Die IC_{50} wurde bei diesem Patienten nach 72 Stunden Behandlung schon bei 0,5 μM SAM486A erreicht. Hier betrug der Anteil der vitalen Zellen bei 1 μM SAM486A 48,39% an dem dritten Tag der Therapie. Bei der höchsten Konzentrationsstufe von 4 μM SAM486A betrug der Anteil der vitalen Zellen 3,54% ($P=0,001$)

im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 41b). Signifikante Daten wurden ab dem dritten Behandlungstag erreicht (Tab. 16).

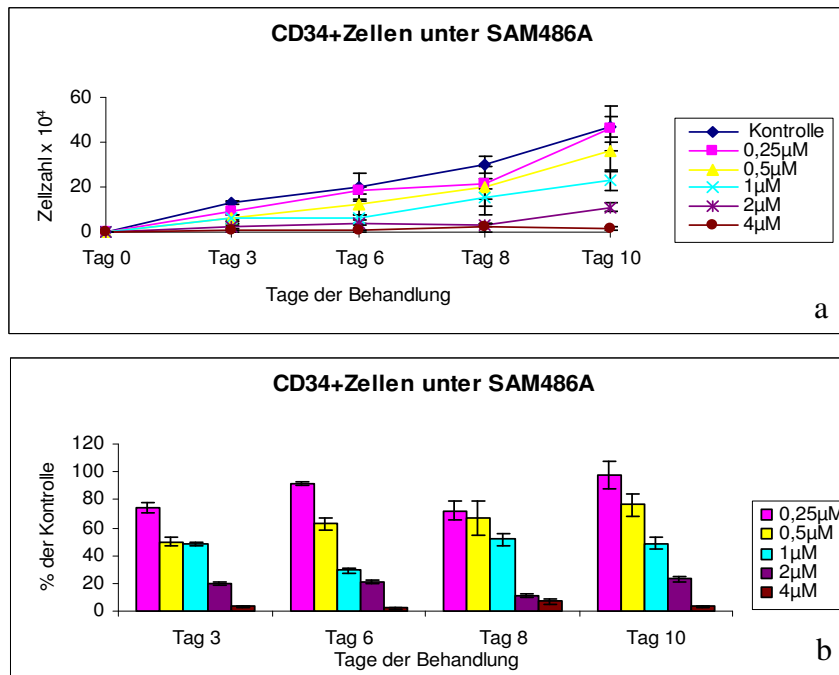


Abbildung 41:
SAM486A-Therapie,
CD34+ Zellen,
Patient 5
41a:Wachstumskurven
41b: % der Kontrolle

Patient 5	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μM	0,364	0,674	0,205	0,819
0,5 μM	0,132	0,021	0,277	0,067
1 μM	0,015	0,084	0,026	0,149
2 μM	0,038	0,017	0,005	0,012
4 μM	0,001	0,001	0,014	0,006

Tabelle 16: P-Werte, Vergleich unbehandelter Zellen mit SAM486A-Behandlung, Rot: Signifikanz

Zusammenfassend ergab sich in diesem Versuch, dass der indirekte Hypusinierungsinhibitor SAM486A sowohl auf gesunde Zellen als auch auf Bcr-Abl-positive und Bcr-Abl-negative Zellen von CML-Patienten in der Monotherapie ab einer Konzentration von 1 μM ab dem dritten Behandlungstag einen statistisch signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen lieferte.

4.8.1. Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A

Der Versuch diente der Feststellung, ob es bei den humanen CD34+ Zellen einen synergistischen Effekt bezüglich der Wirkung von Imatinib und SAM486A in der Kombinationstherapie gibt. Als Kombinationstherapie wurden verschiedene Imatinibkonzentrationen mit einer subapoptotischen SAM486A-Konzentration von 0,5 μM eingesetzt. Zur Klärung der Fragestellung wurden die jeweiligen Daten der Imatinibbehandlung mit der Kombinationsbehandlung verglichen. Traten signifikante Wachstumsunterschiede auf, wurden die Daten mit der SAM486A-Monotherapie verglichen (siehe Anhang Tab. 35-40). So konnte gezielt eine

Aussage getroffen werden, ob ein Synergismus zwischen den beiden Medikamenten vorliegt oder ob die Wirkung alleine durch SAM486A bedingt ist.

4.8.1.1. Gesunde Spender von CD34+ Zellen

• Patient 1

An dem ersten Tag nach der Imatinibtherapie wurde der Anteil der lebenden Zellen auf 70% (0,039 μM) beziehungsweise auf 35% (10 μM) reduziert. Die Zellzahlen für die Kombinationstherapie lagen bei 85% (0,039 μM) und fielen bis auf 50% (10 μM) ab (Abb. 42a). An den weiteren Behandlungstagen kam es sowohl bei der Imatinibtherapie als auch bei der Kombinationstherapie zu einem stufenförmigen Abfall der Zellzahl mit steigender Konzentrationsstufe (Abb. 42b, c). An dem dritten Behandlungstag lagen die Zellzahlen bei beiden Behandlungsoptionen auf gleich niedrigem Niveau. Bei der Konzentrationsstufe von 0,039 μM Imatinib lagen in beiden Fällen 69,09% lebende Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vor. Bei der höchsten Konzentrationsstufe war ein Unterschied von 16% zwischen den beiden Behandlungsansätzen festzustellen, es bestand jedoch keine Signifikanz (Abb. 42c). An dem zweiten und dritten Behandlungstag ließ sich eine bessere Reduktion der Zellzahlen zugunsten der Kombinationstherapie aufzeigen (Abb. 42b, c).

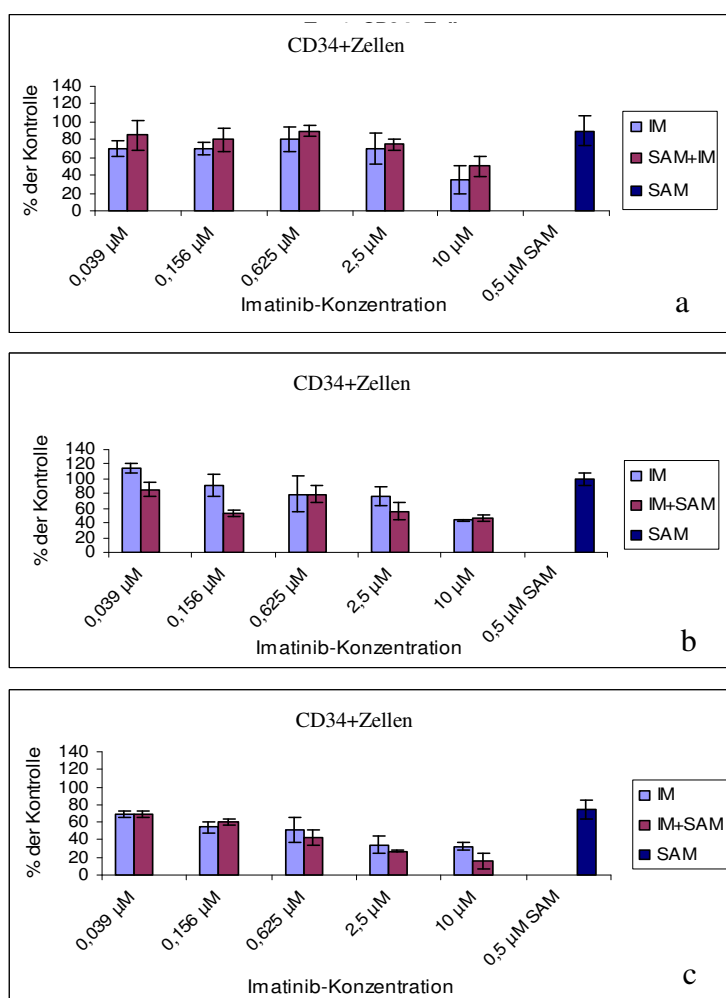


Abbildung 42:

Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A, CD34+Zellen des Patienten 1

42a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

42b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

42c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

- **Patient 2**

An dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe lagen die Zellzahlen für die Kombinationstherapie unter denen der Imatinibtherapie. Zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Behandlungsoptionen kam es an den ersten beiden Messtagen bei 0,039 μM ($P=0,026$, $P=0,001$) (Abb. 43a, b). Bei den höheren Konzentrationsstufen fiel die Zellzahl mit steigender Imatinibkonzentration stufenförmig ab. Der Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen lag bei der Kombinationstherapie durchschnittlich um 5-15% unter denen der Imatinibtherapie. Somit ließ sich hier ein Behandlungsvorteil bezüglich der Kombinationstherapie aufzeigen, auch wenn statistisch keine Signifikanzen vorlagen (Abb. 43 a-c).

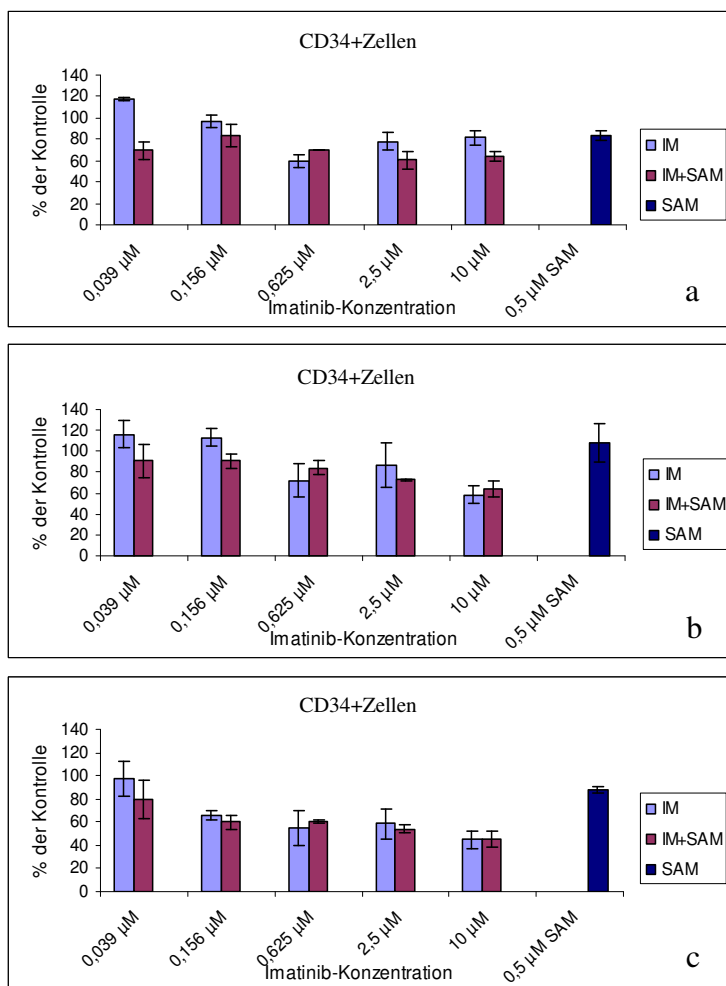


Abbildung 43:

Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A, CD34+Zellen des Patienten 2

43a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

43b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

43c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

4.8.1.2. Bcr-Abl-positive CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)

- **Patient 3**

An dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bei der Imatinibtherapie von 88,71% (0,039 μM) auf 62,9% (10 μM) gesenkt. Bei der Kombinationstherapie fielen die lebenden Zellen von 67,74% (0,039 μM) auf 53,23% (10 μM) ab. Diese Entwicklung setzte sich an den weiteren Messtagen fort. An dem dritten Behandlungstag wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bei der Imatinibtherapie von 66,67%

(0,039 μM) auf 26,14% (10 μM) gesenkt. Bei der Kombinationstherapie sanken die Werte im Vergleich zu der Imatinibtherapie von 60,78% auf 22,75% ab. An den weiteren Behandlungstagen war sowohl bei der Imatinibtherapie als auch bei der Kombinationstherapie eine zeitliche und konzentrationsabhängige Abnahme der Zellproliferation zu erkennen. An allen drei Messzeitpunkten lag die Anzahl der vitalen Zellen der Kombinationstherapie unter der der Imatinibtherapie (Abb. 44 a-c). Die SAM486A-Monotherapie mit 0,5 μM führte bei diesem Patienten zu keiner Zellzahlreduktion. Somit bewirkte die Kombinationstherapie eine deutlich effektivere Zellzahlreduktion im Vergleich zu den beiden Monotherapien.

