



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

Die Differenzierung von Zelllinien der akuten myeloischen Leukämie (AML) mit all-trans-Retinoinsäure (ATRA) bewirkt eine Reduktion der ¹⁸F-FDG Aufnahme bei gleichzeitiger Zunahme der Sensitivität gegenüber dem Apoptose induzierenden BH3-Mimetikum ABT-737

Gabriel Sebastian Buschner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Markus Essler
2. Prof. Dr. Wolfgang A. Weber

Die Dissertation wurde am 02.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.05.2022 angenommen.

Für meine liebe Familie

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Abkürzungsverzeichnis	6
3. Einleitung	8
3.1. Akute myeloische Leukämie	8
3.2. FAB- und WHO-Klassifikation	8
3.3. Diagnostik	10
3.4. Therapie der AML	11
3.4.1. Zielgerichtete Therapie mit all-trans-Retinoinsäure zur Differenzierung der akuten promyelozytären Leukämie	11
3.4.2. Möglicher Therapieansatz der AML durch Induktion der Apoptose mit Hilfe von ABT-263 (Navitoclax) und ABT-199 (Venetoclax)	12
3.5. Nachsorge und Rezidiv	13
3.6. Bildgebende Diagnostik bei AML-Patienten	13
3.6.1. CT / MRT bei AML Patienten	13
3.6.2. Nuklearmedizinische in vivo Diagnostik mit dem Glukoseanalogon ¹⁸ F-FDG	13
3.6.2.1. Übersicht über die oxidative Glykolyse	13
3.6.2.2. Glykolyse bei Tumorzellen	14
3.6.2.3. Das Glukoseanalogon ¹⁸ F-FDG	15
3.6.3. ¹⁸ F-FDG-PET/CT bei AML Patienten	15
3.7. Apoptose	18
3.7.1. Extrinsische Apoptose	19
3.7.2. Intrinsische Apoptose	19
3.8. Die Proteine der BCL-Familie	20
3.9. ABT-737	21
4. Fragestellung	23
5. Material und Methoden	24
5.1. Verwendete Agenzien	24
5.1.1. Zellkultur	24
5.1.1.1. Medien	24
5.1.1.2. Zusätze	24
5.1.2. Chemikalien und Kits	25
5.1.3. Puffer- und Stammlösungen	26
5.1.4. Primär und sekundärer Antikörper	28
5.1.4.1. Primärantikörper für Western-Blot	28
5.1.4.2. Sekundärantikörper für Western-Blot	28
5.1.4.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie	29
5.1.5. Verbrauchsmaterialien	29
5.2. Geräte	29
5.3. Software	31

5.4. Zelllinien und Zellkultur	31
5.4.1. Bestimmung der Zellzahl	32
5.4.2. Passagieren der Zellen	33
5.4.3. Einfrieren der Zellen / dauerhafte Lagerung der Zellen	33
5.4.4. Differenzierung der Zelllinien NB-4 und AML-193	33
5.4.5. Herstellung von Zelllysaten	34
5.5. Zelluläre Aufnahme von ¹⁸F-2-Fluor-2-desoxy-D-glukose (¹⁸F-FDG)	34
5.5.1. ¹⁸ F-2-Fluor-2-desoxy-D-glukose (¹⁸ F-FDG)	34
5.5.2. Versuchsdurchführung	34
5.6. Behandlung von AML-Zellen mit ABT-737	35
5.7. Bestimmung der Zellvitalität mit CellTiter-Glo® nach Behandlung mit ABT-737	36
5.8. Durchflusszytometrie zur Bestimmung apoptotischer Zellen	37
5.9. Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Lösungen / Lysaten	38
5.10. SDS-Page mit Laemmlipuffer	39
5.11. Western-Blot	40
5.12. Immunhistochemischer Proteinnachweis	41
5.13. Statistische Auswertung	42
5.13.1. Berechnung der mittleren Hemmkonzentration [IC ₅₀] und der Sigmoidalkurve	42
5.13.2. Gepaarter Hypothesentest zur Beurteilung der Signifikanz	42
5.13.3. Berechnung des Korrelationskoeffizienten (Pearson-Koeffizient)	43
6. Ergebnisse	44
6.1. Bestimmung der durch ABT-737 induzierten mittleren Hemmkonzentrationen [IC₅₀] bei den verschiedenen AML-Zelllinien	44
6.2. Nachweis der Apoptose mit Hilfe der Durchflusszytometrie	47
6.3. Bestimmung der ¹⁸F-FDG-Aufnahme als molekularer Marker für die Stoffwechselaktivität der verwendeten AML-Zelllinien	50
6.3.1. ¹⁸ F-FDG Aufnahme in KG-1a Zellen	50
6.3.2. ¹⁸ F-FDG Aufnahme in Kasumi-1 und HL-60 Zellen	50
6.3.3. ¹⁸ F-FDG Aufnahme in NB-4 Zellen	51
6.3.4. ¹⁸ F-FDG Aufnahme in PLB-985 Zellen	51
6.3.5. ¹⁸ F-FDG Aufnahme in MV4-11, THP-1 und AML-193 Zellen	52
6.4. Korrelation zwischen der Aufnahme von ¹⁸F-FDG und dem zelllinienspezifischen IC₅₀-Wert nach Inkubation mit ABT-737	53
6.5. Analyse der Expression Apoptose-begleitender Proteine sowie von Proteinen der BCL-2 Familie nach Inkubation von AML-Zelllinien mit ABT-737 mit Western Blot	55
6.6. Differenzierung von AML-Zelllinien	59
6.6.1. ATRA induzierte Änderungen in der Sensitivität gegenüber ABT-737	59
6.6.2. Verminderte Aufnahme von ¹⁸ F-FDG nach Differenzierung mit ATRA	60
6.6.3. Änderungen auf molekularer Ebene	61
7. Diskussion	64

7.1.	Die ^{18}F -FDG Aufnahme als möglicher „Prädiktor“ für das Ansprechen auf die Therapie mit dem BH3-Mimetikum ABT-737	65
7.2.	Veränderungen auf molekularer Ebene in den AML-Zelllinien unter Therapie mit dem BH3-Mimetikum ABT-737	69
7.3.	Beeinflussbarkeit der ^{18}F -FDG Aufnahme und der Sensitivität gegenüber dem BH3-Mimetikum ABT-737 durch ATRA / Optimierung der Therapie	71
7.4.	Der Glucosemetabolismus, respektive die ^{18}F -FDG Aufnahme, als Biomarker für die Sensitivität gegenüber ABT-737 / Ausblick und mögliche Translation	73
8.	Zusammenfassung	77
9.	Literaturverzeichnis	77
10.	Abbildungsverzeichnis	90
11.	Tabellenverzeichnis	91
12.	Danksagung	92

2. Abkürzungsverzeichnis

(T)p53	(Tumor) Protein 53
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-2-Fluor-2-desoxy-D-glukose
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
ABT-199	Venetoclax
ABT-263	Navitoclax
ABT-737	BH3-Mimetikum
ADP	Adenosindiphosphat
Acetyl-CoA	Acetyl Coenzym A
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
APAF-1	apoptotic protease-activating factor-1
APL	Akute promyelozytäre Leukämie
Ara-C	Cytarabin, Cytosinarabinosid
ATO	Arsentrioxid
ATP	Adenosintri-phosphat
ATRA	All-trans-Retinoinsäure / all-trans-retinoic-acid
BAK	BCL-2 antagonist killer
BAX	BCL-2 associated X protein
BCL	B-cell lymphoma
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-W	Bcl-2-like protein 2, BCL2L2
BCL2A1	BCL2 Related Protein A1, BFL1
BH	BCL-2 homology
Bq	Becquerel
BSA	Bovine serum albumine
cAMP	Zyklisches AMP / cyclic AMP
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CN-AML	cytogenetically normal AML
CO ₂	Kohlenstoffdioxid (chemische Formel)
CR	Complete remission / komplette Remission
CSF	Colony stimulating factor / Kolonie stimulierender Faktor
CT	Computertomographie
DCA	Dichloracetat
ddH ₂ O	sterile ultra-pure water
dH ₂ O	steriles Wasser
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECOG	Index der Eastern Cooperative Oncology Group
EFS	event-free survival, Ergebnis-freies Überleben
FAB	French-American-Britisch
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calf serum / fetales Kälberserum
Flt3	FML-like Tyrosin Kinase 3
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF
GX15-070	Obatoclax
h	Stunden
HC	healthy control

HIF-1	hypoxia inducible factor-1
HLA	Humanes Leukozyten Antigen / human leucocyte antigen
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration; mittlere Hemmstoffkonzentration
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KBq	Kilobequerel
KPS	Karnofsky-Performance Score
MBq	Megabequerel
MCL	Myeloid cell leukemia
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOMPC	mitochondrial-outer-membrane-proteine complex
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaN ₃	Natriumazid
nCi	Nano Curi
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nl	Nanoliter
nM	Nanomol
OS	overall survival, Gesamtüberleben
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCi	Piko Curi
PD	Progressive disease / fortschreitende Tumorerkrankung
PET	Positronenemissionstomographie
PI	Propidiumiodid
PKA	Proteinkinase A
pM	Pikomol
PML	Promyelozytäres Leukämieprotein / promyelocytic leukemia protein
PR	Partial remission / partielles Therapieansprechen
PRS	prognostic risc score, prognostischen Risiko-Score
RARα	Retinsäurerezeptor-α / retinoic acid receptor α
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor / retinoid-X-receptor
SD	Stable disease / stabile Tumorerkrankung
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
T-ALL	T-Zell akuten lymphatischen Leukämie
TBS	Tris-Buffered Saline
USA	United States of America / Vereinigte Staaten von Nordamerika
WHO	World Health Organisation / Weltgesundheitsorganisation
XL	Extra-large (BCL-XL)
μCi	Mikro Curi
μl	mikroliter
μM	Mikromol

3. Einleitung

3.1. Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des blutbildenden Knochenmarks. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner auf. Mit zunehmendem Alter (Patienten > 70 Jahre) steigt jedoch die Inzidenz der Erkrankung auf über 100 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Zu den Risikofaktoren gehören die Inkorporation / Inhalation von exogenen Noxen (z. B. von Alkohol, Tabak, Benzolen, Äthylenoxyden, Herbiziden, Pestiziden) aber auch von Arzneimitteln (z. B. von Chemotherapeutika wie Carboplatin, 5-Fluoruracil etc.) sowie auch die Exposition durch ionisierende Strahlung. Diese ist zum einen durch die natürlichen Strahlenquellen (kosmische Strahlung: Sonnenstrahlung; terrestrische Strahlung: Radionuklide im Boden, wie z. B. Thorium-232, Uran-238 und -235, Kalium-40, und in der Luft, wie z. B. Radon-222) und durch die zivilisatorische Strahlung (wie z. B. Röntgenstrahlung in der Bildgebung, kerntechnische Anlagen) bedingt.

Die akute myeloische Leukämie geht infolge der blastären Knochenmarksinfiltration mit einer zunehmenden hämatopoetischen Knochenmarksinsuffizienz einher. Initial treten unspezifische Symptome (B-Symptomatik) wie zum Beispiel eine verminderte Leistungsfähigkeit, Müdigkeit, Nachtschweiß und/oder eine ungewollte Gewichtsabnahme (> 10 kg in 6 Monaten) auf. Weitere Symptome können eine Kurzatmigkeit (Dyspnoe), eine zervikale Lymphadenopathie sowie Gelenk- und Knochenschmerzen sein. Im Verlauf aggravieren die Beschwerden und es kommt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit (bakterielle und virale Infektionen, Mykosen) aufgrund einer Neutropenie und zu einer vermehrten Blutungsneigung aufgrund einer Thrombopenie (wie z. B. punktförmige Blutungen (Petechien), fleckförmige Blutungen (Eckchymosen), Nasenbluten (Epistaxis), abnorm starke und langanhaltende Monatsblutung (Menorrhagien)). Darüber hinaus kann es, aufgrund einer progredienten Leukozytose (>100 G/l), zu einer Leukostase mit Hypoxie des Gewebes (Infarkte), zu pulmonalen Embolien, retinalen Einblutungen sowie neurologischen Beschwerden kommen. Extramedulläre Manifestationen wie Hautinfiltrate, Meningeosis leukaemica, Gingivahyperplasie und/oder Infiltration von Milz und Leber werden überdurchschnittlich häufig bei einer myelomonozytär/monoblastär differenzierten AML beobachtet.

3.2. FAB- und WHO-Klassifikation

Für die Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie wird zum einen die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO Klassifikation) und zum anderen auch die „French-American-British“-Klassifikation (FAB-Klassifikation) verwendet. In beiden Klassifikationen muss für die Diagnose einer AML ein Schwellenwert an pathologischen Myeloblasten in den nukleären Zellen von Knochenmark und/oder Blut überschritten werden, d. h. bei der FAB-Klassifikation müssen $\geq 30\%$ und bei der WHO-Klassifikation $\geq 20\%$ an Blasten vorliegen. Die

Diagnose einer AML kann allerdings auch unabhängig vom Anteil der Knochenmarkblasten gestellt werden, wenn gemäß WHO-Klassifikation im Rahmen der zyto- bzw. molekulargenetischen Analytik eine definierte Aberration nachgewiesen wird.

Für die vorliegende Arbeit wurden AML Zelllinien verwendet, die anhand der FAB-Klassifikation (Bennett et al. 1976, 1985, Harris et al. 1985, Bennett et al. 1991, Zipursky et al. 1994, Zipursky et al. 1994, Sander et al. 2001, Falini et al. 2010) in einer der acht Subtypen (s. Tabelle 1) unterteilt wurden. Als Kriterien für die FAB-Klassifikation werden zum einen die Morphologie und zum anderen die Immunologie der Tumorzellen herangezogen.

Tabelle 1: AML-Subtypen gemäß der „French-American-British“- Klassifikation, modifiziert nach Onkodin (Albers et al. 2002-2021)

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Morphologische Kennzeichen
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	Unreife Blasten ohne Granulation
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	weniger als 10 % reife Zellen (= Promyelozyten, Granulozyten, Monozyten), nur spärliche Granulation
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	≥10 % reife Zellen in der Myelopoese, weniger als 20 % Monozyten
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	30 % Promyelozyten (Blastenanteil oft weniger)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloische Zellen (Blasten + Promyelozyten) > 20 %, monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen) 20 % bis 80 %
M5	Akute Monoblasten/Monozyten-Leukämie	mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten
M6	Akute Erythroleukämie (Erythrämie)	> 50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder >30 % aller Blasten unter den nicht-erythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	Megakaryoblasten

Zusätzlich zu diesen Kriterien werden in der WHO-Klassifikation (Sander et al. 2001, Jaffe 2009, Walter et al. 2013, Arber et al. 2016) weitere Kriterien für die Einteilung der AML wie zum

Beispiel die Definition der biologischen Entität, zytogenetische Aberrationen, die Ursachen für die Entstehung der AML (bspw. therapieinduzierte AML) oder die Morphologie (AML mit multilineärer Dysplasie oder nach FAB-Kriterien) berücksichtigt. Die WHO Klassifikation unterteilt die AML in mehrere Subtypen, die in Tabelle 2 aufgeführt sind.

Tabelle 2: AML-Subtypen gemäß der WHO-Klassifikation, modifiziert nach Onkodin (Albers et al. 2002-2021) und Amboss (2012-2021)

Kategorien	Beispiele / Formen / Ursachen
AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	Subtypen mit balancierten Translokationen oder bestimmten Mutationen
AML mit multilineärer Dysplasie (mindestens 2 Linien betroffen)	AML auf dem Boden einer vorausgegangenen Myelodysplasie/myeloproliferativem Syndrom oder De-novo-AML ohne vorausgegangenes Syndrom
Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom (MDS)	AML/MDS nach Chemo-/ Strahlentherapie
AML in Zusammenhang mit Trisomie 21	
Myeloid sarcoma / Chlorom	
AML, Not Otherwise Specified (NOS)	AML, minimal differenziert (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monozytäre Leukämie (FAB M5a, b) Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7) Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose
AML unklarer Linie	

3.3. Diagnostik

Neben einer ausführlichen Anamnese und körperliche Untersuchung sind für die Diagnose sowie Klassifikation der AML eine Analyse der Zusammensetzung des Blutes (zelluläre Bestandteile) sowie eine Knochenmarkszytologie/-zytochemie mit Zytogenetik (z. B. Translokationen in den Chromosomen bei der AML), Immunphänotypisierung und Molekulargenetik (z. B. veränderte Genabschnitte) unerlässlich. Daneben können ergänzende Untersuchungen wie z.B. die Erfassung des Allgemeinzustandes (Index der Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG/Karnofsky-Performance Score, KPS) und der Komorbiditäten, eine HLA-Typisierung sowie eine ausführliche Serologie für das weitere Procedere, bzw. eine evtl. notwendige allogene/autologe Stammzelltransplantation,

erforderlich sein. In seltenen Fällen sind auch bildgebende Verfahren, wie z. B. die Computertomographie (CT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT), in Vorbereitung auf die Therapie, erforderlich. Bildgebende Verfahren spielen ansonsten im Rahmen der Komplikationskontrolle eine Rolle.

3.4. Therapie der AML

Nach Diagnosestellung, entsprechend der aktuellen Leitlinie für die AML (Lengfelder et al. 2020, Röllig C. 2021), erfolgt vor allem bei jüngeren Patienten eine sehr zeitnahe Einleitung einer Chemotherapie mit Cytarabin (Cytosinarabinosid / Ara-C) und Anthrazyklinen (wie Daunorubicin und Doxorubicin) als Teil der Induktionstherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission (complete remission, CR). Nach Eintritt einer CR erfolgt eine Konsolidierungstherapie mit 2-3 weiteren Zyklen einer Chemotherapie (z. B. Cytarabin unter ggfs. Hinzunahme von weiteren Substanzen, z. B. Mitoxantron oder Amsarcin), die sich am Risikoprofil der AML sowie am Allgemeinzustand des Patienten orientiert. Alternativ bzw. ergänzend kann eine ablative Hochdosischemotherapie zur Konditionierung (bspw. mit Busulfan/Cyclophosphamid oder Busulfa/Etoposid/ Cyclophosphamid) mit anschließender autologer/allogener Stammzelltherapie (Albers et al. 2002-2021) durchgeführt werden. Zusätzlich zu den bekannten Chemotherapeutika werden auch monoklonale Antikörper, wie z. B. Gemtuzumab Ozogamizin (Castaigne et al. 2012, Hills et al. 2014, Zhang et al. 2018), sowie Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Midostaurin bei FLT3-Mutation (Stone et al. 2017), zum Teil in Kombination mit einer Chemotherapie in der Therapie der AML eingesetzt.

3.4.1. Zielgerichtete Therapie mit all-trans-Retinoinsäure zur Differenzierung der akuten promyelozytären Leukämie

Die, begleitend zur Chemotherapie mit beispielsweise Daunorubicin oder Idarubicin, zielgerichtete Therapie mit all-trans-Retinoinsäure (all-trans-retinoic-acid, ATRA) hat zu einer Optimierung der Behandlung und zu einer Verbesserung der Prognose bei Patienten, die an einer akuten promyelozytären Leukämie (APL) erkrankt sind, geführt (Huang ME 1988, Fenaux et al. 1999, Fenaux et al. 2007). Dabei kann eine kombinierte ATRA- und Antrazyklintherapie bei über 70% der Patienten mit neu diagnostizierter APL zu einer Langzeitremissionen (Mandelli et al. 1997, Fenaux et al. 1999, Sanz 2006, Avvisati et al. 2011) und möglicherweise zu einer Heilung führen.

Im Vergleich zu den Zytostatika induziert ATRA eine terminale Differenzierung von Leukämiezellen entlang der granulozytären Zellreihe (Breitman et al. 1981). Hierbei wirkt ATRA über zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen wird Co-Enzym A rekrutiert, nachdem ATRA den Ko-Repressor vom PML-RAR α -RXR-Komplex dissoziiert hat, wodurch anschließend RAR α -Zielgene transkribiert werden können. Zum anderen reguliert ATRA den cAMP-PKA-Signalweg, der zur Differenzierung der APL-Zellen durch Transkriptionsaktivierung führen kann. Darüber hinaus kann das PML-RAR α -Fusionsprotein durch ATRA moduliert und

degradiert werden (Zhao et al. 2004, Saeed et al. 2011, Sakamoto et al. 2014). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass mit der ATRA-Differenzierungstherapie in Kombination mit einer Chemotherapie neben einer raschen Verbesserung der Blutungsneigung eine Vollremissionsrate von >90 % erreicht werden kann (Sanz 2006, Avvisati et al. 2011). Dennoch kommt es bei ca. 1/3 der Patienten zu einem Rezidiv.

3.4.2. Möglicher Therapieansatz der AML durch Induktion der Apoptose mit Hilfe von ABT-263 (Navitoclax) und ABT-199 (Venetoclax)

In onkogenen Zellen der akuten Leukämie wird aufgrund der vorliegenden bzw. anfallenden Mutationen, bspw. p53 Mutationen oder bspw. einer erhöhten Expression von Proteinen der BCL-2 Familie (bisher > 20 bekannt, s. a. Kap. 3.8), häufig die Apoptose inhibiert (Testa et al. 2007), weshalb zielgerichtete Agenzien zur Induktion der Apoptose untersucht werden.

ABT-737 war eines der ersten synthetischen Agenzien zur Induktion der Apoptose und verhindert durch spezifische Bindung antiapoptotischer Proteine der BCL-2 Familie (BCL-2, BCL-XL und BCL-W) die Bindung der proapoptotischen, ebenfalls zur BCL-2 Familie gehörenden, Proteine BAK und BAX. Durch Freisetzung der proapoptotischen Proteine BAK und BAX bilden sich Poren, sog. ‚mitochondrial-outer-membrane-proteine‘ - Komplexe, in der äußeren Membran der Mitochondrien, wodurch es zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran kommt und es nachfolgend zu einer Aktivierung der Caspase 3 und 7 mit letztlich Einleitung der Apoptose kommt (s. a. Kap. 3.7.2).

Die oral bioverfügbaren Analoga ABT-263 (Navitoclax) sowie ABT-199 (Venetoclax), wurden erfolgreich im Rahmen von Studien in der Therapie von unterschiedlichen malignen Erkrankungen, wie z. B. in der Therapie des Glioblastoms, der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), des folliculären Lymphoms, des Leberkrebs, des nicht kleinzelligen (NSCLC) und des kleinzelligen Lungenkrebs (SCLC), des Myeloms und des Prostatakrebs eingesetzt. Für das oral bioverfügbare ABT-199 (Venetoclax) liegt seit 2016 in Europa und USA eine Zulassung zur Therapie von Lymphomen vor. Es ist ein weiteres BH3-Mimetika mit selektiver und sehr hoher Affinität gegenüber BCL-2 (Souers et al. 2013). BCL-XL, das eine wichtige Rolle auch bei den Progenitorzellen von Thrombozyten spielt, wird hingegen nicht gebunden und führt demzufolge nicht zu einer teils lebensbedrohlichen, therapieassoziierten Thrombozytopenie (Pollyea et al. 2019).

Derzeit wird in den Vereinigten Staaten von Nordamerika (USA) im Rahmen einer laufenden Phase Ib/II Studie des National Cancer Institute („Trametinib and Navitoclax in Treating Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors“, NCT02079740, NCI, USA) an mehreren Studienzentren die Kombination aus Navitoclax mit Trametinib in Hinblick auf Nebenwirkungen, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik evaluiert. In 2011 konnte in einer Phase I Studie bereits die Wirksamkeit von Navitoclax bei Patienten mit SCLC und anderen Lungentumoren gezeigt werden (Gandhi et al. 2011). Obatoclax mesylate (GX15-070) (Konopleva et al. 2008) ist ein weiteres BH-3 Mimetika, das auch im Rahmen einer multizentrischen Phase I/II Studie bei älteren Patienten mit einer unbehandelten akuten

Leukämie untersucht wurde (Schimmer et al. 2014). Sowohl Navitoclax, Obatoclax als auch Venetoclax werden derzeit in unterschiedlichen Studien jeweils in Kombination mit Tyrosinkinaseinhibitoren, Chemotherapeutika oder Antikörpern evaluiert (www.cancer.gov).

3.5. Nachsorge und Rezidiv

Nach Eintritt einer CR kommt es häufig in den ersten 1-2 Jahren zu Rezidiven, weshalb regelmäßige Laborkontrollen in Abständen von 2-3 Monaten notwendig sind. Bei nicht eindeutigen Befunden wird zusätzlich eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Bei Nachweis eines Rezidivs erfolgt eine Reinduktionstherapie mit Chemotherapie zum Erreichen einer kompletten Remission (CR). Anschließend ist die Therapie der Wahl zur Konsolidierung der AML die Stammzelltransplantation.

3.6. Bildgebende Diagnostik bei AML-Patienten

3.6.1. CT / MRT bei AML Patienten

Im Rahmen der Primärdiagnostik spielt die Bildgebung, z. B. CT oder MRT, bei der AML eine untergeordnete Rolle. Sie kommt zum Zuge, wenn der Primärtumor nicht eindeutig zugeordnet werden kann („cancer of unknown primary“) oder beispielsweise, wenn primär pathologische Frakturen ohne vorbekannte Tumorerkrankung auftreten.

Zudem wird die Bildgebung häufig unter Chemotherapie angewandt. Dabei dient sie in erster Linie zur Abklärung therapieinduzierter Infekte, beispielsweise eine CT-Untersuchung der Lunge bei Verdacht auf Lungenentzündung (Pneumonie), oder anderen Komplikationen wie Pleuraergüsse (Lungenödem), Ileus-Symptomatik (Darmverschluss) oder Abszesse (abgekapselte Entzündungen).

3.6.2. Nuklearmedizinische in vivo Diagnostik mit dem Glukoseanalogon ^{18}F -FDG

3.6.2.1. Übersicht über die oxidative Glykolyse

Die Glykolyse ist, insbesondere für Eukaryoten sowie auch für einige Prokaryoten, ein essentieller Stoffwechselweg für den Abbau von Kohlenhydraten zur Energiegewinnung. Sie kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen und läuft zunächst bis zur Bildung von Pyruvat unter aeroben und anaeroben Bedingungen gleich ab. 10 zytosolische Enzyme katalysieren dabei den Abbau von D-Glucose zu Pyruvat unter initialem Verbrauch und anschließendem Gewinn von Adenosintriphosphat (ATP = Energieträger) und Reduktion von NAD (Nicotinamidadenindinukleotid) zu NADH/H⁺ (Harris 2013, Kumari 2018). Aus einem Molekül Glucose (Hexose) entstehen dabei zwei Moleküle Pyruvat (Triosen).



Nach Ablauf der Pyruvatkinase Reaktion unter Bildung von 2 Pyruvat kann der weitere Abbau des Pyruvats je nach Sauerstoffangebot aerob oder anaerob ablaufen. Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird das Pyruvat in die Mitochondrien importiert und in der oxidativen Decarboxylierung durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex in Acetyl-CoA, den „Universalbrennstoff“, umgewandelt. Das Acetyl-CoA wird anschließend in den Citratzyklus eingeschleust und weiter abgebaut und oxidiert. Im Verlauf dieses Abbaus entstehen CO_2 und H_2O sowie bei der Oxidation freigesetzte Elektronen, die durch NADH und FADH^2 über Komplex I bzw. Komplex II an die Atmungskette abgegeben werden. Am Ende der Atmungskette beträgt die Energieausbeute eines Glukosemoleküls etwa 36 ATP.

Unter anaeroben Bedingungen wird die mitochondriale Atmungskette umgangen und das Pyruvat im Zytosol durch die Laktatdehydrogenase (LDH), unter Oxidation von NADH/ H^+ zu NAD^+ , zu Laktat reduziert („Milchsäuregärung“). NAD^+ wird anschließend wieder der Glykolyse zugeführt und zu NADH/ H^+ reduziert. Durch den anaeroben Abbau entstehen 2 mol ATP/mol Glukose (Harris 2013, Kumari 2018).

3.6.2.2. Glykolyse bei Tumorzellen

In den 1920er-Jahren entdeckte Ott Warburg, dass Tumorzellen ausschließlich Glucose in der anaeroben Glykolyse („Milchsäuregärung“) verwerten, selbst wenn ihnen ausreichend Sauerstoff für die aerobe Glykolyse zur Verfügung steht (Warburg et al. 1927, Potter et al. 2016). Obwohl die Mitochondrien in der Tumorzelle oft funktionell aktiv bleiben, wird dennoch nur ein sehr geringer Anteil der Glucose oxidativ verwertet. Durch die anaerobe Glykolyse generiert die Tumorzelle somit nur etwa 4 mol ATP/mol Glukose (Vander Heiden et al. 2009). Trotz dieser geringeren Energieausbeute vermag die Tumorzelle vergleichsweise mehr ATP im Vergleich zur oxidativen Glykolyse zu generieren, da beispielsweise entscheidende enzymatische Prozesse der Glykolyse nicht durch einen Mangel an Coenzymen gebremst werden (Pfeiffer et al. 2001). Zum Beispiel läuft die Regeneration des Coenzym NAD^+ durch die Oxidation von NADH/ H^+ zu NAD^+ durch die Lactat-Dehydrogenase, bei gleichzeitiger Reduktion von Pyruvat zu Laktat, wesentlich schneller ab, als es in der oxidativen Phosphorylierung der Fall ist (Gatenby et al. 2004). Zudem können onkogene Zellen durch unterschiedliche Expression von einzelnen Isoformen der Enzyme, beispielsweise von der Laktatdehydrogenase durch Induktion des Subtyps LDH-A und gleichzeitiger Suppression von LDH-B Einfluss auf die Geschwindigkeit der aeroben Glykolyse nehmen (Koukourakis et al. 2006, Miao et al. 2013). Zudem können auch einige der Enzyme im Citratzyklus mutiert vorliegen, wie z. B. die Isozitatdehydrogenase (IDH) (Marcucci et al. 2011), die ebenfalls zu einer höheren Resistenz der Tumorzelle beitragen können (Chen et al. 2014).

Auch auf genetischer Ebene können durch exogene Einflüsse gezielt Transkriptionsfaktoren, z. B. „hypoxia inducible factor-1“ (HIF-1), in Tumorzellen überexprimiert werden. Dies beobachtet man besonders bei schnell wachsenden Tumorzellen, die durch hypoxischen Stress über den Transkriptionsfaktor HIF-1 die Induktion von angiogenetischen

Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF) und hämatopoetische Faktoren (z.B. Transferrin, Erythropoetin) sowie vor allem auch die Bildung von Glukosetransporter und Enzyme der Glykolyse (z. B. Hexokinase II, Pyruvatkinase II oder Laktatdehydrogenase-A) hochregulieren (Shweiki et al. 1992, Koppenol et al. 2011, Kierans et al. 2021). Darüber hinaus dienen die Zwischenprodukte der Glykolyse auch als wichtige Grundbausteine für den Pentosephosphatweg, da die dort gebildeten Ribosen für die Herstellung von Nukleotiden, Aminosäuren, NADPH etc. essentiell sind. Neben den bioenergetischen Vorteilen der beschleunigten anaeroben Glykolyse können auch die alterierten biosynthetischen Prozesse in einer Tumorzelle dazu dienen, beispielsweise exogen induzierte Schäden an der TumordNA zügiger zu reparieren (DeBerardinis et al. 2008).

3.6.2.3. Das Glukoseanalogon ^{18}F -FDG

Mit Hilfe von 2- ^{18}F Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F -FDG) kann die Lage von Tumorzellen in der Hybridbildgebung, z. B. mit der Positronenemissionstomographie/Computertomographie (PET/CT) oder Positronenemissionstomographie/Magnetresonanztomographie (PET/MRT), im Körper dargestellt werden, da Tumorzellen in der Regel eine erhöhte Glucoseaufnahme aufweisen. Das Glucoseanalogon ^{18}F -FDG mit dem Radionuklid ^{18}F an Position 2 wird genauso wie Glucose passiv über die GLUT-Transporter in die Zelle aufgenommen (Czech et al. 2000). Im Zytoplasma wird ^{18}F -FDG durch die Hexokinase zu ^{18}F -2-FDG-6-Phosphat phosphoryliert. Das polare ^{18}F -2-FDG-6-Phosphat kann jetzt nicht mehr aus dem Zytoplasma der Zelle herausdiffundieren. Aufgrund des ^{18}F an Position 2 kann es jedoch auch nicht weiter in der Glykolyse prozessiert werden und wird somit in einer Tumorzelle angereichert (metabolic trapping). Nach Zerfall von ^{18}F ($t_{1/2} = 109,8$ min) in ^{18}O bildet sich mit H_2 erneut eine Hydroxygruppe an Position 2 des Glucose-6-Phosphats, das nun in der Glykolyse weiter prozessiert werden kann. ^{18}F -FDG wird auch in stoffwechselaktiven Organen, wie z. B. Gehirn und Herz, und aufgrund renaler Elimination des Tracers in den Nieren und den harnableitenden Organen angereichert. Relevant für die klinische Diagnostik sind jedoch pathologische Anreicherungen von ^{18}F -FDG in Malignomen oder Entzündungen, die eine bis zu 10fach höhere Glucoseaufnahme als das umliegende Gewebe aufweisen (Czech et al. 2000).

3.6.3. ^{18}F -FDG-PET/CT bei AML Patienten

Eine initiale Bildgebung (CT oder MRT) zur Beurteilung der Ausdehnung einer AML wird nicht durchgeführt, da es sich bei der AML um eine systemische Erkrankung handelt, die kaum morphologische Veränderungen verursacht. Zusätzlich können mit Ultraschall gut erreichbare Organe, wie z. B. Leber und Milz, zur Beurteilung einer Hepato-/Splenomegalie gut beurteilt werden. Bei Auftreten nachfolgender, therapieassoziiierter Komplikationen, wie z. B. Infekte unter Chemotherapie, wird die Bildgebung eingesetzt. Mit ^{18}F -FDG-PET/CT können die Tumorzellen der AML sowohl morphologisch beurteilt (CT) als auch hinsichtlich ihrer

Stoffwechselaktivität charakterisiert (PET) werden. Hierbei kann mit dem SUV (standardized uptake value) die initiale metabolische Aktivität der AML Zellen erfasst werden und diese zum Therapiemonitoring bei weiteren Verlaufskontrollen herangezogen werden (Arimoto et al. 2015). Eine ^{18}F -FDG-PET/CT Untersuchung ist jedoch, im Vergleich zur konventionellen Bildgebung, mit vergleichsweise hohen diagnostischen Kosten verbunden. Außerdem reichert sich der Tracer ^{18}F -FDG nicht ausschließlich in Tumorzellen an. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Anreicherung von ^{18}F -FDG in allen Zellen. Somit werden auch alle Zellen die in Entzündungsprozesse, Abszesse und Heilungsprozesse, involviert sind mit ^{18}F -FDG markiert. Auch können abnorm erhöhte Insulinspiegel, z. B. bei Diabetikern oder bei fehlender Nahrungskarenz, zu einer eingeschränkten oder fehlerhaften Beurteilbarkeit der ^{18}F -FDG-PET/CT Bildgebung führen.

