

Zentrum für Innere Medizin
Klinik III für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin
Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Junghanß

**Untersuchung zellulärer und molekularer Effekte
nach Akt-Inhibition mittels MK-2206
bei der akuten B-lymphatischen Leukämie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von
Elisabeth Fischer, geb. am 29.06.1994 in Frankenberg/Sa.

Rostock, September 2021

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Junghanß,
Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik III für
Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin,
Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen,
Kinder- und Jugendklinik, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Claudia Baldus,
Klinik für Innere Medizin II Hämatologie und Onkologie,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der PI3K/Akt-Signalweg als potentielle anti-leukämische Zielstruktur.....	1
1.1.1	Die Proteinkinase Akt und ihre Rolle im PI3K/Akt-Signalweg	1
1.1.2	Fehlregulation des PI3K/Akt-Signalweges	3
1.1.3	Modulationen des PI3K/Akt-Signalweges	5
1.1.3.1	Inhibition der Proteinkinase Akt	5
1.1.3.2	Akt-Inhibitor MK-2206.....	6
1.1.3.3	Weitere Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges	8
1.2	Therapiekonzepte bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL).....	9
1.2.1	Pathogenese der B-ALL	9
1.2.2	Aktuelle Therapiekonzepte	11
1.2.3	Neuartige Therapiekonzepte	12
2	Zielstellung	13
3	Materialien und Methoden	14
3.1	Materialien	14
3.2	Methoden.....	14
3.2.1	Analyse von B-ALL-Zelllinien	14
3.2.1.1	Kultivierung der Zelllinien.....	14
3.2.1.2	Inkubation der Zelllinien mit MK-2206.....	16
3.2.1.3	Analyse der Proliferation	17
3.2.1.4	Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels WST-1-Assay	17
3.2.1.5	Analyse der Zellmorphologie.....	17
3.2.1.6	Proteinlysatherstellung und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay	18
3.2.1.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot ...	19
3.2.2	Analyse von B-ALL-Primärzellen in Kokultur.....	22
3.2.2.1	Kultivierung der Primärzellen in Kokultur auf Feederlayer-Zellen (OP-9). 22	
3.2.2.2	Inkubation der Primärzellen in Kokultur mit MK-2206	26
3.2.2.3	Bestimmung der Viabilität mittels CellTiter-Blue®-Assay	27
3.2.2.4	Durchflusszytometrischer Apoptose-Nachweis	28

3.2.3	Aufarbeitung von Proteinen humaner B-ALL-Zelllinien für Proteom- und Phosphoproteom-Analyse	30
3.2.3.1	Proteinlysatherstellung und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay.....	31
3.2.3.2	Aufarbeitung der Proteine für nachfolgende Proteom- und Phosphoproteom-Analyse	32
3.2.4	Statistik.....	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane B-ALL-Zelllinien	36
4.1.1	Effekte von MK-2206 auf die Vitalität	36
4.1.2	Effekte von MK-2206 auf die Zellmorphologie	41
4.1.3	Effekte von MK-2206 auf die Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges und der Caspase-3	45
4.1.3.1	Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in SEM.....	45
4.1.3.2	Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in RS4;11	47
4.1.3.3	Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in NALM-6.....	49
4.1.3.4	Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in REH	51
4.2	Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf B-ALL-Primärzellen in Kokultur.....	54
4.2.1	Effekte von MK-2206 auf die Zellviabilität.....	55
4.2.2	Effekte von MK-2206 auf Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose.....	56
4.3	Aufarbeitung von Proteinen aus humanen B-ALL-Zelllinien für eine Proteom- und Phosphoproteom-Analyse	59
5	Diskussion	61
5.1	Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane B-ALL-Zelllinien	61
5.1.1	Einfluss von MK-2206 auf Proliferation und metabolische Aktivität	61
5.1.2	Einfluss von MK-2206 auf Morphologie und Apoptose.....	63
5.1.3	Einfluss von MK-2206 auf Expression und Aktivität von PI3K/Akt-Signalwegproteinen	66
5.2	Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf B-ALL-Primärzellen in Kokultur.....	70
5.3	Zusammenfassung und Ausblick	72
6	Abkürzungsverzeichnis.....	74
7	Literaturverzeichnis.....	79

8	Anhang	91
8.1	Materialien	91
8.1.1	Verbrauchsmaterialien	91
8.1.2	Geräte	93
8.1.3	Chemikalien	95
8.1.4	Zelllinien und Primärzellen	97
8.1.5	Antikörper	98
8.1.6	Puffer	100
8.2	Ergänzende Abbildungen und Tabellen	102
8.3	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	111
	Selbstständigkeitserklärung	114
	Promotionserklärung	115
	Publikationen	116
	Danksagung	117
	Thesen der Dissertation	118

1 Einleitung

1.1 Der PI3K/Akt-Signalweg als potentielle anti-leukämische Zielstruktur

Tumorerkrankungen sind häufig durch dysregulierte Signalwege gekennzeichnet, welche das Wachstum der Tumorzellen fördern. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg ist einer der am häufigsten mutierten und aberrant aktivierten Signaltransduktionswege bei verschiedensten Tumorentitäten, inklusive den akuten Leukämien. Er nimmt eine Schlüsselrolle in der Steuerung unterschiedlicher physiologischer Prozesse in der Zelle ein und reguliert u.a. Differenzierung, Wachstum, Proliferation, Zellzyklusprogression, Überleben, Proteinsynthese und Apoptose [1-4]. Eine aberrante Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges ist mit der Pathogenese verschiedener hämatologischer Erkrankungen, Arzneimittelresistenzen und einer schlechten Prognose assoziiert [2,5,6]. Bei an akuter B-lymphatischer Leukämie (B-ALL) erkrankten Patienten findet sich sehr oft ein dysregulierter PI3K/Akt-Signalweg (siehe Abschnitt 1.1.2) [2,7-14]. Diese Dysregulation ist teilweise mit Resistenzen gegenüber den bisher bei der ALL eingesetzten Medikamenten assoziiert [2,6,12]. Zusätzlich geht die notwendige intensive Kombinations-Chemotherapie oftmals mit schweren Nebenwirkungen einher [15]. Deshalb wird an Therapien geforscht, um gezielt die Funktion von aberrant aktivierten Genen und Proteinen im PI3K/Akt-Signalweg zu beeinflussen und so die Spezifität und Effektivität der Behandlung zu erhöhen, Nebenwirkungen und Resistenzen zu minimieren sowie die Lebensqualität der Patienten zu verbessern [7,16]. Ein zentrales Effektorprotein dieses Signalweges, welches fehlreguliert und konstitutiv aktiviert oder überexprimiert sein kann, ist die Proteinkinase Akt [17-19]. Um zu evaluieren, ob die Hemmung der Akt-Kinase mit dem spezifischen Inhibitor MK-2206 eine effiziente Therapie bei der B-ALL darstellen könnte, wurden in dieser Arbeit die Effekte von MK-2206 auf B-ALL-Zelllinien und -Primärzellen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund untersucht.

1.1.1 Die Proteinkinase Akt und ihre Rolle im PI3K/Akt-Signalweg

Im physiologischen Zustand wird der PI3K/Akt-Signalweg durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine aktiviert. Diese binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Proteingekoppelte Rezeptoren und aktivieren somit die PI3K, welche die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) katalysiert (Abbildung 1) [2]. Beispiele für Komponenten, welche die PI3K stimulieren können, sind das G-Protein Ras, die Tyrosinkinasen Fyn, Lyn und Syk sowie der

Interleukin-7 Rezeptor alpha (IL-7R α), der *Cytokine receptor like factor 2* (CRLF2), die Januskinase 1/2 (JAK1/2), der *Platelet derived growth factor receptor beta* (PDGFRB), der *Colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R, auch FMS) sowie der *Erythropoietin receptor* (EPOR) [2].

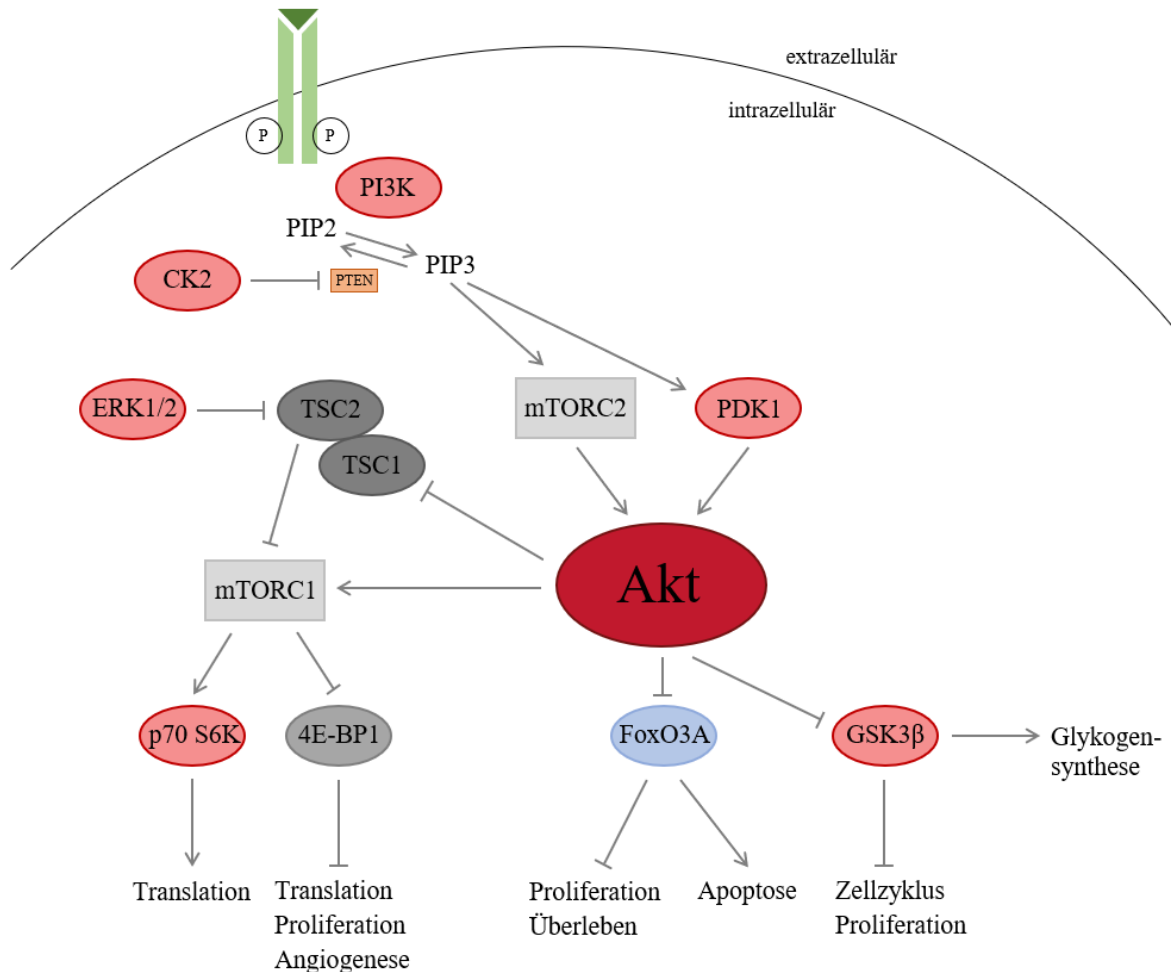


Abbildung 1: **Übersicht zur Aktivierung der Proteinkinase Akt durch PI3K-vermittelte Phosphorylierung und ihr Einfluss auf verschiedene Downstream-Substrate.**

P – phosphoryliert, PI3K – Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP2 – Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP3 – Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat, PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*, CK2 – Casein Kinase II, PDK1 – *Phosphoinositide-dependent kinase-1*, mTORC2 – *Mechanistic target of rapamycin complex 2*, Akt – Proteinkinase Akt/ Proteinkinase B, ERK1/2 – *Extracellular-signal regulated kinase1/2*, TSC1/TSC2 – Tuberöse Sklerose Protein 1/2-Komplex, mTORC1 – *Mechanistic target of rapamycin complex 1*, p70 S6K – p70 S6-Kinase, 4E-BP1 – Translations-Initiationsfaktor 4E-bindendes-Protein-1, FoxO3A – *Forkhead-Box-Protein O3A*, GSK3 β – Glykogensynthase-Kinase 3 beta

Die Serin/Threonin-Kinase Akt wird auch als Proteinkinase B bezeichnet und stellt durch Regulierung zahlreicher Downstream-Substrate ein wichtiges Effektorprotein des PI3K/Akt-Signalweges dar. Sie bindet mit ihrer Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne an PIP3 und wird

dann durch die *Phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) am Threoninrest 308 phosphoryliert [2,20]. Der *mechanistic target of rapamycin complex 2* (mTORC2) phosphoryliert Akt an Serin 473, was zur vollen enzymatischen Aktivität der Proteinkinase führt. Diese ist nun in der Lage, nachgeschaltete Substrate mit dem Sequenzmotiv RxRxxS/T-B (R – Arginin, x – beliebige Aminosäure, S – Serin, T – Threonin, B – Aminosäure mit hydrophoben Resten), welches etwa 400 Proteine aufweisen, zu phosphorylieren und somit zu aktivieren oder zu hemmen [2,20,21]. Durch direkte oder (über den Tuberosöse Sklerose Protein 1/2 (TSC1/TSC2)-Komplex) indirekte Aktivierung von mTORC1, und somit Phosphorylierung von dessen Downstream-Substraten p70 S6-Kinase (p70 S6K) und Translations-Initiationsfaktor 4E-bindendes-Protein-1 (4E-BP1), kontrolliert Akt Prozesse wie Proliferation, Überleben und Proteinsynthese der Zelle [7,22-24]. Über die Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK3 β) reguliert die Akt-Kinase u.a. den Zellzyklus [20,25]. Durch Phosphorylierung und somit Inhibition des Tumorsuppressors *Forkhead-Box O3A* (FoxO3A) hemmt Akt zudem die Apoptose [26,27]. FoxO3A gelangt im phosphorylierten Zustand vom Zellkern ins Zytoplasma und wird dort abgebaut. Dadurch akkumuliert weniger FoxO3A im Zellkern und die Transkription von Zielgenen, welche an der Apoptose beteiligt sind, beispielsweise *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) wird reduziert [28,29]. Der Tumorsuppressor PTEN bildet den wichtigsten Negativregulator des PI3K/Akt-Signalweges. Als Gegenspieler der PI3K führt er zur Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 und inhibiert somit Akt [30,31].

Der TSC1/TSC2-Komplex stellt einen Schnittpunkt zwischen dem PI3K/Akt-Signalweg und dem Ras/Raf/Mek/*Extracellular-signal regulated kinase1/2* (ERK1/2)-Signalweg dar. Neben Akt kann der TSC2-Komplex auch durch ERK1/2 phosphoryliert und mTOR somit indirekt stimuliert werden [24,32]. Die Aktivierung des Ras/Raf/Mek/ERK1/2-Signalweges erfolgt durch Mitogene oder Wachstumsfaktoren. Bei 30 % aller Tumorentitäten ist dieser Signalweg dysreguliert und führt zu einer Steigerung von zellulärem Wachstum, Proliferation und Differenzierung [33].

1.1.2 Fehlregulation des PI3K/Akt-Signalweges

Eine aberrante Aktivierung der Proteinkinase Akt findet sich bei zahlreichen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Mamma-, Ovarial-, Pankreas-, Prostata- und Gallengangs- sowie kolorektalen Karzinom und ist oftmals mit einer schlechten Prognose sowie Resistenzen gegenüber Chemo- und Radiotherapien assoziiert [34]. Auch bei hämatologischen

Erkrankungen, wie dem Mantelzelllymphom, T-Zell-Lymphom, der akuten myeloischen Leukämie, der T-ALL oder dem Diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (DLBCL), zeigte sich ein überexprimiertes Akt [17,18,35-37]. Aberrationen der Proteinkinase finden sich unterschiedlich oft – in einer Studie von Liu *et al.* beispielsweise bei 2 % der Patienten mit einem Glioblastom und bei 30 % der Betroffenen mit einem Kopf-Hals-Tumor [4], in einer Arbeit von Wang *et al.* bei 24 % mit einem DLBCL [36]. Auch bei der B-ALL konnte bereits eine aberrante Aktivierung der Akt-Kinase nachgewiesen werden. Diese steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit Tumorentstehung, Therapieresistenzen und der schlechten Prognose der Patienten [12,19]. Bisher wurde eine aktivierende Mutation der Proteinkinase beschrieben: E17K (Austausch von Glutaminsäure (E) mit Lysin (K) an Aminosäureposition 17). Dabei handelt es sich um eine Punktmutation in der PH-Domäne, wodurch Akt unabhängig von PIP3 an die Membran binden und aktiviert werden kann. Diese Mutation wurde bei einigen Patienten mit Mamma-, Ovarial-, Lungen- oder kolorektalem Karzinom sowie Melanom aufgezeigt. In Mäusen konnte durch E17K teilweise eine Leukämie induziert werden [4,38].

