

**Die duale Hemmung der BCR-ABL1 Kinase und des Proteasoms
als neuer Therapieansatz in der BCR-ABL positiven Akuten
Lymphatischen Leukämie**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Saskia Maletzke

aus Düren

Berichter: Universitätsprofessor Dr. med. Steffen Koschmieder
 Privatdozent Dr. med. Burkhard Gess

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2021

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute lymphatische Leukämie	1
1.1.1	Pathogenese.....	2
1.1.2	Symptome	3
1.1.1	Diagnose.....	4
1.1.2	Klassifikation	4
1.1.3	Prognosefaktoren.....	5
1.1.4	Therapiegrundlagen, Besonderheiten der Therapie bei Ph + ALL	6
1.1.5	Prognose der Ph+ ALL.....	8
1.2	Chronische myeloische Leukämie	8
1.3	Proteasominhibitoren	10
2	Zielsetzung	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	16
3.1.2	Geräte.....	19
3.1.3	Zelllinien und Zellkultur.....	20
3.1.4	Medikamente und Dosierung	21
3.2	Methoden.....	21
3.2.1	Cell Counting Kit-8 (CCK8) Zellwachstumsanalyse.....	21
3.2.2	Durchflusszytometrie	22
3.2.3	Westernblots.....	25
3.2.4	Quantitative Realtime-PCR	27
3.2.5	Berechnung der Arzneimitteleraktion: Coefficient of Drug Interaction (CDI) 29	
3.2.6	Statistische Analyse.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1	Proteasominhibitoren verursachen Wachstumsstopp in Ph+ ALL.....	30
4.2	Bortezomib in alleiniger oder kombinierter Gabe reduziert die Zellviabilität von Ph+ All Zellen signifikant.....	32
4.3	Die Gabe einer niedrigeren Dosierung von Bortezomib zeigt erste Hinweise eines additiven Effekts für TOM-1.....	35
4.4	Proteasominhibitor führt zu Apoptose in Ph + ALL Zellen	36
4.5	Ixazomib verursacht einen Wachstumsstopp in Ph+ ALL Zellen.....	39

4.6	Ixazomib bewirkt signifikanten Reduktion der Zellviabilität	40
4.7	Die Therapie mit Ixazomib verursacht Apoptose in Ph+ ALL Zellen.....	43
4.8	TKI und Proteasominhibitoren verursachen in Ph+ ALL Apoptose durch die Hochregulation unterschiedlicher Apoptosemarker.....	45
4.9	In der quantitative Echtzeit PCR zeigt sich eine Hochregulation der Expression von <i>ERN1/XBP1</i> und <i>TRAIL</i>	48
4.10	Proteasominhibitoren führen auch in Ph- ALL Zellen zu einer starken Reduktion der Zellviabilität	51
5	Diskussion	53
5.1	Reduzierte Zellviabilität und Apoptose	53
5.2	Einfluss von Proteasominhibitoren auf den UPR	58
5.3	Proteasominhibitoren zur Therapie anderer ALL-Subtypen	60
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis	63
8	Anhang	76
8.1.1	zusätzliche Abbildungen	76
8.1.2	Abbildungsverzeichnis.....	79
8.1.3	Tabellenverzeichnis.....	79
9	Danksagung.....	80

Abkürzungsverzeichnis

(teilweise aus dem Englischen übersetzt)

ABL	Abelson
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
Allo	allogen
APC	Allophycocyanin
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BCR	Breakpoint Cluster Region
BIM	BCL-2 Familie Bcl-2-like protein 11
BSA	Bovines Serum Albumin/Rinderserumalbumin
CCK8	Cell Counting Kit-8
CD	Clusters of Differentiation
CDI	Coefficient of Drug Interaction
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COX6b	Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit 6B
CR	komplette Remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligationsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatischesretikulum
ERN1	Endoplasmatic Reticulum To Nucleus Signaling 1
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	fetal bovine serum/ fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FOXO3	Forkhead-Box-Protein O3
GMALL	German Multicenter Study Group for Adult ALL
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
MM	Multiples Myelom
MPN	myeloproliferative Neoplasien
MRD	minimal residual disease
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Ph	Philadelphia
PI	Propidiumjodid
PMAIP1 gene = NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced-protein
PS	Phospholipid Phosphatidylserin
PVDF Membran	Polyvinylidenfluorid Membran
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reversetranskriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Scr Kinase	sarkomäre und zelluläre Kinase
SZT	Stammzelltransplantation
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UPP	Ubiquitin Proteasome Pathway
UPR	Ungefaltete Protein Antwort
XBP1	X-Box-binding-protein 1

1 Einleitung

1.1 Akute lymphatische Leukämie

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) gehört zu den seltenen hämatologischen Neoplasien und ist eine schwerwiegende maligne hämatologische Erkrankung. Sie hat ihren Ursprung im Knochenmark und zeichnet sich durch eine unkontrollierte Proliferation und einen Differenzierungsstopp von Zellen der lymphatischen Reihe aus. Dies führt zu einer Akkumulation unreifer, maligner lymphatischer Vorläuferzellen, sogenannter lymphatischer Blasten. Diese akkumulieren im Knochenmark, im peripheren Blut, in anderen Teilen des lymphatischen Systems, aber auch in nicht lymphatischen und nicht-hämatopoetischen Organen, beispielsweise der Haut (Gökbuget 2011 "Treatment recommendation of the European working group for adult ALL", gebundene Ausgabe 2011, UNI-MED Science, Bremen). Durch verdrängendes Wachstum der mutierten Vorläuferzellen kommt es zu einer Suppression der anderen Zellreihen des blutbildenden Systems: Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten werden vermindert gebildet und es findet sich somit oft eine Panzytopenie im peripheren Blutbild (Terwilliger and Abdul-Hay 2017). Etwa doppelt so häufiger als eine Leukopenie findet sich bei Erwachsenen Patientin mit einer ALL eine Leukozytose durch die vermehrte Ausschwemmung der unreifen Blasten ins periphere Blut (Hoelzer and Gökbuget 1997 "Akute lymphatische Leukämie" in "Therapiekonzepte Onkologie", 3. Auflage 1997, Springer Verlag Berlin, Seite 194).

Die ALL hat eine Gesamtinzidenz von nur ca. 1,1/100.000 pro Jahr, ist aber die häufigste akute Leukämie des Kindesalters mit einer Inzidenz von 5,3/100.000 Jahr bei den unter 5-Jährigen. Die Inzidenz steigt ab einem Alter von 55 Jahren erneut an, und es kommt im hohen Alter von über 80 Jahren zu einem zweiten Inzidenzgipfel mit 23/100.000 (Gökbuget, et al. 2018).

Mit einer weltweit stetig steigenden Lebenserwartung steigt auch die Inzidenz der akuten lymphatischen Leukämie, so dass die Bedeutung einer adäquaten Therapie der ALL kontinuierlich relevanter wird.

1.1.1 Pathogenese

Charakteristisch für die ALL ist eine blockierte Ausreifung der lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark bei gleichzeitig unkontrollierter Proliferation und Akkumulation nicht funktionsfähiger Blasten. Dieser Differenzierungsstopp kann auf verschiedenen Ebenen in der Entwicklung stattfinden und die leukämischen Blasten lassen sich auf eine oder mehrere entartete Vorläuferzellen mit spezifischen klonalen Markern zurückführen (Hiddemann 1999). Der Nachweis der Klonalität ist ein wichtiges Diagnosekriterium und dient insbesondere der Abgrenzung zu reaktiven Veränderung

des lymphatischen Systems, beispielsweise einer Lymphozytose oder Lymphozytopenie im Rahmen viraler Erkrankungen wie durch das Epstein-Barr-Virus ausgelöst. Bei circa 80% der Erwachsenen, die an einer ALL erkrankt sind, lassen sich zytogenetische oder molekulargenetische Aberrationen in den Blasten nachweisen (Alam, et al. 2015). Diese Aberrationen sind beispielsweise an der Regulation von Apoptose, Zellzykluskontrolle oder Signaltransduktion beteiligt und beeinflussen sowohl die Therapiewahl als auch die Prognose der Erkrankung. Die mit Abstand am häufigsten vorkommende Aberration, welche bei ca. 30% aller Erwachsenen ALL Patienten gefunden werden kann, ist das Philadelphia Chromosom t(9;22) (Liu-Dumlao, et al. 2012).

Das Philadelphia Chromosom entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen dem ABL-1 Onkogen der Abelson-Tyrosinkinase auf dem langen Arm des Chromosom 9 und einer Breakpoint Cluster Region (BCR) auf Chromosom 22. Diese Translokation führt zur Entstehung des BCR-ABL1 Fusionsgens, welches für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase kodiert (Liu-Dumlao, et al. 2012). Die Häufigkeit der sogenannten Philadelphia-positiven ALL (Ph+ ALL) steigt ebenfalls mit zunehmendem Lebensalter (Ottmann and Pfeifer 2009b). Die BCR-ABL1 Kinase ist in verschiedene Reaktionswege der Zelle involviert und führt unter anderem zu einem vermehrten Zellwachstums bei gleichzeitiger Hemmung der Zelldifferenzierung und dadurch vermehrter Zelltodresistenz (Kang, et al. 2016).

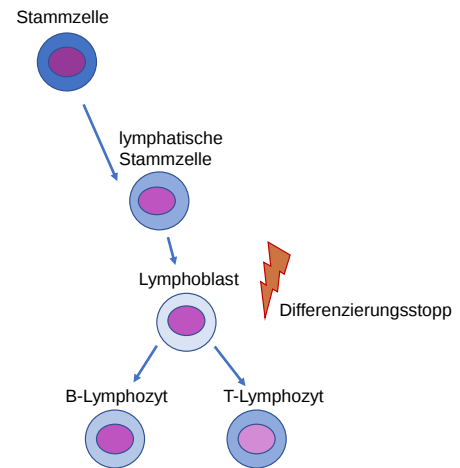


Abbildung 1. schematische Darstellung Pathogenese ALL
(In Anlehnung an Cancer Research UK)

Die pathogenetischen Ursachen, die zur Entwicklung der ALL führen sind nicht bekannt. Es gibt jedoch Risikofaktoren, die bei der Entstehung der ALL eine Rolle spielen. Hierzu zählen unter anderem eine Trisomie 21, Strahlenschäden des Knochenmarks oder die Exposition zu myelotoxischen Substanzen wie Benzol oder Chemotherapeutika, die die Entwicklung einer therapieassoziierten, sekundären ALL zur Folge haben können.

1.1.2 Symptome

Die Symptome der akuten lymphatischen Leukämie entstehen in erster Linie aufgrund der Verdrängung der verschiedenen Zellreihen des blutbildenden Systems und der zunehmenden Insuffizienz der Hämatopoese. Daher lassen sich die Symptome den einzelnen Zellreihen zuordnen. Des Weiteren kann es durch eine Ausschwemmung der Blasten in das periphere Blut und dadurch zunehmende Infiltration verschiedener Organsysteme durch die Leukämiezellen zu vielfältigen weiteren Symptomen kommen. Generell entstehen die Symptome bei der ALL sehr schnell innerhalb von Tagen bis Wochen (Hiddemann 1999 "Akute Leukämien" in "Therapie Innerer Krankheiten", 1999, Springer Verlag Berlin, Seite 959).

Tabelle 1. Symptome der ALL

Anämie durch gestörte Erythropoese	Erschöpfung, Blässe, Luftnot
Granulozytopenie	Hypo- oder Hyperleukozytose, gesteigerte Infektneigung, Fieber, Stomatitis
Thrombozytopenie	Petechien, erhöhte Blutungsneigung u.a. Zahnfleischblutungen, Hämatomneigung
Leukozytose	Sehstörung, zerebrale Dysfunktion
Extramedulläre Symptome	Hepatosplenomegalie (60%) Lymphadenopathie (60%), Mediastinaltumor, kutane Infiltrate, Infiltration anderer Organe
Meningeosis Leukemika	Neurologische Symptome

1.1.1 Diagnose

Die Diagnose bei Verdacht auf eine ALL beruht vor allem auf einer Knochenmarkpunktion mit zytologischer und histopathologischer Untersuchung des Knochenmarks mit dem Nachweis von leukämischen Blasten, die meist (97% der Patienten) mit einem hohen Anteil von >50% aller blutbildenden Zellen nachweisbar sind. Außerdem lassen sich lymphatische Blasten im Blut nachweisen und es zeigt sich häufig die Unterdrückung der oben genannten Zellreihen sowohl im Knochenmark als auch im Blut. Ab einem Anteil von 25% lymphatischen Blasten im Knochenmark spricht man definitionsgemäß von einer ALL (Arber, et al. 2016). Zum detaillierten Staging und zur besseren Prognoseeinschätzung der Erkrankung dienen weitere diagnostische Maßnahmen, beispielsweise eine Lumbalpunktion zum Nachweis einer Meningeosis Leucaemica (Gökbuget, et al. 2018).

Essenziell zur Festlegung eines individuellen Therapiekonzepts sind zytologische und immunologische Untersuchungen der klonalen Blasten inklusive Molekulargenetik.

1.1.2 Klassifikation

Die Klassifikation der ALL erfolgt durch im Rahmen der WHO-Klassifikation von 2008. Diese Einteilung wurde im Rahmen der German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL) verfeinert, ein Überblick ist in Tabelle 2 dargestellt (Arber, et al. 2016), (Gökbuget, et al. 2018).

Grundsätzlich wird die ALL anhand der zytologischen Eigenschaft der Vorläuferzellen primär in B- oder T-Zell-Typ unterschieden, wobei die Leukämie der lymphatischen B-Zellreihe 75% der ALL bei Erwachsenen umfasst und sich in die Untergruppen pro-B, common-, prä-B und reifzellige B-ALL unterteilen lässt. Die Philadelphia positive ALL ist der B-Vorläufer ALL zuzuordnen (Chiaretti, et al. 2014).

Tabelle 2. Einteilung ALL
modifiziert nach WHO und GMALL

Subgruppe	
Bezeichnung	Inzidenz
B- Linien ALL	76%
B-Vorläufer ALL	
• Pro-B	11%
• c- (common)	49%
• Prä-B	12%
Reife B ALL	4%
T- Linien ALL	24%

1.1.3 Prognosefaktoren

Die Prognose der ALL wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen unter anderem ein hohes Erkrankungsalter von >60 Jahren, genetische Aberrationen wie insbesondere die Philadelphia-Translokation t(9;22) und eine hohe Leukozytenzahl von >30.000 pro μl bei B-Vorläufer-ALL. Die ungünstigen Prognosefaktoren der ALL bei Erwachsenen anhand der Definition der GMALL 07/2003 ist in der untenstehenden Tabelle 3 gezeigt (Gökbuget, et al. 2018 Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL) Deutsche Gesellschaft für Hämato-Onkologie (DGHO)).

Bei Vorliegen eines ungünstigen Prognosefaktor erfolgt die Zuordnung zur Hochrisikogruppe, so dass primär alle Patienten mit Ph+ ALL zur Hochrisiko-Gruppe gehören. Alle Patienten, die in einer Hochrisikogruppe eingeordnet sind, sollen schnellstmöglich und im Rahmen des GMALL-Studienprotokolls eine Stammzelltransplantation (SZT) erhalten.

Tabelle 3. negative Prognosefaktoren GMALL 07/2003

Hohe Leukozytenzahl	> 30.000/ μl bei B-Vorläufer-ALL
Subtyp	pro B, early T, reife T
Späte CR	> 3 Wo (nach Induktion II)
Zytogenetische / Molekulare Aberrationen	t(9;22) - <i>BCR-ABL</i> t(4;11) - <i>KMT2A-AFF1</i>
	Komplex aberranter Karyotyp
Minimale Resterkrankung	MRD-Niveau über 10^{-4} nach Frühkonsolidation * MRD-Anstieg über 10^{-4} nach vorheriger molekularer CR

1.1.4 Therapiegrundlagen, Besonderheiten der Therapie bei Ph + ALL

Die Therapie der ALL ist sehr komplex und wird aufgrund der Seltenheit der Erkrankung generell in groß angelegten Studien, beispielsweise der German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL), durchgeführt. Insgesamt wird die Therapie, sofern möglich, anhand von spezifischen molekularen Markern der ALL-Zellen gesteuert, die auch die Bestimmung einer minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) erlauben. Die Therapiestruktur basiert auf verschiedenen Säulen: Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie. Zunächst ist das Therapieziel das Erreichen einer kompletten Remission (CR), die laut Definition der American Cancer Society bei Nachweis von weniger als 5% Blasten im Knochenmark, einer normalen Zellzahlen im peripheren Blut und Fehlen von Krankheitssymptomen vorliegt. Von einer molekularen kompletten Remission wird gesprochen, wenn sich im Knochenmark auch unter sehr sensitiven Methoden wie einer Polymerasekettenreaktion (PCR) keine Leukämiezellen mehr anhand ihrer spezifischen molekulargenetischen Veränderungen nachweisen lassen, d.h. wenn kein Nachweis einer MRD mehr mittels PCR gelingt. Konsolidierungstherapie und Erhaltungstherapie dienen der langfristigen Aufrechterhaltung der kompletten Remission. Bei Hochrisikogruppen umfasst die Konsolidierungstherapie eine Stammzelltransplantation, da ohne diese kein dauerhafter Erhalt einer CR möglich ist. Die Induktionstherapie basiert auf studienspezifischen Chemotherapiekonzepten.

1.1.4.1 Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Ph+ ALL wird durch das Vorhandensein der durch das BCR-ABL1-Fusionsgen kodierten konstitutiv aktiven Tyrosinkinase charakterisiert. Zur Therapie sind daher spezielle Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) verfügbar. Als erster verwendeter Tyrosinkinaseinhibitor und gleichzeitig die Blaupause einer zielgerichteten Krebstherapie steht seit 2001 in Deutschland Imatinib zur Verfügung (Ottmann and Pfeifer 2009a). Aktuell werden auch Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten und dritten Generation im Rahmen von Studien vermehrt zur Therapie von BCR-ABL positiven Leukämien eingesetzt und eine mögliche Erstlinientherapie mit dem Zweitgenerations-TKI Dasatinib bei der Ph+ ALL überprüft (Ottmann, et al. 2007a).

Rousselot et al konnten in einer klinischen Studie bei älteren Ph+ ALL-Patienten unter einer kombinierten Therapie von Dasatinib, Vincristin, Dexamethason und intrathekaler Chemotherapie bei 95% der Patienten eine komplette Remission erzielen, die 5 Jahres Überlebensrate lag bei 36% (Rousselot, et al. 2016).

Dasatinib als hochpotenter oraler Multikinaseninhibitor der zweiten Generation kann dual sowohl die BCR-ABL1 Kinase als auch die Src (sarkomäre und zelluläre) Kinase hemmen und bindet sowohl an die aktive als auch inaktive Konformation der ABL Kinase (Rousselot, et al. 2016). Außerdem weist Dasatinib eine mehr als 300fach höhere Affinität gegenüber der BCR-ABL Kinase auf als Imatinib und ist auch bei Mutationen wirksam, die zu einer Imatinibresistenz führen (Fei, et al. 2010, Foa, et al. 2011, Liu-Dumlao, et al. 2012). Dasatinib dient ebenfalls zur effektiven Therapie bei Patienten, die an einer rezidierten CML leiden oder eine Imatinibresistenz entwickelt haben (Cortes, et al. 2007, Talpaz, et al. 2006).

Für die Ph+ ALL bei Patienten unter 55 Jahren wird aktuell zur Chemotherapie in der Induktionsphase eine wöchentliche Gabe von Vincristin und Dexamethason empfohlen sowie die Gabe von Asparaginase und eines Clusters of Differentiation 20 (CD20) Antikörpers wie beispielsweise Rituximab in Kombination mit Imatinib (Ottmann, et al. 2007b). Da es jedoch unter einer Chemotherapie in Kombination mit einem Tyrosinkinaseinhibitor häufig zur Entwicklung von Resistenzen kommt, stellt eine autologe Stammzelltransplantation für Ph+ ALL Hochrisikopatienten die einzige kurative Therapieoption dar (Gökbuget, et al. 2012).

Von einer Ph+ ALL sind, wie oben beschrieben, besonders häufig ältere Patienten betroffen. Aufgrund von Komorbiditäten und Vorerkrankungen sind diese älteren Patienten häufig nicht in der Lage, die komplette Induktionstherapie zu erhalten, und auch eine Stammzelltransplantation kommt aufgrund der hohen Komplikationsrate und der Intensität der Therapie nur in seltenen Fällen in diesem Patientenkollektiv in Frage. Dies führt bei älteren Patienten, die an einer Hochrisiko Ph+ ALL erkranken, zu einer insgesamt schlechten Prognose mit nur geringen Heilungschancen (Gokbuget 2018). Studien konnten zeigen, dass eine alleinige Zugabe von Imatinib zur Induktionstherapie deutlich zufriedenstellendere initiale Remissionsraten erzielt (Fielding, et al. 2014) (Ottmann, et al. 2007b).

Aktuell wird von der GMALL Studiengruppe zur Therapie der Ph+ ALL bei älteren Patienten in der Induktion die Gabe von Imatinib kombiniert mit Vincristin/Dexamethason inklusive einer intrathekalen Prophylaxe empfohlen (Rousselot, et al. 2016) (Gokbuget 2018).

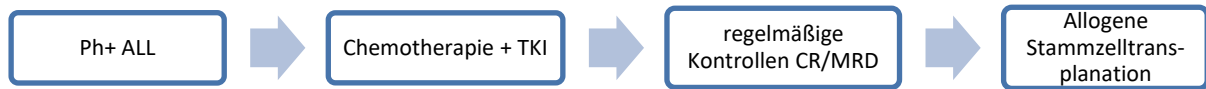


Abbildung 2. Therapie der ALL

1.1.5 Prognose der Ph+ ALL

Die Ph+ ALL stellte lange Zeit die Leukämie-Unterform mit der schlechtesten Prognose dar, eine alleinige Chemotherapie führte nur zu einem ereignisfreien 5 Jahres Überleben von <20% (Chiaretti and Foa 2015) (Liu-Dumlao, et al. 2012). Dank der Einführung von Tyrosinkinaseinhibitoren konnte diese Prognose und die Therapie besonders von erwachsenen Patienten mit Ph+ ALL verbessert werden. Eine Imatinib-basierte Therapie bei älteren Patienten führt zu einem medianen Überleben von 18 Monaten (Ottmann and Pfeifer 2009b). Allerdings ist die Lebenserwartung von erwachsenen Ph+ ALL Patienten weiterhin niedrig und die Heilungschancen sind gering, da die Standardtherapieoptionen aus Chemotherapie und kurativer allogener (allo) SCT häufig aufgrund von Komorbiditäten nicht zur Verfügung stehen (Kang, et al. 2016). Außerdem kommt es, wie bereits beschrieben unter der Therapie mit einem TKI häufig zu Resistenzentwicklungen, beispielsweise der T315I Mutation. Hier stellt Ponatinib heute den einzig wirksamen TKI dar und die Therapieoptionen sind somit sehr beschränkt (Nicolini, et al. 2017).

1.2 Chronische myeloische Leukämie

Eine zweite Leukämieunterform, deren Pathogenese auf der Expression der BCR-ABL1 Kinase beruht, ist die chronische myeloische Leukämie (CML). Die CML zählt zu den myeloproliferativen Neoplasien (MPN) und ist durch eine gesteigerte Proliferation unreifer myeloischer Zellen gekennzeichnet, allerdings liegt, anders als bei der ALL, kein Differenzierungsblock vor, so dass die unreifen myeloischen Zellen noch bis hin zu den reifen Granulozyten ausdifferenzieren.

Dies führt zu einer kontinuierlichen Linksverschiebung im Knochenmark. Auch der CML liegt eine klonale Erkrankung einer pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen zu Grunde, die unter Einfluss der BCR-ABL1 Tyrosinkinase onkogen differenziert ist. Meist finden sich im peripheren Blut keine oder nur wenige Blasten (Hehlmann, et al. 2005). Die Entstehung einer CML beruht, ähnlich wie die eine Ph+ ALL, auf der Philadelphia-Translokation in Zellen der myeloischen Reihe und dem konsekutiven BCR-ABL1 Fusionsgen mit Expression der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL. Wichtiger Unterschied zur Ph+ ALL, bei der das BCR-ABL1 Fusionsgen in lymphatischen Vorläuferzellen auftritt, ist aber die andere, nämlich myeloische, Ursprungszellreihe. Die CML betrifft vor allem ältere Menschen, der Erkrankungsgipfel liegt bei 55-60 Jahren und ist mit einer Inzidenz von 1,2-1,7/100.000 Einwohner pro Jahr ebenfalls eine eher seltene Erkrankung (Hoglund, et al. 2015).

Die CML lässt sich klinisch und histologisch in drei Phasen unterteilen (Baccarani, et al. 2013):

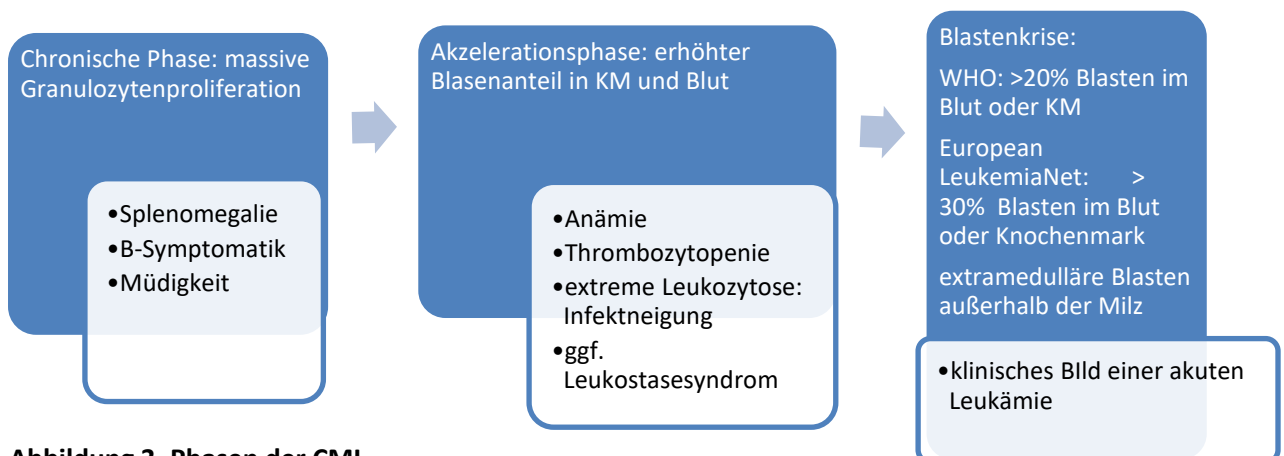


Abbildung 3. Phasen der CML

Die Diagnostik besteht neben einer typischen Anamnese der oben genannten Symptome aus dem Nachweis von Veränderungen im peripheren Blutbild, vor allem der Leukozyten im Differenzialblutbild, und dem Nachweis von BCR-ABL1 Transkripten mittels Multiplex-PCR aus dem peripheren Blut. Auch Knochenmarkaspirat und Knochenmarksbiopsie inklusive Zytologie und Zytogenetik tragen zur initialen Diagnosestellung bei. Durch die revolutionäre Entwicklung und Etablierung des ersten Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib konnte die Prognose der CML deutlich verbessert werden, und die Lebenserwartung der Betroffenen ist dank neuerer Tyrosinkinaseinhibitoren wie Dasatinib sogar noch weiter gestiegen und nähert sich

aktuell der der Normalbevölkerung (Baccarani, et al. 2009). Dasatinib zeigte als Erstlinientherapie höhere Raten einer zytologischen und molekularen Remission und geringere Raten an Progression in Akzelerationsphase oder Blastenkrise. Heute sind die Tyrosinkinaseinhibitoren Dasatinib, Imatinib, Nilotinib und Bosutinib zur Erstlinientherapie zugelassen (Baccarani, et al. 2013).