Im nachfolgend beschriebenen Fall wurde ein Patient aufgrund progredienter Schmerzen und zunehmender Immobilisierung des rechten Armes vom Hausarzt in die Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München eingewiesen. In einer vorab durchgeführten primären Bildgebung mit CT und MRT zeigte sich eine tumoröse Raumforderung im rechten Oberarm mit pathologischer, subcapitaler Humeruskopffraktur rechts. Aufgrund des ungewöhnlichen Befundes und einer unauffälligen primären Staginguntersuchung mit CT und MRT wurde im Rahmen der Primariussuche (CUP: cancer of unknown primary) eine ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchung in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt. Abbildung 1 zeigt den beschriebenen Patienten vor und nach Therapie.

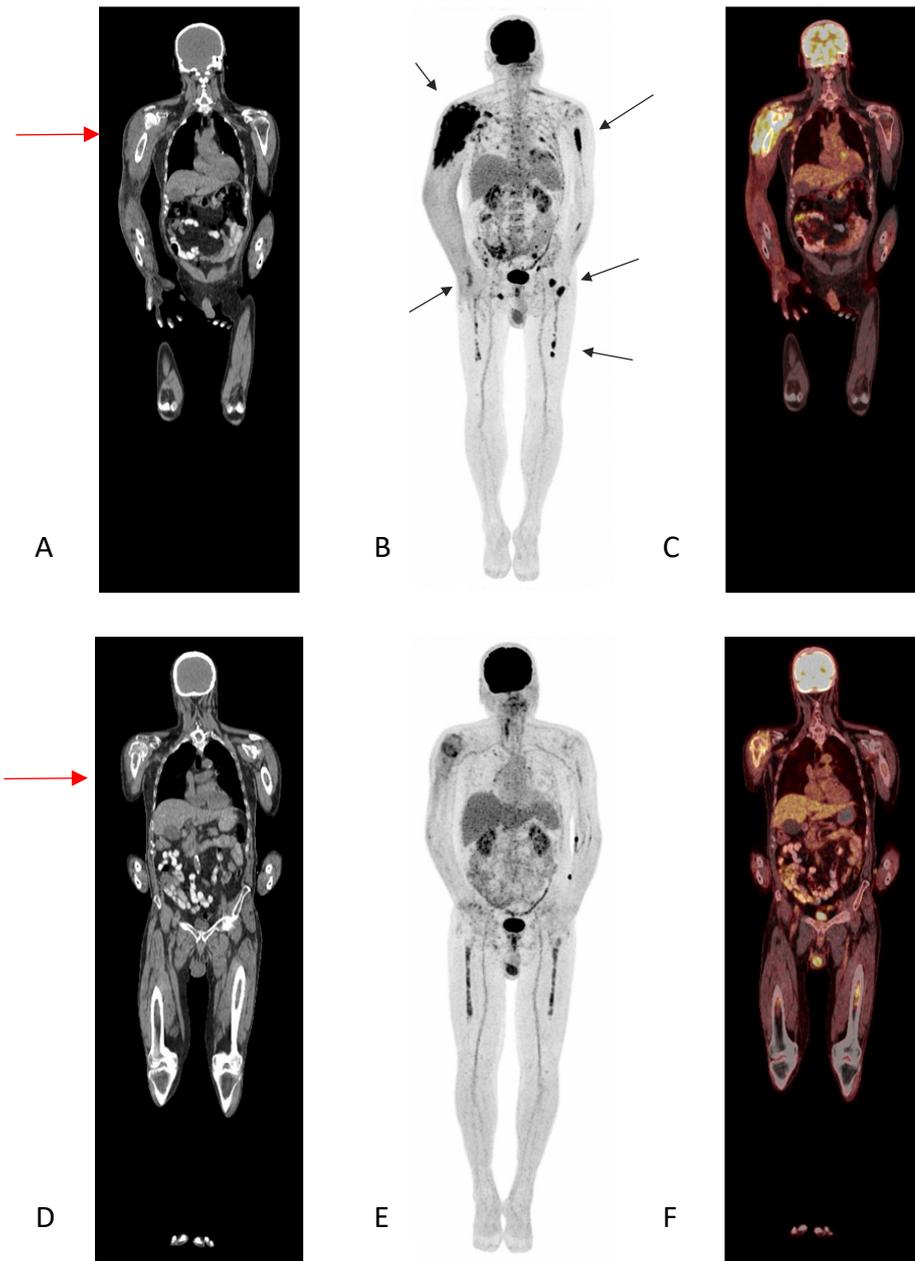


Abbildung 1: ^{18}F -FDG-PET/CT Aufnahme eines Patienten mit pathologischer, subcapitaler Humeruskopffraktur rechts **vor Therapie** mit AraC (Cytarabin) und Daunorubicin nach dem 7 + 3 Schema **(A/B/C)** und **nach Therapie (D/E/F)**:

(A) Coronare CT nativ low-dose Ganzkörperaufnahme mit Darstellung des Körperstamms, der miterfassten Extremitäten und des Schädels sowie der pathologischen Humeruskopffraktur rechts (roter Pfeil). (B) In der PET Aufnahme sind neben der bekannten Läsion am Humerus rechts noch weitere Läsionen in der Axilla rechts sowie fokale im Stammskelett, dem Beckenskelett, den Rippenbögen beidseits und den proximalen langen Röhrenknochen erkennbar (dunkel graue Pfeile). Neben der ^{18}F -FDG Speicherung im Tumor ist eine physiologische Speicherung im Gehirn, den Gefäßen, einzelnen Darmabschnitten und den harnableitenden Organen erkennbar. (B) Fusionierte Darstellung aus CT (A) und PET (B).

Nach Therapie **(D/E/F)**: (D) Coronare CT nativ low-dose Ganzkörperaufnahme mit Darstellung des Körperstamms, der miterfassten Extremitäten und des Schädels sowie der pathologischen Humeruskopffraktur rechts (roter Pfeil). (E) In der PET sind in Kenntnis der initialen Bildgebung nur noch eine geringe Stoffwechselaktivität im Bereich der Fraktur abgrenzbar. Physiologische Tracerspeicherung im Gehirn, den Gefäßen, einzelnen Darmabschnitten und den harnableitenden Organen. (F) Fusionierte Darstellung aus CT (D) und PET (E).

Hierbei zeigten sich starke Anreicherungen von ^{18}F -FDG im Bereich der Tumormanifestation am rechten Oberarm, in den Lymphknoten der regionalen Lymphabflusswege des rechten Oberarmes und auch disseminiert im Knochenmark. In Zusammenschau mit den Laborwerten bestand daher der Verdacht auf eine maligne haematopoetische Erkrankung. Nach anschließender offener Biopsie und Knochenmarkspunktion bestätigte sich dieser Verdacht und es wurde eine akute myeloische Leukämie mit Knochenmarksbefall und extramedullärer Beteiligung diagnostiziert. Als Therapie erhielt der Patient eine Induktion mit AraC (Cytarabin) und Daunorubicin nach dem 7 + 3 Schema (Röllig C. 2021) sowie nach kompletter Remission eine Konsolidierung mit Hochdosis-AraC. Vor der geplanten allogenen Stammzelltransplantation wurde der Patient zur Therapieevaluation erneut mit ^{18}F -FDG-PET/CT-Untersuchung untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Befundverbesserung mit nur noch residuellem, reaktivem ^{18}F -FDG-Uptake im rechten Oberarm. Auch die disseminierten ossären Tracerspeicherungen waren deutlich rückläufig. In der simultan verlaufenen Computertomographie, die im Rahmen der ^{18}F -FDG-PET/CT Untersuchung jeweils mitlief, zeigten sich dagegen keine signifikanten Änderungen zur Ausgangsuntersuchung, weshalb in diesem Fall zur Beurteilung des Therapieansprechens ausschließlich die metabolische Aktivität (^{18}F -FDG-Uptake) herangezogen werden konnte.

3.7. Apoptose

Die Apoptose ist ein genetisch codierter, essentieller Prozess zur Eliminierung von Zellen im Organismus (Galluzzi et al. 2018). Dabei werden infizierte, überflüssige oder beschädigte Zellen gezielt eliminiert. Apoptose findet bereits im Mutterleib statt, beispielsweise bei der Ausbildung der Finger und Zehen des Embryos. Hierbei ist ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zellapoptose essentiell. Störungen in dem fein regulierten System führen zu schwerwiegenden Folgen für den Organismus, beispielsweise einer vermehrten Apoptose bei neurodegenerativen Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson), einer fehlenden exogenen Apoptoseinduktion von fehlerhaften Zellen (Lymphomen / Autoimmunerkrankungen) oder einer fehlenden endogenen Apoptoseinduktion bei maligne transformierten Zellen (Hanahan et al. 2011). Bei letzterem wird die Apoptose verhindert durch inaktivierende Mutationen („loss of function“) der proapoptischen Proteine, besonders von p53 oder durch Überexpression antiapoptischer Mutationen („gain of function“) mit Überexpression von proliferationsinduzierenden Mutationen. Es kommt somit zu einer ungehemmten Proliferation mit Ausbildung von Resistenzen gegenüber intrinsischen und extrinsischen Apoptosestimuli. Diese Mutationen sind ebenfalls von essentieller Bedeutung bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika, Immunsuppressiva oder polymedikamentösen Therapieschemen.

3.7.1. Extrinsische Apoptose

Bei der extrinsischen Apoptose (Galluzzi et al. 2018) bindet ein spezifischer Todesligand (CD95L) an den Todesrezeptor (CD95). Dabei erfolgt eine Oligomerisierung des Rezeptors zum DISC (death-inducing signaling complex) verbunden mit der intrazellulären Weiterleitung des Apoptosesignals über entsprechende Signalmoleküle (Daniel et al. 2001). Die Initiator-Caspasen (Pro-Caspase-8 bzw. -10) (Muzio et al. 1996) werden anschließend aktiviert und aktivieren dann über weitere Zwischenschritte die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7). Die aktivierten Effektor-Caspasen induzieren über Spaltung und Deaktivierung spezifischer Todessubstrate den Tod der Zelle (Krammer 2000, Igney et al. 2002).

3.7.2. Intrinsische Apoptose

Die intrinsische Apoptose (Galluzzi et al. 2018) kann durch verschiedene externe Stimuli ausgelöst werden. Diese Stimuli umfassen beispielsweise den Entzug von Wachstumsfaktoren, die Interaktion mit der extrinsischen Apoptose (Green et al. 2004), die Induktion zellulärer DNA-Schäden sowie Hypoxie mit anschließendem p53 induziertem mitochondrialen Apoptoseweg (Philipp-Staheli et al. 2004).

Wie gerade erwähnt spielen die Mitochondrien dabei, neben ihrer originären Aufgabe als Energielieferanten der Zelle, eine essentielle regulatorische und kontrollierende Rolle. Das Tumorsuppressor Protein p53 kann sowohl durch die proapoptotischen Proteine der mitochondrialen Kaskade (BCL-2-Proteine wie BAX und BAK, APAF-1 sowie weitere Proteine) oder durch direkte Interaktion mit BAX und BAK aktiviert werden (Moll et al. 2005). Wird eine Zelle externen Stresstimuli ausgesetzt (z. B. Induktion von DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren) wird BH3 only aktiviert und BCL-2 gehemmt. Das BAX Protein wird aus einem BCL-BAX-Proteinkomplexe im Zytosol freigesetzt und anschließend in die äußere Mitochondrienmembran transloziert (Willis et al. 2003, Willis et al. 2005, Willis et al. 2005, van Delft et al. 2006). Dort oligomerisieren die aktivierten BAX-Proteine mit den membranständigen BAK-Proteinen zu einem ‚mitochondrial-outer-membrane-proteine-complex‘ (MOMPC). Die Bildung des MOMPC induziert Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die Cytochrom-C von der inneren Mitochondrienmembran dissoziiert und ins Zytosol gelangt (Daniel et al. 2003, Youle et al. 2008, Strasser et al. 2011). Die dissoziierten Cytochrom-C Moleküle oligomerisieren anschließend mit APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und komplexieren mit Caspase 9 zum Apoptosom (Hao et al. 2005). Das Apoptosom aktiviert anschließend die Caspasen 3 und 7, welche wieder die Apoptose einleiten (Pop et al. 2009, Jilg et al. 2016). Eine schematische Übersicht über die intrinsische Apoptose zeigt Abbildung 2.

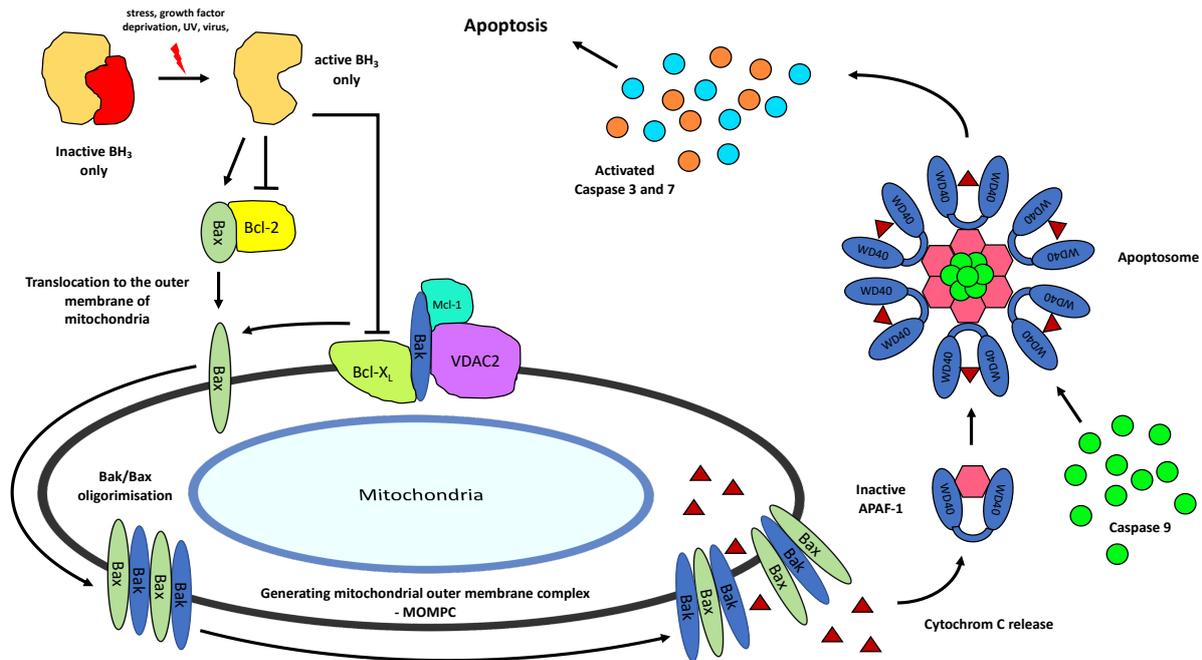


Abbildung 2: Schematischer Verlauf einer intrinsischen Apoptose.

Zunächst wird durch externe Stimuli, wie z. B. Induktion von DNA-Schäden, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Virusbefall, das BH3 only Proteine aktiviert. Nach Aktivierung hemmt das aktivierte BH3 only Proteine BCL-2 und BCL-XL und induziert die Translokation des BAX Proteins aus dem Zytosol in die äußere Membran des Mitochondriums. Anschließend erfolgt durch die BAX/BAK Oligomerisierung die Ausbildung eines MOMPC (mitochondrial – outer – membrane – proteins – complex). Der MOMPC fördert die Freisetzung von Cytochrom-C aus dem Mitochondrium ins Zytosol. Cytochrom-C aktiviert APAF-1 und bildet zusammen mit Caspase 9 ein Apoptosom, das wiederum Caspase 3 und 7 aktiviert. Die aktivierten Caspasen 3 und 7 induzieren schließlich die Apoptose. Abbildung modifiziert nach (Youle et al. 2008) und (Osellame et al. 2012).

3.8. Die Proteine der BCL-Familie

Die Proteine der BCL-2 Familie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der intrinsischen Apoptose (Gross et al. 1999, Youle et al. 2008). Sie haben maßgeblich Einfluss auf die Integrität und die Stabilität des Membranpotentials der Mitochondrienmembran. Mittlerweile sind > 20 Proteine der BCL-2-Familie bekannt, die in zwei Untergruppen, den pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteine, unterteilt werden können (Youle et al. 2008). Sie besitzen zudem zwischen ein oder vier BH-Domänen, die notwendig für die Interaktion untereinander sowie auch mit anderen Proteinen sind. Die anti-apoptotischen Proteine, z. B. BCL-2 und BCL-XL, wirken einer Apoptose entgegen (Cory et al. 2003, Shamas-Din et al. 2011, Strasser et al. 2011), indem sie einerseits pro-apoptotische Proteine aus der BCL-2 Familie binden und andererseits auch andere Proteine, wie z. B. den NF- κ B-Inhibitor, binden und damit indirekt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B fördern, wodurch indirekt die Expression von Apoptose supprimierenden Faktoren unterstützt werden (Grimm et al. 1996, Sohur et al. 1999, Chen et al. 2000). Vertreter der pro-apoptotischen BCL-2 Proteine sind beispielsweise BAX, BAK, BOK und BAD (Youle et al. 2008). Zum Beispiel ist BAX der Kofaktor des

Tumorsuppressors p53, der bei DNA-Schädigung einen Arrest der Mitose auslöst. Zudem kann er bei schwerwiegenden oder länger andauernden Schädigungen der Zelle die Apoptose induzieren. BAX liegt normalerweise frei im Zytosol vor und bildet mit BAK erst nach einem Apoptosestimulus einen BAK/BAX-Poren-Komplex (MOMP) in der äußeren Mitochondrienmembran, durch das Ionen ein- und ausströmen können. Zudem kommt es durch die Störung des Membranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom c (Willis et al. 2003, Willis et al. 2005, Willis et al. 2005, Shamas-Din et al. 2011, Strasser et al. 2011) und nachfolgend zu einer Aktivierung der Caspase 3 und 7, die letztlich den Zelltod einleiten (Pop et al. 2009, Jilg et al. 2016).

3.9. ABT-737

ABT-737 ist ein zielgerichtetes Therapeutikum aus der Gruppe der 'small molecule' Inhibitoren (Oltersdorf et al. 2005). Es bindet über seine BH3-Domäne spezifisch die anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1 sowie BCL2A1 und induziert auf diese Weise die Apoptose (Letai 2005, Cragg et al. 2009, Khaw et al. 2011, Kale et al. 2018). ABT-737 weist allerdings eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Proteinen der BCL-2 Familie BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1 sowie BCL2A1 auf. BCL-2, BCL-W und BCL-XL werden mit sehr hoher Affinität (bis zu einer $K_i < 1$ nM) gebunden, wobei MCL-1 und BCL2A1 nur mit geringer Affinität ($K_i = 0.46 \pm 0.11$ μ M) gebunden werden (Oltersdorf et al. 2005). Nachfolgend entdeckten jedoch sowohl Rooswinkel et al. (2012) als auch Merino et al. (2012) Unterschiede in der Affinität von ABT-737 gegenüber den Proteinen der BCL-2 Familie BCL-2, BCL-W und BCL-XL. In den Versuchen von Rooswinkel et al. (2012) wurden zwei Zelllinien, J16 und MOLT-4, einer T-Zell akuten lymphatischen Leukämie (T-ALL), die hohe Expression von BCL-2 Proteinen aufweisen, mit unterschiedlichen Konzentrationen an ABT-737 für 48h behandelt. Um das Bindungsverhalten von ABT-737 zu den einzelnen Proteinen der BCL-2 Familie BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1 und BCL2A1 näher zu untersuchen, wurden mit Hilfe von Vektoren gezielt jeweils nur ein Protein überexprimiert. Als Kontrolle dienten dann Zelllinien, die einen leeren Vektor im Bereich des untersuchten Proteins (z. B. BCL-2) aufwiesen. Der Zelltod wurde mit Hilfe der Flowzytometrie und der Färbung von Propidiumiodid nachgewiesen. Hierbei zeigte sich sowohl bei J16 als auch bei MOLT-4 Zellen, dass ABT-737 bevorzugt BCL-2 bindet. BCL-W und BCL-XL werden vergleichsweise schwächer gebunden und führen dadurch zu einer höheren Resistenz gegenüber ABT-737 (Rooswinkel et al. 2012). Eine höhere Affinität von ABT-737 gegenüber BCL-2 konnte auch in den Versuchen von Merino et al. (2012) nachgewiesen werden.

Durch die selektive Bindung von ABT-737 an die anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie kommt es zu einer Dissoziation der inaktiven BCL-BAX-Proteinkomplexe im Zytosol und zur Translokation der BAX-Proteine in die äußere Mitochondrienmembran (siehe auch Kap. 3.7.2). Dort oligomerisieren die aktivierten BAX-Proteine zusammen mit den membranständigen BAK-Proteinen zu einem MOMP. Durch diesen MOMP gelangen nun von der inneren

Mitochondrienmembran dissoziierte Cytochrom-C Komplexe ins Zytosol und komplexieren durch Bindung mit Caspase 9 und APAF-1 zum Apoptosom, welches anschließend die Caspase abhängige Apoptose einleitet (Daniel et al. 2001, Daniel et al. 2003, Kale et al. 2018).

4. Fragestellung

Die AML ist eine Erkrankung des blutbildenden Knochenmarks. Sowohl der Verlauf als auch die Prognose der AML hängen maßgeblich von der zytomorphologischen und zytogenetischen Klassifikation ab. Da es sich bei der AML um eine systemische Erkrankung handelt, ist die intravenöse Chemotherapie die Therapie der Wahl um ggf. eine vollständige Remission zu erzielen. Entsprechend der derzeit gültigen Therapieleitlinien wird die Dosis für die Chemotherapie anhand des Körpergewichts bzw. der Körperoberfläche der Patienten berechnet. Dabei ist zunächst offen, in welchem Maße die betreffende AML eines Patienten sensibel gegenüber dem verabreichten Chemotherapeutikum ist und ob daher gegebenenfalls Dosiskorrekturen bzw. Änderungen im Therapieablauf notwendig sind.

Die Kernfragestellung dieser Arbeit war, ob ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von ^{18}F -FDG und der Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum ABT-737 vorliegt. Hierbei wurden folgende Unterpunkte zu dieser Fragestellung definiert:

1. Bestehen Unterschiede zwischen den verwendeten AML Zelllinien bezüglich der Aufnahme von ^{18}F -FDG?
2. Gibt es Unterschiede zwischen den verwendeten AML Zelllinien in der Vitalität nach Behandlung mit ABT-737?
3. Welche Unterschiede in der Dosis-Wirkungsbeziehung zu ABT-737 lassen sich in den verwendeten AML Zelllinien feststellen?
4. Besteht ein Zusammenhang bezüglich der Aufnahme von ^{18}F -FDG und der Resistenz gegenüber ABT-737 zwischen den verwendeten AML Zelllinien?
5. Lassen sich die unterschiedlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen der verwendeten AML Zelllinien auch auf molekularer Ebene mit Western Blot (Proteine der BCL-2 Familie, Proteine der Apoptose) darstellen?
6. Wie verhalten sich die Aufnahme von ^{18}F -FDG und die Vitalität der Zelllinien NB-4 und AML-193 nach Differenzierung mit ATRA (All-Trans-Retinoinsäure)?
7. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von ^{18}F -FDG und der Resistenz gegenüber ABT-737 zwischen den beiden mit ATRA behandelten AML Zelllinien?
8. Zeigen sich Unterschiede in der Aufnahme von ^{18}F -FDG und der Resistenz gegenüber ABT-737 zwischen den Zelllinien, die mit ATRA behandelt wurden, und den entsprechenden Kontrollen ohne ATRA?
9. Lassen sich auch hier Unterschiede auf molekularer Ebene mittels Western Blot (s. 5.) feststellen?

5. Material und Methoden

5.1. Verwendete Agenzien

5.1.1. Zellkultur

5.1.1.1. Medien

Medien	Hersteller, Standort
ATCC™ Fötale Kälberserum (not heat inactivated)	ATCC™, Manassas, VA USA
ATCC™ Iscove's modified Dulbecco's Medium w. 4mM L-glutamine adjusted to contain 1,5 g/L sodium bicarbonate	
Gibco® Iscove's modified Dulbecco's Medium w. 4mM L-glutamine	Gibco®/Life Technology, Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA
Gibco® Minimum Essential Medium (MEM) α, Nucleosides, GlutaMAX	
RPMI 1640 Flüssigmedium (mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

5.1.1.2. Zusätze

Zusätze	Hersteller, Standort
β-Mercaptoethanol	Gibco®/Life Technology, Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA
Insulin (Human)	
Insulin (Human), rekombinant	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	
L-Glutamin (200 mM)	
Natriumpyruvat (100 mM)	
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml 10000 µg/ml)	
Phosphate buffered saline (PBS) (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	
Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor [GM-CSF]	Gibco®/Life Technology, Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA
Recovery Cell Culture Freezing Medium	
Transferrin (Human)	

5.1.2. Chemikalien und Kits

Chemikalien	Hersteller, Standort
ABT-737	Active Biochemicals Co., Limited, Wan Chai, Hongkong, China
Ammoniumacetat (CH ₃ COONH ₄)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	
Ascorbinsäure	
β-Mercaptoethanol	
Bovines Serumalbumin (BSA)	
Bromphenolblau	
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	
Calciumchlorid (CaCl ₂)	
Ethanol 70%	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Glycerin	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	
Isopropanol 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	
Pepstatin A	Calbiochem®/EMD Millipore, MA USA
Protease-Inhibitor Cocktail Tabletten complete-Mini	Roche, Mannheim, Deutschland
Propidiumiodid / PI [3µg/ml]	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Retinoic Acid, all-trans-retinoic acid (ATRA)	Tocris Bioscience, R&D Systems England
RIPA Lysis Buffer, 10X	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl) 30%	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Salzsäure (HCl) 37%	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS) 20% (w/v) solution, 1 L	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trizma® base	
Trypan Blue stain 0,4%	Life Technology, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kits	Hersteller, Standort
CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay, bestehend aus CellTiter-Glo® Buffer (10 ml) und CellTiter-Glo® Substrate (lyophilized)	Promega, Madison, USA

Pierce® BCA Protein assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate	
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	

5.1.3. Puffer- und Stammlösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Annexin-V Binding Buffer (10x), pH = 7,4 (4 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,1 M HEPES/NaOH, ▪ 1,4 M NaCl ▪ 25 mM CaCl₂ ▪ pH mit 37%iger - HCl einstellen
Annexin-V Binding Buffer (1x) (4 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Annexin-V Binding Buffer (10x) 5 ml ▪ Filtriertes FKS 2,5 ml ▪ ddH₂O ad 50 ml
APS 10% Lösung, abgedunkelt (4 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ammoniumperoxodisulfat (APS) ▪ ad 10 ml ddH₂O
Laemmli Puffer (5x) (4° C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 6,25 ml ▪ Glycerol 12,5 ml ▪ 20% SDS Buffer 12,5 ml ▪ β-Mercaptoethanol 5 ml ▪ Bromphenolblau 0,05 g ▪ ddH₂O ad 50 ml
Lysebuffer (-20 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RIPA Buffer (10x) 100 µl ▪ Protease-Inhibitor-Cocktail Stock (1:25) 40 µl ▪ 1 mM NaF (1:100) 10 µl ▪ 1 mM Pepstatin A (1:100) 10 µl ▪ ddH₂O ad 1 ml
Protease-Inhibitor-Cocktail Stock (-80° C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ddH₂O 1 ml ▪ 1 Tablette Protease-Inhibitor
SDS Buffer, 20% (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SDS 200 g ▪ ddH₂O ad 1 L
SDS-Runningbuffer (10x) (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 30,2 g ▪ Glycin 144 g ▪ 20% SDS Buffer 50 ml ▪ ddH₂O ad 1 L
SDS-Runningbuffer (1x) (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SDS-Runningbuffer (10x) 100 ml ▪ ddH₂O ad 1 L
TBS (10x), pH = 7,6	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 24 g

(RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ NaCl 80 g ▪ pH mit 37%iger - HCl einstellen ▪ ddH₂O ad 1 L
TBST (1x) (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TBS (10x) 100 ml ▪ ddH₂O ad 1 L ▪ Tween 20% 500 µl
TBST mit 5% Magermilchpulver (4 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ TBST (1x) 100 ml ▪ Magermilchpulver 5 g
Transfer Buffer (10x) (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 58,2 g ▪ Glycin 29,4g ▪ 20% SDS Buffer 20 ml ▪ ddH₂O ad 1 L
Transfer Buffer (1x) (4 °C)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Transfer Buffer (10x) 100 ml ▪ Methanol 200 ml ▪ ddH₂O ad 1 L
1,5 M Tris Lösung, pH 8,8 (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 181,65 g ▪ ad 800 ml ddH₂O, Einstellen des pH-Werts mit Salzsäure (HCl) 30% auf 8,8 ▪ nach pH-Wert Einstellung auffüllen auf 1 l mit ddH₂O
0,5 M Tris Lösung, pH 6,8 (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 60,55 g ▪ ad 700 ml ddH₂O, Einstellen des pH-Werts mit Salzsäure (HCl) 30% auf 6,8 ▪ nach pH-Wert Einstellung auffüllen auf 1 l mit ddH₂O
1,5 M Tris Lösung, pH 6,8 (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Trizma® base 181,65 g ▪ ad 700 ml ddH₂O, Einstellen des pH-Werts mit Salzsäure (HCl) 30% auf 6,8 ▪ nach pH-Wert Einstellung auffüllen auf 1 l mit ddH₂O

5.1.4. Primär und sekundärer Antikörper

5.1.4.1. Primärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Spezies	Ziel	Größe (kDa)	Verhältnis	Hersteller, Standort
Anti-BCL-2	Maus	Mensch	26	1:1000	R&D Systems, England
Anti-BCL-W	Kaninchen	Mensch	22	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Anti-BCL-XL	Kaninchen	Mensch	26	1:1000	BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, NJ USA
Anti-BCL2A1	Kaninchen	Mensch	20 – 28	1:1000	Origene Technologies, Rockville, MD USA
Anti-Caspase 3	Kaninchen	Mensch	~ 13, ~ 17, 35	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA
Anti-MCL-1	Ratte	Mensch	~ 37	1:1000	AG Jost, III. Med., MRI, TUM
Anti- α -Tubulin, HRP-conjugated	Kaninchen	Human	52	1:1000	Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
Anti- β -Actin, HRP-conjugated	Kaninchen	Mensch	42		Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland

5.1.4.2. Sekundärantikörper für Western-Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller, Standort
anti-rabbit IgG, HRP - conjugated	Ziege	1:5000	Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
anti-mouse IgG HRP - conjugated	Maus	1:5000	Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland

anti-rat IgG HRP - conjugated	Ratte	1:5000	Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
-------------------------------	-------	--------	--

5.1.4.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konzentration	Hersteller, Standort
Annexin V Fluorescein- Isothiocyanat / FITC	[1µg/ml]	BD Bioscience, Becton, Dickinson and Company, NJ USA

5.1.5. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Standort
0,-5 ml- /1,5 ml-/2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
6-/12-/24-/96-Well Mikrotiterplatte mit F-Boden und Abdeckplatte	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well Mikrotiterplatte mit U-Boden und Abdeckplatte	TPP, Trasadingen, Schweiz
Thermo Scientific Flat Bottom 96-well White Polystyrene Plates	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Countess™ cell counting chamber slide	Invitrogen, Oregon, USA
Cryo Tubes 1,8 ml	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Einmalpipetten (2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes™ 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Deutschland
Multipipetten 5, 10, 20, 50 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filter (25, 75, 175 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Falcon® Zentrifulagröhrchen (5 ml, 15 ml und 50 ml)	Corning, Bodenheim, Deutschland

5.2. Geräte

Gerät	Hersteller, Standort
Absaugpumpe Eppendorf 4153	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ACCU Block™ Digital Dry Bath Heizblock	Labnet International, Edison, USA
Analysenwaage SI-64	Denver Instruments, Denver, USA
Brutschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin, Deutschland
Cell-Counter Countess™	Invitrogen, Oregon, USA
Celloshaker Variospeed	Chemetron Products, Milano, Italien

Contamat FHT 111 M	Eberline Instruments, Erlangen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eis, Isernhagen, Deutschland
FACS (fluorescence-activated cell sorting) CantoTM	BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA
Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM3	Wallac, Turku, Finnland
Gefrierschrank (-20°C)	Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C) Unicryo	UniEquip, Planegg, Deutschland
INTAS Science Imaging CCD-Kamera	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
LaminAir Flow HB 2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Magnetrührer RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop, Aktiovert 10	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Milli-Q UF-Plus Membrapure (zur Herstellung von doppelt destilliertem Wasser)	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mini Protean Cooling Unit, Kühlakku	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	
Mithras LB 940 Mikroplattenleser	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Multipipette (0,5-10µl, 20-200 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetus® akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter, pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Röhrchenroller Stuart™ Digital Tube Roller	Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, United Kingdom
Stickstoffbehälter ARPEGE 70	Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Vortex 4 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Vortex-Genie	Scientific Industries INC, Springfield MA, USA (Vertrieb durch Bender&Hobei AG, Zürich, Schweiz)
Wasserbad, 37°C	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wellplattenleser Bio-Tek Elx800™ Series Universal Microplate Reader / ELISA-Reader	Progen Scientific, London, UK
Wippschüttler WS 10	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Zentrifuge, Biofuge fresco, kühlbar	Heraeus, Berlin, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R, kühlbar	

Zentrifuge	Rotanta, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany
------------	---

5.3. Software

Programm	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Adobe, San José, USA
Adobe Illustrator CS5	
Chemostar	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
FlowJo 8.87	FlowJo, LLC Data Analysis Software, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, USA
KC junior für Bio-Tek ELISA Reader	Progen Scientific, London, UK
Microsoft Excel, Power Point, Word for Mac (Version 2016)	Microsoft, Redmond, USA
Mikrowin Software für Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland

5.4. Zelllinien und Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden acht verschiedene AML-Zelllinien verwendet. KG-1a (FAB M1) ist ein Subtyp der Zelllinie KG-1, die sich sowohl morphologisch als auch funktionell von ihrer Ursprungszelllinie unterscheidet (Koeffler et al. 1980). Die Zelllinie umfasst vor allem unreife Myeloblasten, die unabhängig vom koloniestimulierenden Faktor (colony stimulating factor, CSF) proliferieren. KG-1a lässt sich mit ATRA, DMSO oder CSF in Kultur nicht weiter differenzieren (Koeffler 1983). KG-1a Zellen wurden in MEM α Glutamax mit 20% fötalem Kälberserum (FCS), 2% Natriumpyruvat und 5% L-Glutamin-Lösung kultiviert (s. 5.1.1). Die Zelllinie HL-60 (FAB M2) wurde aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Frau mit akuter promyelozytärer Leukämie isoliert. Durch Zugabe von Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), DMSO, Actinomycin D oder all-trans-Retinoinsäure (ATRA) wird die Differenzierung der Zelllinie induziert (Gallagher et al. 1979). Als Kulturmedium für HL-60 wurde RPMI 1640 mit 10% FCS, 2% Natriumpyruvat und 5% L-Glutamin-Lösung verwendet (s. 5.1.1). Kasumi-1 (FAB M2) wurde aus dem peripheren Blut eines siebenjährigen Jungen gewonnen. Die Zelllinie besitzt eine chromosomale Translokation t(8;21) (q22;q22) sowie eine Sensibilität zur Differenzierung induziert durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Asou et al. 1991). Kasumi-1 wurde in RPMI 1640 mit 20% FCS und 1% L-Glutamin-Lösung kultiviert (s. 5.1.1). NB-4 (FAB M3) wurde aus dem Knochenmarksblut einer zwanzigjährigen Frau gewonnen. Die Zelllinie zeigt eine chromosomale Translokation t(15;17) (q22;q11-12), welche ursächlich für ihre schwache Differenzierung sowie ihre Aggressivität ist. Zudem ist NB-4 sehr

sensibel gegenüber Differenzierung mit ATRA (Lanotte et al. 1991), (Benedetti et al. 1996). Für NB-4 wurde ein RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% L-Glutamin-Lösung verwendet (s. 5.1.1). PLB-985 (FAB M4) wurde aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen AML-Patientin mit Rezidiv gewonnen (Tucker et al. 1987). Mittels DNA-Fingerprinting Analyse wurde PLB-985 als ein Subtyp von HL-60 (FAB M2) identifiziert (Drexler et al. 2003). Für die Kultivierung von PLB-985 wurde (wie für NB-4) ein RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% L-Glutamin-Lösung verwendet (s. 5.1.1). MV4-11 (FAB M5) wurde aus dem peripheren Blut eines zehnjährigen Jungen isoliert. MV4-11 Zellen verursachen das Bild einer akuten myelomonozytären Leukämie aufgrund der überwiegend klonalen Proliferation von monozytären Vorstufen. MV4-11 Zellen proliferieren in Kultur auch ohne Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF), jedoch mit einer ca. 50% geringeren Rate (Lange et al. 1987, Santoli et al. 1987, Quentmeier et al. 2005). Das verwendete IMD Medium der Firma Gibco®/Life Technology wurde mit 10% FCS und 2% L-Glutamin ergänzt (s. 5.1.1). THP-1 (FAB M5) wurde aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie isoliert (Tsuchiya et al. 1980). Die Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 0,05 nM 2-Mercaptoethanol und 1% L-Glutamin-Lösung kultiviert (s. 5.1.1). AML-193 (FAB M5) Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines 17-jährigen Mädchens mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen (Lange et al. 1987). Für die Kultivierung von AML-193 wurde ein modifiziertes IMD Medium mit 1,5 g/L Natriumbicarbonat verwendet, das mit 5% nicht-Hitze inaktiviertem FCS, einer 1% L-Glutamin-Lösung, 5µg/ml Transferrin, 5µg/ml humanem rekombinanten Insulin sowie 5pg/ml GM-CSF angereichert wurde (s. 5.1.1). Alle Zelllinien wurden von ATCC, DSMZ bzw. CLS bezogen. Die Kultivierung der AML-Zelllinien erfolgte im Zellkultur-Brutschrank (Heraeus 6000, Berlin, Deutschland) unter kontinuierlicher 5%tiger CO₂-Begasung bei einer konstanten Temperatur von 37° C. Das Passagieren der Zellen (s. 5.4.2) sowie die Inkubation mit ATRA, ABT-737, ¹⁸F-FDG etc. wurde stets unter sterilen Bedingungen in der LaminAir Flow HB 2472 (Heraeus, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

5.4.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Zellzählgerät Cell-Counter Countess™ (Invitrogen, Oregon, USA). Hierbei wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blue stain 0,4% in einem Well einer 96-Well Mikrotiterplatte miteinander vermischt und anschließend nach vorheriger erneuter Resuspension je 10 µl in die beiden Zellzählkammern (A + B) der Countess™ cell counting chamber slides überführt. Das Zellzählgerät unterscheidet anhand der Färbung vitale Zellen (helles Zentrum) von toten Zellen (starke Anfärbung der gesamten Zelle). Nach erfolgter Zählung wurde aus den ermittelten Zellzahlen der ‚live cells‘ (Zellzahl/ml) der Zellzählkammer A und B ein Mittelwert gebildet. Zuletzt wurde der Mittelwert der ‚live cells‘ auf das Gesamtvolumen hochgerechnet.