In leukämischen Zellen sind weitere Mutationen sowie chromosomale Translokationen nachweisbar, durch welche es zu einer Überexpression oder konstitutiven Aktivierung von Rezeptoren oder Downstream-Kinasen und somit zur Überaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges kommt. Bei der B-ALL können beispielsweise Ras und die Tyrosinkinase Fyn und Lyn an einer Hochregulierung der PI3K beteiligt sein. Ebenso spielt die Inhibition von PTEN, beispielsweise durch die Casein Kinase II (CK2), eine Rolle. Ein konstitutiv aktiver Vorläufer-B-Zell-Rezeptor, die Tyrosinkinase Syk sowie ein mutierter IL-7R α , welcher gemeinsam mit CRLF2 einen funktionellen Rezeptor bildet, können zu einem dysregulierten PI3K/Akt-Signalweg führen. Auch genetische Aberrationen von JAK1/2, PDGFRB, CSF1R (auch FMS) und EPOR resultieren möglicherweise in einer Dysregulation. Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinase KIT oder *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT-3) sind ebenfalls in der Lage, zu der aberranten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beizutragen [2,30]. Chromosomale Translokationen können in der Ausbildung verschiedener Fusionsproteine resultieren und somit auch an der Aktivierung des Signalweges beteiligt sein. Beispiele hierfür sind die BCR-ABL1-Tyrosinkinase, welche durch Translokation t(9;22) entsteht oder die Translokation t(12;21), durch welche das ETV6-RUNX1-Fusionsprotein exprimiert wird und bei ca. 25 % der Kinder mit B-Vorläufer-ALL nachweisbar ist. In einer *in vitro*-Studie von Fuka *et al.* führte die Inhibition von ETV6-RUNX1 bei der B-ALL zu einer Reduktion der Akt-Aktivität und somit zu einer Verringerung von Proliferation und Überleben der Zellen

[30,39,40]. Translokationen des Tyrosinkinase-Gens *PDGFRB* können ebenfalls zu einer Überaktivierung des Signalweges führen, so stellt beispielsweise das Fusionsprotein ETV6-PDGFRB einen konstitutiv aktiven Rezeptor dar. PDGFRB ist in der Lage, die PI3K zu aktivieren. Dadurch kommt es u.a. zur Stimulation von Zellwachstum und Inhibition der Apoptose [41].

1.1.3 Modulationen des PI3K/Akt-Signalweges

Da der PI3K/Akt-Signalweg einer der am häufigsten mutierten und aberrant aktivierten Signaltransduktionswege bei verschiedensten Tumorentitäten, inklusive den akuten Leukämien, ist, stellt dieser einen beliebten Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien dar. Eine Vielzahl von Inhibitoren, welche den Signalweg auf unterschiedlichen Ebenen hemmen, befindet sich in präklinischen und klinischen Studien. Einige wenige Substanzen, wie z.B. der PI3K-Inhibitor Idelalisib, sind bereits zugelassen [2,42].

1.1.3.1 Inhibition der Proteinkinase Akt

Die Serin/Threonin-Kinase Akt stellt einen zentralen Punkt des PI3K/Akt-Signalweges dar und ist bei einer Vielzahl von soliden und hämatologischen Tumoren, inklusive der B-ALL, häufig hochreguliert, weshalb die Proteinkinase ein vielversprechendes Ziel bei der Therapie verschiedenster Tumorentitäten darstellt [12,19,50].

In unterschiedlichen Studien wurde gezeigt, dass die Verringerung der Akt-Phosphorylierung durch Akt-Inhibitoren mit einer reduzierten Proliferation von Tumorzellen assoziiert ist [1]. In einer experimentellen Arbeit von Richter *et al.* zeigte Perifosin, ein allosterischer Akt-Inhibitor, in Kombination mit dem Casein Kinase II-Inhibitor CX-4945 anti-leukämische Effekte auf verschiedene B-ALL-Zelllinien [66]. Uprosertib (GSK2141795) und GSK690693 sind zwei Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitive pan-Akt-Inhibitoren [43,45]. Uprosertib führte in präklinischen Studien zu vielversprechenden Ergebnissen. *In vitro* und *in vivo* konnten anti-proliferative Effekte auf verschiedene Tumorentitäten, wie dem Brustdrüsen-, Ovarial- und Prostatakarzinom, nachgewiesen werden. Auch der Einfluss auf T-ALL-Zellen schien vielversprechend [43]. In klinischen Studien konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Eine Studie mit an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten wurde aufgrund nicht nachweisbarer Effektivität frühzeitig terminiert [44]. Auch der Akt-Inhibitor GSK690693 führte in präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Studien zu einer Wachstumshemmung verschiedener solider Tumorzellen [45]. Neben einer Wachstumshemmung konnte bei ALL-

Zelllinien eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden [46]. Eine klinische Studie, in welcher der Inhibitor an Patienten mit hämatologischen Malignitäten erprobt werden sollte, musste jedoch vorzeitig terminiert werden. Auch weitere klinische Arbeiten wurden aufgrund dosislimitierender Toxizität abgebrochen [2,47].

1.1.3.2 Akt-Inhibitor MK-2206

In einer Arbeit von Yan *et al.* wurden verschiedene Akt-Inhibitoren, welche sowohl die Aktivierung als auch die Kinase-Aktivität von Akt hemmen, analysiert. Es erfolgten chemische Untersuchungen der Strukturen und Aktivitäten der Inhibitoren. MK-2206 (Abbildung 2) stellte sich als eine selektive und wirksame Substanz heraus [50]. Während sich die Entwicklung selektiver Akt-Inhibitoren aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten mit verwandten Kinasen als schwierig erwies [67], zeigte MK-2206 eine hochselektive Wirkung gegen Akt sowie keine inhibitorischen Effekte auf über 250 andere Proteinkinasen [50].

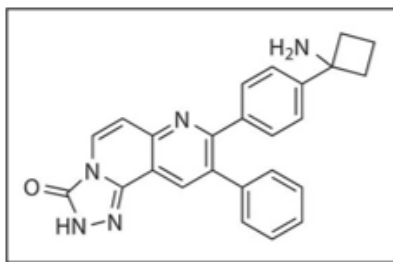


Abbildung 2: Strukturformel des Akt-Inhibitors MK-2206.

MK-2206 ist ein potenter oraler nicht-kompetitiver allosterischer pan-Akt-Inhibitor, welcher die Akt-Isoenzyme 1, 2 und 3 hemmt [18,50]. Der Inhibitor bindet an die PH-Domäne von Akt [68], wodurch die Proteinkinase nicht an die Membran rekrutiert und somit nicht an Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert/aktiviert werden kann [1,50].

In präklinischen Studien führte MK-2206 zu vielversprechenden Ergebnissen. So konnten *in vitro* anti-leukämische Effekte auf T-ALL-Zelllinien und -Primärzellen durch den Akt-Inhibitor nachgewiesen werden, während ein Einfluss auf T-Zellen gesunder Spender ausblieb [17,55-58]. Ebenso zeigten Tosello *et al.* den inhibitorischen Effekt von MK-2206 auf primäre T-ALL-Zellen. Die Kombination des Akt-Inhibitors mit einem Calcineurin-Inhibitor führte in dieser Studie zu einer erhöhten Apoptoserate sowie einer verminderten Viabilität der Zellen [59]. *In vivo*-Studien zur Behandlung von Leukämien mit MK-2206 sind noch sehr rar. Piovan *et al.* analysierten jedoch die Effekte dieses Akt-Inhibitors in Kombination mit

Dexamethason auf die glukokortikoid-resistente T-ALL-Zelllinie CCRF-CEM in einem Xenograft-Mausmodell. Sie konnten signifikante anti-leukämische Effekte nachweisen. Außerdem untersuchten Piovan *et al.* den Einfluss auf primäre glukokortikoid-resistente T-ALL-Zellen im Mausmodell. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Tumormasse nach Behandlung der Mäuse mit MK-2206 und Dexamethason. Zudem konnte eine effektive Verringerung der Akt-Phosphorylierung, ein erhöhtes Ansprechen auf Glukokortikoide sowie eine gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen werden [60].

Auch der Einfluss von MK-2206 auf CLL- und Lymphomzellen wurde bereits untersucht. So bewirkte der Inhibitor *in vitro* eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion dieser Zellen [48,69].

Der Akt-Inhibitor zeigte *in vitro* zudem zytotoxische Effekte auf verschiedenste Zelllinien solider Tumoren [49-52]. *In vivo*-Studien bestätigten den hemmenden Einfluss von MK-2206 [50,52-54]. So zeigte sich in einer Arbeit von Zhao *et al.*, in welcher eine Nasopharynxkarzinom-Zelllinie subkutan in Mäuse injiziert wurde, eine Inhibition des Tumorwachstums durch MK-2206 [52]. In einer weiteren Studie bewirkte die Substanz in einem Xenograft-Mausmodell mit Ovarialkarzinom eine kontinuierliche Akt-Inhibition sowie eine Hemmung des Tumorwachstums um 60 % [50].

MK-2206 befindet sich derzeit in klinischen Phase I/II Studien. Laut ClinicalTrials.gov existieren aktuell (Stand: September 2021) 50 klinische Studien mit dem Akt-Inhibitor MK-2206. Eine Phase I Studie (NCT01231919) untersucht die Wirkung auf Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie, befindet sich jedoch noch in der Auswertungsphase [64].

Larsen *et al.* konnten die Effektivität von MK-2206 bereits bei der Therapie von Patienten mit refraktärer CLL oder einem Rezidiv nachweisen. In dieser klinischen Phase I/II Studie erhielten die Patienten den Akt-Inhibitor in Kombination mit Bendamustin und Rituximab. Die Patienten wiesen eine Ansprechrates von 92 % auf. Allgemein zeigte diese Kombinationstherapie eine sehr gute Effektivität und Verträglichkeit [65]. In manchen klinischen Arbeiten hingegen zeigte die Monoapplikation von MK-2206 nur eine limitierte anti-tumorale Wirkung auf hämatologische Erkrankungen, sodass in Zukunft Studien zur Kombinationstherapie mit dem Akt-Inhibitor als sinnvoll erachtet werden könnten [70,71].

Die meisten klinischen Arbeiten befassen sich bisher mit der Therapie von Patienten mit soliden Tumoren [61-64]. Erste Ergebnisse zeigten eine anti-tumorale Wirksamkeit mit komplettem oder partiellem Ansprechen auf den Inhibitor allein oder in Kombinationstherapie: In zwei Studien von Yap *et al.* erhielten Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren den Akt-Inhibitor p.o.. MK-2206 zeigte eine gute

Verträglichkeit sowie eine signifikante Akt-Blockade in den Tumorbiopsien [61,63]. In einer Phase Ib Studie von Gonzalez-Angulo *et al.* wurde MK-2206, in Kombination mit Paclitaxel, von Patienten mit soliden Tumoren ebenfalls gut vertragen. Zudem wies der Akt-Inhibitor eine anti-tumorale Wirkung auf [62].

Insgesamt sind die Untersuchungen zur Anwendung von MK-2206 bei Leukämien, besonders der B-ALL, jedoch noch sehr rar [5,13,18,48,49].

1.1.3.3 Weitere Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges

Neben der Proteinkinase Akt können weitere Komponenten des PI3K/Akt-Signalweges inhibiert werden. So zeigten verschiedene PI3K- und mTOR-Inhibitoren ebenfalls zytotoxische Effekte auf B-ALL-Zellen [2]. Toosi *et al.* untersuchten den dualen PI3K/mTOR-Inhibitor VS-5584. Sie wiesen nach, dass dieser bei B-Vorläufer-ALL-Zellen eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion erzielt [72]. Die CK2, welche über die Hemmung von PTEN zu einer Hochregulierung von Akt führt, wurde in Studien von Richter *et al.* mittels CX-4945 inhibiert. Die Kombination von CX-4945 mit unterschiedlichen Substanzen, wie beispielsweise Decitabin, führte zu signifikanten anti-leukämischen Effekten auf verschiedene B-ALL-Zelllinien [66,73]. Der duale PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 wurde in einer Arbeit von Schult *et al.* allein und in Kombination mit Cytarabin, Doxorubicin oder Dexamethason analysiert. Es konnten auch hier zytotoxische Effekte auf B- und T-ALL-Zellen gezeigt werden [74].

1.2 Therapiekonzepte bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)

Während sich das Therapieergebnis von an ALL erkrankten Kindern deutlich verbessert hat, ist die Prognose für ältere Patienten noch immer sehr schlecht [75]. Kinder weisen unter Therapie ein Gesamtüberleben von > 80 % auf, ältere Erwachsene lediglich 30-40 % [76], weshalb insbesondere die Behandlung erwachsener Patienten eine Herausforderung darstellt. Doch auch die Prognose von Kindern, welche auf die Chemotherapie nicht ansprechen oder ein Rezidiv erleiden, ist weiterhin schlecht [77]. Insgesamt haben noch immer 15-20 % der Kinder und 60 % der Erwachsenen mit B-ALL eine schlechte Prognose [2]. Deshalb ist es wichtig, an neuartigen Therapiekonzepten zu forschen.

1.2.1 Pathogenese der B-ALL

Bei der B-ALL handelt es sich um eine maligne klonale Neoplasie hämatopoetischer Zellen. Es kommt zur Transformation und unkontrollierten Proliferation lymphatischer Vorläuferzellen der B-Zellreihe. Die maligne entarteten, unreifen Zellen (Blasten) akkumulieren im Knochenmark und breiten sich anschließend im Blut aus [78]. Somit kann es auch zum Befall anderer lymphatischer (z.B. Lymphknoten, Milz) und nicht-lymphatischer Organe (z.B. Leber, Knochen, Haut, Hoden, Zentralnervensystem (ZNS)) kommen [79]. Die Symptome entwickeln sich meist innerhalb weniger Wochen [80]. Durch die leukämischen Blasten kommt es zur Verdrängung der physiologischen Hämatopoese, was klinisch zu einer Panzytopenie führen kann. Auch eine B-Symptomatik ist möglich. Die Diagnosesicherung erfolgt mittels Knochenmarkzytologie und -histologie [81,82].

Die Gesamtinzidenz der ALL beträgt in Deutschland 1/100.000/Jahr [81]. Es finden sich zwei Häufigkeitsgipfel: im Kindesalter (< 5 Jahre) sowie im hohen Erwachsenenalter (> 80 Jahre) [79]. Das Verhältnis von B-ALL zu T-ALL beträgt insgesamt ca. 3:1 [80].

Durch die maligne Entartung lymphatischer Vorläuferzellen der B-Zellreihe kommt es zu einem Differenzierungsblock auf einer bestimmten Ebene der Zellreifung (siehe Abbildung 3). Anhand des Differenzierungsgrades und somit dem Immunphänotyp kann die B-ALL in Anlehnung an die GMALL (*German-Multicenter-ALL*)-Studien in verschiedene Subtypen eingeteilt werden: pro-B-ALL, common-B-ALL, prä-B-ALL und reifzellige B-ALL (siehe Tabelle 1) [79,81].

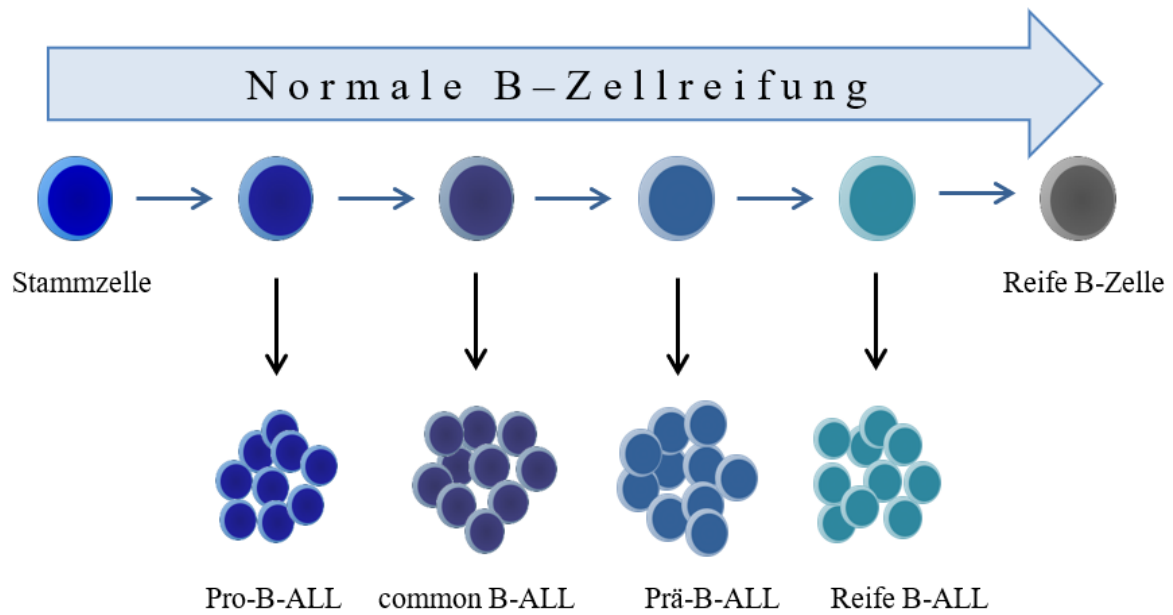


Abbildung 3: Entstehung der B-ALL-Subgruppen aus lymphatischen Vorläuferzellen verschiedener Reifungsebenen.