Eine CML in der Blastenkrise entspricht dem Bild einer akuten Leukämie und kann in myeloischen oder lymphatischen Typ unterschieden werden, wobei der lymphatische Typ mit der Ph+ ALL verglichen werden kann und sich die Therapieprinzipien gleichen (Melo and Barnes 2007) (Hehlmann 2012). Die Prognose einer Blastenkrise ist vergleichbar mit der der Ph+ ALL und eine Stammzelltransplantation verbleibt dann meist als einzige kurative Therapiemöglichkeit (Hehlmann 2012). Aufgrund der weiterhin schlechten Prognose der Ph+ ALL sowie der CML in der Blastenkrise werden aktuell verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Therapie und zur Erweiterung der zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten verfolgt.

Ein Ansatz, der bereits in einzelnen Fallberichten und klinischen Studien vielversprechende Erfolge gezeigt hat, ist die Therapie der akuten Leukämie mit dem Proteasominhibitor Bortezomib.

1.3 Proteasominhibitoren

Proteasominhibitoren sind Substanzen, die bereits bei anderen hämatopoetischen Neoplasien zugelassen sind und eingesetzt werden, hierzu zählen das Multiple Myelom bei Erstdiagnose, das refraktäre Multiple Myelom und das Mantelzelllymphom (Okazuka and Ishida 2018) (Sengar and Jain 2015). Proteasominhibitoren nehmen Einfluss auf den Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP). Der UPP ist ein komplexer Regulationsprozess unter anderem zur Degradierung von fehlgefalteten oder mutierten Proteinen, der in allen eukaryotischen Zellen konserviert abläuft und Proteinstabilität und Zellfunktion reguliert. Die Degradierung von Proteinen spielt eine Rolle für Apoptose, Zellüberleben, DNA Reparatur, Antigen Präsentation und viele weitere Regulationsprozesse (Manasanch and Orlowski 2017). Sie dient somit der Erhaltung der Homöostase und verhindert eine Tumorgenese (Chen, et al. 2011).

Der UPP ist ein vielschichtiger Prozess, in den verschiedene Enzyme E1 (Ubiquitin-aktivierendes Enzym), E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) und E3 (Ubiquitin-Ligationsenzym) involviert sind. Das Proteasom hat eine komplexe molekulare Struktur und besteht aus verschiedenen Untereinheiten. Das 26S Proteasom, welches die Ubiquitin-markierten Proteine detektiert, besteht aus einer katalytischen 20S Einheit und zwei regulatorischen 19S Einheiten. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Proteasoms durch Proteasominhibitoren zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen führt, welches einen Zellzyklusarrest und Apoptose bewirkt. Dies führte zur Etablierung von Proteasominhibitoren in der Krebstherapie, speziell in der Therapie von verschiedenen hämatopoetischen Neoplasien, da Tumorzellen deutlich sensibler auf Proteasominhibitoren reagieren als gesunde, nicht-maligne Zellen (Dou and Zonder 2014).

Der erste Proteasominhibitor, der von der Food and Drug Administration (FDA) zur Krebstherapie zugelassen wurde, ist Bortezomib, eine Boronsäure, die reversibel die 20S Untereinheit des Proteasoms hemmt (Buac, et al. 2013). Bortezomib kann intravenös oder subkutan verabreicht werden, allerdings weist die subkutane Gabe eine bessere Verträglichkeit auf (Moreau, et al. 2011). Die genauen Mechanismen, wie die Hemmung des Proteasoms durch Bortezomib zur Apoptose von Krebszellen führt ist bislang nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass einerseits der *nukleärer Faktor κ -light chain-enhancer of activated B-cells* NF- κ B Signalweg eine entscheidende Rolle spielt und dass Bortezomib durch Hemmung dieses Signalwegs eine Herunterregulierung der antiapoptotischen Targetgene bewirkt, die in diesen Signalweg involviert sind. Ein zweiter Signalweg, der Studien zufolge in die Wirkungsweise von Bortezomib involviert ist, ist die Hochregulation des pro-apoptotischen Mitglieds der B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Proteinfamilie Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced-protein (PMAIP1 Gen=NOXA) welcher mit den proapoptotischen Proteinen B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) und Bcl-2 interagiert. (Chen, et al. 2011)

Ein Proteasominhibitor der zweiten Generation, der 2015 von der FDA zur kombinierten Zweitlinientherapie des Multiplen Myeloms zugelassen wurde, ist Ixazomib. Ixazomib ist der erste und bisher einzige oral verfügbare Proteasominhibitor und weist so einen großen Vorteil in der Compliance der Patienten auf (Teicher and Tomaszewski 2015) (Manasanch and Orlowski 2017).

Häufig ist die Therapie von Patienten mit einem Multiplen Myelom im fortgeschrittenen Stadium durch Nebenwirkungen der Proteasominhibitoren und Schwierigkeiten in der engmaschigen Applikation der intravenös oder subkutan verabreichten Proteasominhibitoren der ersten Generation limitiert. Hier stellt Ixazomib durch seine orale Darreichungsform und sein geringeres Nebenwirkungsprofil mit guter Verträglichkeit einen entscheidenden Fortschritt der Pharmakotherapie dar (Richardson, et al. 2018) (Bonnet and Moreau 2017).

Ein weiterer bekannter Mechanismus, der in die Wirkweise der Proteasominhibitoren beim Multiplen Myelom involviert ist, ist die unfolded protein response (UPR, ungefaltete Proteinantwort). Die UPR ist ein Mechanismus der Zellen, der ausgelöst wird, wenn im Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermehrt fehlgefaltete Proteine entstehen und sich in der Zelle ansammeln. Die UPR versucht zunächst anti-apoptotisch durch die Expression von Chaperonen eine regelhafte Faltung der Proteine im ER zu bewirken. Falls dies nicht gelingt löst er einen Arrest des Zellzyklus und die Induktion von Apoptose aus (Obeng, et al. 2006). Durch die oben genannte Hemmung des Proteasoms kommt es in MM Zellen zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER und dies bewirkt wiederum die Aktivierung der UPR. Proteasominhibitoren führen zur Expression pro-apoptotischer Gene, die Teil der UPR sind (Obeng, et al. 2006). Bisher nicht veröffentlichte Daten zeigen sowohl, dass die kombinierte Gabe von Proteasominhibitoren und UPR Inhibitoren bei MM Zellen, als auch die kombinierte Gabe von UPR Inhibitoren und TKIs in Ph+ ALL synergistisch wirken und zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität führt (Vieri, et al. 2020), (Salimi et al., unpublizierte Daten). Außerdem haben andere Studien bereits gezeigt, dass die UPR in B-ALL Zellen gesteigert ist und eine Beeinflussung der UPR zu Apoptose führen kann (Kharabi Masouleh, et al. 2015). Daher könnten auch Proteasominhibitoren gemeinsam mit TKIs unter anderem über eine Beeinflussung des UPR positive Effekte in der Therapie der ALL aufweisen. Da der Ubiquitin Proteasome Pathway ubiquitär in allen Zellen vorkommt, werden Proteasominhibitoren auch bei vielen anderen Krebserkrankungen als mögliche neue und effektive Therapiemöglichkeiten gehandelt. Hierzu zählen auch Leukämien, bei denen häufig eine gesteigerte Proteasomaktivität nachweisbar ist.

In einem Review von Du et al (Acta Haematol 2013) wird detailliert über antileukämische Effekte Bortezomib in der Behandlung von ALL berichtet und Proteasominhibitoren werden als möglicher Bestandteil einer kombinierten Therapie bei Kindern mit refraktärer ALL genannt (Du and Chen 2013). Grundlage dieses Reviews ist unter anderem die Darstellung der intrazellulären Reaktionswege durch Bortezomib durch Boccadoro et al (siehe Abb. 4). Messinger et al. konnten in einer klinischen Phase 2-Studie mit 22 B-Precursor ALL Patienten unter einer kombinierten Therapie inklusive Bortezomib bereits eine antileukämische Wirkung von Bortezomib aufzeigen (Messinger, et al. 2012).

Da beide oben genannten Proteasominhibitoren Ixazomib und Bortezomib bereits durch die FDA zugelassen sind und etablierte Therapieoptionen darstellen, ist auch das Risikoprofil beider Substanzen bereits gut bekannt und erprobt, so dass eine mögliche klinische Gabe dieser Substanz auch bei anderen Erkrankungen, insbesondere der Ph+ ALL, unter pharmakologischen Aspekten gut realisierbar wäre.

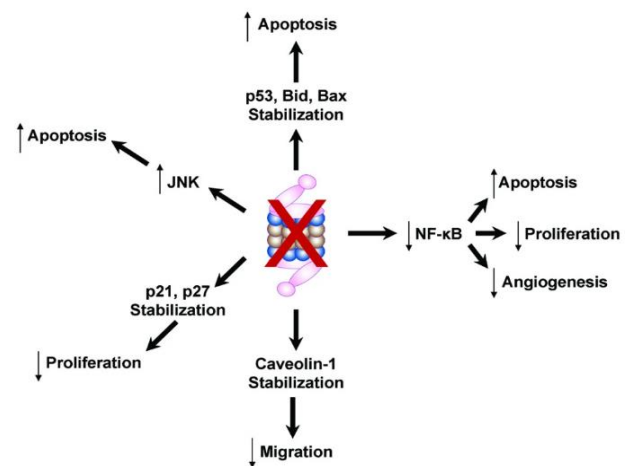


Abbildung 4. intrazelluläre Reaktionswege und Proteine, die durch Bortezomib beeinflusst werden
 JNK = c-Jun N-terminal kinase
 (Boccadoro, et al. 2005)

2 Zielsetzung

Aufgrund der oben beschriebenen limitierten Therapiemöglichkeiten der Ph+ ALL sowie der CML in der Blastenkrise vor allem bei älteren Patienten und der gleichzeitig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung und damit konsekutiv steigenden Prävalenzen beider Erkrankungen, ergibt sich für die Ph+ ALL eine wachsende Diskrepanz zwischen dem Bedarf an Therapieoptionen und den bereits zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten. Es ist von großer Bedeutung, durch neue Therapien die Prognose der Erkrankung weiter zu verbessern. Dies gilt vor allem für Patienten, die aufgrund ihres Alters und damit verbundenen Vorerkrankungen keine kurative allogene Stammzelltransplantation erhalten können. Die Entwicklung neuer, möglichst personalisierter Therapieformen, die dauerhaft die Entwicklung von Resistenzen verhindern und zu einer verlängerten Lebenserwartung bei erhaltener, hoher Lebensqualität unter Berücksichtigung bereits vorhandener, gegen andere hämatologische Erkrankungen wirksamen Substanzen, stellt die Grundlage der hier vorliegenden Arbeit da.

Charakteristisch für die ALL ist ein stark beschleunigtes Zellwachstum und Zellvermehrung, was im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren eine starke Belastung für den UPP darstellt. Daher erscheint die Hemmung des UPP gemeinsam mit der Hemmung der BCR-ABL Tyrosinkinase eine logische und vielversprechende Möglichkeit, die Therapie der Ph+ ALL zu verbessern. Eine Fallstudie von Dewar et al. konnte bereits zeigen, dass es bei einem Ph+ ALL Patienten durch die Behandlung mit Bortezomib und dem Monoklonalen CD20 Antikörper Rituximab zu einer kompletten Remission gekommen ist (Dewar, et al. 2011). Bertaina et al. berichten, dass Bortezomib in Kombination mit Chemotherapie bei Kindern mit rezidivierter ALL eine vielversprechende Wirkung gezeigt hat (Bertaina, et al. 2017). Allerdings beziehen sich diese vor allem rezidivierende ALL Fälle, und Daten zu primären Ph+ ALL Fällen bei Erwachsenen, die die Wirkungsweise von Proteasom-inhibitoren in vivo und in vitro in der Zellkultur untersuchen und vor allem eine mögliche Kombination der Proteasom-inhibitoren mit Tyrosinkinase-inhibitoren testen, sind kaum vorhanden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu evaluieren, welchen Einfluss Proteasominhibitoren auf primäre Ph+ ALL Zelllinien in vivo haben und wie sich die Kombination von Proteasominhibitoren und Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Zellen auswirkt. Außerdem sollen erste Mechanismen, die in den Zellen bei Proteasominhibitorgabe ausgelöst werden aufgezeigt werden, um grundlegende Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Proteasominhibitoren und TKIs in Ph+ ALL Fällen zu gewinnen. Dies soll langfristig eine Untersuchung der beiden Wirkstoffe zunächst im Tiermodell und später bei weiterhin positiven Ergebnissen auch in klinischen Studien ermöglichen, damit es gelingt die Prognose der Ph+ ALL zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

3.1.1.1 Chemikalien

Tabelle 4. Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Annexin-V-APC Antibody	BD Biosciences
Beta-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bradford reagent	Bio-Rad
CFSE Lösung	Sigma-Aldrich
Chlorophorm	Merck
Cleaning solution FACS	BD Biosciences
D (+) Glucose	Carl Roth
Decontamination solution FACS	BD Biosciences
dNTP mix	Invitrogen
DTT	Invitrogen
EDTA	Carl Roth
Ethanol	Emsure®, Merck
Ethidium bromide	invitrogen
Glycine	Carl Roth
Glycerol	Sigma-Aldrich
H2O2	Sigma-Aldrich
Hydrogen peroxide (30%)	Sigma-Aldrich
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich
Isopropanol 100%	Carl Roth
KCl	Carl Roth
KH2PO4	Sigma-Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich
Methanol	Carl Roth
Methylenblau	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
M-MLV Reverse Transcriptase Containing 5X First Strand Buffer	Invitrogen
Na2HPO4	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
p-Coumaric acid	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Gibco® Thermo Fisher Scientific
Phosphate buffered saline powder	roticell® Carl Roth
Prestained Marker	Thermo Fisher Scientific
Propidium iodid solution	Sigma-Aldrich
Protease inhibitor	Sigma-Aldrich
random Hexamers	Invitrogen
RNase	Sigma-Aldrich
SDS	Carl Roth
SIGMAFAST protease inhibitor	Sigma-Aldrich
sodium desoxycholate	Sigma-Aldrich
sodium fluoride	Sigma-Aldrich
sodium orthovanadate (Na3VO4)	Sigma-Aldrich

Streptomycin	Invitrogen
SYBRGreen	Invitrogen
TRIS C4H11NO3	Carl Roth
TRIS-HCL	Carl Roth
Triton-X	Sigma-Aldrich
Trizol	Ambion®/ Thermo Fisher Scientific
β-glycerophosphate	Sigma-Aldrich

3.1.1.2 Kits

Tabelle 5. Auflistung der verwendeten Kits

Material	Hersteller
Cell Counting Kit-8	Dojindo
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio Rad
RNAseOut	Promega
TGX Fast Cast Acrylamide Kit 10%	Bio Rad

3.1.1.3 Antikörper

Tabelle 6. Auflistung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Rabbit Immunoglobulins	DAKO®/Aligent	
BAX	Cell Signaling Technology	D2E11
Bcl-2	Cell Signaling Technology	50E3
Beta Actin	Abcam	Polyclonal #ab8227
BIM	Cell Signaling Technology	C34C5
PARP-1	Cell Signaling Technology	Polyclonal #9542

3.1.1.4 Primer

Tabelle 7. Auflistung der verwendeten Primer

Name	Hersteller	Sequenz
COX6b	eurofins genomics	F - AACTACAAGACCGCCCCTTT
		R - GCAGCCAGTTGAGATCTTCC
XBP1s	eurofins genomics	F - AACCAGGAGTTAAGACAGCGCTT
		R - CTGCACCCTCTGCGGACT
ERN1	eurofins genomics	F - GACCGGCAATTCAGTACAT
		R - TTGGGCATGGATATGAGGAT
NOXA	eurofins genomics	F – CTCTTTCCTCCTCGCCACTT
		R - GAGTCCCCTCATGCAAGTTT
TRAIL	eurofins genomics	F - GCAGGAATTCAGGATCATGGCTATGATGG
		R - GCACGGATCCCAGGTCAGTTAGCCAAC

3.1.1.5 Medikamente

Tabelle 8. Auflistung der verwendeten Medikamente

Medikament	Hersteller
Bortezomib	LC Laboratories
Dasatinib	LC Laboratories
Ixazomib	CaymanChemical

3.1.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 9. Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
10X SDS running buffer	30.3 g tris base, pH 8.3, 144 g glycine, 10 g SDS
10X TBS	pH 7.4; 15 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl
4X Laemmli buffer	1,2 ml 2M Tris pH 6.8, 0,8g SDS stock, 4ml 100% glycerol, 4mg bromophenol blue, 2ml β Mercaptoethanol, 10ml ddH ₂ O
Annexin V binding buffer	0,1 M HEPES, 1,4 M NaCl, 25mM CaCl ₂ in H ₂ O
PCA-ECL Lösung	100 mM Tris-HCL, pH 8.8, 2.5 mM luminol, 0.198 mM p-coumaric acid und 0.2% v/v hydrogen peroxide
RIPA buffer	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X, 15% Glycerol, 0,5% sodium desoxycholate in 500ml ddH ₂ O
saline-GM Lösung	Glucose 1.1g/l, NaCl 8g/l, KCl 0.4g/l, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 0.2g/l, KH ₂ PO ₄ 0.15g/l and EDTA
Transfer buffer	3 g tris base, 14.4 g glycine, 10% methanol
Stripping buffer	pH 6.7, 62,5 mM Tris/HCl, 2% SDS

3.1.1.7 Zellkultur Medium und Lösungen

Tabelle 10. Auflistung des verwendeten Zellkulturmedien und Lösungen

Produkt	Hersteller
BSA	Carl Roth
FBS	Gibco® Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Gibco® Thermo Fisher Scientific
RPMI-1640	Invitrogen

3.1.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11. Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
0,5 mL Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf
1,5mL Reaktionsgefäß/ tube	Sarstedt
10mL Stripette serological pipette	Falcon® Corning
15 ml Tubes	Falcon® Corning
175 cm2 Zellkulturflasche	Greiner Bio-One
25 cm2 Zellkulturflasche	Greiner Bio-One
25mL Stripette serological pipette	Falcon® Corning
50 ml Tubes	Sarstedt
50mL Stripette serological pipette	Falcon® Corning
6 well plate	Greiner Bio-One
6 well plate (uncoated)	BD Biosciences
75 cm2 Zellkulturflasche	Greiner
96 well PCR plate	Applied Biosystems
96 well plate	Greiner Bio-One
Alufolie	Carl Roth
Cuvette	Sarstedt
Handschuhe Nitrile Puderfrei	ABENA classic
PCR tubes	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 10µl	Star Lab TipOne®
Pipettenspitzen 1000µl	Star Lab TipOne®
Pipettenspitzen 200µl	Star Lab TipOne®
PVDF Membran	GE Healthcare
Whatmanpapiere	Carl Roth
Freezing Tubes	Greiner Bio-One

3.1.2 Geräte

Tabelle 12. Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
ABI 7500 fast real-time PCR System	Applied Biosystems	Thermo Fisher Scientific
Flowzytometer	BD Accuri®C6 Flow Cytometer System	BD Biosciences
Fusion SL imaging System		Vilber
Heizplattenrührer	Fisherbrand®	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	BB15 CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Magnetic stirrer	IRHbasic2	IKA
Mikropipette	physio care concept 0.5-2.5 µL	Eppendorf
Mikropipette	physio care concept 2-20 µL	Eppendorf
Mikropipette	physio care concept 10-100 µL	Eppendorf
Mikropipette	physio care concept 20-200 µL	Eppendorf
Mikropipette	physio care concept 10-1000 µL	Eppendorf
Mikroplattenleser		Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	Axioskop	Zeiss
Mikrozentrifuge	accuSpin Micro 17R	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty™ Cell Freezing Container	5100-0001	Thermo Fisher Scientific

Multipipette	Easypet 3	Eppendorf
Multistep pipette	Finnpipette F2 MCP8 30-300 µL	Thermo Fisher Scientific
Multistep pipette	Finnpipette F2 MCP8 5-50 µL	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop	NanoDrop®3300 Fluoreszenzspektrometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauerzählkammer	T729.1	Carl Roth
Präzisionswaage	Kern EMB 200-2	Kern
Thermoschüttler	Thermomixer pro	CellMedia
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
Waage	Fisherbrand® Analysenwaagen	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	Isotemp GPD 10	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur Bank	Cell Guard HC, class 2	IBS Integra Biosciences
Zentrifuge	Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific

3.1.3 Zelllinien und Zellkultur

Es wurden insgesamt vier humane B-Vorläufer ALL Zelllinien verwendet, zwei Ph+ Zelllinien TOM-1 und BV-173 sowie zwei Ph- Zelllinien RS4;11 und REH (Tabelle 4). Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ, Braunschweig, Deutschland erworben und wurden mittels Multiplex Zelllinien Authentifizierung, Multiplexion®, Friedrichshafen, Deutschland überprüft. Die Zelllinien wurden in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640, Invitrogen®, Carlsbad, CA) mit GlutaMAX® bestehend aus 10% fetalem Kälber Serum (FBS), 100 IU ml⁻¹ Penicillin sowie 100 µg ml⁻¹ Streptomycin bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde mindestens jeden dritten Tag vollständig erneuert. Nach 6-8 Wochen wurden frische Zellen aufgetaut und in Kultur gebracht. Vor jedem Experiment wurde die Vitalitätsüberprüfung der Zellen sowie die Zellzahlbestimmung mittels Methylenblaufärbung durchgeführt. Hierzu wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl Methylenblau in einem 1,5ml Eppendorfröhrchen gemischt, 20µl dieser Suspension in einer Neubauerzählkammer überführt und unter dem Mikroskop die Zellzahl bestimmt. Hieraus berechnete sich das für alle weiteren Experimente benötigte Volumen der Zellsuspension zum Erreichen der vorgegebenen Zellzahl. Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut werden sollten, wurden in einer Konzentration von 5 Millionen/ml Zellen bei -80 Grad in Freezing Medium bestehend aus 90% FBS und 10% Dimethylsulfoxid DMSO eingefroren.

Tabelle 13. verwendete Zelllinien

Liste Zelllinien	
Translokation	Zelllinie
BCP-ALL (n=4)	
Ph+ t (9;22) (n=2)	TOM-1, BV-173
MLL+ t (4;11) (n=1)	RS4;11
t (12;21) (n=1)	REH

3.1.4 Medikamente und Dosierung

Es wurden der Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) Dasatinib und die Proteasominhibitoren Bortezomib und Ixazomib als Medikamente für die vorliegende Arbeit verwendet. Dasatinib und Bortezomib wurden bei LC Laboratories (Woburn, MA, USA und Ixazomib bei CaymanChemical® (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) erworben. Alle Medikamente wurden in DMSO auf eine festgelegte Konzentration von 10 mmol gelöst, in einem Volumen von 100µl ml Lösung in Eppendorfröhrchen gefüllt und bei -20°C für alle Experimente gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Cell Counting Kit-8 (CCK8) Zellwachstumsanalyse

Vor Beginn der Versuche erfolgte die Festlegung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) der beiden Proteasominhibitoren Bortezomib und Ixazomib in den beiden Ph+ Zelllinien TOM-1 und BV-173. Diese wurde mittels einer Zellwachstumsanalyse unter Verwendung des Cell Counting Kit-8 von Dojindo Molecular Technologies (München, Deutschland) bestimmt. Die Zellen wurden in einer 96 Mikrotiterplatte mit einer definierten Zellzahl von 3×10^5 Zellen pro *well* in einem Volumen von jeweils 200µl RPMI-1640 Medium ausgesät. Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen mit Bortezomib bzw. Ixazomib behandelt. Die verwendeten Konzentrationen lagen zwischen 0,001 bis 0,5 µM. Jeder der Dosierungsschritte wurde in sechsfacher Ausführung als technische/biologische Replikate durchgeführt. An jeweils drei verschiedenen Zeitpunkten nach 24h, 46h und 72h wurden 10µl CCK8 Reagenz zu jedem *well* der Mikrotiterplatte hinzugefügt und nach weiteren vier Stunden Inkubationszeit im Inkubator wurde die jeweilige Absorption bei 450nm mittels eines Mikroplattenlesers (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) bestimmt.

Nach Subtraktion der Absorption des RPMI Mediums und nach Normalisierung der Messwerte wurden die Ergebnisse mittels GraphPad® analysiert und in eine nicht lineare Regressionskurve überführt. Hierbei stellt der Wendepunkt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) des jeweiligen Medikaments dar.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Zur Differenzierung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometer im Sinne eines Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) untersucht. Die Zellen wurden in einer 6er Mikrotiterplatte mit 3ml RPMI-1640 Medium und einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro *well* ausgesät. Die Medikamente wurden in festgelegter Dosierung und in verschiedenen Kombinationen:

(Tyrosinkinaseinhibitor, Proteasominhibitor sowie Tyrosinkinaseinhibitor + Proteasominhibitor)

sofort zu den Zellen hinzugegeben. Für jedes durchgeführte Experiment wurde eine Kontrolle bestehend aus RPMI-1640 Medium und DMSO angelegt. Im Anschluss wurden die Zellen in der 6er Mikrotiterplatte im Inkubator kultiviert. An definierten Zeitpunkten beispielsweise d0, d1, d2, d3, d4, d5 wurden je 500µl der Zellsuspension pro Bedingung aus der Mikrotiterplatte entnommen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Jeden dritten Tag Tagen wurden die Zellen mit 3ml phosphate buffered saline (PBS) gewaschen und mit frischem Medium sowie einer frischen Dosierung der Medikamente rekultiviert. Die mit den Medikamenten behandelten Zellen wurden mit verschiedenen Assays zur Beantwortung spezifischer Fragestellung untersucht.

