

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Medizinische Klinik II
Direktor: Prof. Dr. med. H. Serve

„Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch neue SRC-Kinase-Inhibitoren“

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Wencke Hofmann
aus Schmalkalden

Frankfurt am Main
Juni 2008

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 „Molecular Targeted Therapy (MTT) als eine neue Strategie in der Entwicklung antineoplastischer Substanzen	7
1.2 SRC-Kinasen sind hervorragende Targetmoleküle für eine spezifische, antineoplastische Therapie	9
1.2.1 Definition, allgemeine Funktion, molekularer Aufbau, Regulation und Vorkommen der SRC-Kinasen	9
1.2.2 Spezielle Funktionen der SRC-Kinasen in der Regulation von Zellprogression, Zelldifferenzierung, Apoptose und weiterer, für die Tumorgenese bedeutsamer Vorgänge am Beispiel hämatopoetischer Zellen	12
1.2.3 Rolle der Expression und Aktivierung der SRC-Kinasen in malignen Erkrankungen	15
1.2.4 Therapeutisches Potential der SRC-Kinase-Inhibitoren	16
1.2.5 AZD0530 – ein potenter und hoch spezifischer SRC-/Abl-Kinase-Inhibitor	16
1.3 Bedeutung der Apoptose für die Aufrechterhaltung der Gewebs-homöostase und ihre Bedeutung in der Tumorgenese	18
1.3.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose	19
1.3.2 Mitochondrialer Weg der Apoptose und Bcl-2 Familie	20
1.3.3 Inhibitoren der Apoptose	21
1.3.4 Bedeutung von Par-4 und Daxx als proapoptotische Moleküle	22
1.4 Fragestellung	23
2. Materialien und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Zelllinien	25
2.1.2 Substanzen zur Herstellung des Kulturmediums	25
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Puffer und Lösungen	26
2.1.5 Antikörper zur Western Blot Analyse	28
2.1.6 Chemotherapeutika	30
2.1.7 Caspasenaktivitätsassays und Caspaseninhibition	30
2.1.8 Antikörper zur Immunphänotypisierung	31
2.1.9 Sonstige Reaktionskits	31
2.1.10 Geräte	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Kultivierung der Zellen und Zellzahlbestimmung	32
2.2.2 Apoptoseinduktion durch SRC-Kinase-Inhibitoren	32
2.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V	32
2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1	35

2.2.5	Zellzyklusanalyse	35
2.2.6	Immunphäotypisierung	36
2.2.7	Bestimmung der Caspasenaktivität der Caspasen-3, -6, -7, -8, -9	37
2.2.8	Inhibition der Caspasenaktivität	38
2.2.9	Extraktion und Quantifizierung von Protein für die Western Blot Analyse	38
2.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine	39
2.2.11	Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression	40
3.	Ergebnisse	42
3.1	SRC-Kinase-Inhibitoren induzieren Apoptose in B-Zell-Lymphomzellen	42
3.2	SRC-Kinase-Inhibitoren führen zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials in der Responderzelllinie DOHH-2	44
3.3	Immunphäotypisierung der sechs lymphatischen Zelllinien	45
3.4	SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zu einem prozentualen Anstieg der Zellen in der G0/G1 Phase und zu einer prozentualen Abnahme der Zellen in der S-Phase	46
3.5	Im Vergleich mit nicht entarteten Leukozyten zeigen die Lymphomzelllinien ein dereguliertes Expressionsmuster der SRC-Kinasen	48
3.6	Lck, Lyn und Fyn sind die Haupteffektor-SRC-Kinasen der getesteten SRC-Kinase-Inhibitoren	50
3.6.1	SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Dephosphorylierung von Lck-Tyr505 und Lyn-Tyr507 sowohl in den Responder- als auch in den Nonresponderzelllinien	50
3.6.2	SRC-Kinase-Inhibitoren führen nur in den Responderzelllinien zu einer Downregulation der SRC-Kinase Fyn	51
3.7	Die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose erfolgt Caspasen-abhängig	53
3.7.1	SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zur Spaltung von PARP	53
3.7.2	SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zu einer Aktivierung von Initiator- und Exekutorcaspasen	54
3.7.3	In den mit SRC-Kinase-Inhibitoren behandelten Zellen bewirkt die simultane Zugabe von Pancaspase-Inhibitor den nahezu vollständigen Abbruch der Apoptose	56
3.8	SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Downregulation von Bcl-xl und zu einer Aktivierung von Bid	57

3.9	Responder- und Nonresponderzelllinien unterscheiden sich bezüglich ihrer Grundexpression von Bcl-2 und Bcl-xl	57
3.10	SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zu einer Downregulation von Survivin, cIAP-1 und c-Flip	59
3.11	Die im Zellkern lokalisierten Proteine Daxx, Par-4 und Zip-Kinase werden nicht oder nur geringfügig durch SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst	61
3.12	SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Downregulation von Rb, während die Expression von p53 unbeeinflusst bleibt	63
3.13	SRC-Kinase-Inhibitoren führen in Responderzelllinien zu einer Downregulation von c-Abl und zu einer Abnahme der Akt-Phosphorylierung	64
3.14	Responderzelllinien exprimieren deutlich weniger c-Myc als Nonresponderzelllinien	66
4.	Diskussion	67
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literaturverzeichnis	84
	Ehrenwörtliche Erklärung	91
	Danksagungen	92
	Lebenslauf	93

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Molekularer Aufbau der SRC-Kinasen am Beispiel von Lyn	10
Abbildung 2: Vorkommen der SRC-Kinasen in gesunden Leukozyten	12
Abbildung 3: Signaltransduktionskaskade am M-CSF- und G-CSF-Rezeptor	14
Abbildung 4: Chemische Strukturformel von AZD0530	17
Abbildung 5: Extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg	21
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung der Apoptoserate mit Annexin V	34
Abbildung 7: Apoptoseraten lymphatischer Zelllinien in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen SRC-Kinase-Inhibitors	43
Abbildung 8: Anteil der DOHH-2-Zellen mit depolarisiertem MMP in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen SRC-Kinase-Inhibitors	44
Abbildung 9: Ergebnisse der Immunphänotypisierung	45
Abbildung 10: Ergebnisse der Zellzyklusanalyse	47
Abbildung 11: Western Blot Analyse der basalen Expression der SRC-Kinasen in den lymphatischen Zellen	49
Abbildung 12: Proteinexpression der SRC-Kinasen in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	52
Abbildung 13: Proteinexpression von PARP und gespaltenem PARP in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	53
Abbildung 14: Enzymaktivitäten der Caspasen -8, -9, -3, -7 und -6 in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	55
Abbildung 15: Apoptoseraten in unbehandelten und mit SRC-Kinase-Inhibitor behandelten DOHH-2-Zellen bei Koinkubation mit verschiedenen Caspase-Inhibitoren	56
Abbildung 16: Proteinexpression der Bcl-2 Familie in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	58
Abbildung 17: Proteinexpression der IAP's in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	60
Abbildung 18: Proteinexpression von Daxx, Par-4 und Zip-Kinase in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	62
Abbildung 19: Proteinexpression von p53 und Rb in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	63

Abbildung 20: Proteinexpression von c-Abl, p-Abl, Akt und p-Akt in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	65
Abbildung 21: Proteinexpression von Ras und c-Myc in unbehandelten und mit AZD0424 behandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen	66
Abbildung 22: Molekulare Mechanismen der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose	79

1. EINLEITUNG

Die Entstehung von Tumoren geht auf Mutationen in Genen zurück, welche an der Kontrolle der Zellteilung, der Zelldifferenzierung oder des programmierten Zelltodes (Apoptose) in Körperzellen beteiligt sind. In der Regel ist die maligne Transformation der Zelle nicht die Folge einer einzelnen Mutation. Sie beruht vielmehr auf der Mutation mehrerer Gene, die dann zusammen zum Versagen der Zellwachstums- und Zelleliminationskontrolle führen. Solche Gene, die für die Steuerung des Zellwachstums essentiell sind, werden in ihrer nicht-mutierten Form als Protoonkogene bezeichnet. Deren mutierte Formen, die ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt sind, werden als Onkogene bezeichnet. Dem gegenüber stehen die so genannten Tumorsuppressorgene, welche die Entwicklung eines Tumors, zum Beispiel über die Synthese von DNS-Reparatur-Enzymen, hemmen können.

Somit beruhen Tumorerkrankungen auf genetischen Defekten, die entweder zu einer Schädigung eines Protoonkogens oder eines Tumorsuppressorgens führen. Dabei gilt, je mehr Gendefekte vorhanden sind, desto höher ist der Malignitätsgrad des entsprechenden Tumors und desto mehr Möglichkeiten hat dieser, Resistenzen gegen eingesetzte Chemotherapeutika zu entwickeln.

1.1 „Molecular Targeted Therapy“ (MTT) als eine neue Strategie in der Entwicklung antineoplastischer Substanzen

Konventionelle Zytostatika wie Alkylantien, Antimetabolite oder Anthracyclin-Derivate hemmen das Zellwachstum unselektiv. Eine relative Selektivität auf das Tumorgewebe wird nur durch die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen erreicht: so wirken konventionelle Zytostatika nur gegen den proliferierenden Zellpool (Wachstumsfraktion) (1). Dies bedingt zum einen, dass insbesondere bei niedrig-malignen Tumoren, die nur eine geringe Zellteilungsrate besitzen, bislang nur unzureichende Therapieerfolge zu verzeichnen sind. Zum anderen schädigen alle konventionellen Zytostatika auch gesunde Gewebe, insbesondere die so genannten Wechselgewebe wie Knochenmark, Keimdrüsen, Schleimhäute und Haarwurzeln, die durch hohen Zellumsatz gekennzeichnet sind (2). Schwere Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression oder intestinale Schleimhautschädigung erhöhen Morbidität und Mortalität und begrenzen so den dosisabhängigen Wirkungserfolg dieser Therapeutika.

Intensive Forschungen auf dem Gebiet antineoplastischer Wirkstoffe verfolgen deshalb ein neues Ziel: die Entwicklung eines spezifischen Therapeutikums, welches nur den entarteten Zellklon angreift und die gesunden Zellen unbeeinflusst lässt (3, 4). Ermöglicht wird dies durch die intensive Untersuchung molekularer Mechanismen, die ursächlich an der Pathogenese der entarteten Zellen beteiligt sind, mit dem Ziel, „tumorspezifische“ Schlüssel-moleküle zu identifizieren, die als Targetmoleküle einer spezifisch auf die Tumorzelle abgestimmten Therapie dienen. Man erhofft sich durch diese maßgeschneiderten Therapien neben einer nebenwirkungsarmen Behandlung auch die Möglichkeit, Resistenzen gegen konventionelle Zytostatika zu überwinden, die in der derzeitigen Therapie hauptverantwortlich für das dauerhafte Ausbleiben des Heilungserfolges sind (3).

Eine Vielzahl fehlregulierter, molekularer Mechanismen, die durch Veränderungen in der Signaltransduktionskaskade zu unkontrolliertem Zellwachstum oder gestörter Apoptose führen, sind bereits aufgedeckt und zahlreiche Forschungen bemühen sich jetzt um die Entwicklung von Substanzen, die diese ursächlichen Defekte gezielt antagonisieren können.

Imatinib als Paradebeispiel für eine tumorspezifische Therapie

Die erste Substanz, die in Rahmen der MTT-Therapie entwickelt und erfolgreich in der Behandlung der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt wurde, ist Imatinib (früher auch als STI 571 = signal transduction inhibitor 571 bezeichnet, *Glivec*® von Novartis, Basel). Bei über 90% der Patienten mit CML ist das charakteristische Philadelphia-Chromosom mit der Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ nachzuweisen. Diese Translokation führt zur Fusion des Breakpoint-Cluster-Region (BCR) Gens auf Chromosom 22 mit dem normalerweise auf Chromosom 9 gelegenen c-Abl Gen. Das dadurch entstandene Fusionsgen wird als Bcr-Abl Gen bezeichnet und codiert für eine deregulierte, konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase, die verantwortlich für das fehlregulierte Zellwachstum des transformierten Zellklons ist (5). Imatinib hemmt selektiv die Bcr-Abl-Tyrosinkinase, indem es kompetitiv an die Adenosin-Tri-Phosphat- (ATP) Bindungsstelle der Tyrosinkinase bindet und so deren konstitutive Aktivierung antagonisiert und über die fehlende Phosphorylierung von proliferationsstimulierenden Proteinen zum Zellsterben führt (6, 7). 95% der Patienten, die in der chronischen Phase mit Imatinib behandelt werden, erreichen eine hämatologische Remission, und 50% dieser Patienten erreichen sogar eine komplette zytogenetische Remission (8, 9). Damit ist Imatinib ein exzellenter Vertreter der neuen MTT - Substanzen, und zeigt beispielhaft, dass diese Substanzen in der Behandlung maligner Erkrankungen ein großes Potential besitzen und mit ihnen eine dauerhafte Heilung erreicht werden kann.

1.2 SRC-Kinasen sind hervorragende Targetmoleküle für eine spezifische, antineoplastische Therapie

SRC-Kinasen gehören ebenso wie die durch Imatinib gehemmte Bcr-Abl-Kinase zur großen Gruppe der Tyrosinkinase. Diese haben entscheidende Aufgaben in der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose (10). Damit stellen sie zunächst theoretisch potentielle Protoonkogene dar. Eine Vielzahl von Untersuchungen belegt, dass sie in malignen Erkrankungen tatsächlich dereguliert sind (11). Damit sind sie optimale Angriffsmoleküle für eine spezifische Tumorthherapie.

Im Folgenden werden ihr Vorkommen, ihre Funktionen in der Signaltransduktion der Zelle und ihr therapeutisches Potential näher besprochen.

1.2.1 Definition, allgemeine Funktion, molekularer Aufbau, Regulation und Vorkommen der SRC-Kinasen

Die Entdeckung und anschließende, intensive Untersuchung der SRC-Kinasen begann nach der Identifizierung des viralen SRC Gens (v-SRC) als wichtiges Onkogen im Rous-Sarkom-Virus, welches bei Hühnern einen Bindegewebstumour, das Rous-Sarkom, hervorruft (10-13). Auf der Suche nach der Herkunft dieses Onkogens stellte man fest, dass auch gesunde Zellen dieses Gen exprimieren.

Definition und allgemeine Funktion

SRC-Kinasen gehören zu den intrazellulären Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (10). Als Tyrosinkinase katalysieren sie die Übertragung von Phosphatgruppen aus Adenosin-Triphosphat (ATP) auf bestimmte Zielproteine und beeinflussen so fundamental verschiedene intrazelluläre Signalwege (13,14).

In humanen Zellen besteht die Familie der SRC-Kinasen aus bisher neun bekannten Mitgliedern: Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Fgr, Lyn, Blk und Yrk (10). Die Zugehörigkeit zu einer Familie wird durch Strukturhomologien und durch gemeinsame Regulationsmechanismen ihrer Kinaseaktivität definiert.

Molekularer Aufbau

Alle SRC-Kinasen lassen sich in vier funktionelle Abschnitte gliedern (siehe Abbildung 1). Ausgehend vom N-terminalen Ende des Moleküls sind das die so genannte „unique region“, die Src-Homologie-Domänen 3 (SH3) und 2 (SH2) und die am C-terminalen Ende gelegene katalytische Domäne. Die „unique region“ ist der Molekülbereich, der für jede SRC-Kinase sequenzvariabel beschaffen ist. Am N-Terminus binden Myristinsäure-Reste, die der Verankerung der Kinasen in der Plasmamembran dienen und sie damit in räumliche Nähe zu ihren dortigen Interaktionspartnern bringen. Die SH3 und SH2 Domänen sind bedeutsam für Protein-Protein-Interaktionen. Da diese Domänen zuerst in den SRC-Kinasen entdeckt wurden, sie aber auch in vielen anderen Proteinkinasen zu finden sind, ist der Terminus SH eine Abkürzung für SRC Homologie. Die SH3 Domäne bindet an prolinreiche Aminosäuresequenzen. Sie ermöglicht so eine Anlagerung weiterer, in der Signaltransduktionskaskade nachgeschalteter Proteine. Zusätzlich kann hier über die Bindung molekuleigener, prolinreicher Sequenzen die Kinaseaktivität negativ reguliert werden. Diese beiden Funktionen sind auch für die SH2 Domäne zutreffend, nur bindet diese mit hoher Affinität an phosphorylierte Tyrosinreste. Über diese werden die Funktionen der SRC-Kinasen in der Weiterleitung Rezeptor-vermittelter Signale zum Zellkern erfüllt (siehe 1.2.2). Die katalytische Domäne beinhaltet die ATP-Bindungsstelle, eine Autophosphorylierungsstelle, an welcher sich das Enzym selbst phosphorylieren und so aktivieren kann und einen C-terminalen Tyrosinrest, der bedeutsam für die negative Regulierung der Kinaseaktivität ist (16,17).

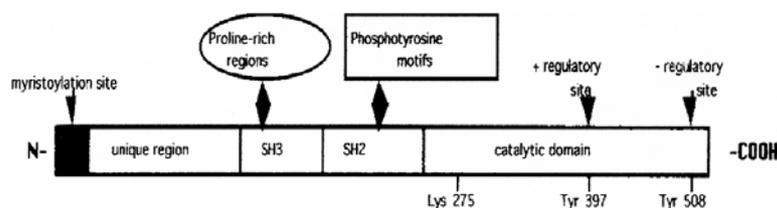


Abbildung 1 (aus (15)): Molekularer Aufbau der SRC-Kinasen am Beispiel von Lyn: vom N-terminalen Ende sind folgende Regionen dargestellt: die Myristinsäure-Bindungsstelle, die „unique region“, die SH3 Domäne mit ihren Bindungspartnern, die SH2 Domäne mit ihren Bindungspartnern und die katalytische Domäne mit der ATP-Bindungsstelle an Lys 275, der Autophosphorylierungsstelle an Tyr 397 zur positiven Regulation und der C-terminale Tyrosinrest Tyr 508 zur negativen Regulation der Kinaseaktivität.

Regulation der Aktivität der SRC-Kinasen

Die enzymatische Aktivität der SRC-Kinasen kann durch zwei Mechanismen in Form von posttranslationaler Phosphorylierung gesteuert werden. Durch eine Autophosphorylierung, in der Regel an einen in der katalytischen Domäne befindlichen Tyrosinrest, aktiviert sich das Enzym selbst. Dabei handelt es sich um eine positive Regulation: ist dieser Tyrosinrest phosphoryliert, ist das Enzym aktiv. Eine negative Regulation erfolgt über einen weiter C-terminal gelegenen Tyrosinrest. Ist dieser durch Csk-Kinasen (Csk = C-terminale SRC Kinase) phosphoryliert worden, befindet sich das Enzym im inaktivierten Zustand. Hierbei bindet die SH3 Domäne an prolinreiche Sequenzen der SH2 Domäne und blockiert so das katalytische Zentrum. Eine Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosinrestes kann durch verschiedene Phosphatasen erfolgen, zum Beispiel durch die CD45 Phosphatase, und somit eine Aktivierung der SRC-Kinase hervorrufen (15, 16, 19).

In gesunden Zellen sind die SRC-Kinasen sehr genau reguliert und nur transient aktiviert. Das bedeutet, dass sie die meiste Zeit im inaktivierten Zustand vorliegen und nicht katalytisch aktiv sind. Nur wenn sie im Rahmen der Signaltransduktionskaskade gebraucht werden, werden sie kurzzeitig aktiviert. Mutationen in allen Bereichen, die für eine negative oder positive Regulation der SRC-Kinasen bedeutsam sind, können zu einer konstitutiven Aktivierung führen und so ihr transformierendes Potential freisetzen (siehe 1.2.3) (15, 17).

Vorkommen

Einige SRC-Kinasen wie Src, Fyn und Yes sind in nahezu allen Geweben nachzuweisen, zum Teil werden sogar verschiedene Isoformen durch alternatives Splicing exprimiert. Andere SRC-Kinasen kommen nur in ausgewählten Geweben vor. So sind Hck, Fgr, Lyn, Blk, Lck vorwiegend in hämatopoetischen Zellen zu finden (10, 14). Auch in diesen existieren sehr unterschiedliche Expressionsmuster. So findet man Hck (Hematopoietic cell kinase) ausschließlich in myeloischen Zellen. Lymphozyten der B-Zell-Reihe exprimieren große Mengen von Blk (B lymphocyte kinase), während Lck nur in T-Lymphozyten nachzuweisen ist. Lyn ist sowohl in myeloischen Zellen als auch in B-Lymphozyten zu finden (15).

Da man von einem abweichenden Expressionsmuster der SRC-Kinasen in entarteten Zellen auf eine Deregulation dieser schließen kann, ist im Folgenden eine Tabelle aufgeführt, die das Expressionmuster der SRC-Kinasen in ausgewählten, gesunden Leukozyten aufzeigt (16).

	Src	Fyn	Yes	Lck	Hck	Fgr	Lyn	Blk	Yrk
T-Lymphozyten	-	+	-	+	-	-	-	-	-
B-Lymphozyten	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Neutrophile Granulozyten	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Eosinophile Granulozyten	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Monozyten	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Thrombozyten	+	+	-	-	-	-	+	-	+

Abbildung 2 (aus (16)): Vorkommen der SRC-Kinasen in gesunden Leukozyten: nicht entartete T-Lymphozyten exprimieren lediglich die SRC-Kinasen Fyn und Lck und nicht entartete B-Lymphozyten exprimieren lediglich die SRC-Kinasen Fyn, Fgr, Lyn, Blk und Yrk.

1.2.2 Spezielle Funktionen der SRC-Kinasen in der Regulation von Zellprogression, Zelldifferenzierung, Apoptose und weiterer, für die Tumorgenese bedeutsamer Vorgänge am Beispiel hämatopoetischer Zellen

Die meisten zellulären Prozesse werden über verschiedene, an der Plasmamembran lokalisierte, Wachstumsfaktoren reguliert. Diese rekrutieren und aktivieren Mitglieder der SRC-Kinasen, die dann als Signalverstärker fungieren: sie leiten die Signale zu verschiedenen Kompartimenten der Zelle weiter und wirken so an der Regulation von Zell-Zell-Kontakten, Zell-Matrix-Kontakten, Tumoradhäsion und -invasion, Angiogenese, Zelldifferenzierung, Migration, Immunreaktion, Zellproliferation und Zelltod mit (15, 17, 19).

Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose

Da in Tumorerkrankungen diese drei zellulären Prozesse primär gestört sind, wird der Einfluss der SRC-Kinasen auf molekulare Vorgänge beispielhaft an diesen Vorgängen erklärt. Zellproliferation und -differenzierung werden durch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren initiiert. Wachstumsfaktoren sind entweder Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die eine eigene Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen oder Tyrosin-Kinase-assoziierte Rezeptoren, die eine externe Tyrosinkinase rekrutieren. Zu den erstgenannten Rezeptoren zählen der M-CSF-Rezeptor (M-CSF = macrophage colony-stimulating factor), der EGF-Rezeptor (EGF = epidermal growth factor) und der PDGF-Rezeptor (PDGF = platelet-derived growth factor). An zweitgenannte Rezeptoren binden vorrangig Zytokine (Interleukin -2, -3, -6) aber auch G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptoren mit anschließender Tyrosinphosphorylierung. Diese

phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Andockstellen für eine Reihe von nachgeschalteten Proteinen mit SH2 Domäne, unter ihnen die Mitglieder der SRC-Familie (siehe Abbildung 3) (15). Diese werden aktiviert und katalysieren weitere Phosphorylierungen an nachgeschalteten Proteinen. So werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden gestartet, die alle zur Transkription von Genen führen, die Zellwachstum und Zellteilung induzieren und die Apoptose unterdrücken (15). Diese intrazellulären Signalwege fasst man auch unter dem Schlagwort „Main Mitogenic Pathways“ zusammen. An allen sind aktivierte SRC-Kinasen beteiligt. Im Einzelnen sind das unter anderen folgende Kaskaden:

- 1) Der SRC > Grb2 > Sos > Ras > Raf > MEK > Map-Kinase-Signalweg. Über diesen Weg führt die SRC-Kinase Lyn zur G-CSF-induzierten Proliferation in Leukozyten (17).
- 2) Der SRC > Cbl > Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) > Akt > Bad > Bcl-2/Bcl-xl-Signalweg. Über diesen Weg können die SRC-Kinasen Lyn und Hck über eine Aktivierung von Akt und Bad zu einer Freisetzung von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie führen und somit eine Unterdrückung des programmierten Zelltodes bewirken (siehe 1.3.2) (15, 17, 18).
- 3) SRC-Kinasen sind beteiligt am JAK-STAT-Signalweg (JAK = just another kinase, STAT = signal transducers und activators of transcription), welcher unter anderem die Zytokin-induzierte Differenzierung hämatopoetischer Zellen steuert (15).
- 4) SRC-Kinasen triggern die Zerstörung von Abi, einem Inhibitor der c-Abl-Kinase und können so zur deregulierten Aktivierung der Abl-Kinase mit gesteigertem Zellwachstum führen (20).
- 5) SRC-Kinasen können über die Aktivierung von STAT3 und STAT5 den Zellzyklus vorantreiben, indem sie die Synthese von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und D2 und c-Myc initiieren, die die Passage des G1 / S-Restriktionspunktes im Zellzyklus ermöglichen (14, 20, 21). Ebenso sind sie für die Passage des G2 / M-Restriktionspunktes erforderlich (10).

Alle Kaskaden führen zur Transkription von Genen, die Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung fördern. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Zielmoleküle nie nur über einen Weg erreicht werden. Vielmehr werden sie über verschiedenste Interaktionen zwischen den Signalkaskaden aktiviert oder inaktiviert. So kann c-Myc auch über 1) oder über eine Interaktion mit Akt aktiviert werden (22), und die Hochregulation von antiapoptotischen Bcl-xl kann auch über 5) erfolgen (14, 20).

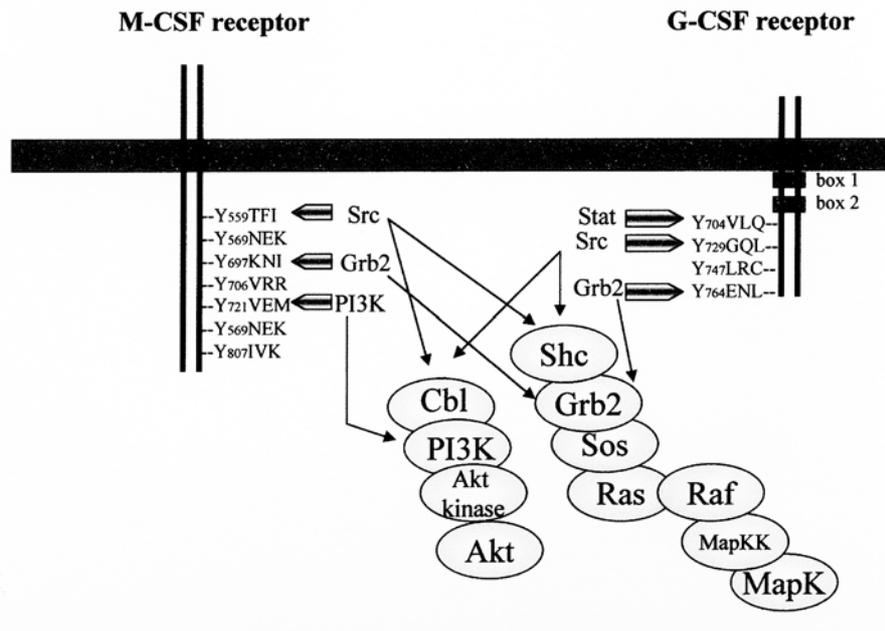


Abbildung 3 (aus (15)): Dargestellt sind Signaltransduktionskaskaden am M-CSF-Rezeptor, der zu den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört und am G-CSF-Rezeptor, der zu den Tyrosin-Kinase-assoziierten Rezeptoren gehört. Nach Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptoren mit anschließender Tyrosinphosphorylierung, so dass SRC-Kinasen mit ihrer SH2 Domäne an ihnen andocken können. Im Folgenden werden wie hier dargestellt zum Beispiel der SRC > Cbl > Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) > Akt-Kinase - Signalweg initiiert oder der SRC > Shc > Grb2 > Sos > Ras > Raf > Map-Kinase - Signalweg, welche dann zur Transkription von Genen führen, die Zellprogression induzieren und Apoptose unterdrücken.