5.4.2. Passagieren der Zellen

Alle Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen, d. h. alle 2-3 Tage, entsprechend ihrer Proliferationsgeschwindigkeit passagiert. Hierzu wurde das jeweilige frische Zellkulturmedium vorher für ca. 1 h auf 37 °C erwärmt und die entsprechende Zelllinie – i.d.R. kultiviert in einer 175 cm² Zellkulturflasche – kurz vor Durchführung der Passage unter die LaminAir Flow HB 2472 (Heraeus, Berlin, Deutschland) gestellt. Unter sterilen Bedingungen wurde gemäß der zur Kultivierung notwendigen Mindestzellzahl die Zellsuspension aus der Kulturflasche durch Absaugen auf ein entsprechendes Volumen reduziert und mit frischem Medium aufgefüllt. Bei komplettem Mediaustausch wurde der Inhalt einer Zellkulturflasche (i.d.R. 30 ml) in ein 50 ml Falcon® überführt und mit 1200 rpm in der Zentrifuge (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Berlin, Deutschland) für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt. Nach erfolgter Passagierung wurde die Passagenummer auf der Flasche vermerkt und diese dann in den Zellkultur-Brutschrank (Brutschrank Typ 6000, Heraeus, Berlin, Deutschland) zur weiteren Kultivierung der Zellen zurückgestellt.

5.4.3. Einfrieren der Zellen / dauerhafte Lagerung der Zellen

Von allen Zelllinien wurden nach der 3. – 5. Passage mindestens 1×10^6 Zellen (i.d.R. 5×10^6) pro Cryo Tube eingefroren. Hierbei wurde unter sterilen Bedingungen (LaminAir Flow HB 2472) die komplette Zellsuspension nach vorheriger mikroskopischer Kontrolle und Zellzählung in ein 50 ml Falcon überführt und mit 1200 rpm für 3 min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Berlin, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen in ca. 1 ml des Recovery Cell Culture Freezing Medium (Gibco®/Life Technology, Thermo Fisher Scientific Inc., MA USA) resuspendiert, anschließend in Cryo Tubes (1,8 ml) überführt und für 4-24 h bei -80 °C aufbewahrt. Schließlich erfolgte die Überführung in den Stickstoffbehälter (ARPEGE 70, Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden, Deutschland) zur Lagerung der Zellen im flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

5.4.4. Differenzierung der Zelllinien NB-4 und AML-193

Die Differenzierung bei NB-4 und AML-193 wurde mit all-trans Retinsäure (ATRA) durchgeführt (Valtieri et al. 1991, Barber et al. 2008). Hierbei wurde die Zelllinie AML-193 analog zu Valtieri et al. (1991) mit 100 nM ATRA bei einer leicht modifizierten Inkubationsdauer von 5 Tagen inkubiert. Die Zelllinie NB-4 wurde entsprechend behandelt (100 nM ATRA, 5 Tage), mit leichten Abweichungen zur Methode von Barber et al. (2008) (200 nM ATRA, 4 Tage). Zur Herstellung einer 25 mM Stocksolution wurden 7,5 mg ATRA in 1 ml DMSO gelöst und anschließend in einem lichtgeschützten 1,5 ml Eppendorff Reaktionsgefäß bei -20 °C aufbewahrt. Die Kontrollgruppen wurden jeweils mit einer entsprechenden Konzentration an DMSO ohne ATRA für 5 Tage inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die behandelten Zelllinien für die Versuche verwendet.

5.4.5. Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung eines Zelllysats wurden mindestens 1×10^7 Zellen benötigt. Hierbei wurden für jede Zellreihe je 9 Wells, d. h. zwei 6-Well Mikrotiterplatten pro Zelllinie, mit je 1×10^7 Zellen in je 10 ml Volumen und mit der entsprechenden ABT-737 Konzentration [IC_{50}] (s. Kapitel 6.1) vorbereitet. Die Inkubation mit ABT-737 erfolgte für maximal 96 h. Nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellansätze (je 10 ml) in 15 ml Falcons überführt, bei 1400 rpm für 3 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Berlin, Deutschland) abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die pelletierten Zellen wurden mit 1,5 ml PBS (4 °C) gewaschen und resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit 2000 rpm für 3 min (4 °C, Biofuge fresco, Heraeus, Berlin, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde nun jeweils mit 120 µl Lysebuffer versetzt, mehrfach resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 min wurde das Lysat bei 4 °C für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand des Zelllysats wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C (Unicryo, UniEquip, Planegg, Deutschland) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.5. Zelluläre Aufnahme von ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glukose (^{18}F -FDG)

5.5.1. ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glukose (^{18}F -FDG)

^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glukose (^{18}F -FDG) ist ein Derivat des Glukosemoleküls (s. auch Einleitung 3.6.2.3), das an Position C2 statt einer OH-Gruppe ein radioaktives Fluor-18 Isotop ($t_{1/2} = 109,7$ min) besitzt. ^{18}F -FDG wird wie Glukose über den zellulären GLUT-1 Transporter aufgenommen und durch das Enzym Hexokinase zu ^{18}F -FDG-6-Phosphat phosphoryliert. Die Phosphorylierung verhindert, dass das Molekül passiv über die Zellmembran ausgeschieden wird. Ein weiterer Abbau von ^{18}F -FDG-6-P findet aufgrund des auf Position C2 vorliegenden ^{18}F -Atoms nicht statt. Somit akkumuliert ^{18}F -FDG-6-P in der Zelle (metabolic trapping) bis zum Zerfall des ^{18}F -Isotops zu ^{18}O . Nach Bindung eines Wasserstoffatoms entsteht wieder eine OH-Gruppe am Glukosemolekül. Das heißt, nach dem Zerfall von ^{18}F entsteht wieder ein Glukosemolekül. ^{18}F -FDG wurde im Zyklotron der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Technischen Universität München hergestellt. Die benötigte Zielaktivität von 370 kBq/ml (10 µCi/ml) wurde durch entsprechende Verdünnungen des Ausgangsprodukts hergestellt.

5.5.2. Versuchsdurchführung

Zur Vorbereitung der Versuchsansätze (mit maximal zwei Zelllinien pro Durchlauf) wurden am Vortag pro Zeitpunkt (insgesamt 10 Zeitpunkte: 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min) dreimal je 2×10^5 Zellen einer Zelllinie in je 200 µl zellspezifischem Medium ausgesät (24-Well Mikrotiterplatten). Die 24-Well Platten wurden dann über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die vorbereiteten Suspensionszellen aus den Mikrotiterplatten in entsprechend vorbereitete Reaktionsgefäße (1,5 ml Eppendorf

Reaktionsgefäße) überführt, mit 2000 rpm für 3 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Berlin, Deutschland) abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun wurden 400 µl glukosefreies Medium hinzugefügt, die Zellen darin resuspendiert und erneut mit 2000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, durch 200 µl glukosefreies Medium ersetzt und die Zellen wieder resuspendiert.

Die ^{18}F -FDG-Lösung (ca. 1-1,5 GBq in ca. 1-1,5 ml PBS) wurde mit glukosefreiem Medium auf eine Zielaktivität von 370 KBq/ml (10 µCi/ml) verdünnt. Je 200 µl der verdünnten ^{18}F -FDG-Lösung (entspricht 74 KBq [2 µCi] bei 200 µl) wurden zu je 200 µl Zellsuspension gegeben (Aktivität im Reaktionsgefäß: 37 KBq [1 µCi] bei 400 µl, entspricht 370 Bq [10 pCi] in 4 µl, entspricht 92,5 Bq/µl [2,5 pCi/µl]). 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min nach Inkubation der Zellen mit ^{18}F -FDG wurden die Reaktionsgefäße mit 2000 rpm für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Zellpellet zweimal mit 1 ml kaltem PBS (4 °C) resuspendiert und zentrifugiert (2000 rpm, 3 min, 4 °C).

Die ^{18}F -FDG Aktivitäten in den Zellpellets wurden zusammen mit 3 Leerwerten (unbehandelte Ansätze ohne Zellen) und 3 Standardwerten (200µl der verdünnten ^{18}F -FDG-Lösung Stammlösung (370 KBq/ml [10 µCi/ml]) mit 200 µl glukosefreiem Medium: Gesamtaktivität im Standard 37 KBq [1 µCi] bei 400 µl) im γ -Counter (Typ 1480 Wizard TM3, Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Von den erhaltenen Daten wurde jeweils der Mittelwert und der korrespondierende Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von den jeweiligen Zeitpunkten mit Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA), berechnet.

5.6. Behandlung von AML-Zellen mit ABT-737

Zur Herstellung einer 1 mM ABT-737 Stocksolution wurden 5 mg ABT-737 (Molekulargewicht 813,4 g/mol) in 6.146 ml DMSO gelöst. 1 ml Aliquots davon wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -20 °C aufbewahrt. Die Kontrollgruppe wurde jeweils mit einem entsprechenden Volumen an DMSO ohne ABT-737 inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Vitalitätsmessung mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) (s. 5.7) wurden je 2×10^4 Zellen pro Well auf einer 96-well Mikrotiterplatte mit U-Boden (TPP, Trasadingen, Schweiz) ausgesät. Davon wurden jeweils 48 Wells mit ABT-737 in 12 unterschiedlichen Konzentrationen (jeweils 4 Wells / Konzentrationsstufe) sowie jeweils 48 Wells als Kontrollen mit DMSO ohne ABT-737 für 48 h im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. In den Vorversuchen zeigten sich bereits Unterschiede bei den Zelllinien bezüglich der Sensitivität gegenüber ABT-737 unter dem verwendeten Inkubationsschema (niedrig: 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM und 10 µM), so dass 2 weitere Inkubationsschemata (mittel und hoch) angewandt wurden. Die Zelllinien HL-60 und NB-4 wurden mit dem hohen Inkubationsschema (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 17,5 µM, 25 µM, 50 µM und 75 µM ABT-737) inkubiert. Die Zelllinie AML-193 wurde mit dem mittleren Inkubationsschema (10 pM, 100 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM,

50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 μ M, 10 μ M und 20 μ M ABT-737) behandelt. Nach 48h erfolgte bei allen Zelllinien die Vitalitätsmessung mithilfe des CellTiter-Glo[®] Tests.

5.7. Bestimmung der Zellvitalität mit CellTiter-Glo[®] nach Behandlung mit ABT-737

Zur Ermittlung der zelllinienspezifischen IC₅₀-Konzentration von ABT-737, d. h. derjenigen Konzentrationen von ABT-737 bei der 50% der Zellen überleben, erfolgte die Vitalitätsmessung mit CellTiter-Glo[®]. Im CellTiter-Glo[®] Test werden die Zellen zunächst lysiert und das freiwerdende ATP wird anschließend durch die Luciferase in Anwesenheit von Mg²⁺ zu AMP und Pyrophosphat unter Bildung von CO₂ gespalten. Das dabei emittierte Licht (560 nm) wird photometrisch mithilfe des Mithras LB 940 Mikroplattenleser (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) quantifiziert. Zur Vorbereitung auf den CellTiter-Glo[®] Test wurden die für 48 h mit ABT-737 und DMSO (Kontrollgruppe ohne ABT-737) inkubierten AML-Zellen für 30 min aus dem Brutschrank genommen und auf Raumtemperatur (RT) akklimatisiert. Ebenfalls wurde zur Herstellung der CellTiter-Glo[®] Stocksolution (s. 5.1.2) das CellTiter-Glo[®] Trockenpulver lyophilisiert) sowie die mitgelieferte CellTiter-Glo[®] Pufferlösung (10 ml) aus dem Gefrierschrank (-20 °C) entnommen und für ca. 30 min bei RT erwärmt. Anschließend wurde die komplette CellTiter-Glo[®] Pufferlösung (10 ml) dem CellTiter-Glo[®] lyophilisierten Trockenpulver hinzugefügt und das Ganze kurz gevortext (IKA, Staufen, Deutschland). Mit einer 12-Kanal Multichannelpipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden je 50 μ l der Zellsuspension (nach mehrfachem Resuspendieren) in eine 96-Well Flat Bottom White Polystyrene Platte (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) überführt. Diese speziellen Platten sind besonders für optische Messungen geeignet, da durch den weissen Kunststoff Interferenzen bei der Analyse der Lichtemissionen von angrenzenden Wells vermieden werden. Anschließend wurden je 50 μ l der CellTiter-Glo[®] Stocksolution hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei RT unter ständigem Schütteln wurden die sich entwickelnden Lichtemissionen im Mithras LB 940 Mikroplattenleser gemessen. Die Daten wurden in einer Exceldatei gespeichert und anschließend in Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, USA) zur Auswertung eingefügt. Zur Berechnung der Überlebenskurven wurden die Mittelwerte aus den gemessenen Lichtemissionen der einzelnen ABT-737 Konzentrationen ermittelt und bezüglich der Kontrollen (DMSO und ohne ATRA; Vitalität = 100%) normiert. Anschließend wurden die Werte für die verschiedenen Konzentrationen an ABT-737 logarithmisch auf der X-Achse und die Werte für die Vitalität in % auf der Y-Achse aufgetragen. Die Berechnung der mittleren Hemmkonzentration [IC₅₀] und der Sigmoidalkurve erfolgte in Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA), anhand der Dosis-Antwort/Wirkung-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (log(inhibitor) vs. normalized response - Variable slope (siehe Statistik, Kap 5.13.1).

Eine Sonderstellung in der Auswertung nimmt HL-60 ein. Bei HL-60 zeigten sich in den beiden höchsten ABT-737 Konzentrationen (50 μM und 75 μM) stark erhöhte prozentuale Anteile an vitalen Zellen von 71,3 % bei 50 μM und 63,8 % bei 75 μM , im Vergleich zu den niedrigeren ABT-737 Konzentrationen. Beispielsweise betrug der Anteil vitaler Zellen bei 25 μM ABT-737 nur 3,2 %. Daher wurden die Werte der beiden höchsten ABT-737 Konzentrationen (50 und 75 μM) bei der Berechnung des IC_{50} sowie der Berechnung und Darstellung der Überlebenskurve von HL-60 nicht berücksichtigt.

5.8. Durchflusszytometrie zur Bestimmung apoptotischer Zellen

In der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) wird jede Zelle hinsichtlich ihrer Membranzmorphologie sowie ihrer Größe analysiert. Dabei wird das auf die Zelle einfallende Laserlicht vorwärts- (forward scatter; FSC) und seitwärts (side scatter; SSC) gestreut. Die Vorwärtsstreuung liefert Informationen über die Zellgröße, die Seitwärtsstreuung Auskünfte über die Zelloberfläche. Zudem lässt sich durch Anfärben der Zellen mit Propidiumiodid (PI) die Vitalität der Zellen quantitativ darstellen, da Propidiumiodid nur in Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran eindringen kann und somit nur absterbende Zellen angefärbt werden. Zur eindeutigen Bestimmung apoptotischer Zellen ist zudem eine Färbung mit Annexin-V-FITC notwendig. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin (PS) in der Zellmembran. PS ist normalerweise in der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert und kann daher durch Annexin-V nicht angefärbt werden. Im Zuge der Apoptose wird PS auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran transferiert. Frühe apoptotische Zellen (mit PS auf der extrazellulären Seite) sind daher durch Annexin-V-FITC anfärbbar, nicht jedoch mit PI, da ihre Zellmembran noch intakt ist. Erst späte apoptotische Zellen weisen Schäden in der Zellmembran auf, so dass PI in die Zellen eindringen und sie anfärben kann. Späte apoptotische Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sowohl mit PI als auch Annexin-V-FITC anfärbbar sind (Wlodkovic et al. 2009).

Für die vorliegende Arbeit wurde das FACS CantoTM (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, California, USA) der AG Ruland (Forschungslabore des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München am Klinikum rechts der Isar, München) verwendet. Das Gerät verfügt über verschiedene Emissionskanäle und daher können mehrere Fluorochrome parallel zur Beurteilung der Apoptose (Annexin-V-FITC und PI) verwendet werden. Die Bestimmung und Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt:

Es wurden jeweils 36 Wells (Triplettansätze für je 0 h - 96 h) einer 96-U-Well Mikrotiterplatte für eine AML-Zelllinie verwendet. Dazu wurden je 2×10^4 Zellen in 90 μl Zellkultur-Medium pro Well ausgesät und anschließend unterschiedlich lange (0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96h) mit der vorher ermittelten, jeweiligen IC_{50} -Konzentration von ABT-737 behandelt (siehe Kap. 6.1 und 6.2, Abbildung 4 und Tabelle 8). Dazu wurden je 90 μl mit der zweifachen IC_{50} -Konzentration von ABT-737 zu den 90 μl Zellsuspension gegeben. Die Kontrollgruppen

erhielten ein entsprechendes Volumen an DMSO ohne ABT-737. Der 0 h Wert (6 Wells) wurde weder mit ABT-737 noch mit DMSO (ohne ABT-737) behandelt.

Zur Vorbereitung auf die FACS Analyse wurde zunächst ein 1 x Annexin-V Bindungspuffer, hergestellt. Dazu wurden 5 ml 10 x Annexin-V Bindungspuffer und 2,5 ml FCS in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon® Zentrifugalröhrchen, Corning, Bodenheim, Deutschland) mit ddH₂O ad 50 ml aufgefüllt. Mit dem 1 x Annexin-V Bindungspuffer wurden Stammlösungen von Annexin-V-FITC [1 µg/ml] und Propidiumiodid [3µg/ml] jeweils in einem 10 ml Reaktionsgefäß (Falcon® Zentrifugalröhrchen, Corning, Bodenheim, Deutschland) hergestellt, mit Alufolie abgedunkelt und auf Eis gekühlt. Die Versuchsansätze wurden anschließend aus dem Brutschrank entnommen und zuerst mit einer 96-Well-Platten Zentrifuge der AG Ruland (Rotanta, Hettich, Tuttlingen, Germany) mit 356 rpm für 5 min und bei 4 °C zentrifugiert, um die Suspensionszellen zu pelletieren. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde komplett entfernt, die Zellen durch dreimaliges Resuspendieren mit je 100 µl 1 x Annexin V Bindungspuffer gewaschen und erneut zentrifugiert (356 rpm, 5 min, 4 °C).

Drei der 36 Wells wurden als Kontrollen genutzt: Alternativ wurden in diese Wells je 50 µl der Annexin-V-FITC Stammlösung, der Propidium-Stammlösung bzw. des 1 x Annexin Bindungspuffers gegeben. Zu den übrigen 33 Wells einer Platte (mit Zellen und ABT-737) wurden je 50 µl Annexin-V-FITC Stammlösung pipettiert und die Zellen darin mehrfach resuspendiert. Anschließend wurden je 50 µl der Propidium-Stammlösung zugegeben, die Zellen darin ebenfalls dreimal resuspendiert und schließlich mit Hilfe des FACS Canto™ bezüglich Apoptose analysiert. Mit Hilfe der drei Kontroll-Wells sollte nachgewiesen werden, dass die gewünschten Emissionen detektiert und angezeigt werden. Lediglich vitale Zellen werden weder durch Annexin V FITC noch Propidiumiodid angefärbt. Die mit Hilfe des FACS Canto™ ermittelten Rohdaten wurden mit der Software FlowJo (LLC Data Analysis Software, Ashland, Oregon, USA) ausgewertet.

5.9. Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Lösungen / Lysaten

Die Proteinbestimmung der Lysate wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce®, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Nach Zugabe der BCA-Reaktionslösung zu einem proteinhaltigen Lysat werden die in der BCA-Reaktionslösung enthaltenen Cu²⁺-Kationen durch die anwesenden Proteine im alkalischen Milieu zu Cu⁺-Kationen reduziert (Biuret-Reaktion). Diese bilden anschließend mit zwei Bichinon-4-Carbonsäure-Molekülen einen intensiv violettfarbenen Chelatkomplex, der bei 562 nm photometrisch quantifiziert werden kann.

Zur Erstellung der Standardgeraden wurden je 5 µl von 8 mitgelieferten BSA-Standards (25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml) sowie 5 µl des Leerwerts ohne BSA-Protein in 9 Wells einer 96-F-Mikrotitterplatte pipettiert. Anschließend wurden je 200 µl BCA-Reaktionslösung [50 Teile Lösung A (Bichinon-4-Carbonsäure) + 1 Teil Lösung B (4% CuSO₄)] zu den Wells gegeben. Nach 30-minütiger

Inkubation (37 °C im Brutschrank) erfolgte die Messung der 96-Well Mikrotiterplatte im Bio-Tek Elx800™ Series Universal Microplate Reader / ELISA-Reader (Progen Scientific, London, UK) bezüglich Extinktion in den einzelnen Wells bei 570 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Lysate wurden je 5 µl der hergestellten Zelllysate einer Zelllinie in je 9 Wells (9 Lysate pro Zelllinie für 9 Zeitpunkte: 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) pipettiert. Nach Zugabe von je 200 µl BCA-Reaktionslösung und 30 min Inkubation wurden die Extinktionen wie oben beschrieben bestimmt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Excel (Microsoft, Redmond, USA). Für die Bestimmung der Standardgeraden wurden auf der x-Achse die jeweilige Protein-Konzentration der verwendeten BSA Standards (25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml) sowie des Leerwerts ohne Protein, sowie auf der y-Achse die gemessenen Extinktionen aufgetragen. Mit Hilfe des Menüpunkts „Trendlinie“ wurde eine Standardgerade durch den 0-Punkt erstellt. Die Geradengleichung für die Standardgerade wurde durch Excel berechnet und angezeigt. Mit Hilfe der Geradengleichung wurden dann die Protein-Konzentrationen der Lysate einer Zelllinie mittels der ermittelten Extinktion berechnet [µg/ml]. Schließlich wurden alle berechneten Protein-Konzentrationen der Lysate einer Zelllinie auf die niedrigste Konzentration normiert und auf max. 100 µl Gesamtvolumen mit 1x RIPA Lysis Puffer aufgefüllt (1 Teil 10x RIPA Lysis Puffer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 9 Teile ddH₂O).

Im letzten Schritt wurden die normierten Lysate einer Zelllinie zur Vorbereitung auf die SDS-Page (siehe 5.10) im Verhältnis 5:1 mit 5x Laemmlipuffer vermischt und unter ständigem Schütteln (800 rpm) für 5 min bei 95 °C inkubiert (zur Denaturierung und Reduktion der Proteine). Die Kühlung erfolgte auf Eis unter dem Abzug und die Aufbewahrung der Proben für die SDS-Page im Gefrierschrank bei -80 °C (Unicryo, UniEquip, Planegg, Deutschland).

5.10. SDS-Page mit Laemmlipuffer

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurde in der Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt. Die dafür notwendigen, diskontinuierlichen Gele mit jeweils 10 Probentaschen, bestehend aus Sammel- (4% Acrylamid) und Trenngel (12% Acrylamid), wurden am Vortag hergestellt. Es wurden je nach Bedarf mindestens 8 und maximal 12 Gele hergestellt. Im ersten Schritt wurde die Stocklösung für das 12% Acrylamid Trenngel (siehe Tabelle 3) in einem verschraubbaren 50 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Die Lösung wurde kurz nach Zugabe von 10% APS (s. 5.1.3) in den Zwischenraum (1 mm) zweier Glasplatten auf ca. 75% der maximalen Füllhöhe eingefüllt. Anschließend wurde, zur Vermeidung von Unebenheiten beim Gelabschluss, das restliche Volumen mit 100% Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgefüllt und das Ganze zur Polymerisierung für ca. 60 min bei RT stehen gelassen.

Tabelle 3: Herstellung des Trenngels (12% Acrylamid), bzgl. Stammlösung siehe Kap. 5.1.3

12%-Trenngel	für 8 Gele	für 12 Gele
dH ₂ O	11,2 ml	16,50 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	8,2 ml	12,50 ml
Acrylamid 30 %	13 ml	20 ml
SDS 20 %	162,5 µl	500 µl
TEMED	16,25 µl	20 µl
APS 10 %	162,5 µl	500 µl

Währenddessen erfolgte die Herstellung der Stocklösung für das 4% Acrylamid Sammelgel (siehe Tabelle 4). Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel eingefüllt und der Probenkamm mit 10 Taschen eingesetzt. Erneut wurde das Gel zur Polymerisation für ca. 30 min bei RT stehen gelassen. Zur Aufbewahrung über Nacht wurden die Gele in feuchte Tücher verpackt im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Tabelle 4: Herstellung des Sammelgels (4% Acrylamid), bzgl. Stammlösung siehe Kap. 5.1.3

4% Sammelgel	für 8 Gele	für 12 Gele
dH ₂ O	12,1 ml	24,2 ml
TRIS 0,5 M (pH 6,8)	4,8 ml	9,6 ml
Acrylamid 30 %	2,8 ml	5,6 ml
SDS 20 %	100 µl	200 µl
TEMED	20 µl	40 µl
APS 10 %	100 µl	200 µl

Je 4 Gele wurden am nächsten Tag in die Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Runningbuffer (s. 5.1.3) aufgefüllt und die Sammeltaschen mit den Proben für die SDS-Page (siehe X. 1.9; 15-20 µg Protein) sowie einem Protein-Standard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) beladen. Die Gelelektrophorese wurde bei konstant 100 V für 90-120 min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele vorsichtig aus den Glasplatten herausgetrennt und mit dH₂O gewaschen

5.11. Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-Page (siehe 5.10) wurden die Trenngele für den Western-Blot, d.h. den Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran, vorbereitet. Dazu wurden die Trenngele zunächst in die Mini Gel Holder Kassette (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) luftblasenfrei in einer mit 1x Transferpuffer (s. 5.1.3) gefüllten Wanne als Sandwich folgendermaßen eingefügt: Filterpapier (Whatman) / Nitrozellulose-Membran / Trenngel / Filterpapier (Whatman). Anschließend wurde die Kassette in die Mini Trans-Blot®

Central Core Apparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) eingesetzt. Nach Einsetzen des gefrorenen Kühlakkus (Mini Protean Cooling Unit, Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) wurde die Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) mit 4 °C vorgekühltem 1x Transferbuffer (s. 5.1.3) bis zur Markierung aufgefüllt. Anschließend wurde die gesamte Mini Trans-Blot® Cell in eine Styroporbox gestellt und seitlich mit Eis befüllt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde so bei einer konstanten Stromstärke 200 mA durchgeführt. Zur Transferkontrolle wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit 1 x TBST (s. 5.1.3) 3 min auf dem Wippschüttler WS 10 (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland) mit destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen. Anschließend wurden die transferierten Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau-S für 1 min reversibel gefärbt. Bei positivem Proteinnachweis wurde die Nitrozellulosemembran zur Entfärbung 2-3 x mit jeweils frischem 1 x TBST (s. 5.1.3) für 3 min auf den Wippschüttler WS 10 gewaschen und anschließend in dH₂O überführt. Die gewaschenen Nitrozellulose-Membranen wurden entweder anschließend sofort für den immunhistochemischen Proteinnachweis weiter vorbereitet oder über Nacht in 1 x TBST (s. 5.1.3) bei 4 °C gelagert.

5.12. Immunhistochemischer Proteinnachweis

Die entfärbten Nitrozellulose-Membranen wurden anschließend zur Absättigung unspezifischer Proteine auf der Membranoberfläche für 1 h bei RT mit 1 x TBST (s. 5.1.3) + 5% Magermilchpulver inkubiert. Währenddessen wurden die primären Antikörper jeweils in 50 ml Falcons [3 ml 1 x TBST (s. 5.1.3) + 5% Magermilchpulver, 0,05 % NaN₃ (Natriumazid), Verdünnung der Antikörper je 1:1000] vorbereitet und die Nitrozellulose-Membranen anschließend in die Falcons eingeführt. Die Inkubation erfolgte in einem Rührchenroller (Stuart™ Digital Tube Roller, Cole-Parmer, Stone, Staffordshire, United Kingdom) unter kontinuierlichem Rollen der Falcons über Nacht bei 4 °C im Kühlraum. Am nächsten Tag wurden die Membranen aus den Falcons herausgenommen und 2 x 10 min mit jeweils frischem 1 x TBST (s. 5.1.3) unter ständigem Schwenken (Wippschüttler WS 10) bei RT gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 90 min bei RT in entsprechend vorbereiteten 50 ml Falcons [5 ml 1 x TBST (s. 5.1.3) + 5 % Magermilchpulver, spezifischer sekundärer Antikörper: anti-rabbit, anti-mouse oder anti-rat IgG, jeweils HRP – conjugated (Cell Signaling Technology / New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland); Verdünnung der Antikörper jeweils 1:5000 (s. 5.1.5.2)]. Die Nitrozellulose-Membranen wurden anschließend dreimal für 10 min mit 1 x TBST (s. 5.1.3) unter ständigem Schwenken (Wippschüttler WS 10) bei RT gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte 2 min nach Zugabe eines Chemolumineszenz-Reagens (Pierce® ECL Plus Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) bei RT mit Hilfe der INTAS Science Imaging CCD-Kamera (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software ChemoStar (INTAS Science

Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) analysiert und mit dem Adobe Illustrator CS5 (Adobe, San José, USA) weiterbearbeitet. Dabei wurden der Name der Zelllinie, das Molekulargewicht (kDa) sowie die Identitäten der entsprechenden Proteine inklusive der Lade-Kontrollen β -Aktin und α -Tubulin eingefügt und alle Proteinbanden auf eine Abbildung zusammengefasst.

5.13. Statistische Auswertung

5.13.1. Berechnung der mittleren Hemmkonzentration [IC₅₀] und der Sigmoidalkurve

In Anlehnung an Shoichet 2006 erfolgte die Berechnung der mittleren Hemmkonzentration (inhibitory concentration 50% / [IC₅₀]) und der Sigmoidalkurve in Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA), anhand der nichtlinearen Regression unter Verwendung der Dosis-Antwort/Wirkung-Sigmoidfunktion mit variabler Steigung (log(inhibitor) vs. normalized response - Variable slope) (Shoichet 2006). Der Berechnung liegt folgende Formel zu Grunde:

$$Y = \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log(\text{EC}_{50}) - X) \cdot \text{HillSlope}}}$$

Top (oberes Niveau) kennzeichnet in unseren Auswertungen die Zellpopulationen der AML-Zelllinien, die nur sehr geringen Konzentrationen an ABT-737 ausgesetzt sind. Bottom (unteres Niveau) entspricht hingegen den Zellpopulationen an AML-Zelllinien, die einer sehr hohen Konzentrationen an ABT-737 ausgesetzt sind. Die Konzentration, im vorliegenden Fall von ABT-737, die im mittleren Niveau zwischen Top und Bottom liegt, wird in unserem Fall, da hier eine Dosis-Wirkungsbeziehung untersucht wird, als mittlere Hemmkonzentration (inhibitory concentration 50% / IC₅₀) bezeichnet. In der S-förmigen Kurve markiert dies auf der X-Achse den Wendepunkt zwischen Top und Bottom. Zudem, da sich die verwendeten Konzentrationen durch feste Faktoren (z. B. 10-fach) kontinuierlich verändern, wird die X-Achse logarithmisch skaliert, so dass äquidistante Messwerte entstehen. Der entsprechende dekadische Logarithmus des EC₅₀ fließt somit als log(EC₅₀) in die Formel ein. Der HillSlope ist ein Steigungsparameter und steuert bei mehreren Variablen die Steilheit der Kurve. Angenommen der Wert für den HillSlope beträgt gleich 1, dann ist ein bei einem Wert < 1 die Kurve flacher und bei einem Wert > 1 die Kurve steiler. Ist der Wert für den HillSlope negativ, so erhält man einen gespiegelten, abfallenden Kurvenverlauf (s. Kap. 6.1, Abb. 4 A-H und Abb. 13 A+B).