3.2.2.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels Propidiumjodid-Färbung

Die Bestimmung der Zellviabilität wurde mit einer Propidiumjodid-Färbung durchgeführt, dabei wurde Propidiumjodid (PI) in einer Konzentration von 0,2µg/mdl., (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) verwendet. Bei Propidiumjodid handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der interkalierend an doppelsträngige DNA bindet. Der Farbstoff durchdringt dabei nur die geschädigte Zellmembran avitaler Zellen und kann nicht die intakte Zellmembran lebender Zellen durchdringen.

Daher dient Propidiumjodid zur Detektion nicht vitaler Zellen und ermöglicht die Messung der Zellviabilität. Zur Durchführung der Propidiumjodid-Färbung wurden jeder Bedingung 500µl Volumen entnommen und mit 1ml PBS gewaschen und hierbei mit 400x g für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500µl PBS resuspendiert und 0,1% Propidiumjodid zu der Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS analysiert. Hierbei wurden drei technische Replikate durchgeführt.

3.2.2.2 Apoptosedetektion mit der Annexin V/PI Färbung

Zur weiteren Quantifizierung der avitalen Zellen wurde ein Apoptose Assay mit Annexin V/ Propidiumjodid durchgeführt. Hierbei ist die Differenzierung der nicht vitalen Zellen in frühe und späte Apoptose beziehungsweise Nekrose möglich. Propidiumjodid kann sich wie beschrieben an doppelsträngige DNA in Abhängigkeit der Integrität der Zellmembran anlagern. Bei lebenden und früh apoptotischen Zellen ist die Zellmembran noch soweit intakt, dass Propidiumjodid diese nicht durchdringen kann und keine Fluoreszenz gemessen werden kann. Bei Annexin V handelt es sich um ein Protein, welches sich Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide bindet und dabei besonders starke Bindungen zum Phospholipid Phosphatidylserin (PS) eingeht. In der frühen Phase der Apoptose findet eine Translokation dieses Phospholipids aus dem Inneren der Plasmamembran auf die äußere Plasmamembran statt. An dieses nun von den apoptotischen Zellen präsentierte PS bindet Annexin V und kann so Zellen bereits in der frühen Phase des Zelltods detektieren. Im Annexin V/PI Assay zur Differenzierung der apoptotischen Zellen repräsentiert die Annexin V-/PI- Population die vitalen Zellen, Annexin V+/PI- Zellen befinden sich in der frühen Apoptose und Annexin V+/PI+ Zellen befinden sich in entweder in der späten Phase der Apoptose oder sind bereits nekrotisch. Zur Detektion der einzelnen Zellfraktionen wurde an jedem Zeitpunkt 500 µl aus jeder der angesetzten Bedingungen entnommen, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (400x g, 20°C, 5 Minuten) und in Annexin V Bindungspuffer (0.1 M HEPES, 1.4 M NaCl, 25mM CaCl_2 in H_2O) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 4 µl eines Annexin-V-APC Antibody (BD Biosciences®) und der bereits erwähnten Propidium Iodid Lösung (2µg/ml) eingefärbt und die einzelnen Zellfraktionen mittels FACS detektiert.

3.2.2.3 Zellzyklusanalyse mittels Zellzyklus-Assay

Zur Analyse des Zellzyklus der Zelllinien unter der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren sowie Proteasominhibitoren haben wir einen Zellzyklus-Assay durchgeführt. Dieser ermöglicht die Feststellung, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen befinden. Der Zellzyklus lässt sich zunächst in Interphase und Mitosephase (M-Phase) unterteilen. Die Interphase enthält die G1-, S- und G2 Phase. Die einzelnen Phasen lassen sich anhand der, in den lebenden Zellen vorhandenen DNA Menge unterscheiden.

Hierbei ist es notwendig, die Zellen zu fixieren und dann die Zellmembran permeabel zu machen, damit durch einen DNA bindenden Farbstoff die vorhandene DNA Menge gemessen werden kann. Wir haben, wie in den anderen Versuchen Propidiumjodid als Farbstoff ausgewählt. Damit nur die Konzentration des an DNA gebundene Propidiumjodid im FACS detektiert wird, ist es zudem notwendig, die in den Zellen vorhandene RNA zu zerstören. Zunächst wurden die Versuche wie oben beschrieben in einer 6er Mikrotiterplatte angesetzt. Zu jedem vorgegebenen Zeitpunkt wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen aus jeder Bedingung entnommen, bei 400x g, 20°C für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in saline-GM Lösung (Glucose 1.1g/l, NaCl 8g/l, KCl 0.4g/l, Na₂HPO₄·2H₂O 0.2g/l, KH₂PO₄ 0.15g/l and EDTA 0.2g/l) resuspendiert und mittels 90%igen Ethanol fixiert.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS sowie 5% FBS gewaschen und für eine Stunde mit einer Lösung aus Propidiumjodid (10 µg/mL in destilliertem H₂O) und 25µg/mL RNase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels FACS detektiert und analysiert. Die einzelnen Versuchsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

3.2.2.4 Zellproliferationsanalyse mittels CFSE Assay

Zur Analyse des Zellwachstums der behandelten Ph+ ALL Zellen haben wir einen Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) Wachstumsassay durchgeführt. Der Farbstoff CFSE bindet stabil und kovalent an vitale Zellen und ermöglicht die Darstellung von wachsenden Zellgenerationen, da sich jede Generation durch Fluoreszenzabweichungen in der Durchflusszytometrie darstellen lässt. (CFSE Lösung: Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA). CFSE gilt dabei als besonders stabil und hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen. An Tag null wurden die Zellen jeder Bedingung mit der CFSE Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schutz vor UV-Strahlung inkubiert, danach wurde Medium hinzugefügt und die Zellen für weitere 5 Minuten inkubiert. Dann wurden alle Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem RPMI-Medium und den Medikamenten in den einzelnen Bedingungen wie oben beschrieben in eine 6er Mikrotiterplatte ausgesät. Zu jedem Messpunkt wurden 500µl der Zelllösung entnommen und mittels FACS detektiert. Alle beschriebenen FACS Daten wurden mittels FlowJo® analysiert.

3.2.3 Westernblots

3.2.3.1 Erstellung der Zelllysate

Zunächst wurden die Zellen mit einer Konzentration von 3×10^6 Zellen pro well in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät und für 16h mit den Medikamenten wie oben beschrieben (siehe 3.2.2: Durchflusszytometrie) inkubiert. Dann wurden die Zellen gesammelt und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Gewinnung der Proteine wurden die Zellen anschließend in einer Mischung aus RIPA Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X, 15% Glycerol, 0,5% Natriumdesoxycholat in H₂O) mit einem Proteaseinhibitorgemisch (Proteaseinhibitor Mix; SIGMA®-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Natriumorthovanadat 1mM (Roche®, Basel, Switzerland), Natriumfluorid 20mM (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) und β-Glycerophosphat (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) 1mM lysiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 17000 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und die so gewonnen Proteine in Eppendorfröhrchen überführt.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) mit einem Nanodrop Spektrophotometer gemessen. Falls im Anschluss keine sofortige Analyse der Proteine mittels Western Blot stattfinden sollte, wurden die Zelllysate bei -80°C eingefroren und für maximal zwei Wochen aufbewahrt.

3.2.3.2 Durchführung des Western Blots

Der Western Blot ermöglicht sowohl einen qualitativen und quantitativen Proteinnachweis, durch Auftrennung der Zelllysate nach Größe der Proteine und anschließende Detektion mittels Antikörper. Zunächst erfolgte die Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe durch unterschiedlich starke Ladung mittels Gelelektrophorese in einem 10% Polyacrylamidgel. Hierbei wurden 40 µg Protein pro Bedingung mit RIPA Puffer und Laemmli Puffer in das Polyacrylamidgel geladen. Die Herstellung des 10%igen Gels erfolgte mittels FastCast Kits (BioRad®, Hercules, CA, USA). Als Marker zur Darstellung der Proteinbandengröße wurde ein Molekulargewichts-Marker von Thermo Fisher® verwendet.

Der Proteintransfer in das Gel wurde in Natriumdodecylsulfat Puffer (SDS, engl.: sodium dodecyl sulfate) bestehend aus 30.3 g Tris Base, pH 8.3, 144 g Glycin und 10 g SDS bei 30mA für 40 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran. Hierbei wurden zunächst die PVDF Membranen für knapp 10 Sekunden in Methanol aktiviert, anschließend in destilliertem Wasser abgespült und danach für 10 Minuten im Transferpuffer (3 g TRIS Base, 14.4 g Glycin, 10% Methanol) inkubiert. Im Anschluss wurden das Gel und die PVDF Membran zwischen Schwämmen und je zwei Whatman Papiere zwischen jedem Schwamm positioniert. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde im Transferpuffer bei 350 mA für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Kühlung von außen mittels Kühlpacks durchgeführt.

Als Vorbereitung zur folgenden Detektion der Proteine mittels Antikörper mussten zunächst die Bindungsstellen entweder in Milch oder in (Bovines Serum Albumin) BSA geblockt werden, um eine spezifische Bindung des Antikörpers sicher zu stellen. Nachdem Blocken wurden die Membranen mit dem ausgewählten Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Membranen drei Mal mit TBS-T Puffer pH 7.4 (15 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl) und 0.05% % IGEPAL® CA-630 (Sigma Aldrich® St. Louis, MO, USA) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Vor der eigentlichen Detektion wurden die Membranen erneut drei Mal wie oben beschrieben gewaschen. Zur Proteindetektion wurde eine PCA-ECL Lösung verwendet. (100 mM Tris-HCL, pH 8.8, 2.5 mM Luminol, 0.198 mM p-Coumarinsäure und 0.2% Wasserstoffperoxid (Sigma Aldrich® St. Louis, MO, USA)). Die Chemilumineszenz wurde unter Verwendung eines Fusion SL imaging System (Vilber®, Eberhardzell, Germany) gemessen. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet: Bcl-2 (50E3), BAX (D2E11), BIM (C34C5), PARP-1 (Polyclonal #9542), Cell Signaling Technology®, Frankfurt, Germany) anti betaActin (Polyclonal #ab8227, Abcam®, Cambridge, UK). Als Sekundärantikörper diente: Anti-Rabbit Immunoglobulins (DAKO®/Aligent®, Santa Clara, CA, USA).

Die Analyse der Densitometrie wurde mittels ImageJ® Software durchgeführt.

3.2.4 Quantitative Realtime-PCR

3.2.4.1 RNA Isolation und cDNA Erstellung

Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden zu den vorgegeben Bedingungen in einer 6er Mikrotiterplatte angesetzt. Zur vorbereitenden Analyse der Genexpression wurde die RNA der Zellen extrahiert. Hierzu wurden zunächst 2×10^6 der vorbehandelten Zellen entnommen, zentrifugiert und mit 1mL Trizol resuspendiert. Danach folgte die Zugabe von Chloroform und eine weitere Zentrifugation bei 15min 12000 x g 4°C, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde in einem weiteren Reaktionsschritt Isopropanol 100% hinzugegeben, erneut zentrifugiert bei 10min 12000 x g 4°C und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol gewaschen und danach getrocknet. Es erfolgte eine Resuspension in 10 µl H₂O, dieses wurde dann bei 10 Minuten 55°C erwärmt, bis das Wasser verdunstet ist und die reine RNA im Reaktionsröhrchen verblieben ist. Die Messung der Konzentration der RNA erfolgte mittels Nanodrop und die gewonnene RNA wurde entweder bei -70°C gelagert oder umgehend zur cDNA-Synthese weiterverwendet.

Zu Erstellung der cDNA wurden 1 µg der totalen RNA entnommen, um eine cDNA Konzentration von 50 ng/µl zu erreichen und auf ein Gesamtvolumen von 10 µl mit d H₂O in einem nukleasefreien Mikrozentrifugenröhrchen aufgefüllt, dann wurden 1 µl random Hexamere (Invitrogen), 1 µl dNTP (Invitrogen) hinzugefügt und zunächst für 5 Minuten 65°C denaturiert. Anschließend wurden 5X First Strand Buffer, DTT 0,1 M und RNaseOut dem Versuchsansatz hinzugefügt. Es folgte eine kurze Inkubation für 2 Minuten bei 37°C. Als Reversetranskriptase zur Gewinnung der cDNA wurde M-MLV RT verwendet und für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 50 Minuten bei 37°C fortgesetzt. Die Inaktivierung der Enzyme nach der nun abgelaufenen cDNA Synthese erfolgte für 15 Minuten bei 70°C. Die cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit destilliertem H₂O verdünnt und konnte nun zur quantitative *Real-Time* PCR verwendet werden.

Dann erfolgte die quantitative *Real-Time* PCR. Hierbei wurde zunächst ein Master Mix bestehend aus SYBRGreen Mix (Invitrogen), dd H₂O und den jeweiligen Primern hergestellt und in Triplikaten in eine 96 Mikrotiter PCR Platte gefüllt. SYBRGreen ist ein fluoreszierender Farbstoff, der unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet.

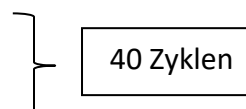
Die gemessene Fluoreszenz lässt auf die vorhandene DNA Menge und so auf die exprimierte RNA und die vorhandenen Proteine der Zellen schließen. Jedem *well* wurde 1 µl der synthetisierten cDNA der jeweiligen Bedingung hinzugegeben. Anschließend konnte die qPCR unter Verwendung von ABI7500 fast *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA) unter Standard PCR Bedingungen durchgeführt werden:

50°C 30 Minuten

95° 15 Minuten: Hitzeaktivierung

95° 15 Sekunden: Denaturierung

60° 1 Minute: Anlagerung und Elongation



Zur Erstellung der Schmelzkurve der synthetisierten doppelsträngigen DNA fand ein kontinuierliches Erhitzen der DNA aufsteigend 60-95, 1° pro Schritt statt.

Die für die quantitative *Real-Time* PCR wurden *TRAIL*, *XPB1*, *ERN-1* und *NOXA* als Primer genutzt. Als Housekeeping Gen wurde *Cox6b* verwendet.

Die Daten wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ Methode zur Kalkulation einer relativen Quantifizierung analysiert.

3.2.5 Berechnung der Arzneimittelinteraktion: Coefficient of Drug Interaction (CDI)

Zur mathematischen Berechnung, ob Tyrosinkinaseinhibitor und Proteasominhibitor sich bei gemeinsamer Gabe in den Ph+ ALL Zellen synergistisch verhalten, wurde der Coefficient of Drug Interaction (CDI) angewandt. Dabei steht AB für die relative Zellviabilität der Kombination und jeweils A oder B für die relative Zellviabilität bei Verwendung der einzelnen Substanz. Ein CDI von <1 weist dabei auf einen synergistischen Effekt hin, ein CDI=1 stellt einen additiven Effekt da und bei einem CDI von >1 ist von einem antagonistischen Effekt zwischen den Substanzklassen auszugehen.

$$CDI = \frac{AB}{(Ax B)}$$

A: Substanz A
B: Substanz B
AB: Kombination beider Substanzen

3.2.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der gesammelten Daten wurde das Programm GraphPad Prism verwendet. Hierbei wurde die Analyse der Varianz (ANOVA) sowie der Bonferroni multiple comparison test als Methode ausgewählt. Ein p Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant *festgelegt*. (*, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$)

4 Ergebnisse

4.1 Proteasominhibitoren verursachen Wachstumsstopp in Ph+ ALL

Um zunächst einen ersten Eindruck zu gewinnen, wie die Ph+ Zellen auf die Behandlung mit Proteasominhibitoren reagieren und um die passende Dosierung für weitere Untersuchungen zu bestimmen, führten wir einen CCK8 Assay zur Kalkulation der IC50 in TOM-1 und BV-173 zunächst für Bortezomib und im Verlauf für Ixazomib durch.

Die beiden Medikamente wurden in einer logarithmisch aufsteigenden Konzentration von 0,001 μM bis 0,5 μM getestet. Bortezomib führte bereits bei einer Konzentration von 5nM zu einer starken Verringerung der Zellviabilität in beiden BCR-ABL+ Zelllinien. In einer höheren Dosierung von 10nM war dieser Effekt bereits so stark, dass nach 24h der Behandlung keine lebenden Zellen mehr detektiert werden konnten. Die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) erfolgte mittels Auftragung der Extinktionswerte auf eine nicht linearen Regressionskurve, in der der Wendepunkt die IC50 repräsentiert. Mathematisch errechnete sich bei n=2 für Bortezomib bei TOM-1 eine IC50 von 5,5nM und für BV-173 eine IC50 von 4,2nM an d2. An d3 lagen die Werte für TOM-1 bei 5nM und für BV-173 bei 4,48 nM. (Abbildung 5).

Tabelle 14. verwendete Dosierungen und log. Auftragung

used conc. [nM]	log(borte[nM])
1	0
2,5	0,39794
5	0,69897
10	1
25	1,39794
50	1,69897
75	1,875061
100	2
200	2,30103
500	2,69897

Tabelle 15. rechnerisch ermittelte IC50

	IC50 TOM-1 [nM Borte]	IC50 BV-173 [nM Borte]
d1	<u>6,1</u>	<u>5,7</u>
d2	<u>5,5</u>	<u>4,2</u>
d3	<u>5,0</u>	<u>4,5</u>

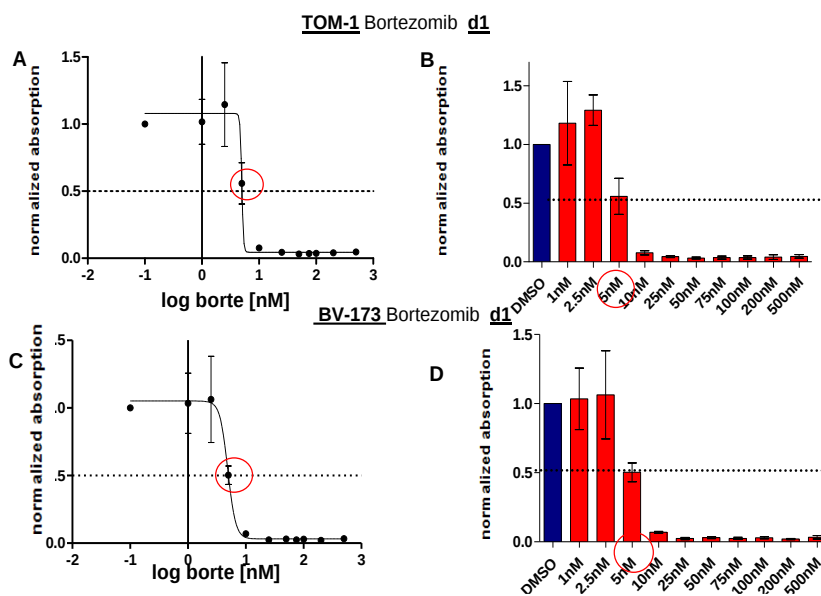


Abbildung 5. Bestimmung der IC50 für Bortezomib [n=2]

Die normalisierte Absorption der Zellen unter Bortezomibbehandlung an Tag 1 ist als nicht-lineare Regressionskurve logarithmisch dargestellt. Der Wendepunkt repräsentiert die IC50. Die Absorption wurde ebenfalls an d2 und d3 bestimmt.

Anschließend führten wir zunächst eine erste Testung (n=1) der Wirkung von Bortezomib auf die Ph+ Zellen in einer PI Färbung durch. Hier ergab sich für TOM-1, dass 5nM Bortezomib einen starken Effekt auf die Viabilität der Zellen hat, dieser war für BV-173 bei 5nM in der PI Färbung weniger stark ausgebildet (Abbildung 6).

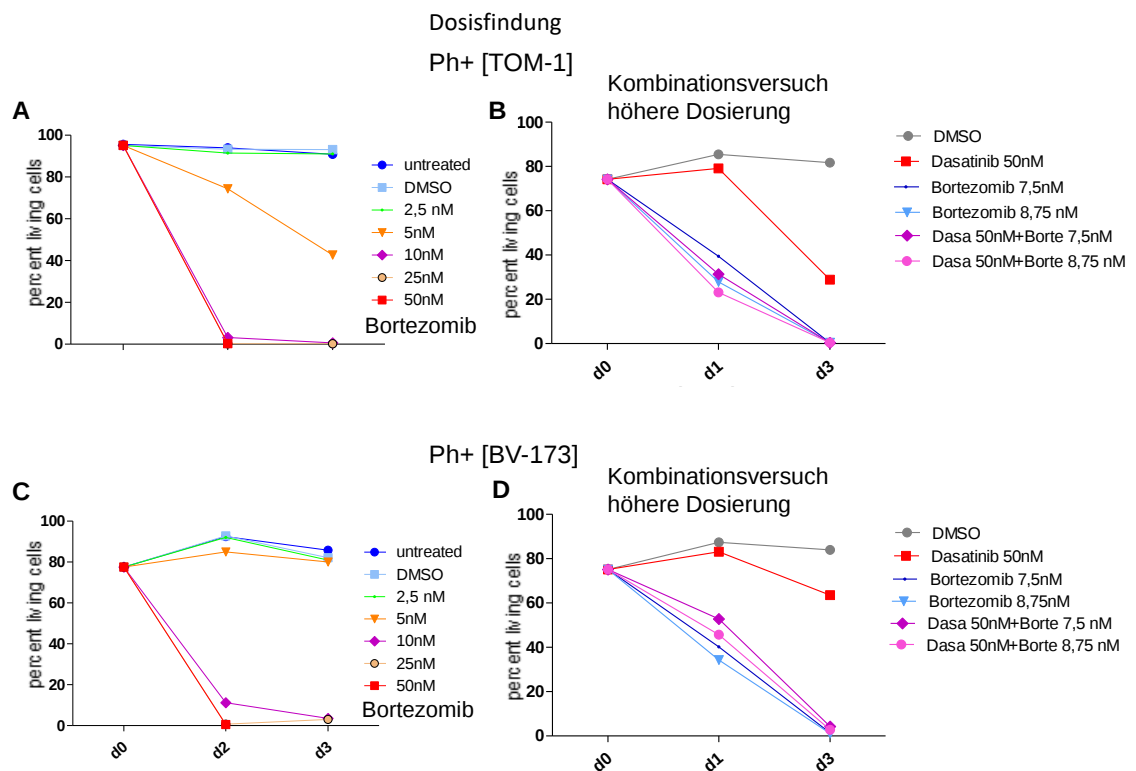


Abbildung 6. Dosisfindung mittels Zellviabilitätsassay [n=1]

(A+C): zunächst wurde die Dosistestung im PI Staining durchgeführt

(B+D): anschließend Testung in erstem Kombinationsversuch

Festlegung von 5nM Bortezomib bei TOM-1 und 6,25nM bei BV-173 als vielversprechendste Dosierung

Dasatinib wurde in einer Standarddosierung von 50nM sowohl in der Einzel- als auch in der Kombinationsbehandlung verwendet (Snead, et al. 2009). Als Kontrolle der unbehandelten Zellen wurde DMSO verwendet. Erste Kombinationsversuche (n=1) führten wir mit einer Dosierung von 5nM, 6,25nM, 7,5nM und 8,75nM an beiden Zelllinien durch. Da sich auch hier der Eindruck wiederholte, dass BV-173 etwas weniger empfindlich auf Bortezomib reagiert, als TOM-1, haben wir für alle weiteren Versuche 5nM für TOM-1 und 6,25nM für BV-173 als die vielversprechendsten Dosierung festgelegt und alle folgenden Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

Um einen Eindruck zu gewinnen, welche Effekte die Kombination von Proteasominhibitor und TKI bei einer niedrigeren Proteasominhibitor-dosierung hat, wurde die Dosierung von 4nM zusätzlich in der PI Färbung und in weiteren Versuchen verwendet. Da sich die beiden Zelllinien in ihrer Reaktion auf die Proteasominhibitorbehandlung etwas unterschiedlich verhalten haben, werden die Ergebnisse differenziert für beide Zelllinien betrachtet.

4.2 Bortezomib in alleiniger oder kombinierter Gabe reduziert die Zellviabilität von Ph+ All Zellen signifikant

Die Zellen wurden für 5 aufeinanderfolgende Tage mit den Medikamenten unter folgenden Bedingungen behandelt: DMSO, Dasatinib 50nM, Bortezomib 5nM (TOM-1), 6,25nM (BV-173), sowie Dasatinib + Bortezomib. Für die TOM-1 Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der lebenden Zellen, die unbehandelt oder mit Dasatinib behandelt wurden, im Vergleich zu den Zellen, die mit einem Proteasominhibitor einzeln oder in Kombination mit einem TKI behandelt wurden. Der Anteil der lebenden Zellen betrug $97.22 \pm 4,8\%$, wohingegen die Fraktion der lebenden Zellen unter Bortezomib Behandlung bei $64.86 \pm 10,36\%$ lag und unter Kombinationsbehandlung nur noch $61.64 \pm 4,87\%$ der Zellen nach nur einem Tag der Behandlung vital waren. Im weiteren Verlauf nahm die Zellviabilität unter der alleinigen oder kombinierten Proteasominhibitortherapie weiterhin deutlich stärker ab, als die der unbehandelten beziehungsweise der nur mit Dasatinib behandelten Zellen.

Nach 4 Tagen war die Fraktion der lebenden Zellen der mit Dasatinib behandelten Zellen auf $59.7 \pm 11.11\%$ reduziert, wohingegen zu diesem Zeitpunkt von den mit Bortezomib behandelten Zellen nur noch $3.68 \pm 2.56\%$ lebendig waren und die Kombinationstherapie den Anteil lebender Zellen ebenfalls deutlich auf $4.9 \pm 3.84\%$ reduziert hatte.

Bemerkenswerterweise zeigte Bortezomib einzeln oder in Kombination mit Dasatinib hier einen signifikanten, 10-20fach stärkeren Unterschied in der Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten beziehungsweise mit der aktuellen Standardtherapie Dasatinib behandelten Zellen (Abbildung 7).