Weitere Funktionen der SRC-Kinasen

Die in Lymphozyten vorkommenden SRC-Kinasen, insbesondere die SRC-Kinase Lyn, sind auch an der B- und T-Zell-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion beteiligt, die in der Expression von Genen für die Regulation der Immunantwort (B- und T-Zellproliferation und -differenzierung, Immunglobulinproduktion) resultiert (23). Des Weiteren sind die SRC-Kinasen an der Stabilisierung des Zytoskeletts und an der Arrangierung bestimmter Zelladhäsionsmoleküle beteiligt (10, 17, 24). So beeinflussen sie Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte. Dies sind entscheidende Vorgänge für infiltrierendes Tumorwachstum und Metastasierung.

1.2.3 Rolle der Expression und Aktivierung der SRC-Kinasen in malignen Erkrankungen

In gesunden Zellen sind SRC-Kinasen die meiste Zeit im inaktivierten Zustand und werden nur transient aktiviert, wenn sie für ihre Aufgaben in oben besprochenen Signaltransduktionskaskaden für Zellwachstum und Mitose benötigt werden (24).

Hingegen konnte gezeigt werden, dass SRC-Kinasen in vielen malignen Erkrankungen überexprimiert sind, und ihre Kinaseaktivität im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich gesteigert ist (14). So ist die SRC-Kinaseaktivität beim Mammakarzinom 4-20fach und beim Kolonkarzinom 5-8fach erhöht (20). Vergleichbares gilt für das Pankreaskarzinom (25). Für die SRC-Kinasen Lyn und Src wurde eine für das Tumorwachstum entscheidende Bedeutung in Prostatakarzinomzellen beschrieben (26). Für die SRC-Kinasen Hck und Lyn wurde eine gesteigerte Aktivität während leukämischen Zellwachstums nachgewiesen (27, 28). Dies veranlasst zu der Hypothese, dass SRC-Kinasen in malignen Erkrankungen konstitutiv aktiviert sind, und infolgedessen Zellwachstums- und Zellteilungsprozesse im gesteigerten Maß unterhalten werden. Ursächlich dafür kommen Mutationen in allen Bereichen in Frage, die die SRC-Kinaseaktivität regulieren (siehe 1.2.1) (24). So wurde im Rous-Sarkom-Virus ein Fehlen des negativ regulierenden C-terminalen Endes des SRC-Moleküls nachgewiesen (20). Weiterhin wurde in einigen, fortgeschrittenen Kolonkarzinomen ein mutiertes SRC Gen (SRC 531) beschrieben (20). An der konstitutiven Aktivierung der SRC-Kinasen können auch reduzierte Proteinmengen der Csk-Kinasen oder gesteigerte Proteinmengen der Phosphatasen ursächlich beteiligt sein.

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die steigenden Enzymaktivitäten mit dem Stadium der Erkrankung, dem Metastasierungsgrad und somit dem Outcome (schlechte Prognose) korrelieren (20, 29, 30, 33). Eine gesteigerte Aktivität der SRC-Kinasen führt zur Zerstörung Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte (127) und damit zur Begünstigung eines invasiven Tumorwachstums. So fand man in Kolonkarzinommetastasen die höchsten Level von SRC-Kinaseaktivitäten (128, 129).

- SRC-Kinasen sind in malignen Erkrankungen überexprimiert und ihre Aktivität ist um ein Vielfaches gesteigert. Damit tragen sie ursächlich zur Pathogenese der Tumorerkrankungen bei.
- Gesteigerte Aktivitäten der SRC-Kinasen führen zu einem invasiven Tumorwachstum und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

1.2.4 Therapeutisches Potential der SRC-Kinase-Inhibitoren

Eine Reihe von SRC-Kinase-Inhibitoren wurde bereits *in vitro* getestet. So konnte mit der Substanz PP2 [4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo(3,4-d)pyrimidine] gezeigt werden, dass sie in menschlichen MTC-Zellen (MTC = medullary thyroid cancer) antiproliferative Wirkung besitzt (31), die Chemosensitivität bisher resistenter, menschlicher Pankreasadenokarzinomzellen steigert (33) und das invasive Tumorwachstum in Kolonkarzinomzellen reduziert (34). Mit der Substanz AZM 475271 lies sich *in vivo* eine Reduktion von Tumolvolumen erreichen (14).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SRC-Kinase-Inhibitoren sowohl „downstream-Targets“ von Imatinib als auch die eigentlichen Imatinib-Targetmoleküle *c*-Abl-, Bcr-Abl- und *c*-Kit-Tyrosinkinase hemmen können (35) und so Möglichkeiten bieten, die zunehmende Resistenz von CML-Zellen gegenüber Imatinib zu überwinden (36). So konnte mit verschiedenen SRC-Kinase-Inhibitoren (unter anderen PP1, PD180970 und CGP76030) ein Ansprechen Imatinib-resistenter Zellen *in vitro* nachgewiesen werden (37-40).

Auch in B-Zell-Leukämiezellen konnte mit dem Einsatz von SRC-Kinase-Inhibitoren (PP2 und SU6656) Apoptose induziert werden (32, 89).

1.2.5 AZD0530 – ein potenter und hoch spezifischer SRC-/Abl-Kinase-Inhibitor

Die in dieser Dissertation getesteten Substanzen (AZD0424, AZD0530, AZM559756) zählen zur Gruppe der neu entwickelten C-5-substituierten (Benzodioxolylamino) Quinazolin-Analoga (126).

Diese besitzen eine hohe Affinität und Spezifität für die Tyrosin-Kinase-Domänen der SRC- und Abl-Kinasen, über deren Bindung sie die Enzyme inhibieren (126). In Mausfibroblasten (Zelllinie NIH 3T3), die mit konstitutiv aktivierten *c*-SRC transfiziert wurden, konnte bei Einsatz nanomolarer Konzentrationen eine Abnahme der Enzymaktivität der SRC-Kinase sowie eine Reduktion der Zellproliferation erreicht werden (126). Auch *in vivo* konnte durch Einsatz von AZD0530 eine Reduktion von Tumolvolumen erzielt werden (126). Aufgrund dieser antiproliferativen Wirkung *in vitro* und *in vivo*, der guten Pharmakokinetik und oralen Applizierbarkeit wird AZD0530 gegenwärtig in klinischen Studien bei verschiedenen Tumorentitäten getestet (126).

Informationen zu detaillierten strukturellen Eigenschaften und Wirkmechanismus waren nur für die Substanz AZD0530 [N-(5-Chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amin] öffentlich erhältlich (126).

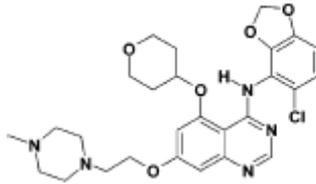


Abbildung 4 (aus (126)): Dargestellt ist die chemische Strukturformel von AZD0530.

1.3 Bedeutung der Apoptose für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und ihre Bedeutung in der Tumorgenese

Apoptose (griech. apoptein = von Bäumen herabfallende Blätter) ist ein physiologischer Prozess, der den Organismus befähigt, alte, geschädigte, überzählige oder potentiell gefährliche Zellen unter Schonung des umliegenden Gewebes zu eliminieren. Man bezeichnet Apoptose auch als programmierten Zelltod, da es sich um einen geordneten, genetisch festgelegten, energieverbrauchenden Mechanismus handelt. Dieser ermöglicht dem Organismus, im Zuge von Wachstum und Differenzierung ein Gleichgewicht zwischen ständig erforderlicher Zellerneuerung und Zelleliminierung aufrecht zu erhalten.

Die Identifizierung der Apoptose als eine Form des Zelltodes, die sich wesentlich von der Nekrose unterscheidet, erfolgte durch Kerr und Wyllie 1972 (41). Das wichtigste Unterscheidungskriterium zur Nekrose ist das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion nach erfolgreicher Eliminierung der Zelle. So kommt es im Verlauf der Apoptose zu spezifischen, morphologischen Zellveränderungen. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und die DNS wird in charakteristisch große Fragmente gespalten. Des Weiteren kommt es zum Zerfall des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und zum Verlust der Zellmembranasymmetrie: Phospholipide wie Phosphatidylserin, die in der gesunden Zelle nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert sind, sind jetzt auch auf der Außenseite der Membran zu finden. Danach erfolgt die Abschnürung kleiner, membranumschlossener Vesikel, die man auch als „apoptotic bodies“ bezeichnet. Diese können von rekrutierten Makrophagen problemlos abgebaut werden. Da während des gesamten Vorgangs im Gegensatz zur Nekrose die Plasmamembran intakt bleibt und kein Zytoplasma austritt, erfolgt auch keine Entzündungsreaktion und umliegendes Gewebe wird nicht geschädigt (41-43).

Intensive Forschungen zur Tumorgenese haben gezeigt, dass neben einer fehlgesteuerten Zellproliferation und -differenzierung primär auch Störungen in der Induktion oder dem Ablauf der Apoptose in der Pathogenese maligner Erkrankungen entscheidend sind (44, 45). Des Weiteren sind diese Störungen auch ursächlich an der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen alle Arten von bisher eingesetzten Chemotherapeutika beteiligt. So wird die apoptoseinduzierende Wirkkomponente von Zytostatika zunehmend bedeutungsvoller in der Therapie maligner Erkrankungen. Die Identifikation der in entarteten Zellen veränderten, molekularen Mechanismen des Apoptoseprozesses bietet die Möglichkeit, diese mit tumorspezifischen Substanzen zu beheben und dauerhafte Heilung zu erreichen.

1.3.1 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Der Rezeptor-vermittelte Weg der Apoptose wird auch als extrinsischer Apoptoseweg bezeichnet, da er über die Bindung eines externen, spezifischen Liganden an spezielle Todesrezeptoren der Plasmamembran initiiert wird. Diese Todesrezeptoren gehören zu der Familie der TNF-Rezeptoren (TNF = Tumor Necrosis Factor). Zu den Bekanntesten zählen der CD95- (Apo-1 / Fas-) (46) und der TRAIL-Rezeptor. Diese Rezeptoren werden auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers und auf vielen Tumorzellen exprimiert. Für einige Zytostatika wurde nachgewiesen, dass deren apoptoseinduzierende Wirkung über eine Interaktion mit dem CD95-Rezeptor erfolgt.

Durch Bindung des entsprechenden Liganden oder agonistischer Antikörper an die Todesrezeptoren erfolgt zunächst eine Trimerisierung der Todesrezeptoren. Dies führt auf zytoplasmatischer Seite zur Aggregation verschiedener Adaptermoleküle, die den so genannten DISC = death inducing signaling complex bilden (47). Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung der Procaspase-8 an den DISC und deren Aktivierung zur Caspase-8, der eigentlichen Initiatorcaspase des extrinsischen Apoptoseweges. Die Caspasen sind wichtige Schlüsselmoleküle in der Apoptosekaskade (48). Es sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein besitzen und ihre Substrate spezifisch nach der Aminosäure Aspartat spalten. Deshalb bezeichnet man sie als Cystein-Aspartasen, oder in der Kurzform als Caspasen (49). Sie werden als inaktive Zymogene (Procaspasen) gebildet, die durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form überführt werden. Man unterteilt sie in Initiator- und Exekutorcaspasen. Initiatorcaspasen stehen am Beginn einer Kaskade und führen zur Aktivierung nachgeschalteter, so genannter Exekutorcaspasen. Die bekanntesten Exekutorcaspasen sind Caspase-3, -6 und -7 (50). Deren Hauptaufgabe ist die Spaltung spezifischer Funktionsproteine der Zelle, die man auch als Todessubstrate bezeichnet, und deren Verlust zum irreversiblen Tod der Zelle führt. So spalten sie Strukturproteine wie Lamin und Aktin, was im Zusammenbruch von Kernlamina und Zytoskelett resultiert. Weiterhin führen sie zur DNS-Fragmentierung, zur Proteolyse von DNS-Reparaturenzymen wie PARP = Poly-ADP-Ribose-Polymerase (51) und zur Spaltung von Zellzyklusregulatoren wie Rb-Protein (Rb = Retinoblastom) (52).

So führt die aktivierte Initiatorcaspase-8 im weiteren Verlauf der Rezeptor-vermittelten Apoptose zur Aktivierung der Exekutorcaspasen mit nachfolgender, sukzessiver Eliminierung der Zelle. Aktivierte Caspase-8 kann aber auch durch Spaltung des Bcl-2 Mitgliedes Bid den mitochondrialen Weg der Apoptose initiieren (53).

1.3.2 Mitochondrialer Weg der Apoptose und Bcl-2 Familie

Der mitochondriale Weg wird auch als intrinsischer Apoptoseweg bezeichnet, da er nicht durch einen externen Liganden, sondern durch intrazelluläre Signale ausgelöst wird. Diese bewirken eine Änderung der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP). So kann aktivierte Caspase-8 das Molekül Bid so spalten, dass es ein hydrophobes, C-terminales Ende bekommt (tBid = truncated Bid). Infolgedessen transloziert es vom Zytoplasma in die Mitochondrienmembran und führt so zur Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (53).

Dieser Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt zur Freisetzung von Cytochrom-c, AIF (Apoptosis Inducing Factor) und anderen Proteinen aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma. Cytochrom-c und AIF bilden anschließend mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) das im Zytoplasma gelegene Apoptosom (43, 54). Jetzt kommt es zur Rekrutierung von Procaspase-9 an das Apoptosom und zu deren Aktivierung zur Caspase-9 (55). Damit ist Caspase-9 die Initiatorcaspase des mitochondrialen Weges der Apoptose. Sie führt jetzt zur Aktivierung nachgeschalteter Exekutorcaspasen.

Die Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose wird maßgeblich durch die Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert. Man unterscheidet antiapoptotisch (Bcl-2, Bcl-xl) und proapoptotisch (Bax, Bid, Bak, Bad, Bcl-xS) wirksame Mitglieder (56). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Expressionsstärke als auch das Interaktionsverhalten der Einzelmoleküle entscheidend sind für den Ablauf der Apoptose (57). Diese können Homo- und Heterodimere bilden, und durch das mengenmäßige Überwiegen der anti- oder proapoptotischen Fraktion entscheiden, ob das mitochondriale Membranpotential beeinträchtigt wird und so die Zelle durch programmierten Zelltod zugrunde geht oder nicht.

Das antiapoptotische Protein Bcl-2 ist das am besten untersuchte Mitglied der Bcl-2 Familie. Ursprünglich entdeckt wurde es als Onkogen in folliculären B-Zell-Lymphomen, das als Folge einer chromosomalen Translokation in diesen überexprimiert wird und durch seine antiapoptotische Wirkung zu einer verlängerten Überlebenszeit der Zellen beiträgt (58). Auch in anderen malignen Erkrankungen (Non-Hodgkin-Lymphome, Akute Lymphatische Leukämie, solide Tumoren) wird es verstärkt exprimiert und dient als negativer Prognosemarker (59). Im Gegensatz dazu erwies sich das proapoptotische Mitglied Bax als positiver Prognosemarker maligner Erkrankungen (60, 61). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 auch ursächlich an der Resistenz maligner Zellen gegenüber verschiedener Chemotherapeutika beteiligt ist (62).

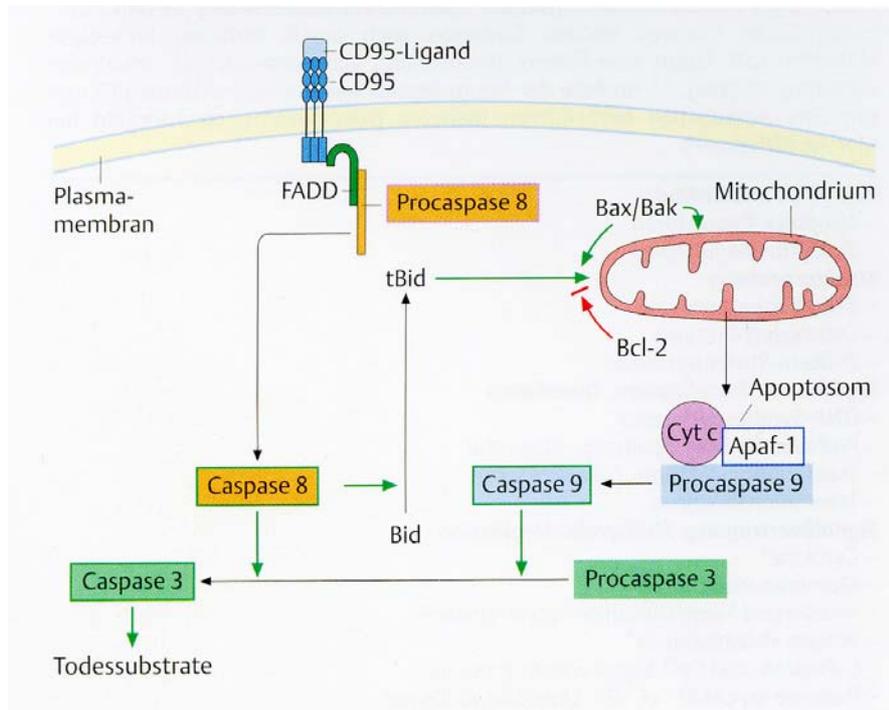


Abbildung 5 (aus (125)): Dargestellt sind der extrinsische und der intrinsische Apoptoseweg: beim extrinsischen Weg kommt es nach CD95-Ligandenbindung an den CD95-Rezeptor zur Trimerisierung der Rezeptoren mit nachfolgender Aktivierung der Initiatorcaspase-8 aus Procaspase-8. Aktivierte Caspase-8 führt einerseits zur Aktivierung nachgeschalteter Effektorcaspasen wie Caspase-3 und andererseits zur Spaltung von Bid in truncated Bid (tBid), welches dann über Interaktionen mit den Bcl-2-Proteinen Bax, Bak und Bcl-2 selbst die Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials bewirkt. Im Folgenden wird Cytochrom-c (Cyt c) in das Zytoplasma freigesetzt, welches dann mit Apaf-1 das Apoptosom bildet. Jetzt kommt es zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 aus Procaspase-9 mit weiterer Aktivierung der Exekutorcaspasen. Exemplarisch ist hier die Aktivierung von Caspase-3 aus Procaspase-3 dargestellt, die dann entsprechende Todessubstrate bildet.

1.3.3 Inhibitoren der Apoptose

Neben den antiapoptischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie gibt es noch weitere Proteine, die hemmend auf apoptotische Signale wirken. Einerseits gibt es die Gruppe der FLICE-inhibierenden Proteine, zu denen c-Flip gehört (c-Flip = cellular FLICE inhibitory protein, dabei ist FLICE der ursprüngliche Name von Caspase-8). Sie verhindern die Apoptose, indem sie die Rekrutierung von Procaspase-8 in den DISC und deren Aktivierung zu Caspase-8 verhindern (43, 63). Andererseits gibt es die Familie der IAP's (Inhibitors of Apoptosis Proteins), deren Hauptaufgabe ebenso die Inhibition verschiedener Caspasen ist (64, 65). Zu dieser Familie gehören folgende Mitglieder: XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), cIAP-1, cIAP-2 und Survivin. XIAP ist der potenteste Inhibitor und vermag die Hemmung von Caspase-3, -7 und -9. Für XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 wurde eine Downregulation während der Zytostatika-induzierten Apoptose beschrieben (66). Ebenso wurde die Expression einiger IAP-Mitglieder in malignen Erkrankungen als prognostisch bedeutsam bewertet (67).

1.3.4 Bedeutung von Par-4 und Daxx als proapoptotische Moleküle

Das Par-4 Gen (Prostate-Apoptosis-Response-Gene-4) ist ein proapoptotisches Gen, das 1994 erstmals in apoptotischen Prostatazellen beschrieben wurde (68, 69). Es wird in einer Vielzahl normaler und neoplastischer Zellen exprimiert. Eine wichtige Funktion von Par-4 ist seine apoptosesensibilisierende Wirkung in Zellen, die unter dem Einfluss apoptoseinduzierender Stimuli stehen. Die alleinige Expression von Par-4 ohne die Anwesenheit apoptoseinduzierender Substanzen ist nicht ausreichend, um die Zellen in Apoptose zu führen. Eine mögliche Erklärung für die proapoptotische Wirkung von Par-4 nach Apoptosestimulus ist die Beobachtung, dass in Fibroblasten- und Prostatakarzinomzellen eine Überexpression von Par-4 zu einer verringerten Expression von antiapoptotischen Bcl-2 führt (70). Diese gegenläufige Expression von Par-4 und Bcl-2 wurde auch in lymphatischen Zelllinien und in ex vivo Zellen von Patienten mit ALL (Akute Lymphatische Leukämie) nachgewiesen (71). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression von Par-4 neoplastische Lymphozyten gegenüber der proapoptotischen Wirkung von Zytostatika (Doxorubicin und Cytosin-Arabinosid) sensibilisiert und zu höheren Apoptoseraten führt (72). Als ursächliche Mechanismen konnten die Downregulation von Bcl-2, die gesteigerte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und die gesteigerte Aktivität der Caspasen identifiziert werden. Weiterhin wurde für Par-4 eine Tumorsuppressorfunktion beschrieben, da es in der Lage ist, die transformatorische Wirkung von Ras über eine Verminderung der Transkriptionsaktivität von NF- κ B zu antagonisieren (73, 74).

Par-4 konnte ebenso wie Daxx (Death Associated Protein) als Bestandteil der PML Nuclear Bodies nachgewiesen werden (75). Dies sind im Zellkern lokalisierte Proteinaggregate, die sich über das Vorhandensein von PML-Protein (Promyelozyten Leukämie Protein) definieren und wichtige Funktionen in der Regulation von Apoptose und Zellzyklus übernehmen. Kawai et al vermuten, dass es einen neuen Apoptoseweg gibt, der über diese im Zellkern befindlichen Moleküle vermittelt wird (76). So konnte gezeigt werden, dass Par-4 die Bindung des proapoptotischen Moleküls Daxx an die Zip-Kinase in den PML Nuclear Bodies verstärkt und somit die Apoptoseraten steigert (76). Für Daxx konnten weitere proapoptotische Mechanismen identifiziert werden, darunter eine hypothetische Interaktion mit dem CD95-Rezeptor (77-79). Des Weiteren steigert die Überexpression von Daxx in T-lymphoblastischen Jurkatzellen die Apoptoseraten nach Rezeptor-induzierter (Fas / TRAIL) und Zytostatika-induzierter Apoptose (80, 81). Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die eine antiapoptotische Wirkung von Daxx vermuten lassen (82).

1.4 Fragestellung

Der Behandlungserfolg maligner Erkrankungen mit konventionellen Chemotherapeutika wird durch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten infolge schwerer Nebenwirkungen und aufgrund einer zunehmenden Resistenzentwicklung gegen das jeweils eingesetzte Mittel limitiert. Zusätzlich wirken konventionelle Chemotherapeutika bei Tumoren mit einer niedrigen Proliferationsrate nur unzureichend. Diese werden daher bislang in erster Linie mit palliativer Zielsetzung therapiert. Ein Beispiel dafür sind niedrig-maligne Non-Hodgkin Lymphome, für die bis heute noch keine kurative Behandlung existiert. Auch in der Behandlung der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL), die zur Gruppe der Non-Hodgkin Lymphome zählt und die die häufigste Leukämie des Erwachsenenalters darstellt, gibt es bis heute außer durch die allogene Knochenmarkstransplantation noch keine echten Heilungschancen. Pathophysiologisches Korrelat stellt für beide Erkrankungen nachgewiesenermaßen primär die Störung der Induktion oder des Ablaufs des programmierten Zelltodes dar, welche nicht durch konventionelle Chemotherapeutika antagonisierbar sind (83, 84).

SRC-Kinase-Inhibitoren gehören zur neuen Gruppe der „Molecular Targeted Therapy“ und haben in vitro und in vivo großes antiproliferatives und apoptoseinduzierendes Potential sowohl bei soliden Tumoren als auch bei hämatologischen Neoplasien gezeigt. Sie hemmen sowohl typische Imatinib-Targetmoleküle wie Bcr-Abl und c-Kit, als auch typische „downstream-Targets“ von Imatinib. Deshalb konnten sie schon erfolgreich zur Behandlung Imatinib-resistenter CML-Zellen in vitro eingesetzt werden (36-40). Dasatinib (*Sprycel*®), ein dualer SRC-/Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor, erzielte hohe hämatologische und zytogenetische Remissionsraten in Patienten mit Imatinib-resistenter CML oder Philadelphia-Chromosom-positiver ALL (Akuter Lymphatischer Leukämie) (85-88). Weitere Beobachtungen messen den SRC-Kinasen große Bedeutung in der Pathogenese hämatologischer Neoplasien zu: Contri et al beschrieben, dass die SRC-Kinase Lyn in B-CLL-Zellen überexprimiert und konstitutiv aktiviert ist und so zur gestörten Apoptose in diesen Zellen beitragen kann (89). Dos Santos et al wiesen eine abnorme Verteilung der SRC-Kinase Lyn in AML Zellen (Akute Myeloische Leukämie) nach (90).

Alle diese Feststellungen veranlassten dazu, in dieser Arbeit die neuen SRC-Kinase-Inhibitoren AZM559756, AZD0530 und AZD0424 bezüglich ihrer apoptoseinduzierenden Wirkung in verschiedenen Bcr-Abl negativen Lymphom- und Leukämiezellen zu untersuchen, mit dem Ziel herauszufinden, ob sie eine neue Therapieoption in der Behandlung

von Lymphomen im Rahmen der MTT-Therapie darstellen und damit Anlass geben, auch für diese niedrig-malignen Tumorerkrankungen bald eine kurative Therapie zu ermöglichen. Dabei sollten folgende Fragestellungen als Leitlinien dienen:

- 1) Induzieren SRC-Kinase-Inhibitoren Apoptose in Bcr-Abl negativen Lymphomzelllinien?
- 2) Welche Apoptosewege (extrinsisch, intrinsisch) werden dabei aktiviert?
- 3) Inwieweit wird der Zellzyklus durch eine Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst?
- 4) Zeigen die Lymphomzelllinien ein normales oder dereguliertes Expressionsmuster der SRC-Kinasen?
- 5) Welche SRC-Kinasen werden maßgeblich durch die Behandlung mit den Inhibitoren beeinflusst?
- 6) Welche apoptoserelevanten Moleküle (Bcl-2 Familie, IAP's, Par-4, Daxx) werden maßgeblich durch die Behandlung beeinflusst?
- 7) Wie unterscheiden sich Responder- und Nonresponderzelllinien bezüglich der basalen Expression bestimmter Proteine voneinander?
- 8) Kommt es durch die Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren zu vergleichbaren, molekularen Veränderungen wie durch andere apoptoseinduzierende Zytostatika?