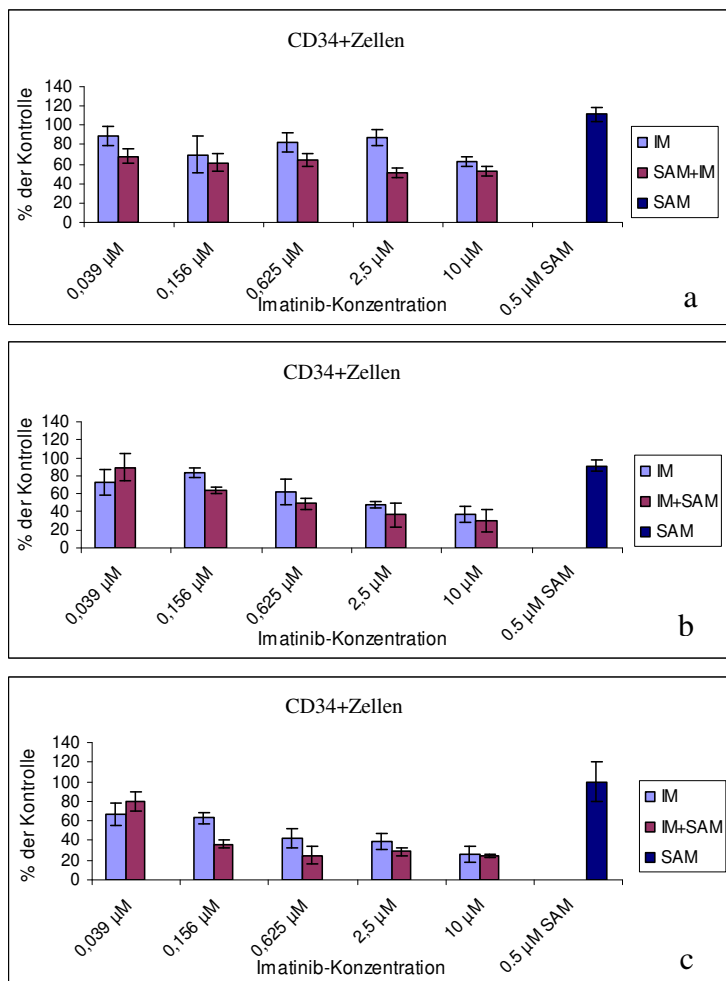


Abbildung 44:

Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A, CD34+Zellen des Patienten 3

44a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

44b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

44c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

• Patient 4

Bei diesem Patienten konnte ein zeitlicher und konzentrationsabhängiger Effekt bezüglich der Zellproliferation bei der Imatinibtherapie sowie der Kombinationstherapie festgestellt werden (Abb. 45 a-c). Bei der niedrigsten Konzentration von 0,039 μM lagen der Anteil der vitalen Zellen bei der Kombinationstherapie deutlich unter dem der Imatinibtherapie. In den höheren Konzentrationsbereichen sank der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bei diesen beiden Behandlungsoptionen in gleichem Maße ab. An dem dritten Behandlungstag betrug der Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen durchschnittlich 30% bei

beiden Therapiemöglichkeiten. In diesem Fall ließ sich kein Vorteil hinsichtlich der Kombinationstherapie aufzeigen.

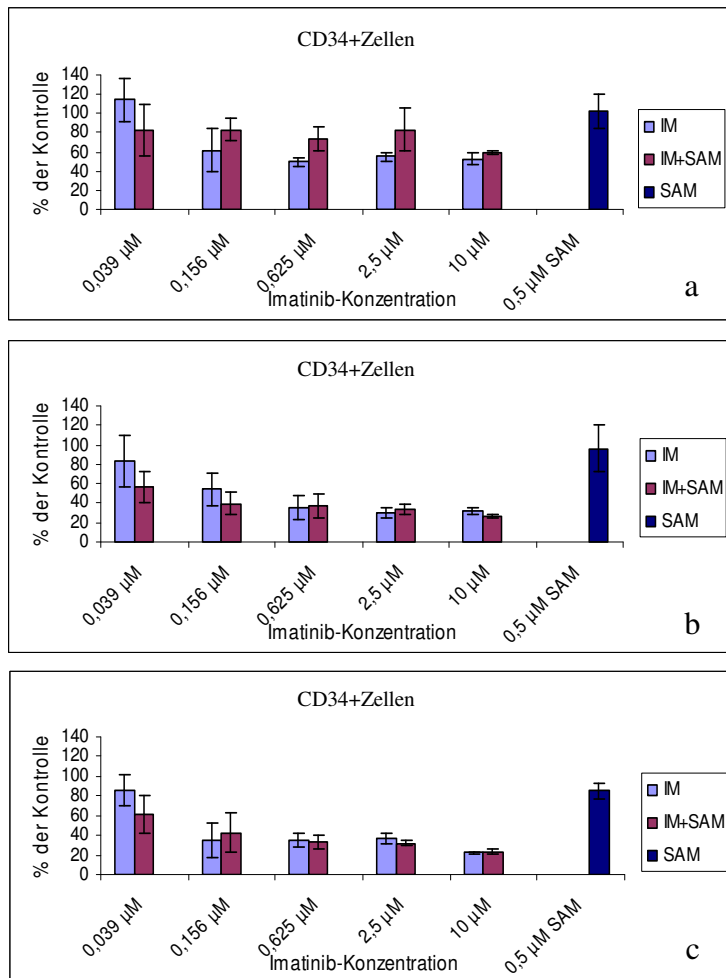


Abbildung 45:

Kombinationstherapie mit Imatinib und SAM486A, CD34+Zellen des Patienten 4

45a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

45b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

45c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

4.8.1.3. Bcr-Abl-negativer CD34+ Spender (CML-Erstdiagnose)

• Patient 5

An dem ersten Tag nach der Imatinibzugabe zeigten die Zellzahlen des Bcr-Abl-negativen CML-Patienten kein Ansprechen auf eine Imatinibtherapie. Im Vergleich dazu lagen die Werte für die Kombinationstherapie bei 80% (Abb. 46a). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsmöglichkeiten. An dem zweiten Messtag lagen die Werte für die Imatinibtherapie konzentrationsunabhängig bei durchschnittlich 85%. Bei der Kombinationstherapie wurde bei 10 µM Imatinib der niedrigste Anteil von vitalen Zellen gezählt. Hier betrug ihr Anteil 55% (Monotherapie 70%). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungen lag bei 0,156 µM vor. Hier konnte der Anteil der lebenden Zellen der Monotherapie auf 83% und der der Kombinationstherapie auf 67% ($P=0,007$) reduziert werden (Abb. 46b).

An dem dritten Behandlungstag lagen die Werte für die Imatinibtherapie bei 2,5 µM mit 72,22% unter denen der Kombinationstherapie mit 81,75% ($P=0,025$). Bei der

Konzentrationsstufe von 10 μM kehrte sich das Verhältnis um. Hier lagen die Werte der Kombinationstherapie mit 46,03% unter denen der Imatinibtherapie mit 57,94% ($P=0,008$) (Abb. 46c). In allen drei Fällen, in denen ein signifikanter Unterschied zwischen der Imatinibtherapie und der Kombinationstherapie auftrat, lag auch ein signifikanter Unterschied zwischen der SAM486A-Monotherapie und der Kombinationstherapie vor. Aufgrund der geringen Anzahl der signifikanten Ereignisse, kann nicht von einem Synergismus zwischen SAM486A und Imatinib ausgegangen werden.

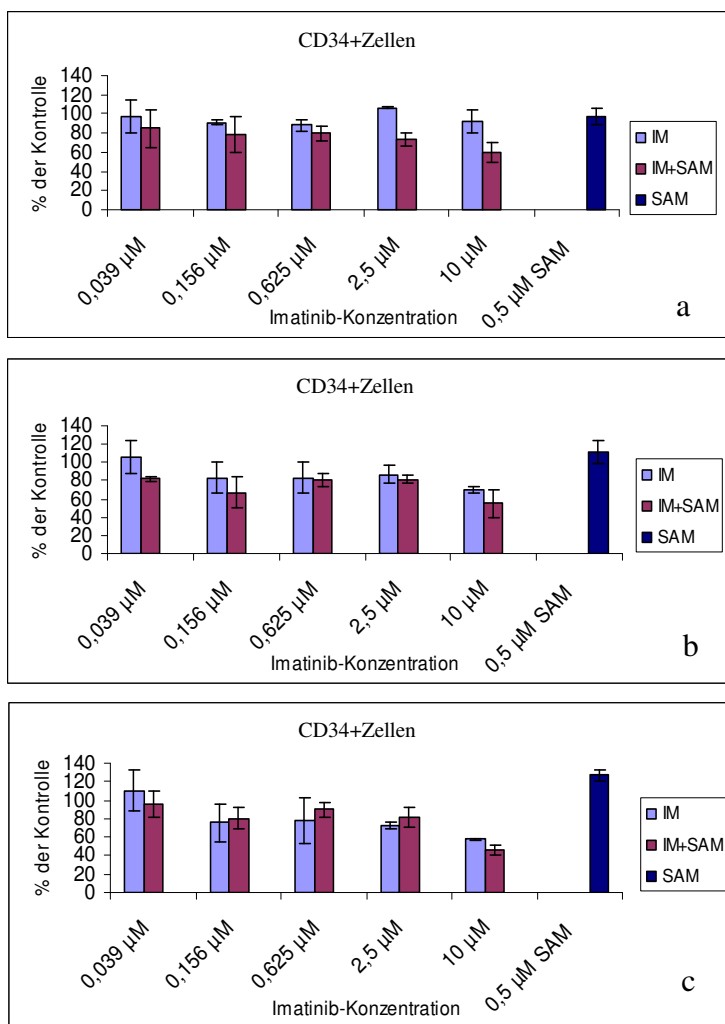


Abbildung 46:
Kombinationstherapie mit
Imatinib und SAM486A,
CD34+Zellen des Patienten 5

46a: Tag 1 nach Imatinibzugabe

46b: Tag 2 nach Imatinibzugabe

46c: Tag 3 nach Imatinibzugabe

5 Diskussion

Hypusinierungsinhibitoren greifen in den Polyaminstoffwechsel ein und blockieren den Vorgang der Hypusinierung des eukaryoten Initiationsfaktor 5a (eIF-5A), der für die Proteinbiosynthese eukaryotischer Zellen essentiell ist [37, 47, 49]. Es werden direkte von indirekten Hypusinierungsinhibitoren unterschieden. Zu den direkten Inhibitoren zählen Substanzen, welche die unmittelbar an der Hypusinierung beteiligten Enzyme (DHH, DHS) inhibieren. SAM486A zählt zu den indirekten Inhibitoren, da es zu einem früheren Zeitpunkt in den Polyaminstoffwechsel eingreift und die Bildung der für die Hypusinierung benötigten Substanzen (Spermidin) blockiert. Da Tumorzellen und somit Leukämiezellen eine erhöhte Zellproliferationsrate aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass vor allem diese Zellen durch SAM486A und andere Hypusinierungsinhibitoren in ihrem Wachstum gehemmt werden könnten.

Bisher konnte die bedeutungsvolle Rolle von eIF-5A und dessen Inhibition durch SAM486A in verschiedenen Zellen festgestellt werden [34, 35, 36, 42]. In dieser Arbeit wurde das Ansprechen der CML-Zellen auf den indirekten Hypusinierungsinhibitor SAM486A im Hinblick auf die Ausprägung des Merkmals Bcr-Abl und der verschiedenen Mutationen der Kinasedomäne untersucht. In diesen Bcr-Abl-positiven Zellen wird eine erhöhte Expression von eIF-5A vermutet, was zu einem guten Ansprechen der Zellen auf SAM486A führen sollte [1, 36, 42].