Tabelle 1: Immunologische Subklassifikation der ALL in den GMALL-Studien, Auszug [79]

Subgruppe	Immunphänotypisierung (charakteristische Marker)
B-Vorläufer-ALL	
• Pro-B-ALL	CD10-
• common B-ALL	CD10+
• Prä-B-ALL	cyIgM+
Reife B-ALL	sIg+

cy – intrazytoplasmatisch, s – surface

Mutationen und chromosomale Translokationen in den lymphatischen Vorläuferzellen sind maßgeblich an der Entstehung der ALL beteiligt [83]. Bei 40 % der Patienten mit B-Vorläufer-ALL können Aberrationen in Genen, welche wesentliche Regulatoren der B-Zellentwicklung und -differenzierung darstellen, beobachtet werden. Zu diesen Genen gehören beispielsweise *Paired box 5 (PAX5)*, *Transcription factor 3 (TCF3)* und *IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1)* [84]. Mit den immunologischen Subtypen der B-ALL sind weitere spezifische zytogenetische bzw. molekulargenetische Veränderungen, die auch

prognostische Relevanz aufweisen, assoziiert [79,83]. Zu diesen gehört beispielsweise die Translokation t(12;21), welche ebenfalls an der Tumorentstehung beteiligt sein kann, jedoch als prognostisch günstig gilt. Sie führt zum ETV6-RUNX1-Fusionsprotein und stellt die häufigste Translokation bei Kindern mit B-Vorläufer-ALL dar [85,86]. Auch das Philadelphia-Chromosom (t(9;22)) kann durch Expression der dauerhaft aktivierten BCR-ABL1-Tyrosinkinase an der Pathogenese der ALL beteiligt sein [39]. Diese Translokation findet sich v.a. bei der common- und prä-B-ALL und tritt eher bei Erwachsenen auf [79]. Translokationen des Lysin Methyltransferase 2A (*KMT2A*)-Gens (ehemals *Mixed lineage leukemia (MLL)*-Gen) zählen zu den meisten genetischen Aberrationen bei der B-Vorläufer-ALL [87] und treten besonders oft bei der pro-B-ALL auf [88]. Es sind bereits über 80 Partnergene bekannt, mit denen das *KMT2A*-Gen fusionieren kann [89]. Darunter ist KMT2A-AF4, welches durch die Translokation t(4;11) entsteht, das häufigste Fusionsprotein. Die KMT2A-AF4-positive ALL gilt als Hochrisiko-Leukämie und ist mit einem schlechten klinischen Behandlungsergebnis assoziiert [83,90,91]. Rearrangements des *KMT2A*-Gens finden sich bei bis zu 80 % der Kleinkinder mit ALL (< 1 Jahr), aber auch bei älteren Kindern und Erwachsenen [83,92]. Fusionen mit dem Tyrosinkinase-Gen *PDGFRB* können ebenfalls bei der B-ALL beobachtet werden, wobei der häufigste Fusionspartner der Transkriptionsfaktor ETV6 (t(5;12)) ist [93,94]. Neben den genetischen können jedoch auch epigenetische Einflüsse an der Leukämie-Entwicklung beteiligt sein [95,96]. Häufig führen diese Veränderungen zur Dysregulation von Signalwegen, welche an der Regulation von Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind, wie beispielsweise der PI3K/Akt-Signalweg [83]. Die zielgerichtete Inhibition dieses Signalweges stellt deshalb einen sinnvollen Therapieansatz dar.

1.2.2 Aktuelle Therapiekonzepte

Laut aktueller Onkopedia-Leitlinie (Stand: Juli 2020) gliedert sich die Therapie der ALL typischerweise in eine Induktionstherapie mit dem Ziel einer kompletten Remission sowie eine Postremissionstherapie, welche sich wiederum aus einer Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie zusammensetzt [79]. Die Standardtherapie basiert auf einer intensiven Kombinations-Chemotherapie. Zu den eingesetzten Medikamenten gehören Dexamethason, Cyclophosphamid, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Cytarabin, 6-Mercaptopurin sowie Methotrexat. Parallel erfolgt zudem eine ZNS-Prophylaxe, beispielsweise mit Methotrexat und gegebenenfalls einer Schädelbestrahlung. Eine allogene

Stammzelltransplantation ist eine zusätzliche Therapieoption für ausgewählte Patientengruppen, beispielsweise für Hochrisikopatienten [76,79,81,97].

1.2.3 Neuartige Therapiekonzepte

Um das Überleben der Patienten weiter zu verbessern und die oftmals mit der aktuellen Therapie einhergehenden schweren Nebenwirkungen zu reduzieren, wird an weiteren neuartigen Therapiekonzepten zur Behandlung der B-ALL geforscht [15,98]. Immuntherapien, beispielsweise mit Blinatumomab, einem monoklonalen Antikörper gegen das B-Lymphozytenantigen CD19, werden bei der Krebstherapie immer erfolgreicher. Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch erst auf eine Minderheit der Patienten und Histologien [98]. Beispiele für weitere neuartige Therapien bei der B-ALL sind der monoklonale Antikörper Inotuzumab, welcher gegen das B-Lymphozytenantigen CD22 gerichtet ist oder auch Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Ponatinib, Dasatinib oder Nilotinib, die die BCR-ABL1-Tyrosinkinase bei der Philadelphia-positiven-ALL hemmen. Auch die *Chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zell-Therapie stellt ein neues Behandlungskonzept dar [98,99]. Hierbei werden T-Lymphozyten des Patienten gentechnisch so verändert, dass diese einen CAR auf ihrer Oberfläche bilden, welcher beispielsweise gegen das CD19 oder den *B-cell activating factor receptor* (BAFF-R) der B-Lymphozyten gerichtet ist. Nachdem die CAR-T-Zellen dem Patienten zurück infundiert wurden, führen diese idealerweise zu einer Immunreaktion gegen die maligne entarteten B-Zellen des Patienten. Diese Therapieoption ist jedoch mit teils schwersten Nebenwirkungen assoziiert, weshalb eine regelmäßige Nachbeobachtung der Patienten erforderlich ist [100-102]. Einen weiteren Therapieansatz stellt die zielgerichtete Inhibition einzelner, an der Dysregulation von Signalwegen beteiligter, Proteine dar. Beispielsweise könnten Spezifität und Effektivität der Therapie durch die zielgerichtete Hemmung einer aberrant aktivierten oder überexprimierten Akt-Kinase erhöht werden.

2 Zielstellung

Besonders erwachsene Patienten mit B-ALL haben unter den aktuell vorhandenen Therapien noch immer eine schlechte Prognose. Die Erkrankten weisen oftmals Resistenzen gegenüber den bisher eingesetzten klassischen Chemotherapeutika auf und leiden unter zahlreichen Nebenwirkungen. Es ist dringend notwendig, nach neuartigen Therapiemöglichkeiten zu forschen, um das Behandlungsergebnis der Patienten zu verbessern, um Nebenwirkungen und Resistenzen zu minimieren und um den Patienten letztendlich ein längeres Leben mit verbesserter Lebensqualität zu ermöglichen.

An B-ALL erkrankte Patienten weisen häufig einen dysregulierten PI3K/Akt-Signalweg mit aberrant aktivierter oder überexprimierter Akt-Kinase auf, was mit Therapieresistenzen und einer schlechten Prognose assoziiert zu sein scheint. Akt reguliert eine Vielzahl von Substraten des PI3K/Akt-Signalweges und nimmt dabei als zentrales Effektorprotein eine entscheidende Rolle bei der Stimulation des Zellwachstums und Verhinderung der Apoptose ein. Die zielgerichtete Inhibition der Akt-Kinase könnte deshalb einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei der B-ALL darstellen.

Vorangegangene *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur präklinischen Anwendung des Akt-Inhibitors MK-2206 bei soliden Tumoren und T-ALL-Zellen zeigten vielversprechende Ergebnisse, während zur Anwendung bei der B-ALL bisher nur sehr wenig bekannt ist. In der hier vorliegenden Arbeit soll deshalb der Einfluss der Akt-Inhibition mittels MK-2206 auf B-ALL-Zelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund sowie auf Primärzellen von an B-ALL erkrankten Patienten auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden.

Folgende Ziele wurden definiert:

- Analyse des Einflusses von MK-2206 auf die Vitalität und Morphologie von B-ALL-Zelllinien
- Analyse des Einflusses von MK-2206 auf die Expression und Aktivität von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges und der Caspase-3 in B-ALL-Zelllinien
- Analyse des Einflusses von MK-2206 auf die Viabilität und Apoptose von B-ALL-Primärzellen in einer protektiven Kokultur-Umgebung
- Probenvorbereitung für nachfolgende Proteom- und Phosphoproteom-Analyse von mit MK-2206 inkubierten B-ALL-Zelllinien

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Chemikalien, Zelllinien, Primärzellen, Antikörper und Puffer sind im Abschnitt 8.1 im Anhang aufgelistet.

3.2 Methoden

3.2.1 Analyse von B-ALL-Zelllinien

3.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

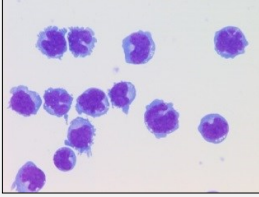
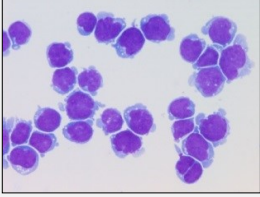

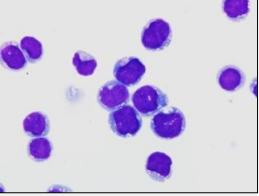
Bei den in dieser Arbeit verwendeten humanen B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH handelt es sich um Suspensionszellen. Sie wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Die Zellkulturarbeiten wurden nach den Vorgaben der DSMZ durchgeführt und erfolgten stets steril unter der Laminarflow-Werkbank.

Charakteristik der verwendeten Zelllinien

In Tabelle 2 sind Informationen über Morphologie, molekularbiologische Eigenschaften und Verdopplungszeiten der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Die vier B-ALL-Zelllinien tragen verschiedene der in Abschnitt 1.1.2 erwähnten Mutationen und Translokationen. Die Zelllinie SEM weist beispielsweise eine *KIT*-Mutation auf, während die NALM-6-Zellen *NRAS*- und *KIT*-mutiert sind sowie das Fusionsprotein ETV6-PDGFRB exprimieren. Die Zelllinie REH ist Träger der Translokation t(12;21). SEM und RS4;11 tragen außerdem ein rearrangiertes *KMT2A*-Gen.

Tabelle 2: Charakteristik der Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH

Zelllinie	SEM	RS4;11	NALM-6	REH
Zelltyp	humane pro-B-ALL	humane pro-B-ALL	humane prä-B-ALL	humane common-B-ALL
Morphologie				
Herkunft	PB eines Mädchens (5 J.) mit ALL bei einem Rezidiv, 1990	KM einer Frau (32 J.) mit ALL bei einem Rezidiv	PB eines Mannes (19 J.) mit ALL bei einem Rezidiv, 1976	PB eines Mädchens (15 J.) mit ALL bei einem Rezidiv, 1973
pAkt-Expression	+++	+++	++	+
Zyto-genetik	Hypodiploid komplex aberrant t(4;11)(q21;q23) KMT2A-AF4	Hyperdiploid komplex aberrant t(4;11)(q21;q23) KMT2A-AF4	Diploid t(5;12)(q33;p13) ETV6-PDGFRB	Pseudodiploid komplex aberrant t(12;21) ETV6-RUNX1
Verdopp-lungszeit	ca. 30 h	ca. 50 h	ca. 36 h	ca. 50 – 70 h

Grafiken adaptiert aus www.dsmz.de.

PB – Peripheres Blut, J. – Jahre, ALL – Akute lymphatische Leukämie, KM – Knochenmark

Die Kultivierung der vier Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in T75-Flaschen mit den entsprechenden Medien, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin. Für SEM wurde das Iscove Basal-Medium, für RS4;11 das Alpha-Medium (mit Ribo- und Desoxyribonukleosiden), für NALM-6 und REH das RPMI 1640-Medium verwendet. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage. Hierfür wurde die Zellsuspension aus den T75-Flaschen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert: SEM, RS4;11 und NALM-6 für 10 min, REH für 8 min, bei 8 °C und 200 x g. Anschließend wurde der Überstand ab- und die Zellen in 4 – 6 ml frischem Medium aufgenommen. Für die darauffolgende Zellzählung wurden von dieser Zellsuspension 10 µl in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Von den Zelllinien SEM, RS4;11 und NALM-6 wurden jeweils 9 x 10⁶ Zellen in eine T75-Flasche in 20 ml frischem Medium eingesät. Von REH waren es stets 10 x 10⁶ Zellen.

Die Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination und Authentizität getestet sowie bis maximal Passage 40 verwendet.

Zellzahlbestimmung

Es werden nur die lebenden Zellen gezählt. Hierfür wird die Zellsuspension mit Trypanblau vermischt. Dieser Farbstoff diffundiert durch die perforierte Zellmembran der toten Zellen, kann die vitalen Zellen jedoch nicht (oder nur kaum) durchdringen [103]. Die lebenden Zellen bleiben somit ungefärbt und erscheinen unter dem Lichtmikroskop hell, wohingegen sich die toten Zellen blau darstellen.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte m.H. einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension (s. o.) mit Trypanblau verdünnt (bei 90 µl Trypanblau ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 10). Von dieser Lösung wurden 10 µl unter das Deckgläschen auf der Zählkammer pipettiert und im Anschluss die vitalen Zellen in allen vier Eckquadraten gezählt. Die Gesamtzellzahl berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Anzahl der Zellen in allen vier Eckquadraten}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension in ml}$$

3.2.1.2 Inkubation der Zelllinien mit MK-2206

Die vier B-Vorläufer-ALL-Zelllinien wurden stets in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 3 ml ihres Kompletmediums ausgesät. Für die Zellzahlbestimmungen und Analysen der Zellmorphologie waren dies 5×10^5 Zellen in 1,5 ml Medium pro Well einer 24-Well-Platte. Um Bestimmungen der metabolischen Aktivität mittels WST-1-Assay durchzuführen, erfolgte die Aussaat von 5×10^4 Zellen in 150 µl Medium pro Well einer 96-Well-Platte. Die Well-Platte wurde in drei technischen Replikaten belegt. Für die Herstellung von Proteinlysaten, um nachfolgend Western Blots durchzuführen, erfolgte die Aussaat von je 5×10^6 Zellen in 15 ml Medium in T25-Flaschen.

Die Zellen wurden für 0,5 h – 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 µM – 10 µM) des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Kontrolle diente die Zugabe von DMSO zum Medium in separaten Wells bzw. T25-Flaschen. Die hinzugegebene Menge an DMSO entsprach bei den Versuchen jeweils der Menge, die notwendig war, um die höchste Konzentration von MK-2206 zu erreichen. Die Experimente zur Zellzahlbestimmung und Messung der metabolischen Aktivität erfolgten in mind. drei unabhängigen biologischen Replikaten.

3.2.1.3 Analyse der Proliferation

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation aus den Wells der 24-Well-Platte in *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Röhrchen überführt und daraufhin jedes Well mit 1,6 ml *Phosphate-buffered saline* (PBS) gespült. Anschließend wurden die Zellen für 8 min bei 20 °C und 200 x g zentrifugiert, danach der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 400 µl – 500 µl PBS aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden dann 10 µl in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, mit Trypanblau verdünnt und im Anschluss m.H. einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.1.4 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels WST-1-Assay

Der WST-1-Assay dient zur Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen. Bei einer intakten Atmungskette der Zellen wird das *Water soluble tetrazolium* (WST-1), ein schwach rot gefärbtes Tetrazoliumsalz, enzymatisch durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System in das dunkelrote Formazan umgesetzt. Dieser Farbumschlag ist ein Maß für den Anteil metabolisch aktiver Mitochondrien, korreliert mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen und kann m.H. eines Spektralphotometers gemessen werden [104-106].