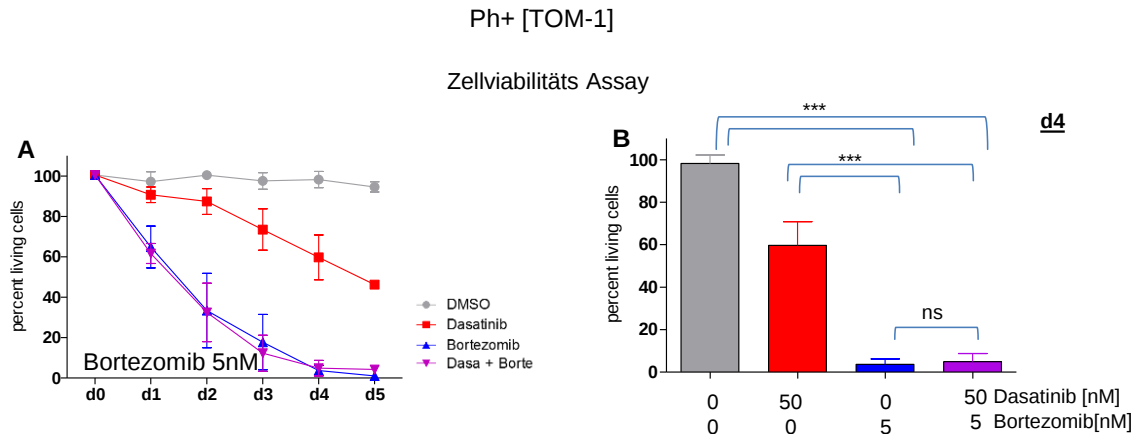


Abbildung 7. TOM-1: Die Behandlung mit Bortezomib alleine oder in Kombination mit Dasatinib führt zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. [n=3]

(A) Ph+ TOM-1 wurden mit DMSO, Dasatinib 50nM, Bortezomib 5nM und kombiniert behandelt und die Zellviabilität mittels PI-Staining an d0-d5 alle 24h bestimmt. Die Zellviabilität der mit Bortezomib alleine oder kombiniert behandelten Zellen wurde sehr stark reduziert. Es zeigte sich kein antagonistischer Effekt zwischen Dasatinib und Bortezomib

(B) Deutliche Reduktion der Zellviabilität an d4 durch Bortezomib alleine oder in Kombination. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Bedingungen feststellbar.

p-Werte wurden mittels one-way ANOVA kalkuliert, ein *p*-Wert kleiner als 0.05 wurde für alle Analysen als statistisch signifikant festgelegt. (*, *p*<0.05, **, *p*<0.01, ***, *p*<0.001)

(Dies gilt für alle in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse.)

Es ließ sich jedoch sowohl für die TOM-1 als auch BV-173 kein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität zwischen den nur mit Bortezomib behandelten Zellen im Vergleich zu den kombiniert behandelten Zellen feststellen. Daher konnte in diesem Fall für beide Zelllinien unter der Behandlung mit Bortezomib kein Coefficient of drug interaction Index gebildet werden. Es zeigte sich sowohl kein antagonistischer als auch kein synergistischer Effekt.

Für BV-173 zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der vitalen Zellen und es kam zu einem starken Anstieg des Anteils der toten Zellen unter Behandlung mit Bortezomib. Während von den mit Dasatinib behandelten Zellen nach 24h noch $93.25 \pm 2.3\%$ lebend waren, war die Fraktion der lebenden Zellen unter Behandlung mit Bortezomib bereits auf $55.13 \pm 2.42\%$ reduziert.

Die kombinierte Therapie von Bortezomib und Dasatinib zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion auf $56.9 \pm 16.34\%$, zeigte jedoch keinen Vorteil im Vergleich zur alleinigen Bortezomib Behandlung. Nach 5 Tagen der Therapie kam es unter der Bortezomib Behandlung zu einer Verringerung der Zellviabilität auf nur $1.26 \pm 0.46\%$ und auf $1.57 \pm 0.7\%$ unter der kombinierten Therapie, wohingegen von den mit Dasatinib behandelten Zellen noch $40.58 \pm 2.6\%$ *viable* waren. (Abbildung 8)

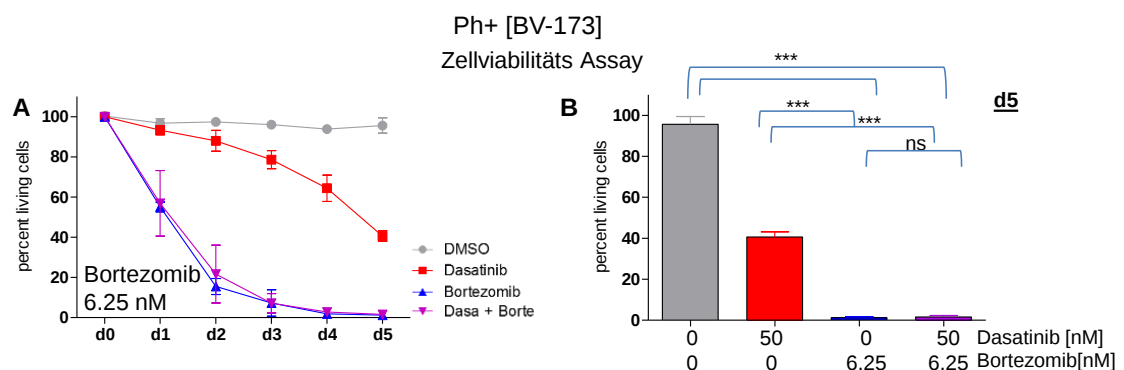


Abbildung 8. BV-173: Die Behandlung mit Bortezomib alleine oder in Kombination mit Dasatinib führt zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. [n=3]

(A) Ph+ BV-173 wurden mit DMSO, Dasatinib 50nM, Bortezomib 6.25nM und kombiniert behandelt und die Viabilität mittels PI-Staining an d0-d5 bestimmt. Die Zellviabilität der mit Bortezomib alleine oder kombiniert behandelten Zellen wurde sehr stark reduziert. Es zeigte sich kein antagonistischer Effekt zwischen Dasatinib und Bortezomib

(B) Deutliche Reduktion der Viabilität an d5 durch Bortezomib alleine oder in Kombination. Kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Bedingungen feststellbar.

Dieser deutliche Unterschied in der Zellviabilität und die deutlich gesteigerte Todesrate der Zellen lässt sich vor allem auf die Wirkung des Proteasominhibitor zurückführen. Es ließ sich kein additiver Effekt zwischen beiden Substanzklassen registrieren. Trotzdem ist es wichtig, vor allem in Bezug auf mögliche klinische Anwendung der Proteasominhibitoren, dass ebenfalls kein antagonistischer Effekt zwischen Bortezomib und Dasatinib festgestellt werden konnte, so dass eine mögliche Ergänzung der jetzigen Standardtherapie um einen Proteasominhibitor unter diesen Gesichtspunkten nach weiteren in vitro und in vivo Untersuchungen theoretisch möglich wäre.

4.3 Die Gabe einer niedrigeren Dosierung von Bortezomib zeigt erste Hinweise eines additiven Effekts für TOM-1

Da die bisher fehlende Feststellung eines additiven beziehungsweise synergistischen Effekts zwischen der Proteasominhibitor Gabe und der TKI Gabe unter anderem mit der sehr starken Wirkung des Proteasominhibitors zusammenhängen könnte, wollten wir auch einen Eindruck davon gewinnen, welchen Einfluss eine niedrigere und besser zu tolerierende Dosierung von Bortezomib auf die Zellen haben könnte.

Daher wiederholten wir die PI Färbung sowohl für TOM-1 als auch BV-173 mit Bortezomib in einer Konzentration von 4nM. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass diese Versuche sequenziell und nicht parallel zu der Verwendung von Bortezomib in einer Konzentration von 5nM stattgefunden haben. Daher ist eine vergleichende Betrachtung der beiden Konzentrationen nur eingeschränkt möglich, und der Dosisunterschied von nur einem bzw. 2,25nM ist gering. Trotzdem zeigte die 4nM Gabe einen anderen Effekt auf die Zellen, als die 5nM Bortezomib. Erstaunlicherweise zeigt die Behandlung von TOM-1 mit 4nM einzeln und in Kombination Hinweise auf einen zumindest additiven, bis zu synergistischen Effekt. Nach 5 Tagen Therapie konnten wir einen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität der mit Bortezomib behandelten Zellen ($61.01 \pm 25,3$) im Vergleich der mit Dasatinib behandelten Zellen ($43.21 \pm 10.97\%$) feststellen. Bei den kombiniert behandelten TOM-1 Zellen lag der Anteil lebender Zellen bei ($21.97 \pm 12.00\%$). Hieraus ließ sich ein CDI von 0.84 berechnen, der Hinweise auf einen additiven beziehungsweise synergistischen Effekt geben kann, wenn die Zellen mit einer geringeren Dosis des Proteasominhibitor behandelt werden. Für die BV-173 zeigte sich unter der Behandlung mit 4nM Bortezomib, dass unter dieser gewählten Dosierung die Wirkung von Dasatinib in der kombinierten Therapie überwiegt, und Dasatinib ist der alleinigen Behandlung mit Bortezomib überlegen. Trotzdem führte Bortezomib im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zur einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. An Tag 5 der Behandlung waren $99,67 \pm 5.41\%$ der unbehandelten Zellen lebend, wohingegen dieser Anteil bei den mit Dasatinib behandelten Zellen nur $32.37 \pm 1.56\%$ beträgt und bei den kombiniert behandelten Zellen bei $31.50 \pm 2.33\%$ lag. Die Behandlung mit 4nM Bortezomib führte nach 5 Tagen zu einem Anteil von $87.33 \pm 11.45\%$ vitalen Zellen (Abbildung 9).

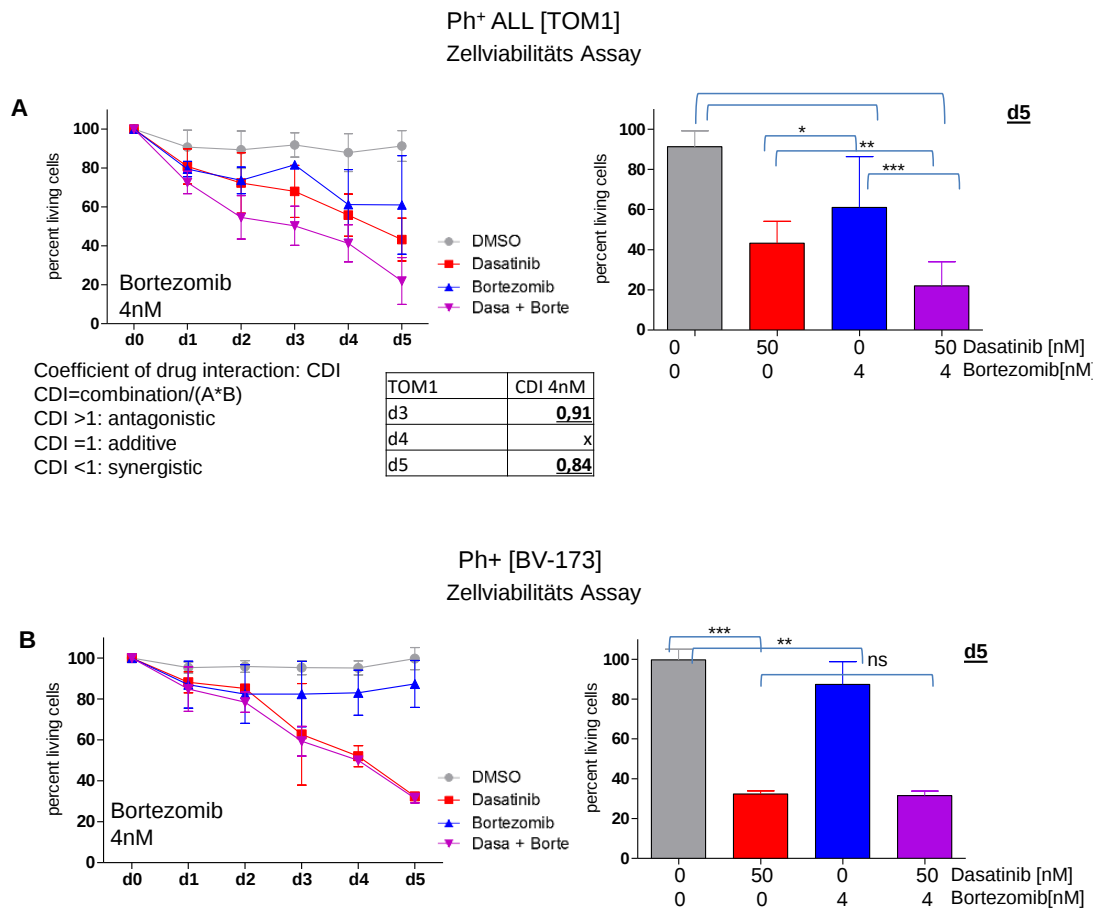


Abbildung 9. Zellviabilitätsassay TOM-1 und BV-173 mit niedriger Bortezomibdosierung [n=3]

(A) Für TOM-1 führt eine niedrigere Bortezomibdosierung von 4nM in Kombination mit Dasatinib zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu einer Dasatinib oder Bortezomibbehandlung. Ein CDI von 0,84 gibt mindestens den Hinweis auf einen additiven Effekt.

(B) Für BV-173 führt eine niedrigere Bortezomibdosierung zu keiner signifikanten Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu Dasatinib. In der kombinierten Behandlung überwiegt der Dasatinibeffekt.

4.4 Proteasominhibitor führt zu Apoptose in Ph + ALL Zellen

Nachdem wir in der PI Färbung den außerordentlich großen Einfluss von Bortezomib auf die Fraktion der lebenden Ph⁺ ALL Zellen feststellen konnten, wollten wir in einem nächsten Schritt herausfinden, auf welchen Mechanismen dieser Einfluss beruhen kann. Zunächst vermuteten wir Apoptose als führenden Mechanismus hinter der starken Reduktion der lebenden Zellfraktion. Trotzdem wollten wir herausfinden, ob die Behandlung mit einem Proteasominhibitor auch einen Einfluss auf Zellwachstum und Zellzyklus hat. Dazu führten wir einen CFSE Assay und einen Zellzyklus Assay durch (n=1). Wir konnten in beiden Assays keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen feststellen.

Es zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf das Zellwachstum oder auf die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, daher wiederholten wir die Versuche nicht, sondern legten den Fokus weiterer Untersuchungen auf die Analyse, ob Apoptose tatsächlich der vorherrschende Mechanismus hinter der Proteasominhibitorthherapie in den Ph+ ALL Zellen ist (Anhang, Abbildung I). Hierzu verwendeten wir eine kombinierte Annexin V/PI Färbung. Die Apoptose wurde mittels FACS in separaten Versuchsansätzen jeweils (n=2) an Tag 2 und an Tag 3 bestimmt. Aufgrund der graphischen Auswertung der FACS Ergebnisse mittels FlowJo® erfolgte die Darstellung der Resultate für d3 exemplarisch, in der Wiederholung und an Tag 2 zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, diese sind hier nicht detailliert ausgeführt, aber in den Abbildungen zu finden. Für TOM-1 mit Bortezomib 5nM und Dasatinib 50nM zeigte sich an Tag 3, dass unter der Behandlung mit Bortezomib nur 2,74% der behandelten Zellen nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-) waren und sich 79,8% der Zellen in einer späten Apoptosephase (Annexin V+/PI+) befanden. In der kombinierten Behandlung waren 5,94% der Zellen nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-) und 86,4% befanden sich in später Apoptose (Annexin V+/PI+). Dahingegen waren unter Dasatinib nur 22,6% in später Apoptose (Annexin V+/PI+) und 72,6% nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-). Von den BV-173 Zellen waren an Tag 3 insgesamt 67.8% der mit Dasatinib behandelten Zellen nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-), 6.33% der Zellen befanden sich in früher Apoptose (Annexin V+/PI-) und 24,3% zeigten eine späte Apoptose (Annexin V+/PI+). Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit Bortezomib an Tag 3 bereits zu einem sehr hohen Anteil von apoptotischen Zellen: Mittels der PI/Annexin V Färbung konnten 84.1% der Zellen in später (Annexin V+/PI+) und 0.9% in früher Apoptose (Annexin V+/PI-) detektiert werden. Ähnliche Werte wurden auch in der kombinierten Therapie nachgewiesen, und es waren nur 6,38 % der behandelten Zellen nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-). Bereits 81,0% der Zellen befanden sich in einer späten Apoptosephase (Annexin V+/PI+) (Abbildung 10, BV-173: Anhang, Abbildung II).

[TOM-1] Annexin V/PI staining

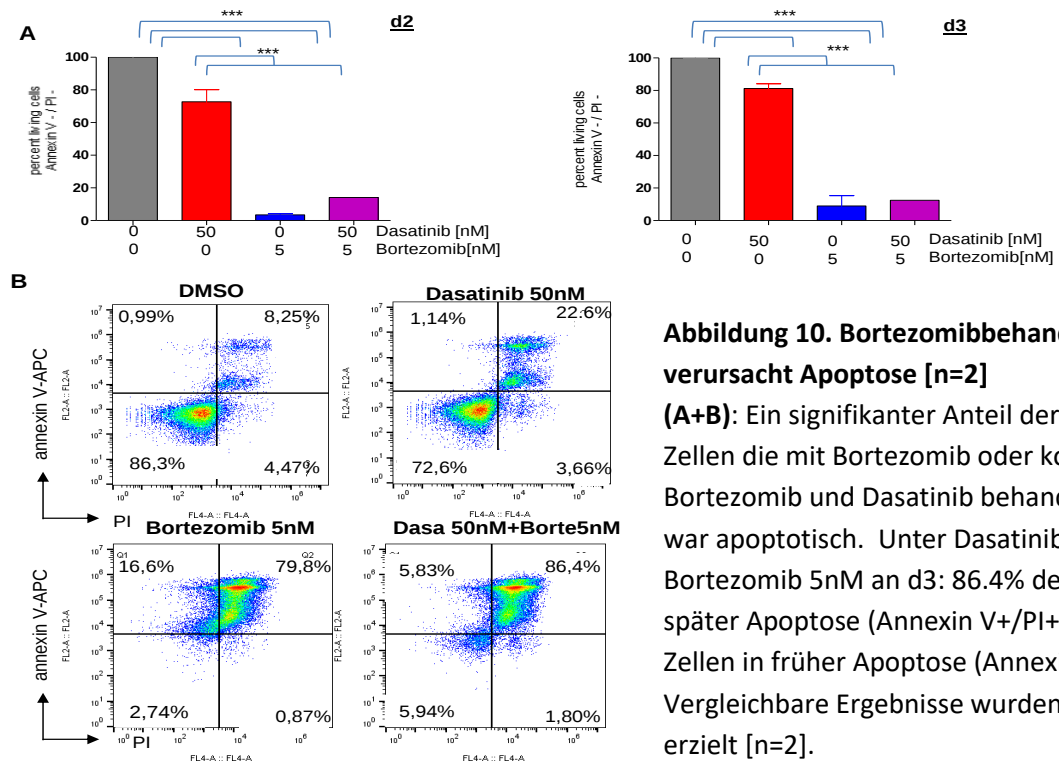


Abbildung 10. Bortezomibbehandlung verursacht Apoptose [n=2]

(A+B): Ein signifikanter Anteil der TOM-1 Zellen die mit Bortezomib oder kombiniert mit Bortezomib und Dasatinib behandelt wurden war apoptotisch. Unter Dasatinib 50nM + Bortezomib 5nM an d3: 86,4% der Zellen in später Apoptose (Annexin V+/PI+), 1,8% der Zellen in früher Apoptose (Annexin V+/PI-) Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für d2 erzielt [n=2].

Zusammenfassend zeigte sich im Apoptose-Assay, dass sowohl die alleinige Behandlung mit Bortezomib als auch die Kombination mit einem Tyrosinkinaseinhibitor zu einer sehr starken Induktion von Apoptose in BCR-ABL+ ALL Zellen in vitro führt.

4.5 Ixazomib verursacht einen Wachstumsstopp in Ph+ ALL Zellen

Nachdem bereits Bortezomib als Proteasominhibitor der ersten Generation sehr starke Effekte auf die Ph+ ALL Zellen aufwies, wollten wir auch evaluieren, welchen Einfluss der oral verfügbare Proteasominhibitor Ixazomib auf die Zellen als Einzelsubstanz und auch besonders in Kombination mit einem TKI hat. Zunächst erfolgte auch für Ixazomib auf gleiche Weise wie bei Bortezomib die Festlegung der mittleren inhibitorischen Konzentration IC₅₀ in den TOM-1 und BV-173 Zelllinien mittels CCK8 Assay wie oben (Verweis Kapitel 4.1) an d1, d2 und d3. Es zeigte sich für n=2 anhand einer nicht-linearen Regressionskurve, dass eine Dosierung von 57,2nM Ixazomib bei TOM-1 und eine Dosierung von 41,2nM für BV-173 als IC₅₀ zu einem Wachstumsstopp führt. Bei einer höheren Dosierung, beispielweise von 100nM Ixazomib, waren für beide Zelllinien bereits nach 48h keine lebenden Zellen im CCK8 Assay zu detektieren (Abbildung 11).

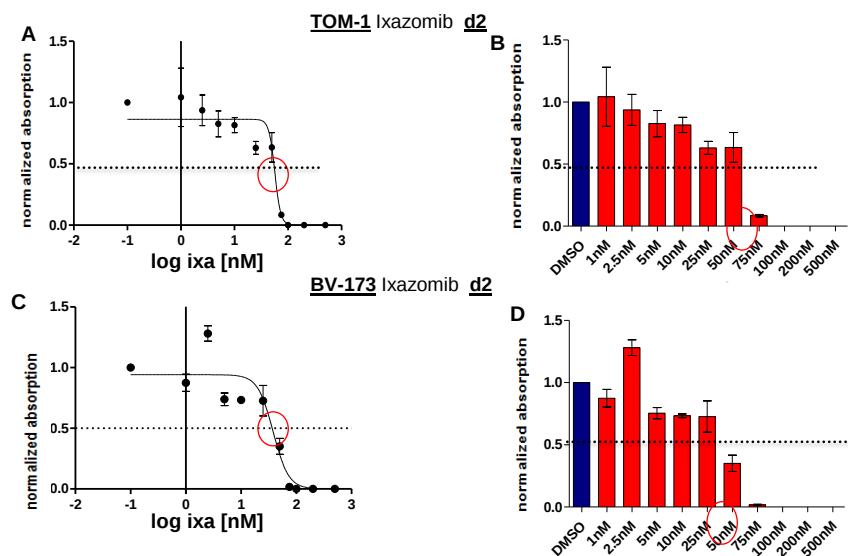


Tabelle 16.
rechnerisch ermittelte IC₅₀ Werte

	IC ₅₀ TOM-1 [nM Ixa]	IC ₅₀ BV-173 [nM Ixa]
d1	81,9	69,4
d2	57,2	41,2
d3	64,7	57,1

Abbildung 11. Bestimmung der IC₅₀ für Ixazomib [n=2]

Die normalisierte Absorption der Zellen unter Ixazomibbehandlung an Tag 2 ist als nicht-lineare Regressionskurve logarithmisch dargestellt. Der Wendepunkt repräsentiert die IC₅₀. Die Absorption wurde ebenfalls an d1 und d3 bestimmt

Anschließend wurden die im CCK8 Assay ermittelten IC₅₀ Werte in einer exemplarischen PI Färbung an den Zelllinien getestet. Da sich diese Dosierungen als sehr hoch erwiesen und die Fraktion der lebenden Zellen sehr schnell sehr stark abnahm, entschieden wir uns für die weiteren Kombinationsversuche für aus der Regressionskurve ersichtlichen weiteren geeigneten Dosierungen (25nM, 30nM, 35nM, 40nM), um auch einen möglichen additiven Effekt detektieren zu können.

Vor allem 25nM und 30nM Ixazomib konnten für BV-173 und 25nM für TOM-1 als vielversprechendste Dosierung in weiteren orientierenden Versuchen etabliert werden und werden daher nun detailliert beschrieben. Die anderen Dosierungen (35 und 40nM) führten zu vergleichbaren Resultaten und sind daher nicht alle im Detail aufgeführt.

Für TOM-1 und BV-173 haben wir bei den Dosierungen 30nM und 25nM insgesamt für $n=5$ vergleichbare Resultate erzielen können, aufgrund mathematisch einheitlicher Darstellung der Graphen und zur statistischen Auswertung allerdings mit $n=3$ gerechnet.

4.6 Ixazomib bewirkt signifikanten Reduktion der Zellviabilität

Die Zellen wurden wie beschrieben mit Dasatinib 50nM, Ixazomib und der Kombination aus Dasatinib und Ixazomib kultiviert. Die Behandlung mit Ixazomib 30nM führte bei BV-173 zu einer sehr starken Reduktion der Zellviabilität auf $26.85 \pm 8.29\%$ lebende Zellen nach zwei Tagen. Der Anteil der vitalen Zellen unter kombinierter Behandlung lag nach zwei Tagen bei $45.36 \pm 9.05\%$. Überraschenderweise zeigte sich im Verlauf der Behandlung eine Erholung der Zellviabilität der nur mit Ixazomib behandelt BV-173 auf zunächst $33.1 \pm 3.1\%$ an Tag 4 und auf $39.89 \pm 1.68\%$ an Tag 5. Dahingegen nahm der Anteil der lebenden Zellen unter kombinierter Behandlung weiter ab und lag an Tag 5 bei $11.71 \pm 5.1\%$. Diese Erholung konnte trotz einer erneuten Ixazomibzugabe an Tag 3 registriert werden, so dass wir einen Abfall der Medikamentenkonzentration als Ursache ausschließen konnten. Der an Tag 5 aufgrund der unterschiedlichen Entwicklungen der Zellpopulation kalkulierte CDI betrug 0.84 und deutet auf einen mindestens additiven, evtl. sogar synergistischen Effekt zwischen TKI und Proteasominhibitor hin (Abbildung 12).

Ph+ [BV-173]
Zellviabilitäts Assay

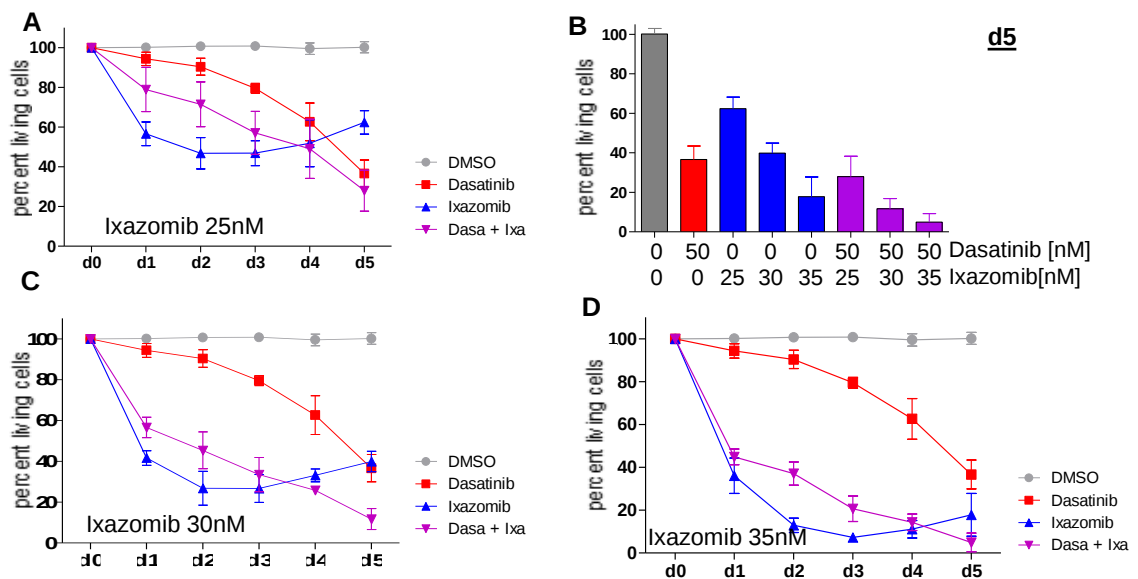


Abbildung 12. Die Behandlung mit Ixazomib alleine oder in Kombination reduziert die Zellviabilität. Kein antagonistischer Effekt in der kombinierten Gabe zu detektieren [n=3]

(A-C) Ph+ BV-173 wurden mit DMSO, Dasatinib 50nM, Ixazomib 25nM, Ixazomib 30nM und 35nM und kombiniert behandelt. Substanzen wurden jeden dritten Tag erneuert und die Viabilität an d0-d5 bestimmt.