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in den Versuchen verwendet:

- | | |
|--------------|-----------------|
| • DOHH-2 | B-Zell Lymphom |
| • WSU-NHL | B-Zell Lymphom |
| • Jurkat | T-Zell Leukämie |
| • Karpas-299 | T-Zell Lymphom |
| • Raji | Burkitt-Lymphom |
| • HUT 78 | T-Zell Lymphom |

Die ersten fünf Zelllinien wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) erworben. Die Zelllinie HUT 78 (91) wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Ruthardt, Abteilung für Hämatologie, Universität Frankfurt am Main, erhalten.

2.1.2 Substanzen zur Herstellung des Kulturmediums

RPMI 1640	Gibco, Paisley, GB
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco, Paisley, GB
L-Glutamin	Gibco, Paisley, GB
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Paisley, GB

2.1.3 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat Kristallin (APS)	Sigma, Deisenhofen
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bromphenol Blue Na-salt	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg

Carnation Nonfat Dry Milk	Nestle, Solon, USA
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem, Darmstadt
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Glycerol	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
JC-1	Alexis Biochemicals, Gruenberg
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Riedel de Haenn, Seelze
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, Paisley, GB
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Carsbad, USA
Sodium Dodecylsulfate (SDS)	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris Base)	USB, Cleveland, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco, Paisley, GB
Tween 20	Serva, Feinbiochemica, Heidelberg
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung

1g Ammoniumpersulfat Kristalin

10ml H₂O dest.

Blocking-Puffer

5g Carnation Nonfat Dry Milk

100ml TBST

Bromphenolblau

0,1g Bromphenol Blue Na-salt

100ml H₂O dest.

Coomasie-Blau-Lösung

1g Coomasie Brilliant Blue R250

180ml H₂O dest.

180ml Methanol

40ml Essigsäure 100%

p-Coumarinsäure-Stammlösung

90mM in DMSO (entspricht 0,296g in 20ml DMSO)

Destain-Lösung

600ml H₂O dest.

300ml Methanol

100ml Essigsäure 100%

Enhanced Chemoluminescence (ECL)-1-Lösung

1,0ml Luminol-Stammlösung

0,44ml p-Coumarinsäure-Stammlösung

10ml Tris HCl 1,0M pH 8,5

mit H₂O dest. auf 100ml auffüllen

Enhanced Chemoluminescence (ECL)-2-Lösung

64µl Wasserstoffperoxid 30%

10ml Tris HCl 1,0M pH 8,5

mit H₂O dest. auf 100ml auffüllen

Elektrophoresepuffer 10x

30,2g Tris Base

144g Glycin

50ml SDS 20%

mit H₂O dest. auf 1000ml auffüllen

JC-1-Lösung

5mg JC-1

5ml Methanol

Luminol-Stammlösung

250mM in DMSO (entspricht 2,214g in 50ml DMSO)

Lysispuffer

1,5ml Tris HCl 1,0M pH 6,8

3,0ml SDS 20%

3,0ml Glycerol 100%

19,5ml H₂O dest.

TBST 10x

50ml Tris HCl 2,0M pH 8

300ml Natriumchlorid 5M

645ml H₂O dest.

5ml Tween 20

Transferpuffer

14,4g Glycin

3,0g Tris Base

200ml Methanol

mit H₂O dest. auf 1000ml auffüllen

2.1.5 Antikörper zur Western Blot Analyse

Angegeben ist jeweils die entsprechend eingesetzte Verdünnungsstufe des Antikörpers für die Western Blot Analyse. Als Lösungsmittel wurde TBST 1x verwendet.

Primäre Antikörper

Akt 1	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
p-Akt 1 (Ser473)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

c-Abl	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Phospho-c-Abl (Tyr245)	1:250	Cell Signaling Technology
Bad	1:500	BD Biosciences Pharmingen
Bak	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Bcl-2	1:1000	DAKO Glostrup, Dänemark
Bcl-x _{S/L}	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Bid	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Blk	1:500	Cell Signaling Technology
Caspase-3	1:750	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Caspase-6	1:500	BD Biosciences Pharmingen
Caspase-7	1:500	BD Biosciences Pharmingen
Caspase-8	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Caspase-9	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Caspase-10	1:500	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Daxx	1:750	Serotec, Oxford, GB
Fgr	1:1000	Upstate Biotechnology, New York, USA
c-Flip	1:250	Alexis Biochemicals, Gruenberg
Fyn	1:250	BD Biosciences Pharmingen
Hck	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Phospho-Hck (Tyr207/ Ser 211)	1:500	Biosource
c-IAP-1	1:500	R&D Systems, Wiesbaden
c-IAP-2	1:1000	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Lck	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Phospho-Lck (Tyr505)	1:500	Cell Signaling Technology
Lyn	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Phospho-Lyn (Tyr507)	1:1000	Cell Signaling Technology
c-myc	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PAR-4	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PARP	1:2000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
p53	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Ras	1:1000	Upstate Biotechnology, New York, USA
Rb	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Src	1:500	Upstate Biotechnology, New York, USA

Phospho-Src (Tyr416)	1:500	Upstate Biotechnology, New York, USA
Survivin	1:500	R&D Systems, Wiesbaden
α -Tubulin	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
XIAP	1:1000	MBL, Naka-ku Nagoya, Japan
Yes	1:1000	BD Biosciences Pharmingen
Zip-Kinase	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundäre Antikörper

Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Rat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Alle verwendeten sekundären Antikörper wurden in der Konzentration 1:5000 in TBST 1x eingesetzt.

2.1.6 Chemotherapeutika

Die SRC-Kinase-Inhibitoren AZM559756, AZD0530 und AZD0424, entwickelt von Astra Zeneca (Wedel, Deutschland), wurden von PD Dr. Martin Ruthardt's Arbeitsgruppe, Abteilung für Hämatologie, Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Caspasenaktivitätsassays und Caspaseninhibition

CaspSELECT™ Caspase-3 Immunoassay Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA
CaspSELECT™ Caspase-7 Immunoassay Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA
Caspase-6/Mch2 Fluorometric Assay Kit	BioCat GmbH, Heidelberg
Caspase-8/FLICE Fluorometric Protease Assay Kit	BioCat GmbH, Heidelberg
Caspase-9/Mch6 Fluorometric Protease Assay Kit	BioCat GmbH, Heidelberg
Pancaspase-Inhibitor Z-VAD-fmk	Bachem, Weil am Rhein

Caspase-3 Inhibitor Ac-DEVD-CHO
Caspase-8 Inhibitor Z-IETD-fmk

Bachem, Weil am Rhein
Calbiochem

2.1.8 Antikörper zur Immunphänotypisierung

CD 19 FITC (4G7), CD 45 FITC (2D1)
CD 20 PE (L27), CD 22 PE
Anti-Human/Mouse ZAP-70 R-PE-Conj.
ZAP-70-Kontrolle: Mouse IgG1 R-PE-Conj.

BD Biosciences, San Jose, USA
BD Biosciences, San Jose, USA
Caltag Laboratories, Burlingame
Caltag Laboratories, Burlingame

2.1.9 Sonstige Reaktionskits

Annexin-V-FLUOS Staining Kit
CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit

Roche Diagnostics, Mannheim
Becton Dickinson, Franklin Lakes,
USA

2.1.10 Geräte

Brutschrank
Blotter
Elektrophoresekammer
FACScan Lysis II Fluoreszenz-Messgerät

Entwicklermaschine
Lichtmikroskop
Magnetrührer
Netzgerät Model 1000/500 Power Supply
Photometer Ultrospec III
Tecan Multifunktionsreader
Thermocycler
Wipptisch
Zentrifugen: Biofuge fresco, Rotana AP

Heraeus, Hanau
Bio-Rad, Herkules, USA
Bio-Rad, Herkules, USA
Becton Dickinson, Franklin Lakes,
USA
Kodak, Rochester, USA
Leitz, Wetzlar
IKA Labortechnik
Bio-Rad, Herkules, USA
Pharmacia Biosystems, Freiburg
Tecan, Crailsheim
Perkin Elmer, Überlingen
Medgenix, Brüssel
Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Zellen und Zellzahlbestimmung

Alle Zelllinien wurden mit RPMI 1640 + 10% FCS + 2% L-Glutamin + 1% Penicillin-Streptomycin in einem Brutschrank bei 37°C bei einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert.

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl Zellsuspension mit 190µl Trypanblaulösung gemischt. Anschließend wurde eine Neubauer-Zählkammer mit dem Gemisch beladen und die Zellzahl in vier Quadranten ermittelt: zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden alle blau gefärbten, vitalen Zellen gezählt. Der Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat wurde bestimmt und dann die Zellzahl der Kultur nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen / ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2 Apoptoseinduktion durch SRC-Kinase-Inhibitoren

Hierzu wurden die Zelllinien mit PBS gewaschen, mit frischem Medium resuspendiert und dabei auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. Die SRC-Kinase-Inhibitoren AZM559756, AZD0530 und AZD0424 wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1µM, 1,5µM, 2µM, 2,5µM, 3µM und 5µM. Die so präparierten Zellen wurden für 24 oder 48 Stunden (h) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert und anschließend wurde die Apoptoserate mit dem FACScan Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V

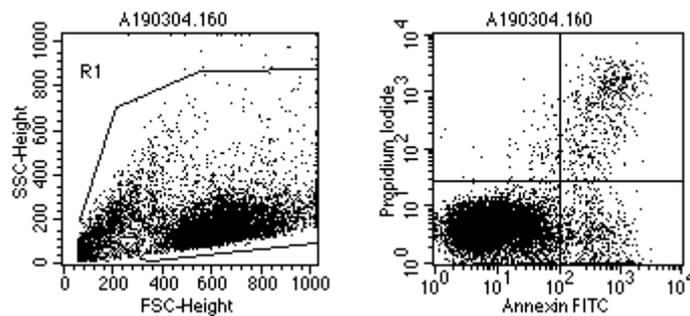
Die quantitative Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mit dem FACScan Durchflusszytometer (FACS = Fluorescence activated cell sorting) mittels dem Annexin-V-FLUOS Staining Kit. Annexin ist ein Protein, das in Anwesenheit von Kalzium an Phospholipide, insbesondere an Phosphatidylserin bindet. Somit ist es ein geeigneter Marker der Frühapoptose, da es hier zu einem Verlust der Asymmetrie der Zellmembran kommt: die in einer gesunden Zelle nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisierten Phosphatidylserinreste sind jetzt auch auf der Außenseite der Zellmembran zu finden. An

diese bindet Fluorescein-konjugiertes Annexin, das im Durchflusszytometer nach Anregung bei $\lambda=488\text{nm}$ und Emission bei $\lambda=530\text{nm}$ detektiert wird. Zur Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte eine simultane Gegenfärbung mit Propidiumiodid. Dieses dringt nach Verlust der Membranintegrität in die Zelle ein und färbt dort vorhandene DNS und dient damit als Marker für nekrotische Zellen. Die Detektion erfolgte im Durchflusszytometer nach einer Anregung bei $\lambda=488\text{nm}$ und einer Messung bei $\lambda=650\text{nm}$.

Zur Darstellung der apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen wurden zwei weitere Eigenschaften der Zellen genutzt: die Größe und die Granularität der Zellen. Beide Parameter werden durch Streulichtmessungen am Durchflusszytometer detektiert. Die Größe der Zelle wird über den FSC-Kanal („Forward Scatter“-Kanal) ermittelt, der die Vorwärtslichtstreuung misst. Kleinere Zellen, die nur wenig Licht ablenken können, erzeugen kleinere FSC-Werte. Die Granularität der Zellen wird über den SSC-Kanal („Side Scatter“-Kanal) ermittelt, der die Seitwärtslichtstreuung misst. Zellen, die stärker granuliert sind, können mehr Licht zur Seite streuen und erzeugen damit größere SSC-Werte (siehe Abbildung 6).

Zur Durchführung dieser Methode wurden entsprechend des Testprotokolls des Annexin-V-FLUOS Staining Kits pro Probe 10^6 Zellen bei 1200 U/min (Umdrehungen pro Minute) für 5 Minuten (min) zentrifugiert, in 1ml PBS gewaschen und erneut bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Pro Probe wurden dann 100 μl Inkubationspuffer, 2 μl Annexin-V-Fluoslösung und 2 μl Propidiumiodidlösung zugegeben. Die so präparierten Zellen wurden jetzt für 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 500 μl Inkubationspuffer zugegeben und dann erfolgte die Messung im Durchflusszytometer mittels der Kanäle FSC, SSC, Fluoreszenzkanal 1 (530nm) und Fluoreszenzkanal 2 (650nm). Pro Röhrchen wurden jeweils 10^4 Zellen gemessen und ausgewertet. Alle Proben der verschiedenen Versuchsbedingungen wurden im Doppelansatz gemessen und dann arithmetisch gemittelt. Die Auswertung der FACS-Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der CellQuest Software von Becton Dickinson.

Vitale Zellpopulation:



Tote Zellpopulation :

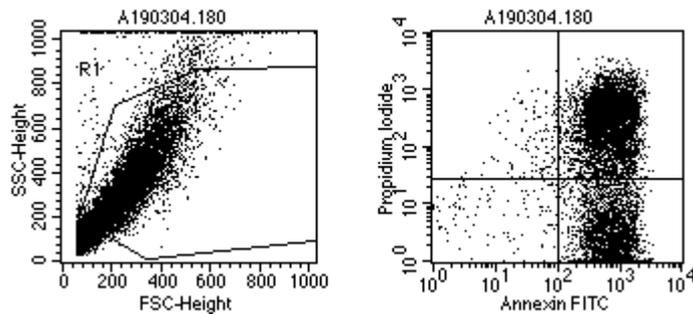


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Messung der Apoptoserate mit Annexin V: dargestellt sind vier Dotplot FACS Ergebnisse. Links sind jeweils die Vorwärts- (FSC) und Seitwärts- (SSC) streulichtmessungen aufgetragen, die über Zellgröße und Granularität der Zellen Auskunft geben. Rechts daneben sind die Fluoreszenzmessergebnisse von Annexin und Propidiumiodid der gleichen Proben dargestellt. In den oberen beiden Abbildungen ist eine große, gesunde Zellpopulation (linker unterer Quadrant) mit nur wenigen apoptotischen und nekrotischen Zellen (rechter unterer und rechter oberer Quadrant) zu erkennen. In den unteren beiden Abbildungen ist eine überwiegend tote Zellpopulation mit vielen apoptotischen und nekrotischen Zellen dargestellt. Wie in der linken unteren Abbildung zu sehen, sind diese Zellen kleiner und stärker granuliert. In der rechten unteren Abbildung erkennt man die frühapoptotischen Zellen (Annexin-positiv, Propidiumiodid-negativ) im rechten unteren Quadranten sowie die toten Zellen (Annexin- und Propidiumiodid-positiv) im rechten oberen Quadranten.

2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials mittels JC-1

Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials können mittels JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine-iodid) im Durchflusszytometer detektiert werden. In nicht-apoptotischen Zellen mit intaktem mitochondrialem Membranpotential liegt JC-1 in Aggregaten aus mehreren Molekülen im Mitochondrium vor und erzeugt ein rotes Fluoreszenzsignal, das im Fluoreszenzkanal 2 (FL2, 650nm) gemessen werden kann. In apoptotischen und nekrotischen Zellen, in denen es zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials kommt, liegt JC-1 in monomerer Form vor. Diese Monomere erzeugen ein grünes Fluoreszenzsignal, das im Fluoreszenzkanal 1 (FL1, 530nm) gemessen werden kann.

Zur Durchführung des Versuchs wurden DOHH-2-Zellen, die auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt waren, mit folgenden Konzentrationen der SRC-Kinase-Inhibitoren AZM559756, AZD0530 und AZD0424 behandelt: $1\mu\text{M}$, $1,5\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $2,5\mu\text{M}$, $3\mu\text{M}$ und $5\mu\text{M}$. Die so präparierten Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt inkubiert. Danach wurde pro Versuchsansatz 1ml Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert, in 1ml frischem Medium gewaschen und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Jedes Zellpellet wurde mit einem Gemisch aus 500 μl frischem Medium und 2 μl JC-1-Lösung resuspendiert. Nach einer 25-minütigen Inkubation bei 37°C wurde jede Probe bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert und in 400 μl kaltem PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung im Durchflusszytometer mittels der Kanäle FCS, SSC, FL1 und FL2. Pro Röhrchen wurden jeweils 10^4 Zellen gemessen und ausgewertet. Alle Proben der verschiedenen Versuchsbedingungen wurden im Doppelansatz gemessen und dann arithmetisch gemittelt. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software von Becton Dickinson.

2.2.5 Zellzyklusanalyse

Zur Darstellung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen in DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen wurden diese jeweils auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml mit frischem Medium eingestellt. Anschließend wurden ansteigende Konzentrationen des SRC-Kinase-Inhibitors AZD0424 (je $1\mu\text{M}$, je $3\mu\text{M}$ und je $5\mu\text{M}$) zu den verschiedenen Zelllinien gegeben.

Die so präparierten Zellen und eine unbehandelte Kontrolle pro Zelllinie wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Die Zellzyklusanalyse erfolgte dann mittels des CycleTEST PLUS DNA Reagent Kits. Dazu wurde pro Versuchsansatz je 1ml Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit 1ml Buffer Solution resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal durchgeführt. Danach wurde das jeweilige Röhrchen erneut bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand gründlich abgesaugt. Pro Röhrchen wurden jetzt 250µl Solution A zugegeben und sanft gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden pro Röhrchen 200µl Solution B zugegeben, sanft gemischt und weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt wurden jeweils 200µl kalte (2-8°C) Solution C zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Röhrchen wurden jetzt für weitere 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem FACScan Durchflusszytometer mittels der ModFit LT Software von Verity Software House, Inc. und der CellQuest Software von Becton Dickinson ausgewertet. Das Messprinzip beruht darauf, dass ein fluoreszierender Farbstoff (Propidiumiodid) an die DNS der Zellen gebunden wird. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzsignals erfolgte im Durchflusszytometer nach einer Anregung bei $\lambda=488\text{nm}$ und einer Messung bei $\lambda=650\text{nm}$. Dabei ist die Menge der emittierten Fluoreszenz proportional zum DNS-Gehalt der Zellen. Die Zellen werden über die Menge ihres DNS-Gehaltes der jeweiligen Zellzyklusphase zugeordnet. So werden Zellen mit einfachem DNS-Gehalt der G0/G1-Phase zugeordnet, denn sie haben noch nicht mit der DNS-Replikation begonnen. Zellen, die über den doppelten DNS-Gehalt verfügen, werden der G2/M-Phase zugeordnet, denn sie haben ihr genetisches Material schon verdoppelt. Alle Zellen, die eine DNS-Menge besitzen, die zwischen der einfachen und der doppelten Menge liegt, werden der S-Phase mit laufender DNS-Replikation zugeordnet.

2.2.6 Immunphänotypisierung

Die Zellpopulationen wurden mit dem jeweiligen, gegen das entsprechende Oberflächenantigen gerichteten, monoklonalen und fluorochrommarkierten Antikörper inkubiert. Die Antikörper gegen CD19 und CD45 waren mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und die gegen CD20, CD22 und ZAP-70 mit Phycoerythrin (PE) konjugiert. Die Detektion des bei Anregung emittierten Lichts der markierten Zellen erfolgte mit dem FACScan Durchflusszytometer und die Auswertung mittels der CellQuest Software von Becton Dickinson.

2.2.7 Bestimmung der Caspasenaktivität der Caspasen-3, -6, -7, -8 und -9

Zur Bestimmung der Caspasenaktivität in DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen wurde für jede Bedingung ein Doppelansatz gewählt: jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml wurden mit der jeweiligen IC_{50} -Konzentration des SRC-Kinase-Inhibitors AZD0424 (DOHH-2: $2\mu\text{M}$, alle anderen Zellen je $5\mu\text{M}$) für bis zu 60 Stunden (h) bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt inkubiert. Als Kontrolle diente ein Doppelansatz der jeweiligen Zelllinie ohne Zusatz von AZD0424. Zu den Entnahmezeitpunkten 0h, 12h, 24h, 36h, 48h und 60h wurde jeweils ein Lysat hergestellt, welches dann für die Caspasenaktivitätsassays verwendet wurde: die Zellen wurden nach Entnahme zunächst bei 1200 U/min für 8 min zentrifugiert, in eiskaltem PBS resuspendiert und erneut bei 7500 U/min bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in $550\mu\text{L}$ Zelllysispuffer resuspendiert, 10 min auf Eis gestellt und erneut bei 13000 U/min bei 4°C für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

Für die Bestimmung der Aktivität der Caspasen-6, -8 und -9 wurden folgende fluorometrische Assays verwendet: Caspase-6/Mch2 Fluorometric Assay Kit, Caspase-8/FLICE Fluorometric Protease Assay Kit und Caspase-9/Mch6 Fluorometric Protease Assay Kit. Gemäß dem Testprotokoll wurden pro Probe jeweils $50\mu\text{l}$ Lysat in eine Mikrotiterplatte pipettiert, je $50\mu\text{l}$ Reaktionspuffer und je $5\mu\text{l}$ des entsprechenden Caspasensubstrates (VEID-AFC für Caspase-6, IETD-AFC für Caspase-8 und LEHD-AFC für Caspase-9) zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde dann 2 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt inkubiert.

Währenddessen kommt es zur Spaltung des Substrates durch die jeweilige, aktivierte Caspase und zur Freisetzung von freiem AFC, welches dann ein gelb-grünes Fluoreszenzsignal emittiert. Dabei ist die Fluoreszenzänderung proportional der Menge der aktivierten Caspase. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte fluorometrisch mittels eines Tecan Multifunktionsreaders und der Magellan Software ausgewertet. Nach Anregung bei $\lambda=400\text{nm}$ erfolgte die Messung bei $\lambda=505\text{nm}$.

Für die Bestimmung der Aktivität der Caspasen-3 und -7 wurden folgende fluorometrische Assays verwendet: CaspSELECT™ Caspase-3 Immunoassay Kit und CaspSELECT™ Caspase-7 Immunoassay Kit. Bei diesen Testen musste zusätzlich eine mitgelieferte Mikrotiterplatte mit Anti-Caspase-3 und -7 Antikörper beschichtet werden. Dies erfolgte laut Testprotokoll. In die Antikörper-beschichteten Kavitäten wurde dann pro Probe jeweils $100\mu\text{l}$

Lysat pipettiert. Die Platte wurde für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Danach wurde das Lysat entfernt, die Platte dreimal mit je 150µL Inkubationspuffer gewaschen und anschließend je 100µl von dem laut Testprotokoll vorbereiteten Substrat zugegeben. Die Platte wurde für weitere 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte wie oben schon beschrieben mit dem Tecan Multifunktionsreader und die Auswertung mit der Magellan Software.

2.2.8 Inhibition der Caspasenaktivität

Zur Hemmung der Caspasenaktivität in DOHH-2-Zellen wurden der Breitspektrum-Pancaspaseninhibitor zVAD-fmk, der Caspase-3-Inhibitor Ac-DEVD-CHO und der Caspase-8-Inhibitor Z-IETD-fmk eingesetzt. Zunächst wurden die DOHH-2-Zellen mit frischem Medium auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml eingestellt. Dann wurde der jeweilige Caspaseninhibitor in einer Konzentration von 50µM zu der Zellsuspension gegeben. Der Caspase-3-Inhibitor wurde in H₂O dest., der Caspase-8-Inhibitor und der Pancaspaseinhibitor in DMSO gelöst. Die so präparierten DOHH-2-Zellen inklusive einer unbehandelten Kontrolle (jeweils im Doppelansatz) wurden für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurde der jeweilige SRC-Kinase-Inhibitor in folgenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben: 4µM AZM559756, 2,5µM AZD0530 und 1,5µM AZD0424. Die so präparierten Zellen wurden für weitere 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert und dann die Apoptoserate mit dem FACScan Durchflusszytometer gemessen.

2.2.9 Extraktion und Quantifizierung von Protein für die Western Blot Analyse

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden jeweils 15×10^6 Zellen bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 7500 U/min bei 4°C für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet auf Eis gelagert. Jedes Zellpellet wurde mit 150µl Lysispuffer-Benzonase-Gemisch (pro 1000µl Lysispuffer wurden 8µl Benzonase zugesetzt) resuspendiert und solange gevortext, bis sich das Pellet vollständig löste und eine klare Lösung entstand, die bei -20°C gelagert werden konnte.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=280\text{nm}$. Hierzu wurde die Extinktion (Ext) von $2\mu\text{l}$ Proteinprobe in $198\mu\text{l}$ H_2O dest. gegen einen Leerwert von $2\mu\text{l}$ Lysispuffer in $198\mu\text{l}$ H_2O dest. bestimmt.

Zur Beladung des SDS-Polyacrylamidgels wurde folgender Probenansatz gewählt:

$1/\text{Ext} \mu\text{l}$ Protein + $(17 - 1/\text{Ext}) \mu\text{l}$ H_2O dest. + $1\mu\text{l}$ Mercaptoethanol + $2\mu\text{l}$ Bromphenolblau.

Dieser Probenansatz wurde dann bei 95°C für 5 min im Thermocycler denaturiert.

2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus einem Trenn- und einem darüber liegenden Sammelgel, verwendet. Um eine optimale Auftrennung der Proteine zu erreichen, wurden entsprechend des Molekulargewichtes des Proteins unterschiedlich prozentige Gele benutzt, die in der Menge des Acrylamides differierten. Die Gele wurden wie folgt angesetzt (alle Angaben in ml):

Trenngel (ca. 5ml pro Gelelektrophorese nötig):

Gelstärke (entsprechendes Molekulargewicht des Proteins)	6% (50-200kD)	8% (30-100kD)	10% (15-70kD)	15% (10-45kD)
H_2O dest.	2,6	2,3	1,9	1,1
30% Acrylamid	1,0	1,3	1,7	2,5
1,5 M Tris pH 8,8	1,3	1,3	1,3	1,3
10% SDS	0,05	0,05	0,05	0,05
10% APS	0,05	0,05	0,05	0,05
TEMED	0,004	0,003	0,002	0,002

Sammelgel (ca. 2ml pro Gelelektrophorese nötig):

Für ein Sammelgel wurden $1,4\text{ml}$ H_2O dest., $330\mu\text{l}$ 30% Acrylamid, $250\mu\text{l}$ 1,0 M Tris pH 6,8, $20\mu\text{l}$ 10% SDS, $20\mu\text{l}$ 10% APS und $2\mu\text{l}$ TEMED pipettiert.

Zunächst wurde das Trenngel in den vorbereiteten Gelträger gegeben. Durch das Überschichten des Gels mit H₂O dest. wurde die luftblasenfreie Polymerisierung erreicht. Danach wurde das H₂O dest. abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Gelkamm zur Formierung der Taschen für die aufzutragenden Proteinproben in das noch flüssige Gel gesteckt. Nach erneuter Polymerisierung wurde der Gelkamm entfernt, der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer 1x gefüllt. Jetzt wurden die vorbereiteten, denaturierten Proteinproben und der Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt für 45 bis 90 Minuten. Hierbei wandern die negativ geladenen Proteine vom Minus- zum Pluspol.

2.2.11 Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dazu wurden zunächst pro Gel 6 Lagen Whatman-Chromatographiepapier und eine Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer getränkt. Der Blotter wurde ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet. Übereinander wurden jetzt auf die untere Platte des Blotters 3 Lagen getränktes Whatman-papier, die getränkte Nitrozellulosemembran, das Trenngel (ohne Sammelgel) und wieder 3 Lagen getränktes Whatman-papier gelegt. Der Blotter wurde geschlossen und es wurde bei 0,6 Ampere pro Blot für 60 Minuten geblottet.