Nach 48 h bzw. 72 h Inkubation der B-ALL-Zellen mit MK-2206 (siehe Abschnitt 3.2.1.2) wurden zu jedem Ansatz in der 96-Well-Platte 15 µl WST-1-Reagenz pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h im Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Absorptionsmessung am Photometer (GloMax[®]-*Multi Detection System*) bei einer Wellenlänge von 420 nm und einer Referenzwellenlänge von 750 nm. Als Blindwert diente ein Dreifachansatz aus reinem Medium mit WST-1, dessen Mittelwert dann vom Mittelwert der Absorptionswerte der zu untersuchenden Proben (je Probe drei technische Replikate) abgezogen wurde.

3.2.1.5 Analyse der Zellmorphologie

Die Inkubation von SEM, RS4;11, NALM-6 und REH erfolgte über 72 h mit MK-2206 (siehe Abschnitt 3.2.1.2). Nach dem Ernten der Zellen aus der 24-Well-Platte erfolgte eine Zellzahlbestimmung (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

Anfertigung von Zytospins

Von den pro Ansatz in 400 µl – 500 µl PBS aufgenommenen Zellen wurden je 2×10^5 in ein neues FACS-Röhrchen überführt und mit PBS auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurden m.H. einer Zytospin-Zentrifuge je Ansatz dreimal 200 µl Zellsuspension (entspricht dreimal 5×10^4 Zellen) auf die Objektträger übertragen. Die Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 100 x g. Im Anschluss wurden die Objektträger luftgetrocknet und bis zur Anfärbung lichtgeschützt aufbewahrt.

Pappenheim-Färbung

Zur Beurteilung der Zellmorphologie erfolgte die Färbung der Zellen nach Pappenheim, bei der die May-Grünwald Eosin-Methylenblaulösung sowie die Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung verwendet wurden. Das Methylenblau färbt saure Zellbestandteile, wie z.B. Desoxyribonukleinsäure (DNA), blau. Basische Zellkomponenten, wie z.B. basische Proteine, werden vom Eosin rot-orange und vom Azur rot-violett gefärbt. Das Zytoplasma erscheint nach der Färbung grau-bläulich und die Zellkerne rot-violett.

Es erfolgte die Inkubation der Objektträger für 6 min in der May-Grünwald-Lösung, sowie nach dreimaligem Spülen in einer Pufferlösung (pH 7,2), eine 20-minütige Inkubation in der Giemsa-Lösung, welche zuvor 1:10 mit der Pufferlösung verdünnt wurde. Die Präparate wurden abschließend nochmals wie zuvor beschrieben sowie zusätzlich einmal mit *Aqua destillata* (*dest.*) gespült und dann luftgetrocknet. Die Analyse der Zellmorphologie erfolgte am Lichtmikroskop (EVOS™ XL Core Cell Imaging System) bei 100x Vergrößerung.

3.2.1.6 Proteinlysatherstellung und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels

Bradford-Assay

Der Bradford-Assay beruht auf der Komplexbildung des Coomassie-Brillant-Blau G-250 Farbstoffes (enthalten im Bradford-Reagenz) mit Proteinen. Der negativ geladene Farbstoff bindet an Argininyll- und Lysinylreste, welche positiv geladen sind. Durch die Proteinbindung schlägt der Farbstoff von rotbraun nach blau um und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 470 nm auf 595 nm [107]. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration jeder Probe durch Vergleich mit einer Standardkurve berechnet werden.

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen verschieden lang (0,5 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h) mit MK-2206 inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.1.2), anschließend aus den

T25-Flaschen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 20 °C und 200 x g zentrifugiert. Nach dem Dekantieren folgte ein Waschschriff mit 10 ml kaltem PBS, ebenfalls für 10 min, 20 °C und 200 x g. Nach erneutem Dekantieren wurde das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 3,5 min bei 4 °C und 1.400 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet je nach Größe in 60 µl – 80 µl *Radioimmunoprecipitation* (RIPA)-Puffer gelöst. Zuvor erfolgte die Hinzugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zu diesem Lysepuffer, um Abbau bzw. Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Anschließend wurden die Lysate bei -20 °C eingefroren.

Zur Weiterverarbeitung erfolgte das Auftauen der Proben auf Eis und das je zweimalige Lysieren für ca. 8 sek mittels Ultraschall. Anschließend wurden die Proteinlysate durch Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 12.000 x g von den Zelltrümmern abgetrennt und danach in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Vom Proteinüberstand fanden jeweils 8 µl Verwendung, um den Proteingehalt m.H. des Bradford-Assays zu bestimmen [108]. Dafür wurden von jeder Probe drei Verdünnungen (1:100, 1:400 und 1:600) mit *Aqua dest.* mit einem Gesamtvolumen von 800 µl (bzw. 800 µl Standard) hergestellt und anschließend mit je 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Danach wurden aus jedem Ansatz je dreimal 200 µl Bradford-Proteinlösung in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden pipettiert und für 5 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung am Photometer (GloMax[®]-*Multi Detection System*) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich mit einer Standardkurve. Diese wurde m.H. von Proteinstandards, hergestellt aus einer *Bovine serum albumine* (BSA)-Stammlösung mit bekannter Konzentration, erstellt. Am Ende wurde das restliche Proteinlysate mit dem gleichen Volumen von 2x Probenpuffer und 5 % β-Mercaptoethanol vermischt und für 10 min bei 96 °C denaturiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte das Einfrieren der Proteine bei -20 °C.

3.2.1.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung verschiedener Proteine in einer Probe. Hierfür werden die Proteine zunächst in einem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Gel wird dann auf eine Membran geblottet. Diese wird anschließend mit Primär-Antikörpern, welche spezifisch gegen das entsprechende Zielprotein gerichtet sind, inkubiert.

Am Ende erfolgt die Detektion der Proteine über spezifische fluoreszenz-gekoppelte Sekundär-Antikörper.

Die Arbeiten bis zum Ende der SDS-PAGE erfolgten unter dem Abzug. Zuerst wurden die am Ende des Bradford-Assays (siehe Abschnitt 3.2.1.6) eingefrorenen, denaturierten Proteine auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte das Pipettieren von 40 µg Proteinlysate pro Probe pro Gel in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Alle Proben wurden dann mit 1x Probenpuffer auf das gleiche Volumen eingestellt. Daraufhin erfolgte das Einsetzen der Midi-Fertiggele in eine mit 1x Elektrophoresepuffer befüllte Elektrophoresekammer. In die erste und letzte Tasche jedes Gels wurde ein Proteinstandard pipettiert. Es folgte das Beladen jeder Geltasche mit 40 µg Proteinlysate sowie leerer Taschen mit 1x Probenpuffer. Nach dem Verschließen der Kammer startete die Elektrophorese für initial ca. 15 min bei 120 V, bis die Proteine das Sammelgel passiert hatten. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel für zunächst 30 min bei 160 V, dann 10 min bei 180 V und am Ende für ca. 10 min bei nochmals 120 V.

Nach vollendeter Elektrophorese wurde das Gel mit den Proteinen unter Verwendung des Bio-Rad Transfer-Kits auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System erfolgte das Blotting der Proteine für 10 min bei 2,5 A und 25 V auf die Membran, welche anschließend 5 min mit Ponceau S-Lösung angefärbt wurde. Dieser rote Azofarbstoff dient dem Nachweis des Proteinauftrags auf die Membran, indem er reversibel an positiv-geladene Aminogruppen bindet. Durch die nun sichtbaren Proteinbanden wird nach der Spülung mit *Aqua dest.* außerdem ein Schneiden der Membran möglich. Anschließend wurde jedes Membranstück in einer separaten Schale durch dreimaliges Waschen für je 5 min in Anode II-Puffer entfärbt und im Anschluss dreimal für je 5 min in 1x *Phosphate-buffered saline with Tween*® (PBST) gewaschen. Danach erfolgte das Blocken der Membranen in 1:3 Odyssey® *Blocking Buffer*/1x PBST auf dem Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der *Blocking Buffer* wurde dekantiert und die verdünnten Primär-Antikörper (Tabelle 3) auf die jeweiligen Membranen gegeben. Zuerst fanden stets die primären Antikörper, welche die Phospho (p)-Formen der Proteine binden, Verwendung. Die Inkubation erfolgte schüttelnd für 1,5 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Tabelle 3: Für den Western Blot verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Klon	Größe [kDa]	Wirt	Verdünnung
p-Akt (Ser473)	polyklonal	60	Kaninchen	1:500
Akt	polyklonal	60	Kaninchen	1:500
p-GSK3 β (Ser9)	D2Y9Y	46	Maus	1:500
GSK3 β	3D10	46	Maus	1:500
p-p70 S6K (Thr389)	108D2	70	Kaninchen	1:1.000
p70 S6K	49D7	70	Kaninchen	1:1.000
p-4E-BP1 (Ser65)	174A9	15-20	Kaninchen	1:1.000
4E-BP1	polyklonal	15-20	Kaninchen	1:1.000
p-FoxO3A (Ser253)	polyklonal	90	Kaninchen	1:500; 1:1.000
FoxO3A	75D8	90	Kaninchen	1:500
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	D175	17, 19	Kaninchen	1:500; 1:1.000
Caspase-3	polyklonal	17, 19, 35	Kaninchen	1:500
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	polyklonal	42, 44	Kaninchen	1:500
ERK1/2	137F5	42, 44	Kaninchen	1:500
GAPDH	ZG003	33-37	Maus	1:20.000

Nach der Primär-Antikörper-Inkubation wurden die Membranen viermal für jeweils 4 min in 1x PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern (Tabelle 4) für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Tabelle 4: Für den Western Blot verwendete Sekundär-Antikörper

Antikörper	Klon	Wirt	Verdünnung
Anti-Maus (IRDye [®] 680/800)	polyklonal	Ziege	1:5.000
Anti-Kaninchen (IRDye [®] 680/800)	polyklonal	Ziege	1:5.000

Nach der Inkubation der Membranen mit den entsprechenden sekundären Antikörpern wurden die Membranen viermalig für je 4 min in 1x PBST und anschließend noch einmal für 4 min in PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteine mit dem Odyssey® *CLx Imaging System*.

Um nun die Gesamtformen der Proteine nachzuweisen, wurden die Membranen erneut viermal für je 4 min in 1x PBST gewaschen und mit den entsprechenden Primär-Antikörpern, welche sich nun gegen die Gesamtformen der Proteine richteten (Tabelle 3), inkubiert. Die Inkubation sowie das weitere Vorgehen bis zur Detektion erfolgten wie oben bereits beschrieben.

Zum Nachweis neuer Proteine auf denselben Membranen erfolgte ein erneuter Waschschrift für 5 min in 1x PBST. Danach wurden die Membranen 45 min lang in einem Stripping-Puffer inkubiert – zunächst für 30 min bei 56 °C und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss wurden die Membranen viermal für jeweils 4 min in 1x PBST gewaschen und in 1:3 Odyssey® *Blocking Buffer*/1x PBST auf dem Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Nun konnten die Membranen mit einem weiteren Primär-Antikörper inkubiert und somit noch andere Proteine detektiert werden.

Die Verdünnung jedes Antikörpers erfolgte in 10 ml 1:5 Odyssey® *Blocking Buffer*/1x PBST. Die Primär-Antikörper wurden bei -20 °C gelagert und konnten durch Zugabe von je 10 µl 10 %-igem Natriumazid konserviert und somit wiederverwendet werden. Die Sekundär-Antikörper hingegen fanden nur einmalig Verwendung. Als endogene Kontrolle diente das Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Auswertung der detektierten Proteine erfolgte m.H. der Image Studio™ Lite 5.2 Software.

3.2.2 Analyse von B-ALL-Primärzellen in Kokultur

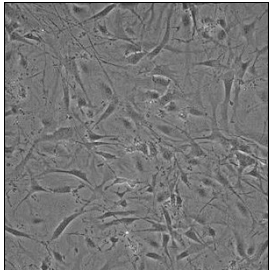
3.2.2.1 Kultivierung der Primärzellen in Kokultur auf Feederlayer-Zellen (OP-9)

In dieser Arbeit wurden Primärzellen zweier an B-ALL erkrankter erwachsener Patienten in direktem Zell-Zell-Kontakt auf einem Feederlayer, den OP-9-Zellen (Stromazellen aus murinem Knochenmark), kultiviert. Die Zelllinie OP-9 wurde von der *American Type Culture Collection* (ATCC) erworben. Die Zellkulturarbeiten erfolgten stets steril unter der Laminarflow-Werkbank, die Kultivierung der OP-9-Zellen nach den Vorgaben der ATCC. Die Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination und Authentizität getestet.

Charakteristik der Zelllinie OP-9

In Tabelle 5 sind Informationen zur Zelllinie OP-9, welche als Feederlayer für die Primärzellen verwendet wurde, aufgeführt.

Tabelle 5: Charakteristik der Zelllinie OP-9

Organismus	<i>Mus musculus</i> , Maus
Stamm	(C57BL/6 x C3H)F2 -op/op
Gewebe	Knochenmark/Stroma
Zelltyp	Embryonale Stammzellen
Morphologie	Fibroblasten-ähnlich 
Eigenschaften in Kultur	Adhärent
Verdopplungszeit	26 h

Grafik adaptiert aus www.lgcstandards-atcc.org.

Kultivierung der OP-9-Zellen

Die OP-9-Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in T75-Flaschen mit Alpha-Medium (ohne Ribo- und Desoxyribonukleoside), versetzt mit 20 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die Zellen wurden ein- bis zweimal pro Woche m.H. von Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vom Flaschenboden gelöst und ggf. gesplittet. Hierfür wurde das Medium aus der T75-Flasche abgesaugt und 7 ml – 8 ml PBS zu den Zellen hinzupipettiert. Durch Schwenken der Flasche erfolgte das Spülen des Zellrasens. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Zugabe von 0,8 ml – 1 ml warmem Trypsin-EDTA. Nach 6 min – 8 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das vollständige Ablösen der Zellen unter dem Lichtmikroskop (EVOS™ XL Core Cell Imaging System) bei 40x Vergrößerung kontrolliert. Danach erfolgte die Aufnahme der Zellen in 7 ml – 10 ml frischem Medium (das FKS stoppt die Reaktion des Trypsins), das Überführen der Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen sowie das Zentrifugieren für 8 min bei

20 °C und 125 x g. Der Überstand wurde ab- und die Zellen in 1 ml – 2 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte wie im Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben. Anschließend wurden $4,5 \times 10^5$ OP-9-Zellen in eine T75-Flasche in 20 ml frischem Medium eingesät.

Charakteristik der Patientenzellen

In Tabelle 6 sind Informationen zu den B-ALL-Primärzellen aufgeführt.

Tabelle 6: Informationen zu den Patienten, deren B-ALL-Zellen in Kokultur kultiviert wurden

Patienten-ID	Alter	Geschlecht	Diagnose	KMT2A-Status	pAkt-Expression
0159	74 Jahre	Weiblich	Initial	+	+++
0122	47 Jahre	Männlich	Initial	+	++

Die untersuchten Primärzellen von Patient 0159 weisen u.a. eine *PIK3CA*- und *NRAS*-Mutation auf, während Patient 0122 u.a. ein mutiertes *KRAS* sowie *FLT-3* trägt. Beide Patienten sind außerdem Träger eines rearrangierten *KMT2A*-Gens (t(4;11)) und exprimieren basal eine moderat (0122) bis stark (0159) phosphorylierte Akt-Kinase (pAkt) [73].

Gewinnung der Patientenzellen

Die primären B-ALL-Zellen wurden zuvor m.H. des von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Junghanß etablierten Patienten-abgeleiteten Xenograft (PDX)-Mausmodells amplifiziert. Hierfür erfolgte die Isolierung der humanen B-ALL-Zellen aus dem Knochenmark der Patienten und anschließend die Injektion in die Schwanzvene immuninkompetenter Mäuse (*NOD scid gamma* (NSG)-Mäuse (NOD.Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ, NSG, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland)), woraufhin es zu einer Amplifikation der Zellen kam. Die Mäuse wurden euthanasiert, sobald der Blasten-Anteil in deren Blutzirkulation > 30 % betrug. Daraufhin wurden die amplifizierten Tumor-Zellen aus Knochenmark und Milz isoliert sowie anschließend in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Danach konnten die B-ALL-Zellen in neue NSG-Mäuse injiziert und somit weiter amplifiziert werden.

Die hier verwendeten, aus dem PDX-Modell gewonnenen, Zellen wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um viable Milzzellen aus der dritten Xenograft-Generation. Die Zellen von Patient 0159 stammen aus der Maus „PDX-26“ und die von Patient 0122 aus Maus „PDX-29“.

Ablauf der Kokultivierung

Die Abbildung 4 dient der Veranschaulichung des Ablaufs der Kokultivierung.