Die Leukämiezellen verfügen, wie oben beschrieben, über einen endogenen Pool an eIF-5A, der während der Behandlung aufgebraucht werden kann. Weiterhin besitzt eIF-5A eine lange Halbwertszeit bezüglich seines Abbaus, weshalb eine ausreichend lange Therapiezeit notwendig ist [23]. Dieser Sachverhalt bestätigte sich in den hier erhobenen Ergebnissen. Die Zellen wiesen zu Beginn der Behandlung kaum eine veränderte Wachstumskinetik auf, wie es in dem Kurzzeitversuch an dem dritten Behandlungstag zu sehen ist. Aus den erhobenen Daten der Langzeitkultivierung ist jedoch zu entnehmen, dass die Zellen durchschnittlich erst ab dem sechsten Behandlungstag mit einer signifikanten Zellzahlreduktion auf SAM486A reagierten. In Studien hat sich eine dreiwöchentliche Therapie über jeweils fünf Tage etabliert, die zu einem guten Ansprechen bei soliden Tumoren und Lymphomen geführt hat [52]. Nach diesem Zeitraum ist die Proteinbiosynthese durch den Verlust beziehungsweise durch die Verminderung des für eIF-5A essentiellen Hypusins eingeschränkt und die Zellen können die notwendigen Proteine für ihr Überleben nicht mehr ausreichend produzieren.

Die Frage nach der Abhängigkeit des Therapieansprechens von der Bcr-Abl-Expression sollte in den verschieden aufgebauten Versuchen geklärt werden. So war in dem Kurzzeitversuch eine Tendenz dahingehend zu sehen, dass alle eingesetzten Bcr-Abl-positiven Zellen sensitiver auf SAM486A ansprachen als die Bcr-Abl-negativen Zelllinien HL60 und Ba/F3+IL3. In diesem

Versuch traten an dem dritten Behandlungstag bei den Mutationen Ba/F3-p210-E255K und Ba/F3-p210-T315I signifikante Wachstumsunterschiede ab einer Konzentration von 0,25 μM SAM486A auf. Diese setzten sich an dem fünften Behandlungstag kontinuierlich fort. Die Bcr-Abl-negativen Zelllinien Ba/F3+IL3 und HL60 sowie die Bcr-Abl-positive Zelllinie Ba/F3-p210 sprachen erst an dem fünften Behandlungstag ab einer SAM486A-Konzentration von 0,5 μM beziehungsweise 1 μM mit einer signifikanten Wachstumsinhibition auf die Substanz an. Der inhibitorische Effekt führte bei den Bcr-Abl-positiven Zellen zu einem stärkeren Abfall der Zellproliferation, also zu einem besseren Ansprechen auf SAM486A. Am sensitivsten reagierten auf den indirekten Hypusinierungsinhibitor SAM486A die Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinien Ba/F3-p210-E255K, gefolgt von den Ba/F3-p210-T315I. Möglicherweise liefern diese Zelllinien die ausgeprägteste Veränderung der Polyamin-homöostase und bieten dadurch einen guten Angriffspunkt für SAM486A.

Somit wurde aus diesem Versuch deutlich, dass der endogene Pool der Polyamine sowohl den Bcr-Abl-positiven als auch den Bcr-Abl-negativen Zellen in unterschiedlicher Weise für einige Tage zur Verfügung steht und die Stoffwechselfvorgänge solange aufrecht erhalten werden können. Der indirekte Hypusinierungsinhibitor SAM486A konnte seine Wirkung erst nach dem intrazellulären Verbrauch dieser Proteine entfalten, wodurch der späte Wirkungseintritt an dem fünften Behandlungstag zu erklären ist. Dieses deckt sich mit der Erkenntnis, dass die Zytostase in zwei Abschnitten verläuft, wobei die späte Phase hypusinabhängig ist und somit erst in dieser Phase von SAM486A inhibiert werden kann [23].

Diese Tendenz wurde in dem Langzeitversuch mithilfe der Regressionsanalyse bestätigt. Mit zunehmender Zeit divergierten die Zellzahlen der jeweiligen Zelllinien stärker, da der endogene Pool an eIF-5A zunehmend mehr verbraucht und die Neusynthese durch SAM486A verhindert wurde. Die maximale Differenz zwischen der Zellzahl der Kontrollzellen und der behandelten Zellen wurde am Ende des Versuchs erreicht. Insgesamt gesehen ergab die Regressionsanalyse des Langzeitversuchs, dass alle Zelllinien unabhängig von dem Merkmal Bcr-Abl im Vergleich zwischen den jeweiligen Kontrollen und den zugehörigen SAM486A behandelten Zellen einen signifikanten Wachstumsunterschied aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme der Ba/F3-p210-T315I die Bcr-Abl-positiven Zellen im Vergleich zu den Bcr-Abl-negativen Zelllinien signifikant besser mit einer Zellzahlreduktion auf die SAM486A-Therapie ansprachen. Die Ba/F3-p210-T315I bildeten eine Ausnahme und zeigten im Vergleich zu der Bcr-Abl-negativen Zelllinie Ba/F3+IL3 eine gleiche Wachstumskinetik unter der SAM486A-Therapie. Aus den oben aufgeführten Daten ist jedoch zu entnehmen, dass SAM486A eine statistisch signifikante Proliferationshemmung auf die imatinibresistente Zelllinie Ba/F3-p210-T315I im Vergleich zu den meisten bisherigen Therapiemöglichkeiten ausübte [19, 40, 50].

In der FACS-Analyse wurden die Apoptose-/ Nekroseraten der jeweiligen Kontrollzellen mit denen der zugehörigen behandelten Zellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ba/F3+IL3

sowie die Ba/F3-p210-T315I der murinen Zelllinien keinen signifikanten Unterschied in der Apoptoserate im Gegensatz zu den anderen beiden Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinien Ba/F3-p210 und Ba/F3-p210-E255K aufwiesen. Bei der Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinie Ba/F3-p210-T315I fiel der berechnete Wert für das 5%-Signifikanzniveau nur gering aus dem signifikanten Grenzbereich ($P=0,061$). Weiterhin wurden die Apoptose-/ Nekroseraten der Bcr-Abl-positiven murinen Zelllinien mit den Bcr-Abl-negativen murinen Ba/F3+IL3 verglichen. Es zeigten sich statistisch signifikante Werte für den Vergleich zwischen Ba/F3+IL3 mit Ba/F3-p210 ($P=0,018$), Ba/F3-p210-E255K ($P=0,009$) und Ba/F3-p210-T315I ($P=0,011$).

Für die humanen Zellen konnte sowohl für den Vergleich zwischen den jeweiligen behandelten Zellen und ihren Kontrollen, sowie für den Vergleich zwischen den behandelten HL60 und den behandelten K562 kein signifikanter Unterschied bezüglich der Apoptose-/ Nekroserate festgestellt werden. Somit übt SAM486A eine Bcr-Abl-abhängige Wirkung nur bezüglich der murinen Leukämiezellen aus.

Weiterhin wurde untersucht, ob SAM486A den Bcr-Abl-abhängigen Effekt von Imatinib sensibilisieren kann und möglicherweise partiell imatinibresistente Zellen wie Ba/F3-p210-E255K durch eine Vorbehandlung mit SAM486A für Imatinib besser zugänglich werden. Somit wurden sowohl die etablierten Zelllinien sowie das Primärmaterial einer Kombinationstherapie bestehend aus $1 \mu\text{M}$ beziehungsweise $0,5 \mu\text{M}$ SAM486A und unterschiedlichen Imatinibkonzentrationen ($0,039 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$) unterzogen. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass es keinen therapeutisch relevanten Synergismus zwischen dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib und dem indirekten Hypusinierungsinhibitor SAM486A gibt. Auffällig war jedoch, dass die Zellzahlen der Kombinationstherapien in den Proliferationsassays häufig unter denen der jeweiligen Monotherapien lagen ohne einen synergistischen Effekt aufzuweisen. Somit scheint eine gleichzeitige Gabe der beiden Substanzen eine additive antiproliferative Wirkung auf die Leukämiezellen auszuüben, auch wenn keine statistischen Signifikanzen erzielt werden konnten.

Abschließend wurde das Ansprechen humaner CD34+ Zellen auf den Hypusinierungsinhibitor SAM486A getestet. Hier konnte gezeigt werden, dass SAM486A sowohl auf gesunde Zellen als auch auf Bcr-Abl-positiv und Bcr-Abl-negativ Zellen von CML-Patienten in der Monotherapie ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ einen statistisch signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen lieferte. Im Gegensatz zu den etablierten Zelllinien wirkte SAM486A bei den CD34+ Zellen ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ab dem dritten Behandlungstag. Der Wirkungseintritt der niedrigeren Konzentrationsstufen erfolgte entsprechend dem des Kurzzeit- und Langzeitproliferationsassays ab dem sechsten Behandlungstag. Anhand dieses Versuches kann hinsichtlich möglicher therapeutischer Konsequenzen darauf geschlossen werden, dass eine SAM486A-Behandlung im Rahmen einer chronischen myeloischen Leukämie mit $0,5 \mu\text{M}$ nicht zu einer relevanten dosislimitierenden

Knochenmarksuppression führen wird. Die hämatopoetischen Zellen wurden in ihrem Wachstum durch diese Konzentration maximal um 20% gehemmt. Eine Ausnahme bildeten die CD34+ Zellen des Bcr-Abl-negativen Patienten. Hierbei kam es zu einer stärkeren suppressiven Wirkung durch SAM486A. Als dosislimitierende Toxizität wird in der Literatur die Myelosuppression angegeben. Diese tritt ab einer Gabe von mehr als 102 mg/m²/Tag auf, was einer Plasmakonzentration von 11 µM SAM486A entspricht und deutlich unter dem Spektrum der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationsstufen liegt. Diese Dosierung wurde als maximale tolerable Dosis sowohl bei der Therapie des Kolorektalen Karzinoms in Kombination mit 5-Fluorouracil als auch in der Monotherapie von Tumoren des Kopf- und Halsbereiches, bei Lymphomen und des Ösophagus-Karzinoms ermittelt [46, 49]. Für den Einsatz der Substanz spricht weiterhin, dass SAM486A die Pharmakokinetik von anderen Chemotherapeutika, wie beispielsweise 5-Fluorouracil, nicht beeinflusst [49]. Im Hinblick darauf, dass es häufig erst bei einem Rezidiv der chronischen myeloischen Leukämie zu einer Imatinibresistenz kommt, wäre eine Kombinationstherapie zu Beginn der Erkrankung mit SAM486A vorstellbar. Hierdurch würde die imatinibresistente Untergruppe der malignen Zellen, die nach der Imatinibbehandlung durch den fehlenden Selektionsdruck expandieren kann, erreicht werden [7, 28, 32]. Unter den Imatinibresistenzen bei dem Versagen der Erstlinientherapie beträgt alleine der Anteil der Mutation T315I 10-20%. Diese Mutation zeigt kein Ansprechen auf alle bisher getesteten Medikamenten einschließlich der Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation wie Nilotinib, Dasatinib und Bosutinib [40]. Aufgrund der guten Wirksamkeit des indirekten Hypusinierungsinhibitors SAM486A auf die imatinibresistente Mutation Ba/F3-p210-T315I ist es denkbar, dass die Ergebnisse dieser Arbeit Ansatzpunkte für neue therapeutische Konzepte der imatinibresistenten Formen der chronischen myeloischen Leukämien liefern.