Nach dem Blotten wurde das Trenngel über Nacht in Coomassie-Blau-Lösung eingelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde nach kurzem Schwenken in H₂O dest. über Nacht in Blocking-Puffer eingelegt. Unspezifische Proteinbindungstellen sollen auf diese Weise blockiert werden.

Am darauf folgenden Tag wurden die Coomassie-gefärbten Gele mit Destain-Lösung solange entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Danach wurden sie in H₂O dest. gespült und zum Trocknen zwischen zwei Folien in einem Rahmen gespannt.

Die geblockte Nitrozellulosemembran wurde dreimal für je 15 min mit TBST 1x gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper. Dieser wurde in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (siehe 2.1.5 Antikörper zur Western Blot Analyse) in TBST eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2-3 Stunden bei Raumtemperatur auf dem

Wipptisch. Danach wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für je 15 min mit TBST 1x gewaschen und dann mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (siehe 2.1.5 Antikörper zur Western Blot Analyse) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch inkubiert. Diese sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper wurden ebenfalls in TBST 1x gelöst. Nach dem Inkubieren wurde die Nitrozellulosemembran erneut dreimal für je 15 min mit TBST 1x gewaschen.

Anschließend erfolgte die Entwicklung des Western Blots mit ECL (Enhanced Chemiluminescence). Diese wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Jede Nitrozellulosemembran wurde kurz mit H₂O dest. gespült und danach mit einer 1:1 Mischung aus ECL-1-Lösung und ECL-2-Lösung für 1 min inkubiert. Dazu wurden pro Blot jeweils 4 ml von jeder Lösung verwendet. Die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase startete jetzt eine Lumineszenzreaktion, die auf einen Film festgehalten wird. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran aus dem ECL-Lösungsgemisch entfernt, auf ein angefeuchtetes Whatman-papier gelegt, mit transparenter Folie bedeckt und ein Filmpapier aufgelegt, welches anschließend mit einer Entwicklermaschine entwickelt wurde. In Abhängigkeit von der Stärke der Lumineszenzreaktion und der Belichtungszeit unterscheidet sich das auf dem Film festgehaltene Signal. Somit lässt sich, vorausgesetzt es wurde jede Probestasche mit gleich viel Gesamtprotein beladen, die Proteinmenge eines einzelnen Proteins in unterschiedlichen Proben vergleichen. Für jedes Protein wurden individuelle Belichtungszeiten benutzt, um die quantitativen Unterschiede bestmöglich darzustellen.

Um zu Überprüfen, dass jede Probestasche auch tatsächlich mit der gleichen Menge an Gesamtprotein gefüllt wurde, wurden 2 Methoden verwendet: zum einen wurde wie oben schon beschrieben das Trenngel mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend die Intensität der blau gefärbten Proteinbanden verglichen. Zum anderen wurde eine Ladungskontrolle mit einem α -Tubulin-Antikörper durchgeführt. Hierzu wurden die an die Nitrozellulosemembran gebundenen Antikörper mit einem Stripping Buffer (7ml pro Blot, Inkubationszeit: 30 min bei Raumtemperatur) entfernt. Danach wurde die gestrippte Membran viermal für je 5 min mit TBST 1x gewaschen und konnte anschließend erneut mit primärem Antikörper inkubiert werden. Auf diese Weise konnte die gleiche Nitrozellulosemembran benutzt werden, um mehrere Proteinexpressionen darzustellen.

3. ERGEBNISSE

3.1 SRC-Kinase-Inhibitoren induzieren Apoptose in B-Zell-Lymphomzellen

Um das apoptoseinduzierende Potential der experimentellen SRC-Kinase-Inhibitoren AZM559756, AZD0530 und AZD0424 auf Bcr-Abl-negative Lymphom- und Leukämiezellen zu untersuchen, wurden sechs lymphatische Zelllinien unterschiedlicher Entitäten eingesetzt: DOHH-2 (B-Zell-Lymphom), WSU-NHL (B-Zell-Lymphom), Raji (Burkitt-Lymphom), Karpas 299 (T-Zell-Lymphom), HUT 78 (T-Zell-Lymphom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie). Die Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen von 1-5 μM der drei SRC-Kinase-Inhibitoren für 24 und 48 Stunden inkubiert und anschließend wurde die Apoptoserate mit dem Durchflusszytometer mittels Annexin V-Färbung bestimmt.

Abbildung 7 zeigt die ermittelten Apoptoseraten der jeweiligen Zelllinien nach 48 Stunden Inkubationszeit. Wie in allen drei Abbildungen zu erkennen ist, konnten die sechs Zelllinien klar unterschieden werden in sensitive und resistente Zelllinien in Bezug auf die Behandlung mit den getesteten SRC-Kinase-Inhibitoren. Zu den sensitiven Zelllinien gehören DOHH-2 und WSU-NHL. Sie werden im Nachfolgenden auch als Responder bezeichnet.

DOHH-2 erwies sich als die sensitivste Zelllinie: schon bei geringen Konzentrationen aller drei SRC-Kinase-Inhibitoren zeigten sich hier die höchsten Apoptoseraten. So wurde mit der Substanz AZD0424 schon bei einer Konzentration von 1 μM eine Apoptoserate von 75% erreicht. WSU-NHL-Zellen sprachen auch auf die Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen an, allerdings sind höhere Konzentrationen der SRC-Kinase-Inhibitoren nötig, um vergleichbar hohe Apoptoseraten wie in DOHH-2-Zellen auszulösen. Bei Einsatz von 5 μM AZD0424 wurde nur eine Apoptoserate von 50% erzielt.

Der SRC-Kinase-Inhibitor AZD0424 ist der am stärksten wirksame Apoptose-Induktor: er erzielt die höchsten Apoptoseraten schon bei Einsatz in geringen Konzentrationen. Der SRC-Kinase-Inhibitor AZM559756 erwies sich als der am schwächsten wirksame Apoptose-Induktor: er bewirkt erst bei hohen Konzentrationen (5 μM) eine deutliche Erhöhung der Spontanapoptoserate in den Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL.

Die anderen vier Zelllinien HUT 78, Karpas-299, Jurkat und Raji zeigen keine zunehmenden Apoptoseraten unter Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren. Wie in allen drei Abbildungen zu erkennen ist, wird trotz steigender Konzentrationen des jeweiligen SRC-Kinase-Inhibitors die Spontanapoptoserate nicht überschritten. Diese Zelllinien werden deshalb als Nonresponder eingestuft.

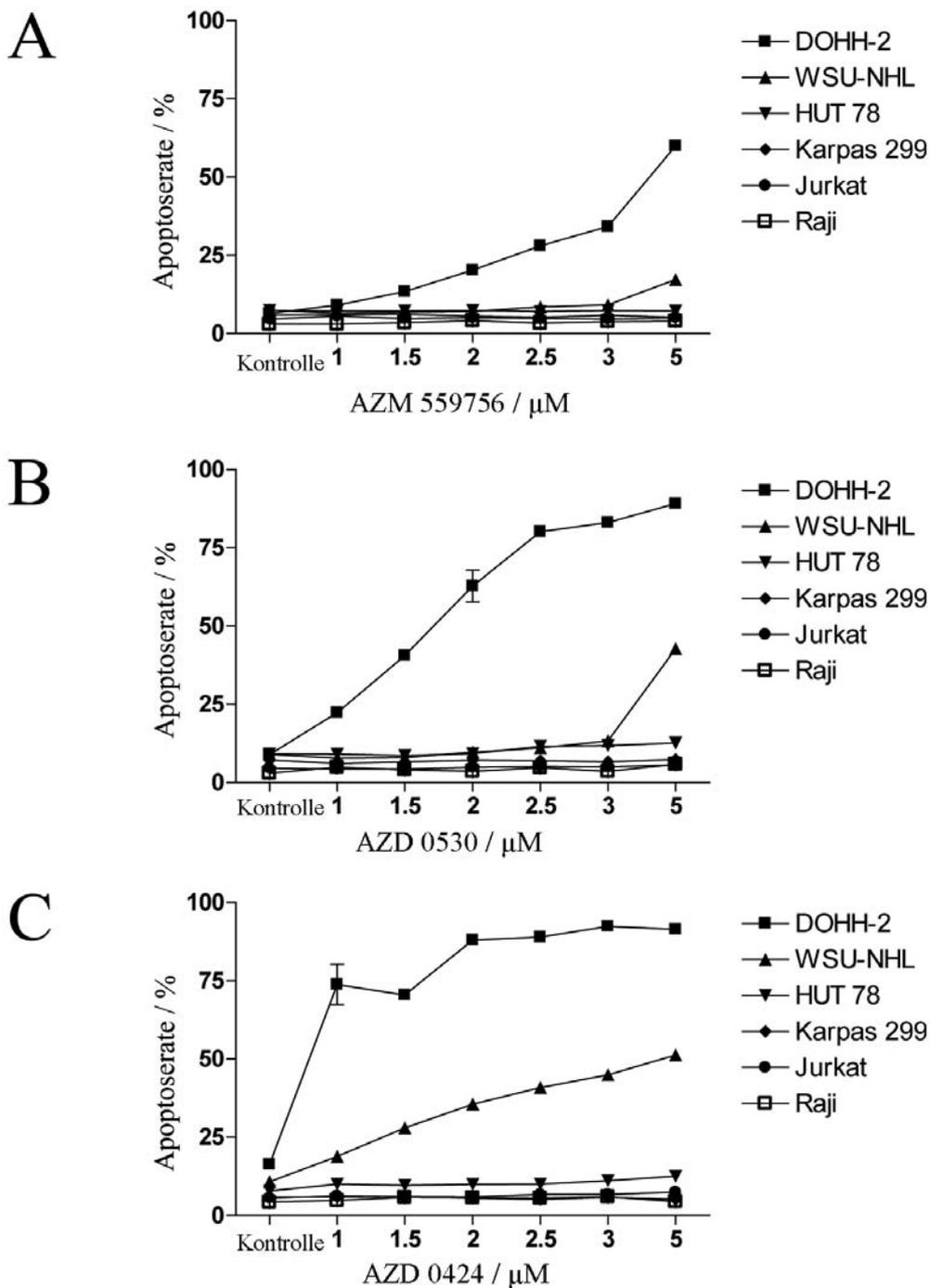


Abbildung 7: Dargestellt sind die Apoptoseraten in % in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen SRC-Kinase-Inhibitors (A: AZM559756, B: AZD0530, C: AZD0424) in 6 lymphatischen Zelllinien nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die Apoptoserate wurde mittels Annexin V-Färbung bestimmt.

- Die B-Zell-Lymphomzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL sprechen auf die Behandlung mit allen drei SRC-Kinase-Inhibitoren an (Responder).

3.2 SRC-Kinase-Inhibitoren führen zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials in der Responderzelllinie DOHH-2

Um nachzuweisen, ob während der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose auch der intrinsische Apoptoseweg aktiviert wird, folgten Untersuchungen zur Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials mittels durchflusszytometrischer Detektion mit JC-1.

Abbildung 8 zeigt den prozentualen Anteil der DOHH-2-Zellen mit depolarisiertem Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach 48 Stunden Inkubation mit den Substanzen AZM559756, AZD0530 und AZD0424, eingesetzt mit steigenden Konzentrationen von 1-5 μM . Wie in der Abbildung zu erkennen ist, führen alle drei Substanzen mit zunehmender Konzentration zu einer zunehmenden Anzahl von DOHH-2-Zellen mit zerstörtem mitochondrialem Membranpotential. Damit ist nachgewiesen, dass durch alle drei Substanzen der intrinsische Apoptoseweg aktiviert wird. Auch in diesem Versuch stellte sich die Substanz AZD0424 als der am stärksten wirksame Apoptose-Induktor heraus, gefolgt von AZD0530 und AZM559756 als am schwächsten wirksame Substanz.

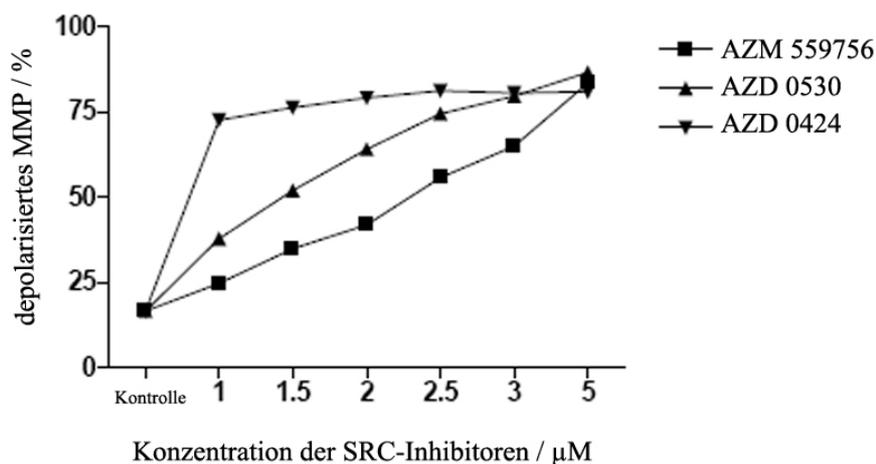


Abbildung 8: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der DOHH-2-Zellen mit depolarisiertem Mitochondrienmembranpotential (MMP) in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen SRC-Kinase-Inhibitors (AZM559756, AZD0530 und AZD0424) nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die Detektion des MMP erfolgte mit JC-1.

3.3 Immunphänotypisierung der sechs lymphatischen Zelllinien

Die in 3.1 präsentierten Ergebnisse belegen, dass beide Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL zur Gruppe der B-Zell-Reihe gehören, während die Nonresponderzelllinien mit Ausnahme der Raji-Zellen der T-Zell-Reihe zu zuordnen sind. Eine Immunphänotypisierung wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob man Responder- und Nonresponderzellen bezüglich der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle unterscheiden kann, die unter anderem als prognostische Marker bei malignen Erkrankungen bedeutsam sind. So wurden alle sechs Zelllinien auf das Vorhandensein folgender Oberflächenmarker untersucht: CD19, CD20, CD22, CD45 und ZAP-70 (Zeta-associated protein of 70kDa).

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, sind alle Zellen der B-Zell-Reihe (DOHH-2, WSU-NHL und Raji) erwartungsgemäß positiv für CD19, CD20 und CD22. Jurkat, Karpas-299 und HUT 78 als T-Zell-Abkömmlinge tragen diese Rezeptoren nicht. CD45, eine transmembranöse Tyrosinphosphatase, die eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion in Immunzellen und bei der Aktivierung bestimmter SRC-Kinasen spielt, wurde in allen Zelllinien nachgewiesen (92). ZAP-70, eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die bedeutsam ist als prognostischer Marker bei B-CLL, konnte in den Responderzellen nicht nachgewiesen werden, dafür aber in allen Nonresponderzelllinien mit Ausnahme der Raji-Zellen (93).

	CD45	CD22	ZAP-70	CD20	CD19
DOHH-2	+	+	-	+	+
WSU-NHL	+	+	-	+	+
Jurkat	+	-	+	-	-
Karpas-299	+	-	+	-	-
Hut 78	+	-	+	-	-
Raji	+	+	-	+	+

Abbildung 9: Dargestellt sind die Ergebnisse der Immunphänotypisierung der sechs lymphatischen Zelllinien.

3.4 SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zu einem prozentualen Anstieg der Zellen in der G0/G1 Phase und zu einer prozentualen Abnahme der Zellen in der S-Phase

SRC-Kinasen sind beteiligt an der Regulation des Zellzykluses (94-96). Deshalb wurde im nächsten Schritt der Einfluss der SRC-Kinase-Inhibitoren auf den Zellzyklus der Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL und der Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji untersucht. Alle Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des potentesten SRC-Kinase-Inhibitors AZD0424 für 48 Stunden inkubiert und anschließend wurde der Zellzyklusstatus am Durchflusszytometer detektiert.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, kommt es in den Responderzelllinien nach Behandlung zu einem Anstieg der Zellen, die sich in der G0/G1 Phase befinden. So steigt der Anteil der Zellen, die sich in der G0/G1 Phase befinden in den DOHH-2-Zellen von ca. 40% in der Kontrollgruppe auf ca. 75% nach erfolgter Behandlung und in den WSU-NHL-Zellen von ca. 50% im unbehandelten Zustand auf ca. 85% nach erfolgter Behandlung. In den Nonresponderzelllinien bleibt die Rate der Zellen in G0/G1 Phase nach Behandlung annähernd gleich der Rate der unbehandelten Kontrolle.

Weiterhin ist zu erkennen, dass eine Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor in den Responderzelllinien zu einer Abnahme der Zellen in der S-Phase führt, wohingegen sich in den Nonresponderzelllinien der Anteil der Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor nicht ändert: er bleibt relativ unverändert zwischen 40% und 45% in den Jurkat-Zellen und zwischen 40% und 35% in den Raji-Zellen, während er in den DOHH-2-Zellen von ca. 40% auf ca. 20% und in den WSU-NHL-Zellen von ca. 40% auf ca. 10% sinkt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit dem neuen SRC-Kinase-Inhibitor AZD0424 ausschließlich in den Responderzelllinien zu einem prozentualen Anstieg der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzykluses führt. Gleichzeitig lässt sich eine prozentuale Abnahme der Zellen, die sich in der Synthesephase befinden, nachweisen. Die getestete Substanz bewirkt somit in den sensitiven Lymphomzelllinien neben einer Induktion der Apoptose auch eine Hemmung der Zellprogression.

- In den Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL induziert AZD0424 einen Zellzyklusarrest.

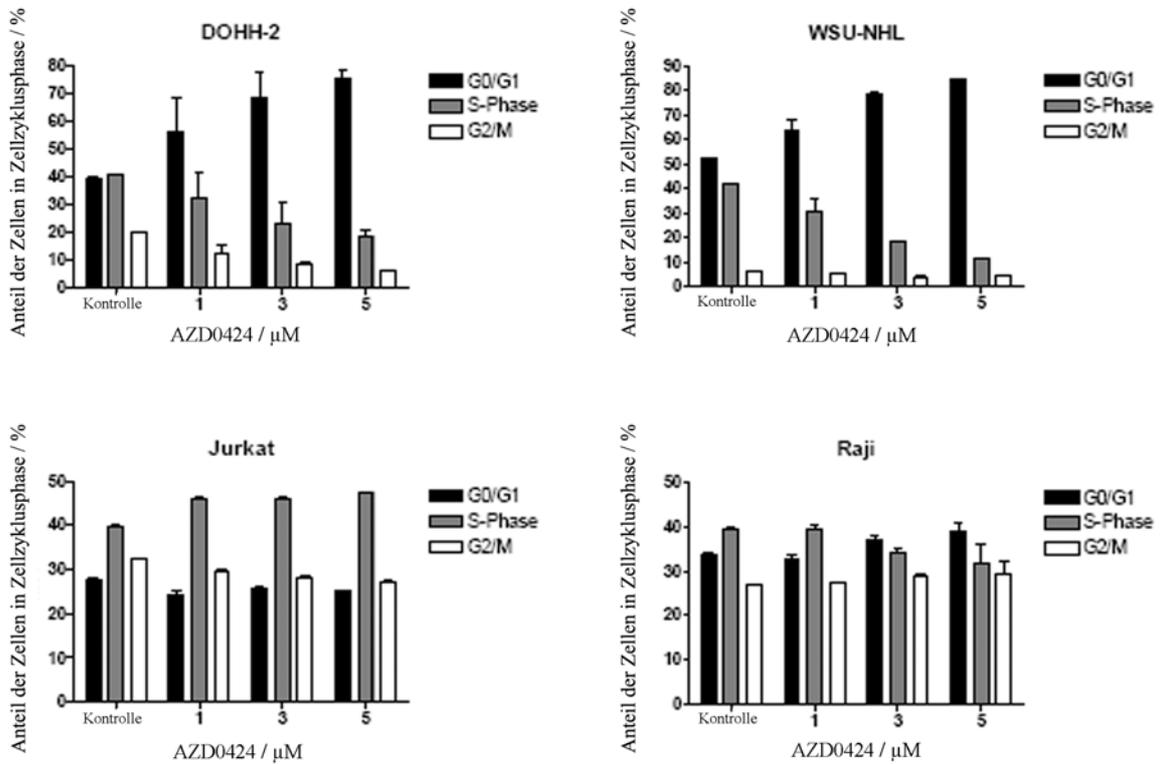


Abbildung 10: Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Responderzellen DOHH-2 und WSU-NHL (obere zwei Abbildungen) und der Nonresponderzellen Jurkat und Raji (untere zwei Abbildungen). Die entsprechenden Zellzyklusphasen (G0/G1, S-Phase und G2/M) sind in Abhängigkeit von der Konzentration des SRC-Kinase-Inhibitors AZD0424 nach 48 Stunden Inkubationszeit aufgetragen.

3.5 Im Vergleich mit nicht entarteten Leukozyten zeigen die Lymphomzelllinien ein dereguliertes Expressionsmuster der SRC-Kinasen

Mit dem Ziel, die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die verantwortlich für das Ansprechen oder die Resistenz bestimmter Zelllinien auf die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren sind, wurde im nächsten Schritt das basale Expressionsmuster folgender acht SRC-Kinasen in allen Lymphomzelllinien untersucht: Src, Hck, Lck, Lyn, Yes, Fyn, Fgr und Blk. Wie in Abbildung 11 erkennbar, ist das Expressionsmuster der acht SRC-Kinasen in den Lymphomzelllinien ausgesprochen heterogen. Es erlaubt nicht, zwischen Responder- und Nonresponderzellen zu unterscheiden: es gibt weder bestimmte SRC-Kinasen, die nur in den Responderzelllinien exprimiert werden, noch solche, die ausschließlich in den Nonresponderzelllinien exprimiert werden.

Des Weiteren lies sich feststellen, dass sich das Expressionsmuster der SRC-Kinasen in den untersuchten Zelllinien deutlich von dem nicht entarteter Leukozyten unterscheidet. Lowell beschrieb, dass gesunde Lymphozyten der T-Zell-Reihe nur Fyn und Lck exprimieren (16). Die hier untersuchten T-Zell-Abkömmlinge Jurkat, Karpas-299 und HUT 78 exprimieren zusätzlich in unterschiedlicher Ausprägung Src, Hck, Lyn, Yes und Fgr. Lediglich Blk wird von keiner der drei T-Zell-Abkömmlinge exprimiert. Lowell beschrieb weiterhin, dass gesunde B-Lymphozyten nur Fyn, Fgr, Lyn, Blk und Yes exprimieren (16). Die hier untersuchten B-Zell-Abkömmlinge DOHH-2, WSU-NHL und Raji exprimieren zusätzlich zum Teil Src, Hck und Lck. Diese Beobachtung unterstützt die schon mehrfach beschriebene Hypothese, dass SRC-Kinasen in vielen malignen Erkrankungen fehlreguliert sind und ein vom Normalzustand abweichendes Expressionsmuster zeigen.

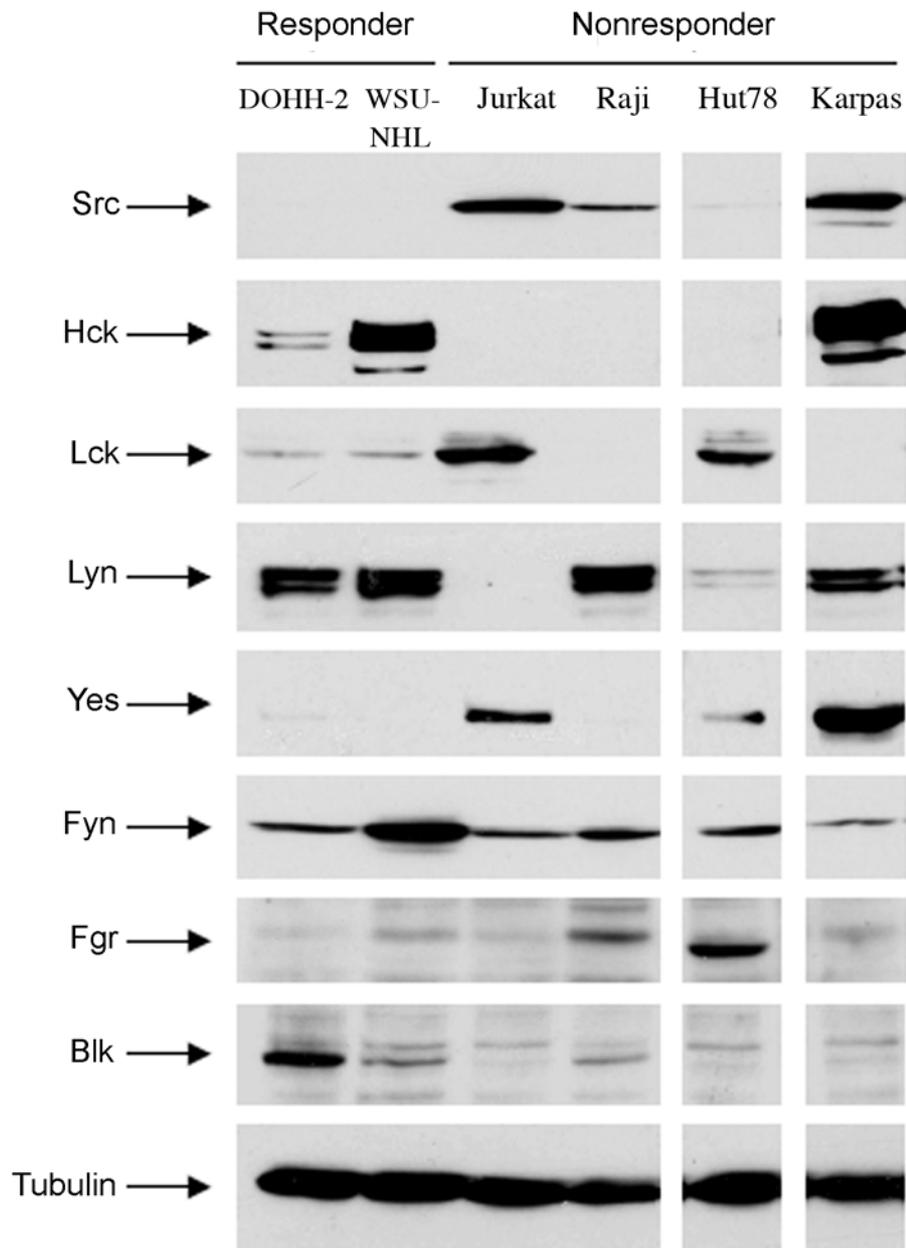


Abbildung 11: Dargestellt ist die Western Blot Analyse der basalen Expression der SRC-Kinasen Src, Hck, Lck, Lyn, Yes, Fyn, Fgr und Blk in unbehandelten DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat-, Raji-, HUT 78- und Karpas-299-Zellen. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

3.6 Lck, Lyn und Fyn sind die Haupteffektor-SRC-Kinasen der getesteten SRC-Kinase-Inhibitoren

3.6.1 SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Dephosphorylierung von Lck-Tyr505 und Lyn-Tyr507 sowohl in den Responder- als auch in den Nonresponderzelllinien

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die in Signaltransduktionsvorgänge involviert sind, welche durch die neuen SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst werden, wurden im nächsten Schritt verschiedene Western Blot Analysen durchgeführt. Diese hatten zum Ziel, sowohl das Expressionsmuster verschiedener apoptoserelevanter Proteine darzustellen, als auch die Aktivität verschiedener SRC-Kinasen genauer zu untersuchen. Dazu wurden die Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL und die beiden Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji mit der jeweiligen IC₅₀-Konzentration (inhibierende Konzentration, die zu ca. 50% Apoptoserate führt) der SRC-Kinase-Inhibitoren AZD0530 und AZD0424 für 48 Stunden inkubiert und anschließend die entsprechenden Proteinlysate hergestellt. Wie in den Abbildungen 12, 13, 16 bis 21 zu sehen ist, wurde für jede Zelllinie die Proteinexpression zwischen der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Probe verglichen. Dieser Versuchsansatz gilt für alle weiteren präsentierten Western Blot Ergebnisse. Um Wiederholungen zu vermeiden, sind im Folgenden nur die Western Blot Ergebnisse mit dem SRC-Kinase-Inhibitor AZD0424 dargestellt. Mit dem SRC-Kinase-Inhibitor AZD0530 wurden für alle folgenden Western Blot Analysen die gleichen Ergebnisse erzielt.