Unter Gabe von Ixazomib 25nM und 30nM kommt zu einer Erholung der nur mit Ixazomib behandelten Zellen, dies führt an d5 zu einem additiven Effekt zwischen Ixazomib 30nM und Dasatinib

(D): Die Behandlung mit Ixazomib 35nM einzeln oder in Kombination führt ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität

Die mit 25nM Ixazomib behandelten BV-173 zeigten ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität im Vergleich zu den mit Dasatinib behandelten Zellen an Tag 2. So waren unter Ixazomib Monotherapie $46.79 \pm 7.8\%$ nicht apoptotisch, wohingegen die Dasatinib behandelten Zellen einen Anteil der Vitalität von $90.37 \pm 1.41\%$ aufwiesen. Allerdings kam es unter Fortführung der Therapie zu einem angleichenden Effekt der Proteasom-inhibitorthherapie im Vergleich mit der TKI Therapie, da sich auch bei 25nM eine Erholung der mit Ixazomib behandelten Zellen ab Tag 3 zeigte. So lag die Zellviabilität bei Ixazomib 25nM bei $62.35 \pm 5.89\%$ an Tag 5. Zu diesem Zeitpunkt überwog letztlich also der Effekt von der Dasatinib sowohl als Einzelsubstanz, als auch in Kombination mit Ixazomib die Wirkung des Proteasom-inhibitors und es konnte kein Vorteil in der kombinierten Behandlung detektiert werden.

Der Anteil lebender Zellen unter Dasatinib allein lag bei $36.65 \pm 6.76\%$ und bei $27.97 \pm 10.3\%$ in Kombination mit Ixazomib. Unter der Gabe von einer höheren Dosierung von Ixazomib, wie beispielsweise 35nM sank die Fraktion der lebenden Zellen unter Ixazomibgabe an Tag 2 auf $12.95 \pm 1.12\%$ und die der kombiniert behandelten Zellen auf $37.07 \pm 1.8\%$, wohingegen diese unter Dasatinib-Monotherapie bei $90.37 \pm 1.41\%$ lag. Auch hier zeigten die BV-173 an Tag 5 eine leichte Tendenz, sich von der Ixazomibtherapie zu erholen. An Tag 5 konnte für die Ixazomib-Monotherapie eine Zellviabilität von $17.81 \pm 3.33\%$ gemessen werden im Vergleich zu $4.9 \pm 1.45\%$ bei den kombiniert behandelten Zellen. Generell war sowohl die Ixazomib-Monotherapie als auch die kombinierte Therapie der alleinigen Dasatinibgabe an d1-d5 deutlich ($p < 0.001$, ***) überlegen. Aufgrund der simultanen Gabe der verschiedenen Dosierungen ermöglicht sich in diesem Fall auch ein Vergleich der unterschiedlichen Ixazomibdosierungen untereinander. Hier zeigt sich, dass die kombinierte Therapie von Dasatinib mit Ixazomib 30nM der kombinierten Therapie von Dasatinib und Ixazomib 25nM an Tag 2 überlegen ist (***), während sich die Kombinationen aus Dasatinib + Ixazomib 30nM und Dasatinib + Ixazomib 35nM an Tag 2 nicht signifikant unterscheiden. Dies gilt ebenfalls für beide kombinierten Konzentrationen an Tag 5. Allerdings ist die Ixazomib-Monotherapie mit 35nM der Therapie mit 30nM Ixazomib an Tag 1, 2, 4 und 5 überlegen (***, (** für d2)).

Die TOM-1 Zellen wurden auf gleiche Art und Weise mit Ixazomib und Dasatinib in verschiedenen Dosierungen behandelt, auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität durch die Therapie mit Ixazomib einzeln oder in Kombination mit Dasatinib im Vergleich zu unbehandelten oder mit Dasatinib therapierten Zellen. So betrug die Zellviabilität bei TOM-1 unter 30nM Ixazomib für die Monotherapie $1.26 \pm 0.04\%$ an d5 und $6.6 \pm 2.68\%$ in der kombinierten Therapie. Die mit Dasatinib therapierten Zellen zeigten eine Zellviabilität von $41.51 \pm 14.22\%$ an d5. Da sich die Monotherapie mit Ixazomib nicht signifikant von der kombinierten Therapie unterschied, konnte kein CDI kalkuliert werden. Gleichzeitig war aber auch kein antagonistischer Effekt feststellbar. Beide Bedingungen zeigten sowohl für 25nM als auch für 30nM Ixazomib einen signifikant ($p < 0.001$, ***) stärkeren Effekt als die Dasatinib-Monotherapie, mit Ausnahme von d6 für die Therapie mit Ixazomib 25nM, da die TOM-1 Zellen ebenfalls eine Tendenz zur Erholung aufwiesen, diese konnte jedoch,

anders als bei den BV-173, nicht regelhaft detektiert werden. Da sich die TOM-1 Zellen unter der Therapie mit 25nM Ixazomib ähnlich verhielten, wird diese Dosierung nur in der untenstehenden Abbildung dargestellt (Abbildung 13).

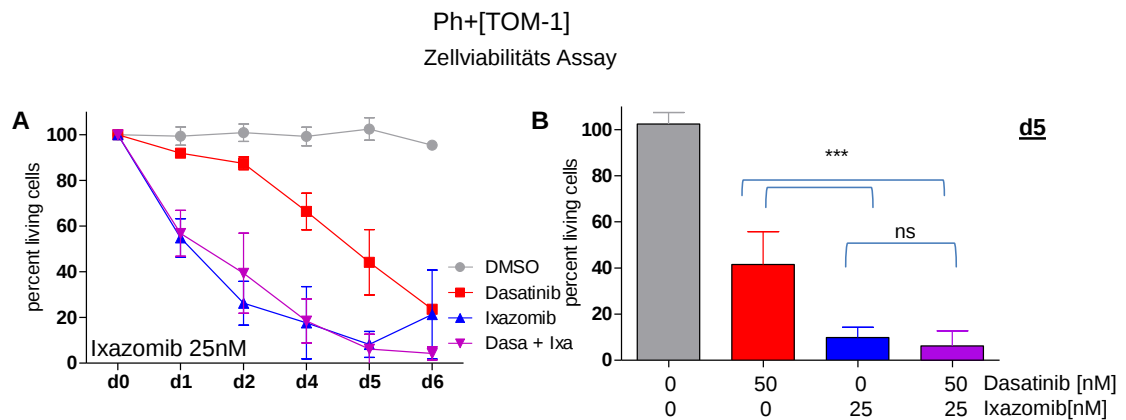


Abbildung 13. TOM-1: Ixazomib einzeln oder in Kombination mit Dasatinib reduziert Zellviabilität signifikant [n=3]

(A+B) Ph+ TOM-1 wurden mit DMSO; Dasatinib 50nM, Ixazomib 25nM, Ixazomib 30nM und kombiniert behandelt. Die Viabilität wurde von d0-d6 bestimmt. Ixazomib führt sowohl einzeln als auch in Kombination zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität. Es konnte kein antagonistischer Effekt zwischen Dasatinib und Ixazomib detektiert werden. Für Ixazomib 35nM wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt

4.7 Die Therapie mit Ixazomib verursacht Apoptose in Ph+ ALL Zellen

Um festzustellen ob die deutliche Reduktion der Zellviabilität der mit Ixazomib behandelten Ph+ Zelllinien auf Apoptose zurückzuführen ist, führten wir auch für Ixazomib eine Annexin V / PI Färbung (Apoptose Assay) durch. Die Detektion der Apoptose erfolgte für Ixazomib 25nM, Ixazomib 30nM und Ixazomib 35nM an Tag 3 und 5 (n=2). Da auch hier die Auswertung der einzelnen Versuche überwiegend mittels FlowJo erfolgte, wird hier je ein Experiment exemplarisch beschrieben. Die graphische Zusammenfassung mehrerer Versuche ist in Abbildung 14 dargestellt. An Tag 3 waren 59% der mit Dasatinib allein behandelten BV-173 Zellen nicht apoptotisch (Annexin V-/PI-). Im Vergleich dazu waren von den mit 30nM Ixazomib behandelten Zellen 73.3% bereits in der späten Phase der Apoptose (Annexin V+/PI+) und 76,4% der kombiniert behandelten BV-173 befanden sich ebenfalls in der späten Phase der Apoptose (Annexin V+/PI+).

Die Behandlung mit Ixazomib 35nM führte an Tag 3 dazu, dass 89.8% der Zellen in später Apoptose waren und bei kombinierter Behandlung mit höherer Ixazomib Dosierung 71,3% der Zellen. An Tag 5 sahen die Ergebnisse für BV-173 ähnlich aus: 14.4% der mit Ixazomib 30nM behandelten Zellen waren an Tag 5 Annexin V-/PI- im Vergleich zu 2.87% Annexin V-/PI- Zellen bei kombinierter Therapie. Unter höherer Ixazomibdosierung (35nM) befanden sich an Tag 5 insgesamt 89.8% der allein mit Ixazomib behandelten Zellen in später Apoptose (Annexin V+/PI+), in der kombinierten Therapie waren es sogar 94.6%. Dahingegen waren unter Dasatinib 50nM an Tag 5 nur 75.9% der Zellen in später Apoptose (Abbildung 14).

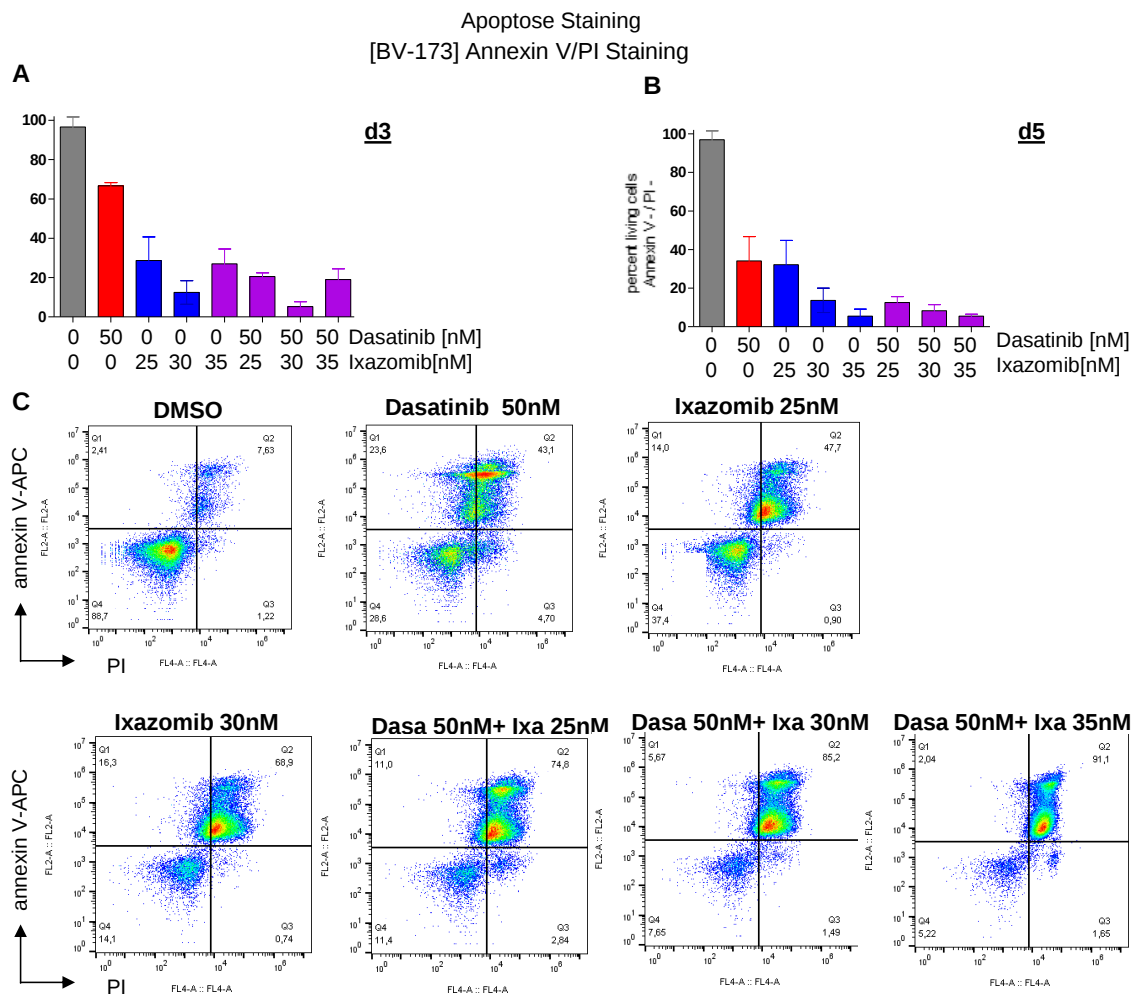


Abbildung 14. Apoptose Staining: Ixazomibbehandlung verursacht Apoptose [n=2]

Ein signifikanter Anteil der BV-173 Zellen, die mit Ixazomib oder kombiniert mit Ixazomib und Dasatinib behandelt wurden war apoptotisch. Apoptose wurde an d3 und d5 gemessen. Unter Dasatinib 50nM + Ixazomib 30nM an d5: 85.2% der Zellen in später Apoptose (Annexin V+/PI+), 1.49% der Zellen in früher Apoptose (Annexin V+/PI-). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch an d3 erzielt.

Ähnliche Resultate zeigten sich auch für die TOM-1 Zelllinie. Hier waren an Tag 3 insgesamt 72.2% der mit Dasatinib behandelten Zellen Annexin V- und PI-. Unter Ixazomib 30nM waren es nur 1.43% der Zellen, in der kombinierten Therapie von Dasatinib und Ixazomib 30nM lag dieser Wert bei 14.7%. An Tag 5 befanden sich 87.3% der mit Ixazomib 30nM behandelten TOM-1 in später Apoptose (Annexin V+/PI+) und 89.1 % der kombiniert mit Dasatinib und Ixazomib 30nM behandelten Zellen. Die detaillierten Ergebnisse inklusive der beiden Dosierungen 25nM und 35nM Ixazomib sind im Anhang, Abbildung III dargestellt.

Somit führt Ixazomib sowohl in Monotherapie als auch in kombinierter Behandlung mit Dasatinib bei Ph+ ALL Zellen ebenso wie Bortezomib zu einer Induktion von Apoptose.

4.8 TKI und Proteasominhibitoren verursachen in Ph+ ALL Apoptose durch die Hochregulation unterschiedlicher Apoptosemarker

Um die oben beschriebene Apoptose, die sowohl unter TKI Therapie als auch unter Proteasominhibitorthherapie in den Ph+ ALL Zellen induziert wird, genauer zu differenzieren und analysieren, wurden verschiedene Apoptosemarker mittels quantitativer und qualitativer Analyse mittels Western Blot untersucht. Einer dieser Marker war cleaved Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1). Dieses Protein wird durch diverse Caspasen (u.a. Caspase 3, Caspase 7) gespalten, die in den programmierten Zelltod mit eingebunden sind (Zhang, et al. 2012). In unseren Western Blots konnten wir in allen mit Proteasominhibitor behandelten Zellen eine Hochregulation der PARP-1 Expression und eine vermehrte Spaltung von PARP-1 feststellen, und dies war sowohl für Ixazomib als auch für Bortezomib in der Mono- und kombinierten Behandlung zu sehen. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Hypothese, dass Proteasominhibitoren in Ph+ ALL Zellen Apoptose unter Beteiligung von PARP-1 abläuft. In den nur mit Dasatinib behandelten und den unbehandelten Zellen zeigte sich keine Hochregulation der PARP-1 Expression und Spaltung.

In den nur mit Dasatinib behandelten Zellen zeigte sich dagegen eine Hochregulation des pro-apoptotischen Mitglieds der BCL-2 Familie Bcl-2-like protein 11 BIM, eines der *BH3-only* Proteine, welches an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und in den intrinsischen Weg der Apoptose involviert ist (Elmore 2007, Frank, et al. 2015) (Abbildung 15 und 16).

Des Weiteren untersuchten wir auch die Expression des Apoptose Markers Bcl-2-associated X protein BAX sowie des antiapoptotischen Markers der Bcl-2 Familie, Bcl-xl. Für BAX ergab sich jedoch die Schwierigkeit, dass bereits in den unbehandelten Ph+ ALL Zellen eine relativ starke Expression zu sehen war und so keine eindeutige Hochregulierung dieses Proteins in den Western Blots zu sehen war. Ähnliche Schwierigkeiten ergaben sich auch bei der Detektion von Bcl-xl. Dieser Marker zeigte in entsprechenden Western Blots eine Herunterregulierung, diese konnte jedoch aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Anfärbung von Bcl-xl in den Membranen nicht regelhaft in n=3 in den Zellen beobachtet werden.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse von Dewar et al., wonach Forkhead-Box-Protein O3 FOXO3a, ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedene essentielle zelluläre Prozesse involviert ist, beispielsweise sowohl Wachstum der Zelle als auch Apoptose der Zelle reguliert und in vielen kanzerogenen Prozessen eine Rolle spielt (Liu, et al. 2018), ein möglicher diagnostischer und therapeutischer Marker bei Therapie mit Bortezomib in einem Fallbericht zu rezidierten ALL sein könnte (Dewar, et al. 2011), wurde versucht, FOXO3 ebenfalls mittels Western Blot zu detektieren (n=1). Es zeigte sich jedoch auch hier eine sehr hohe FOXO3 Expression sowohl in den behandelten als auch unbehandelten Zellen, so dass wir diese Detektionsversuche zunächst verlassen haben. Die Expression der Proteine BIM und PARP-1 im Western Blot wurden mittels Densitometrie analysiert, hier zeigte sich ebenfalls eine Hochregulation von PARP-1 unter Proteasominhibitorthherapie und eine vermehrte Expression von BIM durch Dasatinibgabe. In der one way Anova, waren diese Ergebnisse jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 15 und 16).

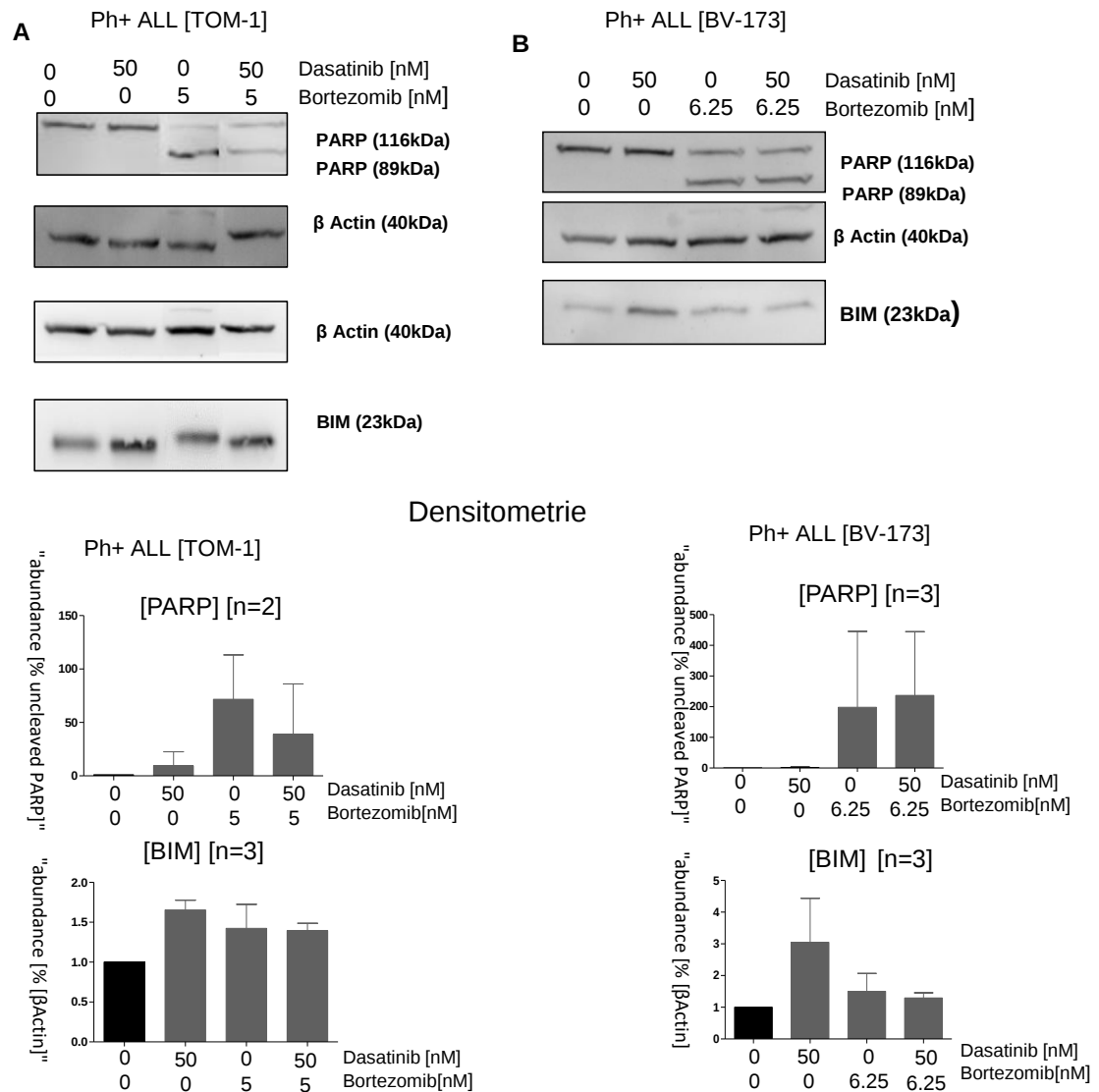


Abbildung 15. Westernblot Resultate nach 16h Bortezomib:

Die Behandlung mit Proteasominhibitor Bortezomib führt zur Hochregulierung und vermehrten Spaltung des proapoptotischen Markers PARP in TOM-1 und BV-173. Unter TKI Behandlung kommt es zur vermehrten Expression des proapoptotischen Markers BIM. Dies lässt sich auch in der Densitometrieanalyse darstellen, diese wurde mittels Image J-Software durchgeführt.

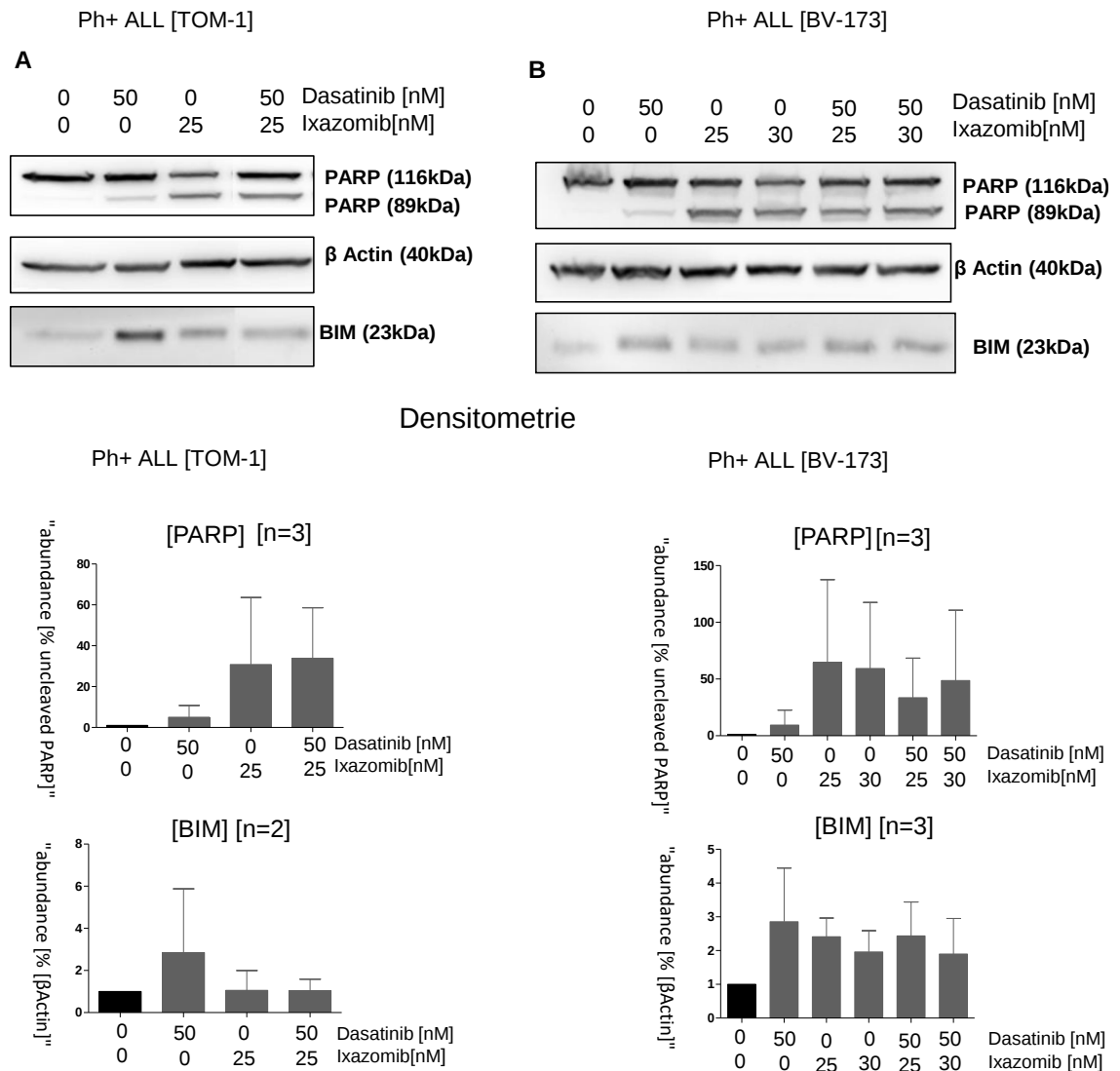


Abbildung 16. Westernblot Resultate nach 16h Ixazomib:

Die Behandlung mit Proteasominhibitor Ixazomib führt zur Hochregulierung und vermehrten Spaltung des proapoptotischen Markers PARP in TOM-1 und BV-173. Unter TKI Behandlung kommt es zur vermehrten Expression des proapoptotischen Markers BIM. Dies lässt sich auch in der Densitometrieanalyse darstellen, diese wurde mittels Image J-Software durchgeführt.