Vor diesem Hintergrund sollten weiterhin Untersuchungen zur Wirkung von SAM486A gegen die akute myeloische Leukämie erfolgen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SAM486A zu einer Zellzahlreduktion bei der Bcr-Abl-negativen Zelllinie HL60 führte, die Zellen einer akuten myeloischen Leukämie darstellt. Zusätzlich wäre es interessant nachzuweisen, ob der eukaryote Initiationsfaktor eIF-5A tatsächlich in allen Leukämiezellen vermehrt exprimiert wird und unter einer gewissen Therapiedauer mit Hypusinierungsinhibitoren abnimmt. Es könnte in diesem Rahmen untersucht werden, ob die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Mengen des eIF-5A bilden und dies das vermutete unterschiedliche Ansprechen auf SAM486A erklärt. Dies wäre durch den radioaktiven Einbau von ¹⁴C-Putrescin möglich, da es zur Synthese von Spermidin benötigt wird und die Menge des Spermidins mittels Western Blots gemessen werden könnte [45].

Weiterhin wäre es wichtig in vivo Versuche zu initiieren, um die notwendigen Plasmaspiegel zu ermitteln, die bei der imatinibresistenten Mutation Ba/F3-p210-T315I zu einer Abnahme der Leukämiezellen führen. So könnte diese Substanz eventuell bei der Therapie von Patienten mit

Imatinibresistenz und einer Resistenz gegen die Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation, zum Einsatz kommen, zumal Phase I- und Phase-II-Studien bezüglich anderer Tumorarten vollendet wurden und die Verträglichkeit des Medikaments untersucht ist [36, 38, 46, 49].

6 Zusammenfassung

In der Therapie der Bcr-Abl-positiven chronischen myeloischen Leukämie brachte der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib 2001 einen großen Erfolg und wird heute als Erstlinientherapie eingesetzt [22]. Es ergab sich jedoch eine Reihe von Resistenzen gegen diesen Tyrosinkinaseinhibitor, weshalb nach neuen therapeutischen Strategien geforscht werden muss.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des indirekten Hypusinierungsinhibitors S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase-Inhibitor (SAM486A) auf Leukämiezellen untersucht, um neue therapeutische Optionen gegen die Imatinibresistenz vermittelten Mutationen, insbesondere der Ba/F3-p210-T315I zu ermöglichen, welche nicht auf Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation ansprechen. Die Mutation T315I wird bei 10-20% der Patienten detektiert, bei denen es zu keinem Therapieerfolg unter der Erstlinientherapie mit Imatinib kommt [40].

Aufgrund der Tatsache, dass 95% der chronischen myeloischen Leukämiezellen Bcr-Abl-positiv sind, also das Philadelphia-Chromosom tragen, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Wirkung des Hypusinierungsinhibitors von dem Vorliegen des Merkmals Bcr-Abl abhängig ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Bcr-Abl-negative und Bcr-Abl-positive Leukämiezellen in verschiedenen Versuchen eingesetzt, um einen direkten Vergleich zu bekommen. So wurde als Bcr-Abl-negative Kontrolle im Bereich der murinen Zellen die Zelllinie Ba/F3+IL3 und als Bcr-Abl-positive murine Zellen die Zelllinien Ba/F3-p210, Ba/F3-p210-E255K und Ba/F3-p210-T315I eingesetzt. Für die humanen Zellen wurden die Bcr-Abl-negative Zelllinie HL60 sowie die Bcr-Abl-positive Zelllinie K562 verwendet. Weiterhin wurde das Ansprechen von gesunden und leukämischen humanen CD34+ Zellen auf SAM486A untersucht. Anhand der Versuchsergebnisse ist ersichtlich, dass SAM486A sowohl auf die Bcr-Abl-negativen als auch auf die Bcr-Abl-positiven Zelllinien einen antiproliferativen Effekt ausübt. Diese Erkenntnis ist hinsichtlich des Wirkmechanismus im Bereich des Polyaminstoffwechsels nicht unerwartet gewesen [36, 37, 45]. Allerdings konnte in dem Kurzzeitversuch, dem Langzeitproliferationsassay und der FACS-Analyse aufgezeigt werden, dass es unter der SAM486A-Behandlung zu einer signifikanteren Zellzahlreduktion von Bcr-Abl-positiven Zelllinien im Vergleich zu den Bcr-Abl-negativen Zelllinien kam.

In Anlehnung an die publizierten Daten [1] wurde ein besonderes Augenmerk auf die Kombinationstherapie bestehend aus Imatinib und SAM486A gelegt. Es konnte jedoch weder bei Bcr-Abl-positiven noch bei Bcr-Abl-negativen Zelllinien ein synergistischer Effekt zwischen Imatinib und SAM486A festgestellt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass SAM486A als Monotherapie einen statistisch signifikanten antiproliferativen Effekt auch in der hoch imatinibresistenten Zelllinie Ba/F3-p210-T315I erzielt, ergeben sich hier potentiell neue Möglichkeiten in der Therapie der Imatinib und der Zweitgenerations-Tyrosinkinaseinhibitoren resistenten chronischen myeloischen Leukämie.

7 Abkürzungsverzeichnis

AbeAdo:	5'-{[(Z)-4-Amino-2-butyl]methylamino}-5'-deoxyadenosin
AP:	Akzelerationsphase
ATP:	Adenosintri-phosphat
BK:	Blastenkrise
Bcr-Abl	Proteinexpression
<i>BCR-ABL</i>	Fusionsgen
CD:	Cluster of Differentiation
CML:	Chronische myeloische Leukämie
CP:	Chronische Phase
DdH₂O:	Doppelt destilliertes Wasser
DHH:	Desoxyhypusin-Hydroxylase
DHS:	Desoxyhypusin-Synthetase
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DSMZ:	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS:	Fötale Rinderserum
Flt3-Ligand:	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
G-CSF:	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GIST-Tumoren:	Gastrointestinale-Stromatumoren
IL:	Interleukin
IM:	Imatinib
MGBG:	Methylglyoxal-bis-guanylhydrazon
MDR:	Multi-Drug-Resistenz
MTT:	[3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid]
ODC:	Ornithindecaboxylase
PAPT:	Putrescin-Aminopropyl-Transferase
PBS:	Puffer (Phosphate Buffer Saline)
PCR:	Polymerasekettenreaktion
Ph-:	Philadelphia negative Chromosomen
Ph+:	Philadelphia positive Chromosomen
PI:	Propidiumjodid
RNA:	Ribonukleinsäure
RPMI:	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute

SAM486A:	S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase-Inhibitor
SAMdc:	S-Adenosyl-Methionin-Decarboxylase
SAPT:	Spermidin-Aminopropyl-Transferase
SCF:	Stem Cell Factor
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SZT:	Stammzelltransplantation
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TPO:	Thrombopoetin

8 Literaturverzeichnis

- [1] Balabanov S., Gontarewicz A., Ziegler P. et al, „Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A): a novel therapeutic target in Bcr-Abl-positive leukaemias identified by a proteomics approach”, *Blood*, 2007, 109(4): 1701-1711
- [2] Bartolovic K., Balabanov S., Hartmann U. et al, „Inhibitory effect of Imatinib on normal progenitor cells in vitro”, *Blood*, 2004, 103(2): 522-529
- [3] Brümmendorf T. H., Dragowska W., Zijlumans J.M. et al, „Asymmetric Cell Division Sustain Long-Term Hematopoiesis from Single-sorted Human Fetal Liver Cells”, *Journal of Experimental Medicine*, 1998, 188(6): 1117-1124
- [4] Bühling K. J., „Allgemeine und spezielle Pathologie“, 3. Auflage, Urban & Fischer, 2004
- [5] Calabrese, E. J., Blain R. B. „The single exposure carcinogen database: assessing the circumstance under which a single exposure to a carcinogen can cause cancer”, *Toxicological Science*, 1999, 50: 169-185
- [6] Chattopadhyay M. K., Park M. H., Tabor H., „Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine”, *PNAS*, 2008, 105(18): 6554-6559
- [7] Cortes J, Jabbour E., Kantarjian H. et al „Dynamics of Bcr-Abl kinase domain mutations in chronic myeloid leukaemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors”, *Blood*, 2007, 110(12): 4005-4011
- [8] Cortes J., Kim D. W., Raffoux E. et al, „Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or –intolerant patients with chronic myeloid leukaemia in blast phase“, *Leukaemia* 2008, 22(12): 2176-2183
- [9] Deininger M. W., „Milestones and Monitoring in Patients with CML Treated with Imatinib, *American Society of Hematology*, 2008: 419-26

- [10] Deininger M. W., Goldman J.M., Melo J.V., „The molecular biology of chronic myeloid leukaemia”, *Blood* 2000, 96(10): 3343-3356
- [11] Deininger M. W., Buchdunger E., Druker B. J., „The development of Imatinib as a agent for chronic myeloid leukaemia”, *Blood*, 2005, 105, 7: 2639-2653
- [12] Dempke W., „Chronische myeloische Leukämie“, aus Lehrbuch Hämato-/Onkologie, Verlag Hans Huber, 2007
- [13] Dorhout B., Odink M. F., de Hoog E. et al, „4-Amidinoindan-1-one-2'amidinohyrazone (CGP 48664A) exerts in vitro growth inhibitory effects that are not only related to S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMdc) inhibition”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1335(1-2): 144-152
- [14] Dörner K., „Klinische Chemie“, 5. Auflage, Thieme-Verlag, 2003
- [15] Dressmann M. A., Malinowski R., McLean L. A. et al, „Correlation of Major Cytogenetic Response with a Pharmagogenetic Marker in Chronic Myeloid Leukaemia Patients treated with Imatinib (STI571)”, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 2265-2271
- [16] Ehninger G., Freund M., Verkamp F., „Colloquium Onkologie 4“, Lukon-Vertragsgesellschaft GmbH, DGHO 2007
- [17] Goldman J. M., Melo J. V., „Bcr-Abl in Chronic Myelogenous Leukaemia-How does it work?”, *Acta Haematologica*, 2008, 119: 212–217
- [18] Goldman J. M., „How I treat chronic myeloid leukaemia in the imatinib era”, *Blood*, 2007, 110, 8: 2828-2837
- [19] Gontarewicz A., Balabanov S. , Keller G. et al „Simultaneous targeting of Aurora kinases and BBR-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] Hochhaus A., Baccarani M., Deininger M. et al, „Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukaemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib, *Leukaemia*, 2008, 22 (6): 1200-1206
- [21] Hochhaus A., Berger U., Hehlmann R., „Chronische myeloische Leukämie“, Unimed, 2. Auflage
- [22] Hunter T., „Treatment for chronic myelogenous leukaemia: the long road to Imatinib“, *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117(8): 2036-2043
- [23] Hyvönen M. T., Keinänen T. A., Cerrada-Gimenez M. et al, „Role of Hypusinated Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A in Polyamine Depletion induced Cytostasis“, *Jornal of Biological Chemistry*, 2007, 282(48): 34700–34706
- [24] Linke R., Dempke W., „Management of Imatinib-Resistant CML Patients“, *Onkologie*, 2007; 30: 574–580
- [25] Moore C. C., Martin E. N., Lee G., „Interference RNA–Liposome Complexes Reduce Inflammation and Increase Survival in Murine Models of Severe Sepsis and Acute Lung Injury“, *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 198: 1407–14
- [26] Jamieson C. H., „Chronic Myeloid Leukaemia Stem Cells“, *American Society of Hematology*, 2008, 436-442
- [27] Kantarjian H. M., Giles F., Gattermann N. et al, „Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukaemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance“, *Blood*, 2007, 110 (10): 3540-3546
- [28] Kavalierchik E., Goff D. Jamieson C. H. M., „Chronic Myeloid Leukaemia Stem Cells“, *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26(17): 2911-2915
- [29] Kesel A. B., „Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler“, Birkhäuserverlag, 1999