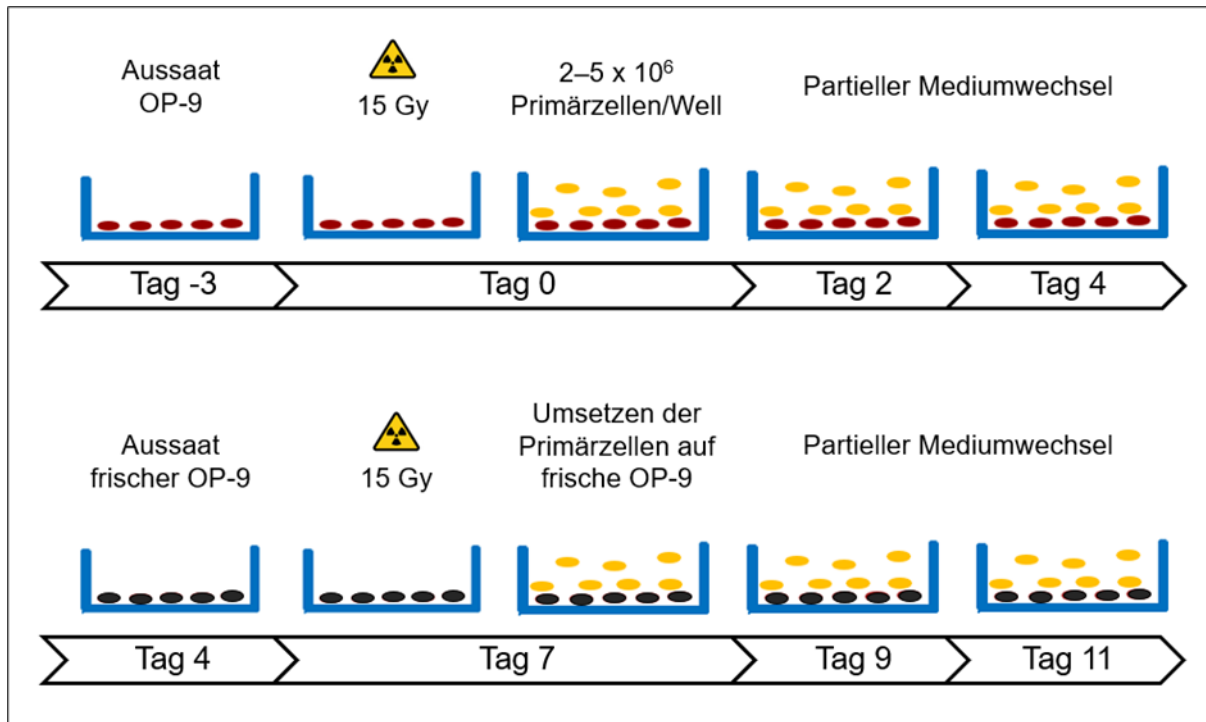


Abbildung 4: Aussaat von OP-9-Zellen als Feederlayer für den Start einer Kokultur mit humanen B-ALL-Primärzellen sowie Umsetzen der Primärzellen auf frische OP-9-Zellen zum Aufrechterhalten der Kokultur.

Um an Tag 0 die Kokultur zu starten, erfolgte 72 h zuvor (Tag -3) die Aussaat der OP-9-Feederzellen in eine 6-Well-Platte. Hierfür wurden die Zellen zunächst aus den T75-Flaschen geerntet und gezählt (siehe „Kultivierung der OP-9-Zellen“) sowie anschließend pro Well je 2×10^5 Zellen in 4 ml frischem Medium ausgesät. An Tag 0 erfolgte die Bestrahlung der 6-Well-Platte. Hierfür wurde die Gamma-Bestrahlungsanlage im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock genutzt. Die Bestrahlung der Platte erfolgte für 382 sek mit insgesamt 15 Gy (2,36 Gy/min), um die Proliferation der OP-9-Zellen zu inhibieren. Danach wurde die 6-Well-Platte zunächst zurück in den Brutschrank gestellt.

Währenddessen erfolgte das Auftauen der PDX-abgeleiteten Primärzellen. Diese wurden vom Kryoröhrchen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 7 °C und 200 x g zentrifugiert, um so das DMSO vollständig zu entfernen. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Primärzellen in 500 µl – 700 µl RPMI 1640-Medium, versetzt mit 20 % FKS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin, aufgenommen. Von dieser

Zellsuspension wurden 5 µl in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach dem Mischen mit Trypanblau gezählt (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

Nun erfolgte das Absaugen des Mediums von den zuvor bestrahlten OP-9-Zellen und je nach Zellzahl die Hinzugabe von $2,2 - 4,7 \times 10^6$ primären B-ALL-Zellen pro Well in 4 ml frischem RPMI 1640-Medium auf die Feederlayer-Zellen. An Tag 2 sowie an Tag 4 erfolgte jeweils ein partieller Mediumwechsel. Hierfür wurde aus jedem Well die Hälfte des Volumens abgenommen und durch frisches RPMI 1640-Medium ersetzt. Außerdem wurden die Zellen an beiden Tagen unter dem Lichtmikroskop (EVOS™ XL Core Cell Imaging System) bei 40x Vergrößerung beurteilt.

Wie bereits beschrieben, wurden die OP-9-Zellen zunächst in eine neue 6-Well-Platte ausgesät, um diese 72 h später zu bestrahlen. Der Beginn einer neuen Woche in Kokultur erfolgte stets sieben Tage nach dem Start durch das Umsetzen der Patientenzellen auf die frischen, bestrahlten OP-9-Feederzellen. Hierfür wurden die humanen Primärzellen durch kräftiges Spülen vom Boden der 6-Well-Platte gelöst, anschließend in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 8 min bei 20 °C und 140 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand ab- und die Zellen in 0,5 ml – 2 ml frischem Medium aufgenommen. Es erfolgte das Überführen von 5 µl der Zellsuspension in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß und – nach dem Mischen mit Trypanblau – die Zellzählung (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.2.2 Inkubation der Primärzellen in Kokultur mit MK-2206

Der Ablauf ist in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt.

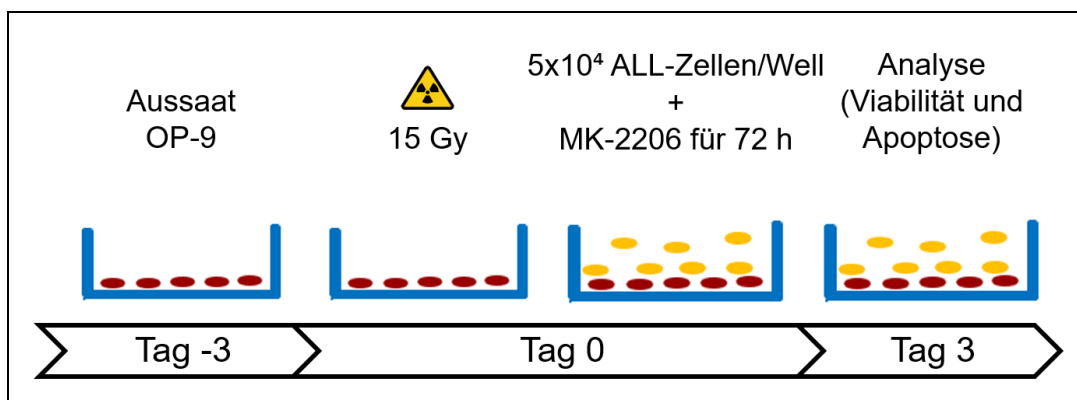


Abbildung 5: Aussaat von OP-9-Feederzellen, Hinzugabe humaner B-ALL-Primärzellen und Inkubation der Primärzellen in Kokultur mit dem Akt-Inhibitor MK-2206.

Um die Viabilität der Primärzellen (auf den OP-9-Zellen) nach Inkubation mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay zu analysieren, wurden an Tag -3 7×10^3 OP-9-Zellen in 150 μl Medium pro Well einer 96-Well-Platte ausgesät und über 72 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 0 erfolgte, nach dem Absaugen des Mediums von den zuvor mit 15 Gy bestrahlten Feederzellen, die Hinzugabe von 5×10^4 primären B-ALL-Zellen in 100 μl RPMI 1640-Medium pro Well. Die Well-Platte wurde für die Viabilitätsmessungen im Dreifachansatz belegt. Inkubation und Kultivierung der Zellen erfolgten über 72 h mit 0,05 μM – 5 μM des Akt-Inhibitors MK-2206 bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kontrolle diente die Zugabe von DMSO zum Medium in separaten Wells. Die hinzugegebene Menge an DMSO entsprach bei den Versuchen jeweils der Menge, die notwendig war, um die höchste Konzentration von MK-2206 zu erreichen. Die Experimente zur Viabilitätsmessung erfolgten in drei unabhängigen biologischen Replikaten.

Um nach Exposition der Primärzellen mit MK-2206 mittels Durchflusszytometrie eine Messung der früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen durchzuführen, wurden ebenfalls an Tag -3 4×10^4 OP-9-Zellen in 1 ml Medium pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät und über 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. An Tag 0 erfolgte die Bestrahlung der Feederzellen mit 15 Gy sowie anschließend das Absaugen des Mediums und die Hinzugabe von 5×10^5 Patientenzellen in 1,5 ml RPMI 1640-Medium pro Well. Die Zellen wurden ebenso für 72 h mit 0,05 μM – 5 μM MK-2206 inkubiert und bei 37 °C sowie 5 % CO₂ kultiviert. Die Zugabe von DMSO zum Medium in separaten Wells diente auch hier als Kontrolle und die Menge entsprach der, die notwendig war, um die höchste Konzentration von MK-2206 zu erreichen.

3.2.2.3 Bestimmung der Viabilität mittels CellTiter-Blue®-Assay

Die Viabilität der humanen Primärzellen in Kokultur wurde mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay bestimmt. Dieser Assay dient zur Analyse viabler Zellen. Diese können das im CellTiter-Blue®-Reagenz enthaltene Resazurin zu Resorufin reduzieren. Resazurin ist ein dunkelblauer Farbstoff mit nur geringer Fluoreszenz. Durch die Reduktion entsteht das pinke Resazurin, welches stark fluoresziert und somit m.H. eines Photometers gemessen werden kann. Das Fluoreszenz-Signal ist proportional zur Anzahl viabler Zellen. Nicht-viable Zellen ohne metabolische Aktivität können das Resazurin hingegen nicht reduzieren und generieren somit kein Fluoreszenz-Signal [109].

Nachdem die Primärzellen in Kokultur auf den OP-9-Feederzellen für 72 h mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 inkubiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.2.2) erfolgte die Zugabe von 20 µl CellTiter-Blue®-Reagenz zu jedem Ansatz in der 96-Well-Platte. Nach einer Inkubationszeit von 3 h im Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Fluoreszenz-Messung am Photometer (GloMax®-Multi Detection System) bei 560/590 nm. Als Blindwerte dienten ein Dreifachansatz aus reinem Medium mit OP-9-Zellen sowie ein Dreifachansatz mit Medium allein, zu denen ebenfalls das CellTiter-Blue®-Reagenz hinzupipettiert wurde. Somit konnten im Anschluss mit den Mittelwerten der Fluoreszenzwerte (je Probe drei technische Replikate) folgende Subtraktionen durchgeführt werden:

$$1.) \bar{x}_{\text{Proben}} - \bar{x}_{\text{Medium}} = \bar{x}_{\text{Proben ohne Medium}}$$

$$2.) \bar{x}_{\text{OP-9 in Medium}} - \bar{x}_{\text{Medium}} = \bar{x}_{\text{OP-9 ohne Medium}}$$

$$3.) \bar{x}_{\text{Proben ohne Medium}} - \bar{x}_{\text{OP-9 ohne Medium}}$$

\bar{x} = Mittelwert der jeweiligen Fluoreszenzwerte,
 Proben = OP-9 + Primärzellen + MK-2206 + Medium

3.2.2.4 Durchflusszytometrischer Apoptose-Nachweis

Mittels Durchflusszytometrie können Zellsuspensionen analysiert werden. Fluoreszierende Antikörper dienen hierbei der quantitativen Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Messung von Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose der Primärzellen (und OP-9-Zellen) genutzt. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem FACSVerse™ von BD Biosciences. Die Steuerung und Auswertung der Messung erfolgte mit der Software BD FACSuite 1.0.6. Der Nachweis früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen erfolgte m.H. von Annexin V und Propidiumiodid (PI). Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin, welches vitale Zellen auf der Innenseite ihrer Zellmembran tragen. Bei Beginn der Apoptose werden die Phosphatidylserine zur äußeren Seite der Lipidschicht transloziert. Annexin V ist deshalb ein Indikator für den Nachweis früh-apoptotischer Zellen. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen weisen eine permeable Zellmembran auf, sodass Annexin V in die Zellen eindringen und ebenfalls an die Phosphatidylserine binden kann. Die Unterscheidung zwischen früh-

apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen gelang durch ein zusätzliches Anfärben der Zellen mit PI. PI ist ein fluoreszierender DNA-Farbstoff, welcher nur durch eine defekte Zellmembran diffundieren und die Zelle durch Einlagerung in die DNA anfärben kann. Da die Zellmembran früh-apoptotischer Zellen noch intakt ist, können diese nur mit Annexin V angefärbt werden. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen hingegen können sowohl Annexin V als auch PI aufnehmen [111]. Als Marker für die humanen B-ALL-Zellen fand ein gegen das humane Antigen CD19 gerichteter Antikörper Verwendung.

Für die Analyse wurden die über 72 h mit MK-2206 inkubierten Primärzellen (in Kokultur auf OP-9-Zellen) (siehe Abschnitt 3.2.2.2) zunächst aus der 24-Well-Platte in FACS-Röhrchen überführt. Nachdem jedes Well mit 1 ml PBS ausgewaschen und die Suspension zum entsprechenden FACS-Röhrchen hinzugegeben wurde, erfolgte der erste Waschschrift für 10 min bei 20 °C und 180 x g in der Zentrifuge sowie danach das Dekantieren des Überstands und die Aufnahme des Pellets in 100 µl PBS. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10 µl CD19-Antikörper je Ansatz (nicht zu den alleinigen OP-9-Zellen sowie zu den Autofluoreszenz-Kontrollen und zum Ansatz mit DMSO), mit welchem die Zellsuspensionen für 10 min bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit 2 ml und dann mit 1,5 ml PBS, wie oben beschrieben, gewaschen. Nach erneutem Dekantieren des Überstands erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in 100 µl Bindungspuffer (1x). Dieser Puffer enthält Kalziumionen in ausreichender Konzentration, wodurch die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserine stabilisiert wird. Nun wurden je 5 µl Annexin V-*Fluorescein isothiocyanate* (FITC) hinzugegeben (nicht zu den alleinigen OP-9-Zellen, nicht zu den alleinigen Primärzellen und nicht zu den Autofluoreszenz-Kontrollen). Die Inkubation erfolgte für 15 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Danach wurden je 400 µl Bindungspuffer (1x) zu jedem Ansatz pipettiert. Nachdem die Bestimmung der Autofluoreszenz erfolgt war, wurden unmittelbar vor der Messung 0,6 µg/ml PI zu den mit Annexin V-FITC gefärbten Zellen hinzugegeben. Die Analysen der Zellen erfolgten anhand von Dotplots und sind beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt.

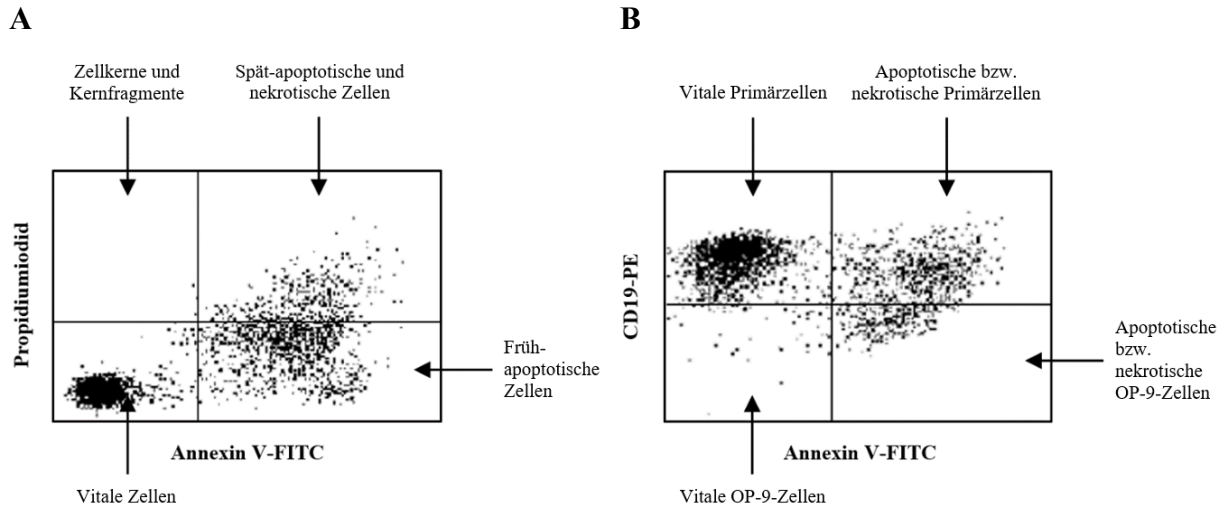


Abbildung 6A, B: **Durchflusszytometrische Analyse von apoptotischen und nekrotischen Zellen.**

Die Analyse der apoptotischen und nekrotischen Zellen (OP-9- und Primärzellen) erfolgte durch Hinzugabe eines CD19-Antikörpers bzw. Anfärbung mittels Annexin V-Fluorescein isothiocyanate (FITC) und Propidiumiodid (PI). Früh-apoptotische Zellen sind Annexin V-FITC⁺ und PI⁻. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen hingegen sind Annexin V-FITC⁺ und PI⁺. Die humanen Primärzellen sind CD19-Phycoerythrin (PE)⁺. A: Dargestellt sind OP-9- und Primärzellen gemeinsam. B: Dargestellt sind vitale bzw. apoptotische/nekrotische OP-9-Zellen (CD19-PE⁻) sowie vitale bzw. apoptotische/nekrotische Primärzellen (CD19-PE⁺).