Man weiß, dass die Aktivität der SRC-Kinasen davon abhängig ist, in welchem Ausmaß diese an bestimmten Domänen phosphoryliert sind (siehe 1.2.1) (15, 19). Deshalb wurden zunächst die phosphorylierten Isoformen einzelner SRC-Kinasen untersucht und welche Veränderungen hier unter Behandlung zu beobachten sind. Weiterhin ist bekannt, dass es in vielen malignen Erkrankungen zu einer Deregulierung der SRC-Kinasen kommt, mit dem Ergebnis, dass diese konstitutiv aktiviert sind, und somit bestimmte phosphorylierte oder unphosphorylierte Formen überexprimiert werden (15, 17). Handelsübliche Antikörper gegen phosphorylierte Isoformen der SRC-Kinasen sind nur für p-Src-Tyr416, p-Hck-Tyr209/Ser211, p-Lck-Tyr505 und p-Lyn-Tyr507 verfügbar. Somit konnten die jeweils phosphorylierten Isoformen von Yes, Fyn, Fgr und Blk nicht untersucht werden.

Abbildung 12 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Src, p-Src-Tyr416, Hck, p-Hck-Tyr209/Ser211, Lck, p-Lck-Tyr505, Lyn, p-Lyn-Tyr507, Yes, Fyn, Fgr und Blk in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien. Wie zu erkennen ist, sind Lck und Lyn die SRC-Kinasen, die am meisten durch die Behandlung beeinflusst werden: die Proteinmenge an phosphoryliertem p-Lck-Tyr505 wird durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor in jeder Zelllinie stark reduziert und zwar unabhängig von ihren Responder- oder Nonrespondereigenschaften. Gleiches konnte auch für die SRC-Kinase Lyn gezeigt werden: in allen Zelllinien, die Lyn exprimieren (DOHH-2, WSU-NHL und Raji) kommt es unabhängig ihrer Responder- oder Nonrespondereigenschaften durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor zu einer Downregulation von p-Lyn-Tyr507.

Abbildung 12 zeigt weiterhin, dass es sowohl in den Responder- als auch in den Nonresponderzelllinien durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor zu keiner Veränderung der Proteinexpression von p-Src-Tyr416 und p-Hck-Tyr209/Ser211 sowie deren unphosphorylierten Isoformen kommt. Sie scheinen damit nicht zu den Haupteffektorkinasen der getesteten Substanzen zu gehören.

3.6.2 SRC-Kinase-Inhibitoren führen nur in den Responderzelllinien zu einer Downregulation der SRC-Kinase Fyn

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, führt die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor in den Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL zu einer Abnahme der Proteinexpression der SRC-Kinase Fyn im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu ändern sich die Proteinexpressionlevel der SRC-Kinase Fyn nicht in den Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji. Somit konnte auch die SRC-Kinase Fyn als eine Haupteffektor-Kinase der getesteten Substanzen identifiziert werden.

In Abbildung 12 ist ebenso ersichtlich, dass es in allen Zellen, die Lck exprimieren zu einer Downregulation von Lck nach Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor kommt.

Die Untersuchungen zu den Proteinexpressionen der SRC-Kinasen Yes, Fgr und Blk haben keine Veränderungen durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren gezeigt. Sie scheinen daher nicht zu den Haupteffektormolekülen der getesteten Substanzen zu gehören.

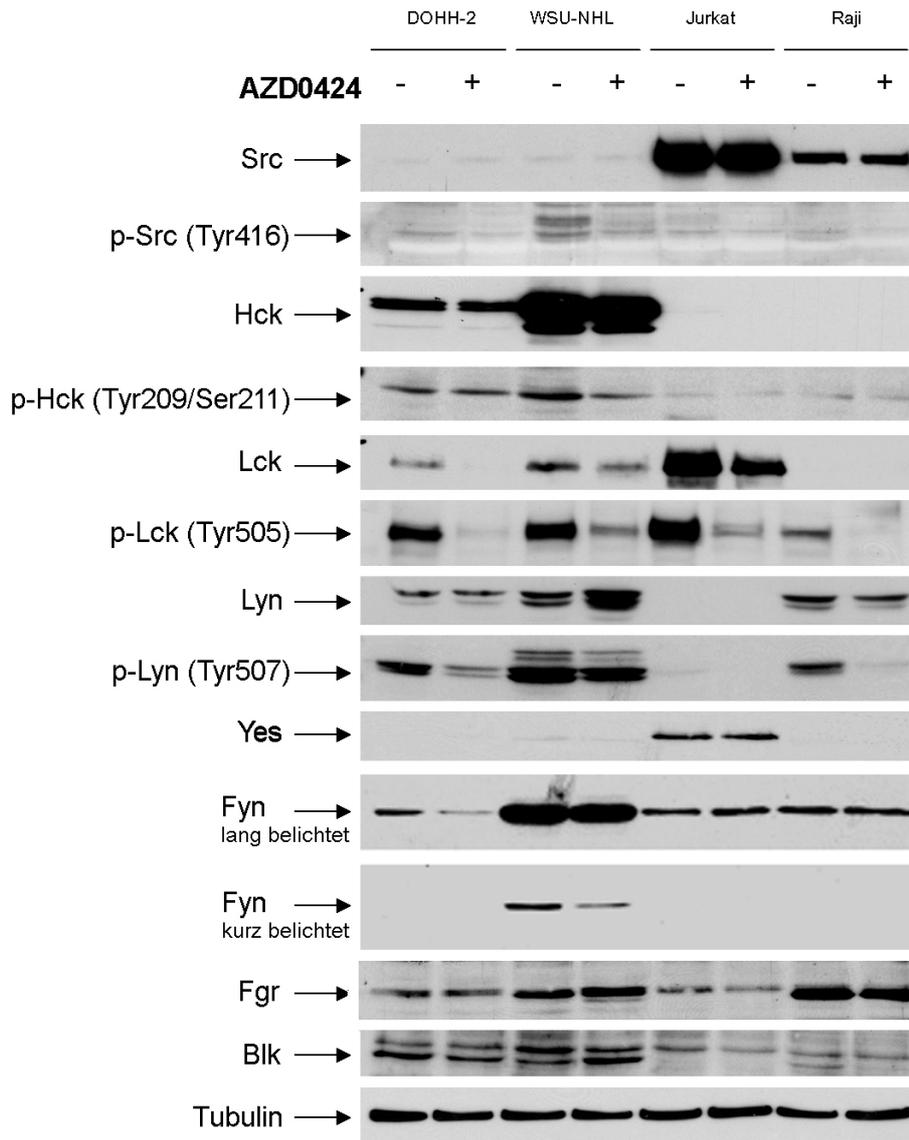
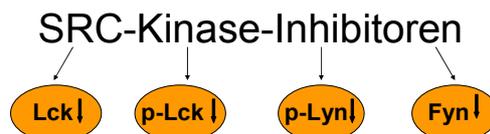


Abbildung 12: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression der SRC-Kinasen Src, Hck, Lck, Lyn, Yes, Fyn, Fgr, Blk und der phosphorylierten SRC-Kinasen p-Src (Tyr416), p-Hck (Tyr209/Ser211), p-Lck (Tyr505) und p-Lyn (Tyr507) in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.



3.7 Die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose erfolgt Caspasen-abhängig

Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung der apoptoserelevanten Proteine mit dem Ziel, die Schlüsselproteine der Apoptosekaskade zu identifizieren, die am meisten durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst werden. Ein unabdingbarer Schritt während der Apoptose ist die Aktivierung verschiedenster Caspasen (48). Diese lassen sich in Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-8, -9 und -10) und Exekutorcaspasen (zum Beispiel Caspase-3, -6 und -7) unterscheiden. Aktivierte Initiatorcaspasen aktivieren downstream-befindliche Exekutorcaspasen (49). Diese bewirken dann die für die Apoptose typischen morphologischen Zellveränderungen wie Verlust der Membranasymmetrie oder Zerstörung der DNS. Ein solches Substrat einer Exekutorcaspase ist das DNS-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welches während der Apoptose in ein 89 kDa (Kilodalton) großes Fragment gespalten wird (51).

3.7.1 SRC-Kinase-Inhibitoren führen in Responderzelllinien zur Spaltung von PARP

Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, erfolgt diese PARP-Spaltung nur in den behandelten Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL. In den Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji ist diese PARP-Spaltung nach Inkubation mit den SRC-Kinase-Inhibitoren nicht nachzuweisen.

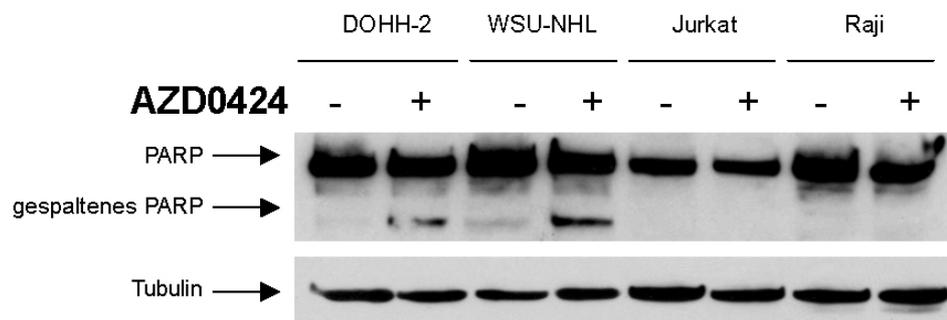


Abbildung 13: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von PARP und gespaltenem PARP in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

3.7.2 SRC-Kinase-Inhibitoren führen in Responderzelllinien zu einer Aktivierung von Initiator- und Exekutorcaspasen

Um eine Aktivierung oben beschriebener Caspasen nachzuweisen, wurden fluorometrische Caspasenaktivitätsassays verwendet. Diese können quantitative Veränderungen wesentlich sensitiver erkennen, als dies mit der Western Blot Analyse möglich ist. Die im Vorfeld durchgeführten Western Blot Untersuchungen zur Proteinexpression von Caspase-3, -6, -7, -8, -9 und -10 (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigen vergleichbare Ergebnisse wie die fluorometrischen Aktivitätsassays. Für die Assays wurden die Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL und die Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji mit der IC_{50} -Konzentration des potentesten SRC-Kinase-Inhibitors AZD0424 für 60 Stunden inkubiert. In Abständen von jeweils 12 Stunden wurde die Caspasenaktivität ermittelt und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Caspasenaktivitätsassays für die Caspasen-8, -9, -3, -7, und -6. In allen fünf Abbildungen ist zu erkennen, dass es nur in den Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL zu einer deutlichen Steigerung der Caspasenaktivität aller untersuchter Caspasen unter Behandlung mit AZD0424 kommt. Dagegen bleibt die Caspasenaktivität der behandelten Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji auf demselben Niveau wie in den unbehandelten Kontrollzellen.

In den behandelten DOHH-2-Zellen wird das Maximum der Enzymaktivität für Caspase-8, -9 und -6 bereits nach 12 Stunden erreicht und für Caspase-3 und -7 bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit. In den behandelten WSU-NHL-Zellen werden die jeweiligen Maxima erst gegen Ende der Inkubationszeit erreicht: für Caspase-9 und -6 erst nach 48 Stunden und für Caspase-8, -3 und -7 erst nach 60 Stunden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich die DOHH-2-Zellen in den vorangegangenen Versuchen als die sensitivsten Zellen erwiesen haben, so dass es in ihnen zu einer früheren Caspasenaktivierung kommt als in den WSU-NHL-Zellen.

Weiterhin ist in Abbildung 14 zu erkennen, dass in den behandelten DOHH-2-Zellen die Initiatorcaspasen-8 und -9 einen nahezu gleichen Kurvenverlauf aufweisen, und sie ihr Aktivitätsmaximum schon nach 12 Stunden Inkubationszeit erreichen und damit deutlich vor den jeweiligen Aktivitätsmaxima der Exekutorcaspasen -3 und -7.

In den behandelten DOHH-2-Zellen kommt es nach 24 Stunden Inkubationszeit zu einer schnellen Abnahme der Caspasenaktivität zum Teil bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus.

Dies kann damit begründet werden, dass es in diesen Zellen zu einem fortgeschrittenen Zellsterben kommt, wobei die Caspasen selbst wie viele anderen zelleigenen Enzyme zerstört werden.

Einige unbehandelte Zellen (zum Beispiel die WSU-NHL Kontrolle in der Caspase-7-Aktivitätskurve) zeigen gegen Ende der Inkubationszeit (60 Stunden) einen leichten Anstieg der Caspasenaktivität. Ursächlich dafür kommt die Nährstoffverarmung mit fortschreitender Apoptose in dem seit 60 Stunden nicht gewechselten Kulturmedium in Frage.

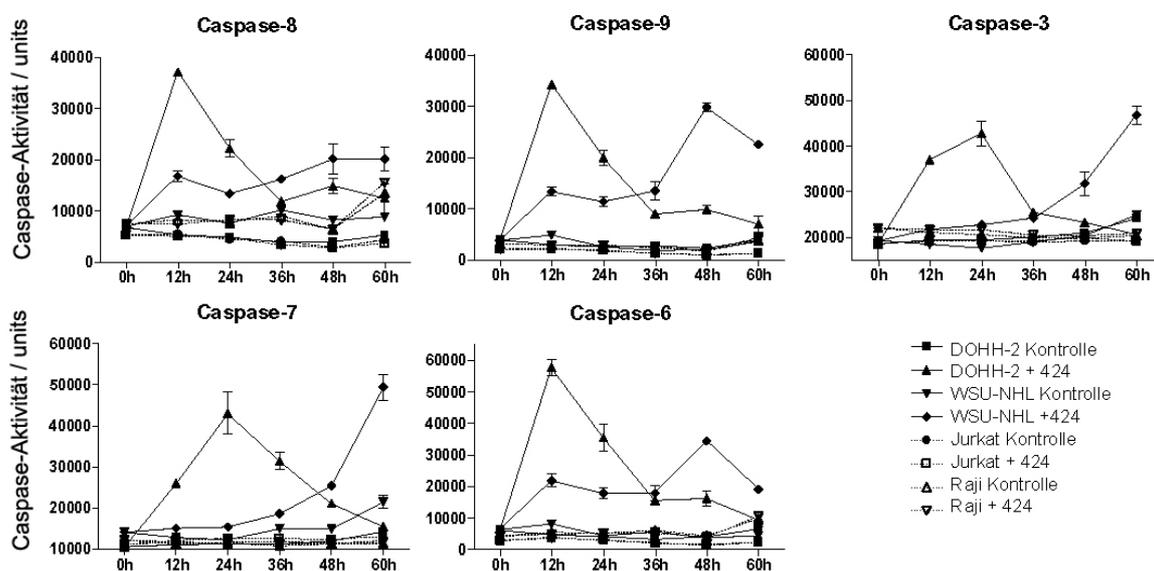


Abbildung 14: Dargestellt sind die Caspasenaktivitäten der Caspasen-8, -9, -3, -7 und -6 in unbehandelten (Kontrolle) und mit AZD0424 behandelten (+424) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

- Die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose erfolgt über eine Aktivierung von Initiatorcaspasen (-8 und -9) und Effektorcaspasen (-3, -7, -6).

3.7.3 In den mit SRC-Kinase-Inhibitoren behandelten Zellen bewirkt die simultane Zugabe von Pancaspase-Inhibitor den nahezu vollständigen Abbruch der Apoptose

Um zu bestätigen, dass die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose tatsächlich Caspasen-abhängig verläuft, erfolgten weitere Untersuchungen mit verschiedenen Caspase-Inhibitoren. Dazu wurde die Responderzelllinie DOHH-2 mit 4 μ M AZM559756, 2,5 μ M AZD0530 und 1,5 μ M AZD0424 und einem Pancaspase-Inhibitor, einem spezifischen Caspase-3 Inhibitor und einem spezifischen Caspase-8 Inhibitor für 48 Stunden inkubiert und anschließend die Apoptoserate mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, kommt es in den mit SRC-Kinase-Inhibitoren behandelten Zellen durch Zusatz des Pancaspase-Inhibitors zu einem massiven Rückgang der Apoptoseraten, bis fast auf den Wert der Spontanapoptoserate der unbehandelten Kontrollen. Diese Beobachtung trifft auf alle drei getesteten Substanzen zu. Damit wurde gezeigt, dass alle drei SRC-Kinase-Inhibitoren die Apoptose nur induzieren, wenn es zur Aktivierung bestimmter Caspasen kommt. Die Caspasen sind somit wesentliche Schlüsselmoleküle für die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose.

Bei alleinigem Zusatz von Caspase-3 Inhibitor bzw. Caspase-8 Inhibitor wurden die Apoptoseraten nur geringfügig reduziert. Dies belegt, dass weder aktivierte Caspase-3, noch aktivierte Caspase-8 alleine ausreichen, um die Apoptose in vollem Maße auszulösen. Es bedarf der Aktivierung weiterer Caspasen, um maximale Apoptoseraten zu erreichen.

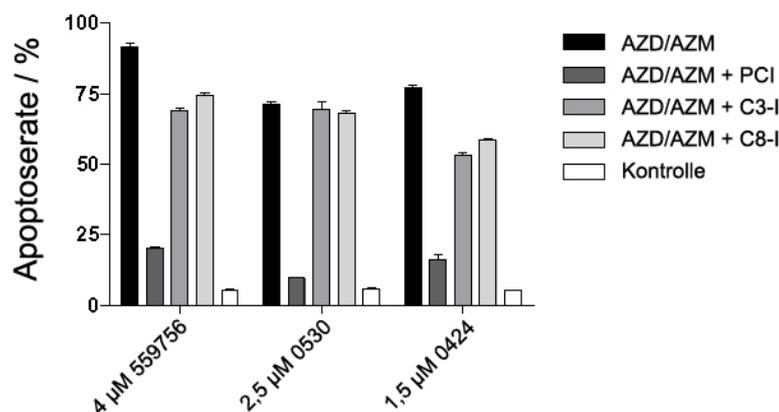


Abbildung 15: Dargestellt sind die Apoptoseraten in % in DOHH-2-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit mit 4 μ M AZM559756, 2,5 μ M AZD0530 und 1,5 μ M AZD0424 und Koinkubation mit Pancaspase-Inhibitor (PCI), Caspase-3 Inhibitor (C3-I) und Caspase-8 Inhibitor (C8-I) im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle.

3.8 SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Downregulation von Bcl-xl und zu einer Aktivierung von Bid

Die Untersuchung der apoptoserelevanten Moleküle wurde mit der Analyse der Bcl-2 Familie fortgesetzt. Untersucht wurden die proapoptotischen Bcl-2 Mitglieder Bak, Bid und Bad sowie die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder Bcl-2 und Bcl-xl.

Abbildung 16 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Bcl-2, Bcl-xl, Bak, Bid und Bad in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien. Wie zu erkennen ist, kommt es unter Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren sowohl in den Responder-, als auch in den Nonresponderzellen zu einer Downregulation des antiapoptotischen Moleküls Bcl-xl. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die Proteinexpression des proapoptotischen Moleküls Bid gemacht: in den behandelten Responderzelllinien kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Proteingehaltes. In den behandelten Nonresponderzelllinien ist diese Abnahme auch sichtbar, aber sie ist wesentlich schwächer ausgeprägt, als in den Responderzellen. Aufgrund des verwendeten Antikörpers ist diese Downregulation von Bid als proapoptotisches Ereignis zu interpretieren. Während der Apoptose wird Bid von Caspase-8 aktiviert, indem es durch aktivierte Caspase-8 gespalten wird (53). Der verwendete Antikörper weist nur das ungespaltene Ausgangsprodukt und nicht das aktivierte Spaltprodukt nach. Die beobachtete Downregulation von Bid weist dessen erfolgte Spaltung in seine aktivierte Form nach.

Bei den anderen Bcl-2 Mitgliedern Bcl-2, Bak und Bad konnte keine Veränderung der Proteinexpression durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren festgestellt werden.

3.9 Responder- und Nonresponderzelllinien unterscheiden sich bezüglich ihrer Grundexpression von Bcl-2 und Bcl-xl

Wie in Abbildung 16 auch zu erkennen ist, wird in den Responderzelllinien das antiapoptotische Bcl-2 stärker exprimiert als in den Nonresponderzelllinien. Trotz des höheren Proteingehalts reagieren diese Zellen sensitiver auf eine Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren.

Ebenso ist zu erkennen, dass die Responderzellen das antiapoptotische Molekül Bcl-xl schwächer exprimieren als die Nonresponderzellen.

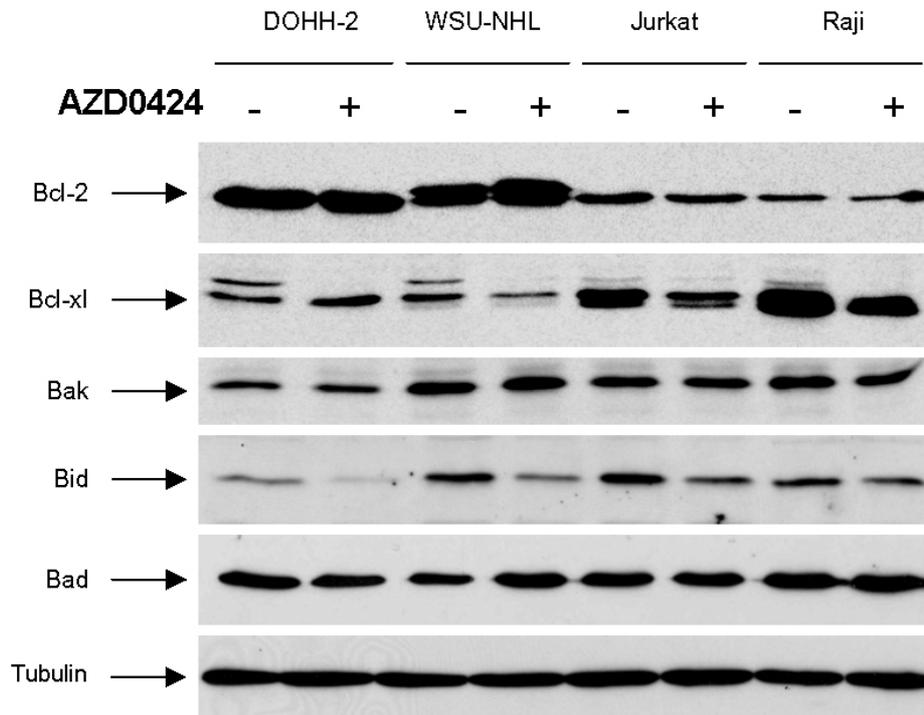


Abbildung 16: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression der Bcl-2 Mitglieder Bcl-2, Bcl-xl, Bak, Bid und Bad in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

SRC-Kinase-Inhibitoren



3.10 SRC-Kinase-Inhibitoren führen in den Responderzelllinien zu einer Downregulation von Survivin, cIAP-1 und c-Flip

Eine weitere, für die Regulation der Apoptose bedeutsame Proteinfamilie, ist die Gruppe der Inhibitoren der Apoptose-Proteine (IAP's). Ihre Hauptfunktion ist die direkte oder indirekte Inhibition bestimmter Caspasen (64, 65). Die Mitglieder cIAP-1, cIAP-2, XIAP und Survivin sowie ein weiteres apoptoseinhibierendes Molekül c-Flip wurden im nächsten Schritt untersucht. Der potenteste Inhibitor aus der IAP-Familie ist XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), gefolgt von cIAP-1, cIAP-2 und Survivin. Für alle Mitglieder außer Survivin ist eine Downregulation während der Zytostatika-induzierten Apoptose beschrieben (66). Abbildung 17 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Survivin und c-Flip in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien.

Wie zu erkennen ist, führt die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren zu einer Downregulation von cIAP-1 in den Responderzelllinien, während die Proteinexpression in den Nonresponderzelllinien unbeeinflusst bleibt. Für XIAP und cIAP-2 sind keine oder nur unbedeutende Veränderungen in der Proteinexpression zu beobachten.

Survivin, das kleinste Protein der IAP-Familie, dessen Expression während der Zytostatika-induzierten Apoptose unverändert bleibt, wird in den mit SRC-Kinase-Inhibitoren behandelten Responderzelllinien stark herunterreguliert, während es in den Nonresponderzelllinien unverändert bleibt.

C-Flip (cellular FLICE inhibitory protein) gehört nicht zur IAP-Familie, ist aber trotzdem als apoptoseinhibierendes Protein bedeutsam. Es vermag, den extrinsischen Apoptoseweg über eine Hemmung der Aktivierung von Caspase-8 im so genannten DISC-Komplex (death inducing signaling complex) zu blockieren (63). Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, kommt es durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren zu einer Downregulation von c-Flip in den Responderzelllinien, während die Expression von c-Flip in den Nonresponderzelllinien unbeeinflusst bleibt.

Diese Downregulation von verschiedenen Caspasen-inhibierenden Proteinen (cIAP-1, Survivin und c-Flip) in den Responderzelllinien ist eine mögliche Erklärung für die in 3.7. dargelegten Ergebnisse: die Aktivierung der Caspasen in den Responderzellen während der induzierten Apoptose durch SRC-Kinase-Inhibitoren.

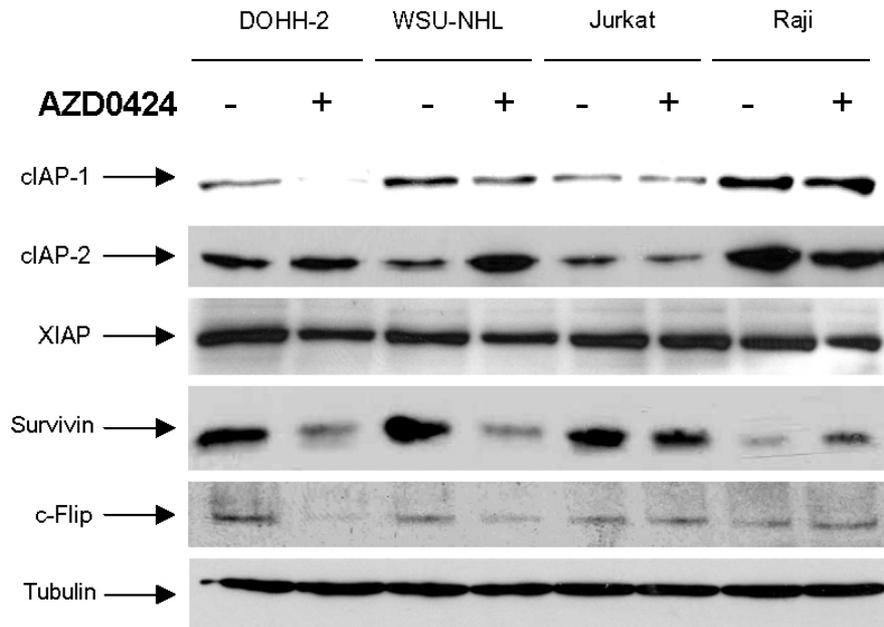
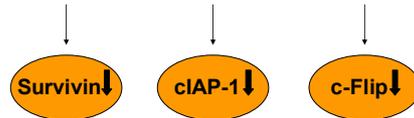


Abbildung 17: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression der Inhibitoren der Apoptose cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Survivin und c-Flip in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

SRC-Kinase-Inhibitoren



3.11 Die im Zellkern lokalisierten Proteine Daxx, Par-4 und Zip-Kinase werden nicht oder nur geringfügig durch SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst

Daxx (Death Associated Protein) und Par-4 (Prostate Apoptosis Response Gene-4) sind wichtige proapoptotische Proteine. Zum einen steigern sie die durch verschiedene Zytostatika induzierte Apoptose (72, 80, 81), zum anderen sind sie Schlüsselmoleküle für synergistische Zytostatikawirkungen in der Behandlung von CLL und Non-Hodgkin-Lymphomen (66). Zip-Kinase ist ein proapoptotisches Protein, welches sich wie Daxx und Par-4 in PML-Körperchen im Zellkern befindet und durch Interaktion mit Daxx und Par-4 die Apoptose moduliert (76). Deshalb wurde im nächsten Schritt die Expression dieser Proteine untersucht. Abbildung 18 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Daxx, Par-4 und Zip-Kinase in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien. Diese unterscheiden sich nicht im basalen Expressionslevel der drei untersuchten Proteine.