-
- [30] Le Coutre P., Ottmann O. G., Giles F., „Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with Imatinib resistant or - intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukaemia”, *Blood*, 2007, 11(4): 1834-1839
- [31] Luchessi A. D., Cambiaghia T. D., Alvesa A. S., „Insights on eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in the brain and aging”, *Brain Research*, 2008, 1228: 6-13
- [32] Mahon F. X., Deininger M., Schultheis B. et al, „Selection and characterization of Bcr-Abl positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance“, *Blood*, 2000, 96(3): 1070-1079
- [33] Moore C., Martin E. N., Lee G., „Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Small Interference RNA–Liposome Complexes Reduce Inflammation and Increase Survival in Murine Models of Severe Sepsis and Acute Lung Injury”, *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 198: 1407–14
- [34] Nishimura K., Murozumi K., Shirahata A. et al, „Independent roles of eIF-5A and polyamines in cell proliferation”, *Biochemical Society*, 2005, 385: 779-785
- [35] Niskanen E., Kallio A., McCann P. P. et al, Baker, „The role of Polyamine Biosynthesis in Hematopoietic Precursor Cells, Proliferation in Mice”, *Blood*, 1983, 61(4): 740-745
- [36] Paridaens R., Uges D. R., Barbet A. et al, „A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours“, *British Journal of Cancer*, 2000, 83(5): 594-601
- [37] Park M. H., „The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A), *The Japanese Biochemical Society*, 2006, 139: 161-169

- [38] Pless M., Belhadj H., Menssen D. et al, „Clinical Efficacy, Tolerability and Safety of SAM486A, a Novel Polyamine Biosynthesis Inhibitor in Patients with Relapsed or Refractory Non-Hodgkin’s Lymphoma: Results from a Phase II Multicenter Study”, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 1299-1305
- [39] Preiß J., Dornhoff W., Hagmann F.-G. et al, „Taschenbuch Onkologie - Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie“, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, 13. Auflage, 2006/07
- [40] Quintás-Cardama A., Kantarjian H., Cortes J., „Flying under the radar: the new wave of Bcr-Abl-inhibitors”, *Nature Reviews*, 2007, 6: 834-848
- [41] Ramirez P., Dipersio J. F., „Therapy Options in Imatinib Failures”, *The Oncologist*, 2008; 13: 424–434
- [42] Regness U., „CGP 48664A, a new S-Adenosylmethionine Decarboxylase Inhibitor with Broad Spectrum Antiproliferative and Antitumor Activity”, *Cancer Research*, 1994, 54: 3210-3217
- [43] Riccardi C., Nicoletti I., „Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry”, *Nature*, 2006, 1(3): 1458-1461
- [44] Sachs L., „Statistische Methoden“, 5. Auflage, Springer-Verlag 1982
- [45] Schäfer B., Hauber I., Bunk A. et al.: „Inhibition of Multidrug-Resistant HIV-1 by Interference with Cellular S-adenosylmethionine Decarboxylase Activity”, *The Journal of Infectious Diseases*, 2006, 11(7): 773-781
- [46] Siu L., Rowinsky E., Hammond L. et al, „A Phase I and Pharmacokinetic Study of SAM486A, a Novel Polyamine Biosynthesis Inhibitor, Administered on a Dailytimes-five every-three-week Schedule in Patients with Advanced Solid Malignancies”, *Clinical Cancer Research* , 2002, 8: 2157–2166
- [47] Sugiura M., Shafman T., Mitchell T. et al, „Involvement of spermidine in proliferation and differentiation in human promyelocytic leukaemia cells”, *Blood*, 1984, 63(5): 1153-1158

- [48] Takao K., Rickhag M., Hegardt C. et al, „Induction of apoptotic cell death by putrescin”, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2006, 38(4): 621-628
- [49] Van Zuylen L., Bridgewater J., Sparreboom A. et al, „Phase I and Pharmacokinetic Study of the Polyamine Synthesis Inhibitor SAM486A in Combination with 5-Fluorouracil/ Leucovorin in Metastatic Colorectal Cancer”, *Clinical Cancer Research*, 2004; 10: 1949–1955
- [50] Weisberg E., Manley P. W., Cowan-Jacob S. W., Hochhaus A. et al, „Second generation inhibitors of Bcr-Abl for the treatment of Imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia”, *Nature Reviews*, 2007, 7: 345-358
- [51] Welsch U., „Lehrbuch Histologie”, 1. Auflage, Urban & Fischer, 2003
- [52] Zhou H., Choi L., Lau H. et al, „Population pharmacokinetics/toxicodynamics (PK/TD) relationship of SAM486A in phase I studies in patients with advanced cancers”, *Journal of Clinical Pharmacology*, 2000; 40: 275-283

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. T. H. Brümmendorf (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens. Ferner möchte ich ihm für die Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und Handeln danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. A. Gontarewicz für die kompetente Betreuung bei der Durchführung der Experimente sowie der ständigen Offenheit für fachliche Fragen.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe „Telomer- und Stammzellbiologie“ danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Ute Brassat und Christine Baretz für die gute Einarbeitung in den Umgang mit Zellkulturen bedanken.

Der medizinisch technischen Assistentin Joanna Schmidt danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Zytotoxizitätstests und der Bereitstellung des Patientenmaterials.

Mein tiefster Dank gilt denen, die mir privat Unterstützung geleistet haben. Ein besonderer Dank geht an meine Eltern Burgel und Dr. rer. nat. Karl-Heinz Werner, die mir meinen Werdegang ermöglicht und mich während des ganzen Studiums liebevoll unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten	Anna-Maria Werner Geboren am 07.09.1982 in Bad Kreuznach
Schulbildung	1989-1992 Grundschule am Pleiser Wald 1992-1993 Grundschule Sottrum 1993-1994 Orientierungsstufe an der Haupt- und Realschule Sottrum 1995-2002 Ratsgymnasium Rotenburg/Wümme 2002 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
Universitäre Ausbildung	2002-2003 Chemiestudium Universität Bremen 2003 Beginn des Medizinstudium an dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf 2004/2005 Belegung des Wahlfaches „Einführungspraktikum Molekularbiologie“ 08/2005 Ärztliche Vorprüfung 2005-2008 Klinischer Abschnitt des Studiums 04/2007 Beginn der experimentellen Doktorarbeit in der <i>Hämatologischen Onkologie</i> des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf 2008-2009 Praktisches Jahr: Neurologie, kath. Marienkrankenhaus, Hamburg Innere Medizin, kath. Marienkrankenhaus, Hamburg Chirurgie, kath. Marienkrankenhaus, Hamburg 12/ 2009 Abschluss der Promotion 01/2010 Approbation als Ärztin
Famulaturen	2006 <i>Hämatologie und Onkologie</i> an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf 2006 <i>Gastroenterologie</i> am Klinikum Bremen-Mitte 2008 <i>Kardiologie</i> in der kardiologischen Praxis am Klinikum Links der Weser, Bremen 2008 <i>Allgemeinmedizin</i> in einer Praxis am Klosterstern, Hamburg

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, 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.

Anna-Maria Werner

12 Anhang

12.1. Test auf Normalverteilung („David-Test“)

Mithilfe des Testverfahrens „Schnelltest nach David“ kann die Verteilung von Stichproben geprüft werden. Als Nullhypothese H_0 wird postuliert, dass die Stichproben einer Normalverteilung angehören. Der Test ist bei kleinen Stichproben ($n < 30$) sehr zuverlässig.

Die zur Beurteilung benötigte Prüfgröße lässt sich folgendermaßen berechnen:

$$PG = \frac{\text{Spannweite}}{\text{Streuung}} = \frac{R}{s} = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{s}$$

Dabei wird als Spannweite R die Differenz aus dem größten und dem kleinsten Messwert angegeben. S stellt die Standardabweichung (Streuung) der Messwerte dar. Der Quotient aus Spannweite und Standardabweichung liefert die Prüfgröße. Der Tabelle im Anhang sind die Grenzen für die Prüfgröße zu entnehmen. Es gilt $v = n$. Bei einem Stichprobenumfang von sechs ergibt sich $v = 6$. Das zugehörige Intervall für die Prüfgröße beträgt 2,28 bis 3,31 bei einem Irrtumsrisiko von 5%.

Im Folgenden wird die Prüfgröße für alle Zelllinien getestet. Exemplarisch werden die Berechnungen für zwei Zelllinien aufgezeigt. Es ergeben sich für die jeweiligen Prüfgrößen die Werte

$$PG_{(Ba/F3+IL3)} = \frac{13,63 - 4,13}{4,08} = 2,33 \quad \text{und} \quad PG_{(Ba/F3-p210)} = \frac{62,5 - 31,25}{13,54} = 2,31$$

Somit liegen die Zelllinien mit ihrer Prüfgröße innerhalb der angegebenen Schranken, weshalb von einer Normalverteilung der Zellen ausgegangen werden kann.

Aufgrund dieser Berechnungen kann die statistische Auswertung der Versuche dieser Arbeit mit dem auf einer Normalverteilung basierenden Modelle „T-Test für paarweise angeordnete Messwerte“ sowie der „Regressionsanalyse“ erfolgen.

α	Untere Schranke			Obere Schranke		
	0,050	0,010	0,001	0,050	0,010	0,001
v						
5	2,15	2,02	1,83	2,75	2,80	2,83
6	2,28	2,15	1,83	3,01	3,10	3,16
7	2,40	2,26	1,87	3,22	3,34	3,46
8	2,50	2,35	1,87	3,40	3,54	3,74
9	2,59	2,44	1,90	3,55	3,72	4,00
10	2,67	2,51	1,90	3,68	3,88	4,24
11	2,74	2,58	1,92	3,80	4,01	4,47
12	2,80	2,64	1,92	3,91	4,13	4,69
13	2,86	2,70	1,93	4,00	4,24	4,90
14	2,92	2,75	1,93	4,09	4,34	5,10
15	2,97	2,80	1,94	4,02	4,44	5,29
16	3,01	2,84	1,94	4,24	4,52	5,48
17	3,06	2,88	1,94	4,31	4,60	5,66
18	3,10	2,92	1,94	4,37	4,67	5,83
19	3,14	2,96	1,95	4,43	4,74	6,00
20	3,18	2,99	1,95	4,49	4,80	6,16
25	3,34	3,15	1,96	4,71	5,06	6,93
30	3,47	3,27	1,97	4,89	5,26	7,62
35	3,58	3,38	1,97	5,04	5,42	8,25
40	3,67	3,47	1,98	5,16	5,56	8,83
45	3,75	3,55	1,98	5,26	5,67	9,38
50	3,83	3,62	1,98	5,35	5,77	9,90
55	3,90	3,69	1,98	5,43	5,86	10,39
60	3,96	3,75	1,98	5,51	5,94	10,86
65	4,01	3,80	1,98	5,57	6,01	11,31
70	4,06	3,85	1,99	5,63	6,07	11,75
75	4,11	3,90	1,99	5,68	6,13	12,17
80	4,16	3,94	1,99	5,73	6,18	12,57
85	4,20	3,99	1,99	5,78	6,23	12,96
90	4,24	4,02	1,99	5,82	6,27	13,34
95	4,27	4,06	1,99	5,86	6,32	13,71
100	4,31	4,1	1,99	5,90	6,36	14,97
150	4,59	4,38	1,99	6,18	6,64	17,26
200	4,78	4,59	2,00	6,39	6,84	19,95
500	5,37	5,13	2,00	6,94	7,42	31,59

Tabelle 17: David-Test

12.2. T-Test für paarweise angeordnete Messwerte

Mit Hilfe des T-Tests wird untersucht, ob die Differenz der Mittelwerte von zwei gepaarten Beobachtungen zufällig zustande gekommen ist, oder ob sie auch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in der Grundgesamtheit vorliegt und somit im statistischen Sinne signifikant ist. So lässt sich in dieser Arbeit die Apoptose-/ Nekroserate auswerten. Es wird die Apoptose-/ Nekroserate der unbehandelten Kontrollzellen mit der Apoptose-/ Nekroserate der mit 1 μM SAM486A behandelten Zellen verglichen. Weiterhin wird dieses statistische Modell zu der Auswertung verschiedener Proliferationsassays herangezogen.