4.9 In der quantitative Echtzeit PCR zeigt sich eine Hochregulation der Expression von *ERN1/XBP1* und *TRAIL*

Als weiterer Nachweis, dass sowohl die Therapie mit TKI als auch mit Proteasominhibitoren Apoptose in den Ph+ ALL Zelllinien TOM-1 und BV-173 induziert, wurde zusätzlich eine quantitative Echtzeit PCR (qPCR) zum Nachweis der Expression weiterer, in die Apoptose involvierter Marker durchgeführt. Es konnte in den TOM-1 Zellen und in den BV-173 Zellen eine signifikante Hochregulation der tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand *TRAIL* Expression in allen mit Dasatinib behandelten Zellen nachgewiesen werden.

Die stärkste Expression von *TRAIL*, normalisiert auf die Expression des verwendeten housekeeping gene *COX6b*, zeigte sich unter der Monotherapie mit Dasatinib 50nM ($p < 0.001$ ***), doch auch die Kombination aus Dasatinib und Bortezomib führte zur einer deutlichen Hochregulation der TRAIL Expression (Dasatinib + Ixazomib 25nM ***, Dasatinib + Bortezomib 5/6.25nM ** (Abbildung 17). Zusätzlich wurde das kodierende Gen für das X-Box-binding-protein 1 (*XBP1*) untersucht. Dieses fungiert nach seiner Aktivierung als Transkriptionsfaktor, der die Homöostase des Endoplasmatischen Retikulums entweder wiederherstellt oder wenn dies nicht möglich ist, die Apoptose der entsprechenden Zelle einleitet und einen Schlüsselsensor der *unfolded protein response* (UPR) darstellt (Wang, et al. 2011), (He, et al. 2010). Die Aktivierung von *XBP1* geschieht durch eine Serine/Threonin Protein Kinase und Endoribonuklease, die durch das Gen Endoplasmatic Reticulum To Nucleus Signaling 1 *ERN-1* kodiert wird, diese Kinase generiert das aktive XBP1 mittels einer nicht konventionellen Splicingreaktion. Die Aktivierung der UPR ist verursacht durch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen und führt letztendlich im Zusammenspiel mit weiteren Reaktionen in den Zellen zur Apoptose.

In beiden Zelllinien zeigte sich unter Proteasominhibitorbehandlung eine signifikant höhere *ERN1* Expression ($p < 0.001$ ***) im Vergleich zu unbehandelten oder nur mit Dasatinib behandelten Zellen. Allerdings unterschied sich die Ausprägung der *ERN1* Expression sowohl in den einzeln mit Bortezomib bzw. Ixazomib behandelten BV-173 Zellen als auch in den kombiniert behandelten Zellen nicht signifikant voneinander. Dies unterstreicht die wichtige Rolle, die der Proteasominhibitor in der kombinierten Behandlung der Zellen einnimmt. Für die TOM-1 Zellen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression von *ERN-1* für Ixazomib als Mono- oder kombinierte Therapie. Allerdings war die Ausprägung der *ERN-1* Expression in den kombiniert behandelten TOM-1 Zellen niedriger als unter Bortezomib Monotherapie (***). Für *XBP-1* zeigte sich in beiden Zelllinien unter Proteasominhibitor Monotherapie eine signifikant höhere Expression im Vergleich zur nicht behandelten oder allein mit Dasatinib behandelten Zellen.

Diese erhöhte Expression konnte jedoch in der kombinierten Behandlung aus Proteasominihibitor und Tyrosinkinaseinhibitor nicht nachgewiesen werden (***). (Abbildung 17)

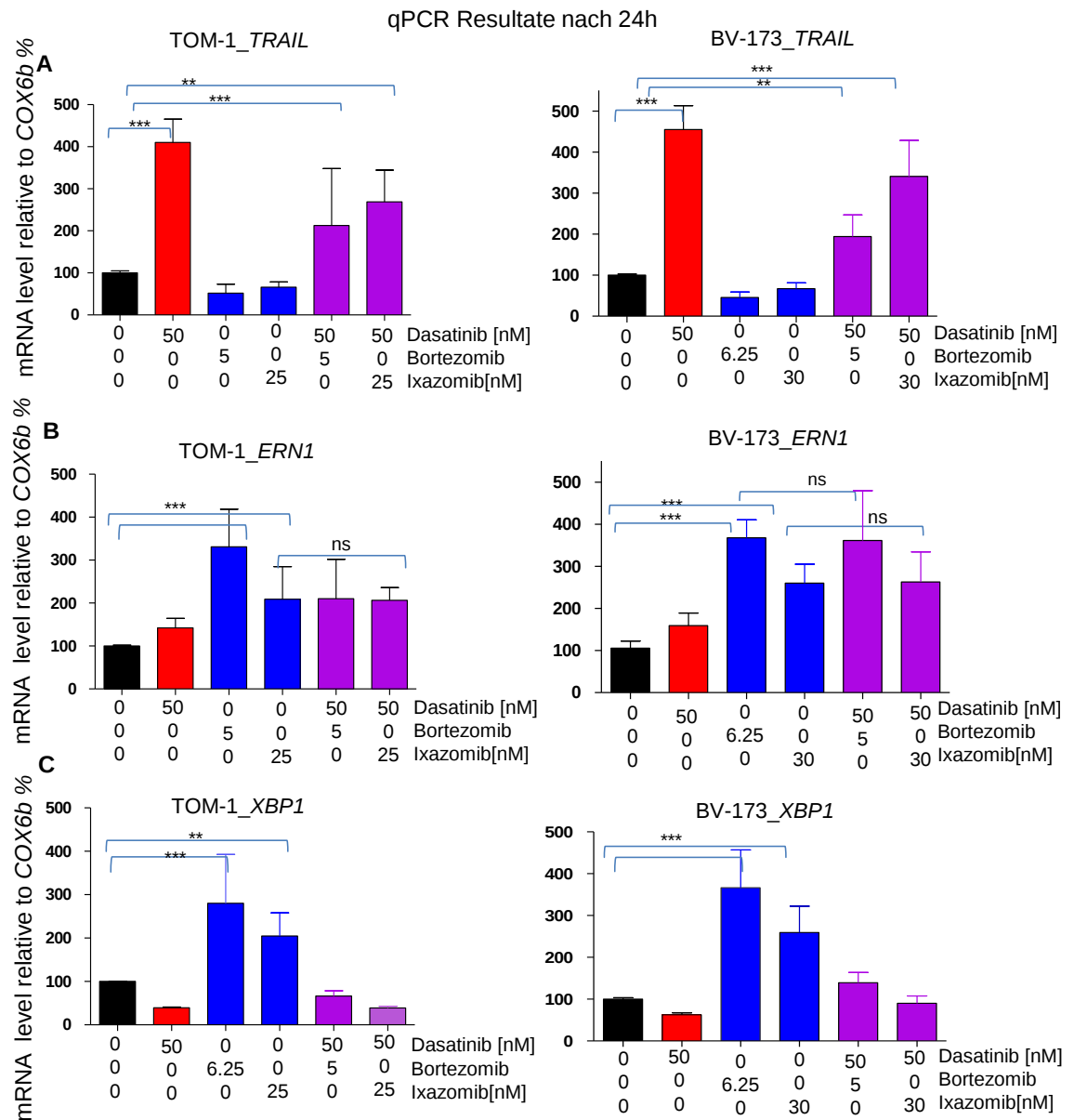


Abbildung 17. qPCR Ergebnisse: Dasatinibtherapie steigert TRAIL Expression, Proteasomihhibitoren beeinflussen den UPR

(A) [n=4]: Signifikante Steigerung der *TRAIL* Expression in allen mit Dasatinib behandelten Zellen sowohl für TOM-1 als auch BV-173, die höchste Expression zeigt sich in den nur mit Dasatinib behandelten Zellen.

(B) [n=4]: Signifikante Steigerung der *ERN1* Expression in allen mit Bortezomib sowohl einzeln als auch in Kombination behandelten Zellen. Für Ixazomib zeigt sich kein Unterschied zwischen der Kombinations- und der Einzelbehandlung.

(C) [n=3]: Signifikante Steigerung der *XBP1* Expression und damit Beeinflussung des UPRs durch alleinige Proteasomihhibitorthherapie in den beiden Ph+ ALL Zelllinien.

4.10 Proteasominhibitoren führen auch in Ph- ALL Zellen zu einer starken Reduktion der Zellviabilität

Zuletzt wollten wir auch einen Eindruck gewinnen, welchen Einfluss Proteasominhibitoren auf Ph- ALL Zellen haben, die in der Regel mit einer günstigeren Prognose aufweisen. Dafür haben wir die beiden Ph- negativen Zelllinien REH und RS4-11 ausgewählt und mit den bereits zuvor verwendeten Proteasominhibitordosierungen behandelt: Bortezomib 4nM, 5nM und 6.25nM sowie Ixazomib 25nM, 30nM und 35nM. Der Anteil von lebenden Zellen wurde von d0-d4 in der PI Färbung mittels FACS detektiert. Hier zeigte sich, dass sowohl Bortezomib als auch Ixazomib zu einer sehr starken Reduktion der Zellviabilität in beiden Zelllinien führen. So lag der Anteil der lebenden Zellen der REH Zelllinie bei Behandlung mit 5nM Bortezomib an Tag 3 bei $14.84 \pm 9.18\%$ und bei Behandlung mit Ixazomib 30nM bei $21.01 \pm 7.43\%$. Allerdings zeigte sich auch hier, wie bereits in den Ph+ ALL Zellen, ein dosisabhängiger Effekt: So führte die Gabe von 4nM Bortezomib in den REH Zellen nur zu einer Reduktion der lebenden Zellfraktion auf $84.36 \pm 17.35\%$ an Tag 3, und der Vergleich der Dosierungen 4nM Bortezomib mit 5nM Bortezomib ergab, dass 5nM zu einer deutlich ausgeprägteren Reduktion der Zellviabilität führt (***). Auch für Ixazomib zeigte sich an Tag 3 ein dosisabhängiger Effekt zwischen den unterschiedlichen Ixazomibkonzentrationen, und so ist die Wirkung von Ixazomib 35nM signifikant stärker als 30nM (***). Allerdings ist dieser Effekt an Tag 4 nicht mehr feststellbar, da alle drei gewählten Ixazomibdosierungen zu einer sehr starken Reduktion der Zellviabilität führen. Die Gabe von Ixazomib und Bortezomib führt auch in den RS4;11 Zellen zu einer sehr starken und signifikanten Reduktion der Zellviabilität, aufgrund der sehr ausgeprägten Reduktion wurde die PI Färbung nur bis Tag 3 fortgeführt.

An d3 lag der Anteil der lebenden Zellen unter Behandlung mit Bortezomib 5nM bei $0.46 \pm 0.2\%$ und mit Ixazomib 30nM bei $1 \pm 0.94\%$. Auch hier zeigte sich zwischen Bortezomib 5nM und Bortezomib 4nM ein dosisabhängiger Effekt. Aufgrund der sehr starken Wirkung aller gewählten Ixazomibkonzentrationen ließ sich für Ixazomib in den RS4;11 Zellen kein Unterschied zwischen den einzelnen Dosierungen feststellen.

Die beiden Substanzen Bortezomib und Ixazomib zeigen starke zytotoxische Effekte in Ph- ALL Zellen und besonders RS4;11 reagierte sehr empfindlich auf die Gabe von Proteasominhibitoren (Abbildung 18).

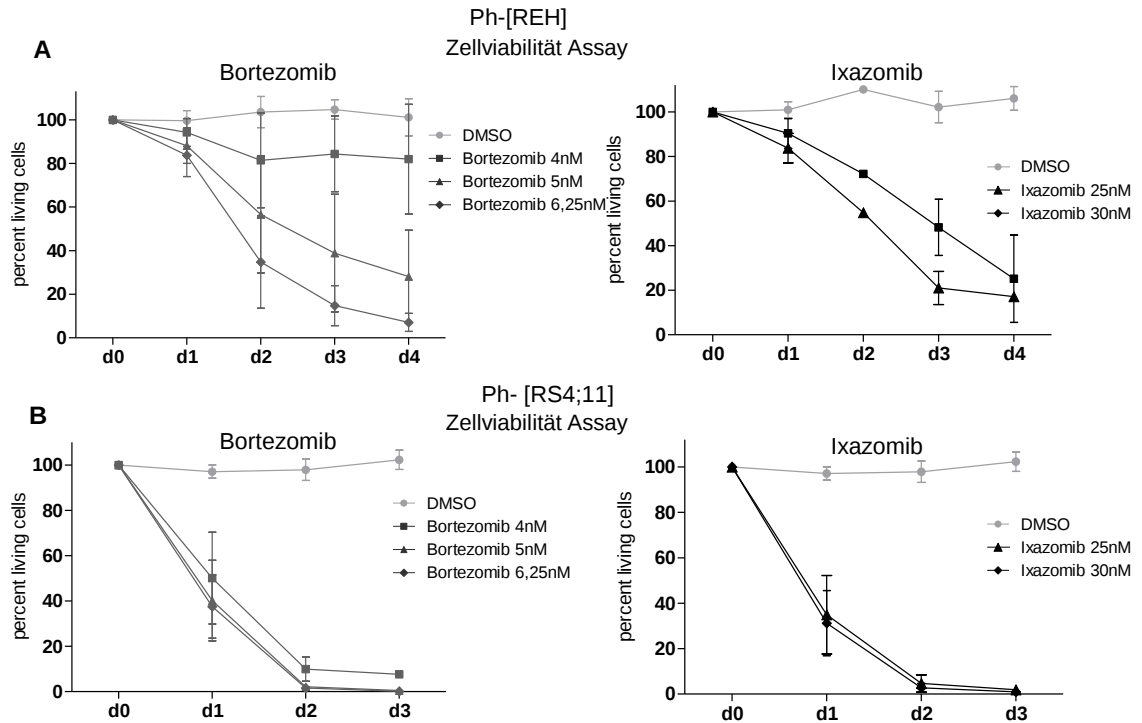


Abbildung 18. REH und RS4;11: Behandlung mit Bortezomib und Ixazomib [n=3]

Auch in den Ph- Zelllinien REH und RS4;11 verursacht die Behandlung mit Proteasominhibitoren eine signifikante (***) Reduktion der Zellviabilität

5 Diskussion

Während vorherige Arbeiten vor allem den Effekt von Proteasominhibitoren in Fällen von rezidivierter Ph+ ALL untersucht haben, zeigt die hier vorliegende Arbeit die Effektivität von Proteasominhibitoren an Zelllinien, die aus primären Fällen generiert worden und evaluiert die Wirkung der Proteasominhibition in der Zellkultur. Außerdem vermittelt die hier vorliegende Arbeit einen ersten Eindruck, welchen Effekt die gemeinsame Gabe von Proteasominhibitoren und Tyrosinkinaseinhibitoren auf die Ph+ ALL Zellen hat. Die vielversprechenden Ergebnisse deuten an, dass die Kombination dieser beiden Substanzen eine effiziente Strategie zur Therapie von Ph+ ALL bei Erwachsenen sein kann.

Vorausgegangene Studien haben bereits gezeigt, dass Bortezomib einen antileukämischen Effekt bei kindlicher B-Zell Vorläufer ALL aufweist (Messinger, et al. 2012), und dass die Organtoxizität bei Bortezomibgabe tolerierbar ist (Teicher and Tomaszewski 2015). Unter pharmakologischen Aspekten erscheint es also möglich und machbar, die hier getesteten Proteasominhibitoren in Kombination mit Tyrosinkinaseinhibitoren langfristig auch in klinischen Studien zur Therapie der Ph+ ALL bei Erwachsenen einzusetzen, da sowohl Bortezomib als auch Ixazomib von der FDA zugelassen sind und bereits seit Jahren mit bekanntem, tolerierbarem Nebenwirkungsprofil zur Behandlung anderer hämatologischer Neoplasien, insbesondere des Multiplen Myeloms, verwendet werden.

5.1 Reduzierte Zellviabilität und Apoptose

Die Behandlung der Zelllinien TOM-1 und BV-173 mit den Proteasominhibitoren sowohl einzeln, als auch in Kombination mit TKI, führte dosisabhängig zu einer signifikant stärkeren Reduktion der Zellviabilität als die alleinige Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib, der in unserer Arbeit als Vertreter der aktuellen Standardtherapie bei Ph+ ALL für erwachsene Patienten ausgewählt wurde und aktuell sowohl in Kombination mit Chemotherapie und/oder mit Glucocorticoiden eingesetzt wird.

In beiden Zelllinien TOM-1 und BV-173 hatte die Bortezomibgabe sowohl einzeln als auch kombiniert mit einem TKI einen signifikant größeren Einfluss auf die Zellviabilität als die alleinige TKI Gabe, wenn die Dosierung von Bortezomib der im CCK8 ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentration IC50 entsprach. Im Allgemeinen zeigte sich, dass der Effekt von Bortezomib dosisabhängig ist. Bei einer Dosierung von 4nM Bortezomib in Kombination mit Dasatinib konnte in der PI-Färbung für die TOM-1 Zellen sogar eine Tendenz zur Entwicklung eines synergistischen Effekts zwischen Proteasom- und Tyrosinkinaseinhibitor festgestellt werden. Dieser Trend sollte in weiteren Experimenten detailliert untersucht werden, dabei sollte vor allem die Verwendung unterschiedlicher Dosierung der Proteasominhibitoren und Tyrosinkinaseinhibitoren stattfinden. So ließ sich ein besserer Eindruck über die geeignete Dosierung gewinnen, die den bestmöglichen Effekt zu Reduzierung der Zellviabilität aufweist, ohne zu starke Nebenwirkungen durch hohe Bortezomibdosierungen zu riskieren.

Primär relevant ist, dass in keinem der zahlreich durchgeführten Versuche ein antagonistischer Effekt zwischen Bortezomib und Dasatinib dokumentiert werden konnte. Immer wurde eine mindestens additive Wirksamkeit nachgewiesen.

Die hier gezeigte sehr starke Reduktion der Zellviabilität durch die Proteasominhibitoren in Ph+ ALL Zellen deckt sich mit den Ergebnisse von Takashi et al, die bereits eine antileukämische Aktivität von Bortezomib an verschiedenen B-Zell Vorläufer ALL Zelllinien aufzeigen konnten. Hierunter waren auch ALL Zelllinien, die eine IKZF1 Mutation aufwiesen, diese Mutation wurde als möglicher Biomarker beschrieben, der eine Proteasominhibitor Sensitivität anzeigt (Takahashi, et al. 2017).

Auch die Behandlung der Zellen mit dem oral verfügbaren Proteasominhibitor Ixazomib führte dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität sowohl einzeln als auch in Kombination mit Dasatinib. Vor allem bei höheren Dosierungen von 35nM für BV-173 bzw. 30nM für TOM-1 ist der Effekt von Ixazomib auf die Zellen sehr groß und die Zellviabilität in der einzelnen und kombinierten Gabe ist in wenigen Tagen sehr stark reduziert. Erfreulicherweise zeigte sich bei der gemeinsamen Gabe von Dasatinib und Ixazomib 30nM ein additiver Effekt, diese additive Wirkung zeigt einen Vorteil der kombinierten Behandlung im Vergleich zur alleinigen Ixazomib- sowie Dasatinibbehandlung an.

Dieser additive Effekt beruht in erster Linie darauf, dass die nur mit Ixazomib behandelten BV-173 nach drei Tagen beginnen, sich an die fortgesetzte Medikamentengabe anzupassen und sich zu erholen, so dass ihre Zellviabilität erneut ansteigt. Diese steigende Zellviabilität konnte trotz Auffrischung der Substanzen wiederholt an Tag 3 beobachtet werden. Auch bei einer Dosierung von 25nM Ixazomib konnte dieses Erholungsphänomen festgestellt werden. Nach aktuellem Stand bleibt unklar, wie es auf zellulärer Ebene zur Erholung der Zellen unter alleiniger Ixazomibtherapie kommt, tiefer gehende Untersuchungen zur Erklärung dieses von uns beobachteten Effekts können Gegenstand weitestführender Forschung sein. Es zeigt sich, dass sowohl eine ausreichend hohe Dosierung von Ixazomib als auch die dosisabhängige Kombination von Ixazomib und Dasatinib die Zellviabilität stark reduziert und dass es auch hier zu keinem antagonistischen Effekt kommt. Es sollten daher weitere Untersuchung der Zusammenwirkung beider Substanzen in vivo durchgeführt werden, um beispielsweise auch klinischen Versuche zu ermöglichen. Unter Betrachtung des typischerweise älteren, vorerkrankten Ph+ ALL Patienten, wäre vor allem die Gabe des oral verfügbaren Proteasominhibitor Ixazomib in Bezug auf Lebensqualität und Compliance der Patienten ein großer Vorteil.

Weitere Untersuchungen im Hinblick auf eine Erklärung der Wirkungsweise der Proteasominhibitoren zeigten, dass sowohl die Gabe der Proteasominhibitoren als auch die kombinierte Gabe mit Dasatinib zu Apoptose in den Ph+ Zellen führt. Dies konnte zum einen im Apoptose Assay nachgewiesen werden und zum anderen gezielt qualitativ durch den Nachweis von Apoptosemarkern, sowohl im Western Blot als auch in der qPCR dargestellt werden.

In der Proteinanalyse mittels Western Blot haben wir uns vor allem auf die Expression der beiden proapoptotischen Marker BIM und PARP-1 fokussiert. In den mit Dasatinib behandelten Zellen konnten wir eine Hochregulierung der Expression von BIM feststellen, welches bereits bekannt ist, in CML Zellen unter Dasatinibbehandlung vermehrt exprimiert zu werden (Simara, et al. 2013).

Dahingegen zeigte sich sowohl in den einzeln als auch kombiniert mit einem Proteasominhibitor behandelten Zellen eine vermehrte Expression und Spaltung von PARP-1.

Das Enzym PARP-1 hat vielseitige Eigenschaften, einerseits ist es in die DNA Reparatur involviert, andererseits wird PARP-1 unter anderem durch Caspase 3 gespalten, und die proteolytische Spaltung von PARP-1 wird als universeller Biomarker für Apoptose und Zelltod angesehen (Oliver, et al. 1998). Esparis-Ogando et al. konnten bereits zeigen, dass die Bortezomib Behandlung von Plasma Zell Leukämie zu einer vermehrten PARP-1 Spaltung führt, und dass die hierausresultierende Hochregulation von Caspase 3 zur Apoptose in den Leukämiezellen führt (Esparis-Ogando, et al. 2005). Außerdem ist bekannt, dass die Spaltung von PARP-1 durch Caspase 3 und 7 in die beiden Untereinheiten 89 kDa katalytische Untereinheit und 24 kDa DNA-Bindungsdomäne ein Kennzeichen der Caspase abhängigen Apoptose in Chronisch Lymphatischen Leukämiezellen ist. (Diamantopoulos, et al. 2014), (Soldani and Scovassi 2002). Die in unseren Westernblot detektierte vermehrte Spaltung von PARP-1 zeigt, dass die Gabe von Proteasominhibitoren in Ph+ ALL unter anderem über den Caspase-3-Signalweg zu Apoptose führt.

Die qPCR Versuche fokussierten sich zudem auf die Analyse des pro apoptotischen Proteins TRAIL, welches Teil der TNF/TNFR Superfamilie ist und die Caspase 8 abhängige Apoptose aktiviert. TRAIL ist daher Teil des extrinsischen Apoptosewegs. Es zeigte sich sowohl in den nur mit Dasatinib behandelten Zellen als auch in den kombiniert behandelten Ph+ ALL eine signifikant höhere TRAIL Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Das onkogene Potential von BCR-ABL exprimierenden Leukämiezellen, sowie die verstärkte Proliferation und die deutlich verminderter Apoptose in den Zellen beruht unter anderem auf einer veränderten Zytokinexpression der Zellen, die Einfluss auf verschiedene Reaktionswege nimmt, beispielsweise die Aktivierung des RAS, JAK/STAT oder NF- κ B Signalweg (Jagani, et al. 2008). Ein weiterer Mechanismus, der Teil der Leukämogenese bei Ph+ Zellen bei der CML und der ALL ist, ist die Hemmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren der FoxO Familie. Es ist bekannt, dass diese Transkriptionsfaktoren als Tumorsuppressor fungieren. In Ph+ ALL Zellen ist unter anderem die Aktivität von FoxO3a stark herunterreguliert. In gesunden Zellen ist FoxO3a an der Regulation von Apoptose beteiligt und bewirkt unter anderem die Aktivierung der beiden oben genannten proapoptotischen Proteine BIM und TRAIL, die intrinsisch und extrinsisch Apoptose verursachen (Ghaffari, et al. 2003).

Essafi et. al konnten bereits zeigen, dass Imatinib in BV-173 Zellen zur Aktivierung von FoxO3a verursacht, und dass dies zur Expression von BIM und damit zu Apoptose führt (Essafi, et al. 2005). Auch die vermehrte TRAIL Expression unter Imatinibtherapie in Ph+ ALL und hieraus entstehende Beteiligung am Zelltod wurde bereits in früheren Studien beschrieben. (Kang, et al. 2016) Diese Feststellung deckt sich mit unseren Ergebnissen, wonach Dasatinib in Ph+ ALL Zellen die Expression von TRAIL und BIM fördert und so die Apoptose via intrinsischem Signalweg bewirkt.

Da die in Ph+ Zellen stattfindende Herunterregulierung von Proteinen der FoxO Familie durch das Ubiquitinproteasom System reguliert wird, haben bereits andere Studien vermutet, dass der Proteasom Pathway eine Rolle in der Tumorgenese von Ph+ Leukämiezellen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass Bortezomib in murinen BaF3/BCR-ABL pro B Zellen zu einer erhöhten Expression von BIM und TRAIL führt, bei gleichzeitig vermehrter Anreicherung von nicht phosphoryliertem FoxO3a im Zellkern (Jagani, et al. 2009). Diese vermehrte FoxO3a Expression konnte auch in BCR-ABL T315I Zellen gezeigt werden. (Jagani, et al. 2009)

Im Gegensatz zu diesen genannten Ergebnissen von Jagani et. al führte die alleinige Gabe von Ixazomib und Bortezomib in den Ph+ ALL Zellen zwar ebenfalls zu einer Apoptose, jedoch nicht zu einer vermehrten Expression von BIM und TRAIL. Dies lässt uns vermuten, dass die alleinige Wirkung der Proteasominhibitoren nicht auf einer durch FOXO3a vermittelten Apoptoseaktivierung über TRAIL und BIM führt, sondern dass andere Reaktionswege, die in der Spaltung von PARP-1 münden an der Wirkung der Proteasominhibitoren beteiligt sind. Da jedoch weiterführende Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe die Bedeutung von FOXO3 als sowohl therapeutischen als auch diagnostischen Marker bei effizienter Bortezomibgabe in einem Ph+ ALL Patienten herausstellen, wäre es interessant, die Rolle von FOXO3a in der kombinierten Gabe von TKIs mit Proteasominhibitoren auch in unseren Ph+ ALL Zellen zu untersuchen (Dewar, et al. 2011).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Hauptwirkung der beiden Substanzklassen TKI und Proteasominhibitoren einzeln und in Kombination in Ph+ ALL die Apoptose ist, und dass sich diese auf die Aktivierung unterschiedlicher Apoptosewege zurückzuführen lässt.