3.2.3 Aufarbeitung von Proteinen humaner B-ALL-Zelllinien für Proteom- und Phosphoproteom-Analyse

Um später eine Proteom- und Phosphoproteom-Analyse zweier in dieser Arbeit analysierter humaner pro-B-ALL-Zelllinien (SEM und RS4;11) durchführen zu können, wurde eine Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS) Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Sickmann etabliert.

In Rostock erfolgte zunächst die Inkubation der Zelllinien SEM und RS4;11 mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 und anschließend die Herstellung der Proteinlysate. In Dortmund wurde unter Anleitung der ISAS-Arbeitsgruppe die Proteinkonzentration der Proben bestimmt. Es folgten weitere Aufarbeitungsschritte sowie ein Verdau der Proteine zu Peptiden. Der vorerst letzte Schritt, die Auftrennung der Peptide m.H. einer Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC), wurde durch das Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften durchgeführt.

3.2.3.1 Proteinlysatherstellung und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay

Proteinlysatherstellung

Da pro Zelllinie 2×10^8 Zellen notwendig waren, mussten die Zelllinien SEM und RS4;11 zunächst ausreichend lang kultiviert werden. Dies erfolgte im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 , zunächst in T75-Flaschen. In diese wurden jeweils 9×10^6 Zellen in 20 ml frischem Medium eingesät. Später erfolgte die Kultivierung in T175-Flaschen, in welche bis zu 6×10^7 Zellen in 90 ml frischem Medium eingesät wurden. Es erfolgte eine regelmäßige Testung der Zellen auf Kontamination und Authentizität sowie eine Verwendung bis maximal Passage 32. Als ausreichend SEM- und RS4;11-Zellen vorhanden waren, erfolgte die Aussaat von je 5×10^6 Zellen in 15 ml Medium in T25-Flaschen. Die Inkubation erfolgte mit $0,5\text{ }\mu\text{M}$ MK-2206, die Kultivierung im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 . Als Kontrolle diente die Zugabe von DMSO (gleiche Menge wie MK-2206) zum Medium in separaten T25-Flaschen. Die Ernte der B-ALL-Zellen erfolgte zu fünf verschiedenen Zeitpunkten: nach 30 min sowie nach 1 h, 2 h, 4 h und 12 h Inkubationszeit. Bei vier Replikaten pro Ansatz waren dies 40 Proben pro Zelllinie. Die Zellen wurden durch Überführen in 50 ml-Zentrifugenröhrchen geerntet und anschließend für 8 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $180 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Dekantieren folgten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml PBS in der Zentrifuge für ebenfalls 8 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $180 \times g$. Nach erneutem Dekantieren wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals für 3,5 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $1.400 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Nach dem Auftauen erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in einem Lysepuffer, bestehend aus Trishydroxymethylaminomethan (Tris), Natriumchlorid (NaCl) und SDS. Der Puffer wurde zuvor mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Tabletten versetzt, um Abbau bzw. Dephosphorylierung der Proteine zu verhindern. Das SDS führt zu einer Denaturierung der Proteine. Pro 1×10^6 Zellen erfolgte die Verwendung von $100\text{ }\mu\text{l}$ des Lysepuffers. Die Lysate wurden anschließend erneut bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurden diese auf Eis aufgetaut und jeweils zweimal für ca. 8 sek mittels Ultraschall lysiert. Danach erfolgte das Abtrennen der Proteine von den Zelltrümmern durch Zentrifugieren für 10 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $20.000 \times g$, anschließend das Überführen der Proteinlysate in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße sowie das Einfrieren bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zum Transport nach Dortmund.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Der BCA-Assay beruht auf der Komplexbildung der Bicinchoninsäure mit einwertigen Kupferionen (Cu^+). Das BCA-Reagenz enthält u.a. Kupfersulfat (CuSO_4). Nach Zugabe dieses Reagenz zu den Proteinen binden zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) an die Peptidbindungen und werden zu Cu^+ reduziert. Nun binden zwei BCA-Moleküle an das Cu^+ , wodurch ein blau-violetter Farbkomplex entsteht. Der Farbumschlag kann durch Absorptionsmessung an einem Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert werden und korreliert mit der Proteinmenge [112]. Durch den Vergleich mit Proteinstandards kann anschließend die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

Die Proteinlysate wurden nach dem Auftauen zunächst 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt, wofür je 90 μl *Aqua dest.* in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend je 10 μl jeder Probe hinzupipettiert wurden. Von den verdünnten Proben wurden je 25 μl pro Well in je drei 96-Well-Platten mit flachem Boden pipettiert. In je zwei Wells aller drei Platten erfolgte die Hinzugabe von je 25 μl eines Proteinstandards, hergestellt aus einer BSA-Stammlösung mit bekannter Konzentration (insgesamt fünf verschiedene Konzentrationen) sowie von je 25 μl *Aqua dest.*. Anschließend wurden 200 μl BCA-Reagenz in jedes bereits befüllte Well hinzugegeben und die Platten für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde pro Platte eine Absorptionsmessung am Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm durchgeführt. Im Anschluss konnte pro Probe bzw. Proteinstandard ein Mittelwert aus den drei Messungen gebildet werden. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte durch Vergleich mit den Proteinstandards. Das restliche Proteinlysate aus den SEM- und RS4;11-Zellen wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.2 Aufarbeitung der Proteine für nachfolgende Proteom- und Phosphoproteom-Analyse

Aufarbeitung der Proteine aus SEM- und RS4;11-Zellen für eine Auftrennung der Peptide mittels Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC)

Die Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend mussten 100 μg Protein jeder Probe auf ein gleiches Volumen eingestellt werden (Proteine aus den SEM-Zellen auf 287 μl , aus den RS4;11-Zellen auf 160 μl). Hierfür wurden die Proteine zunächst in eine 96-Deepwell-Platte transferiert und m.H. des Lysepuffers (aus Tris, NaCl und SDS, jedoch ohne Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) auf das gleiche Volumen eingestellt. Im Anschluss wurde in

jedes befüllte Well Dithiothreitol (DTT) hinzupipettiert (5,7 μl zu den SEM-, 3,2 μl zu den RS4;11-Proteinen) und die Platte für 35 min im Brutschrank bei 56 °C inkubiert. Das DTT führt zur Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen zu Thiolgruppen [113].

Danach erfolgte die Zugabe von Iodacetamid (IAA). Zu den Proteinen aus den SEM-Zellen waren dies 17,2 μl und zu denen aus den RS4;11-Zellen 9,6 μl IAA. Durch das Iodacetamid kommt es zu einer irreversiblen Alkylierung der Proben. Cystein wird hierbei in das stabile S-Carboxyamidomethylcystein überführt, wodurch die Rückbildung der Disulfidbrücken verhindert wird [113].

Anschließend erfolgte die lichtgeschützte Inkubation der Proben für 30 min bei Raumtemperatur. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde die 96-Deepwell-Platte mit den reduzierten und alkylierten Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Die Platte mit den Proteinen wurde im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut und es folgte die Zugabe von 8 M Harnstoff in jedes Well, wodurch jede Probe auf ein Gesamtvolumen von 900 μl eingestellt wurde. Durch den Harnstoff kommt es zu einer Umpufferung (Puffertausch SDS gegen Harnstoff) unter denaturierenden Bedingungen.

Danach erfolgte der Transfer des Harnstoff-Proben-Gemischs in eine 96-Deepwell-Filterplatte, unter welcher sich eine normale 96-Deepwell-Platte befand. Anschließend wurden beide Platten unter ein automatisiertes Festphasenextraktionsgerät (Resolvex™ A200 der Tecan Trading AG) gestellt. Dieses Gerät bewirkt m.H. eines Überdrucks die Aufreinigung der Proteine: Der Puffer wird durch den Filter der oberen Platte in die untere Platte gedrückt, wohingegen die Proteine auf dem Filter zurückbleiben. Dieses Prinzip wird auch als *Filter Aided Sample Preparation* (FASP) bezeichnet. Anschließend erfolgte – ebenfalls automatisiert und m.H. des Überdrucks – ein fünfmaliges Waschen der Proteine an dem Gerät der Tecan Trading AG: zweimal mit je 200 μl Harnstoff und dreimal mit je 200 μl Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3). Beide Platten wurden dann vom Resolvex™ A200 entfernt. Es folgte die Zugabe von je 100 μl Verdaupuffer in jedes Well mit Proteinen. Die im Verdaupuffer enthaltene Serinprotease Trypsin spaltet Peptidbindungen spezifisch am Carboxyende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin [114].

Die beiden Platten wurden dann für 11 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und die Proteine auf der 96-Deepwell-Filterplatte zu Peptiden verdaut. Im Anschluss erfolgte die Elution des Verdaus: Durch Zentrifugation für 75 min bei 20 °C und 3.500 x g wurden die Peptide durch die Filterplatte in die 96-Deepwell-Platte darunter gedrückt. Es folgten zwei Waschschrte für je 45 min bei 20 °C und 3.500 x g. Im ersten Schritt wurde die obere Filterplatte mit je 100 μl NH_4HCO_3 pro Well und im zweiten Schritt mit je 100 μl *Aqua dest.* pro Well gewaschen.

Durch Ansäuern der nun in der 96-Deepwell-Platte befindlichen Peptide kommt es zu einem Abstoppen der Trypsinierung. Hierfür wurden pro Well 30 µl 10 %-ige Ameisensäure zu den Peptiden pipettiert. Bis zur Auftrennung der Peptide mittels UHPLC erfolgte das Einfrieren der Platte bei -80 °C.

Auftrennung der Peptide aus SEM- und RS4;11-Zellen mittels Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC)

Zunächst wurden die Proben aufgetaut. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der Peptide m.H. eines Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie-Gerätes (UltiMate 3000 UHPLC-System mit Monolithen-Technologie). Dies stellt eine Qualitätskontrolle dar [115]. Allgemein dient die Flüssigchromatographie zur Auftrennung von Stoffgemischen durch die unterschiedliche Verteilung der Analyten in einer flüssigen mobilen und einer stationären Phase (Säule). Die verschiedenen Einzelbestandteile der Probe zeigen eine unterschiedlich starke Wechselwirkung mit der unbeweglichen stationären Phase. Dadurch werden sie verschieden schnell in der flüssigen mobilen Phase – m.H. einer Pumpe – durch das Chromatographie-Gerät transportiert. So ergeben sich für die einzelnen Analyten unterschiedliche Retentionszeiten. Die am häufigsten angewandte Flüssigchromatographie-Methode ist heutzutage die Hochleistungsflüssigchromatographie, bei welcher die mobile Phase mit sehr hohem Druck durch die Säule gepumpt wird. Vorteile hierbei sind die Schnelligkeit, das Auflösungsvermögen sowie die Automatisierbarkeit [116]. Die aufgetrennten Peptide können dann am Ende der Säule detektiert werden. Als Detektionsmethode wurde hier die UV-Absorption verwendet, wodurch ein Chromatogramm entsteht, in dem die verschiedenen Peptide (Peaks) in Abhängigkeit ihrer Retentionszeit aufgetragen werden.

Im Anschluss an die Auftrennung der Peptide erfolgen die Proteom-Analysen via Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS). Danach erfolgen Phosphopeptid-Anreicherungen, um abschließend Phosphoproteom-Analysen (ebenfalls mittels LC-MS) anzufertigen.

3.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Programm Microsoft Office Excel 2010. Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Die Berechnung der Signifikanz wurde mittels zweiparametrigem t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei $\leq 0,05$ festgelegt. Der p-Wert wurde durch $\leq 0,05 = *$, $\leq 0,01 = **$ und $\leq 0,001 = ***$ dargestellt. Die Kalkulation der IC50-Werte erfolgte m.H. des Online-Tools Quest Graph™ *IC50 Calculator* (AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA) [117].

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane B-ALL-Zelllinien

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf die B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH erforscht. Die Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 10 μM MK-2206 inkubiert und in einem Zeitintervall bis 72 h untersucht.

4.1.1 Effekte von MK-2206 auf die Vitalität

Vergleich der Vitalität der Zelllinien nach 48 h Inkubation:

Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit dem Akt-Inhibitor konnte in allen vier Zelllinien eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Die nicht-exponierten Zellen proliferierten innerhalb dieses Zeitraums, wohingegen es zu einem verringerten Wachstum der exponierten Zellen kam. Außerdem wurde in den mit MK-2206 inkubierten Zellen mit steigender Konzentration eine Abnahme der metabolischen Aktivität beobachtet.

Bei den **SEM**-Zellen kam es ab einer Konzentration von 1 μM zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums. Die maximale Konzentration des Akt-Inhibitors führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer durchschnittlichen Verminderung der Zellzahl um 72 %. Die metabolische Aktivität der SEM-Zellen verringerte sich bereits ab 0,01 μM signifikant und reduzierte sich bei 10 μM um 80 %.

Bei der Zelllinie **RS4;11** verminderte sich die Zellzahl ab einer Konzentration von 0,5 μM mit Signifikanz. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach Exposition mit 10 μM MK-2206 ein Rückgang der Anzahl an Zellen um durchschnittlich 59 %. Die metabolische Aktivität reduzierte sich ab 0,01 μM signifikant und die höchste Konzentration des Akt-Inhibitors bewirkte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Reduktion der metabolischen Aktivität um 72 %.

NALM-6 zeigte ab der Inkubation mit 0,5 μM eine signifikante Verminderung der Zellzahl. Verglichen mit der Kontrolle reduzierte sich die Zellzahl bei der maximalen Konzentration um 96 %, die metabolische Aktivität sank auf 0,2 % und zeigte ab 0,1 μM Signifikanz.