Unter der Nullhypothese wird angenommen, dass es keinen Unterschied bezüglich der Wachstumsrate beziehungsweise der Apoptoserate zwischen Kontrollzellen und behandelten Zellen gibt. Hierbei ist der Mittelwert der n Paardifferenzen $[(\sum d)/n] = \bar{d}$ gleich Null ($\mu_d = 0$). Die Alternativhypothese lautet $\mu_d \neq 0$.

Werden unabhängige angenäherte normalverteilte Differenzen vorausgesetzt, dann lässt sich die Nullhypothese auf dem 5%-Signifikanzniveau ablehnen, sobald $z \geq t_{v;\alpha}$ mit v gleich $n-1$ ist. Die Berechnung von „ z “ erfolgt mithilfe der unten angegebenen Formel.

In der folgenden Tabelle werden die Werte für die Kontrollzellen und für die behandelten Zellen eingetragen. Es lassen sich die Variablen d und d^2 bestimmen, die für die Berechnung von z in der unten angegebenen Formel notwendig sind.

Proben	Kontrolle (X)	Behandlung (Y)	d (X-Y)	d ²
1	X ₁	Y ₁	X ₁ -Y ₁	(X ₁ -Y ₁) ²
2	X ₂	Y ₂	X ₂ -Y ₂	(X ₂ -Y ₂) ²
3	X ₃	Y ₃	X ₃ -Y ₃	(X ₃ -Y ₃) ²
n=3			$\sum d$	$\sum d^2$

Tabelle 18: T-Tests für paarweise angeordnete Messwerte

$$z = \frac{\left| \frac{\sum d}{n} \right|}{\sqrt{\frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

Abbildung 47: Formel zur Berechnung des T-Tests für paarweise angeordnete Messwerte

Der 95%-Vertrauensbereich für die wahre mittlere Differenz μ_d ist durch $d \pm t_{n-1;0,05} s_d$ gegeben, wobei s_d dem Nenner in der oberen Formel entspricht. Anhand des 95%-Vertrauensbereichs kann geschaut werden, ob μ_d deutlich von Null verschieden ist. Tritt dies ein, wird die Nullhypothese verworfen und es resultieren niedrige Werte für „P“. Der Vertrauensbereich wurde in allen Berechnungen berücksichtigt und exemplarisch in den Tabellen unter 12.5 angegeben.

Somit gibt der Test Auskunft über die Existenz des Unterschiedes in der Behandlung und der Vertrauensbereich über die Größe des Unterschiedes in der Behandlung [23].

Es wird die Differenz zwischen den Zellzahlen der Imatinibbehandlung und der Kombinationstherapie betrachtet.

Die Relevanz der Differenz wird mit dem „T-Test für paarweise angeordnete Messwerte“ geprüft. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen liegt vor, wenn der $z > 4,303$ beträgt beziehungsweise $P \leq 0,05$ bei einem Signifikanzniveau von 5% ist. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die P-Werte angegeben.

12.3. Lineare Regression

Das Modell der linearen Regression wird verwendet, um eine echte Abhängigkeit zwischen den Kontrollzellen und den SAM486A behandelten Zellen über einen Zeitraum von 13 Tagen im Langzeitversuch zu analysieren. Der Korrelationskoeffizient R^2 drückt dabei aus, wie gut die Regressionsgerade den Zusammenhang zwischen unabhängiger und abhängiger Variable wiedergibt. R^2 liegt zwischen 0 und 1, wobei der Wert $R^2 = 1$ bedeutet, dass jeder gemessene Datenpunkt (Zellzahl) direkt auf der Regressionsgeraden liegt und eine statistische Interpretation zulässt. Es existieren sowohl im Vergleich der Kontrollzellen als auch der behandelten Zellen R^2 -Werte, die annähernd bei 1 liegen. Somit ist der Vergleich der einzelnen Zelllinien untereinander zulässig. Bei Werten kleiner 0,5 bestünde kein linearer Zusammenhang zwischen den Variablen und die Aussagekraft wäre herabgesetzt. Die jeweiligen Geradengleichungen sind den Abbildungen zu entnehmen. In Violette sind die Geradengleichungen der Kontrollzellen angegeben, in Blau die der mit $1\mu\text{M}$ SAM486A behandelten Zellen.

Die Nullhypothese behauptet in diesem Fall, dass es keinen Unterschied in der Zellproliferation zwischen den Kontrollzellen und den mit SAM486A behandelten Zellen gibt.

Im einfachsten Fall linearer Regression wird die Abhängigkeit zwischen den Messungen y und der kontrollierten Variablen t angenommen:

$$y = \alpha + \beta t_i + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Dabei sind α und β unbekannte konstante Parameter und können mithilfe der Methode der kleinsten Quadrate gefunden werden. ε_i ist der Messfehler der i -ten Messung. Es werden alle Messungen als unabhängig angenommen und die Fehler ε_i als Mittelwert Null und gleicher Varianz σ^2 als normalverteilt betrachtet. Durch Einführung der Gleichungen

$$\bar{t} = \frac{1}{n} \sum t_i \quad \bar{y} = \frac{1}{n} \sum y_i$$

können die Messwerte in einem Koordinatensystem dargestellt werden, dessen Ursprung bei

(\bar{t}, \bar{y}) liegt:

$$t' = t - \bar{t} \quad y' = y - \bar{y}$$

Dabei ist zu beachten, dass t (Zeit) und y (ln der absoluten Zellzahlen) nur eine formale Ähnlichkeit mit Stichprobenmittelwerten haben, da sie von der speziellen Wahl der Werte der kontrollierten Variablen t abhängen.

In diesem Versuch kann die lineare Regression angewendet werden, wenn folgende Voraussetzungen vorliegen. Es besteht eine Normalverteilung der Fehler ε mit dem Mittelwert Null und der Varianz σ_y^2 , wobei die Größe σ_y^2 selbst aber häufig unbekannt ist. Durch die Berechnung der Standardabweichung s_y^2 kann die Varianz aus den Messungen abgeschätzt werden.

Da die Steigung $\tilde{\beta}$, wie oben angegeben, um den wahren Wert β mit der Varianz $\sigma^2(\tilde{\beta}) = \sigma_y^2 / \sum t_i'^2$ normalverteilt ist, kann die Variable u eingeführt werden. Ist die Hypothese

war, dann folgt die Variable $u = \frac{\tilde{\beta} - \beta}{\sigma_y / \sqrt{(\sum t_i'^2)}}$ der normalisierten Gaußverteilung, wobei $\tilde{\beta}$

die Steigung der Regressionsgeraden der behandelten Zellen und β die Steigung der Kontrollzellen ist. Sie könnte daher zur Überprüfung der Nullhypothese dienen, wenn die Varianz σ_y^2 bekannt wäre. Da die Varianz mithilfe der Standardabweichung abgeschätzt werden kann, darf σ_y durch s_y in der Gleichung der Variablen u ersetzt werden. Somit ergibt sich die Gleichung

$$v = \frac{\tilde{\beta} - \beta}{s_y / \sqrt{(\sum t_i'^2)}}$$

Die Variable „ v “ ist nach der „Student’schen Verteilung“ mit $n-2$ Freiheitsgraden verteilt. Die Nullhypothese wird bei vorgegebenem Signifikanzniveau α verworfen, wenn die experimentellen Daten die Ungleichung $|v| > t_{1-0,5\alpha}$ erfüllen.

Das vorgegebene Signifikanzniveau beträgt 5%. Der zugehörige „t-Wert“ ist der Tabelle „Student’sche Verteilung“ zu entnehmen.

12.4. „Student’sche Verteilung“

Die Variable v nach der „Student’schen Verteilung“ wird mit $n-2$ Freiheitsgraden verteilt. Die Nullhypothese H_0 wird bei vorgegebenem Signifikanzniveau α abgelehnt, wenn die experimentellen Daten die Ungleichung $|v| > t_{1-0,5\alpha}$ erfüllen. Der zugehörige t-Wert für das 5%-Signifikanzniveau wird der Tabelle je nach entsprechendem Freiheitsgrad entnommen.

f	0.750	0.875	0.900	0.950	0.975	0.990	0.995	0.999
1	1.000	2.414	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.309
2	0.817	1.604	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327
3	0.765	1.423	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215
4	0.741	1.344	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	0.727	1.301	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893
6	0.718	1.273	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	0.711	1.254	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785
8	0.706	1.240	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501
9	0.703	1.230	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297
10	0.700	1.221	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144
11	0.697	1.214	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025
12	0.695	1.209	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930
13	0.694	1.204	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852
14	0.692	1.200	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787
15	0.691	1.197	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733
16	0.690	1.194	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686
17	0.689	1.191	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646
18	0.688	1.189	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.611
19	0.688	1.187	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579
20	0.687	1.185	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552
21	0.686	1.183	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527
22	0.686	1.182	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505
23	0.685	1.180	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485
24	0.685	1.179	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467
25	0.684	1.178	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450
26	0.684	1.177	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	0.684	1.176	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	0.683	1.175	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
29	0.683	1.174	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396
30	0.683	1.173	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385
40	0.681	1.167	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307
50	0.679	1.164	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261
60	0.679	1.162	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232
70	0.678	1.160	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211
80	0.678	1.159	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195
90	0.677	1.158	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183
100	0.677	1.157	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174
200	0.676	1.154	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.131
300	0.675	1.153	1.284	1.650	1.968	2.339	2.592	3.118
∞	0.674	1.150	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090

Tabelle 19: „Student’sche Verteilungstabelle“

12.5. Proliferationsassay mit Kombinationstherapie

Ba/F3 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,138	2,400	(-0,28) - (0,98)
0,156 μ M	0,027	5,944	(0,12) - (0,74)
0,625 μ M	0,190	1,954	(-0,44) - (1,17)
2,5 μ M	0,244	1,634	(-0,37) - (0,81)
10 μ M	0,344	1,230	(-0,80) - (1,44)

Ba/F3 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,090	3,105	(-1,31) - (4,25)
0,156 μ M	0,004	16,144	(0,38) - (0,65)
0,625 μ M	0,017	7,656	(0,15) - (0,54)
2,5 μ M	0,040	4,825	(0,04) - (0,54)
10 μ M	0,095	3,009	(-0,28) - (1,60)

Ba/F3 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,021	6,828	(0,13) - (0,58)
0,156 μ M	0,001	27,024	(0,40) - (0,58)
0,625 μ M	0,021	6,766	(0,11) - (0,51)
2,5 μ M	0,002	23,177	(0,56) - (0,81)
10 μ M	0,063	3,804	(-0,06) - (1,03)

Tabelle 20: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, Ba/F3+IL3,

Rot: Signifikanz

Ba/F3 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,261	1,553	(-0,51) - (1,08)
0,156 μ M	0,165	2,146	(-0,44) - (1,31)
0,625 μ M	0,376	1,130	(-0,91) - (1,55)
2,5 μ M	0,116	2,694	(-0,18) - (0,79)
10 μ M	0,086	3,185	(-0,26) - (1,76)

Ba/F3 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,178	2,041	(-1,15) - (3,22)
0,156 μ M	0,187	1,976	(-0,13) - (0,35)
0,625 μ M	1,000	0,000	(-0,05) - (0,05)
2,5 μ M	0,489	0,841	(-0,38) - (0,57)
10 μ M	0,028	5,854	(0,24) - (1,56)

Ba/F3 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,401	-1,057	(-0,41) - (0,25)
0,156 μ M	0,192	1,941	(-0,11) - (0,30)
0,625 μ M	0,551	-0,710	(-0,19) - (0,14)
2,5 μ M	0,207	1,843	(-0,37) - (0,14)
10 μ M	0,080	3,326	(-0,04) - (0,34)