5.13.2. Gepaarter Hypothesentest zur Beurteilung der Signifikanz

Zur Beurteilung der Signifikanz hinsichtlich der ¹⁸F-FDG Aufnahme bei mit ATRA differenzierten AML-Zelllinien, NB-4 und AML-193, im Vergleich zu ATRA unbehandelten AML-Zelllinien, NB-4 und AML-193, wurde in Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA), der gepaarte Hypothesentest (t-Test, paired sample t-test) herangezogen.

Der gepaarte t-Test untersucht die Mittelwerte zweier abhängiger, verbundener Stichproben (meistens vor und nach einer Behandlung) auf Unterschiede. Als Null-Hypothese (H_0) wird hierbei angenommen, dass kein Unterschied im Mittelwertvergleich zwischen beiden Stichproben vorliegt. Die Alternativhypothese (H_1) hingegen geht davon aus, dass in der untersuchten Stichprobe im Mittelwertvergleich ein Unterschied vorliegt. Entsprechende Berechnungen erfolgten mit Prism 7, GraphPad Software (La Jolla, USA), analog der Veröffentlichung von (Kim 2015).

5.13.3. Berechnung des Korrelationskoeffizienten (Pearson-Koeffizient)

Der Korrelationskoeffizient bezeichnet die Stärke der Korrelation zwischen zwei Variablen. Die Werte für den Korrelationskoeffizienten bewegen sich zwischen $-1,0$ und $1,0$. Ein Wert von $-1,0$ belegt eine perfekte negative Korrelation, ein Wert von $1,0$ dagegen eine perfekte positive Korrelation. Werte nahe 0 implizieren keine oder nur eine schwache lineare Korrelation. Ein Wert von $0,2$ beispielsweise, zeigt eine schwache positive Korrelation zwischen zwei Variablen an. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (Pearson-Koeffizient [r]) zur Ermittlung der Korrelation zwischen der Sensitivität einer AML-Zelllinie gegenüber ABT-737 und der Aufnahme von ^{18}F -FDG erfolgte nach der Formel:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

Dabei bezeichnet n die Anzahl der für eine Berechnung verwendeten AML-Zelllinien, x die Sensitivität einer AML-Zelllinie gegenüber ABT-737 (IC_{50} Wert in nM) (siehe Abb. 3 und Tab. 5) und y die Aufnahme von ^{18}F -FDG (in %) durch eine AML-Zelllinie nach 240 min (siehe Abb. 11).

6. Ergebnisse

6.1. Bestimmung der durch ABT-737 induzierten mittleren Hemmkonzentrationen [IC₅₀] bei den verschiedenen AML-Zelllinien

Zur Bestimmung der mittleren Hemmkonzentration [IC₅₀] nach 48 h Inkubation mit ABT-737 (Apoptoseinduktor) wurde die Vitalität der AML-Zelllinien mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) bestimmt. Zunächst wurden die AML-Zelllinien jeweils mit 12 verschiedenen ABT-737 Konzentrationen behandelt. Die Kontrollgruppen wurden analog zu den ABT-737 Konzentrationen mit 12 entsprechenden Konzentrationen an DMSO ohne ABT-737 für 48 h behandelt. Da sich in den Vorversuchen bereits Unterschiede bei den AML-Zelllinien in ihrer Sensitivität gegenüber ABT-737 gezeigt hatten, wurden 3 verschiedene Behandlungsschemata (niedrig, mittel und hoch) angewendet. Dabei wurden die Zelllinien KG-1a, Kasumi-1, PLB-985, MV4-11 und THP-1 gemäß dem niedrigen Konzentrationsschema behandelt: 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM und 10 µM ABT-737. Die Zelllinie AML-193 wurde gemäß dem mittleren Konzentrationsschema behandelt: 10 pM, 100 pM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1 µM, 10 µM und 20 µM ABT-737. Die Zelllinien HL-60 und NB-4 wurden gemäß dem hohen Konzentrationsschema behandelt: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 17,5 µM, 25 µM, 50 µM und 75 µM ABT-737. Anschließend erfolgte die Vitalitätsmessung mit dem CellTiter-Glo® Assay (s. Material & Methode 5.7). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3 zusammengefasst.

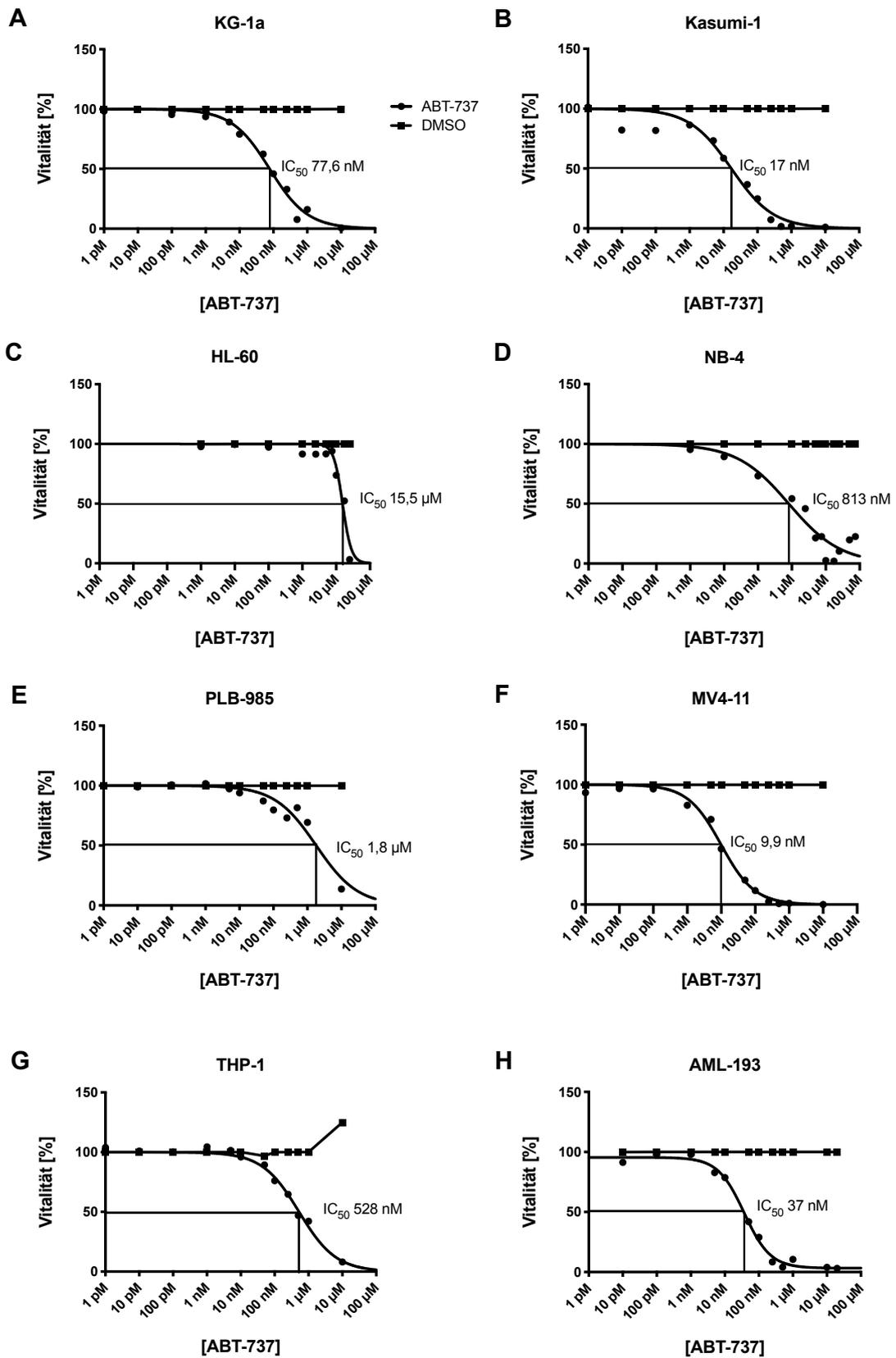


Abbildung 3: Bestimmung der mittleren ABT-737 Hemmkonzentrationen [IC₅₀] bei verschiedenen AML-Zelllinien nach 48 h Inkubation:

KG-1a (A), Kasumi-1 (B), HL-60 (C), NB-4 (D), PLB-985 (E), MV4-11 (F), THP-1 (G) und AML-193 (H). Die IC₅₀ (mittlere Hemmstoffkonzentration; half maximal inhibitory concentration) gibt diejenige Konzentration eines Inhibitors an, die eine 50%ige Inhibierung der Zellvitalität verursacht. Die Vitalität der verschiedenen AML-Zelllinien wurde anhand ihres ATP-Gehalts mithilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, USA) photometrisch bestimmt und die Daten wurden mit Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, USA) ausgewertet. 100 % entspricht der Vitalität der Kontrollen (gefüllte Vierecke). Die ATP-Messungen nach Inkubation mit 12 verschiedenen ABT-737 Konzentrationsstufen (gefüllte Kreise) wurden dazu entsprechend normiert. Die Berechnung der zelllinienspezifischen mittleren ABT-737 Hemmkonzentrationen [IC₅₀] sowie die Berechnung und Darstellung der Überlebenskurven erfolgte anhand der Gleichung (Prism 7): log(inhibitor) vs. normalized response - variable slope (siehe Material und Methoden, Kap. 5.13.1). Bei HL-60 (C) wurden die Ergebnisse der beiden höchsten ABT-737 Konzentrationsstufen [50 µM] und 75 [µM] nicht berücksichtigt (s. Material & Methode 5.7), da sich hier eine erneute Zunahme des ATP-Gehaltes zeigte und die Ergebnisse in diesen beiden Konzentrationsstufe nicht plausibel mit dem Verhalten der vorangegangenen ATP-Messungen war. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus $n \geq 3$.

Bei KG-1a (FAB M1; Abb. 3 A) zeigte ABT-737 bei Konzentrationen von 1 pM bis 1 nM keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellen. Zwischen 1 nM und 10 nM ABT-737 war erstmals ein Effekt auf das Zellüberleben beobachtbar. Bei ABT-737 Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 µM nahm der Effekt hinsichtlich der veränderten Vitalität zu. Die mittlere Hemmkonzentration [IC₅₀] wurde mit 77,6 nM (95%-KI: 61-98 nM) ermittelt (Tab. 5). Bei 1 µM ABT-737 wurden nur noch ca. 10 Prozent vitale Zellen nachgewiesen.

Kasumi-1 (FAB M2; Abb. 3 B) erwiesen sich sensibler gegenüber ABT-737. Eine verringerte Vitalität war bereits ab 100 pM ABT-737 beobachtbar. Entsprechend wurde der IC₅₀-Wert mit 16,95 nM (95%-KI: 10,87-26,42 nM) bestimmt (Tab. 5). Bei 1 µM ABT-737 betrug der Anteil an vitalen Zellen noch ca. 2 %.

Bei den HL-60 Zellen dagegen, überlebten selbst bei 10 µM ABT-737 noch 100 % der Zellen (FAB M2; Abb. 3 C). Dementsprechend betrug die IC₅₀ Konzentration 15,5 µM (95%-KI: 14,11-16,95 µM) (Tab. 5). Erst bei 25 µM ABT-737 ließen sich nur noch ca. 2 % lebende Zellen nachweisen. Völlig unerwartet wurde bei 50 µM und 75 µM ABT-737 wieder ein Anstieg der Vitalität auf bis zu 70 % beobachtet (die entsprechenden Messpunkte sind nicht in der Abb. 3 C angegeben, s. a. Material & Methode 5.7). Auch nach 3-maliger Wiederholung des Versuchs bestätigte sich dieses unerklärliche Ergebnis.

Eine vergleichsweise geringere Sensitivität als HL-60 gegenüber ABT-737 zeigten auch NB-4 Zellen (FAB M3; Abb. 3 D). Bei 1 nM war eine geringe Beeinträchtigung der Vitalität beobachtbar. Die IC₅₀ Konzentration wurde mit 813 nM (95%-KI: 563-1173 nM) ermittelt (Tab. 5). Bei 10 µM ABT-737 waren noch ca. 3% der Zellen vital. Ähnlich wie bei HL-60 war auch bei NB-4 Zellen bei ABT-737 Konzentrationen von 25 µM, 50 µM und 75 µM ein erneuter Anstieg der Vitalität im Vergleich zu 10 µM ABT-737 zu erkennen.

Die Zelllinie PLB-985 (FAB-M4; Abb. 3 E) zeigte eine Beeinträchtigung der Vitalität ab 1 nM ABT-737. Die IC_{50} Konzentration betrug 1,8 μ M (95%-KI: 1,18-2,79 μ M) (Tab. 5). Bei 10 μ M ABT-737 konnten noch ca. 10% vitale Zellen nachgewiesen werden.

In der FAB Kategorie M5 zeigten sich bei den AML-Zelllinien MV4-11, THP-1 und AML-193 unterschiedliche Dosiswirkungsbeziehungen bezüglich Inkubation mit ABT-737. Bei MV4-11 (Abb. 3 F) wurde bereits bei 100 pM eine Beeinträchtigung der Vitalität nachgewiesen. Entsprechend betrug der IC_{50} -Wert 9,9 nM (95%-KI: 7,69-12,73 nM) (Tab. 5). Bei einer ABT-737 Konzentration von 1 μ M waren noch weniger als 3% der Zellen vital.

Dagegen zeigte THP-1 (Abb. 3 G) erst bei 10 nM ABT-737 eine beginnende Abnahme der Vitalität. Der IC_{50} -Wert wurde auf 528 nM (95%-KI: 362-769 nM) bestimmt (Tab. 5). Bei 10 μ M ABT-737 waren weniger als 10 % der Zellen vital.

Bei AML-193 Zellen (Abb. 3 H) wurde eine Verminderung der Vitalität zwischen 1 nM und 10 nM ABT-737 beobachtet. Die IC_{50} Konzentration wurde zu 36,9 nM (95%-KI: 19,94-68,20 nM) bestimmt (Tab. 5). Bei 500 nM ABT-737 waren weniger als 5% der Zellen vital.

Zusammengefasst sind deutliche Unterschiede innerhalb der ermittelten IC_{50} -Werte nach Inkubation mit ABT-737 bei den untersuchten AML-Zelllinien zu erkennen. Auch Zellen der gleichen FAB-Kategorie wiesen deutliche Unterschiede auf. Beispielsweise wiesen innerhalb der FAB Kategorie M5 MV4-11 Zellen ($[IC_{50}] = 9,9$ nM) eine mehr als 50fach höhere Sensitivität gegenüber ABT-737 auf als THP-1 ($[IC_{50}] = 528$ nM). Ein noch deutlicherer Unterschied hinsichtlich der Sensitivität gegenüber ABT-737 (Faktor > 900) wurde in der FAB Kategorie M2 bei Kasumi-1 Zellen ($[IC_{50}] = 16,95$ nM) und HL-60 Zellen ($[IC_{50}] = 15,5$ μ M) beobachtet. Der höchste IC_{50} -Wert nach Inkubation mit ABT-737 wurde bei HL-60 Zellen ($[IC_{50}] = 15,5$ μ M) und der niedrigste bei MV4-11 ($[IC_{50}] = 9,9$ nM) ermittelt. Alle verwendeten Zelllinien zeigten sich sensitiv gegenüber ABT-737 mit einer individuellen Abnahme ihrer Vitalität. Tabelle 8 zeigt die Übersicht der ermittelten IC_{50} Werte.

Tabelle 5: IC_{50} Werte für die untersuchten AML-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit ABT-737

AML-Zelllinie	KG-1a	Kasumi-1	HL-60	NB-4	PLB-985	MV4-11	THP-1	AML-193
IC_{50}	77,6 nM	16,95 nM	15,5 μ M	813 nM	1,8 μ M	9,9 nM	528 nM	36,9nM

6.2. Nachweis der Apoptose mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Zur Verifikation der ermittelten ABT-737 IC_{50} Werte wurde der Anteil apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 4). Dazu wurden die verschiedenen AML-Zelllinien zunächst mit den ABT-737 IC_{50} Konzentrationen für 48 h behandelt (s. Material und Methoden 5.7). Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V – FITC und Propidiumiodid inkubiert (s. Material und Methoden 5.8). Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), das bei apoptotischen Zellen auf die Außenseite der Zellmembran transloziert wird (Darzynkiewicz et

al. 1992, Vermes et al. 1995, Vermes et al. 2000). Die zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid (PI) dient dazu, apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Propidiumiodid dringt in nekrotische Zellen ein, da deren Zell- und Zellkernmembranen permeabel sind, und interkaliert mit den Nukleinsäuren der DNA. Hingegen besitzen frühe apoptotische Zellen noch intakte Zellmembranen und Propidiumiodid kann die Zellen daher nicht anfärben. Bei spät-apoptotischen Zellen sind die Zell- und Zellkernmembranen i.d.R. defekt, so dass Propidiumiodid in die zelluläre DNA interkalieren kann (Riccardi et al. 2006, Rieger et al. 2011). Vereinfacht lässt sich daher sagen, dass intakte, vitale Zellen Annexin V – FITC und Propidiumiodid negativ, apoptotische Zellen Annexin V – FITC positiv und PI negativ und nekrotische Zellen Annexin V – FITC und PI positiv sind (Wlodkowic et al. 2009).

Nach 48 h Inkubation mit der für jede AML-Zelllinie spezifischen ABT-737 IC_{50} Konzentration konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie in allen Zelllinien Apoptose nachgewiesen werden (Abb. 4). Dabei zeigten sich Unterschiede hinsichtlich des Verteilungsmusters der Zellpopulationen (vitale Zellen und Zellen in Apoptose bzw. Nekrose) in den verwendeten AML-Zelllinien. Bei KG1-a, Kasumi-1, HL-60 und MV4-11 fanden sich neben vitalen Zellen auch Zellpopulationen in Apoptose und Nekrose. Anders verteilten sich die Zellpopulationen bei PLB-985, THP-1 und AML-193. Hier wurden fast keine apoptotischen Zellen, sondern fast ausschließlich nekrotische Zellen nachgewiesen. Bei NB-4 zeigten sich neben den vitalen Zellen auch eine kleine Zellpopulation in Apoptose und eine vergleichsweise große Zellpopulation in Nekrose.

Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie belegen, dass ABT-737 in allen behandelten AML Zelllinien Apoptose induziert. Dabei zeigen sich jedoch teilweise deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten AML-Zelllinien in den Verteilungsmustern von vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen (Abb. 4).

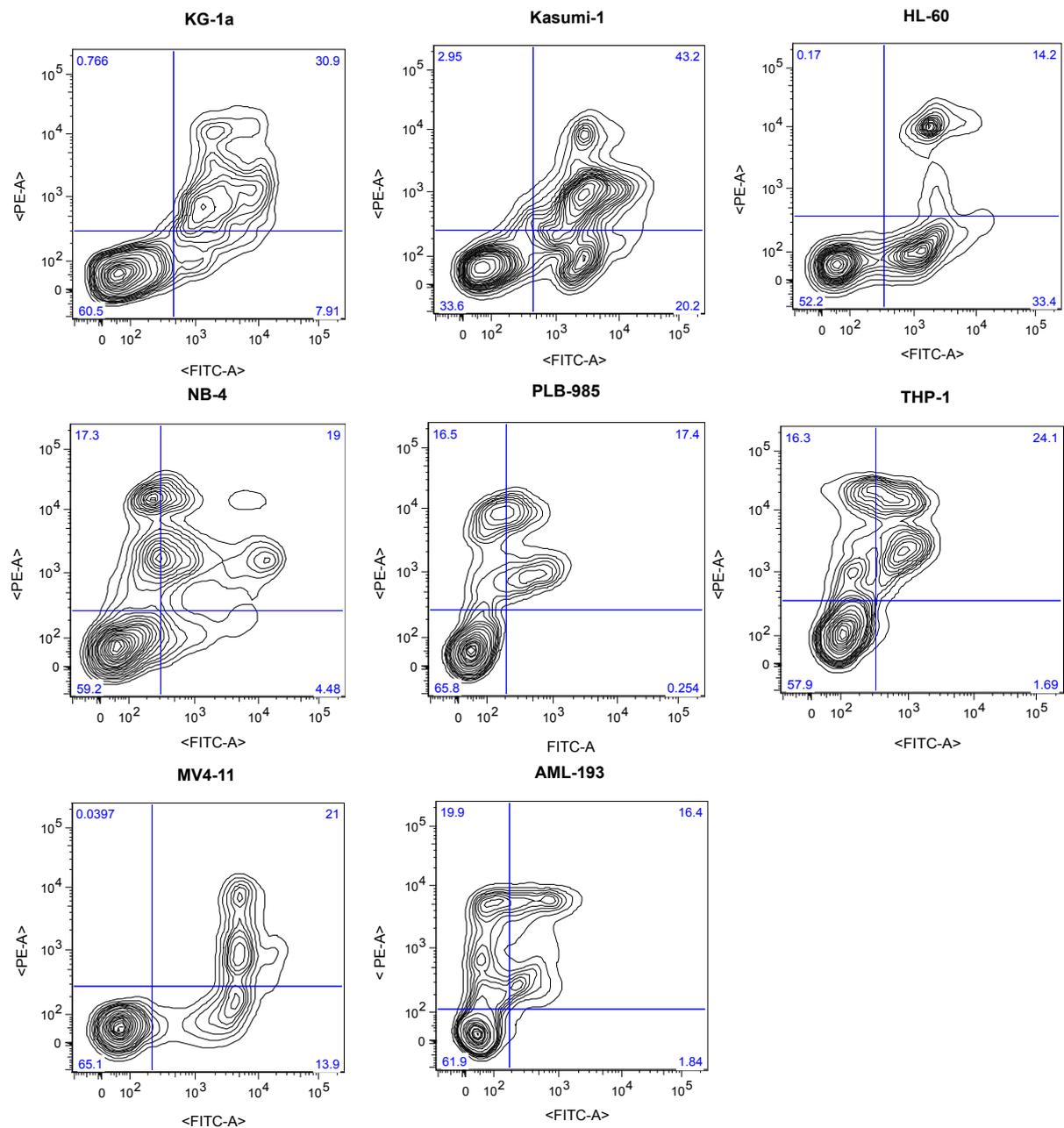


Abbildung 4: Nachweis der Apoptose mit Annexin V – FITC (FITC-A, x-Achse) und Propidiumiodid (PE-A, y-Achse) (s. Material und Methoden, Kap. 5.8).

Die AML-Zelllinien wurden für 48 h mit den zelllinienspezifischen ABT-737 IC_{50} Konzentrationen behandelt (s. Tab. 5). Anschließend erfolgte die Messung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS Canto™, BD Biosciences Immunocytometry Systems). Es wurden insgesamt maximal 10.000 counts, d. h. 10.000 Zellen, in einer Messung berücksichtigt und graphisch ausgewertet. In den abgebildeten Vierfeldertafeln entspricht die Zellpopulation unten links jeweils dem prozentualen Anteil an vitalen Zellen (FITC-A und PE-A negativ), unten rechts dem prozentualen Anteil an Zellen in Apoptose (FITC-A positiv; PE-A negativ) und oben dem prozentualen Anteil an Zellen in Nekrose (FITC-A und PE-A positiv). Beispielsweise sind bei KG-1a Zellen nach 48 h Inkubation mit ABT-737 (77,6 nM) 60,5 % der Zellen vital (unten links), 7,91 % der Zellen apoptotisch (unten rechts) und 30,9 % + 0,766 % der Zellen nekrotisch (oben rechts + oben links). Exemplarische Abbildungen aus n=3.

6.3. Bestimmung der ^{18}F -FDG-Aufnahme als molekularer Marker für die Stoffwechselaktivität der verwendeten AML-Zelllinien

Zur Charakterisierung des Glukosemetabolismus von AML-Zellen wurde der radioaktive Tracer ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F -FDG) verwendet (s. Einleitung, Kap. 3.6.2.3). Dieser wird wie Glukose über den GLUT-Transporter in die Zelle aufgenommen und anschließend durch die Hexokinase phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung wird ^{18}F -FDG polar und kann somit nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren. Ein weiterer Abbau des phosphorylierten ^{18}F -FDG ($p\text{-}^{18}\text{F}$ -FDG) in der Glykolyse findet, im Gegensatz zu Glucose, nicht statt (metabolic trapping).

6.3.1. ^{18}F -FDG Aufnahme in KG-1a Zellen

KG-1a-Zellen (FAB M1), aus einem Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie ohne Ausreifung, zeigen insgesamt eine moderate Kinetik in der ^{18}F -FDG-Aufnahme. Innerhalb der ersten 120 min war ein linearer Anstieg der ^{18}F -FDG-Aufnahme von 1,1 % auf 4,4 % zu verzeichnen. Anschließend zeigte sich nur noch ein geringer Anstieg auf 5,6 % nach 240 min (Abb. 5).

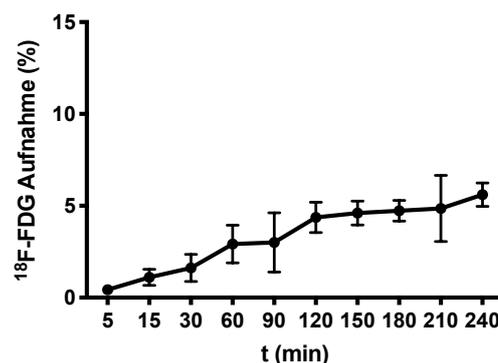


Abbildung 5: ^{18}F -FDG Aufnahme in KG-1a Zellen (FAB M1):

Je 2×10^5 Zellen in $200 \mu\text{l}$ glucosefreiem Medium wurden in einer 24-Flat-well Platte mit $200 \mu\text{l}$ ^{18}F -FDG einer Stammlösung (370 KBq/ml) inkubiert. Nach Start der Inkubation wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (5' – 240') die Reaktion jeweils gestoppt und die ^{18}F -FDG Aufnahme quantifiziert (siehe Material und Methode Kap. 5.5). Die zu den Zellen hinzugefügte Aktivität von 74 KBq in $200 \mu\text{l}$ wurde als 100 % bewertet und die davon von den Zellen aufgenommene Aktivität als prozentualer Anteil im Graphen dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean / SEM). Mittelwerte aus mindestens $n=2$.

6.3.2. ^{18}F -FDG Aufnahme in Kasumi-1 und HL-60 Zellen

Kasumi-1 (FAB M2) und HL-60 (FAB M2), als Beispiele für die akute myeloische Leukämie mit granulozytärer Ausreifung, zeigten eine unterschiedliche Kinetik bezüglich der ^{18}F -FDG-Aufnahme (Abb. 6). Bei Kasumi-1 wurde ein nahezu konstanter linearer Anstieg mit einer maximalen ^{18}F -FDG-Aufnahme von 5,9 % nach 240 min nachgewiesen. Dagegen zeigten HL-60 Zellen innerhalb der ersten 60 Minuten einen steilen linearen Anstieg auf 6,3 %. 60 bis 240

min nach Inkubationsbeginn wurde eine Plateauphase mit nur noch geringem Anstieg der ^{18}F -FDG-Aufnahme auf 7,4 % detektiert (240 min) (Abb. 6).

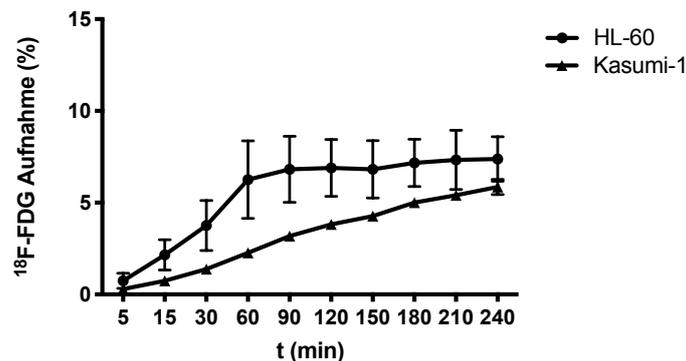


Abbildung 6: ^{18}F -FDG Aufnahme bei Kasumi-1 (FAB M2) und HL-60 (FAB M2) Zellen (siehe auch Abb. 5).

6.3.3. ^{18}F -FDG Aufnahme in NB-4 Zellen

Die von allen AML-Zelllinien höchste ^{18}F -FDG-Aufnahme mit 12,6% nach 240 min wies NB-4 (FAB M3) auf, eine Zelllinie der akuten promyelozytären Leukämie (APL) (Abb. 7). Dabei zeigte sich innerhalb der ersten 150 min ein steiler, annähernd linearer Anstieg auf 12,8 % mit anschließender, weitgehend konstanter Plateauphase (12,7 % nach 180 min, 13,5 % nach 210 min, 12,6% nach 240 min) (Abb. 7).

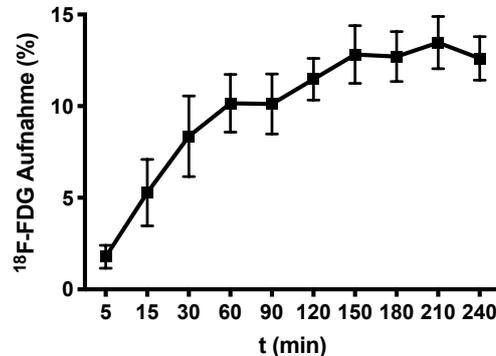


Abbildung 7: ^{18}F -FDG Aufnahme von NB-4 (FAB M3) Zellen (siehe auch Abb. 6).

6.3.4. ^{18}F -FDG Aufnahme in PLB-985 Zellen

PLB-985 (FAB M4), eine Zelllinie eines Patienten mit myelomonozytärer Leukämie mit Eosinophilie, zeigte innerhalb der ersten 120 min nach Zugabe von ^{18}F -FDG eine steile lineare ^{18}F -FDG-Aufnahme auf 6,7 %. Nachfolgend war der Anstieg der ^{18}F -FDG Aufnahme geringer und setzte sich bis auf 8,4 % nach 240 min fort (Abb. 8).

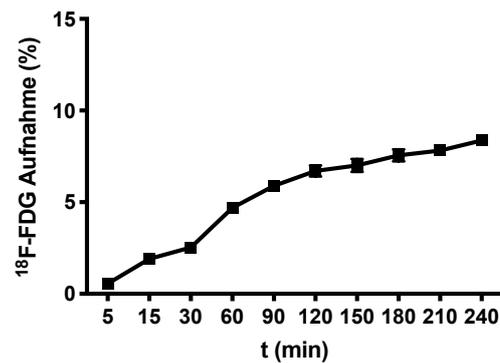


Abbildung 8: ¹⁸F-FDG Aufnahme in PLB-985 (FAB M4) Zellen (siehe auch Abb. 6).

6.3.5. ¹⁸F-FDG Aufnahme in MV4-11, THP-1 und AML-193 Zellen

Die Zelllinien MV4-11, THP-1 und AML-193 (alle FAB M5), als Vertreter der akut monocytären / monoblastären Leukämie, zeigten deutliche Unterschiede in der ¹⁸F-FDG-Aufnahme. Bei AML-193 wurde eine steile, lineare Aufnahme von ¹⁸F-FDG innerhalb des Messzeitraumes mit einer maximalen Aufnahme von 11 % nach 240 min gemessen. Ein Erreichen einer Plateauphase ließ sich in dieser Zelllinie nicht erkennen (Abb. 9). MV4-11 und THP-1 zeigten vergleichsweise geringere lineare ¹⁸F-FDG-Aufnahmen, ebenfalls ohne Erreichen einer Plateauphase. Bei MV4-11 Zellen betrug die maximale ¹⁸F-FDG Aufnahme nach 240 min 4,1 % und bei THP-1 Zellen 7 % (Abb. 9).

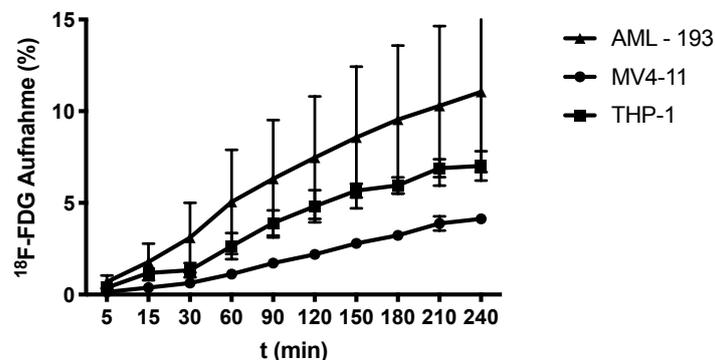


Abbildung 9: ¹⁸F-FDG Aufnahme in MV4-11, THP-1 und AML-193 (alle FAB M5) Zellen (siehe auch Abb. 6).

Zusammengefasst, zeigen sich bezüglich der ¹⁸F-FDG Aufnahme innerhalb der untersuchten AML-Zelllinien deutliche Unterschiede sowohl zwischen Zellen, die verschiedenen FAB-Kategorien angehören, als auch bei Zellen aus ein- und derselben FAB-Kategorie, wie in Abbildung 10 dargestellt.

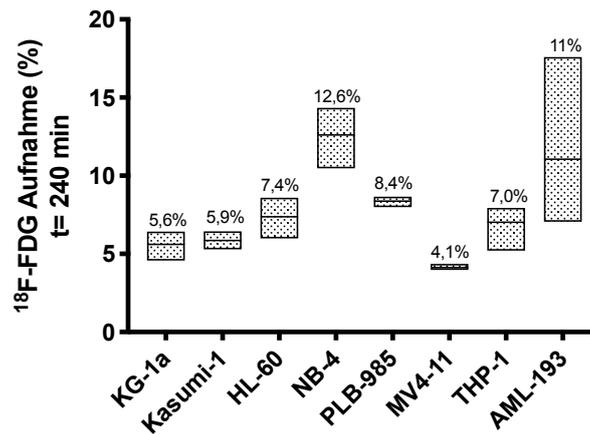


Abbildung 10: Boxblott mit der maximalen ^{18}F -FDG Aufnahme der untersuchten AML-Zelllinien (KG-1a = FAB M1; Kasumi-1 und HL-60 = FAB M2; NB-4 = FAB M3; PLB-985 = FAB M4; MV4-11, THP-1 und AML-193 = FAB M5) nach 240 min. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der ^{18}F -FDG-Aufnahmen in % der jeweils zugegebenen ^{18}F -FDG-Aktivität nach 240 min mit Standardabweichungen (s. auch Abbildungen 6-10).