Im Gegensatz zur Zytostatika-induzierten Apoptose, wo es zu einer Downregulation von Par-4 und Daxx kommt (66), sind die Veränderungen der Expression von Par-4 und Daxx in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose gar nicht vorhanden oder nur geringfügig und so heterogen, dass sie keine allgemeine Schlussfolgerung zulassen. So kommt es lediglich in den behandelten DOHH-2-Zellen zu einer Abnahme von Daxx und einer geringen Abnahme von Par-4. Raji-Zellen zeigen eine geringe Abnahme von Daxx unter Behandlung und Jurkat-Zellen zeigen eine Abnahme von Par-4 unter Behandlung.

Ebenso wird die Expression der Zip-Kinase durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren nicht beeinflusst: es gibt keine Veränderungen der Proteinexpression vor oder nach Behandlung in Responder- oder Nonresponderzelllinien.

Damit scheint der kürzlich neu beschriebene Apoptoseweg, in welchen diese drei Proteine involviert sind (76), in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose keine wesentliche Rolle zu spielen.

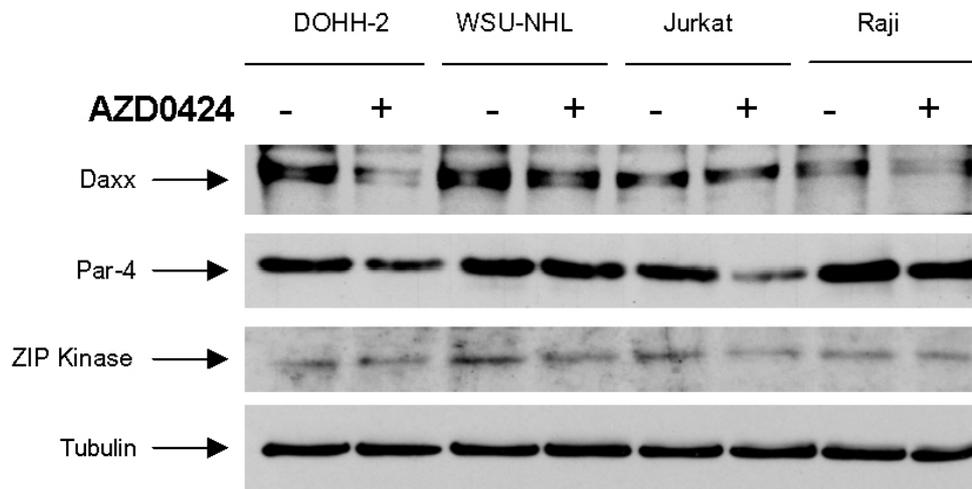


Abbildung 18: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Daxx, Par-4 und Zip-Kinase in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

3.12 SRC-Kinase-Inhibitoren führen zu einer Downregulation von Rb, während die Expression von p53 unbeeinflusst bleibt

Die in 3.4 beobachtete Beeinflussung des Zellzykluses der Responderzelllinien durch die SRC-Kinase-Inhibitoren führte dazu, die Expression wichtiger Tumorsuppressor- und Zellzyklusregulatorproteine, nämlich p53 und Rb zu untersuchen (97).

In Abbildung 19 sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von p53 und Rb in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien dargestellt. Die basale Expression von p53 ist in den verschiedenen Zelllinien sehr heterogen und sie verändert sich nicht durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor. Währenddessen kommt es durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren zu einer Downregulation von Rb in DOHH-2-, WSU-NHL- und Jurkat-Zellen. Die Raji-Zellen exprimieren so wenig Rb, dass kein Rückschluss auf eine Veränderung unter Behandlung möglich ist. Somit scheint die beobachtete Downregulation von Rb unabhängig vom Responder- bzw. Nonresponderstatus zu sein.

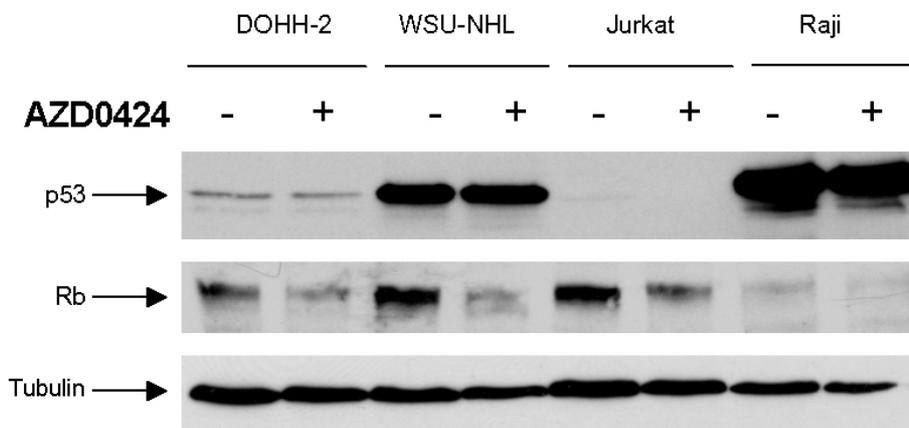


Abbildung 19: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von p53 und Rb in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

3.13 SRC-Kinase-Inhibitoren führen in Responderzelllinien zu einer Downregulation von c-Abl und zu einer Abnahme der Akt-Phosphorylierung

Viele Substanzen, die ursprünglich als SRC-Kinase-Inhibitoren entwickelt wurden, üben gleichzeitig auch inhibierende Effekte auf die c-Abl-Kinase und Akt aus (17, 35, 98, 99). Für die Gruppe der C-5-substituierten (Benzodioxolylamino) Quinazolin-Analoga wurde die duale SRC-/Abl-Kinase-Inhibition bereits beschrieben (126). Dies veranlasste zur Untersuchung der Proteinexpression von c-Abl, phosphoryliertem Abl (p-Abl-Tyr245), Akt und phosphoryliertem Akt (p-Akt-Ser473) in den getesteten Zelllinien.

Abbildung 20 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von c-Abl, p-Abl-Tyr245, Akt und p-Akt-Ser473 in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien. Diese unterscheiden sich nicht im basalen Expressionslevel der vier untersuchten Proteine. Durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren kommt es ausschließlich in den Responderzellen zu einer beträchtlichen Downregulation der c-Abl-Kinase, während die Expression in den Nonresponderzelllinien unbeeinträchtigt bleibt. Dies legt nahe, dass die c-Abl-Inhibition oder deren Regulation ein entscheidender Mechanismus für die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose in Lymphomzellen ist. Weiterhin ist eine Downregulation der phosphorylierten Isoform p-Abl-Tyr245 nach Behandlung in allen Zellen zu beobachten.

Wie in Abbildung 20 ebenfalls zu erkennen ist, kommt es ausschließlich in den behandelten Responderzelllinien zu einer Abnahme der phosphorylierten Isoform p-Akt-Ser473, während die Expression in den Nonresponderzelllinien unbeeinflusst bleibt. Die Gesamtexpression von Akt zeigt unter Behandlung keine Veränderung, die eine allgemeine Schlussfolgerung zulässt.

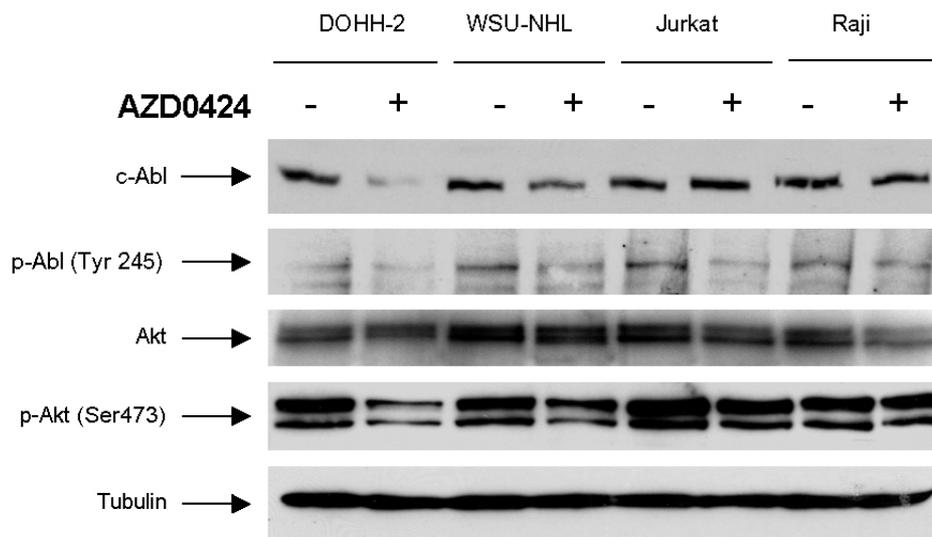
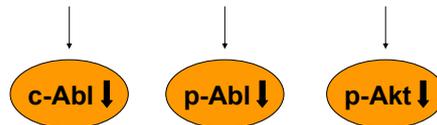


Abbildung 20: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von c-Abl, p-Abl (Tyr245), Akt und p-Akt (Ser473) in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

SRC-Kinase-Inhibitoren



3.14 Responderzelllinien exprimieren deutlich weniger c-Myc als Nonresponderzelllinien

Um weitere Unterschiede zwischen Responder- und Nonresponderzellen zu identifizieren, welche das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren erklären können, wurde die Expression der Onkogene Ras und c-Myc untersucht (100, 101).

Abbildung 21 zeigt die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Ras und c-Myc in unbehandelten und behandelten Responder- und Nonresponderzelllinien. Wie zu erkennen ist, sind die basalen Expressionslevel von Ras identisch in Responder- und Nonresponderzelllinien. Diese bleiben durch die Behandlung mit den getesteten Substanzen unverändert.

Wie in Abbildung 21 weiterhin zu erkennen ist, unterscheiden sich Responder- und Nonresponderzelllinien durch die Menge an basal exprimiertem c-Myc: die Responderzelllinien exprimieren deutlich weniger c-Myc als die Nonresponderzelllinien. Dies könnte eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen der Responder- und Nonresponderzelllinien auf die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren sein.

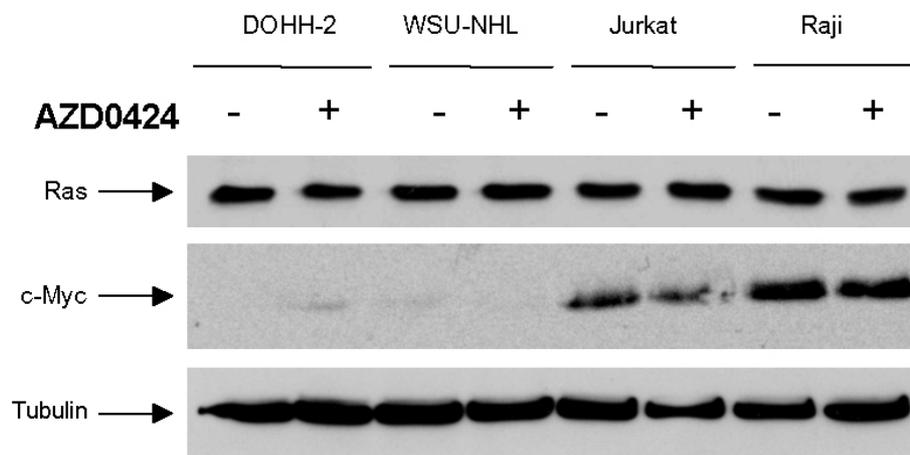


Abbildung 21: Dargestellt sind die Western Blot Ergebnisse der Proteinexpression von Ras und c-Myc in unbehandelten (-) und mit AZD0424 behandelten (+) DOHH-2-, WSU-NHL-, Jurkat- und Raji-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit. Ladungskontrollen wurden mit Tubulin durchgeführt.

- Die Responderzellen DOHH-2 und WSU-NHL exprimieren weniger c-Myc.

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass die SRC-Kinase-Inhibitoren AZD0424, AZD0530 und AZM559756 (AstraZeneca) in der Lage sind, in ausgewählten Bcr-Abl-, c-Kit- und PDGF-negativen B-Zell-Lymphomzelllinien gezielt Apoptose zu induzieren und die Zellprogression durch eine Beeinflussung des Zellzykluses zu unterdrücken. Damit stellen sie eine neue, aussichtsreiche Therapieoption in der Behandlung der Lymphomerkkrankungen dar. Von den drei getesteten Substanzen erwies sich AZD0424 als der am stärksten wirksame Apoptose-Induktor und AZM559756 als der am schwächsten wirksame Apoptose-Induktor. Sowohl in der Apoptosemessung, die auf der Detektion von Annexin V beruht, als auch in der Apoptosemessung, die die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials nachweist, konnten mit den niedrigsten Konzentrationen von AZD0424 die höchsten Apoptoseraten in den Responderzellen erzielt werden.

SRC-Kinase-Inhibitoren wurden ursprünglich entwickelt, um die zunehmende Resistenz gegen die Vorreitersubstanz der „Molecular Targeted Therapy“ Imatinib (*Glivec*®) in der Behandlung der CML (Chronisch Myeloische Leukämie) zu umgehen (98). Von der Beeinflussung der SRC-Kinasen, welche downstream der typischen Imatinibtargetmoleküle (Bcr-Abl, c-Kit und PDGF) lokalisiert sind, erhoffte man sich, eine neue Methode zu finden, gezielt in die in Tumorzellen fehlregulierte Signaltransduktionskette einzugreifen, entsprechende Transformationen spezifisch zu antagonisieren und so eine nebenwirkungsärmere Therapie anzustreben. Das antiproliferative und apoptoseinduzierende Potential der SRC-Kinase-Inhibitoren konnte mehrfach in vitro sowohl in soliden Tumorzellen (14, 31, 33, 34) als auch in Imatinib-resistenten CML-Zelllinien nachgewiesen werden (36, 37, 39, 40). Dasatinib (*Sprycel*®), ein dualer SRC-/Bcr-Abl-Kinase-Inhibitor ist seit 2006 zur Behandlung Imatinib-resistenter CML- oder Philadelphia-Chromosom-positiver ALL-Patienten zugelassen und erzielt hohe hämatologische und zytogenetische Remissionsraten (85-88). Die hier untersuchten Substanzen zählen zur Gruppe der C-5-substituierten (Benzodioxolylamino) Quinazolin-Analoga, die ebenso als duale SRC-/Abl-Kinase-Inhibitoren charakterisiert sind (126).

Gerade für die Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL), die zur Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome zählt, wird postuliert, dass Störungen der Induktion und des Ablaufs der Apoptose entscheidend sind für die Pathogenese der Erkrankung, die durch bisherige, konventionelle Chemotherapeutika nicht antagonisierbar sind (83, 84). So wurden die verschiedenen Apoptosewege inklusive ihrer Schlüsselmoleküle in Hinblick auf eine mögliche

Beeinflussung durch SRC-Kinase-Inhibitoren untersucht. Interessanterweise waren die getesteten Lymphomzelllinien unterschiedlich sensitiv in Bezug auf die apoptoseinduzierenden Eigenschaften der SRC-Kinase-Inhibitoren. Zu den sensitiven Zelllinien gehören die B-Zell-Lymphomzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL, wobei sich DOHH-2 als die sensitivste Zelllinie erwies. Alle drei Substanzen konnten in DOHH-2-Zellen bei Einsatz niedriger Konzentrationen die höchsten Apoptoseraten erzielen. So konnte mit AZD0424 schon bei einer Konzentration von 1 μ M eine Apoptoserate von 75% erzielt werden, während mit AZD0530 mit einer Konzentration von 5 μ M nur eine Apoptoserate von 50% erreicht wurde. Zu den Zelllinien, die nicht auf eine Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren ansprechen, gehören die T-Zell-Lymphomzelllinien Karpas-299 und HUT 78, die T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat und die Burkitt-Lymphomzelllinie Raji. Stellvertretend für alle Nonresponderzelllinien wurden alle nachfolgenden Untersuchungen mit den Nonresponderzelllinien Jurkat und Raji gemacht. Mittels dieser Einteilung in Responder- und Nonresponderzelllinien konnte ein Modell geschaffen werden, mit dem gezielt nach Unterschieden zwischen Responder- und Nonresponderzellen gesucht werden konnte und so mögliche Ursachen für das Vorliegen einer Sensitivität oder Resistenz gegen die getesteten Substanzen identifiziert werden konnten. Im Anschluss an die Apoptosemessungen und Zellzyklusanalysen erfolgten Untersuchungen zur Immunphänotypisierung, zum Expressionsmuster der SRC-Kinasen, der apoptoserelevanten Proteine sowie weiterer, wichtiger Tumorsuppressorproteine und Zellzyklusregulatoren.

Da beide Responderzelllinien zur Gruppe der B-Zell-Reihe gehören und die Nonresponderzelllinien mit Ausnahme der Raji-Zellen der T-Zell-Reihe zuzuordnen sind, wurde zunächst eine Immunphänotypisierung für folgende Oberflächenmoleküle durchgeführt: CD19, CD20, CD22, CD45 und ZAP-70. Erwartungsgemäß konnten die B-Zellmarker CD19, CD20 und CD22 auf den DOHH-2-, WSU-NHL- und Raji-Zellen nachgewiesen werden. Da die Raji-Zellen aber zur Gruppe der Nonresponder gehören, kann nicht verallgemeinert werden, dass das Ansprechen der Responder mit der Zugehörigkeit zur Gruppe der B-Zellen assoziiert ist. Des Weiteren waren alle getesteten Zellreihen positiv für CD45, eine transmembranöse Tyrosinphosphatase, welche durch Dephosphorylierung des C-terminalen Endes der SRC-Kinasen diese in ihre aktivierte Form überführen kann (15, 16, 89, 92). Somit scheint die Expression von CD45 und die damit verbundene Aktivierung oder Inaktivierung der SRC-Kinasen nicht entscheidend zu sein für die Sensitivität der Zellen bezüglich der Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren. ZAP-70 ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die als prognostischer Marker bei CLL bedeutsam ist. Keine oder eine geringe

Expression in B-CLL-Zellen ist mit einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung und einem kürzeren Überlebenszeitraum assoziiert (93, 102). ZAP-70 konnte nicht in den Responderzelllinien nachgewiesen werden, dafür aber in allen Nonresponderzelllinien mit Ausnahme der Raji-Zellen und somit in allen T-Zell-Abkömmlingen. Somit könnte die Abwesenheit von ZAP-70 in den Responderzelllinien ein Faktor sein, der das Ansprechen der Zellen auf die SRC-Kinase-Inhibitoren begünstigt. Diese Schlussfolgerung wird dadurch eingeschränkt, dass die Raji-Zellen negativ sind für ZAP-70, aber zur Gruppe der Nonresponder gehören.

Untersuchungen zur basalen Expression und Aktivität der SRC-Kinasen

Die Untersuchung der basalen Expression der acht SRC-Kinasen Src, Hck, Lck, Lyn, Yes, Fyn, Fgr und Blk in den Lymphomzelllinien zeigte ein ausgesprochen heterogenes Expressionsmuster, welches nicht mit dem Expressionsmuster in gesunden Leukozyten übereinstimmt (16). So exprimieren die B-Zell-Abkömmlinge DOHH-2 und WSU-NHL zusätzlich die SRC-Kinasen Hck und Lck, welche in nicht entarteten B-Lymphozyten nicht exprimiert werden. Die Raji-Zellen, die auch zur Gruppe der B-Zellen gehören, exprimieren zusätzlich noch Src, welches in nicht entarteten Lymphozyten nicht nachweisbar ist. Dies unterstützt die schon mehrfach beschriebene Hypothese, dass SRC-Kinasen in vielen malignen Erkrankungen fehlreguliert sind und ein vom Normalzustand abweichendes Expressionsmuster aufzeigen (14, 20, 25-28, 108). Des Weiteren trug das basale Expressionsmuster der SRC-Kinasen nicht dazu bei, Unterschiede zwischen Responder- und Nonresponderzelllinien zu identifizieren: es konnten keine spezifischen Kinasen gefunden werden, die nur in Responder- bzw. Nonresponderzellen vorkommen und damit für das Ansprechen oder Nichtansprechen auf die zu testenden Substanzen verantwortlich sind.

Die enzymatische Aktivität der SRC-Kinasen ist in vielen malignen Erkrankungen pathologisch gesteigert (14, 20, 25-28, 108). So wird vermutet, dass SRC-Kinasen in transformierten Zellen konstitutiv aktiviert sind. Dies bedeutet, dass sie nicht wie in gesunden Zellen nur kurzzeitig aktiviert werden, um ihre Funktionen in Zellwachstums- und Zellteilungsprozessen zu erfüllen, sondern sie dauerhaft aktiviert sind und so Zellproliferation in gesteigertem Maße unterhalten. Ursächlich dafür kommen Mutationen in allen Bereichen in Frage, die die SRC-Kinaseaktivität negativ regulieren, so dass die aktivierte Form überexprimiert wird (siehe 1.2.1). Demzufolge wurden die Responder- und Nonresponderzelllinien bezüglich ihres Proteingehaltes bestimmter phosphorylierter Isoformen ohne und nach Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren verglichen. Diese

Untersuchungen wurden dadurch limitiert, dass Antikörper nur gegen die phosphorylierten Formen von Src, Hck, Lck und Lyn verfügbar waren. Interessanterweise führte die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren in den behandelten Responder- und Nonresponderzellen zu einer Downregulation von phosphoryliertem p-Lck-Tyr505 und phosphoryliertem p-Lyn-Tyr507. Wie oben bereits erwähnt, zählt Lck zu den Kinasen, die in gesunden B-Lymphozyten gar nicht exprimiert werden (16). Lyn wiederum ist ein entscheidendes Schlüsselmolekül für die durch den B-Zell-Rezeptor vermittelte Steuerung von Apoptose und Zellüberleben (89). Contri et al konnten nachweisen, dass Lyn in B-CLL-Zellen überexprimiert und konstitutiv aktiviert ist (89) und damit zu den pathogenetischen Eckpunkten dieser Erkrankung zählt. Dass es aber zu einer Downregulation dieser phosphorylierten Isoformen kommt, ist insofern verwunderlich, da in einer Reihe von Veröffentlichungen von einem Modell ausgegangen wird, in dem die Phosphorylierung an diesen Aminosäureresten zu einer Inaktivierung des Enzym führt, währenddessen eine Phosphorylierung an Lck-Tyr394 und Lyn-Tyr397 in einer Aktivierung des Enzyms resultiert (15, 92, 118). Entsprechend dieses Modells würden die SRC-Kinase-Inhibitoren durch eine Downregulation der phosphorylierten Formen p-Lck-Tyr505 und p-Lyn-Tyr507 zu einer Aktivierung der Kinasen führen und somit eine konstitutive Aktivierung noch weiter verstärken. Die hier präsentierten Ergebnisse unterstützen andere Veröffentlichungen, die aufzeigen, dass die Aktivierung der Kinasen nicht im Sinne dieses einfachen Modells verstanden werden kann, sondern dass der letztendliche Aktivitätszustand des Enzyms von den Veränderungen an mehreren strukturellen Domänen bestimmt wird. So kann die SRC-Kinase Lck trotz der Phosphorylierung an Tyr505 konstitutiv aktiviert sein (119-121). Neuere Veröffentlichungen kommen zu der Hypothese, dass für eine Abnahme der Lck-Kinaseaktivität Dephosphorylierungen an beiden regulatorischen Bereichen des Enzyms erforderlich sind (122). Demzufolge interpretieren wir die hier gezeigte Downregulation der phosphorylierten Formen von p-Lck-Tyr505 und p-Lyn-Tyr507 als Schritte, die zur Inhibition der entsprechenden Kinasen führen. Diese Hypothese wird zusätzlich durch das Ergebnis unterstützt, dass die Gesamtproteinmenge der SRC-Kinase Lck durch die Behandlung mit den Kinase-Inhibitoren herunterreguliert wird. So ist es doch nur schwer denkbar, dass es unter Behandlung zu einer Steigerung der Enzymaktivität kommt, obwohl die Gesamtexpression an Enzym abnimmt. Diese Interpretation geht mit dem Ergebnis von Contri et al konform, die zeigen konnten, dass es in B-CLL-Patientenzellen durch den selektiven Lyn-Kinase-Inhibitor PP2 zu einer Hemmung der basalen Lyn-Aktivität kommt, die zusätzlich noch mit der erzielten Apoptoserate korreliert (89). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die

Behandlung mit den hier getesteten SRC-Kinase-Inhibitoren zwei SRC-Kinasen maßgeblich beeinflusst werden, die wie oben bereits erläutert, vermutlich maßgeblich an der Pathogenese der CLL in diesen Zellen beteiligt sind. Dass die beobachteten Downregulationen auch in den Nonresponderzelllinien nachweisbar waren, führt zu der Hypothese, dass diese Veränderungen nicht allein für die erzielten Apoptoseraten in den Responderzellen verantwortlich sein können. Andere Mechanismen, die ausschließlich in den Responderzelllinien nachweisbar sind, müssen vorhanden sein, um dann letztendlich im Zusammenspiel mit allen anderen Phänomenen die apoptoseinduzierenden Eigenschaften der SRC-Kinase-Inhibitoren zu erklären. Ein solches Ereignis könnte die ausschließlich in den behandelten Responderzellen beobachtete Downregulation der SRC-Kinase Fyn sein. Für alle drei Kinasen (Fyn, Lck und Lyn) ist eine Funktion für das Vorantreiben des Zellzykluses beschrieben (15), so dass man von deren gemeinsamen Inhibition auf eine verminderte Zellprogression schließen kann, wie sie im übrigen ausschließlich in den Responderzelllinien nachgewiesen wurde.