Tabelle 21: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, Ba/F3+IL3,

Rot: Signifikanz

Ba/F3-p210 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,051	4,236	(-0,01) - (1,00)
0,156 μ M	0,051	4,249	(-0,01) - (0,98)
0,625 μ M	0,562	0,690	(-1,10) - (1,52)
2,5 μ M	1,000	0,000	(-1,77) - (1,77)
10 μ M	0,189	1,961	(-0,99) - (2,65)

Ba/F3-p210 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,238	1,456	(-0,95) - (1,91)
0,156 μ M	0,030	5,600	(0,04) - (0,32)
0,625 μ M	0,776	0,325	(-0,62) - (0,53)
2,5 μ M	0,904	0,137	(-2,38) - (2,23)
10 μ M	0,423	1,000	(-1,01) - (1,63)

Ba/F3-p210 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,148	2,306	(-0,01) - (1,00)
0,156 μ M	0,014	8,513	(-0,01) - (0,99)
0,625 μ M	0,203	1,868	(-1,10) - (1,52)
2,5 μ M	0,423	1,000	(-1,77) - (1,77)
10 μ M	-	-	Zu geringe Zellzahl

Tabelle 22: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A Ba/F3-p210,

Rot: Signifikanz

Ba/F3-p210 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,004	1,835	(-0,32) - (0,80)
0,156 μ M	0,003	3,159	(-0,13) - (0,84)
0,625 μ M	0,025	3,786	(-1,07) - (1,07)
2,5 μ M	0,443	3,557	(-0,27) - (2,82)
10 μ M	0,031	14,303	(1,92) - (3,56)

Ba/F3-p210 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,009	0,481	(-0,71) - (0,89)
0,156 μ M	0,008	0,171	(1,05) - (1,13)
0,625 μ M	0,023	4,735	(0,10) - (2,05)
2,5 μ M	0,026	12,262	(-2,38) - (2,23)
10 μ M	0,001	32,637	(3,71) - (4,84)

Ba/F3-p210 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,494	-0,829	(-0,89) - (0,60)
0,156 μ M	0,921	-0,122	(-0,52) - (0,49)
0,625 μ M	0,052	4,218	(-0,02) - (1,56)
2,5 μ M	0,001	37,756	(4,13) - (5,19)
10 μ M	0,001	38,636	(4,27) - (5,34)

Tabelle 23: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A Ba/F3-p210,

Rot: Signifikanz

E255K (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,500	0,817	(-0,38) - (0,56)
0,156 μ M	0,253	1,591	(-0,49) - (1,07)
0,625 μ M	0,022	6,631	(0,26) - (1,07)
2,5 μ M	0,110	2,765	(-0,37) - (1,70)
10 μ M	0,542	0,728	(-1,15) - (1,61)

E255K (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,055	4,045	(-0,04) - (1,29)
0,156 μ M	0,018	5,022	(0,08) - (1,09)
0,625 μ M	0,001	8,603	(0,35) - (1,04)
2,5 μ M	0,012	8,931	(0,37) - (1,02)
10 μ M	0,084	1,914	(-0,47) - (1,23)

E255K (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,008	11,431	(0,81) - (1,79)
0,156 μ M	0,011	9,660	(0,61) - (1,58)
0,625 μ M	0,016	7,902	(0,50) - (1,69)
2,5 μ M	0,020	6,956	(0,45) - (1,69)
10 μ M	0,151	2,276	(-0,33) - (1,07)

Tabelle 24: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, Ba/F3-p210-E255K, Rot: Signifikanz

E255K (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,659	-0,513	(-0,59) - (0,47)
0,156 μ M	0,126	2,558	(-0,09) - (0,37)
0,625 μ M	0,013	8,600	(0,27) - (0,86)
2,5 μ M	0,038	4,992	(0,07) - (0,93)
10 μ M	0,074	3,466	(-1,19) - (1,75)

E255K (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,098	2,953	(-0,06) - (0,30)
0,156 μ M	0,524	0,766	(-0,49) - (0,71)
0,625 μ M	0,190	1,956	(-0,29) - (0,78)
2,5 μ M	0,037	5,066	(0,06) - (0,67)
10 μ M	0,009	10,722	(1,02) - (2,40)

E255K (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,081	3,308	(-0,05) - (0,33)
0,156 μ M	0,095	3,009	(-0,14) - (0,79)
0,625 μ M	0,193	1,935	(-0,25) - (0,66)
2,5 μ M	0,031	5,535	(0,05) - (0,40)
10 μ M	0,002	21,867	(1,38) - (2,06)

Tabelle 25: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, Ba/F3-p210-E255K, Rot: Signifikanz

T315I (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,020	6,954	(0,29) - (1,21)
0,156 μ M	0,010	10,120	(0,49) - (1,20)
0,625 μ M	0,055	4,093	(-0,05) - (1,76)
2,5 μ M	0,091	3,078	(-0,33) - (1,96)
10 μ M	0,024	6,388	(0,27) - (1,37)

T315I (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,020	6,914	(0,20) - (0,88)
0,156 μ M	0,123	2,583	(-0,33) - (1,32)
0,625 μ M	0,024	6,389	(0,24) - (1,21)
2,5 μ M	0,005	16,800	(0,44) - (0,74)
10 μ M	0,002	9,874	(0,33) - (0,83)

T315I (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,017	7,601	(0,35) - (1,28)
0,156 μ M	0,010	10,160	(0,60) - (1,48)
0,625 μ M	0,011	9,323	(-0,14) - (1,71)
2,5 μ M	0,013	8,805	(0,48) - (1,40)
10 μ M	0,030	5,610	(0,21) - (1,59)

Tabelle 26: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, Ba/F3-p210-T315I, Rot: Signifikanz

T315I (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,370	1,148	(-0,61) - (1,06)
0,156 μ M	0,368	1,155	(-0,48) - (0,83)
0,625 μ M	0,532	0,750	(-1,07) - (1,52)
2,5 μ M	0,346	1,224	(-1,05) - (1,88)
10 μ M	0,162	2,174	(-0,39) - (1,17)

T315I (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,064	3,769	(-0,62) - (0,35)
0,156 μ M	0,028	5,892	(0,05) - (0,31)
0,625 μ M	0,063	3,805	(-0,04) - (0,63)
2,5 μ M	0,045	4,570	(0,01) - (0,45)
10 μ M	0,032	5,429	(0,08) - (0,68)

T315I (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,928	0,102	(-0,68) - (0,72)
0,156 μ M	0,401	1,058	(-0,68) - (1,11)
0,625 μ M	0,528	0,757	(-0,72) - (1,03)
2,5 μ M	0,318	1,318	(-0,47) - (0,88)
10 μ M	0,591	0,633	(-0,89) - (1,20)

Tabelle 27: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, Ba/F3-p210-T315I, Rot: Signifikanz

HL60 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,368	1,155	(-1,02) - (0,59)
0,156 μ M	0,400	1,059	(0,80) - (-1,32)
0,625 μ M	0,853	0,210	(-0,86) - (0,78)
2,5 μ M	0,321	1,309	(-0,27) - (0,51)
10 μ M	0,103	2,862	(-0,13) - (0,64)

HL60 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,593	0,631	(-0,64) - (0,86)
0,156 μ M	0,037	5,031	(0,04) - (0,55)
0,625 μ M	0,525	0,762	(-0,39) - (0,55)
2,5 μ M	0,115	2,684	(-0,21) - (0,90)
10 μ M	0,015	8,021	(0,12) - (0,41)

HL60 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,028	5,813	(0,05) - (0,34)
0,156 μ M	0,390	1,089	(-0,21) - (0,35)
0,625 μ M	0,150	2,283	(-0,35) - (1,14)
2,5 μ M	0,054	4,119	(-0,01) - (0,65)
10 μ M	0,442	0,950	(-0,49) - (0,77)

Tabelle 28: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, HL60,

Rot: Signifikanz

HL60 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,032	5,500	(0,03) - (0,26)
0,156 μ M	0,408	1,039	(-0,68) - (1,11)
0,625 μ M	0,245	1,630	(-0,25) - (0,56)
2,5 μ M	0,122	2,592	(-0,26) - (1,04)
10 μ M	0,218	1,776	(-0,44) - (1,05)

HL60 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,397	1,670	(-0,64) - (0,90)
0,156 μ M	0,065	3,739	(0,04) - (0,59)
0,625 μ M	0,293	1,415	(-0,39) - (0,70)
2,5 μ M	0,227	2,660	(-0,21) - (1,13)
10 μ M	0,030	5,630	(0,12) - (0,76)

HL60 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,853	0,210	(0,05) - (0,14)
0,156 μ M	0,353	-0,199	(-0,21) - (0,23)
0,625 μ M	0,062	3,813	(-0,35) - (0,45)
2,5 μ M	0,051	4,241	(-0,01) - (0,34)
10 μ M	0,119	2,636	(-0,49) - (0,89)

Tabelle 29: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A,

HL60, Rot: Signifikanz

K562 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,252	3,671	(-0,08) - (0,99)
0,156 μ M	0,755	1,596	(-0,96) - (0,44)
0,625 μ M	0,378	0,357	(-2,47) - (2,92)
2,5 μ M	0,265	1,122	(-0,33) - (0,56)
10 μ M	0,058	1,533	(-0,12) - (0,39)

K562 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,018	7,432	(0,36) - (1,33)
0,156 μ M	0,113	2,716	(-0,46) - (2,03)
0,625 μ M	0,247	1,617	(-1,68) - (0,76)
2,5 μ M	0,268	1,521	(-2,71) - (1,29)
10 μ M	0,562	0,688	(-3,36) - (2,43)

K562 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,038	4,974	(0,17) - (2,38)
0,156 μ M	0,126	2,540	(-1,16) - (4,48)
0,625 μ M	0,423	1,000	(-0,24) - (0,39)
2,5 μ M	-	-	Zu geringe Zellzahl
10 μ M	-	-	Zu geringe Zellzahl

Tabelle 30: T-Test Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, K562,

Rot: Signifikanz

K562 (Tag 1)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,074	3,456	(-0,12) - (1,10)
0,156 μ M	0,210	1,820	(-0,17) - (0,43)
0,625 μ M	0,282	1,460	(-1,34) - (2,70)
2,5 μ M	0,011	9,354	(0,26) - (0,70)
10 μ M	0,058	3,962	(-0,05) - (1,20)

K562 (Tag 2)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,075	3,447	(-0,19) - (0,98)
0,156 μ M	0,021	6,835	(0,33) - (1,46)
0,625 μ M	0,014	8,515	(0,65) - (1,99)
2,5 μ M	0,002	24,180	(1,32) - (1,90)
10 μ M	0,039	4,939	(0,30) - (4,34)

K562 (Tag 3)	P	z	95% Vertrauensbereich
0,039 μ M	0,238	1,662	(-0,57) - (1,30)
0,156 μ M	0,064	3,771	(-0,23) - (3,50)
0,625 μ M	0,001	36,397	(3,10) - (3,93)
2,5 μ M	0,001	36,397	(3,10) - (3,93)
10 μ M	0,001	36,397	(3,10) - (3,93)

Tabelle 31: T-Test Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A,

K562, Rot: Signifikanz

12.6. Proliferationsassay: SAM486-Monotherapie

Primärmaterial mit SAM486A-Monotherapie:

Patient 1	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μ M	0,432	0,262	0,627	0,299
0,5 μ M	0,335	0,263	0,004	0,130
1 μ M	0,000	0,099	0,031	0,027
2 μ M	0,026	0,039	0,018	0,008
4 μ M	0,062	0,022	0,001	0,000

Patient 2	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μ M	0,297	0,833	0,222	0,236
0,5 μ M	0,340	0,035	0,079	0,252
1 μ M	0,100	0,006	0,004	0,041
2 μ M	0,061	0,007	0,013	0,024
4 μ M	0,008	0,006	0,001	0,001

Tabelle 32: SAM486A-Monotherapie, gesunde Spender, Rot: Signifikanz

Patient 3	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μ M	0,432	0,262	0,627	0,926
0,5 μ M	0,335	0,263	0,004	0,130
1 μ M	0,000	0,099	0,031	0,027
2 μ M	0,026	0,039	0,018	0,008
4 μ M	0,062	0,022	0,001	0,001