6.4. Korrelation zwischen der Aufnahme von ^{18}F -FDG und dem zelllinienspezifischen IC_{50} -Wert nach Inkubation mit ABT-737

Bezüglich der Korrelation zwischen der ^{18}F -FDG-Aufnahme und den IC_{50} -Werten nach Inkubation mit ABT-737 sind bei den verwendeten AML-Zelllinien deutliche Unterschiede zu erkennen (Abb. 11). Beispielsweise zeigte MV4-11 (FAB M5) eine niedrige ^{18}F -FDG-Aufnahme (4,1 %) und eine hohe Sensitivität gegenüber ABT-737 (IC_{50} : 9,9 nM). Andere AML-Zelllinien aus der gleichen FAB-Kategorie (FAB M5), wie THP-1 und AML-193, zeigten dagegen eine vergleichsweise höhere ^{18}F -FDG Aufnahme und eine geringere Sensitivität gegenüber ABT-737 (THP-1: 7,0 % ^{18}F -FDG-Aufnahme vs. IC_{50} 528 nM ABT-737; AML-193: 11,0 % ^{18}F -FDG-Aufnahme vs. IC_{50} 36,88 nM ABT-737). NB-4 (FAB M3) und HL-60 (FAB M2) wiesen eine vergleichsweise hohe ^{18}F -FDG-Aufnahme (NB-4: 12,6%; HL-60 7,4 %) und eine vergleichsweise niedrige Sensitivität gegenüber ABT-737 auf (NB-4 IC_{50} : 813 nM; HL-60 IC_{50} : 15,5 μM) (Abb. 11). Demgegenüber wies Kasumi-1 (FAB M2) im Vergleich zu HL-60 aus der gleichen FAB-Kategorie (FAB M2) eine vergleichsweise geringere ^{18}F -FDG-Aufnahme (Kasumi-1: 5,9 %; HL-60: 7,4 %) sowie eine ca. 1000-fach höhere Sensitivität gegenüber ABT-737 auf (Kasumi-1 IC_{50} : 16,95 nM; HL-60 IC_{50} : 15,5 μM). Ähnlich wie Kasumi-1 (FAB M2) und MV4-11 (FAB M5) zeigten KG-1a (FAB M1) Zellen eine vergleichsweise niedrige ^{18}F -FDG-Aufnahme (5,6 %) und eine hohe Sensitivität gegenüber ABT-737 (IC_{50} : 77,6 nM). PLB-985 (FAB M4) wies hingegen ähnlich zu THP-1 (FAB M5) und HL-60 (FAB M2) eine vergleichsweise höhere ^{18}F -FDG-Aufnahme (8,4 %) und eine vergleichsweise niedrigere Sensitivität gegenüber ABT-737 (IC_{50} : 1,8 μM) auf. Die Ergebnisse belegen, dass die FAB Kategorie keinen Einfluss auf die ^{18}F -FDG Aufnahme bzw. auf den IC_{50} Wert nach Inkubation mit ABT-737 hat.

Die Berechnung des Korrelations-Koeffizienten (Pearson-Koeffizient) ergab für $n=7$ (d.h. ohne die Zelllinie HL-60; Abb. 11 B) einen Wert von 0,363 (Buschner et al. 2020). Dieser Wert legt

eine schwach positive Korrelation zwischen dem IC_{50} Wert nach Inkubation mit ABT-737 und der Aufnahme von ^{18}F -FDG nahe (für die untersuchten 7 verschiedenen AML-Zelllinien). D.h., AML-Zellen, die einen vergleichsweise hohen IC_{50} Wert nach Inkubation mit ABT-737 aufweisen (entsprechend einer geringen Sensitivität gegenüber ABT-737), zeigen auch eine vergleichsweise hohe Aufnahme von ^{18}F -FDG. Unter Einbeziehung aller 8 untersuchten AML-Zelllinien (d.h. auch von HL-60) in die Berechnung des Pearson-Koeffizienten ergibt sich ein Wert von - 0,0077, der nahelegt, dass keine Korrelation zwischen IC_{50} (ABT-737) und ^{18}F -FDG Aufnahme besteht. Die in Abb. 11 dargestellte positive Korrelation (unter Einbeziehung aller 8 untersuchten AML-Zelllinien) zwischen IC_{50} (ABT-737) und ^{18}F -FDG Aufnahme entspricht daher nicht der Berechnung des Pearson-Koeffizienten.

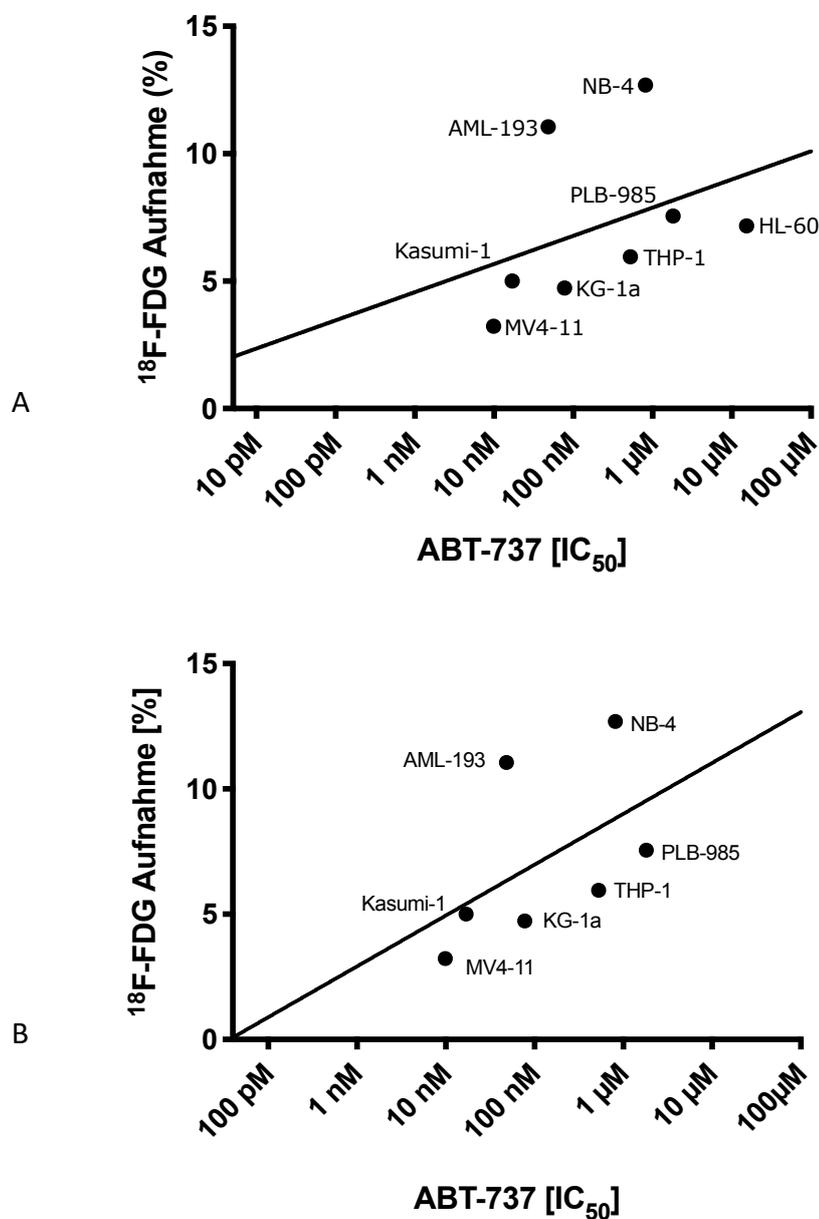


Abbildung 11: Korrelation der ^{18}F -FDG-Aufnahme nach 240 min und den IC_{50} -Werten nach 48 h Inkubation mit ABT-737 bei allen verwendeten AML-Zelllinien ($n = 8$, **A**) und bei allen verwendeten AML-Zelllinien ohne HL-60 ($n = 7$, **B**).

In (A) und (B) zeigen beispielsweise NB-4 Zellen eine vergleichsweise hohe ^{18}F -FDG-Aufnahme und eine vergleichsweise niedrige Sensitivität gegenüber ABT-737. MV4-11 Zellen dagegen zeigen eine vergleichsweise niedrige Aufnahme von ^{18}F -FDG verbunden mit einer vergleichsweise hohen Sensitivität gegenüber ABT-737. Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass AML-Zellen mit niedriger Sensitivität gegenüber ABT-737 eine vergleichsweise hohe Aufnahme von ^{18}F -FDG zeigen und umgekehrt, weshalb anzunehmen ist, dass eine Korrelation vorliegt. (A) Die Berechnung des Pearson-Koeffizienten für alle 8 verwendeten Zelllinien ergibt einen Wert von $-0,0077$, so dass hier anzunehmen ist, dass keine Korrelation zwischen der ^{18}F -FDG-Aufnahme und der Sensitivität gegenüber dem Apoptose-Induktor ABT-737 vorliegt. Bei (B) erfolgte die Berechnung des Korrelations-Koeffizienten (Pearson-Koeffizient) anhand der Werte von $n=7$ AML-Zelllinien (ohne HL-60). Der berechnete Wert ($0,363$) ergibt eine schwach positive Korrelation und legt somit nahe, dass eine direkte Korrelation zwischen der Höhe der ^{18}F -FDG Aufnahme und der Höhe des ABT-737 [IC_{50}] anzunehmen ist. In diesem Fall liegt offensichtlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Aggressivität einer AML Zelllinie und der ^{18}F -FDG Aufnahme vor. Von daher ist ein direkter Zusammenhang als wahrscheinlicher anzusehen, da diese Beobachtung sich auch mit den bisherigen Erkenntnissen von Kroemer et al. 2008, Herst et al. 2011, Zhao et al. 2013 und Chen et al. 2014 decken, dass ein erhöhter Glucosemetabolismus mit einer höheren Therapieresistenz korreliert (siehe auch Diskussion, Kap 7.1).

6.5. Analyse der Expression Apoptose-begleitender Proteine sowie von Proteinen der BCL-2 Familie nach Inkubation von AML-Zelllinien mit ABT-737 mit Western Blot

Zur Charakterisierung der Expression von Proteinen der BCL-2 Familie sowie Apoptose-begleitender Proteine wurden die verschiedenen AML-Zelllinien mit der jeweils zelllinienspezifischen IC_{50} Konzentration an ABT-737 bis zu 96 h behandelt. Folgende Zeitpunkte nach Inkubation mit ABT-737 wurden mit Western Blot untersucht: 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Als Apoptosemarker wurden Caspase 3 und die cleaved Caspase 3 evaluiert. Hinsichtlich der Proteine der BCL-2 Familie wurde sowohl die Expression der Zielproteine von ABT-737, d.h. von BCL-2, BCL-XL und BCL-W, als auch der beiden Proteine, die von ABT-737 nicht gebunden werden (BCL2A1 und MCL-1), mit Western Blot analysiert.

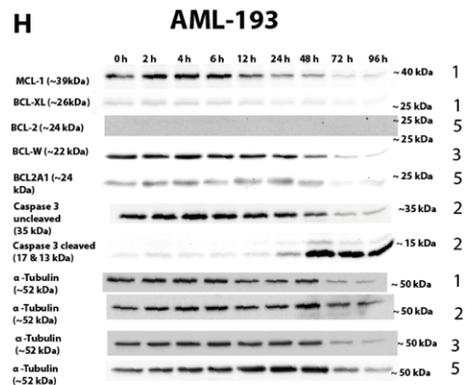
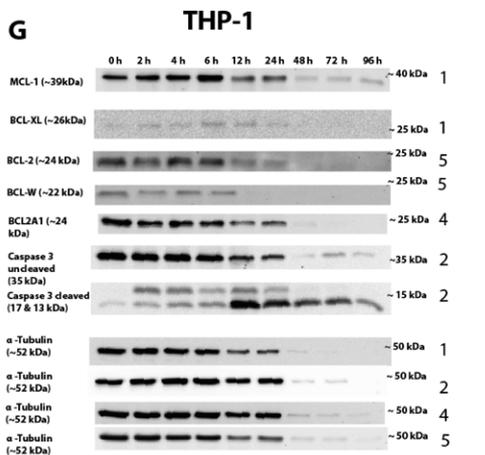
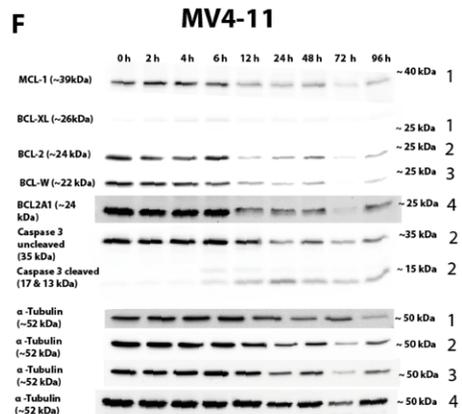
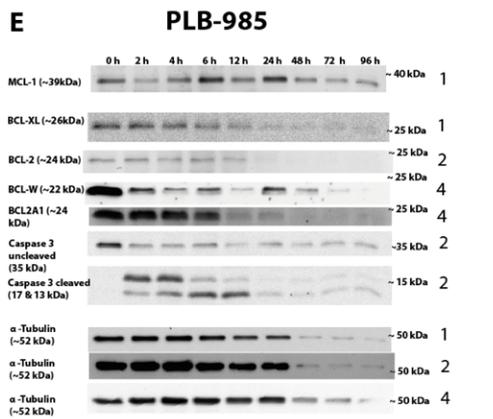
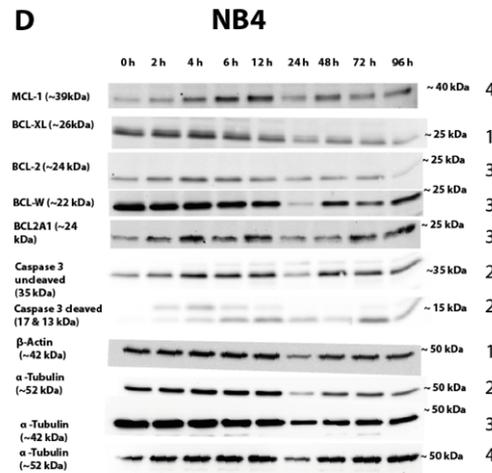
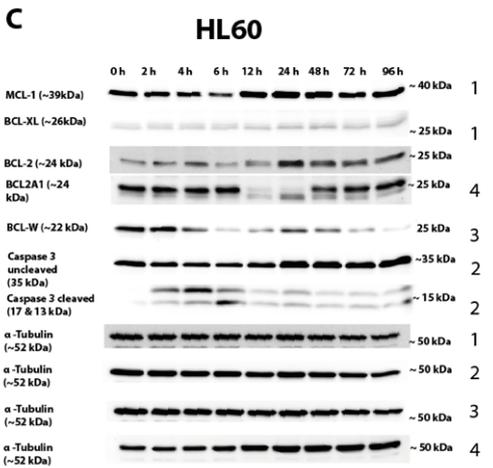
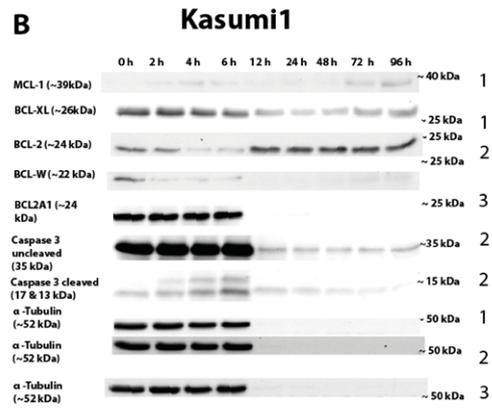
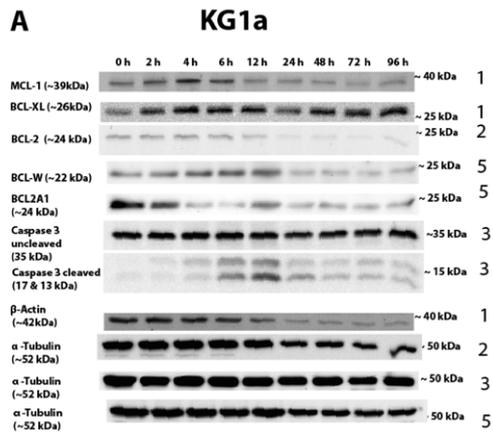


Abbildung 12: Analyse der Expression ausgewählter Proteine in verschiedenen AML-Zelllinien (A-H) nach Inkubation mit ABT-737 mit Western Blot.

Der Zeitpunkt 0 h repräsentiert jeweils die unbehandelten Kontrollen. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte nach Inkubation mit der jeweiligen IC_{50} Konzentration von ABT-737 für 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Aufgrund der Vielzahl an analysierten Proteinen wurden die Western Blot Analysen mit mehreren PVDF Membranen durchgeführt. Diese sind rechts durch die Zahlen von 1-5 gekennzeichnet. Als Ladekontrolle wurde beta-Actin und alpha-Tubulin verwendet (siehe Material und Methoden, Kap 5.12). Sehr schwache Banden wurden bei der Entwicklung am Detektor (Intas Life Science, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) stärker kontrastiert und zeigen deshalb einen höheren Hintergrund. Die Zunahme der Bandendicke korrespondiert i. d. R. mit einer Zunahme der Proteinexpression.

In allen AML-Zelllinien (A-H) konnte bereits nach 2 h (bis zu 96 h) nach Behandlung mit der zelllinienspezifischen IC_{50} -Konzentration an ABT-737 die Apoptose anhand der cleaved Caspase 3 nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich bei den einzelnen Zelllinien nur geringe Schwankungen in der Abnahme bzw. Zunahme der Bandenintensitäten.

Bei KG-1a Zellen (A) war nach Behandlung mit der zelllinienspezifischen IC_{50} -Konzentration an ABT-737 Abnahme der Bandenintensität bei MCL-1, BCL-XL, BCL-W und BCL2A1 nach 24 h zu beobachten. Die Expression von BCL-XL dagegen blieb bis 96 h weitgehend konstant.

Ein anderes Bild zeigte sich bei der AML-Zelllinie Kasumi-1 (B). Nach Behandlung mit der zelllinienspezifischen IC_{50} -Konzentration an ABT-737 konnten, ohne große Veränderungen innerhalb des Untersuchungszeitraums bis zu 96 h, MCL-1 und BCL-W nur sehr schwach detektiert werden. Darüber hinaus zeigte sich bei BCL-XL eine geringe Abnahme der Bandenintensität nach 12 h. Zusätzlich fiel auf, dass die Ladekontrolle der Membranen 1-3 bei 12 h, 24 h, 48 h, 74 h und 96 h sehr stark erniedrigt war, was auf eine zu geringe Proteinkonzentration im Lysat hindeutet. Trotz der Wiederholung der Western Blot Analysen mit neuen Lysaten, zeigten sich ähnlich erniedrigte Bandenintensitäten in den Ladekontrollen sowie auch bei Caspase 3 (cleaved/uncleaved), BCL-W und BCL2A1. Als mögliche Gründe können neben einer verminderten Proteinkonzentration im Lysat auch folgende Ursachen herangeführt werden: Bindungsprobleme der entsprechenden Antikörper, beispielsweise liegt das entsprechende Epitop eines Proteins auf der PVDF Membran durch ein unspezifisches Protein blockiert vor; verminderte oder gestörte Aktivität des primär/sekundären Antikörpers sowie im Rahmen der Entfernung der sekundären Antikörpers mit NaN_3 (Natriumazid) können Proteine beschädigt werden.

Bei HL-60 Zellen (C) wurden die Proteine MCL-1 und BCL2A1 bis 96 h unter Behandlung mit ABT-737 sehr stark und konstant exprimiert. Vergleichsweise schwache Banden zeigten sich dagegen bei BCL-XL und BCL-W über den gesamten Untersuchungszeitraum. Bei BCL-2 war nach 24 h eine geringe Zunahme der Bandenintensitäten beobachtbar.

Bei NB-4 Zellen (D) zeigte sich nach Behandlung mit ABT-737 (IC_{50}) bis zu 96 h eine weitgehend konstante Proteinexpression bei BCL-2, BCL-W und BCL2A1. BCL-XL wies ab 24 h – 96 h eine

geringe Abnahme in der Bandenintensität auf. Bei MCL-1 konnte eine konstante Zunahme der Bandenintensität im Zeitraum von 0 h – 12 h festgestellt werden. Außerdem fiel eine vergleichsweise niedrige Bandenintensität bei allen 24 h - Werten auf. Dies könnte auf eine niedrige Proteinkonzentration in dem entsprechenden Lysat des 24 - Wertes hinweisen. Eine Wiederholung des Western Blots oder die Erstellung neuer Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen wären anzustreben.

Vergleichsweise geringe Proteinexpressionen von BCL-2 und BCL-XL konnten in der AML-Zelllinie PLB-985 (E) beobachtet werden, wobei nach 24 stündiger Inkubation mit ABT-737 (IC_{50}) eine nochmalige Abnahme in der Bandenintensität zu beobachten war. Ebenfalls mit anfänglich moderater Proteinexpression zeigte sich auch bei BCL2A1 und BCL-W nach 12 h Inkubation mit ABT-737 eine weitere Abnahme in der Bandenintensität. Hingegen blieb die Expression von MCL-1 über den gesamten Untersuchungszeitraum von 96 h weitgehend konstant. Zudem war auffallend, dass nach 48 h eine annähernd gleichmäßige Abnahme der Bandenintensitäten für alle Proteinbanden (inklusive der Ladekontrollen) zu beobachten war, die möglicherweise auf eine verminderte Proteinkonzentration nach Behandlung mit ABT-737 in den Lysaten zurückzuführen ist. Eine Wiederholung des Western Blots oder die Erstellung neuer Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen wären anzustreben.

Bei den MV4-11 Zellen (F) war auffallend, dass nach Behandlung mit der IC_{50} -Konzentration an ABT-737 vor allem die Expression von BCL-XL sehr schwach war. Eine mittlere Expression zeigten MCL-1, BCL-2, BCL-W und BCL2A1, wobei bereits nach 6 h eine Abnahme in den Bandenintensitäten beobachtbar war.

Bei THP-1 Zellen (G) zeigten sich bis 24 h nach Behandlung mit ABT-737 intensive Banden bei MCL-1, BCL-2 und BCL2A1. Ab 48 h ließ sich jeweils eine deutliche Abnahme in den Bandenintensitäten feststellen. Initial schwache Bandenintensitäten zeigten sich bei BCL-XL (0-24h) und BCL-W (0-6h) mit teilweise ab 48 h (-96 h) fehlendem Nachweis (BCL-XL) bzw. von 12-96 h (BCL-W). Auch konnte eine deutliche Abnahme der Bandenintensitäten ab 48 h in den Ladekontrollen festgestellt werden, ein eventueller Hinweis auf verminderte Proteinkonzentrationen unter Behandlung mit ABT-737 in den Lysaten. Eine Wiederholung des Western Blots oder die Erstellung neuer Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen wären anzustreben.

In AML-193 (H) Zellen konnte nach Behandlung mit ABT-737 keinerlei BCL-2 Protein detektiert werden. Dagegen wurden bei MCL-1 und BCL-W vergleichsweise starke Proteinbanden nachgewiesen, wobei nach 12 h (MCL-1) bzw. 24 h (BCL-W) die Bandenintensitäten jeweils kontinuierlich abnahmen. Weitgehend konstant in der Intensität zeigten sich die schwächer ausgeprägten Banden bei BCL-XL und BCL2A1. Auch war in Übereinstimmung zur generellen Abnahme der Intensität der Banden, eine Abnahme der Bandenintensität in den

Ladekontrollen bei 72 und 96 h beobachtbar, die eventuell auf eine verminderte Proteinkonzentration unter Behandlung mit ABT-737 in den Lysaten zurückzuführen ist. Eine Wiederholung des Western Blots oder die Erstellung neuer Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen wären anzustreben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ABT-737 in allen AML-Zelllinien (A-H) die Apoptose induziert, wie durch den Nachweis der cleaved Caspase 3 gezeigt werden konnte. Darüber hinaus wurden in allen Zelllinien die antiapoptotischen BCL-2 Family Proteine BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 und BCL2A1 detektiert. Wie oben beschrieben zeigten sich dabei Unterschiede in der Expression der Proteine (Intensität der Banden) sowie eine unterschiedliche Abnahme bzw. Zunahme in der Proteinexpression nach Behandlung mit ABT-737. Bei einzelnen Zelllinien wäre eine Wiederholung des Western Blots oder ggfs. die Erstellung neuer Lysate mit gleichen Proteinkonzentrationen und neuer Western Blots hilfreich.

6.6. Differenzierung von AML-Zelllinien

Die verwendeten AML-Zelllinien zeigten Unterschiede in der Aufnahme von ^{18}F -FDG und in der Sensitivität gegenüber ABT-737. Im nächsten Schritt war von Interesse, zu evaluieren inwieweit die Differenzierung einer AML-Zelllinie Einfluss auf die ^{18}F -FDG Aufnahme und die Sensitivität gegenüber ABT-737 hat, nachdem bereits beispielsweise bei der akuten promyelozytären Leukämie eine Kombinationstherapie aus ATRA und einer anthrazyklinbasierten Chemotherapie erfolgreich eingesetzt wird (siehe Einleitung, Kap. 3.4.1). Zu diesem Zwecke wurden in Anlehnung an bereits publizierte Versuche mit ATRA (Chomienne et al. 1990, Valtieri et al. 1991, Lee et al. 2002, Barber et al. 2008) NB-4 und AML-193 ausgesucht und über 5 d mit 100 nM ATRA (siehe Material und Methoden, Kap. 5.4.4).

6.6.1. ATRA induzierte Änderungen in der Sensitivität gegenüber ABT-737

Im Vergleich zu den Kontrollen, die 5 d nur mit DMSO behandelt wurden, zeigte sich in beiden AML-Zelllinien AML-193 und NB-4, die mit 100 nM ATRA (gelöst in DMSO) über 5 d behandelt wurden, ein insgesamt verminderter ATP-Gehalt. Beispielsweise bewirkte die niedrigste Konzentration (10 pM) bei ATRA behandelten AML-193 Zellen eine ca. 40 % und bei ATRA behandelten NB-4 Zellen eine ca. 50 % Reduktion des ATP-Gehalts im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 13). Zusätzlich zeigte sich nach Inkubation mit ATRA (100 nM) in AML-193 und NB-4 Zellen im Vergleich zu den Kontrollen eine Abnahme der mittleren ABT-737 Hemmkonzentration (IC_{50}): bei AML-193 (A) von 753 nM (95%.KI: 502 nM – 1128 nM) auf 590 nM (95%.KI: 301 nM – 1157 nM) und bei NB-4 (B) von 1,38 μM (95%.KI: 0,787 μM – 2,43 μM) auf 582 nM (95%.KI: 315 nM – 1075 nM) (Abb. 13).

Zusammenfassend zeigt sich in den ATRA behandelten Zelllinien AML-193 und NB-4 im Vergleich zu den DMSO Kontrollen sowohl ein verminderter, prozentualer ATP-Gehalt (Abb. 13) als auch eine Zunahme der Sensitivität gegenüber ABT-737.

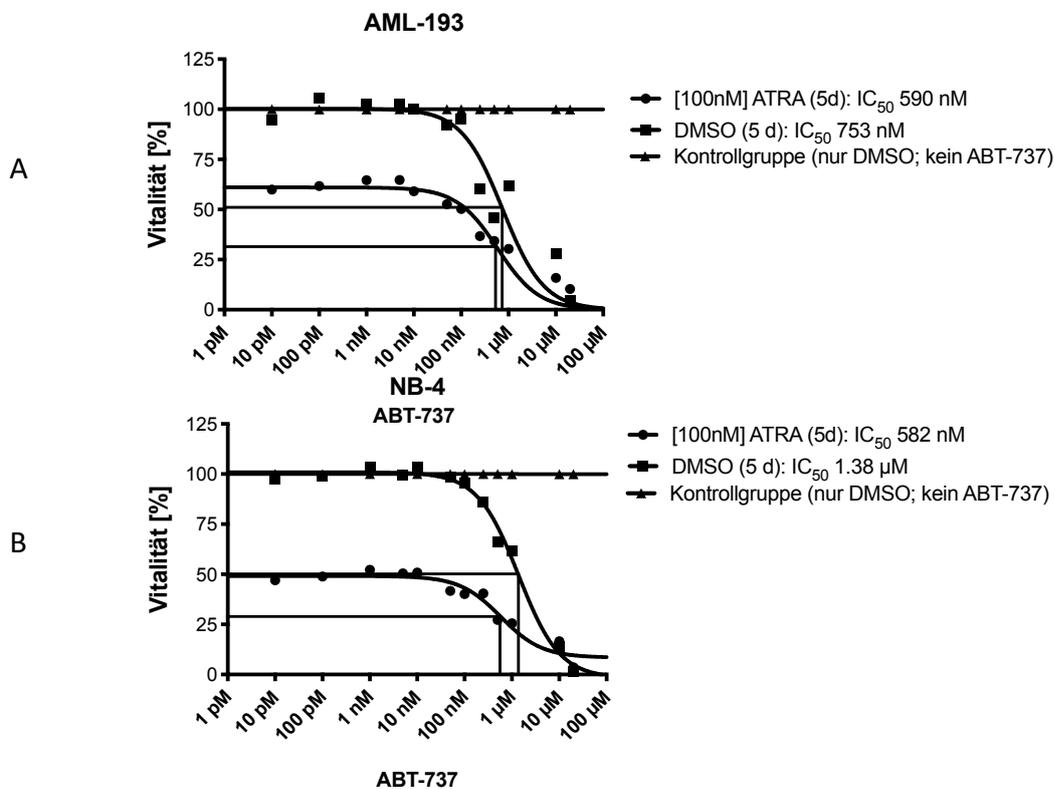


Abbildung 13: Überlebenskurven von AML-193 (A) und NB-4 (B) Zellen nach Differenzierung mit ATRA (all-trans Retinsäure) und anschließender Inkubation mit ABT-737.

Beide Zelllinien wurden alternativ mit ATRA (100 nM gelöst in DMSO) (gefüllte Kreise), DMSO (DMSO-Kontrolle) (gefüllte Quadrate) bzw. nur mit DMSO (Kontrolle ohne ABT-737) (gefüllte Dreiecke) für 5 d inkubiert. Die ATRA behandelten Zellen sowie die DMSO-Kontrolle wurden anschließend mit ABT-737 für 48 h behandelt (analog zu Abb. 4). Die Kontrolle ohne ABT-737 wurde für 48 h weiter mit DMSO inkubiert. 100% entspricht dem Überleben der Kontrollen (ohne ABT-737; gefüllte Dreiecke). Die gefüllten Kreise zeigen das Überleben der ATRA behandelten Zellen und Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen mit ABT-737. Entsprechend stellen die gefüllten Quadrate das Überleben von DMSO mit ABT-737 behandelten Zellen da (DMSO-Kontrolle). Die Berechnung der IC_{50} Werte erfolgte mit $\log(\text{inhibitor})$ vs. normalized response in Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) (siehe Material & Methoden, Kap. 5.13.1). Dargestellt sind die berechneten, idealen konzentrationsabhängigen Überlebenskurven, die zelllinienspezifischen, mittleren Hemmkonzentration [IC_{50}] und die 95%tigen Konfidenzintervalle. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus $n=4$. Die Standardabweichung ist jeweils nicht angegeben.

6.6.2. Verminderte Aufnahme von ^{18}F -FDG nach Differenzierung mit ATRA

Sowohl bei AML-193 Zellen als auch bei NB-4 Zellen zeigte sich nach Differenzierung mit ATRA [100 nM] im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe eine Abnahme in der ^{18}F -FDG-Aufnahme. Hierbei sank die ^{18}F -FDG-Aufnahme jeweils signifikant (p jeweils 0,0008) von 11,9 % auf 4,7 % bei AML-193 Zellen und von 13 % auf 4,1 % bei NB-4 Zellen (Abb. 14).

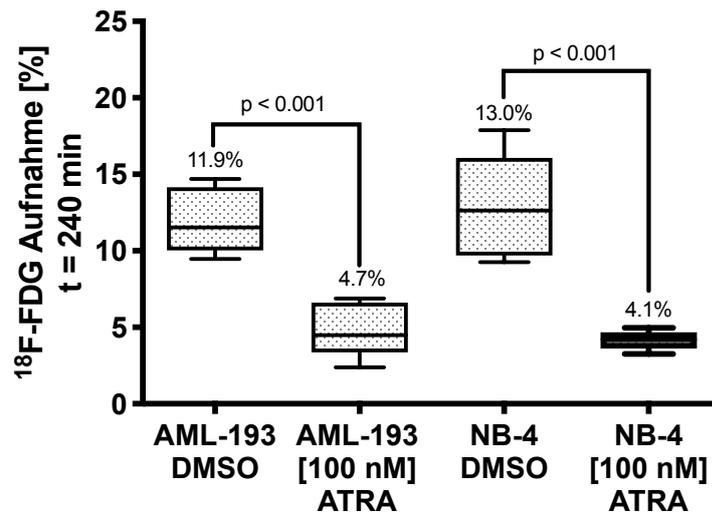


Abbildung 14: Reduktion der ^{18}F -FDG Aufnahme in AML-193 und NB-4 Zellen nach Differenzierung mit ATRA (Boxplot).

Zur Differenzierung wurden beide Zelllinien 5 d mit ATRA (100 nM in DMSO) inkubiert. Die entsprechenden Kontrollgruppen wurden mit DMSO für 5 d vorbehandelt. Anschließend wurde die prozentuale ^{18}F -FDG Aufnahme (in CpM) nach 240 min bei jeweils 2×10^5 Zellen ermittelt. Zu den Zellen wurden jeweils 74 kBq ^{18}F -FDG pipettiert. Die 74 kBq wurden dabei in der Standardprobe (ohne Zellen) auf den Wert 100% normiert und die ^{18}F -FDG Aufnahme in den Zellen als prozentualer Anteil berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mit Hilfe des gepaarten Hypothesentests (paired sample t-test) wurde die Signifikanz ($p < 0,001$) berechnet.

6.6.3. Änderungen auf molekularer Ebene

Nach Behandlung mit ABT-737 [IC_{50}] ließ sich bei den mit ATRA vorbehandelten AML-193 Zellen im Vergleich zum 0 h Wert eine kontinuierliche Abnahme in der Expression aller untersuchten Proteine der BCL-2 Familie MCL-1, BCL-2, BCL-XL, BCL-W und BCL2A1 über 48 h beobachten (Abb. 15 und 16 A-E). Hingegen zeigte sich bei den mit ATRA vorbehandelten NB-4 Zellen eine konstant erniedrigte Expression an Proteine der BCL-2 Familie BCL-XL, BCL-W und BCL2A1 (Abb. 15 und 16 G, H und K) sowie eine geringfügige Reduktion der Expression von BCL-2 und MCL-1 nach 24 h (Abb. 15 und 16 F und I). Nach 12 h ließ sich einzig bei MCL-1 (Abb. 16 F) eine geringfügige Zunahme der Expression sowie auch bei BCL-2 (Abb. 16 H) eine konstante Expression im Vergleich zum 0 h Wert (Kontrolle) erkennen. Im Gegensatz dazu konnte bei den nicht mit ATRA vorbehandelten AML-Zelllinien NB-4 und AML-193 keine gleichzeitige Abnahme aller untersuchten Proteine der BCL-2 Familie (MCL-1, BCL-2, BCL-XL, BCL-W und BCL2A1) beobachtet werden (Abb. 12 D und H). Somit ist anzunehmen, dass ATRA wahrscheinlich die Expression der Proteine der BCL-2 Familie (MCL-1, BCL-2, BCL-XL, BCL-W und BCL2A1) insgesamt reduziert. Die Apoptose konnte durch Nachweis der cleaved Caspase 3 in beiden mit ATRA vorbehandelten AML-Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 15).