Die Proliferation der **REH**-Zellen verringerte sich bei Exposition mit 10 μM des Akt-Inhibitors signifikant um 90 %. Die metabolische Aktivität dieser Zelllinie reduzierte sich ab 0,1 μM signifikant und fiel bei Inkubation mit der höchsten Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um durchschnittlich 99 %.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Ergebnisse

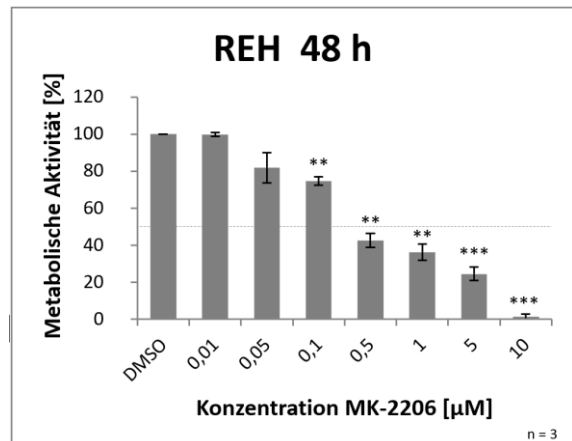
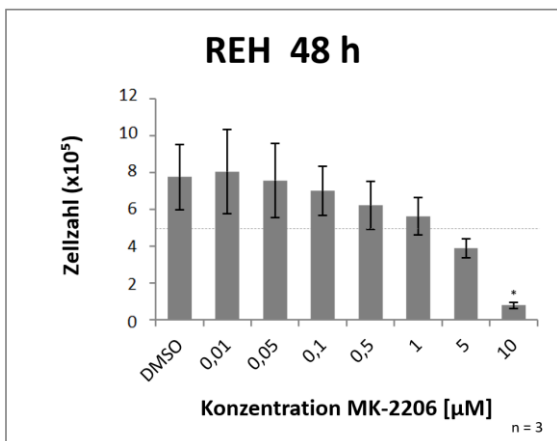
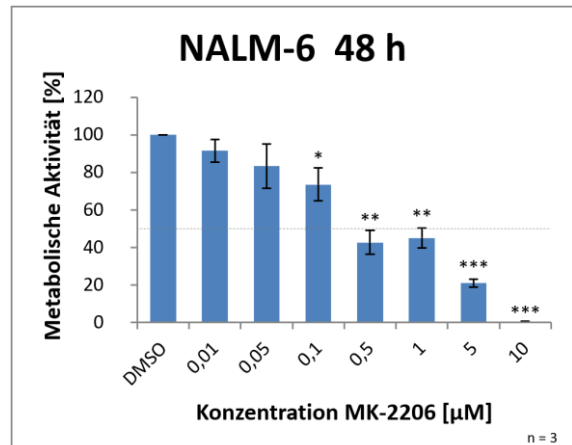
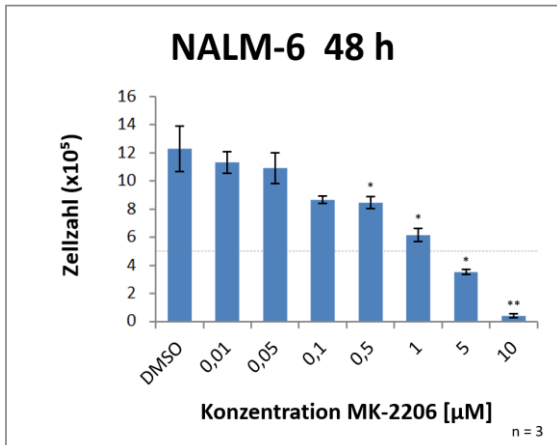
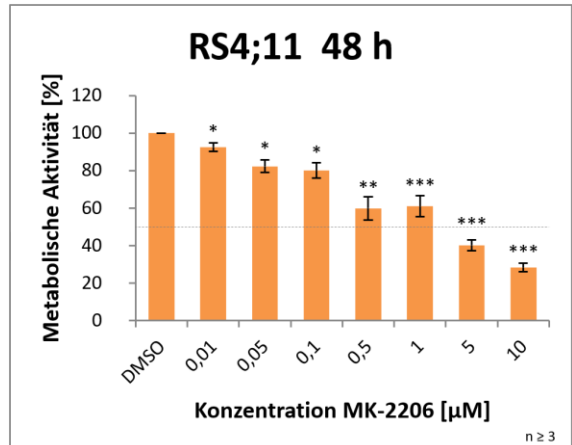
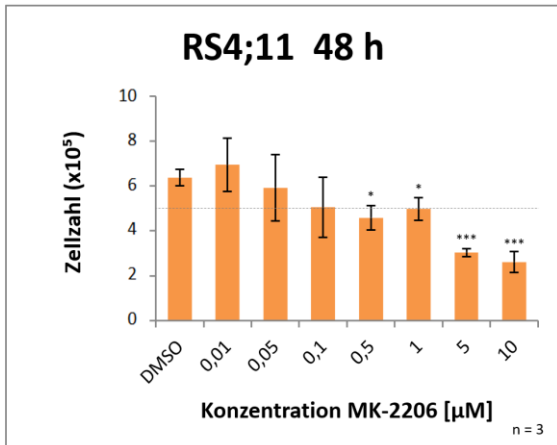
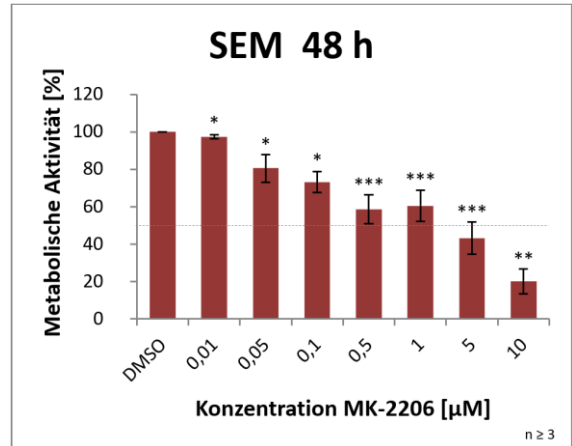
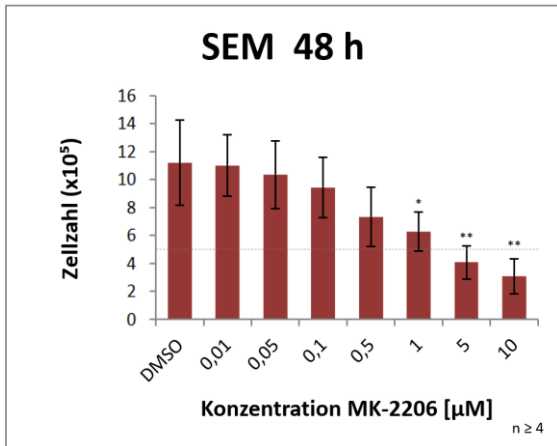
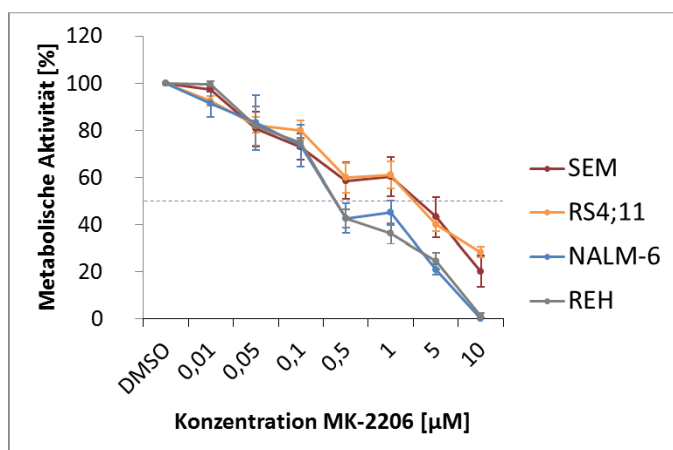


Abbildung 7: Proliferation und metabolische Aktivität nach 48 h Inkubation mit MK-2206.

Die B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der Zellzahl bzw. der metabolischen Aktivität mit Standardabweichung aus mind. drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Strichlinie in den Diagrammen auf der linken Seite kennzeichnet die an Tag 0 ausgesäte Zellzahl. Dies waren stets 5×10^5 Zellen. In den Abbildungen auf der rechten Seite markiert die gestrichelte Linie eine metabolische Aktivität von 50 %. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung, die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

IC50-Werte der Zelllinien nach 48 h:

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Bestimmung der metabolischen Aktivität ergeben sich hier für die vier B-ALL-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit MK-2206 folgende IC50-Werte:

**Abbildung 8: Metabolische Aktivität der vier B-ALL-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit MK-2206.**

Die Strichlinie markiert eine metabolische Aktivität von 50 %. Die metabolische Aktivität wurde mittels WST-1-Assay bestimmt. $N \geq 3$ biologische Replikate.

Tabelle 7: Errechnete IC50-Werte nach 48 h Inkubation mit MK-2206

Zelllinie	IC50-Wert
SEM	1,36 µM
RS4;11	1,78 µM
NALM-6	0,48 µM
REH	0,39 µM

Vergleich der Vitalität der Zelllinien nach 72 h Inkubation:

Auch nach 72 h Inkubation mit dem Inhibitor MK-2206 konnte in allen vier B-ALL-Zelllinien eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums gezeigt werden. Die nicht-exponierten Zellen proliferierten innerhalb dieser Zeit, wohingegen es zu einem verringerten Wachstum der mit dem Akt-Inhibitor inkubierten Zellen kam. Auch eine Abnahme der metabolischen Aktivität konnte bei den inkubierten Zelllinien beobachtet werden.

Ergebnisse

Bei den **SEM**-Zellen bewirkte die Exposition ab einer Konzentration von 0,5 μM eine signifikante Reduktion des Zellwachstums. Die Inkubation mit 10 μM MK-2206 verringerte die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle um durchschnittlich 83 % und die metabolische Aktivität um 92 %. Ab 0,1 μM zeigte die Verminderung der metabolischen Aktivität Signifikanz.

Proliferation und metabolische Aktivität der **RS4;11**-Zellen verringerten sich bei Inkubation mit der höchsten Konzentration des Akt-Inhibitors um 69 % bzw. um 83 %. Das Wachstum wurde, verglichen zur Kontrolle, ab 5 μM und die metabolische Aktivität ab 0,5 μM signifikant reduziert.

Die Exposition mit 10 μM MK-2206 führte bei **NALM-6** im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer Reduktion der Zellzahl um 95 %. Außerdem zeigten die Zellen hier keine metabolische Aktivität mehr. Ab einer Konzentration von 0,5 μM kam es zu einer signifikanten Abnahme von Zellwachstum und metabolischer Aktivität.

Bei der Zelllinie **REH** bewirkte die maximale Konzentration einen Abfall der Zellzahl, verglichen mit der Kontrolle, um durchschnittlich 93 %. Ab 5 μM waren die Werte signifikant. Die metabolische Aktivität verringerte sich bereits ab 0,05 μM signifikant und fiel bei höchster Konzentration auf nahezu 0 %.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse veranschaulicht.

Ergebnisse

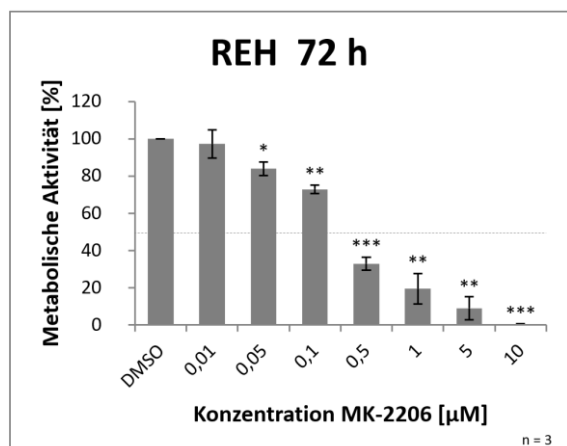
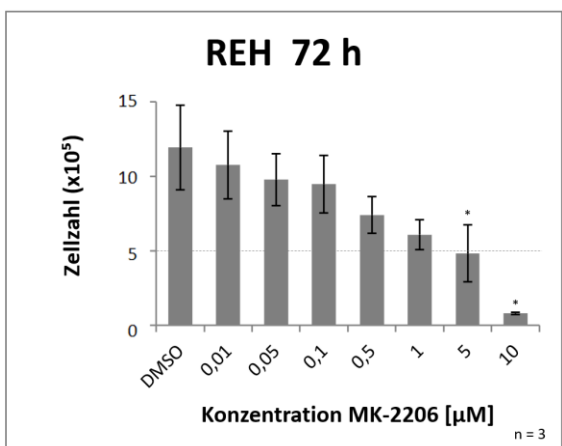
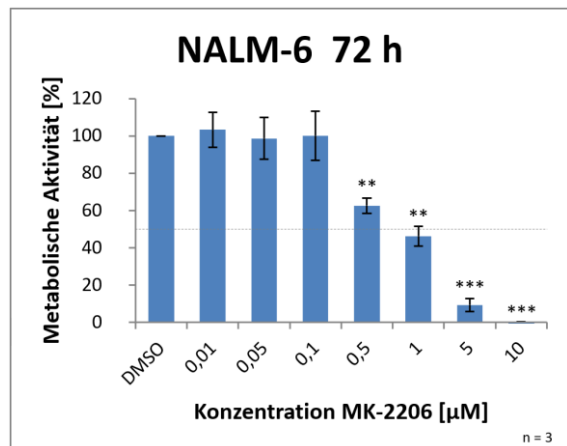
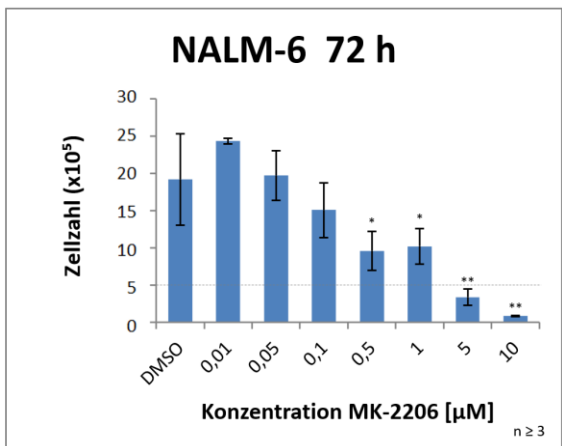
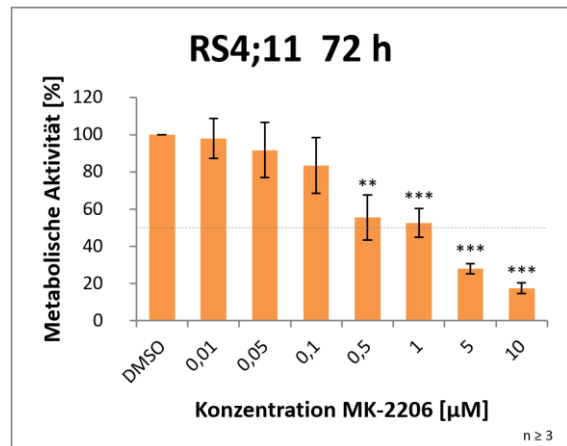
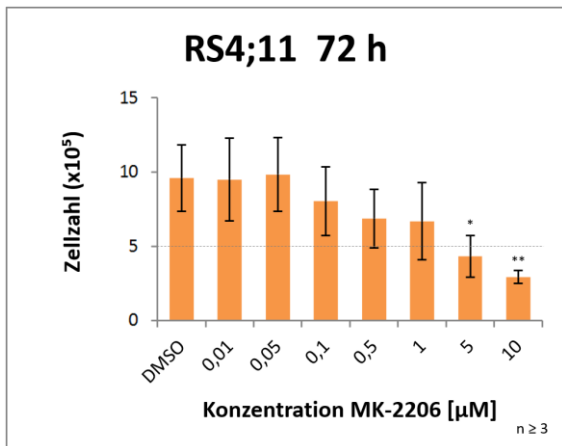
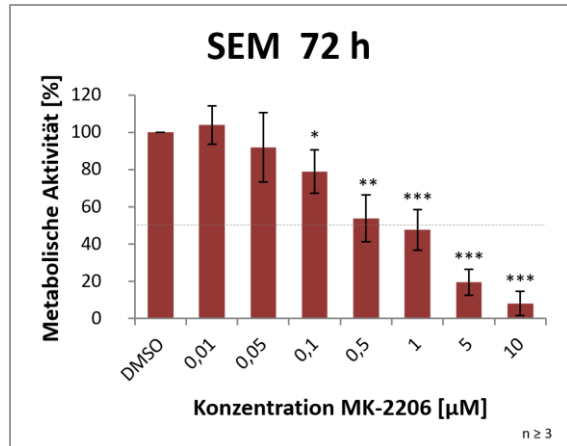
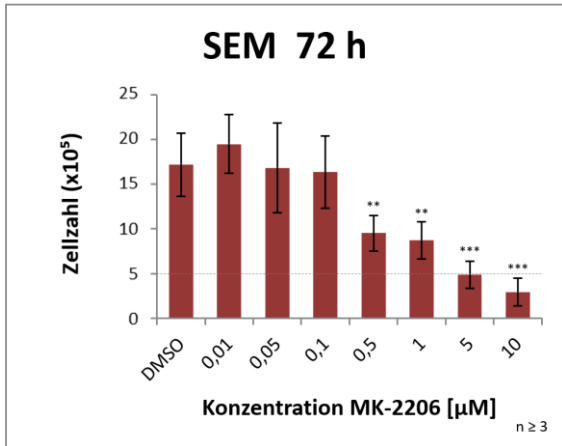


Abbildung 9: Proliferation und metabolische Aktivität nach 72 h Inkubation mit MK-2206.