Patient 4	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μ M	0,423	0,021	0,097	0,159
0,5 μ M	0,053	0,515	0,073	0,009
1 μ M	0,100	0,156	0,016	0,010
2 μ M	0,178	0,047	0,021	0,003
4 μ M	0,004	0,001	0,004	0,000

Tabelle 33: SAM486-Monotherapie, Bcr-Abl-positive CML-Patienten, Rot: Signifikanz

Patient 5	P (Tag 3)	P (Tag 6)	P (Tag 8)	P (Tag 10)
0,25 μ M	0,364	0,674	0,205	0,819
0,5 μ M	0,132	0,021	0,277	0,067
1 μ M	0,015	0,084	0,026	0,149
2 μ M	0,038	0,017	0,005	0,012
4 μ M	0,001	0,001	0,014	0,006

Tabelle 34: SAM486A-Monotherapie, Bcr-Abl-negativer CML-Patient, Rot: Signifikanz

12.7. Proliferationsassay: Kombinationstherapie

Primärmaterial mit Kombinationstherapie (Imatinib plus SAM486A)

Patient 1	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,522	0,299	0,919
0,156 μ M	0,623	0,022	0,841
0,625 μ M	0,855	0,979	0,730
2,5 μ M	0,648	0,038	0,769
10 μ M	0,833	0,877	0,324

Patient 2	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,026	0,001	0,376
0,156 μ M	0,256	0,283	0,150
0,625 μ M	0,549	0,354	0,565
2,5 μ M	0,121	0,587	0,469
10 μ M	0,914	0,121	0,911

Tabelle 35: T-Test, Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, gesunde Spender, Rot: Signifikanz

Patient 1	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,710	0,296	0,270
0,156 μ M	0,185	0,013	0,632
0,625 μ M	0,870	0,251	0,143
2,5 μ M	0,220	0,028	0,003
10 μ M	0,198	0,152	0,068

Patient 2	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,033	0,378	0,412
0,156 μ M	0,946	0,184	0,015
0,625 μ M	0,444	0,403	0,098
2,5 μ M	0,195	0,181	0,075
10 μ M	0,141	0,017	0,014

Tabelle 36: T-Test, Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, gesunde Spender, Rot: Signifikanz

Patient 3	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,037	0,310	0,634
0,156 μ M	0,296	0,187	0,004
0,625 μ M	0,465	0,263	0,129
2,5 μ M	0,138	0,395	0,326
10 μ M	0,564	0,187	0,546

Patient 4	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,296	0,030	0,254
0,156 μ M	0,046	0,214	0,601
0,625 μ M	0,175	0,684	0,959
2,5 μ M	0,075	0,737	0,387
10 μ M	0,582	0,316	0,423

Tabelle 37: T-Test, Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, Bcr-Abl-positive CML-Patienten, Rot: Signifikanz

Patient 3	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,050	0,911	0,186
0,156 μ M	0,032	0,990	0,086
0,625 μ M	0,026	0,004	0,062
2,5 μ M	0,035	0,096	0,051
10 μ M	0,014	0,041	0,360

Patient 4	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,334	0,021	0,149
0,156 μ M	0,498	0,001	0,009
0,625 μ M	0,186	0,011	0,106
2,5 μ M	0,512	0,015	0,140
10 μ M	0,423	0,073	0,036

Tabelle 38: T-Test, Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, Bcr-Abl-positive CML-Patienten, Rot: Signifikanz

Patient 5	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,208	0,137	0,396
0,156 μ M	0,105	0,007	0,776
0,625 μ M	0,466	0,822	0,567
2,5 μ M	0,172	0,800	0,025
10 μ M	0,053	0,243	0,008

Tabelle 39: T-Test, Kombinationsproliferationsassay IM versus IM+SAM486A, Bcr-Abl-negativer CML-Patient, Rot: Signifikanz

Patient 5	P (Tag 1)	P (Tag 2)	P (Tag 3)
0,039 μ M	0,233	0,022	0,221
0,156 μ M	0,292	0,000	0,134
0,625 μ M	0,169	0,168	0,054
2,5 μ M	0,423	0,159	0,036
10 μ M	0,072	0,040	0,037

Tabelle 40: T-Test, Kombinationsproliferationsassay SAM486A versus IM+SAM486A, Bcr-Abl-negativer CML-Patient, Rot: Signifikanz

12.8. Analyse der apoptotischen –nekrotischen- Rate mittels der Durchflusszytometrie

Die Marker M1 und M2 geben den prozentualen Anteil apoptotischer beziehungsweise nekrotischer Zellen an.

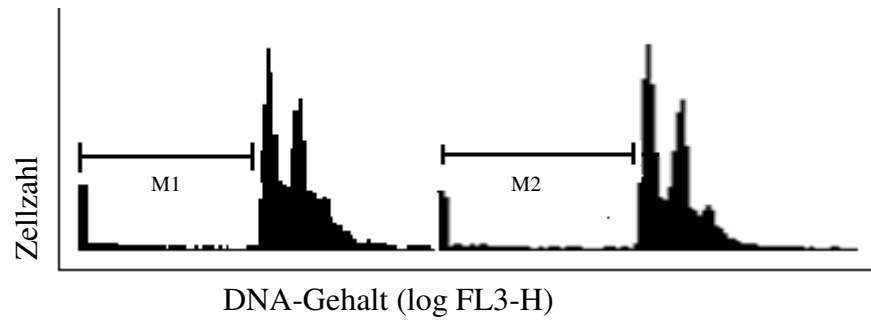


Abbildung 48: Ba/F3+IL3, Kontrolle M1:1,7% und SAM486A M2: 3,64%

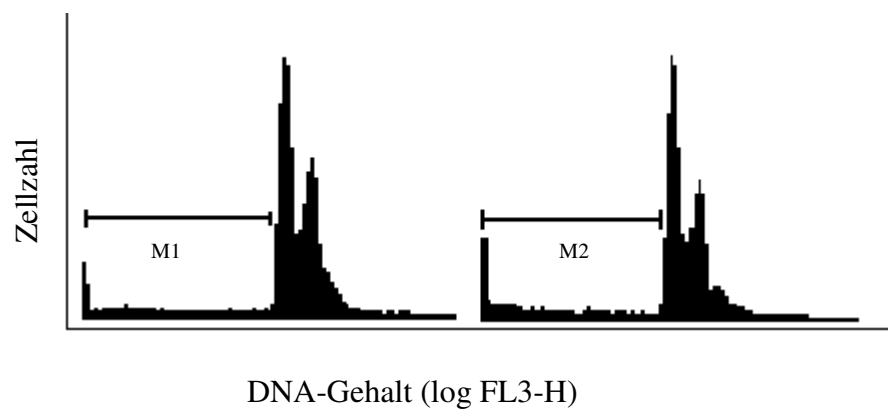


Abbildung 49: Ba/F3-p210, Kontrolle M1: 4,52% und SAM486A M2: 12,83%

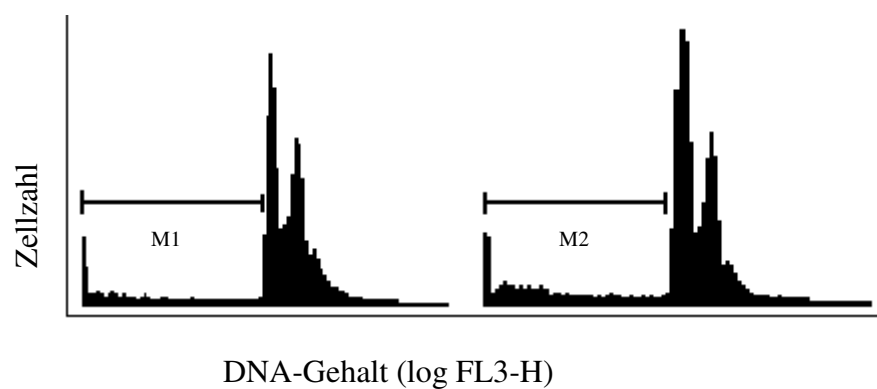


Abbildung 50: Ba/F3-p210-E255K, Kontrolle M1: 5,64% und SAM486A M2: 14,71%

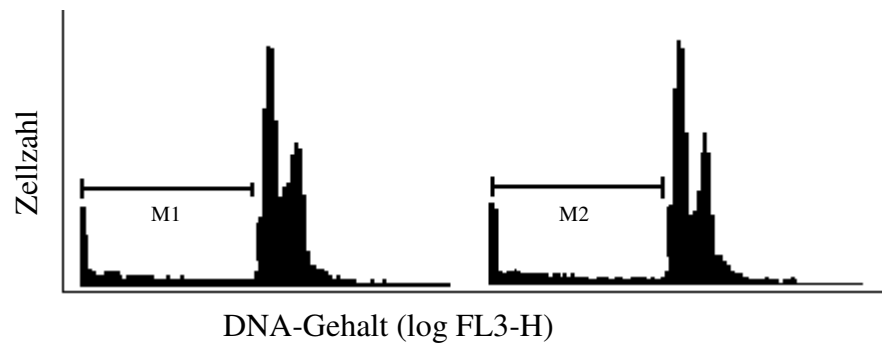


Abbildung 51: Ba/F3-p210-T315I, Kontrolle M1: 5,37% und SAM486A M2: 9,31%

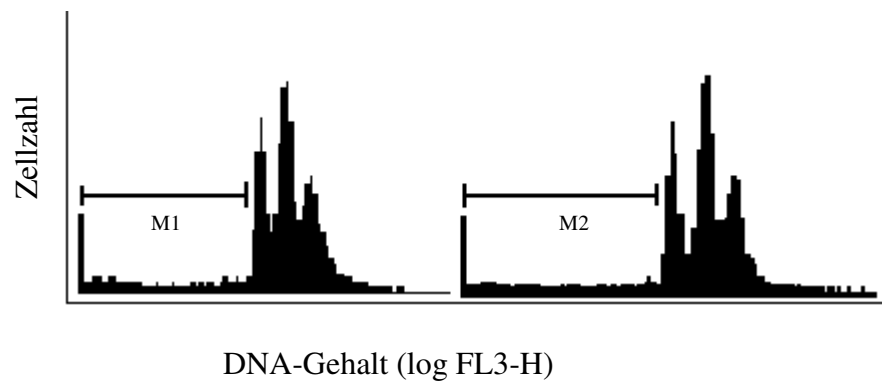


Abbildung 52: HL60, Kontrolle M1: 9,07% und SAM486A M2: 16,49%

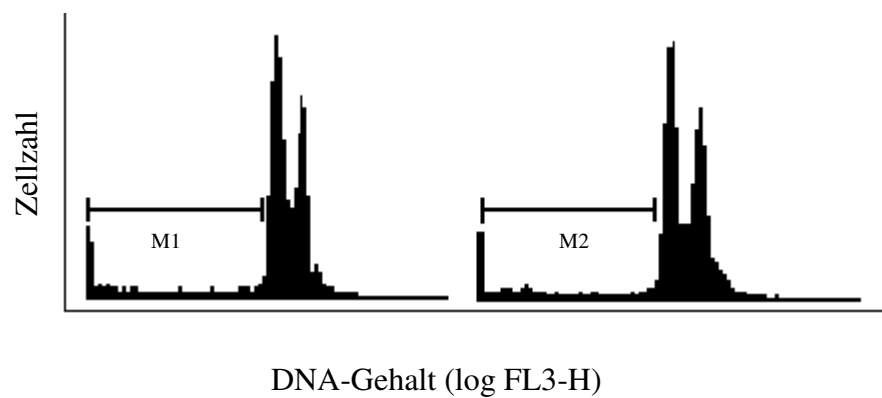


Abbildung 53: K562, Kontrolle M1: 5,46% und SAM486A M2: 11,46%