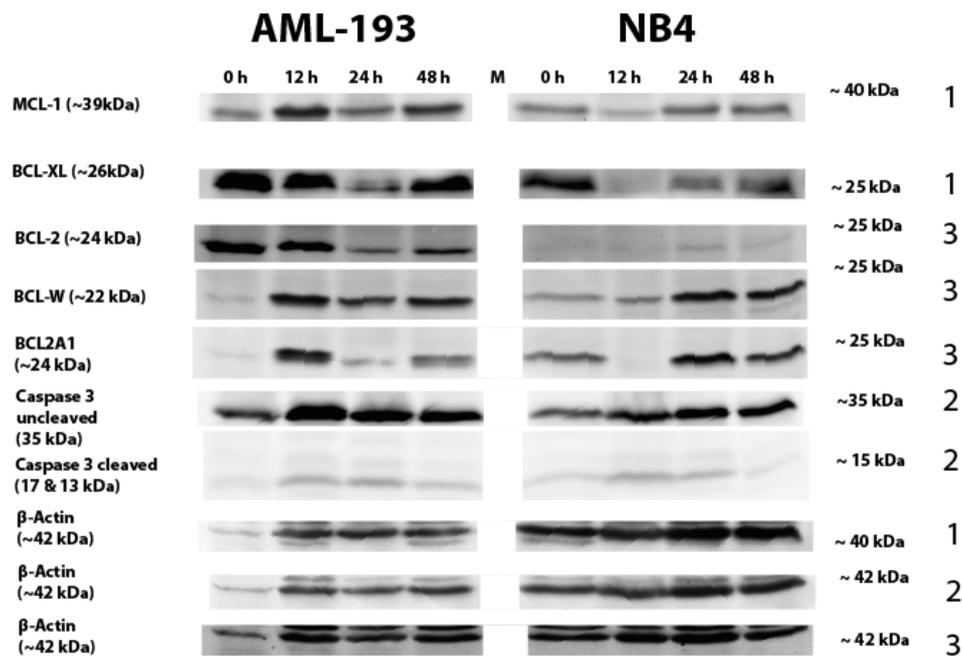


Abbildung 15: Expression der antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie sowie von Caspase 3 und cleaved Caspase 3 in ATRA differenzierten AML-193 und NB-4 Zellen.

Die AML-Zelllinien AML-193 und NB-4 wurden mit ATRA [100 nM] für 5 d inkubiert, anschließend erfolgte der Nachweis der Expression ausgewählter Proteine mit Western Blot zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 12 h, 24 h und 48 h) nach Inkubation mit der zelllinienspezifischen mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) von ABT-737. Aufgrund der Vielzahl an analysierten Proteinen wurden mehrere PVDF Membranen verwendet. Diese sind rechts durch die Zahlen von 1-3 gekennzeichnet. Als Ladekontrolle wurde beta-Actin verwendet. Sehr schwache Banden wurden bei der Entwicklung am Detektor (Intas Life Science, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) stärker kontrastiert und zeigen deshalb einen höheren Hintergrund. Die Zunahme der Bandenstärke korrespondiert i. d. R. mit einer Zunahme der Proteinexpression.

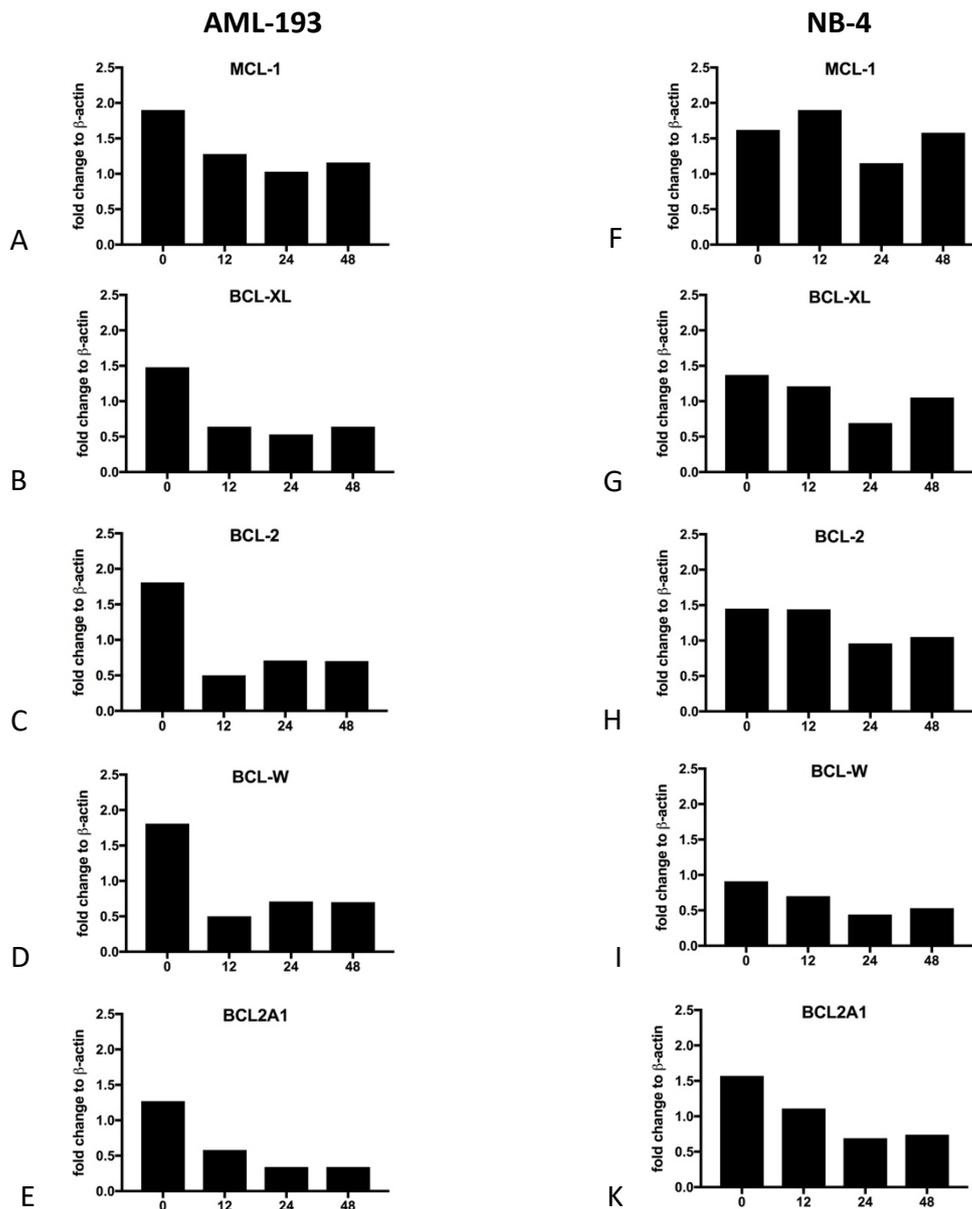


Abbildung 16: Semiquantitative Auswertung der Proteinexpression der antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie aus Abb. 15 relativ zur Expression von beta-Actin bei den mit ATRA differenzierten AML-Zelllinien AML-193 und NB-4 zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 12 h, 24 h und 48 h) nach Behandlung mit ABT-737. Die semiquantitative Analyse der Proteinbanden der Westen Blots aus Abb. 16 wurde mit Hilfe der Software Chemostar (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Dargestellt ist die Proteinexpression von MCL-1 (A und F), BCL-XL (B und G), BCL-2 (C und H), BCL-W (D und I) und BCL2A1 (E und K) in AML-193 Zellen (linke Spalte) und NB-4 Zellen (rechte Spalte) relativ zur Expression der Ladekontrolle von beta-Actin.

7. Diskussion

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des haematopoetischen Knochenmarks und weist einen rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf auf (siehe auch Einleitung, Kap 3.1 bis 3.3). Die Behandlung umfasst im Wesentlichen eine systemische Therapie mit Cytarabin (Cytosinarabinosid / Ara-C) und Anthrazyklinen (wie Daunorubicin und Doxorubicin) mit dem Ziel einer kompletten Remission (siehe auch Einleitung, Kap 3.4). Anschließend erfolgt eine Konsolidierungstherapie mit 2-3 weiteren Zyklen einer Chemotherapie (z. B. Cytarabin unter ggfs. Hinzunahme von weiteren Substanzen, z. B. Mitoxantron oder Amsarcin), die sich am Risikoprofil der AML und am Allgemeinzustand des Patienten orientiert (Röllig C. 2021). Zudem kann auch eine ergänzende Hochdosischemotherapie zur Konditionierung (bspw. mit Busulfan/Cyclophosphamid oder Busulfan/Etoposid/Cyclophosphamid) mit anschließender autologer/allogener Stammzelltherapie erfolgen (Albers et al. 2002-2021). Obwohl mittlerweile auch neue Therapien, wie z. B. die Therapien mit Antikörpern, bspw. dem monoklonalen Antikörper gegen das CD33-Antigen Gemtuzumab Ozogamizin (Castaigne et al. 2012, Hills et al. 2014, Zhang et al. 2018), oder mit Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Midostaurin bei FLT3-Mutation (Stone et al. 2017), zur Behandlung der AML in den letzten Jahrzehnten deutliche Fortschritte erzielt haben, sind die Heilungsraten bei Patienten <30 Jahre mit ca. 60%, bei Patienten < 60 Jahre mit ca. 40% und bei Patienten >60 Jahre mit ca. 15 % noch nicht zufriedenstellend (Juliusson et al. 2012, Arber et al. 2016, Dohner et al. 2017). Ein Grund dafür könnte vor allem die Heterogenität der AML sein. Zusätzlich weisen fast alle AML-Patienten genetische Veränderungen auf. Z. B. liegt bei der akuten promyelozytären Leukämie häufig eine Translokation in t(15;17)(q24; q21) vor, die zu einer Ausbildung eines PML-RAR α Fusionsprotein führt (de The et al. 1990, Huret 1997-2021, Jimenez et al. 2020). Bei der akuten myeloischen Leukämie mit Ausreifung (FAB M2) liegt oftmals eine Translokation in t(8;21)(q22;q22) mit Ausbildung des Fusionsproteins AML-ETO vor (Huret 1997-2021, Licht 2001).

Eine vielversprechende Therapieoption ist begleitend zur klassischen Chemotherapie mit Cytarabin und Anthrazyklinen die simultane Gabe von Gemtuzumab Ozogamizin (GO). Dabei handelt es sich um einen monoklonalen, humanisierten Anti-CD33-Antikörper, an den die hoch zytotoxische Substanz Calicheamicin durch eine Hydrazon-Verbindung gebunden ist (ein sog. antibody-drug conjugate [ADC]). GO bindet dabei an das CD33-Antigen, welches in AML Zellen deutlich überexprimiert ist. Nach Internalisierung des GO erfolgt die Freisetzung des Calicheamicin aus dem ADC durch Hydrolyse. Das Calicheamicin bewirkt anschließend die selektive Abtötung der AML Zellen (Castaigne et al. 2012, Hills et al. 2014, Zhang et al. 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur erfolgreichen Behandlung einer Krebserkrankung im Allgemeinen bzw. von AML im Besonderen stellt die gezielte Hemmung anti-apoptotischer

Proteine in Tumorzellen dar, beispielsweise der BCL-2 Proteine. Letztere sind meist abnormal in Tumorzellen exprimiert (Andreeff et al. 1999, Konopleva et al. 2018). ABT-737 ist ein synthetischer Apoptose-Induktor, der mit unterschiedlicher Affinität spezifisch an drei der fünf verschiedenen BCL-2 Proteine BCL-2, BCL-W und BCL-XL und nicht an MCL-1 und BCL2A1 bindet (Shamas-Din et al. 2011, Rooswinkel et al. 2012). Das oral bioverfügbare Analogon ABT-263 (Navitoclax) wurde bereits erfolgreich in Studien zur Therapie von Glioblastomen, der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), des follikulären Lymphoms, von Lungenkrebs (NSCLC / SCLC), des Myeloms und von Prostatakrebs eingesetzt (Hassan et al. 2014, Zhang et al. 2018). ABT-737 und ABT-263 binden dabei an die hydrophobe BH3 Domäne der anti-apoptotischen BCL-2 Proteine BCL-2, BCL-W und BCL-XL. ABT-737 und ABT-263 sind Analoga/Mimetika des Proteins BAD, wobei BAD zur Familie der pro-apoptotischen BH3-only Proteine gehört. BH3-Mimetika, wie z. B. ABT-737, sind daher geeignete Therapeutika um Tumorzellen mit verstärkter Expression von anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen abzutöten. Es treten jedoch auch Nebenwirkungen nach Therapie mit BH3-Mimetika auf, wie beispielsweise Thrombozytopenie bzw. Thrombozytopathie (dysfunktionale Thrombozyten) (Schoenwaelder et al. 2011). Bei Tumorzelllinien aus der Leber (HepG2, Huh-7 und SMMC-7721) konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Inkubation mit ABT-737 und simultaner Gabe von Glycyumarin (GCM) sowohl die Toxizität gegenüber Thrombozyten reduziert als auch die Empfindlichkeit gegenüber ABT-737 erhöht wird (Zhang et al. 2018).

Das oral bioverfügbare ABT-199, das in den USA und in Europa seit 2016 als Venetoclax zur Therapie von Lymphomen zugelassen ist, ist ein weiterer BH3-Mimetika mit selektiver und sehr hoher Affinität gegenüber BCL-2 (Souers et al. 2013). BCL-XL, das eine wichtige Rolle auch bei den Progenitorzellen der Thrombozyten spielt, wird hingegen nicht gebunden und führt demzufolge nicht zu einer teils lebensbedrohlichen, therapieassoziierten Thrombozytopenie (Pollyea et al. 2019). Hingegen liegen für Navitoclax (ABT-263) und Obatoclax (GX15-070) (Konopleva et al. 2008, Schimmer et al. 2014) bisher noch keine Zulassungen vor, weshalb sie im Rahmen von Studien, genauso wie auch Venetoclax, jeweils in unterschiedlichen Kombinationen mit z. B. Tyrosinkinaseinhibitoren, Chemotherapeutika oder Antikörper untersucht werden (www.cancer.gov).

7.1. Die ^{18}F -FDG Aufnahme als möglicher „Prädiktor“ für das Ansprechen auf die Therapie mit dem BH3-Mimetikum ABT-737

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Subtypen von AML-Zellen mit unterschiedlicher FAB-Klassifikation (FAB M1 – M5) auf Unterschiede in der ^{18}F -FDG-Aufnahme und bezüglich der Sensitivität gegenüber ABT-737 untersucht. Außerdem wurde evaluiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Sensitivität gegenüber ABT-737 und der Aufnahme von ^{18}F -FDG besteht. Weiterhin galt es herauszufinden, ob eine eventuelle Korrelation auch in Zusammenhang mit der Differenzierungsstufe und der Vitalität eines Subtyps einer AML Zelllinie steht. Zur Charakterisierung der unterschiedlichen IC_{50} -Werte gegenüber ABT-737 der

verschiedenen Subtypen von AML-Zellen wurde zudem die Expression der Mitglieder der anti-apoptotischen BCL-2 Familie (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 und A1) nach Behandlung mit ABT-737 (2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h und 96h) analysiert. Um zu zeigen, dass die Vitalität und die Differenzierung von AML-Zellen in indirektem Zusammenhang mit der Aufnahme von ¹⁸F-FDG steht, wurden exemplarisch Differenzierungsversuche mit all-trans-Retinoinsäure (all-trans-retinoid-acid, ATRA, Vitamin-A) in NB4 und AML-193 Zellen durchgeführt.

Im ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit ABT-737 (48 h) die Vitalität der verwendeten Zelllinien große Unterschiede aufwies. Beispielsweise zeigte die Zelllinie NB4 (FAB M3), aus einem Patienten mit akut promyelozytärer Leukämie, eine hohe Vitalität, die sich auch in einer geringeren Sensitivität gegenüber ABT-737 widerspiegelte. Dagegen wies die Zelllinie MV4-11 (FAB M5), aus einem Patienten mit akut monozytärer / monoblastärer Leukämie, die niedrigste Vitalität mit entsprechend höchster Sensitivität gegenüber ABT-737 auf. Außerdem zeigten die verwendeten AML-Zelllinien auch innerhalb einer FAB-Kategorie deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber ABT-737. Beispielsweise unterschieden sich die Zelllinien THP-1 und MV4-11 der FAB-Kategorie M5 (akut monozytäre/monoblastäre Leukämie) ca. um den Faktor 50: 10 nM (MV4-11) vs. 523 nM (THP-1) (je IC₅₀ ABT-737). Noch ausgeprägter zeigte sich der Unterschied hinsichtlich der Sensitivität gegenüber ABT-737 in der Gruppe der FAB M2 Zellen (akute myeloblastische Leukämie mit granulozytärer Ausreifung): HL-60 (IC₅₀: 15 µM) vs. Kasumi-1 (IC₅₀: 17 nM) unterschieden sich ca. um den Faktor 880. Trotz mehrfacher Wiederholungen der Versuche bei HL-60 bestätigte sich der IC₅₀ von ABT-737, obwohl in der Literatur deutlich geringere IC₅₀ Werte für HL-60 beschrieben sind. Bei Konopleva et al. (2006) wiesen HL-60 Zellen eine höhere Sensitivität mit einem IC₅₀ Wert 50 nM gegenüber ABT-737 auf. Zu ähnlichen Ergebnissen für HL-60 kamen auch Shaoyan et al. (2011) und beobachteten einen IC₅₀ Wert von 30 nM. Allerdings beobachteten sie gleichzeitig in Langzeitkulturen eine zunehmende Resistenz von HL-60 gegenüber ABT-737 (IC₅₀ = 10 µM) (Shaoyan et al. 2011).

Ein Zusammenhang zwischen der FAB-Klassifikation einer Zelllinie und der Sensitivität gegenüber ABT-737, wie Kuusanmaki et al. (2020) in ihrer Arbeit beschrieben haben, konnte nicht beobachtet werden. Diese Korrelation wurde bei der Anwendung von ABT-199 (Venetolcax), dem oral bioverfügbaren Derivat von ABT-737, beobachtet. Hierbei wiesen die Subtypen M0 und M1 aus primären AML Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber ABT-199 auf, wohingegen die Subtypen M4 und M5 aus primären AML Zellen eine Resistenz gegenüber dem BCL-2 Inhibitor zeigten. Die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen bei der Verwendung von ABT-737 und den Ergebnissen von Kuusanmaki et al. (2020) könnten möglicherweise auf Unterschiede zwischen primären AML Zellen und AML-Zelllinien zurückzuführen sein.

Zum Nachweis, dass ABT-737 Apoptose induziert, wurden die Zellen nach Anfärbung mit Annexin V – GFP und Propidiumiodid mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

Hierbei wurden die AML-Zelllinien zunächst mit ihrer zelllinienspezifischen ABT-737 IC₅₀ Konzentration inkubiert und nach Anfärbung mit dem FACS analysiert. Dabei zeigte sich, dass ABT-737 in allen AML-Zelllinien Apoptose induziert (siehe Material und Methoden, Kap 5.6, und Abb. 3). Zudem bestätigte sich der hohe IC₅₀ Wert nach 48-stündiger Inkubation mit ABT-737 bei HL-60 bei Nachweis einer apoptotischen/nekrotischen Zellpopulation von ca. 50%. Bei MV4-11 hingegen zeigte sich nach 48 h eine apoptotische/nekrotische Zellpopulation von ca. 70% und bei allen übrigen, verwendeten Zelllinien von ca. 60% (siehe Abb. 4 aus Material und Methoden).

Hinsichtlich der ¹⁸F-FDG-Aufnahme zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede bei den untersuchten AML-Zelllinien. Der höchste Aufnahmewert wurde bei NB-4 (FAB M3) mit 12,6%, der niedrigste (jeweils nach 240 min) bei MV4-11 (FAB M5) mit 4,1% gemessen (s. Abb. 11 A). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von ¹⁸F-FDG und der Sensitivität gegenüber ABT-737 besteht. Zellen mit hoher ¹⁸F-FDG-Aufnahme wiesen eine vergleichsweise niedrige Sensitivität gegenüber ABT-737 (hoher IC₅₀ Wert) auf und umgekehrt (siehe Abb. 11 A).

Der Korrelations-Koeffizient (Pearson-Koeffizient), wie in der Veröffentlichung von Buschner et al. (2020) beschrieben, wurde für n=7 verschiedene AML Zelllinien (d.h. ohne die Zelllinie HL-60) berechnet und ergab einen Wert von 0,363. Dieser Wert legt eine schwach positive Korrelation für die untersuchten 7 verschiedenen AML-Zelllinien zwischen dem IC₅₀ Wert nach Inkubation mit ABT-737 und der Aufnahme von ¹⁸F-FDG nahe. D.h., AML-Zellen, die einen vergleichsweise hohen IC₅₀ Wert nach Inkubation mit ABT-737 aufweisen (entsprechend einer geringen Sensitivität gegenüber ABT-737), zeigen auch eine vergleichsweise hohe Aufnahme von ¹⁸F-FDG (siehe auch Ergebnisse Kap. 6.4 sowie Abb. 11 B). In diesem Fall liegt offensichtlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Aggressivität einer AML Zelllinie und der ¹⁸F-FDG Aufnahme vor.

Nach Hinzunahme von HL-60 in die Berechnung des Pearson-Koeffizients (für alle 8 untersuchten AML-Zelllinien) ergab sich allerdings ein Wert von - 0,0077, der nahelegt, dass wohl keine Korrelation zwischen IC₅₀ (ABT-737) und ¹⁸F-FDG Aufnahme vorliegt (Abb. 11 A). Allerdings ist der hohe IC₅₀ ABT-737 Wert für HL-60 kritisch zu hinterfragen, da in der Literatur deutlich niedrigere IC₅₀ Werte ermittelt wurden (Konopleva et al. 2006, Shaoyan et al. 2011). Zudem weisen erste Ergebnisse von Shaoyan et al. (2011) auch darauf hin, dass Langzeitkulturen von HL-60 eine zunehmende Resistenz gegenüber ABT-737 im Verlauf entwickeln, weshalb hier eine mögliche, ungünstige Verzerrung in der Berechnung der Auswertung vorliegen kann. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Aggressivität einer AML Zelllinie und der ¹⁸F-FDG Aufnahme, wie anhand der schwach positiven Korrelation für die 7 AML-Zelllinien (ohne HL-60) ersichtlich ist, ist dennoch als wahrscheinlicher anzusehen, da diese Beobachtung auch sich mit den Erkenntnissen von Kroemer et al. (2008), Herst et al. (2011), Zhao et al. (2013) und Chen et al. (2014), dass ein erhöhter Glucosemetabolismus mit einer höheren Therapieresistenz korreliert, decken.

Seit den Untersuchungen von Warburg und Cori in den 20er Jahren des vorigen Jahrhunderts (Potter et al. 2016) ist bekannt, dass der Glukosemetabolismus (Glykolyse und Zitratzyklus), allgemein in Tumorzellen, wie auch in AML-Zellen, deutlich erhöht ist (Kroemer et al. 2008, Hanahan et al. 2011, Chen et al. 2014, Arimoto et al. 2015). Zudem können neben anderen Faktoren auch Enzyme, z. B. in der Glykolyse oder im Citratzyklus, mutiert vorliegen, beispielsweise im Citratzyklus die mitochondriale Isozitatdehydrogenase (IDH) (Marcucci et al. 2011, Chen et al. 2014) oder der Subtyp A der Laktatdehydrogenase (LDH-A) (Koukourakis et al. 2006, Miao et al. 2013), die zu einem gesteigerten Glucosemetabolismus führen (siehe auch Einleitung, Kap. 3.6.2.2). Der erhöhte Glukosemetabolismus in Tumorzellen korreliert dann mit einer höheren Therapieresistenz und einer schlechteren klinischen Prognose (Kroemer et al. 2008, Herst et al. 2011, Zhao et al. 2013).

Unsere Ergebnisse stützen diese Beobachtungen, da auch in unseren Versuchen die AML-Zelllinien mit einer hohen Sensitivität gegenüber ABT-737 eine niedrige ^{18}F -FDG Aufnahme aufwiesen. Umgekehrt zeigten AML-Zelllinien mit einer niedrigen Sensitivität gegenüber ABT-737 eine hohe ^{18}F -FDG Aufnahme. Zumindest liegt gemäß dem Pearson-Koeffizient von 0,363 offensichtlich eine schwach positive Korrelation für 7 der 8 AML-Zelllinien (ohne HL-60) zwischen der Aggressivität einer AML Zelllinie und der ^{18}F -FDG Aufnahme vor.

Die Zelllinie HL-60 (FAB M2) allerdings wies in der vorliegenden Arbeit den höchsten ABT-737 IC_{50} -Wert [15 μM] aller acht untersuchten AML-Zelllinien auf. Konopleva et al. (2006) dagegen ermittelten für HL-60 Zellen einen um den Faktor 300 geringeren ABT-737 IC_{50} Wert [50 nM]. Ebenfalls ermittelten Shaoyan et al. (2011) sowie auch Contractor et al. (2004) niedrigere ABT-737 IC_{50} Werte (< 100 nM) für HL-60. Um eigene Methodenfehler bei der Bestimmung des IC_{50} Werts auszuschließen, wurden die Versuche mehrfach wiederholt (mit immer dem gleichen Ergebnis), und die Ergebnisse konnten auch mit der Durchflusszytometrie bestätigt werden. Möglicherweise ist die Heterogenität der verwendeten HL-60 Zelllinie oder auch das Alter der kultivierten Zelllinie (Langzeitkultur) der Grund für den vergleichsweise hohen ABT-737 IC_{50} Wert (Shaoyan et al. 2011). Ferner ist daher nicht auszuschließen, dass der vergleichsweise niedrige ABT-737 IC_{50} Wert von Contractor et al. (2004), Konopleva et al. (2006) und Shaoyan et al. (2011) eine HL-60 Zelllinie mit unterschiedlicher Heterogenität zurückzuführen ist.

Leukämiezellen im Allgemeinen bilden eine enorm heterogene Zellpopulation, die zum Teil aus unreifen und reifen Zellklonen bestehen und sich in ihrer Morphologie und Zytogenetik voneinander unterscheiden (Saadatpour et al. 2014, De Kouchkovsky et al. 2016). Dies ist sehr wahrscheinlich ein Grund für die unterschiedliche Sensitivität der untersuchten AML-Zelllinien gegenüber ABT-737.

7.2. Veränderungen auf molekularer Ebene in den AML-Zelllinien unter Therapie mit dem BH3-Mimetikum ABT-737

Eine wichtige Rolle in onkogenen Zellen spielen bezüglich der Apoptose auch die Proteine der BCL-2 Familie, von denen drei der fünf anti-apoptotischen Proteine (BCL-2, BCL-XL und BCL-W) von ABT-737 selektiv gebunden/gehemmt werden. An die anti-apoptotischen BCL-2 Proteine MCL-1 und BCL2A1 bindet ABT-737 nicht (Oltersdorf et al. 2005, Konopleva et al. 2006). MCL-1 und BCL2A1 werden in AML-Zelllinien oft deutlich erhöht exprimiert (Shamas-Din et al. 2011), weshalb die betreffenden AML-Zelllinien auch eine geringere Sensitivität gegenüber ABT-737 aufweisen. Auch unterschiedliche Expressionsmuster von BCL-2, BCL-W und BCL-XL können zu einer geringeren Sensitivität gegenüber ABT-737 führen, z. B. geringe Expression von BCL-2 mit im Vergleich dazu höherer Expression von BCL-W und BCL-XL, wie in den Arbeiten von Merino et al. (2012) und Rooswinkel et al. (2012) gezeigt werden konnten.

ABT-737 bindet mit unterschiedlicher Affinität an die anti-apoptotischen Proteine: BCL-2 wird mit hoher, BCL-XL mit mäßiger und BCL-W mit geringer Affinität gebunden (Chen et al. 2005, Oltersdorf et al. 2005, Shamas-Din et al. 2011, Merino et al. 2012, Rooswinkel et al. 2012). Durch die selektive Bindung der drei anti-apoptotischen Bcl-Proteine (BCL-2, BCL-XL, BCL-W) durch ABT-737 wird BAX aus den entsprechenden, inaktiven BCL-BAX-Proteinkomplexen (BCL-2-BAX, BCL-XL-BAX bzw. BCL-W-BAX) im Zytosol verdrängt und es erfolgt eine Translokation der BAX-Proteine in die äußere Mitochondrienmembran (Willis et al. 2003, Willis et al. 2005, Willis et al. 2005, van Delft et al. 2006). Nach Oligomerisierung der somit aktivierten BAX-Proteine mit den membranständigen BAK-Proteinen zum mitochondrial-outer-membrane-complex (MOMC) gelangen von der inneren Mitochondrienmembran dissoziierte Cytochrom-C Komplexe ins Zytosol (siehe auch Einleitung, Kap. 3.7.2, 3.8 und 3.9) (Daniel et al. 2003, Youle et al. 2008, Strasser et al. 2011). Anschließend erfolgt die Ausbildung des Apoptosoms, unter Bindung von Caspase 9 und APAF-1. Das Apoptosom leitet die Caspase-abhängige Apoptose ein.

Eine Überexpression von MCL-1 und BCL2A1 in AML oder in MDS-Zellen, an die ABT-737 nicht bindet, ist mit einer Resistenz gegenüber ABT-737 assoziiert (Shamas-Din et al. 2011, Jilg et al. 2016). Durch beispielsweise selektive Inhibierung/Bindung von MCL-1 mit dem pan-BCL-2 Family Inhibitor (-)BI97D6 (Pan et al. 2015) oder durch knock-out des MCL-1 Genes in AML-Zellen (Glaser et al. 2012) konnte dies nachgewiesen werden. Die in unserer Arbeit verwendeten AML-Zelllinien zeigten in der Western Blot-Analyse eine heterogene Expression an den anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1 und BCL2A1. Beispielsweise zeigen sich zu allen Zeitpunkten (0 – 96 h) in den AML-Zelllinien KG1a, MV4-11 und Kasumi-1, die eine vergleichsweise hohe Sensitivität gegenüber ABT-737 ($IC_{50} < 100$ nM) aufwiesen, eine höhere Expression von BCL-2, BCL-W und BCL-XL und eine geringere Expression von MCL-1 und BCL2A1 (s. Abb. 12 A, B und F). In Einklang mit den Beobachtungen von Merino et al. (2012) und Rooswinkel et al. (2012) ist die unterschiedliche Sensitivität der AML-Zelllinien KG1a, MV4-11 und Kasumi-1 gegenüber ABT-737 zu allen Zeitpunkten (0 – 96

h) nach Behandlung mit ABT-737 auch durch die unterschiedliche Expression der antiapoptotischen BCL-2 Proteine BCL-2, BCL-XL und BCL-W in der Western Blot-Analyse beobachtbar. Zum Beispiel zeigen KG-1a Zellen (s. Abb. 12 A) eine geringe Expression von BCL-2, bei hoher Expression von BCL-XL und BCL-W. Nachdem BCL-2 im Vergleich zu BCL-XL und BCL-W mit sehr hoher Affinität von ABT-737 gebunden wird, liegt hier offenbar die Ursache für den höheren ABT-737 IC_{50} Wert (77,6 nM) im Vergleich zu den AML Zelllinien MV4-11 (IC_{50} = 9,9 nM) und Kasumi-1 (IC_{50} = 16,95 nM) vor (s. Abb. 12 A, B und F). Hingegen zeigen sowohl die AML Zelllinie MV4-11 als auch die AML Zelllinie Kasumi-1 eine geringere Expression von BCL-XL und BCL-W, bei im Gegensatz dazu hoher Expression von BCL-2, weshalb hier offenbar der Grund für die höhere Sensitivität gegenüber ABT-737 im Vergleich zu der AML Zelllinie KG1a vorliegt (s. Abb. 12 A, B und F).

Im Gegensatz dazu ließen sich bei den AML-Zelllinien mit geringerer Sensitivität gegenüber ABT-737, beispielsweise bei HL-60 und PLB-985 (IC_{50} > 1 μ M), vergleichsweise geringe Expressionen von BCL-2, BCL-W und BCL-XL und höhere Expressionen von MCL-1 und BCL2A1 erkennen (s. Abb. 12 C). Da ABT-737 nicht an MCL-1 und BCL2A1 bindet, wird durch die Überexpression von MCL-1 und BCL2A1 die Resistenz dieser Zellen gegenüber ABT-737 erklärt (Oltersdorf et al. 2005, van Delft et al. 2006, Vogler et al. 2009). Dagegen zeigt sich in NB-4 Zellen nach ABT-737 Behandlung zu allen Zeitpunkten (0 – 96 h) sowohl eine vergleichsweise niedrigere Expression von BCL-2, bei moderater/starker Expression von BCL-W und BCL-XL, als auch moderate Expression von MCL-1 und BCL2A1 (s. Abb. 13 D). Somit führt nicht nur eine höhere von MCL-1 und BCL2A1, sondern auch eine niedrige Expression von BCL-2 bei im Gegensatz dazu höherer Expression BCL-XL und BCL-W zu einer geringeren Sensitivität gegenüber ABT-737 (Merino et al. 2012, Rooswinkel et al. 2012). Die Behandlung mit ABT-737 induziert – wie mit der Western Blot-Analyse gezeigt werden konnte – in den AML-Zelllinien MV4-11, AML-193, PLB-985 und THP-1 auch eine verminderte Expression einzelner anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (BCL-2, BCL-W, BCL-XL, MCL-1, BCL2A1): z. B. nach 12 h bei MV4-11 mit einer verminderten Expression von MCL-1, BCL-2, BCL-XL und BCL2A1 oder nach 12 h bei PLB-985 mit einer verminderten Expression von MCL-1, BCL-2, BCL-W und BCL2A1 (s. Abb. 12 E - H). Bei den AML-Zelllinien HL-60 und Kasumi-1 bewirkt die Behandlung mit ABT-737 dagegen eine Zunahme der Expression einzelner anti-apoptotischer Proteine der BCL-2-Familie (s. Abb. 12 B und C). Beispielsweise induziert ABT-737 eine zunehmende Expression von BCL-2, BCL-W, MCL-1 und BCL2A1 in HL-60 Zellen bzw. von BCL-2 in Kasumi-1, wengleich bei Letzteren die Ladekontrollen fehlen. Möglicherweise geht die erhöhte Expression der BCL-2 Proteine auf den zytotoxischen Zellstress durch Behandlung mit ABT-737 zurück (Vogler et al. 2009).

Zur Überwindung der Resistenz von Tumorzellen gegenüber ABT-737 erscheint die Anwendung eines weiteren Inhibitors der anti-apoptotischen BCL-2 Proteine sinnvoll. Beispielsweise bindet Obatoclax (GX15-070) selektiv an MCL-1, BCL-XL und BCL-W, und sollte damit die Wirkung von ABT-737 ergänzen (Konopleva et al. 2008, Stefanzi et al. 2017).