Allerdings können wir anhand unserer Untersuchungen heute noch nicht sagen, welche Apoptosewege aktiviert werden, wenn beide Substanzen kombiniert in Ph+ ALL Zellen gegeben werden. Aufgrund der ambivalenten Stellung der BV-173 als Ph+ ALL hervorgehend aus einer CML in der Blastenkrise, lassen sich die positiven Effekte der Proteasominhibitoren kombiniert mit Tyrosinkinaseinhibitoren auch auf die CML in einem solchen fortgeschrittenen Stadium übertragen und die Proteasominhibitoren könnten in den seltenen Fällen, in denen einige alleinige Tyrosinkinaseinhibitorthherapie zur Kontrolle dieser Erkrankung nicht ausreichend ist auch eine vorteilhafte Ergänzung der Therapie darstellen.

5.2 Einfluss von Proteasominhibitoren auf den UPR

Ein anderer Fokus zum Verständnis der Wirkungsweise von Proteasominhibitoren in Ph+ ALL Zellen sowohl einzeln als auch in Kombination mit Dasatinib liegt auf der Unfolded Protein Response zu Deutsch ungefaltete Proteinantwort. In unseren durchgeführten qPCR Analysen konnten wir feststellen, dass es unter der Therapie mit Proteasominhibitoren zu einer vermehrten Expression von XBP1 und ERN1 kommt. Die vermehrte Expression von XBP1, Schlüsselenzym der UPR als Stressantwort der Zelle, im Vergleich zu allen unbehandelten Zellen oder mit Dasatinib behandelten Zellen zeigt, dass die Therapie mit Proteasominhibitoren in den Ph+ ALL Zellen signifikanten Zellstress verursacht.

Vor allem Ixazomib führte sowohl einzeln als auch in Kombination zu einer starken ERN1 Expression, und dies könnte bedeuten, dass der Hauptwirkungseffekt von Ixazomib durch die UPR vermittelt wird und dass diese Wirkung auch bei gemeinsamer Gabe mit Dasatinib nicht reduziert wird und hierbei eine additive Wirkung der beiden Substanzen ermöglicht wird.

ERN1 kodiert für IRE1 α , ein Protein, das das Splicing von vom inaktiven unspliced XBP-1 XBP1 in seine aktive Form vermittelt (Chalmers, et al. 2019). Die Rolle von XBP1 und ERN1 in der Zelle ist vielseitig: Als Sensor für einen vermehrten Zellstress ist die Expression von XBP1 durch Aktivierung von ERN1 zunächst protektiv, allerdings führt die UPR bei nicht kompensiertem Stress zu Apoptose und ERN1 kann ebenfalls durch Bindung an TRAF2 zur Aktivierung von Caspase abhängiger Apoptose führen (He, et al. 2010).

In Multiplen Myelom Zellen, die mit einem Proteasominhibitor behandelt wurden konnte gezeigt werden, dass Bortezomib ERN1 und XBP1 supprimiert (Lee, et al. 2003), und es wird vermutet, dass eine Blockade der Splicing Reaktion von XBP1 ein Therapiemöglichkeit beim Multiplen Myelom sein kann (Mimura, et al. 2012). Dies konnte auch in unveröffentlichten Daten von Salimi et al. gezeigt werden. Im Allgemeinen wird beschrieben, dass XBP1 in Ph+ ALL Zellen vermehrt exprimiert wird und dass TKIs wie Imatinib die XBP1 Expression senken. Darüber hinaus ist bekannt, dass Patienten, die eine verstärkte XBP1 Expression aufweisen, eine schlechtere Prognose haben als solche mit einer niedrigeren XBP1 Expression in den jeweiligen Leukämiezellen (Kharabi Masouleh, et al. 2015, Kharabi Masouleh, et al. 2014). Hieraus leiten sich Ansätze ab, wonach eine gezielte Hemmung der UPR und speziell von XBP1 bei Ph+ ALL ein therapeutischer Ansatz sein könnte, dies legen (Roberts, et al. 2014) unveröffentlichte Daten von Vieri et al. und die Daten von Kharabi et al. (Kharabi Masouleh, et al. 2014) dar.

Allerdings gibt es auch Beobachtungen, dass die Proteasominhibition durch Bortezomib in Multiplen Myelom Zellen zu einer vermehrten Expression von XBP1 führt und dass dies durch gesteigerten Zellstress zur Apoptose führen kann (Field-Smith, et al. 2006). Insgesamt verursachen Proteasominhibitoren also auf verschiedene Art und Weise eine Induktion der UPR (Obeng, et al. 2006).

Unsere Beobachtungen zeigen, dass Proteasominhibitoren in Ph+ ALL Zellen die Unfolded Protein Response beeinflussen und durch vermehrte Expression von ERN1 und XBP1 Zellstress auslösen, der in den hier vorliegenden Experiment proapoptotisch wirkte. Dies zeigt, dass die Unfolded Protein Response und die damit verbundene XBP1 und ERN1 Expression ein komplexes und vielschichtiges System ist, bei dem ein sensibles Gleichgewicht als Stressreaktion der Zelle für diese zu einem Überlebensvorteil führt. Wenn es jedoch, wie im Fall der hier durchgeführten Versuche sowohl zu einer Aktivierung der UPR, aber auch durch die Gabe eines XBP1 Inhibitors zu einer Hemmung der UPR kommt, überwiegt letztlich die proapoptotische Wirkung auf die Ph+ ALL Zellen.

Die genaue Wirkung von Proteasominhibitoren auf die UPR scheint jedoch vielseitig zu sein und bleibt im Detail noch nicht vollständig verstanden.

Interessanterweise kam es in unseren Versuchen bei alleiniger Proteasominhibitorgabe zu einer vermehrten Expression von XBP1, diese vermehrte Expression konnte in den kombiniert behandelten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Die beiden Versuchsansätze unterscheiden sich also signifikant in ihrer Stärke der XBP1 Expression, obwohl es in der apoptotischen Wirkung von TKI und TKI + Proteasominhibitor auf die beiden Ph+ ALL keinen signifikanten Unterschied gab.

Man kann festhalten, dass Proteasominhibitoren gemeinsam mit Tyrosinkinaseinhibitoren Apoptose in Ph+ ALL Zelllinien bewirken, und dass diese unter anderem auch durch eine Beeinflussung der UPR stattfindet. Um diese Resultate zu verdeutlichen und mit weiteren Ergebnissen zu untermauern, sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig. Hierzu zählt beispielweise die Analyse der Wirkung von Proteasominhibitoren gemeinsam mit TKIs im Mausmodell oder die Untersuchung an primären Ph+ ALL Zellen bei Erstdiagnose der Erkrankung.

5.3 Proteasominhibitoren zur Therapie anderer ALL-Subtypen

Die ausgeprägte apoptoseinduzierende und somit letztlich zytoreduktive Wirkung der Proteasominhibitoren konnte auch in den Ph- Zelllinien RS4-11 und REH nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die Proteasominhibition nicht nur einen positiven Effekt auf die Reduktion der Zellviabilität in den beiden hier gezeigten Ph+ ALL Zelllinien TOM-1 und BV-173 haben, sondern dies auch für andere ALL Subtypen gilt. Von besonders großer Bedeutung im Hinblick auf die Etablierung neuer, vielversprechender Therapiemöglichkeiten wäre hierbei die Untersuchung der Wirkung von Proteasominhibition an solchen Ph+ ALL Zellen, die eine T315I Mutation aufweisen. Die Prognose von Patienten, deren Zellen eine solche Mutation primär zeigen oder im Laufe der Therapie akquiriert haben ist besonders eingeschränkt, da bis heute Ponatinib der einzig wirksame Tyrosinkinaseinhibitor bei dieser Mutation ist und Langzeitergebnisse zur dauerhaften Wirkung von Ponatinib noch fehlen (Nicolini, et al. 2017). Einer japanischen Forschergruppe ist es vor Kurzem gelungen, eine Ph+ ALL T315I Zelllinie in der Zellkultur zu etablieren.

Untersuchungen zur Wirkung der Proteasominhibitoren an diesen Zellen in Kombination mit Ponatinib wären interessant und wünschenswert (Okabe, et al. 2010).

Eine erst kürzlich definierte ALL-Subgruppe, die ebenfalls eine sehr schlechte Prognose und schwierige Therapie Voraussetzungen birgt, ist die Ph like ALL. Dieser ALL-Subtyp hat mit bis zu 27% der Fälle eine recht hohe Inzidenz bei jungen Erwachsenen mit B-ALL (Tran and Loh 2016). Das Therapieregime ist bislang uneinheitlich und richtet sich nach dem Genexpressionsprofil. Auch bei dieser Unterform ist jedoch die bislang einzig bekannte kurative Therapieoption eine allogene Stammzelltransplantation (Jain, et al. 2017). Charakteristisch für die Ph like ALL ist ein vielfältiges Genexpressionsprofil, dass in einigen Charakteristika dem der Ph+ ALL ähnelt. Sie kann über verschiedene Kinaseaktivitäten verfügen und weist wie die Ph+ ALL häufig IKZF1 Alterationen auf, allerdings ohne das simultane Vorhandensein der BCR-ABL Tyrosinkinase (Tran and Loh 2016). Da wie oben bereits genannt eine IKZF Deletion von Takashi et. al als möglicher positiver prädiktiver Marker für eine Sensibilität von ALL Zellen auf Proteasominhibitoren beschrieben wurde, könnte die Ph like ALL auch aufgrund der IKZF1 Alteration ebenfalls auf eine Behandlung mit Proteasominhibitoren ansprechen.

Die Ph like ALL und die Ph+ ALL weisen auf molekularer Ebene Ähnlichkeiten auf und das Therapieregime der relativ neu definierten und erst seit wenigen Jahren bekannten Erkrankung orientiert sich an etablierten Therapiestrategien der Ph+ ALL und beinhaltet auch die gemeinsame Gabe von Chemotherapie und Tyrosinkinaseinhibitoren. (Frisch and Ofran 2019) (Roberts, et al. 2014). Da die Proteasominhibitoren sowohl einzeln, als auch in Kombination mit dem TKI Dasatinib bei Ph+ ALL und Ph – ALL in unseren Versuchen eine hohe Wirksamkeit zeigten, könnte diese Substanzklasse auch für die noch uneinheitliche Therapie der Hochrisiko Ph like ALL als neue vielversprechende Therapieoption in Betracht kommen. Hier sind weitere Untersuchungen sinnvoll und wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass Proteasominhibitoren einen signifikanten pro-apoptotischen Effekt auf Ph+ ALL Zelllinien in der Zellkultur aufweisen. Dieser Effekt ist sowohl bei der Proteasominhibition als Monotherapie, als auch in Kombination mit einem Tyrosinkinaseinhibitor nachweisbar. Proteasominhibitoren sind gut geprüfte, bereits etablierte und im Wesentlichen gut verträgliche Therapeutika bei anderen hämatopoetischen Neoplasien, wie beispielsweise dem Multiplen Myelom. Ein kombiniertes Therapieregime mit einem Bestandteil einer Standardtherapie der Ph+ ALL, nämlich einem Tyrosinkinaseinhibitor, zusammen mit einem Proteasominhibitor stellt so einen vielversprechenden neuen Therapieansatz zur Verbesserung der Prognose vor allem von älteren Ph+ ALL Patienten dar. Da die gemeinsame Gabe von Dasatinib und Proteasominhibitoren in der vorliegenden Untersuchung zu keinem Zeitpunkt einen antagonistischen Effekt aufwies, wäre es möglich, die zugelassenen und bereits umfassend untersuchten Proteasominhibitoren nach klinischer Prüfung verhältnismäßig unkompliziert ergänzend in ein Therapieregime für ältere Patienten mitaufzunehmen, ohne auf etablierte Therapeutika zu verzichten. Voraussetzung dafür sind selbstverständlich primär weitere Untersuchung in vivo. Die vorliegende Arbeit liefert bereits einen kleinen Eindruck über die Wirkweise von Proteasominhibitoren in Ph+ ALL Zellen, und die Untersuchungen könnten vor allem in einer Erweiterung des erprobten Dosisspektrums sowie der analysierten Proteine deutlich ausgeweitet werden und anschließend in ein bereits etabliertes Mausmodell der Ph+ ALL übertragen werden. Eine genauere Analyse, welchen Einfluss Proteasominhibitoren tatsächlich auf die UPR in der Ph+ ALL haben und wie man sich diesen Einfluss therapeutisch zielgerichteter zu Nutze machen kann, steht noch aus. Langfristig wäre es wünschenswert, bei weiterhin überzeugenden Resultaten den Effekt von Proteasominhibitoren in verschiedene ALL-Hochrisiko-Subtypen zu untersuchen, die eine ebenso schlechte oder noch schlechtere Prognose als die Ph+ ALL aufweisen, wie beispielsweise die Ph like ALL oder die Ph+ ALL mit einer primären oder sekundären T315I Mutation. Abschließend lässt sich sagen, dass Proteasominhibitoren weiterhin eine moderne, vielversprechende Substanzklasse darstellen, deren Potential als Antikrebstherapien vor allem in Bezug auf hämatopoetische Neoplasien noch nicht ausgeschöpft ist und weiter untersucht werden sollte.

Literaturverzeichnis

D. A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman. 2016. "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia" *Blood* 2391-405 10.1182/blood-2016-03-643544

M. Baccarani, J. Cortes, F. Pane, D. Niederwieser, G. Saglio, J. Apperley, F. Cervantes, M. Deininger, A. Gratwohl, F. Guilhot, A. Hochhaus, M. Horowitz, T. Hughes, H. Kantarjian, R. Larson, J. Radich, B. Simonsson, R. T. Silver, J. Goldman, R. Hehlmann and L. European. 2009. "Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet" *J Clin Oncol* 6041-51 10.1200/JCO.2009.25.0779

M. Baccarani, M. W. Deininger, G. Rosti, A. Hochhaus, S. Soverini, J. F. Apperley, F. Cervantes, R. E. Clark, J. E. Cortes, F. Guilhot, H. Hjorth-Hansen, T. P. Hughes, H. M. Kantarjian, D. W. Kim, R. A. Larson, J. H. Lipton, F. X. Mahon, G. Martinelli, J. Mayer, M. C. Muller, D. Niederwieser, F. Pane, J. P. Radich, P. Rousselot, G. Saglio, S. Saussele, C. Schiffer, R. Silver, B. Simonsson, J. L. Steegmann, J. M. Goldman and R. Hehlmann. 2013. "European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013" *Blood* 872-84 10.1182/blood-2013-05-501569

A. Bertaina, L. Vinti, L. Strocchio, S. Gaspari, R. Caruso, M. Algeri, V. Coletti, C. Gurnari, M. Romano, M. G. Cefalo, K. Girardi, V. Trevisan, V. Bertaina, P. Merli and F. Locatelli. 2017. "The combination of bortezomib with chemotherapy to treat relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia of childhood" *Br J Haematol* 629-636 10.1111/bjh.14505

M. Boccadoro, G. Morgan and J. Cavenagh. 2005. "Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy" *Cancer Cell Int* 18 10.1186/1475-2867-5-18

A. Bonnet and P. Moreau. 2017. "Safety of ixazomib for the treatment of multiple myeloma" *Expert Opin Drug Saf* 973-980 10.1080/14740338.2017.1344212

D. Buac, M. Shen, S. Schmitt, F. R. Kona, R. Deshmukh, Z. Zhang, C. Neslund-Dudas, B. Mitra and Q. P. Dou. 2013. "From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond" *Curr Pharm Des* 4025-38

F. Chalmers, S. Mogre, J. Son, N. Blazanin and A. B. Glick. 2019. "The multiple roles of the unfolded protein response regulator IRE1alpha in cancer" *Mol Carcinog* 1623-1630 10.1002/mc.23031

D. Chen, M. Frezza, S. Schmitt, J. Kanwar and Q. P. Dou. 2011. "Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives" *Curr Cancer Drug Targets* 239-53

S. Chiaretti and R. Foa. 2015. "Management of adult Ph-positive acute lymphoblastic leukemia" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 406-13 10.1182/asheducation-2015.1.406

S. Chiaretti, G. Zini and R. Bassan. 2014. "Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia" *Mediterr J Hematol Infect Dis* e2014073 10.4084/MJHID.2014.073

J. Cortes, P. Rousselot, D. W. Kim, E. Ritchie, N. Hamerschlak, S. Coutre, A. Hochhaus, F. Guilhot, G. Saglio, J. Apperley, O. Ottmann, N. Shah, P. Erben, S. Branford, P. Agarwal,

A. Gollerkeri and M. Baccarani. 2007. "Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis" *Blood* 3207-13 10.1182/blood-2006-09-046888

R. Dewar, S. T. Chen, H. Yeckes-Rodin, K. Miller and R. Khosravi-Far. 2011. "Bortezomib treatment causes remission in a Ph+ALL patient and reveals FoxO as a theranostic marker" *Cancer Biol Ther* 552-8

P. T. Diamantopoulos, M. Sofotasiou, V. Papadopoulou, K. Polonyfi, T. Iliakis and N. A. Viniou. 2014. "PARP1-driven apoptosis in chronic lymphocytic leukemia" *Biomed Res Int* 106713 10.1155/2014/106713

Q. P. Dou and J. A. Zonder. 2014. "Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system" *Curr Cancer Drug Targets* 517-36

X. L. Du and Q. Chen. 2013. "Recent advancements of bortezomib in acute lymphocytic leukemia treatment" *Acta Haematol* 207-14 10.1159/000345260

S. Elmore. 2007. "Apoptosis: a review of programmed cell death" *Toxicol Pathol* 495-516 10.1080/01926230701320337

A. Esparis-Ogando, A. Alegre, B. Aguado, G. Mateo, N. Gutierrez, J. Blade, D. Schenkein, A. Pandiella and J. F. San Miguel. 2005. "Bortezomib is an efficient agent in plasma cell leukemias" *Int J Cancer* 665-7 10.1002/ijc.20793

A. Essafi, S. Fernandez de Mattos, Y. A. Hassen, I. Soeiro, G. J. Mufti, N. S. Thomas, R. H. Medema and E. W. Lam. 2005. "Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a

mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells" *Oncogene* 2317-29
10.1038/sj.onc.1208421

F. Fei, S. Stoddart, M. Muschen, Y. M. Kim, J. Groffen and N. Heisterkamp. 2010.
"Development of resistance to dasatinib in Bcr/Abl-positive acute lymphoblastic
leukemia" *Leukemia* 813-20 10.1038/leu.2009.302

A. Field-Smith, G. J. Morgan and F. E. Davies. 2006. "Bortezomib (Velcade[®]) in
the Treatment of Multiple Myeloma" *Ther Clin Risk Manag* 271-9
10.2147/tcrm.2006.2.3.271

A. K. Fielding, J. M. Rowe, G. Buck, L. Foroni, G. Gerrard, M. R. Litzow, H. Lazarus, S. M.
Luger, D. I. Marks, A. K. McMillan, A. V. Moorman, B. Patel, E. Paietta, M. S. Tallman
and A. H. Goldstone. 2014. "UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard
treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute
lymphoblastic leukemia" *Blood* 843-50 10.1182/blood-2013-09-529008

R. Foa, A. Vitale, M. Vignetti, G. Meloni, A. Guarini, M. S. De Propriis, L. Elia, F. Paoloni,
P. Fazi, G. Cimino, F. Nobile, F. Ferrara, C. Castagnola, S. Sica, P. Leoni, E. Zuffa, C.
Fozza, M. Luppi, A. Candoni, I. Iacobucci, S. Soverini, F. Mandelli, G. Martinelli, M.
Baccarani and G. A. L. W. Party. 2011. "Dasatinib as first-line treatment for adult
patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia" *Blood*
6521-8 10.1182/blood-2011-05-351403

D. O. Frank, J. Dengjel, F. Wilfling, V. Kozjak-Pavlovic, G. Hacker and A. Weber. 2015.
"The pro-apoptotic BH3-only protein Bim interacts with components of the translocase
of the outer mitochondrial membrane (TOM)" *PLoS One* e0123341
10.1371/journal.pone.0123341

A. Frisch and Y. Ofra. 2019. "How I diagnose and manage Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia" *Haematologica* 2135-2143
10.3324/haematol.2018.207506

S. Ghaffari, Z. Jagani, C. Kitidis, H. F. Lodish and R. Khosravi-Far. 2003. "Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor" *Proc Natl Acad Sci U S A* 6523-8
10.1073/pnas.0731871100

N. Gokbuget. 2018. "Treatment of Older Patients with Acute Lymphoblastic Leukaemia" *Drugs Aging* 11-26 10.1007/s40266-017-0503-5

N. Gökbuget. "Treatment recommendation of the European working group for adult ALL" in "Uni-Med Bremen" 2011,

N. Gökbuget, C. Baldus, M. Brüggemann, A. W. Hauswirth and U. Schanz. 02.2018
Periodical "Leitlinie Akute Lymphatische Leukämie (ALL) Deutsche Gesellschaft für Hämato-Onkologie (DGHO)" 2018

N. Gökbuget, M. Kneba, T. Raff, H. Trautmann, C. R. Bartram, R. Arnold, R. Fietkau, M. Freund, A. Ganser, W. D. Ludwig, G. Maschmeyer, H. Rieder, S. Schwartz, H. Serve, E. Thiel, M. Brüggemann, D. Hoelzer and L. German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic. 2012. "Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies" *Blood* 1868-76 10.1182/blood-2011-09-377713

Y. He, S. Sun, H. Sha, Z. Liu, L. Yang, Z. Xue, H. Chen and L. Qi. 2010. "Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor" *Gene Expr* 13-25

R. Hehlmann. 2012. "How I treat CML blast crisis" *Blood* 737-47 10.1182/blood-2012-03-380147

R. Hehlmann, U. Berger and A. Hochhaus. 2005. "Chronic myeloid leukemia: a model for oncology" *Ann Hematol* 487-97 10.1007/s00277-005-1039-z

W. Hiddemann. "Akute Leukämien" in "Therapie innerer Krankheiten",S.959, 1999, *Springer-Verlag, Berlin*

D. Hoelzer and N. Gökbüget. " Akute lymphatische Leukämie" in "Therapiekonzepte Onkologie",S.194, 1997, *Springer Verlag, Berlin*

M. Hoglund, F. Sandin and B. Simonsson. 2015. "Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update" *Ann Hematol* S241-7 10.1007/s00277-015-2314-2

Z. Jagani, A. Singh and R. Khosravi-Far. 2008. "FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis" *Biochim Biophys Acta* 63-84 10.1016/j.bbcan.2007.10.003

Z. Jagani, K. Song, J. L. Kutok, M. R. Dewar, A. Melet, T. Santos, A. Grassian, S. Ghaffari, C. Wu, H. Yeckes-Rodin, R. Ren, K. Miller and R. Khosravi-Far. 2009. "Proteasome inhibition causes regression of leukemia and abrogates BCR-ABL-induced evasion of apoptosis in part through regulation of forkhead tumor suppressors" *Cancer Res* 6546-55 10.1158/0008-5472.CAN-09-0605

N. Jain, K. G. Roberts, E. Jabbour, K. Patel, A. K. Eterovic, K. Chen, P. Zweidler-McKay, X. Lu, G. Fawcett, S. A. Wang, S. Konoplev, R. C. Harvey, I. M. Chen, D. Payne-Turner, M. Valentine, D. Thomas, G. Garcia-Manero, F. Ravandi, J. Cortes, S. Kornblau, S. O'Brien, S. Pierce, J. Jorgensen, K. R. Shaw, C. L. Willman, C. G. Mullighan, H. Kantarjian and M. Konopleva. 2017. "Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults" *Blood* 572-581 10.1182/blood-2016-07-726588

Z. J. Kang, Y. F. Liu, L. Z. Xu, Z. J. Long, D. Huang, Y. Yang, B. Liu, J. X. Feng, Y. J. Pan, J. S. Yan and Q. Liu. 2016. "The Philadelphia chromosome in leukemogenesis" *Chin J Cancer* 48 10.1186/s40880-016-0108-0

B. Kharabi Masouleh, E. Chevet, J. Panse, E. Jost, M. O'Dwyer, T. H. Bruemmendorf and A. Samali. 2015. "Drugging the unfolded protein response in acute leukemias" *J Hematol Oncol* 87 10.1186/s13045-015-0184-7

B. Kharabi Masouleh, H. Geng, C. Hurtz, L. N. Chan, A. C. Logan, M. S. Chang, C. Huang, S. Swaminathan, H. Sun, E. Paietta, A. M. Melnick, P. Koeffler and M. Muschen. 2014. "Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia" *Proc Natl Acad Sci U S A* E2219-28 10.1073/pnas.1400958111

A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, K. C. Anderson and L. H. Glimcher. 2003. "Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells" *Proc Natl Acad Sci U S A* 9946-51 10.1073/pnas.1334037100

T. Liu-Dumlao, H. Kantarjian, D. A. Thomas, S. O'Brien and F. Ravandi. 2012. "Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options" *Curr Oncol Rep* 387-94 10.1007/s11912-012-0247-7

Y. Liu, X. Ao, W. Ding, M. Ponnusamy, W. Wu, X. Hao, W. Yu, Y. Wang, P. Li and J. Wang. 2018. "Critical role of FOXO3a in carcinogenesis" *Mol Cancer* 104 10.1186/s12943-018-0856-3

E. E. Manasanch and R. Z. Orlowski. 2017. "Proteasome inhibitors in cancer therapy" *Nat Rev Clin Oncol* 417-433 10.1038/nrclinonc.2016.206

J. D. Melo and D. Barnes. 2007. "Chronic myeloid leukemia as model of disease evolution in human cancer" *Nature Review Cancer*

Y. H. Messinger, P. S. Gaynon, R. Sposto, J. van der Giessen, E. Eckroth, J. Malvar, B. C. Bostrom, L. Therapeutic Advances in Childhood and C. Lymphoma. 2012. "Bortezomib with chemotherapy is highly active in advanced B-precursor acute lymphoblastic leukemia: Therapeutic Advances in Childhood Leukemia & Lymphoma (TACL) Study" *Blood* 285-90 10.1182/blood-2012-04-418640