Untersuchungen zur Apoptose

Der zweite Teil der Arbeit widmete sich der Untersuchung der Apoptosekaskade. Insbesondere die Frage, welche Apoptosewege aktiviert und welche Proteine maßgeblich durch die Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren beeinflusst werden, sollte beantwortet werden. Es konnte durch verschiedene Untersuchungen gezeigt werden, dass die Apoptose in den Responderzelllinien DOHH-2 und WSU-NHL durch die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren sowohl über eine Aktivierung des extrinsischen, als auch des intrinsischen Weges induziert wird (48-50). Mittels der fluorometrischen Caspasenaktivitätsassays wurde in allen behandelten Responderzelllinien eine gesteigerte Aktivität sowohl der Initiatorcaspasen-8 (für den extrinsischen Weg) und -9 (für den intrinsischen Weg) als auch der Exekutorcaspasen-3, -6 und -7 nachgewiesen, während in den Nonresponderzelllinien die Caspasenaktivität auf dem gleichen Niveau wie in den unbehandelten Kontrollzellen bleibt. Vergleichbare Ergebnisse wurden von Lee et al in B-Zell-Leukämiezellen mit dem selektiven Lyn-Kinase-Inhibitor PP2 erzielt: auch hier konnte in der apoptotischen Zellfraktion die Aktivierung von Caspase-3 nachgewiesen werden (32). Aktivierte Caspasen starten dann eine Signalkaskade, die den weiteren Ablauf der Apoptosewege bestimmt: so spaltet aktivierte Caspase-8 das Bcl-2 Mitglied Bid so, dass es ein hydrophobes, C-terminales Ende bekommt (53). Infolgedessen transloziert es vom Zytoplasma in die Mitochondrienmembran und initiiert damit die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (53). Diese Spaltung von

Bid konnte in den Responderzelllinien stark und in den Nonresponderzellen schwach nachgewiesen werden: nach Zusatz von SRC-Kinase-Inhibitor sinkt der Gehalt an ungespaltenem Bid. Ebenso konnte die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) nachgewiesen werden: alle drei getesteten Substanzen führen in der Responderzelllinie DOHH-2 mit steigender Konzentration zu einer zunehmenden Anzahl von Zellen mit zerstörtem MMP. Aktivierte Caspase-3 und -7 führen in der Endstrecke der Apoptose zur Spaltung von PARP (51, 52). Dieser Vorgang konnte ausschließlich in den Responderzelllinien nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte bewiesen werden, dass die Caspasen unabdingbare Schlüsselmoleküle für die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose sind. Bei Zusatz von Pancaspase-Inhibitor kam es beim Einsatz aller drei Substanzen zu einem massiven Rückgang der Apoptoserate in den behandelten DOHH-2-Zellen bis annähernd auf den Wert der Spontanapoptoserate der unbehandelten Kontrollen. Ferner wurde durch den separaten Einsatz von Caspase-3 bzw. Caspase-8 Inhibitor gezeigt, dass es der Aktivierung mehrerer Caspasen bedarf, um maximale Apoptoseraten zu erzielen, und weder aktivierte Caspase-3, noch aktivierte Caspase-8 alleine ausreichen, um maximale Apoptoseraten zu erreichen.

Eine weitere Beobachtung war, dass die apoptoseinduzierenden Prozesse unterstützt wurden durch die Downregulation des antiapoptotischen Proteins Bcl-xl (56), die Downregulation von Survivin und cIAP-1, die zur Gruppe der Inhibitoren der Apoptose-Proteine gehören (64, 65), und die Downregulation von c-Flip, welches den extrinsischen Apoptoseweg über eine Hemmung der Aktivierung von Caspase-8 im so genannten DISC-Komplex blockieren vermag (63). Dies ist insofern überraschend, da diese Proteine, ausgenommen cIAP-1, in den gleichen Zelllinien während der durch konventionelle Zytostatika induzierten Apoptose unbeeinflusst bleiben (66). So kommt es in den gleichen Zellen durch Behandlung mit konventionellen Zytostatika zur Downregulation von XIAP und cIAP-1, während die Expression von Survivin und Bcl-xl nicht beeinflusst wird (66, 103). Die Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren führt dagegen weder in Responder-, noch in Nonresponderzelllinien zu einer Beeinflussung von XIAP. Da es auch in den Nonresponderzelllinien zu einer Downregulation von Bcl-xl in behandelten Zellen kommt, kann dies nicht der entscheidende Schritt für das Ansprechen der Zellen auf SRC-Kinase-Inhibitoren sein. Da aber die Downregulation von Survivin, c-Flip und cIAP-1 ausschließlich in den behandelten Zellen der Respondergruppe nachzuweisen ist, sind damit Schlüsselmoleküle identifiziert, die hauptverantwortlich sind für die Apoptoseinduktion und damit das Ansprechen der Responderzelllinien auf die Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren. Dies führt zu der

Hypothese, dass SRC-Kinase-Inhibitoren und konventionelle Zytostatika unterschiedliche Wege der Apoptosekaskade initiieren. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass man durch eine Kombination der Beiden in der Behandlung maligner Erkrankungen synergistische Erfolge erzielen kann, und so mit dem Einsatz niedrigerer Wirkstoffdosen einen adäquaten, eventuell nebenwirkungsärmeren Behandlungserfolg erzielt.

Die beobachtete Downregulation von Bcl-xl, c-Flip und Survivin geht mit den geschilderten Ergebnissen konform, dass die durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierte Apoptose caspasenabhängig abläuft. Die Downregulation von Bcl-xl kann dadurch erklärt werden, dass aktivierte Caspase-3 antiapoptotisches Bcl-xl inhibiert und dadurch den Apoptoseprozess verstärkt. Die Downregulation von c-Flip in behandelten Responderzellen bewirkt, dass mehr Procaspase-8 in den DISC rekrutiert wird und somit mehr aktivierte Caspase-8 gebildet wird und als Folge dessen sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Apoptoseweg induziert wird (43, 53, 63). Auch die Downregulation von Survivin bewirkt, dass die Inhibition insbesondere der Caspasen-3 und -7 unterbunden wird und infolgedessen eine gesteigerte Aktivität der Caspasen die Apoptosekaskade vorantreibt (65).

Weitere Untersuchungen zu den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bak und Bad belegten, dass die Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren die Expression dieser Proteine nicht beeinflusst. Damit scheinen sie keine Bedeutung in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose zu haben.

Weiterhin zeigten die Western Blot Analysen zu den antiapoptotischen Proteinen, dass sich Responder- und Nonresponderzelllinien bezüglich ihrer Grundexpression von Bcl-2 und Bcl-xl unterscheiden. Die Responderzelllinien exprimieren mehr antiapoptotisches Bcl-2 als die Nonresponderzelllinien. Dass B-CLL-Zellen Bcl-2 überexprimieren, wurde schon nachgewiesen und als einer der pathogenetischen Eckpunkte der Erkrankung definiert (58, 83). Der Überexpression von Bcl-2 wird eine negative prognostische Bedeutung sowie eine gesteigerte Resistenz der Zellen gegen Chemotherapeutika beigemessen (62). Trotz des höheren Proteingehaltes sind die hier untersuchten Responderzellen sensitiver für eine Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren. Somit kann die Überexpression von Bcl-2 in den Responderzellen durch Mechanismen aufgehoben werden, die das Übergewicht an antiapoptotischen Proteinen neutralisieren und die Responderzellen trotz des erhöhten Proteingehalts für die Behandlung mit SRC-Kinase-Inhibitoren sensibilisieren. Ein möglicher Mechanismus kann die Beobachtung sein, dass die Responderzelllinien weniger antiapoptotisches Bcl-xl exprimieren als die Nonresponderzelllinien. Dies ist ein Beispiel dafür, dass nicht ein Protein allein die Eigenschaften einer Zelle wie zum Beispiel die

Sensitivität auf ein Zytostatikum bestimmt, sondern diese immer durch das Zusammenwirken mehrerer Proteine determiniert werden.

Die oben beschriebene Beobachtung, dass SRC-Kinase-Inhibitoren vermutlich einen anderen Apoptoseweg initiieren als konventionelle Zytostatika wird auch dadurch unterstützt, dass sie in den hier dargelegten Ergebnissen keinen Einfluss auf die Proteine Par-4, Daxx und Zip-Kinase ausüben. Sie sind Bestandteile der PML Nuclear Bodies und sind laut Kawai et al vermutlich maßgeblich an einem neuen Weg der Apoptose beteiligt (76). Ihre proapoptotische Funktion konnte schon vielfach gezeigt werden (72, 77-81). Insbesondere erhöht die Expression von Par-4 die Sensitivität bcr-abl-positiver und bcr-abl-negativer Zellen bezüglich einer Behandlung mit Imatinib (104, 105). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass es während der durch konventionelle Zytostatika induzierten Apoptose zu einer Downregulation von Par-4 und Daxx kommt (66). Diese Downregulation konnte nicht in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Lediglich die DOHH-2-Zellen zeigen nach Behandlung einen geringeren Proteingehalt an Daxx und einen geringfügig niedrigeren Proteingehalt an Par-4, aber im Vergleich zu den Veränderungen in den WSU-NHL- und den Nonresponderzelllinien sind die Unterschiede so heterogen, dass keine allgemeine Schlussfolgerung getroffen werden kann. Ebenso unterscheiden sich Responder- und Nonresponderzelllinien nicht bezüglich ihrer Grundexpression von Par-4, Daxx und Zip-Kinase. Somit scheint insbesondere die Expression von Par-4 keinen Einfluss auf das Ansprechen der Zellen auf SRC-Kinase-Inhibitoren zu haben.

Untersuchungen zum Zellzyklus

SRC-Kinasen sind an der Regulation des Zellzykluses beteiligt (95, 96) und mittels selektiver SRC-Kinase-Inhibitoren konnte bereits eine spezifische Inhibition der Zellprogression nachgewiesen werden (94). Mizenina et al zeigten, dass mittels selektiver SRC-Kinase-Inhibitoren eine Hemmung der Zellprogression über eine Hemmung der Zellen in der S-Phase oder der Mitose-Phase erfolgte (94). Mit dem hier getesteten SRC-Kinase-Inhibitor AZD0424 konnten vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der S-Phase der Zellen erzielt werden. So führte eine Behandlung mit AZD0424 in den Responderzelllinien zu einem prozentualen Anstieg der Zellen in der G0/G1-Phase sowie zu einer prozentualen Abnahme der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, während in den Nonresponderzelllinien der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase und der G0/G1-Phase nach Behandlung gleich dem der unbehandelten Kontrolle blieb. Auf der Suche nach Mechanismen, die diese Beeinflussung des Zellzykluses triggern, wurden Western Blot Analysen zu p53 und Rb,

zweier wichtiger Tumorsuppressorproteine und Zellzyklusregulatoren (97), durchgeführt. Die basale Expression von p53 ist in den verschiedenen Zelllinien sehr heterogen und bleibt unbeeinflusst durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor. Die basale Expression von Rb ist ebenso heterogen und erlaubt keine Rückschlüsse auf die unterschiedliche Sensitivität der Responder- und Nonresponderzellen. Durch die Behandlung mit dem SRC-Kinase-Inhibitor kommt es aber sowohl in Responder- als auch in Nonresponderzelllinien zu einer Downregulation von Rb. Diese Downregulation scheint im Hinblick auf die gesteigerte Apoptose verwunderlich, da Rb als Tumorsuppressor bedeutsam ist und sein Verlust in vielen malignen Erkrankungen unter anderem der Retinoblastome mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht wird (97). So kontrolliert Rb den Übergang einer Zelle von der G1- zur S-Phase und blockiert über eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F die Transkription von Genen des Zellzykluses sowie der DNS-Replikation. Reguliert wird diese Tumorsuppressorfunktion über eine Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Rb zu entsprechenden Zeiten des Zellzykluses (52). Inwieweit die hier demonstrierte Downregulation die beobachteten Verschiebungen im Zellzyklus in den Responderzellen bedingt, kann nicht abgeleitet werden, da man dafür die phosphorylierten Isoformen des Proteins hätte untersuchen müssen. Neuere Veröffentlichungen zeigen auf, dass Rb auch bedeutsam ist als Survivalfaktor und Inhibitor der Apoptose. Ebenso kann es verantwortlich für die Resistenz einer Zelle gegen Chemotherapeutika sein, so dass seine Downregulation mit Zelldifferenzierung und Apoptoseinduktion assoziiert wird (97, 106, 107). Somit kann die hier beobachtete Downregulation durchaus auch als ein apoptosevorantreibender Schritt gewertet werden. Eine weitere Erklärung für die Downregulation von Rb kann dessen Spaltung durch aktivierte Caspase-3 während der frühen Apoptose sein (97). Dagegen spricht, dass es in den Nonresponderzellen, in denen keine gesteigerte Caspase-3 Aktivität nachgewiesen werden konnte, ebenso zu einer Abnahme von Rb kommt. Letztendlich muss man sagen, dass ähnlich der Downregulation von Bcl-xl auch die Downregulation von Rb nicht alleine für das Ansprechen der Responderzellen verantwortlich ist, da entsprechende Veränderungen auch in den Nonresponderzellen zu finden sind.

Untersuchungen zu Signaltransduktionskaskaden: die c-Abl- und p-Akt-Downregulation sind entscheidende Mechanismen für die Induktion der Apoptose durch SRC-Kinase-Inhibitoren in Lymphomzellen

Da viele SRC-Kinase-Inhibitoren auch inhibierende Effekte auf die c-Abl-Kinase bzw. die Bcr-Abl-Kinase ausüben (35, 37-39) und die Gruppe der C-5-substituierten

(Benzodioxolylamino) Quinazolin-Analoga bereits als duale SRC-/Abl-Kinase-Inhibitoren charakterisiert ist (98, 126), wurde der Einfluss von AZD0424 und AZD0530 auf die Expression von c-Abl und phosphoryliertem p-Abl-Tyr245 in Lymphomzelllinien untersucht. Auch die kürzlich veröffentlichten Daten, dass Imatinib in CLL-Zellen (ebenso Bcr-Abl-, c-Kit- und PDGF-negativ) über eine Inhibition der c-Abl-Kinase Apoptose induzieren kann, gaben Anlass zur näheren Untersuchung der Expression der c-Abl-Kinase (105, 113). Die c-Abl-Kinase ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum und Zellüberleben beteiligt. Ähnlich der SRC-Kinasen erfolgt ihre Regulation über mehrere Phosphorylierungsstellen (123, 124). Die am meisten untersuchten Motive sind Tyr412 und Tyr245. Eine Phosphorylierung an beiden Stellen ist mit einer Aktivierung des Enzyms assoziiert, während das inaktive Enzym an diesen Stellen unphosphoryliert ist. Hantschel et al beschreiben, dass die Phosphorylierung an Tyr412 essentiell für die Aktivierung der c-Abl-Kinase ist, und dass es für die vollständige Aktivierung einer Phosphorylierung an Tyr245 bedarf (124). Für die SRC-Kinasen ist nachgewiesen, dass sie nach Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren in der Lage sind, die c-Abl-Kinase am Tyr412 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (124). Diese Tatsache konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da es für phosphoryliertes Abl-Tyr412 keinen erwerblichen Antikörper gab. Es konnte aber gezeigt werden, dass die SRC-Kinase-Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung der Tyr245-Isoform haben, da sowohl in den behandelten Responder- als auch Nonresponderzellen eine Downregulation von phosphoryliertem p-Abl-Tyr245 nachweisbar war. Dies veranlasst zu der Hypothese, dass SRC-Kinasen auch an der Phosphorylierung am Tyr245 beteiligt sind.

Viel entscheidender im Hinblick auf das Ansprechen der Responderzellen ist aber das Ergebnis, dass es ausschließlich in den Responderzellen zu einer beachtlichen Downregulation von c-Abl unter Behandlung mit den SRC-Kinase-Inhibitoren kommt. Damit wurde ein weiteres Schlüsselmolekül für das Ansprechen der Zellen auf SRC-Kinase-Inhibitoren identifiziert.

Als weiteres Schlüsselmolekül in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose in B-CLL-Zellen konnte Akt identifiziert werden. Akt ist ein Hauptakteur in einem der „Main Mitogenic Pathways“ (17). Verschiedene Wachstumsfaktoren führen zu Aktivierung von Akt, welches dann durch Initiierung einer bestimmten Signaltransduktionskette zur Transkription von Genen führt, die Zellwachstum und Zelldifferenzierung unterhalten und Apoptose inhibieren (109, 110). Die Aktivierung von Akt erfolgt über Phosphorylierungen an Ser473 und Tyr308 (99, 109). So konnte in den mit SRC-Kinase-Inhibitoren behandelten

Responderzelllinien eine Abnahme der phosphorylierten Form von p-Akt-Ser473 nachgewiesen werden. In den Nonresponderzellen kam es zu keiner Veränderung des Proteingehalts von phosphoryliertem p-Akt-Ser473. Damit scheint über eine Verminderung von aktiviertem Akt ein Schlüsselmechanismus identifiziert zu sein, über welchen SRC-Kinase-Inhibitoren in Lymphomzelllinien Apoptose induzieren und die Zellprogression unterdrücken können. Auch in anderen Veröffentlichungen konnte mit SRC-Kinase-Inhibitoren eine Reduktion von aktiviertem Akt nachgewiesen werden (31, 35, 99, 111). Über welche molekularen Mechanismen wird diese apoptoseinduzierende Wirkung vermittelt? Zum einen können SRC-Kinasen (insbesondere Lyn) die Aktivierung von Akt über eine Beeinflussung des SRC > Cbl > PI 3-Kinase > Akt - Pathways vermitteln (17). SRC-Kinasen phosphorylieren Cbl, welches die PI 3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) aktiviert, die wiederum über eine PI 3-Kinase-abhängige-Kinase (PDK1) Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Zum anderen können SRC-Kinasen direkt die Aktivierung von Akt über Phosphorylierung an Tyr315 und Tyr326 in ihrem katalytischen Zentrum beeinflussen (99, 109, 111, 112). Unterbindet man die Akt-Aktivierung hat das folgende Auswirkungen auf die Apoptose: zum einen unterbleibt damit die Phosphorylierung von Bad, so dass dieses sich nicht von Bcl-2 und Bcl-xl lösen kann. Dadurch wird die apoptoseinhibierende Wirkung dieser zwei Proteine antagonisiert (15, 17, 109). Dies kann auf die hier präsentierten Ergebnissen nur bedingt angewendet werden, da die Expression von Bad und Bcl-2 durch Zugabe von den SRC-Kinase-Inhibitoren unbeeinflusst blieb. Die beobachtete Downregulation von antiapoptotischen Bcl-xl könnte aber über diesen Mechanismus erklärt werden. Zum anderen führt eine Inhibition der Aktivierung von Akt zu einer gesteigerten Aktivierung von Caspase-9 und damit zu vorangetriebenen Apoptose (109). Dieser Mechanismus kann eine mögliche Erklärung für die in den Responderzellen nachgewiesene aktivierte Caspase-9 sein, die wiederum sowohl den extrinsischen, als auch den intrinsischen Weg der Apoptose vorantreibt.

Ein weiterer „Main Mitogenic Pathway“, in dessen Ablauf die SRC-Kinasen involviert sind, ist der SRC > Grb2 > Sos > Ras > Map-Kinase - Pathway (17, 20, 23, 98, 114). Um zu prüfen, ob die hier getesteten SRC-Kinase-Inhibitoren auch diesen Signalweg beeinflussen, wurde die Expression des Onkogens Ras in den Responder- und Nonresponderzellen getestet. Diese unterscheiden sich weder in der basalen Expressionsmenge, noch ändert sich diese durch die Behandlung mit den Substanzen. Damit scheint der SRC > Ras > Map-Kinase - Pathway von den SRC-Kinase-Inhibitoren vermutlich unbeeinflusst zu bleiben.

Responderzellen exprimieren weniger c-Myc als Nonresponderzellen

Auf der Suche nach weiteren Unterschieden zwischen Responder- und Nonresponderzellen konnte gezeigt werden, dass sich die Responderzellen im Gegensatz zu den Nonresponderzellen durch eine deutlich geringere c-Myc Grundexpression auszeichnen. Das Protoonkogen c-Myc kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle bei der Steuerung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose einnimmt (22, 101). So führt die Stimulation der Zelle mit Wachstumsfaktoren über zwischengeschaltete SRC-Kinasen (20, 22) zur Aktivierung von c-Myc, welches dann die Synthese von bestimmten Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen initiiert, die verantwortlich sind für den Übergang der Zelle von der G1- zur S-Phase (116, 117). Eine erhöhte oder fehlregulierte Expression von c-Myc mit der Folge der konstitutiven Aktivierung von c-Myc konnte in den unterschiedlichsten malignen Tumoren nachgewiesen werden (Neuroblastom, Kleinzelliges Lungenkarzinom, Mamma- und Kolonkarzinom und Burkitt-Lymphom) und wird mit einer schlechteren Prognose in diesen Erkrankungen in Verbindung gebracht (101, 115, 130). Diese konstitutive Aktivierung von c-Myc führt zu einer gesteigerten S-Phase und damit zu gesteigerter Zellprogression unabhängig von äußeren Stimuli. Die hier präsentierten Ergebnisse lassen vermuten, dass die hohe c-Myc Expression in den Nonresponderzelllinien mitverantwortlich ist für Resistenz dieser Zellen, die sich darauf begründet, dass durch die stark erhöhte c-Myc Aktivität die Zellprogression so stark unterhalten wird, dass der alleinige Einsatz der SRC-Kinase-Inhibitoren nicht genügt, um diese zu antagonisieren. So konnte entsprechend der in 3.4 gezeigten Ergebnisse in den behandelten Nonresponderzelllinien der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, so gut wie nicht verändert werden, während in den c-Myc-negativen, behandelten Responderzellen der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen deutlich reduziert wurde. Somit unterstützen auch diese Untersuchungen die von Pelengaris et al aufgezeigte These, dass eine Überexpression c-Myc die entartete Zelle unempfindlich macht für apoptoseinduzierende Stimuli (101). An der Regulation der Expression von c-Myc sind sowohl SRC-Kinasen, als auch Akt beteiligt. Dominguez-Caceres et al berichteten, dass die SRC-Kinasen und aktiviertes Akt für die Expression von c-Myc benötigt werden (20, 22). Inwieweit diese Mechanismen in der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose beeinflusst werden, konnte nicht ausreichend in diesem Versuchsansatz geklärt werden, da die hier untersuchten Responderzellen per se kein c-Myc exprimieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Behandlungserfolg maligner Erkrankungen mit konventionellen Chemotherapeutika wird durch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten infolge schwerer Nebenwirkungen aufgrund der unselektiven Wirkung auf den proliferierenden Zellpool und durch zunehmende Resistenzentwicklungen gegen das jeweils eingesetzte Therapeutikum limitiert. Zusätzlich wirken konventionelle Chemotherapeutika bei niedrig-malignen Tumoren mit geringer Proliferationsrate nur unzureichend. Intensive Forschungen beschäftigen sich deshalb mit der Entwicklung spezifischer Therapeutika, die ausschließlich den entarteten Zellklon angreifen, indem sie den zur Transformation der Zelle führenden molekularen Mechanismus, der zur Störung der Induktion oder des Ablauf des programmierten Zelltodes (Apoptose) oder zur gesteigerten Zellprogression führt, gezielt antagonisieren.

SRC-Kinase-Inhibitoren gehören zu diesen innovativen Substanzen der so genannten „Molecular Targeted Therapy“. Sie hemmen selektiv SRC-Kinasen, die zur Gruppe der intrazellulären Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen und an der Pathogenese verschiedener malignen Erkrankungen beteiligt sind. Ihr antiproliferatives Potential konnte in vitro sowohl in der Therapie solider Tumoren, als auch der CML und CLL nachgewiesen werden.

In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass die neuen SRC-Kinase-Inhibitoren AZD0424, AZD0530 und AZM559756 bei Einsatz mikromolarer Konzentrationen in der Lage sind, in Bcr-Abl-, c-Kit- und PDGF-negativen B-Zell-Lymphomzelllinien Apoptose zu induzieren und die Zellprogression durch Beeinflussung des Zellzykluses zu unterdrücken. Dabei erwies sich die Substanz AZD0424 als der am stärksten wirksame Apoptose-Induktor.

Durch umfangreiche Untersuchungen der Responder- (DOHH-2 und WSU-NHL) und Nonresponderzellen (Jurkat und Raji) zur Apoptosekaskade konnten die Schlüsselmoleküle des durch die neuen SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten programmierten Zelltodes identifiziert werden. So lies sich die Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges nachweisen. In Responderzellen erfolgten eine Aktivierung von Initiator- (-8 und -9) und Exekutorcaspasen (-3, -6 und -7), die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials sowie die Spaltung von Bid, Rb und PARP. Des Weiteren konnten in den Responderzellen eine Downregulation von antiapoptotischen Bcl-xl und eine Downregulation der Apoptoseinhibitoren Survivin, cIAP-1 und c-Flip als apoptosevorantreibene Schritte identifiziert werden. Ebenso lies sich ausschließlich in den behandelten Responderzellen eine Downregulation der c-Abl-Kinase und eine Verminderung der Akt-Phosphorylierung nachweisen.

Die Untersuchung der basalen Expression der SRC-Kinasen in den getesteten Lymphomzelllinien bestätigte, dass SRC-Kinasen in unterschiedlichen malignen Erkrankungen fehlgesteuert sind und sich durch ein vom Normalzustand abweichendes Expressionsmuster auszeichnen. Des Weiteren konnten Lyn, Fyn und Lck als Haupteffektor-SRC-Kinasen der neuen SRC-Kinase-Inhibitoren identifiziert werden: so lies sich in allen behandelten Zellen eine Downregulation der SRC-Kinase Lck sowie der phosphorylierten Isoformen p-Lck-Tyr505 und p-Lyn-Tyr507 nachweisen.

Durch vergleichende Western Blot Analysen zwischen Responder- und Nonresponderzelllinien gelang es, Charakteristika der Zellen zu identifizieren, die Erklärungen für das unterschiedliche Ansprechen der Zellen auf SRC-Kinase-Inhibitoren anbieten. So wurde gezeigt, dass sich Responderzellen im Gegensatz zu Nonresponderzellen durch eine deutlich geringere c-Myc Expression auszeichnen.

Somit deckt diese Arbeit die molekularen Mechanismen der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptosekaskade in B-Zell-Lymphomzellen auf, zeigt wesentliche Schlüssel-moleküle der SRC-vermittelten intrazellulären Signaltransduktion auf, die letztendlich zur Initiierung des programmierten Zelltodes und der Inhibition der Zellzyklusprogression führen und identifiziert entscheidende, für das Ansprechen der Zellen verantwortliche Proteine.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass die neuen SRC-Kinase-Inhibitoren großes antiproliferatives Potential in B-Zell-Lymphomzellen besitzen. Damit stellen sie eine neue, aussichtsreiche Therapieoption in der Behandlung der Lymphomerkkrankungen dar. Insbesondere für die Therapie der niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphome, für die es trotz zahlreicher Forschungsanstrebungen bis heute keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten gibt, könnten mit diesen Substanzen verbesserte Heilungschancen erzielt werden. Durch die Aufdeckung der molekularen Mechanismen der durch SRC-Kinase-Inhibitoren induzierten Apoptose, die sich in der Tat von denen der konventionellen Zytostatika unterscheiden, ergibt sich ferner die Möglichkeit, durch eine Kombination beider Chemotherapeutika synergistische Erfolge in der Behandlung maligner Erkrankungen zu erreichen. So könnten zum einen durch Einsatz niedriger Wirkstoffdosen die Nebenwirkungen für den Patienten reduziert werden. Zum anderen könnten mittels der neuen SRC-Kinase-Inhibitoren Resistenzen gegen konventionelle Zytostatika überwunden werden. Somit liefert diese Arbeit wesentliche Grundlagen für weitere, aussichtsreiche in vivo Untersuchungen der SRC-Kinase-Inhibitoren bezüglich einer Optimierung der Therapie der Lymphomerkkrankungen.

SUMMARY

Most conventional cytotoxic drugs are characterized by severe side effects which lead to considerable morbidity and mortality in the treatment of malignancies. These drugs do not only destroy neoplastic cells but also harm healthy tissues. Moreover, their unspecific effects result in minimal cure rates especially in low grade malignancies, e.g. low grade Non-Hodgkin-Lymphomas. Primary or secondary resistance of the malignant clone presents the major clinical obstacle which prevents remission and definite cure.