Obatoclox wurde bereits erfolgreich in einer multizentrischen Phase I/II Studie bei älteren, therapienaiven Patienten mit Erstdiagnose einer AML angewendet (Schimmer et al. 2014). Es konnte zudem auch bereits gezeigt werden, dass die kombinierte Anwendung von ABT-737 und Obatoclox eine deutliche Reduktion ABT-737 resistenter Tumorzellen bewirkt (Konopleva et al. 2008, Pan et al. 2015). Darüber hinaus lässt sich auch durch die Inhibierung der Expression von MCL-1 und des PI3K/Akt-Signalwegs, der die Aktivierung von MCL-1 steuert, die Resistenz von Tumorzellen gegenüber ABT-737 reduzieren. Die Anwendung von Quercetin führt bei Patienten mit einer chronischen lymphozytären Leukämie (CLL) sowohl in B-Zellen als auch in Leukämie-Zellen zu einer verminderten Expression von MCL-1 bei gleichzeitiger Inhibierung des PI3K-Akt Signalwegs (Russo et al. 2013, Russo et al. 2017). Durch die kombinierte Gabe von Quercetin und ABT-737 kann bei diesen Patienten die Apoptose in den Leukämiezellen induziert werden.

7.3. Beeinflussbarkeit der ^{18}F -FDG Aufnahme und der Sensitivität gegenüber dem BH3-Mimetikum ABT-737 durch ATRA / Optimierung der Therapie

Eine weitere Möglichkeit, um Therapie-resistente AML-Tumorzellen erneut zu sensibilisieren, ist die Differenzierung von Tumorzellen. Die Differenzierung erhöht die Sensitivität gegenüber zytotoxischen Therapeutika, wie z. B. gegenüber ABT-737. Ca. 10% aller AML-Patienten leiden an der akuten promyelozytären Leukämie (APL), einem Subtyp der AML. ATRA wird –parallel zur Chemotherapie mit Ara-C –erfolgreich zur Differenzierung (siehe auch Einleitung, Kap 3.4.1) eingesetzt (Fenaux et al. 1999, Fenaux et al. 2007). Das Flavinoid Kaempferol besitzt antioxidative und antitumorale Eigenschaften. Kaempferol wurde in NB-4 und HL-60 Zellen präklinisch evaluiert und induziert wie ATRA Apoptose und inhibiert zusätzlich die multi-drug resistant (MDR) assoziierte Proteine wie ABCB1 und ABCC1 (Shaffer et al. 2012). Eine Differenzierung der Tumorzellen konnte jedoch in der Arbeit von Moradzadeh et al. (2018) nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist es möglich, dass Kaempferol eine vielversprechende therapeutische Alternative zu ATRA in der Behandlung der APL-Patienten in der Zukunft darstellen kann.

ATRA kann in einigen AML-Zelllinien zu einer Differenzierung der Zellen und zu einem Proliferationsstopp durch Dissoziation des PML-RAR α -RXR-Komplexes und Modulation / Degradation des PML-RAR α -Fusionsprotein führen (Zhao et al. 2004, Saeed et al. 2011, Sakamoto et al. 2014). Eine kombinierte Therapie aus ATRA und einer Chemotherapie, meist mit Anthrazyklinen, wird bereits erfolgreich bei Patienten mit einer akuten promyelozytären Leukämie eingesetzt. Zudem führt die kombinierte Therapie zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose (Huang ME 1988, Fenaux et al. 1999, Fenaux et al. 2007, Avvisati et al. 2011). Bei APL-Zelllinien liegt häufig eine Translokation in t(15;17)(q24; q21) vor, die zu einer Ausbildung eines PML-RAR α Fusionsprotein führt (de The et al. 1990, Huret 1997-2021, Jimenez et al. 2020). Durch das neu entstandene PML-RAR α -Fusionsprotein wird allerdings

der weitere Retinsäure (retinoic acid / RA) Signalweg blockiert (Zelent et al. 2001, Nowak et al. 2009), da dieser mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) Heterodimere bildet. Das PML-RAR α -RXR-Protein bildet so einen Ko-Repressorkomplex mit Histon-Deacetylase-(HDAC-)Aktivität aus und induziert eine Chromatinkondensation. Zudem bindet PML-RAR α DNA-methylierende Enzyme, wodurch die Zielpromoter des RA-Signalweges methyliert werden und somit eine Transkription der RAR α -Zielgene unterdrückt wird.

Hohe Konzentrationen an ATRA allerdings bewirken eine Dissoziation des PML-RAR α -RXR-Komplexes wodurch Co-Enzym A rekrutiert werden kann und anschließend RAR α -Zielgene transkribiert werden können. Zum anderen reguliert ATRA den cAMP-PKA-Signalweg, der zur Differenzierung der APL-Zellen durch Transkriptionsaktivierung führen kann. Darüber hinaus kann das PML-RAR α -Fusionsprotein selbst durch ATRA moduliert und degradiert werden (Zhao et al. 2004, Saeed et al. 2011, Sakamoto et al. 2014).

In Anlehnung an bereits publizierte Versuche mit ATRA (Chomienne et al. 1990, Valtieri et al. 1991, Lee et al. 2002, Barber et al. 2008) wurden die Zelllinien NB4 und AML-193 in der vorliegenden Studie für fünf Tage mit ATRA [100nM] inkubiert. Die Behandlung mit ATRA bewirkt eine signifikante Abnahme der ¹⁸F-FDG Aufnahme bei NB-4 von 13% auf 4 % und bei AML-193 von 12% auf 5% (p jeweils < 0,001). Auch zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Sensitivität gegenüber ABT-737 (IC₅₀ NB-4: [813nM] vs. [582nM]; IC₅₀ AML-193: [753nM] vs. [590nM]). Beide Ergebnisse weisen einen direkten Zusammenhang mit der Differenzierung auf, weshalb zusätzlich untersucht wurde, ob sich auch ATRA-induzierte Veränderungen bezüglich der Expression von BCL-2 Proteinen nachweisen lassen.

ATRA bewirkt in beiden AML-Zelllinien, NB-4 und AML-193, eine Abnahme der Expression der anti-apoptotischen Proteine der BCL-2 Familie. Dabei zeigen sowohl die Proteine BCL-2, BCL-XL und BCL-W, an die ABT-737 bindet, als auch die Proteine MCL-1 und BCL2A1, an die ABT-737 nicht bindet, eine Abnahme in ihrer Proteinexpression (siehe Abb. 15 und 16). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Bradbury et al. (1996), in der u.a. gezeigt wurde, dass ATRA in 8 von 25 primären AML-Zelllinien sowie auch in der Zelllinie K562, eine etablierte Zelllinie aus einem Patienten, der an einer chronisch myeloische Leukämie litt, eine Abnahme der Expression des BCL-2 Proteins induziert. Hierbei zeigen insbesondere die CD34 positiven Zelllinien eine Abnahme der Expression des BCL-2 Proteins. Weitere Proteine der BCL-2 Familie wurden allerdings nicht untersucht (Bradbury et al. 1996).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen auch, dass ATRA die Aufnahme von ¹⁸F-FDG reduziert. Damit übereinstimmend bewirkte die Behandlung mit ATRA auch eine Zunahme der Sensitivität gegenüber ABT-737. Beide Ergebnisse legen eine ATRA-induzierte Differenzierung der AML-Zelllinien nahe. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Chen et al. (2014), die durch Inhibition der initialen Glykolyse mit 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) eine Abnahme der Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Ara-C nachweisen konnten. Dabei zeigen die AML-Zelllinien U937, OCI-AML3, THP-1 und KG-1a im Vergleich zu HL-60 eine erhöhte Glykolyse.

Zudem liegen im Vergleich zu HL-60 in den AML- Zelllinien U937, OCI-AML3, THP-1 und KG-1a eine erhöhte Expression von glykolytischen Genen (Hexokinase 1 (HK1), Hexokinase 2 (HK2), Phosphofruktokinase L (PFKL), Phosphofruktokinase B (PFKB), Pyruvatkinase M1 (PKM1) und M2 (PKM2), Lactatdehydrogenase A (LDHA) und B (LDHB)) sowie Gene des Citratcyclus (Citrat Synthase (CS), Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) und 2 (IDH2), Oxalglutarat-Dehydrogenase (OGDH), Succinat-Dehydrogenase (SDHA)) vor, wobei die HK1 in den vier AML-Zelllinien im Vergleich zu HL-60 am höchsten exprimiert wurde. Aufgrund dessen wurde die Hexokinase, ein Schlüsselenzym der Glykolyse, mit zwei Glykolyse-Inhibitoren, 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) und Dichloracetat (dichloracetate / DCA), jeweils getrennt inhibiert. Nach Behandlung der AML-Zellen mit 2-DG ließ sich eine Abnahme der glykolytischen Prozesse mit konsekutiver Abnahme der Zell-Proliferation sowie eine Zunahme der Sensitivität gegenüber Ara-C nachweisen. Durch gezielte Reduktion der Expression von HK1 mit shRNA ließ sich in den AML-Zelllinien U937 und OCI-AML3 zudem eine Zunahme der Sensitivität gegenüber Ara-C nachweisen. Zusammenfassend konnten Chen et al. (2014) in den untersuchten AML-Zelllinien eine Korrelation zwischen der Inhibierung der Glykolyse und der Sensitivität gegenüber Ara-C belegen.

Die Ergebnisse von Chen et al. (2014) stehen ebenfalls im Einklang mit Erkenntnis aus einer früheren Arbeit von Herst et al. (2011), bei der beobachtet wurde, dass primäre AML-Zelllinien mit einem hohen Glykolysemetabolismus im Vergleich zu primären AML-Zelllinien mit einem moderaten Glykolysemetabolismus eine signifikant höhere Resistenz gegenüber der kombinierten Behandlung mit all-trans-Retinoinsäure (all-trans-retinoic-acid / ATRA) und Arsentrioxid (arsenic trioxide/ATO) zeigten. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit unseren Ergebnissen, bei denen wir einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aufnahme von ^{18}F -FDG – entsprechend eines erhöhten Glykolysemetabolismus – und der Sensitivität gegenüber dem Apoptose-Induktor ABT-737 in AML-Zelllinien beobachten konnten.

7.4. Der Glucosemetabolismus, respektive die ^{18}F -FDG Aufnahme, als Biomarker für die Sensitivität gegenüber ABT-737 / Ausblick und mögliche Translation

In zukünftigen Untersuchungen sollte weiter geklärt werden, ob die Quantifizierung der Aufnahme von ^{18}F -FDG eine Möglichkeit zur Beurteilung und Stratifizierung der jeweiligen AML-Erkrankung bietet. Dabei könnten beispielsweise Informationen über die individuelle Dosis-Wirkungsbeziehung und / oder einer evtl. Resistenz gegenüber einer Therapieform gewonnen werden. Schließlich könnte dann aufgrund der Aufnahme von ^{18}F -FDG als dynamischem Biomarker eine Schlussfolgerung hinsichtlich des Therapieerfolges (Gesamtüberleben [overall survival, OS] / Ergebnis-freies Überleben [event-free survival, EFS]) gezogen werden, wie es z. B. Chen et al. (2014) mithilfe des prognostischen Risiko-Scores (prognostic risk score, PRS) untersucht haben. Als Basis für den PRS diente die Auswertung

von 100 Metaboliten, die von 400 Patienten, die an einer cytogenetisch normalen AML (cytogenetically normal AML / CN-AML) erkrankt sind, im Vergleich zu einem Normkollektiv (n= 446) an gesunden Menschen (healthy control / HC) aus 7 verschiedenen hämatoonkologischen Zentren in der Volksrepublik China evaluiert wurden. Hierbei wiesen 6 von 10 der untersuchten Metabolite, die den Glucosemetabolismus betreffen, bei CN-AML Patienten Unterschiede im Vergleich zur HC auf. Glycerol-3-phosphat, Laktat und Citrat waren im Vergleich zur HC erniedrigt, wohingegen Pyruvat, 2-Oxoglutarat und 2-Hydroxyglutaratsäure (2-HG) erhöht vorlagen. Von den übrigen 90 Metaboliten lagen 41 in veränderter Form bei CN-AML Patienten im Vergleich zur HC vor, so dass insgesamt 47 modifizierte Metabolite (u. a. Alkohole, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren, organische Säuren, Nucleoside, etc.) nachgewiesen werden konnten. Basierend auf der Datenanalyse konnten Chen et al. (2014) nachweisen, dass bei 45 Stoffwechselwegen (metabolic pathways) eine Dysregulation dieser vorliegt. Anhand dieser Daten wurden 233 CN-AML Patienten, bei denen detaillierte Informationen über Therapie und Nachsorge (follow up) vorlagen, zur statistischen Analyse des PRS herangezogen. Anschließend erfolgte anhand des Medianwerts des PRS die Unterteilung der Patienten in Patienten mit einem hohen PRS und in Patienten mit einem niedrigen PRS. Patienten mit einem niedrigen PRS zeigten demzufolge ein kürzeres medianes OS und medianes EFS im über 2-jährigen Verlauf (Beobachtungsdauer 5 Jahre) im Vergleich zu Patienten mit einem hohen PRS. Zudem zeigte sich in der Analyse, dass das Vorliegen von Laktat, 2-Oxoglutarat, Pyruvat, 2-HG und Glycerol-3-Phosphat sich negativ auf den PRS und somit auf das OS und EFS auswirkten, wohingegen Citrat einen positiven Effekt auf den PRS und somit auf das OS und das EFS zu haben schien. Chen et al. (2014) konnten zudem in einer Multivariant Cox Regressions-Analyse zeigen, dass ein niedriger PRS auch unabhängig von den bekannten, ungünstigen Prognosefaktoren (wie z. B. dem Lebensalter, die Zahl der weißen Blutkörperchen, der prozentuale Anteil an Blasten im Knochenmark, die bereits absolvierten Therapieprotokolle, Mutationen in Genen (z. B. die FLT3-ITD, CEBPA biallel, NPM1, DNMT3A, MLL-PTD und 2-HG)) ein schlechteres OS (HR 1,80, p = 0,008) und kürzeres EFS (HR 1,75, p = 0,008) vorhersagen kann. Darüber hinaus konnten Chen et al. (2014) auch in ihrer Arbeit ein Zusammenhang zwischen einem niedrigen PRS und einer gesteigerten Aktivität der Glykolyse und des Citratzyklus nachweisen. Die gesteigerte Glykolyse korreliert ebenfalls in den untersuchten primären AML-Zellen sowie in den AML-Zelllinien mit einer niedrigeren Sensitivität gegenüber Ara-C.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen von Herst et al. (2011), Chen et al. (2014) und legen daher nahe, dass der Glucosestoffwechsel, insbesondere die Glykolyse und der Citratzyklus, ein potentiell Ziel für die Therapie der AML, beispielsweise im Rahmen einer kombinierten Therapie mit einem Glykolyse-Inhibitor und einem Chemotherapeutika (Ara-C), darstellt. In einer Phase III Studie (ARMADA 2000; NCT#03504410) wird bereits die Wirksamkeit und Sicherheit von Devimistat (CPI-613®), einem selektiven Inhibitor von zwei Schlüsselenzyme, der Pyruvatdehydrogenase (PDH) im Zytosol und der α -

Ketoglutaratdehydrogenase (KGDH) im Citratzyklus, in Kombination mit hohen Dosen an Ara-C und Mitoxantrone bei älteren Patienten mit einer rezidivierenden oder therapierefraktären AML untersucht (Pardee et al. 2019).

Allerdings sollten neben der Evaluation neuer Therapieformen auch weiterführende Untersuchungen der bereits entdeckten Biomarker (Chen et al. 2014) sowie der bekannten und noch unbekannte alterierten Stoffwechselwege in AML-Zellen (Kroemer et al. 2008, Zhao et al. 2013, Kreitz et al. 2019) erfolgen. Zum einen könnte durch das bessere Verständnis der Signalwege die Erweiterung bereits bestehender Therapieregime mit z. B. Antikörpern, z. B. einem toxin-gekoppelten Anti-CD33-Antikörpern (z. B. Gemtuzumab – Ozogamizin) (Castaigne et al. 2012, Hills et al. 2014, Zhang et al. 2018), oder mit z. B. Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Sorafinib (Metzelder et al. 2012, Serve et al. 2013, Rollig et al. 2015) oder bei FTL3-Mutation Midostaurin (Stone et al. 2017), die Effektivität der Therapie weiter optimiert werden. Zum anderen könnten zur nicht invasiven Beurteilung hinsichtlich der Sensitivität gegenüber einer Therapie, beispielsweise Venetoclax (ABT-199), bei AML-Zellen durch Erweiterung / Adaptierung bereits bestehender Risikoscores, wie z. B. dem PRS von Chen et al. (2014), durch Hinzunahme weiterer Biomarker, wie z. B. der Aufnahme von ^{18}F -FDG, herangezogen werden. Zudem sollten einerseits weitere AML-Zelllinien hinsichtlich der ^{18}F -FDG Aufnahme und der Sensitivität gegenüber ABT-737 untersucht werden, um den anhand von 7 AML-Zelllinien berechneten Korrelations-Koeffizienten (Pearson-Koeffizient) weiter zu validieren, sowie auch andererseits weitere Untersuchungen mit ATRA bei AML-Zellen angestrebt werden, da unsere Ergebnisse gezeigt haben, dass die Sensitivität gegenüber ABT-737 diametral zur ^{18}F -FDG Aufnahme signifikant zunimmt (Buschner et al. 2020).

Vielversprechende Ansätze wären hierbei beispielsweise weitere Untersuchungen am Retinsäure-Rezeptor (RAR) selbst, der in AML-Zellen verändert vorliegen kann und durch ATRA, begleitend zur oder in Vorbereitung auf die Systemtherapie, reaktiviert und/oder stabilisiert werden kann. Die weiteren Untersuchungen würden dabei die Inhibierung folgender Enzyme/Prozesse beinhalten, die auf den RAR in AML-Zellen abzielen: I. posttranslationale Modifikation von RAR; II. proteasomale Degradation von RAR; III. NADPH-abhängige Oxidoreduktase von AKR1C3; die im Retinsäuremetabolismus an der Bildung des RAR beteiligt ist; IV. Inosin-50-monophosphatdehydrogenase (IMPDH), die an der Guaninnukleosidsynthese beteiligt ist. Die Funktionalität von RAR (I.) kann in AML-Zellen durch posttranslationale Modifikation, beispielsweise der Phosphorylierung, deutlich herabgesetzt werden. Ein möglicher Ansatz wäre der Einsatz von Proteinkinase-Inhibitoren, die die Funktionalität von RAR wiederherstellen würden (Kropf et al. 2010, Gianni et al. 2012, Gupta et al. 2012). Ebenfalls kann eine Inhibition des 26S-Proteasoms (II.) durch Bortezomib zu einer Wiederherstellung der Funktionalität von RAR führen und somit die Differenzierung der AML-Zellen eingeleitet werden (Ying et al. 2013). Durch die Inhibition von AKR1C3, einer NADPH-abhängigen Oxidoreduktase, mit beispielsweise dem AKR1C3-Inhibitor Medroxyprogesteron kann indirekt die Aktivität von RAR (III.) erhöht werden (Khanim et al. 2009, Verma et al. 2016, Morell et al. 2020), wodurch die Proliferation, Differenzierung und

die Apoptose der AML-Zellen negativ beeinflusst werden. Das Enzym IMPDH (IV.) wird in AML-Zellen überexprimiert und ist an der Guaninnukleosidsynthese beteiligt. Durch die gleichzeitige Gabe eines IMPDH-Inhibitors und ATRA konnte in NB-4 Zellen eine Zunahme der Differenzierung nachgewiesen werden (Moosavi et al. 2006). In einer Phase I/IIa Studie zeigten 3 von 19 AML Patienten (in Phase I) unter Therapie mit FF-10501-01, ein IMPDH Inhibitor, ein partielles Therapieansprechen (partial remission / PR) sowie bei 2 von 20 MDS/CMML Patienten (Phase I und IIa) eine komplette Remission (complete remission / CR) im Knochenmark, so dass sich eine Wirksamkeit bei stark vorbehandelten AML und MDS/CMML Patienten nachweisen ließ. Allerdings musste die vielversprechende Studie in der Phase IIa aufgrund einer deutlichen Zunahme der Mukositis Ereignisse (°III, CTCAE v4.03) vorzeitig abgebrochen werden (Garcia-Manero et al. 2020). Ein kausaler Zusammenhang konnte allerdings in der Arbeit von Garcia-Manero et al. (2020) nicht eindeutig identifiziert werden.

Neben der Evaluation weiterer Therapieformen oder der Untersuchung weiterer Biomarker sollte auch die Analyse der Aufnahme von ^{18}F -FDG bei AML-Patienten weiter vorangetrieben werden, da das Radiopharmazeutikum ^{18}F -FDG in der klinischen Diagnostik (PET/CT und PET/MRT) bereits etabliert ist. Hierbei könnte auch die Reproduzierbarkeit, der in der vorliegenden Arbeit in vitro gewonnenen Ergebnisse zur veränderten Aufnahme von ^{18}F -FDG nach Induktion der Apoptose mit ABT-737 und Differenzierung mit ATRA überprüft werden. Zusätzlich könnte vor Beginn und während einer Therapie die ^{18}F -FDG-PET/CT oder ^{18}F -FDG-PET/MRT eingesetzt werden, um mit deren Hilfe, bei fehlendem metabolischem Ansprechen, weniger wirksame Therapien zu erkennen und ggfs. Dosisadaptierungen / Therapieänderungen vorzunehmen (Effektivität vs. Toxizität). Schließlich könnte die Aufnahme von ^{18}F -FDG, wie bereits in einigen Publikationen gezeigt werden konnte (Chen et al. 2014, Arimoto et al. 2015), im Rahmen des Therapiemonitorings zur Verlaufskontrolle und zur Beurteilung der therapeutischen Effizienz herangezogen werden können.

8. Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Erkrankung des blutbildenden Knochenmarks, die verschiedene Subtypen umfasst. Bisher ist wenig bekannt, wie die morphologischen und zytogenetischen Unterschiede der Subtypen den Zellstoffwechsel beeinflussen. Die zytogenetische Heterogenität von AML hat zwei verschiedene Klassifizierungssysteme hervorgebracht: die WHO Klassifikation und die French-American-British (FAB) Klassifikation. Die Standardtherapie von AML umfasst Chemotherapie und, falls notwendig, eine allogene Stammzell-Transplantation.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien der AML verwendet (FAB Klassifikation): KG-1a (M1), Kasumi-1, HL-60 (alle M2), NB-4 (M3), PLB-985 (M4), MV4-11, THP-1, AML-193 (alle M5). Die Zelllinien wurden hinsichtlich Sensitivität gegenüber ABT-737 (einem Auslöser der Apoptose), der Aufnahme von ^{18}F -FDG sowie der Expression relevanter Proteine der Apoptose im Western-Blot analysiert. Nach Behandlung mit ABT-737 wurde die Zellvitalität mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] / ATP-Assay sowie die Induktion der Apoptose mit Hilfe der Flowzytometrie bestimmt. Die Aufnahme von ^{18}F -FDG diente als Maß für die Aufnahme von Glukose. Die Expression von ausgewählten Proteinen der Bcl-2-Familie wurde mit Western-Blot dargestellt. Die Bcl-2-Familie umfasst sowohl pro- (BAK, BAX, BAD, BOK) als auch anti-apoptotische (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BCL-2A1) Proteine. ABT-737 bindet mit hoher Affinität an die anti-apoptotischen Proteine BCL-2, BCL-XL und BCL-W und induziert somit nach Freisetzung von BAK die Apoptose.

ABT-737 induzierte in allen untersuchten AML-Zelllinien die Apoptose, wie mit Hilfe der Flowzytometrie verifiziert werden konnte. Dabei zeigte jede Zelllinie jedoch auch Unterschiede hinsichtlich der Vitalität. Beispielsweise konnten in HL-60 (M2) und NB-4 (M3) Zellen vergleichsweise hohe ^{18}F -FDG-Aufnahmen verbunden mit relativ geringen Sensitivitäten gegenüber ABT-737 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten Kasumi-1 (M2) und MV4-11 (M5) vergleichsweise niedrige ^{18}F -FDG-Aufnahmen und hohe Sensitivitäten gegenüber ABT-737. Mit Western-Blot ließen sich nach Behandlung mit der jeweiligen zelllinienspezifischen mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) von ABT-737 verminderte Expressionen von BCL-2, BCL-W und BCL-XL darstellen. Auch konnten Unterschiede in der Expression der anti-apoptotischen BCL-2 Proteine, die an ABT-737 binden (BCL-2, BCL-W, BCL-XL), bzw. nicht an ABT-737 binden (MCL-1, BCL-2A1) zwischen den untersuchten Zelllinien beobachtet werden.

Die Ergebnisse belegen einen indirekten Zusammenhang zwischen der Aufnahme von ^{18}F -FDG und der Sensitivität gegenüber ABT-737. Die evaluierten Unterschiede könnten im Zusammenhang mit unterschiedlich alterierten Stoffwechselwegen einer AML-Zelllinie stehen. Daher erfolgte die Differenzierung von zwei der untersuchten AML-Zelllinien, NB-4 und AML-193, mit ATRA (all-trans-Retinoinsäure, all-trans-retinoic-acid) zur Evaluation von möglichen Veränderungen bezüglich Aufnahme von ^{18}F -FDG, Sensitivität gegenüber ABT-737 sowie der Expression von Proteinen der BCL-2-Familie. Mit ATRA behandelte, d.h.

differenzierte NB-4 und AML-193 Zellen wiesen nach Behandlung mit ABT-737 eine um ca. 40 % verminderte Vitalität im Vergleich zur nicht differenzierten Kontrollgruppe auf. Entsprechend verminderten sich die IC₅₀ Werte für Behandlung mit ABT-737 entsprechend einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber ABT-737. In beiden mit ATRA differenzierten AML-Zelllinien war zudem eine signifikante Abnahme der ¹⁸F-FDG-Aufnahme gegenüber den nicht differenzierten Kontrollen beobachtbar. Außerdem konnten mit dem Western-Blot in den ATRA differenzierten NB-4 und AML-193 Zellen unterschiedliche Expressionsmuster bezüglich der anti-apoptischen BCL-2 Proteine die an ABT-737 binden (BCL-2, BCL-XL und BCL-W) sowie denjenigen, die nicht an ABT-737 binden (MCL-1, BCL-2A1) gezeigt werden. Der Apoptosemarker Cleaved caspase 3 konnte nach Differenzierung mit ATRA in beiden AML-Zelllinien nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich in den untersuchten AML-Zelllinien ein indirekter Zusammenhang zwischen der Aufnahme von ¹⁸F-FDG und der Sensitivität gegenüber ABT-737. Da eine Differenzierungsbehandlung von AML-Zellen mit ATRA sowohl die Aufnahme von ¹⁸F-FDG verminderte als auch die Sensitivität gegenüber ABT-737 erhöhte, könnte eine derart kombinierte Behandlung zukünftig eine erfolgversprechende Therapie darstellen. Zudem kann die Aufnahme von ¹⁸F-FDG in AML-Zellen auch als Biomarker zur Beurteilung hinsichtlich der Sensitivität gegenüber einer Therapie oder zur Therapiekontrolle eingesetzt werden.

Teile dieser Arbeit konnten im Journal *Leukemia & Lymphoma* publiziert werden.

9. Literaturverzeichnis

- Albers, P., Andreesen, R., Böhme, A., Bokemeyer, C., Creutzig, U., Ehninger, G., Freund, M., Garbe, C., Gökbuget, N., Hallek, M., Hartmann, J. T., Hehlmann, R., Heimpel, H., Hochhaus, A., Höffken, K., Hübner, G., Kath, R., Köhne, C.-H., Link, H., Mahlberg, R., Matzdorff, A., Müller, R.-P., Preiß, J., Schmoll, H.-J. and von Minckwitz, G. (2002-2021). "ONKODIN - Onkologie, Hämatologie - Daten und Informationen." 2021, from <https://www.onkodin.de/e2/e51675/e52337/>.
- Andreeff, M., Jiang, S., Zhang, X., Konopleva, M., Estrov, Z., Snell, V. E., Xie, Z., Okcu, M. F., Sanchez-Williams, G., Dong, J., Estey, E. H., Champlin, R. C., Kornblau, S. M., Reed, J. C. and Zhao, S. (1999). "Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid." *Leukemia* **13**(11): 1881-1892.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M. and Vardiman, J. W. (2016). "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia." *Blood* **127**(20): 2391-2405.
- Arimoto, M. K., Nakamoto, Y., Nakatani, K., Ishimori, T., Yamashita, K., Takaori-Kondo, A. and Togashi, K. (2015). "Increased bone marrow uptake of 18F-FDG in leukemia patients: preliminary findings." *Springerplus* **4**: 521.
- Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K. and Kamada, N. (1991). "Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation." *Blood* **77**(9): 2031-2036.
- Avvisati, G., Lo-Coco, F., Paoloni, F. P., Petti, M. C., Diverio, D., Vignetti, M., Latagliata, R., Specchia, G., Baccarani, M., Di Bona, E., Fioritoni, G., Marmont, F., Rambaldi, A., Di Raimondo, F., Kropp, M. G., Pizzolo, G., Pogliani, E. M., Rossi, G., Cantore, N., Nobile, F., Gabbas, A., Ferrara, F., Fazi, P., Amadori, S., Mandelli, F., Gimema, A. and Groups, E. C. (2011). "AIDA 0493 protocol for newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: very long-term results and role of maintenance." *Blood* **117**(18): 4716-4725.
- Barber, N., Belov, L. and Christopherson, R. I. (2008). "All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias." *Leuk Res* **32**(2): 315-322.
- Benedetti, L., Grignani, F., Scicchitano, B. M., Jetten, A. M., Diverio, D., Lo Coco, F., Avvisati, G., Gambacorti-Passerini, C., Adamo, S., Levin, A. A., Pelicci, P. G. and Nervi, C. (1996). "Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RARalpha-mediated increase of type II transglutaminase." *Blood* **87**(5): 1939-1950.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group." *Br J Haematol* **33**(4): 451-458.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1985). "Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group." *Ann Intern Med* **103**(3): 460-462.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R. and Sultan, C. (1991). "Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO)." *Br J Haematol* **78**(3): 325-329.
- Bradbury, D. A., Aldington, S., Zhu, Y. M. and Russell, N. H. (1996). "Down-regulation of bcl-2 in AML blasts by all-trans retinoic acid and its relationship to CD34 antigen expression." *Br J Haematol* **94**(4): 671-675.
- Breitman, T. R., Collins, S. J. and Keene, B. R. (1981). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid." *Blood* **57**(6): 1000-1004.
- Buschner, G., Feuerecker, B., Spinner, S., Seidl, C. and Essler, M. (2020). "Differentiation of acute myeloid leukemia (AML) cells with ATRA reduces (18)F-FDG uptake and increases sensitivity towards ABT-737-induced apoptosis." *Leuk Lymphoma*: 1-10.

- Castaigne, S., Pautas, C., Terre, C., Raffoux, E., Bordessoule, D., Bastie, J. N., Legrand, O., Thomas, X., Turlure, P., Reman, O., de Revel, T., Gastaud, L., de Gunzburg, N., Contentin, N., Henry, E., Marolleau, J. P., Aljijakli, A., Rousselot, P., Fenaux, P., Preudhomme, C., Chevret, S., Dombret, H. and Acute Leukemia French, A. (2012). "Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study." *Lancet* **379**(9825): 1508-1516.
- Chen, C., Edelstein, L. C. and Gelinas, C. (2000). "The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2687-2695.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. and Huang, D. C. (2005). "Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chen, W. L., Wang, J. H., Zhao, A. H., Xu, X., Wang, Y. H., Chen, T. L., Li, J. M., Mi, J. Q., Zhu, Y. M., Liu, Y. F., Wang, Y. Y., Jin, J., Huang, H., Wu, D. P., Li, Y., Yan, X. J., Yan, J. S., Li, J. Y., Wang, S., Huang, X. J., Wang, B. S., Chen, Z., Chen, S. J. and Jia, W. (2014). "A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value." *Blood* **124**(10): 1645-1654.
- Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, N., Daniel, M. T., Fenaux, P., Castaigne, S. and Degos, L. (1990). "All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship." *Blood* **76**(9): 1710-1717.
- Contractor, R., Konopleva, M., Deng, X., Harris, D., Ruvolo, P., Estrov, Z., May, W. S., Rosenberg, S. H. and Andreeff, M. (2004). "Inhibition of Bcl-2 Signaling at Nanomolar Concentrations by Small Molecule BH3 Inhibitor, ABT-737 as a Novel Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia (AML)." **104**(11): 760.
- Cory, S., Huang, D. C. and Adams, J. M. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* **22**(53): 8590-8607.
- Cragg, M. S., Harris, C., Strasser, A. and Scott, C. L. (2009). "Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics." *Nat Rev Cancer* **9**(5): 321-326.
- Czech, N., Brenner, W., Kampen, W. U. and Henze, E. (2000). "[Diagnostic value of positron emission tomography (PET) in clinical oncology]." *Dtsch Med Wochenschr* **125**(18): 565-567.
- Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C. and Guner, D. (2003). "Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins." *Essays Biochem* **39**: 73-88.
- Daniel, P. T., Wieder, T., Sturm, I. and Schulze-Osthoff, K. (2001). "The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy." *Leukemia* **15**(7): 1022-1032.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. and Traganos, F. (1992). "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* **13**(8): 795-808.
- De Kouchkovsky, I. and Abdul-Hay, M. (2016). "'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'." *Blood Cancer J* **6**(7): e441.
- de The, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L. and Dejean, A. (1990). "The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus." *Nature* **347**(6293): 558-561.
- DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C. B. (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." *Cell Metab* **7**(1): 11-20.
- Dohner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Dombret, H., Ebert, B. L., Fenaux, P., Larson, R. A., Levine, R. L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M. S., Tien, H. F., Wei, A. H., Lowenberg, B. and Bloomfield, C. D. (2017). "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel." *Blood* **129**(4): 424-447.