N. Mimura, M. Fulciniti, G. Gorgun, Y. T. Tai, D. Cirstea, L. Santo, Y. Hu, C. Fabre, J. Minami, H. Ohguchi, T. Kiziltepe, H. Ikeda, Y. Kawano, M. French, M. Blumenthal, V. Tam, N. L. Kertesz, U. M. Malyankar, M. Hokenson, T. Pham, Q. Zeng, J. B. Patterson, P. G. Richardson, N. C. Munshi and K. C. Anderson. 2012. "Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1alpha is a promising therapeutic option in multiple myeloma" *Blood* 5772-81 10.1182/blood-2011-07-366633

P. Moreau, H. Pylypenko, S. Grosicki, I. Karamanesht, X. Leleu, M. Grishunina, G. Rekhtman, Z. Masliak, T. Robak, A. Shubina, B. Arnulf, M. Kropff, J. Cavet, D. L. Esseltine, H. Feng, S. Girgis, H. van de Velde, W. Deraedt and J. L. Harousseau. 2011. "Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with

relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study" *Lancet Oncol* 431-40 10.1016/S1470-2045(11)70081-X

F. E. Nicolini, G. W. Basak, D. W. Kim, E. Olavarria, J. Pinilla-Ibarz, J. F. Apperley, T. Hughes, D. Niederwieser, M. J. Mauro, C. Chuah, A. Hochhaus, G. Martinelli, M. DerSarkissian, M. S. Duh, L. J. McGarry, H. M. Kantarjian and J. E. Cortes. 2017. "Overall survival with ponatinib versus allogeneic stem cell transplantation in Philadelphia chromosome-positive leukemias with the T315I mutation" *Cancer* 2875-2880 10.1002/cncr.30558

E. A. Obeng, L. M. Carlson, D. M. Gutman, W. J. Harrington, Jr., K. P. Lee and L. H. Boise. 2006. "Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells" *Blood* 4907-16 10.1182/blood-2005-08-3531

S. Okabe, T. Tauchi and K. Ohyashiki. 2010. "Establishment of a new Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell line (SK-9) with T315I mutation" *Exp Hematol* 765-72 10.1016/j.exphem.2010.04.017

K. Okazuka and T. Ishida. 2018. "Proteasome inhibitors for multiple myeloma" *Jpn J Clin Oncol* 785-793 10.1093/jjco/hyy108

F. J. Oliver, G. de la Rubia, V. Rolli, M. C. Ruiz-Ruiz, G. de Murcia and J. M. Murcia. 1998. "Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant" *J Biol Chem* 33533-9

O. Ottmann, H. Dombret, G. Martinelli, B. Simonsson, F. Guilhot, R. A. Larson, G. Rege-Cambrin, J. Radich, A. Hochhaus, A. M. Apanovitch, A. Gollerkeri and S. Coutre. 2007a. "Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with

Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study" *Blood* 2309-15
10.1182/blood-2007-02-073528

O. G. Ottmann and H. Pfeifer. 2009a. "First-line treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia in adults" *Curr Opin Oncol* S43-6
10.1097/01.cco.0000357476.43164.6b

O. G. Ottmann and H. Pfeifer. 2009b. "Management of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL)" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 371-81 10.1182/asheducation-2009.1.371

O. G. Ottmann, B. Wassmann, H. Pfeifer, A. Giagounidis, M. Stelljes, U. Duhrsen, M. Schmalzing, L. Wunderle, A. Binckebanck, D. Hoelzer and G. S. Group. 2007b. "Imatinib compared with chemotherapy as front-line treatment of elderly patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ALL)" *Cancer* 2068-76 10.1002/cncr.22631

P. G. Richardson, S. Zweegman, E. K. O'Donnell, J. P. Laubach, N. Raje, P. Voorhees, R. H. Ferrari, T. Skacel, S. K. Kumar and S. Lonial. 2018. "Ixazomib for the treatment of multiple myeloma" *Expert Opin Pharmacother* 1949-1968
10.1080/14656566.2018.1528229

K. G. Roberts, Y. Li, D. Payne-Turner, R. C. Harvey, Y. L. Yang, D. Pei, K. McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfort, M. Rusch, S. C. Chen, J. Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R. S. Fulton, J. Wen, M. Valentine, C. Cheng, S. W. Paugh, M. Devidas, I. M. Chen, S. Reshmi, A. Smith, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau, B. Vadodaria, H. Mulder, N. J. Winick, E. C.

Larsen, W. L. Carroll, N. A. Heerema, A. J. Carroll, G. Grayson, S. K. Tasian, A. S. Moore, F. Keller, M. Frei-Jones, J. A. Whitlock, E. A. Raetz, D. L. White, T. P. Hughes, J. M. Guidry Auvil, M. A. Smith, G. Marcucci, C. D. Bloomfield, K. Mrozek, J. Kohlschmidt, W. Stock, S. M. Kornblau, M. Konopleva, E. Paietta, C. H. Pui, S. Jeha, M. V. Relling, W. E. Evans, D. S. Gerhard, J. M. Gastier-Foster, E. Mardis, R. K. Wilson, M. L. Loh, J. R. Downing, S. P. Hunger, C. L. Willman, J. Zhang and C. G. Mullighan. 2014. "Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia" *N Engl J Med* 1005-15 10.1056/NEJMoa1403088

P. Rousselot, M. M. Coude, N. Gokbuget, C. Gambacorti Passerini, S. Hayette, J. M. Cayuela, F. Huguet, T. Leguay, P. Chevallier, C. Salanoubat, C. Bonmati, M. Alexis, M. Hunault, S. Glaisner, P. Agape, C. Berthou, E. Jourdan, J. Fernandes, L. Sutton, A. Banos, O. Reman, B. Lioure, X. Thomas, N. Ifrah, M. Lafage-Pochitaloff, A. Bornand, L. Morisset, V. Robin, H. Pfeifer, A. Delannoy, J. Ribera, R. Bassan, M. Delord, D. Hoelzer, H. Dombret, O. G. Ottmann and A. L. L. g. European Working Group on Adult. 2016. "Dasatinib and low-intensity chemotherapy in elderly patients with Philadelphia chromosome-positive ALL" *Blood* 774-82 10.1182/blood-2016-02-700153

M. Sengar and H. Jain. 2015. "Bortezomib-based therapy for mantle-cell lymphoma" *N Engl J Med* 2270-1 10.1056/NEJMc1504240

P. Simara, S. Stejskal, I. Koutna, D. Potesil, L. Tesarova, M. Potesilova, Z. Zdrahal and J. Mayer. 2013. "Apoptosis in chronic myeloid leukemia cells transiently treated with imatinib or dasatinib is caused by residual BCR-ABL kinase inhibition" *Am J Hematol* 385-93 10.1002/ajh.23419

J. L. Snead, T. O'Hare, L. T. Adrian, C. A. Eide, T. Lange, B. J. Druker and M. W. Deininger. 2009. "Acute dasatinib exposure commits Bcr-Abl-dependent cells to apoptosis" *Blood* 3459-63 10.1182/blood-2007-10-113969

C. Soldani and A. I. Scovassi. 2002. "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update" *Apoptosis* 321-8 10.1023/a:1016119328968

K. Takahashi, T. Inukai, T. Imamura, M. Yano, C. Tomoyasu, D. M. Lucas, A. Nemoto, H. Sato, M. Huang, M. Abe, K. Kagami, T. Shinohara, A. Watanabe, S. Somazu, H. Oshiro, K. Akahane, K. Goi, J. Kikuchi, Y. Furukawa, H. Goto, M. Minegishi, S. Iwamoto and K. Sugita. 2017. "Anti-leukemic activity of bortezomib and carfilzomib on B-cell precursor ALL cell lines" *PLoS One* e0188680 10.1371/journal.pone.0188680

M. Talpaz, N. P. Shah, H. Kantarjian, N. Donato, J. Nicoll, R. Paquette, J. Cortes, S. O'Brien, C. Nicaise, E. Bleickardt, M. A. Blackwood-Chirchir, V. Iyer, T. T. Chen, F. Huang, A. P. Decillis and C. L. Sawyers. 2006. "Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias" *N Engl J Med* 2531-41 10.1056/NEJMoa055229

B. A. Teicher and J. E. Tomaszewski. 2015. "Proteasome inhibitors" *Biochem Pharmacol* 1-9 10.1016/j.bcp.2015.04.008

T. Terwilliger and M. Abdul-Hay. 2017. "Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update" *Blood Cancer J* e577 10.1038/bcj.2017.53

T. H. Tran and M. L. Loh. 2016. "Ph-like acute lymphoblastic leukemia" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 561-566 10.1182/asheducation-2016.1.561

M. Vieri, C. Preisinger, M. Schemionek, A. Salimi, J. B. Patterson, A. Samali, H. B. T, I. Appelman and B. Kharabi Masouleh. 2020. "Targeting of BCR-ABL1 and IRE1alpha induces synthetic lethality in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia" *Carcinogenesis* 10.1093/carcin/bgaa095

F. M. Wang, Y. J. Chen and H. J. Ouyang. 2011. "Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation" *Biochem J* 245-52 10.1042/BJ20101293

F. Zhang, S. S. Lau and T. J. Monks. 2012. "A dual role for poly(ADP-ribose) polymerase-1 during caspase-dependent apoptosis" *Toxicol Sci* 103-14 10.1093/toxsci/kfs142

7 Anhang

7.1.1 zusätzliche Abbildungen

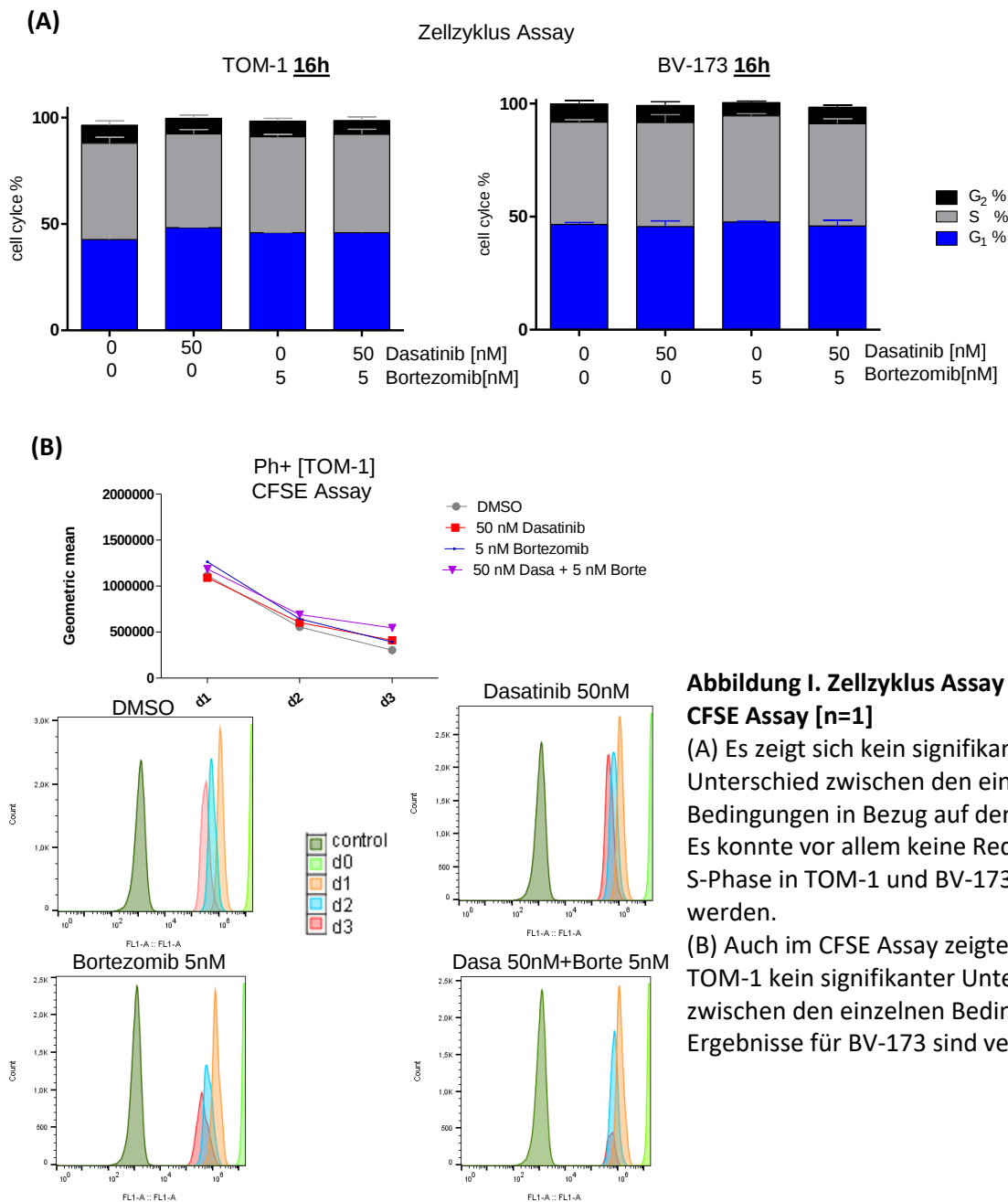


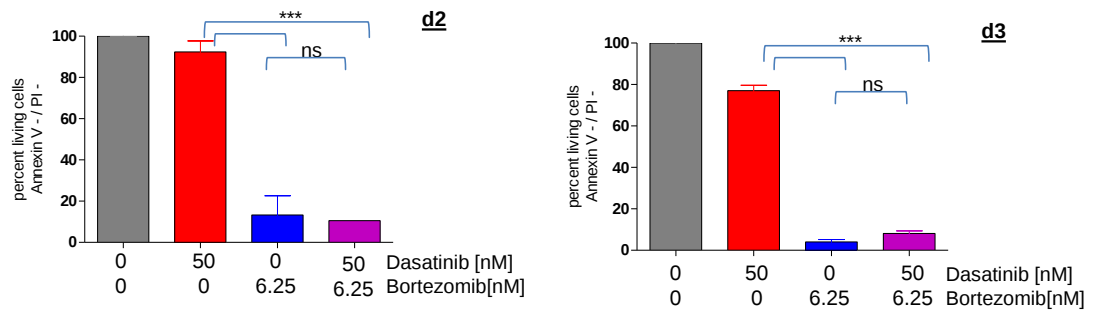
Abbildung I. Zellzyklus Assay [n=1] und CFSE Assay [n=1]

(A) Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen in Bezug auf den Zellzyklus. Es konnte vor allem keine Reduktion der S-Phase in TOM-1 und BV-173 detektiert werden.

(B) Auch im CFSE Assay zeigte sich bei TOM-1 kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Bedingungen, die Ergebnisse für BV-173 sind vergleichbar.

Apoptose Staining
[BV-173] Annexin V/PI Staining

A



B

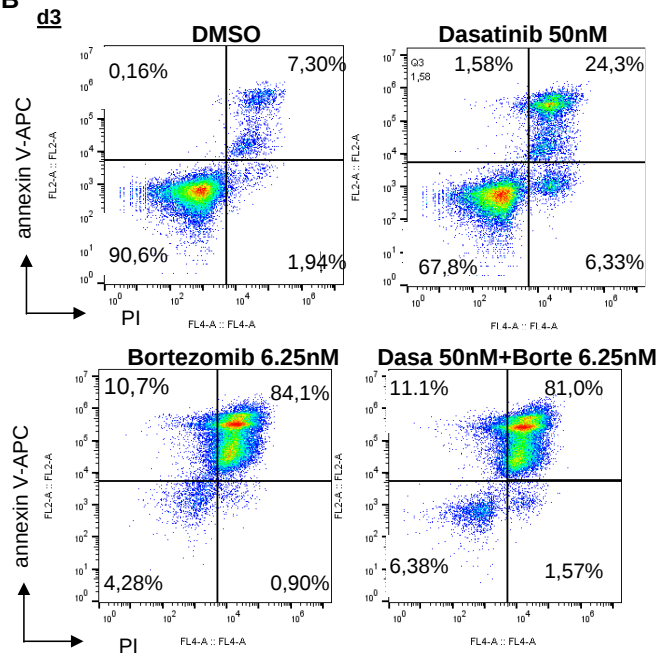


Abbildung I. Messung der Apoptose mittels Annexin V/ PI Staining BV-173 [n=2]

(A) Ph⁺ BV-173: Die Apoptose im Annexin V/ PI Staining wurde an d2 und d3 jeweils [n=2] detektiert. Bortezomib alleine als auch in Kombination mit Dasatinib führt zu starker Apoptose.

(B) Unter Dasatinib 50nM, Bortezomib 6,25nM befanden sich an d3 81% in später Apoptose (Annexin V+/PI+) und 1.57% in früher Apoptose (Annexin V+/PI-)

Apoptose Staining
[TOM-1] Annexin V/PI staining

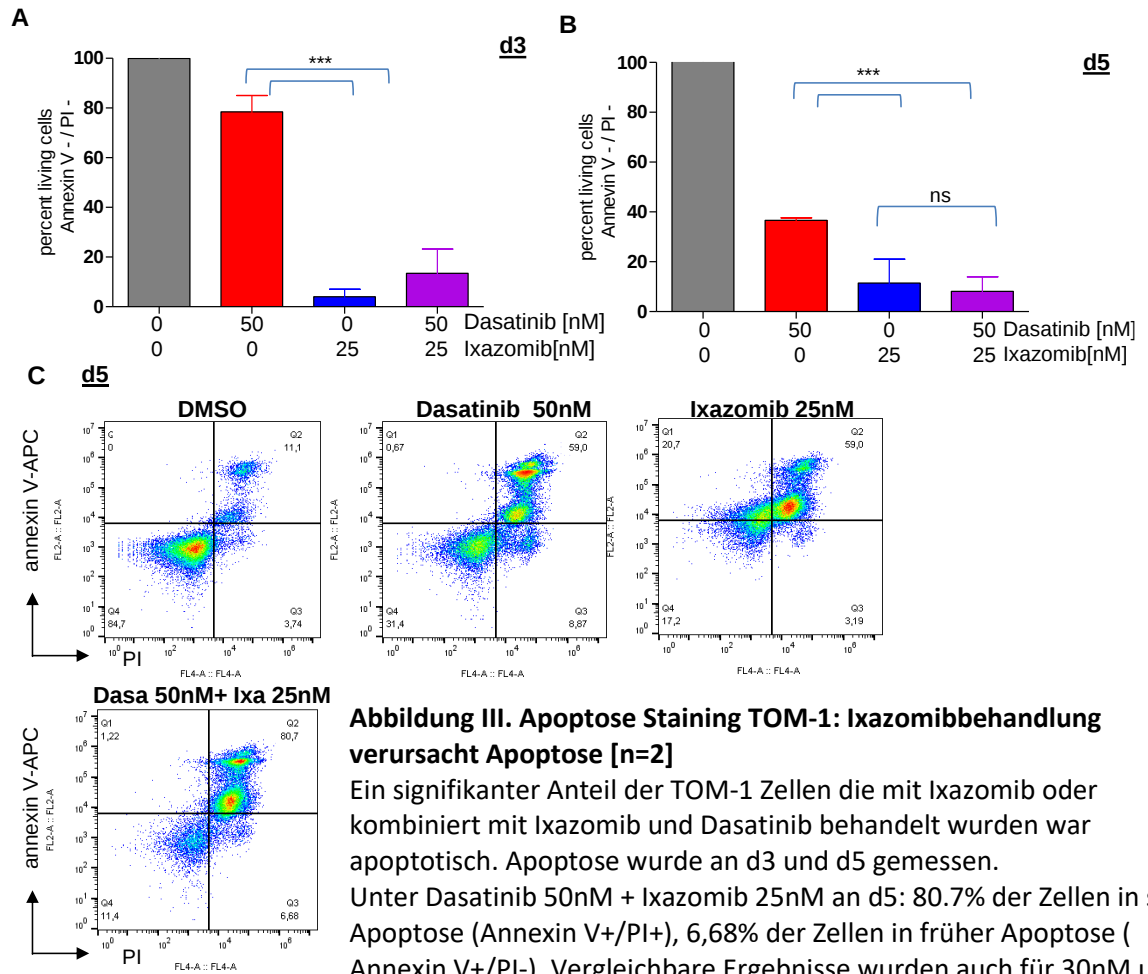


Abbildung III. Apoptose Staining TOM-1: Ixazomibbehandlung verursacht Apoptose [n=2]

Ein signifikanter Anteil der TOM-1 Zellen die mit Ixazomib oder kombiniert mit Ixazomib und Dasatinib behandelt wurden war apoptotisch. Apoptose wurde an d3 und d5 gemessen.

Unter Dasatinib 50nM + Ixazomib 25nM an d5: 80.7% der Zellen in später Apoptose (Annexin V+/PI+), 6,68% der Zellen in früher Apoptose (Annexin V+/PI-), Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für 30nM und 35nM an d3 und d5 erzielt [n=2].

p-Werte wurden mittels one-way ANOVA kalkuliert, ein *p*-Wert kleiner als 0.05 wurde für alle Analysen als statistisch signifikant festgelegt. (*,*p*<0.05, **,*p*<0.01, ***,*p*<0.001)

7.1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 schematische Darstellung der Pathogenese der ALL	1
Abbildung 2 Therapie der ALL	8
Abbildung 3. Phasen der CML	9
Abbildung 4. intrazelluläre Reaktionswege und Proteine, die durch Bortezomib beeinflusst werden	13
Abbildung 5. Bestimmung der IC50 für Bortezomib	30
Abbildung 6. Dosisfindung mittels Zellviabilitätsassay	31
Abbildung 7. TOM-1: Die Behandlung mit Bortezomib alleine oder in Kombination mit Dasatinib führt zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität	33
Abbildung 8. BV-173: Die Behandlung mit Bortezomib alleine oder in Kombination mit Dasatinib führt zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität	34
Abbildung 9. Zellviabilitätsassay TOM-1 und BV-173 mit niedriger Bortezomibdosierung	36
Abbildung 10. Bortezomibbehandlung verursacht Apoptose	38
Abbildung 11. Bestimmung der IC50 für Ixazomib	39
Abbildung 12. Die Behandlung mit Ixazomib alleine oder in Kombination reduziert die Zellviabilität. Kein antagonistischer Effekt in der kombinierten Gabe zu detektieren	41
Abbildung 13. TOM-1: Ixazomib einzeln oder in Kombination mit Dasatinib reduziert Zellviabilität signifikant	43
Abbildung 14. Apoptose Staining: Ixazomibbehandlung verursacht Apoptose	44
Abbildung 15. Westernblot Resultate nach 16h Bortezomib	47
Abbildung 16. Westernblot Resultate nach 16h Ixazomib	48
Abbildung 17. qPCR Ergebnisse: Dasatinibtherapie steigert TRAIL Expression, Proteasominhibitoren beeinflussen den UPR	50
Abbildung 18. REH und RS4;11: Behandlung mit Bortezomib und Ixazomib	52
Abbildung I. Zellzyklus Assay und CFSE Assay	72
Abbildung II. Messung der Apoptose mittels Annexin V/ PI Staining BV-173	73
Abbildung III. Apoptose Staining TOM-1: Ixazomibbehandlung verursacht Apoptose	74

7.1.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Symptome der ALL	3
Tabelle 2. Einteilung ALL nach WHO und GMALL	4
Tabelle 3. Negative Prognosefaktoren GMALL 07/2013	5
Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Chemikalien	16
Tabelle 5. Auflistung der verwendeten Kits	17
Tabelle 6. Auflistung der verwendeten Antikörper	17
Tabelle 7. Auflistung der verwendeten Primer	17
Tabelle 8. Auflistung der verwendeten Medikamente	18
Tabelle 9. Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen	18
Tabelle 10. Auflistung des verwendeten Zellkultur Medium und Lösungen	18
Tabelle 11. Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 12. Auflistung der verwendeten Geräte	19
Tabelle 13. Verwendete Zelllinien	21
Tabelle 14. verwendete Dosierungen und logarithmische Auftragung	30
Tabelle 15. rechnerisch ermittelte IC50 Werte Bortezomib	30
Tabelle 16. rechnerisch ermittelte IC50 Werte Ixazomib	39

8 Danksagung

Ich möchte mich an erster Stellen ganz herzlich bei Iris Appelmann bedanken, sie hat mich von Beginn der Arbeit immer unterstützt und motiviert und hat mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich bewundere, wie es Iris gelingt in der Klinik, in der Forschung und in der Familie Hochleistung zu bringen und sie ist mir ein echtes Vorbild geworden. Ohne Iris wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank geht vor allem an Azam und Margherita, die mich herzlich in das Team aufgenommen haben und die immer, egal wann ein offenes Ohr für mich hatten und mich tatkräftig im Labor unterstützt haben. Ihr wart wirklich klasse.

Vielen Dank auch an Marlene, die ebenfalls eine sehr große Hilfe war, vor allem bei der Durchführung der gezeigten qPCR Ergebnisse.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Mirle Schemnionek bedanken, die mit ihren Ideen und Anregungen die vorliegende Arbeit unterstützt hat. Herzlichen Dank auch an Herrn Professor Koschmieder für die Supervision der vorliegenden Arbeit.

Ein Dankeschön auch an das gesamte Labor Team des MTZs, ihr seid eine tolle Gemeinschaft und ich bin trotz mancher Frustrationen jeden Tag gerne ins Labor gekommen und habe die Arbeit sehr genossen.

Mein letzter und wichtigster Dank geht an meine Eltern und meine Familie, ohne euch wäre ich nicht der Mensch, der ich heute bin und ohne eure große Unterstützung und Motivation meinen Traum von der Medizin zu verwirklichen, hätte ich es nicht geschafft.

Vielen Dank.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei
meiner Betreuerin,

Dr. med. Iris Appelman, Klinik für Hämatologie, Onkologie, Hämostaseologie und
Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Aachen,

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

*Hiermit erkläre ich, **Saskia Maletzke** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Die duale Hemmung der BCR-ABL1 Kinase und des Proteasoms als neuer Therapieansatz in der BCR-ABL positiven Akuten***

Lymphatischen Leukämie “ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

	Doktorandin Saskia Maletzke	Prakt. Betreuerin Iris Appelmann	Assistenten Margherita Vieri Azam Salimi	MTA Kema Marlene Schröder	Doktorvater Steffen Koschmieder	Summe (%)
Konzeption	10	90				100
Datenauswertung	100					100
Durchführung der Experimente (s.o.)	90		5	5		100
Statistische Auswertung	90		10			100
Bereitstellung von Materialien		100				100
Interpretation der Datenauswertung	60	20	10		10	100
Durchführung der qPCR Experimente	10			90		100

Hier ggf. auch Experimente oder statistische Auswertungen aufführen, die nicht selbstständig gemacht, sondern von den entsprechenden Personen übernommen wurden.

Unterschrift der Doktorandin Saskia Maletzke

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau Saskia Maletzke

Unterschrift des Doktorvaters Prof. Steffen Koschmieder