Therefore, the concept of “molecular targeted therapies” which specifically target the malignant clone while sparing normal cells is most appealing. Different substances like monoclonal antibodies or tyrosine kinase inhibitors are currently tested in clinical studies.

SRC Kinase Inhibitors belong to this innovative group of “targeted therapies”. They selectively inhibit SRC-Kinases which are nonreceptor intracellular tyrosine kinases. These tyrosine kinase inhibitors are part of intracellular signalling pathways including regulation of proliferation, cell motility, adhesion, tumor invasiveness, angiogenesis, immune cell signalling, cell cycle control and apoptosis. Indeed, results from studies with SRC Kinase Inhibitors show that they are able to elicit antiproliferative effects, induce apoptosis, reduce cancer invasiveness and also exert inhibitory effects on Imatinib targets such as c-Kit and Bcr-Abl offering possibilities to overcome Imatinib resistance.

In this dissertation could be demonstrated that three recently developed selective SRC Kinase Inhibitors (AZD0424, AZD0530 and AZM559756) are able to induce apoptosis and cell cycle arrest in Bcr-Abl-, c-Kit and platelet-derived growth factor (PDGF) -negative lymphoma cell lines. AZD0424 emerged to be the most effective of the three tested inhibitors, inducing the highest levels of apoptosis with the lowest concentrations.

Treatment of DOHH-2, WSU-NHL, Raji, Karpas-299, HUT78 and Jurkat cells with escalating concentrations of SRC Kinase Inhibitors revealed that the tested substances were effective on these parameters in the cell lines DOHH-2 and WSU-NHL, whereas the other tested cell lines remained unaffected. Thus, the lymphoma cell lines could clearly be separated into a group of sensitive and resistant cell lines to these substances.

Extensive examinations between sensitive and resistant cell lines according to the potential apoptosis inducing properties of the new SRC Kinase Inhibitors showed that extrinsic as well as intrinsic apoptosis pathways were activated only in sensitive cell lines. Downregulation of Survivin, c-IAP-1, Bcl-xl and c-Flip, enhanced activation of caspases -8, -9, -3, -7 and -6 and cleavage of PARP, Bid and Rb could be observed in responder cell lines upon treatment with SRC Kinase Inhibitors.

Interestingly, protein levels of c-Abl were downregulated and Akt phosphorylation was decreased by treatment with SRC Kinase Inhibitor in responder cell lines while these parameters remained unaffected in non-responder cell lines.

Assessment of SRC-Kinase expression in all cell lines revealed heterogeneous and irregular expression patterns not in accordance with expressional patterns detected in normal leukocytes. These observations once more support the hypothesis of deregulated expression of SRC Kinases in malignancies. In order to identify main target SRC Kinases especially influenced by the treatment of SRC Kinase Inhibitors, we analysed phosphorylated SRC Kinases and found that phosphorylation of Lyn and in particular Lck were affected most heavily by treatment with the SRC Kinase Inhibitors, and may therefore represent the candidate SRC Kinases responsible for mediating the apoptotic effects.

Furthermore, basal expression levels of c-Myc were notably lower in sensitive cell lines as compared with non-sensitive cell lines, possibly providing an explanation for sensitivity versus resistance against these novel substances.

In conclusion, these examinations show that new SRC Kinase Inhibitors AZD0424, AZD0530 and AZM559756 potently induce apoptosis and cell cycle arrest in certain types of lymphoma cell lines at micromolar concentrations and may therefore represent a promising new treatment option for these malignancies. Particularly for the therapy of low grade lymphomas and CLL, for which there are still no curative treatment possibilities, these substances could reach better cure rates. It could be demonstrated that apoptosis induction by these new agents is associated with the activation of a unique pattern of apoptosis pathways which considerably differ from pathways activated by other apoptosis inducers such as conventional cytotoxic drugs. This fact leads to the hypothesis that a combination of both treatment groups may achieve synergistic effects in the therapy of lymphomas. Additionally, SRC Kinase Inhibitors are promising weapons to overcome chemoresistance against conventional cytotoxic drugs.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Thomas Karow, 2003
2. Pharmakologie und Toxikologie, Lüllmann, Mohr, Wehling, 15. Auflage, 2003
3. Boehrer S, Nowak D, Hoelzer D, Mitrou PS, Chow KU: Novel agents aiming at specific molecular targets increase chemosensitivity and overcome chemoresistance in hematopoietic malignancies, 2006, *Curr Pharm Des*, 12, 111-28
4. Dr. rer. nat Nicola Siegmund-Schultze: Die Molekularbiologie erobert Diagnostik und Therapie, *Deutsches Ärzteblatt*, Jg.105, Heft 10, 07.März 2008
5. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM: Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy, 1999, *Ann Intern Med*, 131, 207-19
6. Hochhaus A, Berger U, Reiter A, Hehlmann R: Update CML und andere chronische myeloproliferative Erkrankungen, *Onkologie heute* 04/2005
7. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, 1996, *Nat Med*, 2, 561-6
8. Savage DG, Antman KH: Imatinib mesylate-a new oral targeted therapy, 2002, *N Engl J Med*, 346, 683-93
9. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A et al: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, 2002, *N Engl J Med*, 346, 645-52
10. Thomas SM, Brugge JS: Cellular functions regulated by src family kinases, 1997, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 513-609
11. Johnson FM, Gallick GE: SRC family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy, 2007, *Anticancer Agents Med Chem*, 7(6), 651-9
12. Biochemie und Pathobiochemie, Löffler, Petrides, 6. Auflage
13. Prof. Dr. med. Jochen Schüttle, Dr. med. Sebastian Bauer: Ansätze zur Therapie mit STI571 (Imatinib) bei soliden Tumoren, *innovartis*, 3/2001
14. Yezhelyev MV, Koehl G, Guba M et al: Inhibition of Src tyrosine kinase as treatment for human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice, 2004, *Clin Cancer Res*, 10, 8028-8036
15. Corey SJ, Anderson SM: Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis, 1999, *Blood*, 93, 1-14
16. Lowell CA: Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling, 2004, *Mol Immuno*, 41, 631-43
17. Korade-Mirmics Z, Seth JC: Src kinase-mediated signaling in leukocytes, 2000, *Journal of Leukocyte Biology*, 68, 603-613
18. Jin W, Yun C, Jeong J et al: c-Src is required for tropomyosin receptor kinase C (TrkC)-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway, 2008, *J Biol Chem*, 283(3), 1391-400
19. Geahlen RL, Handley MD, Harrison ML: Molekular interdiction of src-family kinase signaling in hematopoietic cells, 2004, *Oncogene*, 23, 8024-8032
20. Irby RB, Yeatman TJ: Role of src expression and activation in human cancer, 2000, *Oncogene*, 19, 5636-5642

-
21. Biochemie, Müller-Esterl, 1. Auflage, 2004
 22. Dominguez-Caceres MA, Garcia-Martinez JM, Calcabrini A et al: Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells, 2004, *Oncogene*, 23, 7378-90
 23. Ollila J, Vihinen M: B cells, 2005, *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 518-23
 24. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ: Selected glimpses into the activation and function of src kinase, 2000, *Oncogene*, 19, 5620-5635
 25. Lutz MP, Silke-Eber IB, Flossmann-Kast BBM et al: Overexpression and activation of the tyrosine kinase src in human pancreatic carcinoma, 1998, *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 503-8
 26. Park SI, Zhang J, Phillips KA et al: Targeting SRC family kinases inhibits growth and lymph node metastases of prostate cancer in an orthotopic nude mouse model, 2008, *Cancer Res*, 68, 3323-33
 27. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ et al: Activation of src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells, 1996, *Cancer Res*, 56, 3589-96
 28. Roginskaya V, Zuo S, Caudell E et al: Therapeutic targeting of src-kinase lyn in myeloid leukemic cell growth, 1999, *Leukemia*, 13, 855-61
 29. Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ et al: Identification of src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of src sh2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior, 2005, *Cancer Res*, 65, 1335-42
 30. Boyer B, Bourgeois Y, Poupon MF: Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells, 2002, *Oncogene*, 21, 2347-56
 31. Liu Z, Falola J, Zhu X et al: Antiproliferative effects of src inhibition on medullary thyroid cancer, 2004, *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 3503-9
 32. Lee M, Kim JY, Koh WS: Apoptotic effect of PP2 a src tyrosine kinase inhibitor, in murine B cell leukaemia, 2004, *J Cell Biochem*, 93, 629-38
 33. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ et al: Inhibition of src tyrosine kinase impairs inherent and acquired gemcitabine resistance in human pancreatic adenocarcinoma cells, 2004, *Clin Cancer Res*, 10, 2307-18
 34. Boyd DD, Wang H, Avila H et al: Combination of an src kinase inhibitor with a novel pharmacological antagonist of the urokinase receptor diminishes in vitro colon cancer invasiveness, 2004, *Clin Cancer Res*, 10, 1545-55
 35. Tatton L, Morley GM, Chopra R et al: The src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases, 2003, *J Biol Chem*, 278, 4847-53
 36. Golas JM, Arndt K, Etienne C et al: SKI-606, a 4-Anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against Chronic Myelogenous Leukemia Cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice, 2003, *Cancer Res*, 63, 375-81
 37. Nimmanapalli R, O'Bryan E, Huang M et al: Molecular characterization and sensitivity of STI-571 (Imatinib Mesylate, Gleevec)- resistant, Bcr-Abl-positive, human acute leukemia cells to SRC kinase inhibitor PD180970 and 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 2002, *Cancer Res*, 62, 5761-9

-
38. Warmuth M, Simon N, Mitina O et al: Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases, 2003, *Blood*, 101, 664-72
 39. Tipping AJ, Baluch S, Barnes DJ et al: Efficacy of dual-specific Bcr-Abl and Src-family kinase inhibitors in cells sensitive and resistant to imatinib mesylate, 2004, *Leukemia*, 18, 1352-6
 40. Shah NP, Tran C, Lee FY et al: Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor, 2004, *Science*, 305, 399-401
 41. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, 1972, *Br J Cancer*, 26, 239-57
 42. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis, 1980, *Int Rev Cytol*, 68, 251-306
 43. Krammer PH: Apoptose, 2000, *Deutsches Ärzteblatt*, 97, A-1752-1759
 44. Reed JC: Dysregulation of apoptosis in cancer, 1999, *J Clin Oncol*, 17, 2941-53
 45. Reed JC: Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer, 1999, *Curr Opin Oncol*, 11, 68-75
 46. Peter ME, Krammer PH: Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis, 1998, *Curr Opin Immunol*, 10, 545-51
 47. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al: Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor, 1995, *Embo J*, 14, 5579-88
 48. Salvesen GS: Programmed cell death and the caspases, 1999, *Apmis*, 107, 73-9
 49. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis, 1997, *Biochem J*, 326, 1-16
 50. Slee EA, Adrian C, Martin SJ: Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct, non-redundant, roles during the demolition phase of apoptosis, 2000, *J Biol Chem*, 276, 7320-6
 51. Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG: PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage, 2003, *Experimental Hematology*, 31, 446-54
 52. Dou QP, An B: RB and apoptotic cell death, 1998, *Front Biosci*, 3, 419-30
 53. Li H, Zhu H, Xu CJ et al: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, 1998, *Cell*, 94, 491-501
 54. Tsujimoto Y: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?, 1998, *Genes Cells*, 3, 697-707
 55. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T et al: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization, 1998, *Mol Cell*, 1, 949-57
 56. Reed JC, Jurgensmeier JM, Matsuyama S: Bcl-2 family proteins and mitochondria, 1998, *Biochim Biophys Acta*, 1366, 127-37
 57. Korsmeyer SJ: BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death, 1999, *Cancer Res*, 59(7Suppl), 1693s-1700s
 58. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ: Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18), 1991, *Nature*, 349, 254-6
 59. Del Principe MI, Del Poeta G, Maurillo L et al: P-glycoprotein and Bcl-2 levels predict outcome in adult acute lymphoblastic leukaemia, 2003, *Br J Haematol*, 121, 730-8

-
60. Ong YL, McMullin MF, Bailie KE et al: High bax expression is a good prognostic indicator in acute myeloid leukaemia, 2000, *Br J Haematol*, 111, 182-9
 61. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI et al: Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukaemia (AML), 2003, *Blood*, 101, 2125-31
 62. Reed JC: Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance, 1995, *Curr Opin Oncol*, 7, 541-6
 63. Krueger A, Baumann S, Krammer PH et al: FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis, 2001, *Mol Cell Biol*, 21, 8247-54
 64. Deveraux QL, Reed JC: IAP family proteins-suppressors of apoptosis, 1999, *Genes Dev*, 13, 239-52
 65. Tamm I, Wang Y, Sausville E et al: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs, 1998, *Cancer Res*, 58, 5315-20
 66. Chow KU, Nowak D, Boehrer S et al: Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in lymphoma cells are associated with down-regulation of inhibitors of apoptosis proteins (IAP's), prostate-apoptosis-response-gene-4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation, 2003, *Biochem Pharmacol*, 66, 711-24
 67. Tamm I, Kornblau SM, Segall H et al: Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias, 2000, *Clin Cancer Res*, 6, 1796-803
 68. Sells SF, Wood DP, Joshi-Barve SS et al: Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells, 1994, *Cell Growth Differ*, 5, 457-66
 69. Sells SF, Han SS, Muthukkumar S et al: Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis, 1997, *Mol Cell Biol*, 17, 3823-32
 70. Qiu G, Ahmed M, Sells SF et al: Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4, 1999, *Oncogene*, 18, 623-31
 71. Boehrer S, Chow KU, Puccetti E et al: Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional pattern of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia, 2001, *Hematol*, 2, 103-7
 72. Boehrer S, Chow KU, Beske F et al: In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation, 2002, *Cancer Res*, 62, 1768-75
 73. Barradas M, Monjas A, Diaz-Meco MT et al: The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression, 1999, *Embo J*, 18, 6362-9
 74. Nalca A, Qiu SG, El-Guendy N et al: Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4, 1999, *J Biol Chem*, 274, 29976-83
 75. Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T et al: THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies, 2003, *Oncogene*, 22, 2432-42
 76. Kawai T, Akira S, Reed JC: ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains, 2003, *Mol Cell Biol*, 23, 6174-86

-
77. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY et al: Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis, 1997, *Cell*, 89, 1067-76
 78. Chang HY, Nishitoh H, Yang X et al: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx, 1998, *Science*, 281, 1860-3
 79. Kim EJ, Park JS, Um SJ: Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML, 2003, *Nucleic Acids Res*, 31, 5356-67
 80. Boehrer S, Nowak D, Hochmuth S et al: Daxx overexpression in T-lymphoblastic Jurkat cells enhances caspase-dependent death receptor- and drug-induced apoptosis in distinct ways, 2005, *Cell Signal*, 17, 581-95
 81. Boehrer S, Nowak D, Kukoc-Zivojnov N et al: Expression of Daxx sensitizes Jurkat T-cells to the apoptosis-inducing effect of chemotherapeutic agents, 2005, *Pharmacol Res*, 51, 367-74
 82. Michaelson JS, Bader D, Kuo F et al: Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development, 1999, *Genes Dev*, 13, 1918-23
 83. Schriever F, Huhn D: New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia, 2003, *Drugs*, 63, 953-69
 84. Reed JC: Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia, 1998, *Semin Oncol*, 25, 11-8
 85. Shaoguang L: Src-family kinases in the development and therapy of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia, 2008, *Leukemia and Lymphoma*, 49(1), 19-26
 86. Cortes J, Rousselot P, Kim DW et al: Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis, 2007, *Blood*, 109(8), 3207-13
 87. Steinberg M: Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia, 2007, *Clin Ther*, 29(11), 2289-308
 88. Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M et al: Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy, 2007, *Blood*, 109(6), 2303-9
 89. Contri A, Brunati AM, Trentin L et al: Chronic lymphocytic leukemia B cells contain anomalous Lyn tyrosine kinase, a putative contribution to defective apoptosis, 2005, *J Clin Invest*, 115, 369-78
 90. Dos Santos C, Demur C, Bardet V et al: A critical role for Lyn in acute myeloid leukemia, 2008, *Blood*, 111(4), 2269-79
 91. Bunn PA, Jr., Foss FM: T-cell lymphoma cell lines (HUT192 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical features, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL), 1996, *J Cell Biochem Suppl*, 24, 12-23
 92. Huntington ND, Tarlinton DM: CD45: direct and indirect government of immune regulation, 2004, *Immunol Lett*, 94, 167-74
 93. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW: Chronic lymphocytic leukemia, 2004, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 163-83

-
94. Mizenina OA, Moasser MM: S-phase inhibition of cell cycle progression by a novel class of pyridopyrimidine tyrosine kinase inhibitors, 2004, *Cell Cycle*, 3, 796-803
 95. Tayler SJ, Shalloway D: Src and the control of cell division, 1996, *Bioessays*, 18, 9-11
 96. Martin NG, McAndrew PC et al: Phosphorylation of cyclin dependent kinase 4 on tyrosine 17 is mediated by Src family kinases, 2008, *FEBS J*
 97. Sherr CJ, McCormick F: The RB and p53 pathways in cancer, 2002, *Cancer Cell*, 2, 103-12
 98. Martinelli G, Soverini S, Rosti G et al: New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia, 2005, *Haematologica*, 90, 534-41
 99. Chen R, Kim O, Yang J et al: Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation, 2001, *J Biol Chem*, 276, 31858-62
 100. Cox AD, Der CJ: The dark side of Ras: regulation of apoptosis, 2003, *Oncogene*, 22, 8999-9006
 101. Pelengaris S, Khan M, Evan G: c-MYC: more than just a matter of life and death, 2002, *Nat Rev Cancer*, 2, 764-76
 102. Wiestner A: More ZAP for chronic lymphocytic leukemia (CLL), 2005, *Blood*, 105, No.5, 1839-40
 103. Nowak D, Boehrer S, Brieger A et al: Upon drug-induced apoptosis in lymphoma cells X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) translocated from the cytosol to the nucleus, 2004, *Leukemia und Lymphoma*, 45, 1429-1436
 104. Brieger A, Boehrer S, Schaaf S et al: In bcr-abl-positive myeloid cells resistant to conventional chemotherapeutic agents, expression of Par-4 increases sensitivity to Imatinib (STI571) and histone deacetylase-inhibitors, 2004, *Biochem Pharmacol*, 68, 85-93
 105. Chow KU, Nowak D, Hofmann W et al: Imatinib induces apoptosis in CLL lymphocytes with high expression of Par-4, 2005, *Leukemia*, 19, 1103-5
 106. Guy M, Moorghen M, Bond JA et al: Transcriptional down-regulation of the retinoblastoma protein is associated with differentiation and apoptosis in human colorectal epithelial cells, 2001, *Br J Cancer*, 84, 520-8
 107. Liu H, Dibling B, Spike B et al: New roles for the RB tumor suppressor protein, 2004, *Curr Opin Genet Dev*, 14, 55-64
 108. Tsygankov AY, Shore SK: Src: regulation, role in human carcinogenesis and pharmacological inhibitors, 2004, *Curr Pharm Des*, 10, 1745-56
 109. Song G, Ouyang G, Bao S: The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival, 2005, *J Cell Mol Med*, 9, 59-71
 110. Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS et al: Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy, 2004, *Nature*, 428, 332-7
 111. Cui QL, Zheng WH, Quirion R et al: Inhibition of Src-like kinases reveals Akt-dependent and – independent pathways in Insulin-like Growth Factor I-mediated oligodendrocyte progenitor survival, 2005, *J Biol Chem*, 280, 8918-8928
 112. Jiang T, Qiu Y: Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation, 2003, *J Biol Chem*, 278, 15789-15793
 113. Aloyz R, Grzywacz K, Xu ZY et al: Imatinib sensitizes CLL lymphocytes to chlorambucil, 2004, *Leukemia*, 18, 409-14

-
114. Rane SG, Reddy EP: JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis, 2002, *Oncogene*, 21, 3334-3358
 115. Field JK, Spandidos DA: The role of ras and myc oncogenes in human solid tumors and their relevance in diagnosis and prognosis, 1990, *Anticancer Res*, 10, 1-22
 116. Dang CV: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism, 1999, *Mol Cell Biol*, 19, 1-11
 117. Eilers M: Control of cell proliferation by Myc family genes, 1999, *Mol Cells*, 9, 1-6
 118. Abraham KM, Levin SD, Marth JD et al: Thymic tumorigenesis induced by overexpression of p56lck, 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 3977-81
 119. Burn CM, Sakaguchi K, Appella E et al: CD45 regulation of tyrosine phosphorylation and enzyme activity of src family kinases, 1994, *J Biol Chem*, 269, 13594-600
 120. D'Oro U, Sakaguchi K, Appella E et al: Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity, 1996, *Mol Cell Biol*, 16, 4996-5003
 121. D'Oro U, Ashwell JD: Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes, 1999, *J Immunol*, 162, 1879-83
 122. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M et al: Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells, 2004, *Blood*, 103, 1425-32, Epub 2003 Oct 16
 123. Wang JYJ: Controlling Abl: auto-inhibition and co-inhibition?, 2004, *Nature Cell Biology*, 6, 3-7
 124. Hantschel O, Superti-Furga G: Regulation of the c-Abl and bcr-abl tyrosine kinases, 2004, *Molecular Cell Biology*, 5, 33-44
 125. Karlons Biochemie und Pathobiochemie, Detlef Doenecke, Jan Koolman, Georg Fuchs, Wolfgang Gerok, 15. Auflage, 2005
 126. Hennequin LF, Allen J, Breed J et al: N-(5-Chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a novel, highly selective, orally available, dual-specific c-src/Abl Kinase Inhibitor, 2006, *J Med Chem*, 49, 6465-6488
 127. Irby R, Yeatman TJ: Increased src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells, 2002, *Cancer Res*, 62, 2669-2674
 128. Talamonti MS, Roh MS, Curley SA et al: Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer, 1993, *J Clin Invest*, 71, 53-60
 129. Mao W, Irby R, Coppola D et al: Activation of c-src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential, 1997, *Oncogene*, 15, 3083-3090
 130. Arvanitis C, Felsher DW: Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis, 2006, *Semin Cancer Biol*, 16(4), 313-7

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

*„Apoptoseinduktion in Lymphomzellen durch neue
SRC-Kinase-Inhibitoren“*

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik II, Hämatologie / Onkologie, des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von PD Dr. med. K. U. Chow mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. P. S. Mitrou ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan – Nowak D, Boehrer S, Hochmuth S, Trepohl B, Hofmann W, Hoelzer D, Hofmann WK, Mitrou PS, Ruthardt M, Chow KU. Src kinase inhibitors induce apoptosis and mediate cell cycle arrest in lymphoma cells. *Anti-Cancer Drugs* 2007, 18(9): 981-995 - veröffentlicht.

DANKSAGUNGEN

Für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, die hervorragende Betreuung, viele motivierende Gespräche sowie die uneingeschränkte Unterstützung bei allen Fragestellungen danke ich ganz herzlich meinen Betreuern Herrn PD Dr. med. K. U. Chow und Herrn Prof. Dr. med. P. S. Mitrou.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des hämatologisch-immunologischen Labors, insbesondere Herrn Bernd Schneider und Frau Natasa Kukoc-Zivojnov, für die ausführliche Einarbeitung, die geduldige Hilfestellung bei allen technischen Fragen und die stets freundliche Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen anderen Doktoranten des Labors, insbesondere bei Herrn Dr. med. Daniel Nowak für das kollegiale und harmonische Arbeiten bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Anne Kölsch für viele anregende und kritische Gespräche und eine wunderbare Freundschaft.

Darüber hinaus gilt mein persönlichster Dank meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Studienzeit selbstlos unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Vielen Dank für die finanzielle Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis. Meinem Lebenspartner Sven Lange möchte ich für seine Geduld und sein Vertrauen, zahlreiche aufbauende Gespräche und die Begleitung nach Neuseeland danken. Beiden gilt unendlicher Dank für zahlreiche bereichernde Momente, ohne die diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Vielen Dank auch an Frau Gudrun Zabel, die mich während des gesamten Studiums immer unterstützt hat und mich motivierte, mich kulturell weiterzubilden und so einen guten Ausgleich zu der wissenschaftlichen Arbeit schuf.

Wencke Hofmann
Pfarrstraße 6
63303 Dreieich
Mobil: 0160-98044033
E-Mail: WenckeHofmann@aol.com

Lebenslauf

Geburtstag, Geburtsort und Familienstand

22. Januar 1979 in Schmalkalden
ledig

Schulbildung

1985-1991
1991-1997
Grund- und Realschule in Rotterode
Staatliches Gymnasium Schmalkalden mit Erwerb der
Allgemeinen Hochschulreife (Note 1,0)

Berufsausbildung

08/1997-12/1999
zur Biologielaborantin im Paul-Ehrlich-Institut in
Langen, im Verbund mit der Firma E. Merck in
Darmstadt (Note 1)

Berufstätigkeit

12/1999-09/2000
als Biologielaborantin im Paul-Ehrlich-Institut in Langen
im Fachgebiet Diagnostika

Studium der Humanmedizin

10/2000
04/2001
Beginn an der Friedrich Schiller-Universität Jena
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

(Note 2,0)

Famulaturen

02/2004-04/2004
09/2004
02/2005-03/2005
08/2005
02/2006-03/2006
Medizinische Klinik im Hospital zum heiligen Geist in
Frankfurt am Main
Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonspital in Basel,
Schweiz
Praxis für Allgemeinmedizin von Herrn Markus Preuß in
Dillenburg
Pädiatrie und Jugendmedizin am Kreiskrankenhaus in
Gelnhausen
Pädiatrie im Central Hospital in Lilongwe, Malawi

Praktisches Jahr

08/2006-12/2006
12/2006-03/2007
03/2007-07/2007
1. Terial: Innere Medizin am St. Elisabethen
Krankenhaus in Frankfurt am Main
2. Terial: Dermatologie und Venerologie am
Universitätsklinikum in Frankfurt am Main
3. Terial: Chirurgie am St. Elisabethen
Krankenhaus in Frankfurt am Main

Wencke Hofmann
Pfarrstraße 6
63303 Dreieich
Mobil: 0160-98044033
E-Mail: WenckeHofmann@aol.com

05/2002-06/2003
08/2003-12/2007

12/2007

Seit 01/2008

Seit 08/2003

06/2005

10/2007

Lebenslauf

Sonstige klinische Tätigkeit

Pflegehelferin in den Asklepios Kliniken in Langen
Praxisassistentin beim Ärztlichen Notdienst Langen-
Dreieich

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

(Note 1,5)

Ärztliche Tätigkeit

Assistenzärztin am Zentrum für Dermatologie und
Venerologie des Universitätsklinikums in Frankfurt am
Main

Dissertation

Laborexperimentelle Arbeit an der Medizinischen Klinik
II, Hämatologie / Onkologie der Johann Wolfgang
Goethe-Universität in Frankfurt am Main
(PD Dr. med. K. U. Chow, Prof. Dr. med. P. S. Mitrou)

Veröffentlichungen

Chow KU, Nowak D, Hofmann W, Schneider B,
Hofmann WK. Imatinib induces apoptosis in CLL
lymphocytes with high expression of Par-4. Leukemia
2005; 19 (6): 1103-5
Nowak D, Boehrer S, Hochmut S, Trepohl B, Hofmann
W, Hoelzer D, Hofmann WK, Mitrou PS, Ruthardt M,
Chow KU. Src kinase inhibitors induce apoptosis and
mediate cell cycle arrest in lymphoma cells. Anti-Cancer
Drugs 2007 Oct; 18(9): 981-95

Frankfurt am Main, 04.07.2008