- Drexler, H. G., Dirks, W. G., Matsuo, Y. and MacLeod, R. A. (2003). "False leukemia-lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines." *Leukemia* **17**(2): 416-426.
- Falini, B., Tiacci, E., Martelli, M. P., Ascani, S. and Pileri, S. A. (2010). "New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues." *Discov Med* **10**(53): 281-292.
- Fenaux, P., Chastang, C., Chevret, S., Sanz, M., Dombret, H., Archimbaud, E., Fey, M., Rayon, C., Huguet, F., Sotto, J. J., Gardin, C., Makhoul, P. C., Travade, P., Solary, E., Fegueux, N., Bordessoule, D., Miguel, J. S., Link, H., Desablens, B., Stamatoullas, A., Deconinck, E., Maloisel, F., Castaigne, S., Preudhomme, C. and Degos, L. (1999). "A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group." *Blood* **94**(4): 1192-1200.
- Fenaux, P., Wang, Z. Z. and Degos, L. (2007). "Treatment of acute promyelocytic leukemia by retinoids." *Curr Top Microbiol Immunol* **313**: 101-128.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F. and Gallo, R. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." *Blood* **54**(3): 713-733.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., DeBerardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., Garcia-Saez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jaattela, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., Lopez-Otin, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Munoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nunez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H. U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G. and Kroemer, G. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death Differ* **25**(3): 486-541.
- Gandhi, L., Camidge, D. R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C. L., McKeegan, E. M., Litvinovich, E., Hemken, P. M., Dive, C., Enschede, S. H., Nolan, C., Chiu, Y. L., Busman, T., Xiong, H., Krivoshik, A. P., Humerickhouse, R., Shapiro, G. I. and Rudin, C. M. (2011). "Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors." *J Clin Oncol* **29**(7): 909-916.
- Garcia-Manero, G., Pemmaraju, N., Alvarado, Y., Naqvi, K., Ravandi, F., Jabbour, E., De Lumpa, R., Kantarjian, H., Advani, A., Mukherjee, S., Gerds, A., Carraway, H. E., Nazha, A., Iwamura, H., Murase, M., Bavisotto, L.,

- Kurman, M., Maier, G., Johansen, M. and Sekeres, M. A. (2020). "Results of a Phase 1/2a dose-escalation study of FF-10501-01, an IMPDH inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes." *Leuk Lymphoma* **61**(8): 1943-1953.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* **4**(11): 891-899.
- Gianni, M., Peviani, M., Bruck, N., Rambaldi, A., Borleri, G., Terao, M., Kurosaki, M., Paroni, G., Rochette-Egly, C. and Garattini, E. (2012). "p38alphaMAPK interacts with and inhibits RARalpha: suppression of the kinase enhances the therapeutic activity of retinoids in acute myeloid leukemia cells." *Leukemia* **26**(8): 1850-1861.
- Glaser, S. P., Lee, E. F., Tronson, E., Bouillet, P., Wei, A., Fairlie, W. D., Izon, D. J., Zuber, J., Rappaport, A. R., Herold, M. J., Alexander, W. S., Lowe, S. W., Robb, L. and Strasser, A. (2012). "Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia." *Genes Dev* **26**(2): 120-125.
- Green, D. R. and Kroemer, G. (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." *Science* **305**(5684): 626-629.
- Grimm, S., Bauer, M. K., Baeuerle, P. A. and Schulze-Osthoff, K. (1996). "Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis." *J Cell Biol* **134**(1): 13-23.
- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **13**(15): 1899-1911.
- Gupta, K., Gulen, F., Sun, L., Aguilera, R., Chakrabarti, A., Kiselar, J., Agarwal, M. K. and Wald, D. N. (2012). "GSK3 is a regulator of RAR-mediated differentiation." *Leukemia* **26**(6): 1277-1285.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hao, Z., Duncan, G. S., Chang, C. C., Elia, A., Fang, M., Wakeham, A., Okada, H., Calzascia, T., Jang, Y., You-Ten, A., Yeh, W. C., Ohashi, P., Wang, X. and Mak, T. W. (2005). "Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis." *Cell* **121**(4): 579-591.
- Harris, M. I., Hadden, W. C., Knowler, W. C. and Bennett, P. H. (1985). "International criteria for the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance." *Diabetes Care* **8**(6): 562-567.
- Harris, R. A. (2013). Glycolysis Overview. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Lennarz, W., Lane, M., Academic Press: 3232.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. and Sakuragi, N. (2014). "Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer." *Biomed Res Int* **2014**: 150845.
- Herst, P. M., Howman, R. A., Neeson, P. J., Berridge, M. V. and Ritchie, D. S. (2011). "The level of glycolytic metabolism in acute myeloid leukemia blasts at diagnosis is prognostic for clinical outcome." *J Leukoc Biol* **89**(1): 51-55.
- Hills, R. K., Castaigne, S., Appelbaum, F. R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E. H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J. Y., Recher, C., Chilton, L., Moorman, A. V. and Burnett, A. K. (2014). "Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials." *Lancet Oncol* **15**(9): 986-996.
- Huang ME, Y. Y., Chen SR, et al. (1988). "Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia." *Blood* **72**(2): 567-572.
- Huret, J.-L. (1997-2021, 02/10/2021). "Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology."
- Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." *Nat Rev Cancer* **2**(4): 277-288.

- Jaffe, E. S. (2009). "The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 523-531.
- Jilg, S., Reidel, V., Muller-Thomas, C., Konig, J., Schauwecker, J., Hockendorf, U., Huberle, C., Gorka, O., Schmidt, B., Burgkart, R., Ruland, J., Kolb, H. J., Peschel, C., Oostendorp, R. A., Gotze, K. S. and Jost, P. J. (2016). "Blockade of BCL-2 proteins efficiently induces apoptosis in progenitor cells of high-risk myelodysplastic syndromes patients." *Leukemia* **30**(1): 112-123.
- Jimenez, J. J., Chale, R. S., Abad, A. C. and Schally, A. V. (2020). "Acute promyelocytic leukemia (APL): a review of the literature." *Oncotarget* **11**(11): 992-1003.
- Juliusson, G., Lazarevic, V., Horstedt, A. S., Hagberg, O., Hoglund, M. and Swedish Acute Leukemia Registry, G. (2012). "Acute myeloid leukemia in the real world: why population-based registries are needed." *Blood* **119**(17): 3890-3899.
- Kale, J., Osterlund, E. J. and Andrews, D. W. (2018). "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death." *Cell Death Differ* **25**(1): 65-80.
- Khanim, F. L., Hayden, R. E., Birtwistle, J., Lodi, A., Tiziani, S., Davies, N. J., Ride, J. P., Viant, M. R., Gunther, U. L., Mountford, J. C., Schrewe, H., Green, R. M., Murray, J. A., Drayson, M. T. and Bunce, C. M. (2009). "Combined bezafibrate and medroxyprogesterone acetate: potential novel therapy for acute myeloid leukaemia." *PLoS One* **4**(12): e8147.
- Khaw, S. L., Huang, D. C. and Roberts, A. W. (2011). "Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in haematological malignancies." *Pathology* **43**(6): 525-535.
- Kierans, S. J. and Taylor, C. T. (2021). "Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology." *J Physiol* **599**(1): 23-37.
- Kim, T. K. (2015). "T test as a parametric statistic." *Korean journal of anesthesiology* **68**(6): 540.
- Koeffler, H. P. (1983). "Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications." *Blood* **62**(4): 709-721.
- Koeffler, H. P., Billing, R., Lusic, A. J., Sparkes, R. and Golde, D. W. (1980). "An undifferentiated variant derived from the human acute myelogenous leukemia cell line (KG-1)." *Blood* **56**(2): 265-273.
- Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y. X., Sneed, T., Verhaegen, M., Soengas, M., Ruvolo, V. R., McQueen, T., Schober, W. D., Watt, J. C., Jiffar, T., Ling, X., Marini, F. C., Harris, D., Dietrich, M., Estrov, Z., McCubrey, J., May, W. S., Reed, J. C. and Andreeff, M. (2006). "Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia." *Cancer Cell* **10**(5): 375-388.
- Konopleva, M. and Letai, A. (2018). "BCL-2 inhibition in AML: an unexpected bonus?" *Blood* **132**(10): 1007-1012.
- Konopleva, M., Watt, J., Contractor, R., Tsao, T., Harris, D., Estrov, Z., Bornmann, W., Kantarjian, H., Viallet, J., Samudio, I. and Andreeff, M. (2008). "Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax)." *Cancer Res* **68**(9): 3413-3420.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L. and Dang, C. V. (2011). "Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism." *Nat Rev Cancer* **11**(5): 325-337.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Harris, A. L. and Sivridis, E. (2006). "Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma." *Cancer Res* **66**(2): 632-637.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* **407**(6805): 789-795.
- Kreitz, J., Schonfeld, C., Seibert, M., Stolp, V., Alshamleh, I., Oellerich, T., Steffen, B., Schwalbe, H., Schnutgen, F., Kurrle, N. and Serve, H. (2019). "Metabolic Plasticity of Acute Myeloid Leukemia." *Cells* **8**(8).
- Kroemer, G. and Pouyssegur, J. (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." *Cancer Cell* **13**(6): 472-482.

- Kropf, P. L., Wang, L., Zang, Y., Redner, R. L. and Johnson, D. E. (2010). "Dasatinib promotes ATRA-induced differentiation of AML cells." *Leukemia* **24**(3): 663-665.
- Kumari, A. (2018). Glycolysis. *Sweet Biochemistry*. Kumari, A., Academic Press.
- Kuusanmaki, H., Leppa, A. M., Polonen, P., Kontro, M., Dufva, O., Deb, D., Yadav, B., Bruck, O., Kumar, A., Everaus, H., Gjertsen, B. T., Heinaniemi, M., Porkka, K., Mustjoki, S. and Heckman, C. A. (2020). "Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia." *Haematologica* **105**(3): 708-720.
- Lange, B., Valtieri, M., Santoli, D., Caracciolo, D., Mavilio, F., Gemperlein, I., Griffin, C., Emanuel, B., Finan, J., Nowell, P. and et al. (1987). "Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines." *Blood* **70**(1): 192-199.
- Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F. and Berger, R. (1991). "NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3)." *Blood* **77**(5): 1080-1086.
- Lee, K. H., Chang, M. Y., Ahn, J. I., Yu, D. H., Jung, S. S., Choi, J. H., Noh, Y. H., Lee, Y. S. and Ahn, M. J. (2002). "Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(5): 1125-1133.
- Lengfelder, E., Döhner, K., Lambert, J.-F., Nachbaur, D., Niederwieser, D., Schlenk, R. F., Thol, F. and Platzbecker, U. (2020, 08/2020). "Leitlinie - Akute Promyelozyten Leukämie (APL)."
- Letai, A. (2005). "BCL-2: found bound and drugged!" *Trends Mol Med* **11**(10): 442-444.
- Licht, J. D. (2001). "AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML." *Oncogene* **20**(40): 5660-5679.
- Mandelli, F., Diverio, D., Avvisati, G., Luciano, A., Barbui, T., Bernasconi, C., Brocchia, G., Cerri, R., Falda, M., Fioritoni, G., Leoni, F., Liso, V., Petti, M. C., Rodeghiero, F., Saglio, G., Vegna, M. L., Visani, G., Jehn, U., Willemze, R., Muus, P., Pelicci, P. G., Biondi, A. and Lo Coco, F. (1997). "Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. Gruppo Italiano-Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto and Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica Cooperative Groups." *Blood* **90**(3): 1014-1021.
- Marcucci, G., Haferlach, T. and Dohner, H. (2011). "Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications." *J Clin Oncol* **29**(5): 475-486.
- Merino, D., Khaw, S. L., Glaser, S. P., Anderson, D. J., Belmont, L. D., Wong, C., Yue, P., Robati, M., Phipson, B., Fairlie, W. D., Lee, E. F., Campbell, K. J., Vandenberg, C. J., Cory, S., Roberts, A. W., Ludlam, M. J., Huang, D. C. and Bouillet, P. (2012). "Bcl-2, Bcl-x(L), and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells." *Blood* **119**(24): 5807-5816.
- Metzelder, S. K., Schroeder, T., Finck, A., Scholl, S., Fey, M., Gotze, K., Linn, Y. C., Kroger, M., Reiter, A., Salih, H. R., Heinicke, T., Stuhlmann, R., Muller, L., Giagounidis, A., Meyer, R. G., Brugger, W., Vohringer, M., Dreger, P., Mori, M., Basara, N., Schafer-Eckart, K., Schultheis, B., Baldus, C., Neubauer, A. and Burchert, A. (2012). "High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses." *Leukemia* **26**(11): 2353-2359.
- Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J. and Huang, G. (2013). "Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy." *IUBMB Life* **65**(11): 904-910.
- Moll, U. M., Wolff, S., Speidel, D. and Deppert, W. (2005). "Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 631-636.
- Moosavi, M. A., Yazdanparast, R. and Lotfi, A. (2006). "3-Hydrogenkwadaphnin induces monocytic differentiation and enhances retinoic acid-mediated granulocytic differentiation in NB4 cell line." *J Biochem Mol Biol* **39**(6): 722-729.

- Moradzadeh, M., Tabarraei, A., Sadeghnia, H. R., Ghorbani, A., Mohamadkhani, A., Erfanian, S. and Sahebkar, A. (2018). "Kaempferol increases apoptosis in human acute promyelocytic leukemia cells and inhibits multidrug resistance genes." *J Cell Biochem* **119**(2): 2288-2297.
- Morell, A., Cermakova, L., Novotna, E., Lastovickova, L., Haddad, M., Haddad, A., Portillo, R. and Wsol, V. (2020). "Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors Ibrutinib and Acalabrutinib Counteract Anthracycline Resistance in Cancer Cells Expressing AKR1C3." *Cancers (Basel)* **12**(12).
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Dixit, V. M. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* **85**(6): 817-827.
- Nowak, D., Stewart, D. and Koefler, H. P. (2009). "Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development." *Blood* **113**(16): 3655-3665.
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., Bruncko, M., Deckwerth, T. L., Dinges, J., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Kitada, S., Korsmeyer, S. J., Kunzer, A. R., Letai, A., Li, C., Mitten, M. J., Nettesheim, D. G., Ng, S., Nimmer, P. M., O'Connor, J. M., Oleksijew, A., Petros, A. M., Reed, J. C., Shen, W., Tahir, S. K., Thompson, C. B., Tomaselli, K. J., Wang, B., Wendt, M. D., Zhang, H., Fesik, S. W. and Rosenberg, S. H. (2005). "An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours." *Nature* **435**(7042): 677-681.
- Osellame, L. D., Blacker, T. S. and Duchon, M. R. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **26**(6): 711-723.
- Pan, R., Ruvolo, V. R., Wei, J., Konopleva, M., Reed, J. C., Pellicchia, M., Andreeff, M. and Ruvolo, P. P. (2015). "Inhibition of Mcl-1 with the pan-Bcl-2 family inhibitor (-)BI97D6 overcomes ABT-737 resistance in acute myeloid leukemia." *Blood* **126**(3): 363-372.
- Pardee, T. S., Luther, S., Buysse, M., Powell, B. L. and Cortes, J. (2019). "Devimistat in combination with high dose cytarabine and mitoxantrone compared with high dose cytarabine and mitoxantrone in older patients with relapsed/refractory acute myeloid leukemia: ARMADA 2000 Phase III study." *Future Oncol* **15**(28): 3197-3208.
- Pfeiffer, T., Schuster, S. and Bonhoeffer, S. (2001). "Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways." *Science* **292**(5516): 504-507.
- Philipp-Staheli, J., Kim, K. H., Liggitt, D., Gurley, K. E., Longton, G. and Kemp, C. J. (2004). "Distinct roles for p53, p27Kip1, and p21Cip1 during tumor development." *Oncogene* **23**(4): 905-913.
- Pollyea, D. A., Amaya, M., Strati, P. and Konopleva, M. Y. (2019). "Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm." *Blood Adv* **3**(24): 4326-4335.
- Pop, C. and Salvesen, G. S. (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation." *J Biol Chem* **284**(33): 21777-21781.
- Potter, M., Newport, E. and Morten, K. J. (2016). "The Warburg effect: 80 years on." *Biochem Soc Trans* **44**(5): 1499-1505.
- Quentmeier, H., Martelli, M. P., Dirks, W. G., Bolli, N., Liso, A., Macleod, R. A., Nicoletti, I., Mannucci, R., Pucciarini, A., Bigerna, B., Martelli, M. F., Mecucci, C., Drexler, H. G. and Falini, B. (2005). "Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin." *Leukemia* **19**(10): 1760-1767.
- Riccardi, C. and Nicoletti, I. (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *Nat Protoc* **1**(3): 1458-1461.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D. and Barreda, D. R. (2011). "Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death." *J Vis Exp*(50).

- Rollig, C., Serve, H., Huttmann, A., Noppeney, R., Muller-Tidow, C., Krug, U., Baldus, C. D., Brandts, C. H., Kunzmann, V., Einsele, H., Kramer, A., Schafer-Eckart, K., Neubauer, A., Burchert, A., Giagounidis, A., Krause, S. W., Mackensen, A., Aulitzky, W., Herbst, R., Hanel, M., Kiani, A., Frickhofen, N., Kullmer, J., Kaiser, U., Link, H., Geer, T., Reichle, A., Junghanss, C., Repp, R., Heits, F., Durk, H., Hase, J., Klut, I. M., Illmer, T., Bornhauser, M., Schaich, M., Parmentier, S., Gorner, M., Thiede, C., von Bonin, M., Schetelig, J., Kramer, M., Berdel, W. E., Ehninger, G. and Study Alliance, L. (2015). "Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial." *Lancet Oncol* **16**(16): 1691-1699.
- Röllig C., B. D. W., Braess J., Greil R., Heuser, M., Manz, M. G., Passweg J., Reinhardt D., Schlenk R. F. (2021, 01/2021). "Leitlinie - Akute Myeloische Leukämie (AML)." www.onkopedia.com - Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., from <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>.
- Rooswinkel, R. W., van de Kooij, B., Verheij, M. and Borst, J. (2012). "Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B." *Cell Death Dis* **3**: e366.
- Russo, M., Milito, A., Spagnuolo, C., Carbone, V., Rosen, A., Minasi, P., Lauria, F. and Russo, G. L. (2017). "CK2 and PI3K are direct molecular targets of quercetin in chronic lymphocytic leukaemia." *Oncotarget* **8**(26): 42571-42587.
- Russo, M., Spagnuolo, C., Volpe, S., Tedesco, I., Bilotto, S. and Russo, G. L. (2013). "ABT-737 resistance in B-cells isolated from chronic lymphocytic leukemia patients and leukemia cell lines is overcome by the pleiotropic kinase inhibitor quercetin through Mcl-1 down-regulation." *Biochem Pharmacol* **85**(7): 927-936.
- Saadatpour, A., Guo, G., Orkin, S. H. and Yuan, G. C. (2014). "Characterizing heterogeneity in leukemic cells using single-cell gene expression analysis." *Genome Biol* **15**(12): 525.
- Saeed, S., Logie, C., Stunnenberg, H. G. and Martens, J. H. (2011). "Genome-wide functions of PML-RARalpha in acute promyelocytic leukaemia." *Br J Cancer* **104**(4): 554-558.
- Sakamoto, K., Imamura, T., Yano, M., Yoshida, H., Fujiki, A., Hirashima, Y. and Hosoi, H. (2014). "Sensitivity of MLL-rearranged AML cells to all-trans retinoic acid is associated with the level of H3K4me2 in the RARalpha promoter region." *Blood Cancer J* **4**: e205.
- Sander, C. A., Flaig, M. J. and Jaffe, E. S. (2001). "Cutaneous manifestations of lymphoma: a clinical guide based on the WHO classification. World Health Organization." *Clin Lymphoma* **2**(2): 86-100; discussion 101-102.
- Santoli, D., Yang, Y. C., Clark, S. C., Kreider, B. L., Caracciolo, D. and Rovera, G. (1987). "Synergistic and antagonistic effects of recombinant human interleukin (IL) 3, IL-1 alpha, granulocyte and macrophage colony-stimulating factors (G-CSF and M-CSF) on the growth of GM-CSF-dependent leukemic cell lines." *J Immunol* **139**(10): 3348-3354.
- Sanz, M. A. (2006). "Treatment of acute promyelocytic leukemia." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 147-155.
- Schimmer, A. D., Raza, A., Carter, T. H., Claxton, D., Erba, H., DeAngelo, D. J., Tallman, M. S., Goard, C. and Borthakur, G. (2014). "A multicenter phase I/II study of obatoclax mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia." *PLoS One* **9**(10): e108694.
- Schoenwaelder, S. M., Jarman, K. E., Gardiner, E. E., Hua, M., Qiao, J., White, M. J., Josefsson, E. C., Alwis, I., Ono, A., Willcox, A., Andrews, R. K., Mason, K. D., Salem, H. H., Huang, D. C., Kile, B. T., Roberts, A. W. and

- Jackson, S. P. (2011). "Bcl-xL-inhibitory BH3 mimetics can induce a transient thrombocytopenia that undermines the hemostatic function of platelets." *Blood* **118**(6): 1663-1674.
- Serve, H., Krug, U., Wagner, R., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Brunnberg, U., Schaich, M., Ottmann, O., Duyster, J., Wandt, H., Fischer, T., Giagounidis, A., Neubauer, A., Reichle, A., Aulitzky, W., Noppene, R., Blau, I., Kunzmann, V., Stuhlmann, R., Kramer, A., Kreuzer, K. A., Brandts, C., Steffen, B., Thiede, C., Muller-Tidow, C., Ehninger, G. and Berdel, W. E. (2013). "Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial." *J Clin Oncol* **31**(25): 3110-3118.
- Shaffer, B. C., Gillet, J. P., Patel, C., Baer, M. R., Bates, S. E. and Gottesman, M. M. (2012). "Drug resistance: still a daunting challenge to the successful treatment of AML." *Drug Resist Updat* **15**(1-2): 62-69.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B. and Andrews, D. W. (2011). "BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis." *Biochim Biophys Acta* **1813**(4): 508-520.
- Shaoyan, H., Mirshahidi, S., Bi, C.-L., Chng, W.-J., Hsu, H. W.-, Wu, S.-Y., Pan, J., Cen, J.-N. and Chen, C.-S. (2011). "C3aR1 Contributed to Acute Myeloid Leukemia Acquired Resistance to ABT-737 and Involved In the Process of AML." *Blood* **118**(21): 1435.
- Shoichet, B. K. (2006). "Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery." *J Med Chem* **49**(25): 7274-7277.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* **359**(6398): 843-845.
- Sohur, U. S., Dixit, M. N., Chen, C. L., Byrom, M. W. and Kerr, L. A. (1999). "Rel/NF-kappaB represses bcl-2 transcription in pro-B lymphocytes." *Gene Expr* **8**(4): 219-229.
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., Mason, K. D., Mitten, M. J., Nimmer, P. M., Oleksijew, A., Park, C. H., Park, C. M., Phillips, D. C., Roberts, A. W., Sampath, D., Seymour, J. F., Smith, M. L., Sullivan, G. M., Tahir, S. K., Tse, C., Wendt, M. D., Xiao, Y., Xue, J. C., Zhang, H., Humerickhouse, R. A., Rosenberg, S. H. and Elmore, S. W. (2013). "ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets." *Nat Med* **19**(2): 202-208.
- Stefanzl, G., Berger, D., Cerny-Reiterer, S., Blatt, K., Eisenwort, G., Sperr, W. R., Hoermann, G., Lind, K., Hauswirth, A. W., Bettelheim, P., Sill, H., Melo, J. V., Jager, U. and Valent, P. (2017). "The pan-BCL-2-blocker obatoclax (GX15-070) and the PI3-kinase/mTOR-inhibitor BEZ235 produce cooperative growth-inhibitory effects in ALL cells." *Oncotarget* **8**(40): 67709-67722.
- Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Dohner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A. and Dohner, H. (2017). "Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation." *N Engl J Med* **377**(5): 454-464.
- Strasser, A., Cory, S. and Adams, J. M. (2011). "Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases." *EMBO J* **30**(18): 3667-3683.
- Testa, U. and Riccioni, R. (2007). "Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia." *Haematologica* **92**(1): 81-94.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer* **26**(2): 171-176.
- Tucker, K. A., Lilly, M. B., Heck, L., Jr. and Rado, T. A. (1987). "Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity." *Blood* **70**(2): 372-378.

- Valtieri, M., Boccoli, G., Testa, U., Barletta, C. and Peschle, C. (1991). "Two-step differentiation of AML-193 leukemic line: terminal maturation is induced by positive interaction of retinoic acid with granulocyte colony-stimulating factor (CSF) and vitamin D3 with monocyte CSF." *Blood* **77**(8): 1804-1812.
- van Delft, M. F., Wei, A. H., Mason, K. D., Vandenberg, C. J., Chen, L., Czabotar, P. E., Willis, S. N., Scott, C. L., Day, C. L., Cory, S., Adams, J. M., Roberts, A. W. and Huang, D. C. (2006). "The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized." *Cancer Cell* **10**(5): 389-399.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* **324**(5930): 1029-1033.
- Verma, K., Zang, T., Gupta, N., Penning, T. M. and Trippier, P. C. (2016). "Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines." *ACS Med Chem Lett* **7**(8): 774-779.
- Vermes, I., Haanen, C. and Reutelingsperger, C. (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." *J Immunol Methods* **243**(1-2): 167-190.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. (1995). "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J Immunol Methods* **184**(1): 39-51.
- Vogler, M., Butterworth, M., Majid, A., Walewska, R. J., Sun, X. M., Dyer, M. J. and Cohen, G. M. (2009). "Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **113**(18): 4403-4413.
- Walter, R. B., Othus, M., Burnett, A. K., Lowenberg, B., Kantarjian, H. M., Ossenkoppele, G. J., Hills, R. K., van Montfort, K. G., Ravandi, F., Evans, A., Pierce, S. R., Appelbaum, F. R. and Estey, E. H. (2013). "Significance of FAB subclassification of "acute myeloid leukemia, NOS" in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients." *Blood* **121**(13): 2424-2431.
- Warburg, O., Wind, F. and Negelein, E. (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." *J Gen Physiol* **8**(6): 519-530.
- Willis, S., Day, C. L., Hinds, M. G. and Huang, D. C. (2003). "The Bcl-2-regulated apoptotic pathway." *J Cell Sci* **116**(Pt 20): 4053-4056.
- Willis, S. N. and Adams, J. M. (2005). "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis." *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 617-625.
- Willis, S. N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J. I., Adams, J. M. and Huang, D. C. (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305.
- Wlodkowic, D., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z. (2009). "Flow cytometry-based apoptosis detection." *Methods Mol Biol* **559**: 19-32.
- Ying, M., Zhou, X., Zhong, L., Lin, N., Jing, H., Luo, P., Yang, X., Song, H., Yang, B. and He, Q. (2013). "Bortezomib sensitizes human acute myeloid leukemia cells to all-trans-retinoic acid-induced differentiation by modifying the RARalpha/STAT1 axis." *Mol Cancer Ther* **12**(2): 195-206.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 47-59.
- Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S. and Licht, J. D. (2001). "Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia." *Oncogene* **20**(49): 7186-7203.
- Zhang, C. C., Yan, Z., Pascual, B., Jackson-Fisher, A., Huang, D. S., Zong, Q., Elliott, M., Fan, C., Huser, N., Lee, J., Sung, M. and Sapra, P. (2018). "Gemtuzumab Ozogamicin (GO) Inclusion to Induction Chemotherapy

- Eliminates Leukemic Initiating Cells and Significantly Improves Survival in Mouse Models of Acute Myeloid Leukemia." Neoplasia **20**(1): 1-11.
- Zhang, E., Yin, S., Lu, X., Ye, L., Fan, L. and Hu, H. (2018). "Glycycomarin Sensitizes Liver Cancer Cells to ABT-737 by Targeting De Novo Lipogenesis and TOPK-Survivin Axis." Nutrients **10**(3).
- Zhao, Q., Tao, J., Zhu, Q., Jia, P. M., Dou, A. X., Li, X., Cheng, F., Waxman, S., Chen, G. Q., Chen, S. J., Lanotte, M., Chen, Z. and Tong, J. H. (2004). "Rapid induction of cAMP/PKA pathway during retinoic acid-induced acute promyelocytic leukemia cell differentiation." Leukemia **18**(2): 285-292.
- Zhao, Y., Butler, E. B. and Tan, M. (2013). "Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics." Cell Death Dis **4**: e532.
- Zipursky, A., Thorner, P., De Harven, E., Christensen, H. and Doyle, J. (1994). "Myelodysplasia and acute megakaryoblastic leukemia in Down's syndrome." Leuk Res **18**(3): 163-171.
- Zipursky, A., Wang, H., Brown, E. J. and Squire, J. (1994). "Interphase cytogenetic analysis of in vivo differentiation in the myelodysplasia of Down syndrome." Blood **84**(7): 2278-2282.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ^{18}F -FDG-PET/CT Aufnahme eines Patienten mit pathologischer, subcapitaler Humeruskopffraktur rechts vor Therapie mit AraC (Cytarabin) und Daunorubicin nach dem 7 + 3 Schema (A/B/C) und nach Therapie (D/E/F) :	17
Abbildung 2: Schematischer Verlauf einer intrinsischen Apoptose.....	20
Abbildung 3: Bestimmung der mittleren ABT-737 Hemmkonzentrationen [IC_{50}] bei verschiedenen AML-Zelllinien nach 48 h Inkubation:	46
Abbildung 4: Nachweis der Apoptose mit Annexin V – FITC (FITC-A, x-Achse) und Propidiumiodid (PE-A, y-Achse) (s. Material und Methoden, Kap. 5.8).	49
Abbildung 5: ^{18}F -FDG Aufnahme in KG-1a Zellen (FAB M1):	50
Abbildung 6: ^{18}F -FDG Aufnahme bei Kasumi-1 (FAB M2) und HL-60 (FAB M2) Zellen (siehe auch Abb. 5).	51
Abbildung 7: ^{18}F -FDG Aufnahme von NB-4 (FAB M3) Zellen (siehe auch Abb. 6).....	51
Abbildung 8: ^{18}F -FDG Aufnahme in PLB-985 (FAB M4) Zellen (siehe auch Abb. 6).....	52
Abbildung 9: ^{18}F -FDG Aufnahme in MV4-11, THP-1 und AML-193 (alle FAB M5) Zellen (siehe auch Abb. 6).....	52
Abbildung 10: Boxblott mit der maximalen ^{18}F -FDG Aufnahme der untersuchten AML-Zelllinien (KG-1a = FAB M1; Kasumi-1 und HL-60 = FAB M2; NB-4 = FAB M3; PLB-985 = FAB M4; MV4-11, THP-1 und AML-193 = FAB M5) nach 240 min. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der ^{18}F -FDG-Aufnahmen in % der jeweils zugegebenen ^{18}F -FDG-Aktivität nach 240 min mit Standardabweichungen (s. auch Abbildungen 6-10).	53
Abbildung 11: Korrelation der ^{18}F -FDG-Aufnahme nach 240 min und den IC_{50} -Werten nach 48 h Inkubation mit ABT-737 bei allen verwendeten AML-Zelllinien (n = 8, A) und bei allen verwendeten AML-Zelllinien ohne HL-60 (n = 7, B).	55
Abbildung 12: Analyse der Expression ausgewählter Proteine in verschiedenen AML-Zelllinien (A-H) nach Inkubation mit ABT-737 mit Western Blot.	57
Abbildung 13: Überlebenskurven von AML-193 (A) und NB-4 (B) Zellen nach Differenzierung mit ATRA (all-trans Retinsäure) und anschließender Inkubation mit ABT-737.	60
Abbildung 14: Reduktion der ^{18}F -FDG Aufnahme in AML-193 und NB-4 Zellen nach Differenzierung mit ATRA (Boxblot).....	61
Abbildung 15: Expression der antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie sowie von Caspase 3 und cleaved Caspase 3 in ATRA differenzierten AML-193 und NB-4 Zellen.....	62
Abbildung 16: Semiquantitative Auswertung der Proteinexpression der antiapoptotischen Proteine der BCL-2 Familie aus Abb. 15 relativ zur Expression von beta-Actin bei den mit ATRA differenzierten AML-Zelllinien AML-193 und NB-4 zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 12 h, 24 h und 48 h) nach Behandlung mit ABT-737.	63

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AML-Subtypen gemäß der „French-American-British“- Klassifikation, modifiziert nach Onkodin (Albers et al. 2002-2021).....	9
Tabelle 2: AML-Subtypen gemäß der WHO-Klassifikation, modifiziert nach Onkodin (Albers et al. 2002-2021) und Amboss (2012-2021).....	10
Tabelle 3: Herstellung des Trenngels (12% Acrylamid), bzgl. Stammlösung siehe Kap. 5.1.3.....	40
Tabelle 4: Herstellung des Sammelgels (4% Acrylamid), bzgl. Stammlösung siehe Kap. 5.1.3	40
Tabelle 5: IC ₅₀ Werte für die untersuchten AML-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit ABT-737	47

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen des im Folgenden genannten Artikels veröffentlicht:

Buschner, G., Feurecker, B., Spinner, S., Seidl, C. and Essler, M. (2020). "Differentiation of acute myeloid leukemia (AML) cells with ATRA reduces (18)F-FDG uptake and increases sensitivity towards ABT-737-induced apoptosis." Leuk Lymphoma: 1-10

12. Danksagung

Jedes Projekt benötigt das Wohlwollen und die Unterstützung von Personen, weshalb ich mich hier herzlich bei all den Personen bedanken möchte, die zum Erfolg meiner Dissertation wesentlich beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. M. Schwaiger und seinem Nachfolger Herrn Univ.-Prof. Dr. W. Weber bedanken, dass ich in ihrer Klinik die Dissertation durchführen konnte.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. M. Essler der mir das Thema zu meiner Dissertation überlassen hat. Während seiner Tätigkeit als Oberarzt und Forscher an der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, stand er mir jederzeit mit kompetenten Ratschlägen zur Seite. Ebenfalls unterstützte er mich bei der konzeptionellen Weiterentwicklung des Projekts mit seiner langjährigen Erfahrung als Forscher und die mit ihm geführten, interessanten Diskussionen. Auch nach seiner Berufung in November 2013 auf die W3-Professur der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin in Bonn stand Herr Univ.-Prof. Dr. M. Essler trotz der großen Distanz für mich immer zu Verfügung.

Ein weiterer, besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Sabine Spinner aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Jost, III. medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, die mir insbesondere bei den Versuchen, der konzeptionellen Weiterentwicklung des Projekts und bei der Auswertung der Ergebnisse eine riesen Unterstützung war. Sie stand mir jederzeit mit kompetenter und geduldiger Hilfestellung zur Seite. Darüber hinaus gilt auch mein besonderer Dank am Forschungslabor der III. medizinischen Klinik (Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Jost), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, für die Verwendung der Gerätschaften zur Entwicklung meiner Ergebnisse, die ich lange Zeit uneingeschränkt nutzen durfte.

Auch besonders hervorheben möchte ich Frau Birgit Blechert (MTRA) und Frau Stephanie Rott (MTRA AG Prof. Dr. med. Jost), die mit viel Geduld und freundlicher Zuwendung mir bei der Erlernung sowie Weiterentwicklung der Versuche zur Seite standen. An dieser Stelle möchte ich mich bei ihnen besonders bedanken für die Motivation bei den doch langwierigen und über das Jahr aufgrund des Studiums doch diskontinuierlichen Versuchsphasen.

Ein weiterer, besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Christof Seidl, der mir mit seiner kompetenten Erfahrung in der präklinischen Forschung eine große Unterstützung, sowohl fachlich als auch inhaltlich, bei der Erstellung und Bearbeitung der Dissertation war.

Auch möchte ich mich für die guten Diskussionen und Hilfe bei der Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin bei Herrn Dr. med. Benedikt Feurecker, Herrn Dr. med. Hans Demel, Frau Johanna Bussemer und Frau Katharina Teiluf bedanken.

Großer Dank gebührt auch meiner lieben Mutter und meinem lieben Papa, die mir anfangs geduldig den finanziellen Rahmen für die Dissertation sicherten und anschließend, nach Beginn der beruflichen Tätigkeit als Arzt, liebevoll mahnend auf die Vollendung der Dissertation hinwiesen.

Größte und tiefste Dankbarkeit jedoch gebührt meiner geliebten Ehefrau, Frau Dr. med. dent. Livia Joho-Buschner, und meinen beiden geliebten Kindern, Laurens und Marie-Sophie, die mit großer Liebe und Verständnis dem Vater gegenüber zum einen bei den Höhen und Tiefen der Doktorarbeit immer zur Seite standen und zum anderen die Abwesenheit des Vaters in der Familie bei der Erstellung der Dissertation nachsahen. Daher widme ich euch, ihr Lieben, meine Doktorarbeit aus tiefster Dankbarkeit.