Die B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH wurden für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der Zellzahl bzw. der metabolischen Aktivität mit Standardabweichung aus mind. drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Strichlinie in den Diagrammen auf der linken Seite kennzeichnet die an Tag 0 ausgesäte Zellzahl. Dies waren stets 5×10^5 Zellen. In den Abbildungen auf der rechten Seite markiert die gestrichelte Linie eine metabolische Aktivität von 50 %. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung, die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

IC50-Werte der Zelllinien nach 72 h:

Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit dem Inhibitor MK-2206 ergeben sich aus den hier durchgeführten Experimenten zur Ermittlung der metabolischen Aktivität folgende IC50-Werte für die vier B-ALL-Zelllinien:

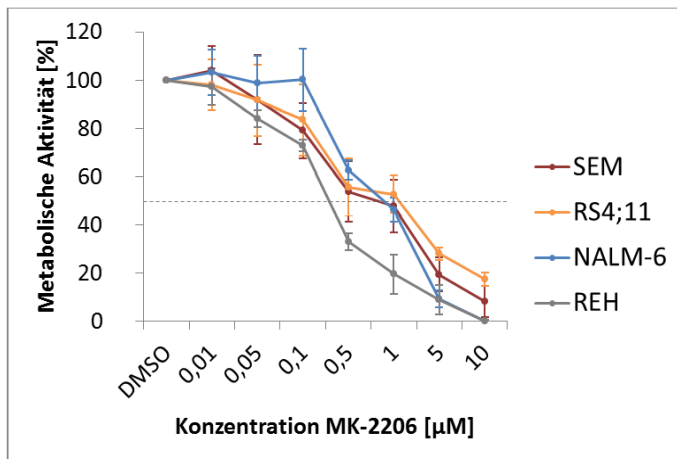


Abbildung 10: Metabolische Aktivität der vier B-ALL-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit MK-2206.

Die Strichlinie markiert eine metabolische Aktivität von 50 %. Die metabolische Aktivität wurde mittels WST-1-Assay bestimmt. $N \geq 3$ biologische Replikate.

Tabelle 8: Errechnete IC50-Werte nach 72 h Inkubation mit MK-2206

Zelllinie	IC50-Wert
SEM	0,65 µM
RS4;11	0,94 µM
NALM-6	0,79 µM
REH	0,25 µM

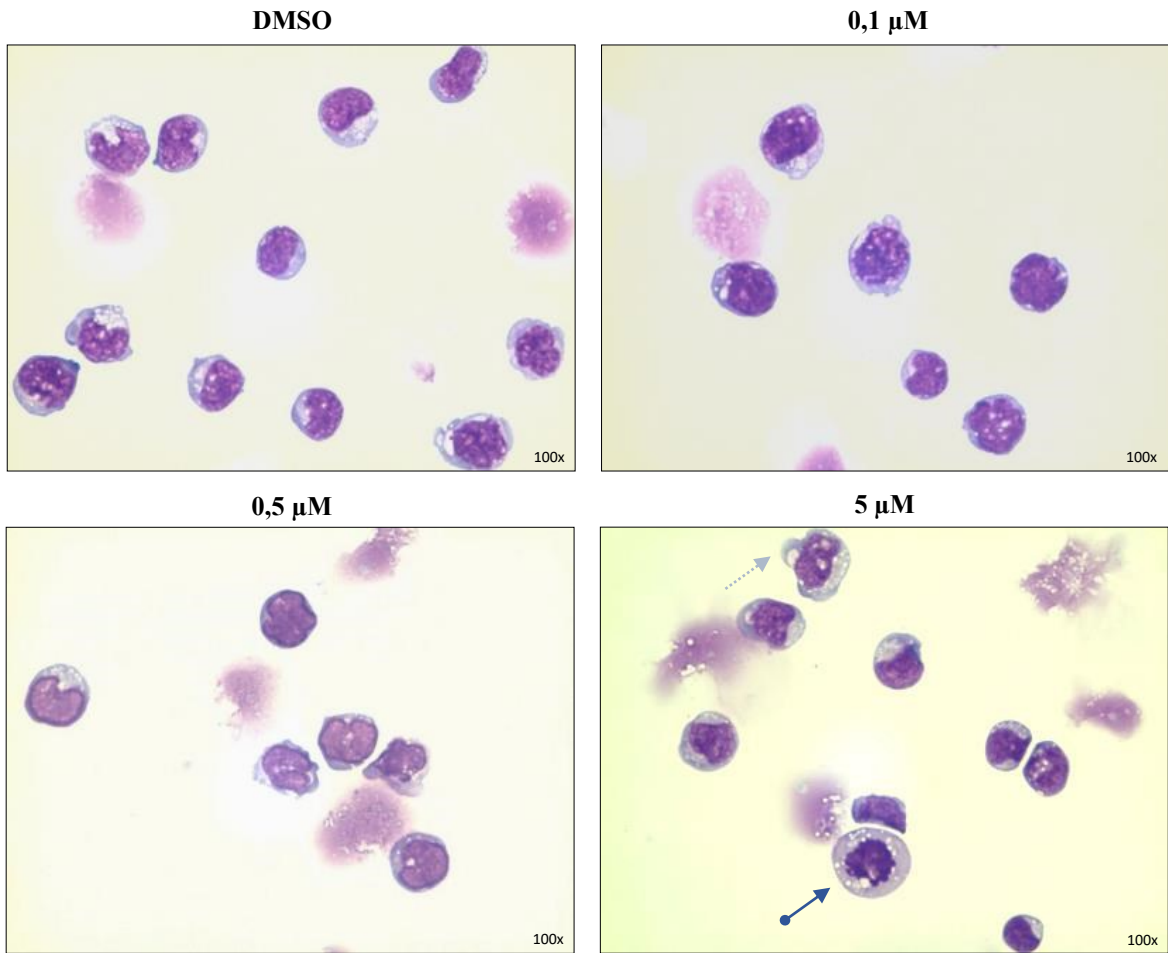
4.1.2 Effekte von MK-2206 auf die Zellmorphologie

SEM, RS4;11, NALM-6 und REH wurden mit 0,1 µM – 5 µM des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. Dies erfolgte über einen Zeitraum von 72 h, da sich im Vergleich zur 48-stündigen Exposition eine stärkere Reduktion der Zellvitalität sowie durchschnittlich höhere Signifikanzen zeigten. Anschließend wurde die Morphologie aller vier B-ALL-Zelllinien beurteilt.

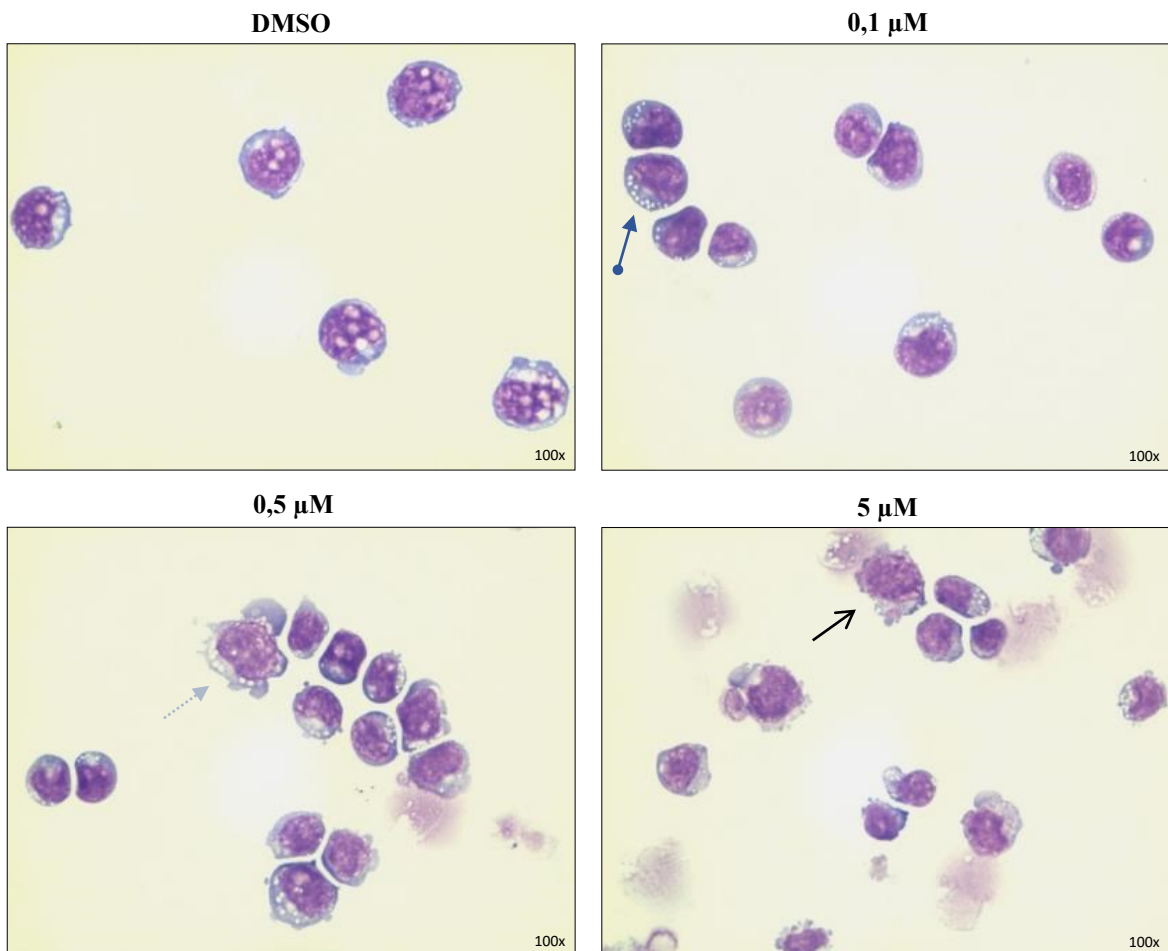
Die folgende Abbildung zeigt Bilder der Kontrolle sowie der exponierten Zellen, welche nach Pappenheim-Färbung bei 100-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop betrachtet wurden. Im Anhang sind zusätzlich Bilder von SEM und RS4;11 nach 72 h Inkubation mit 1 µM MK-2206 sowie Übersichtsaufnahmen (40-fache Vergrößerung) aller Zelllinien zu finden (Abbildungen 20 und 21).

Ergebnisse

SEM

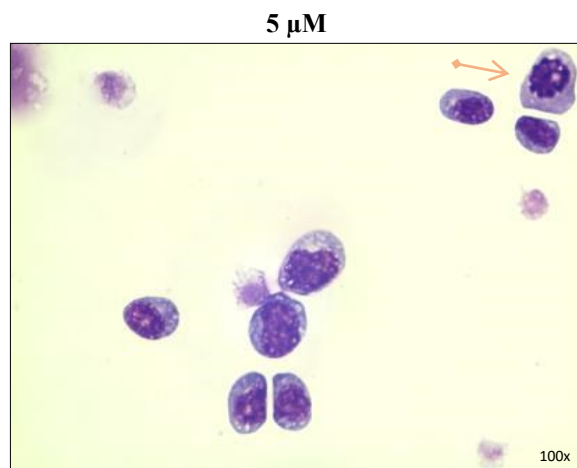
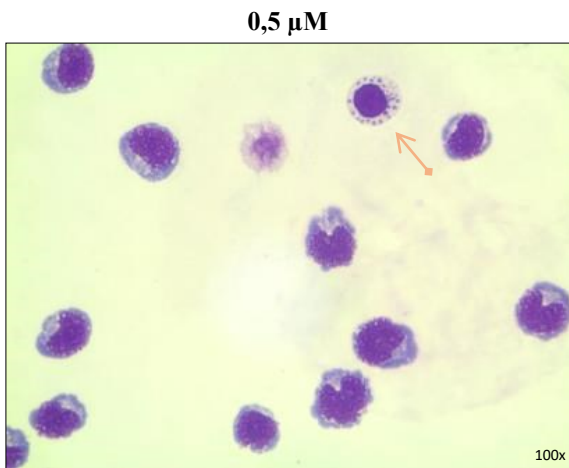
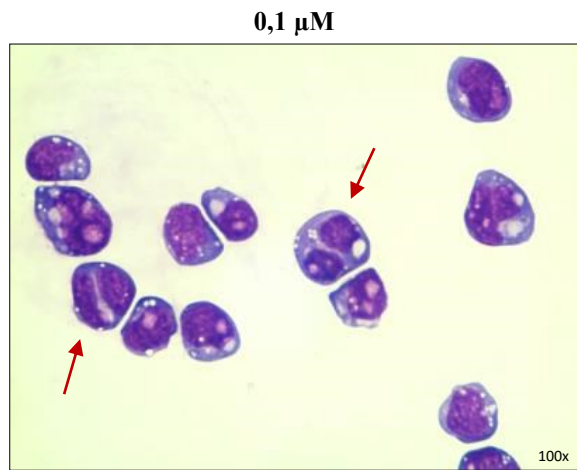
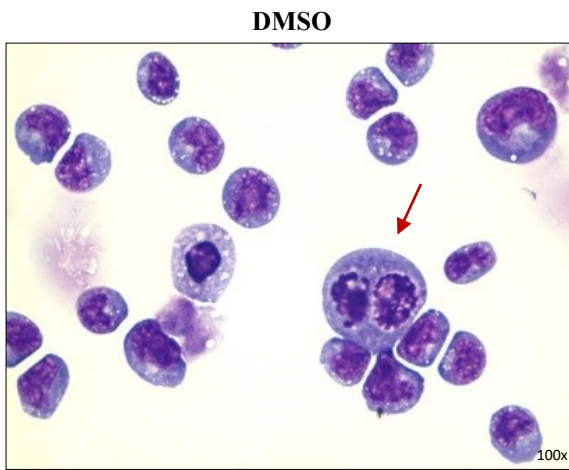


RS4:11



Ergebnisse

NALM-6



REH

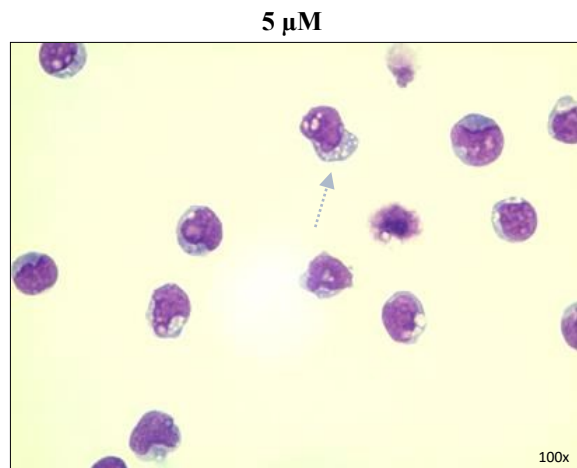
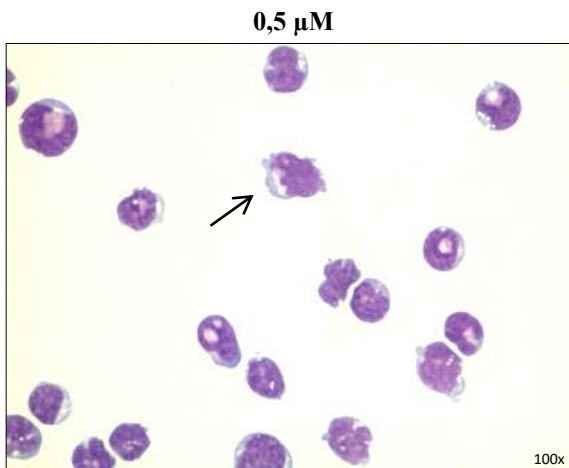
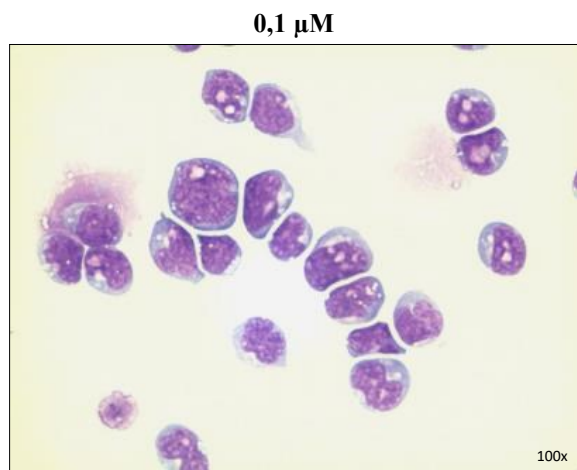
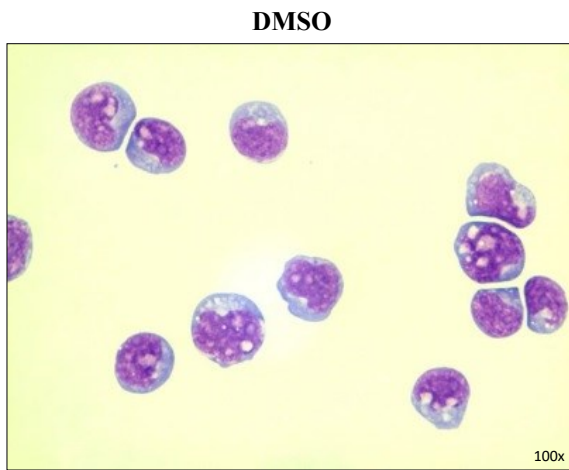









Abbildung 11: Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit MK-2206.




Die Abbildung zeigt repräsentative Lichtmikroskopie-Bilder der Pappenheim-Präparate der B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206. Betrachtung bei 100-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop EVOS™ XL Core Cell Imaging System. $N \geq 2$ biologische Replikate.



Tabelle 9: Legende der in Abbildung 11 verwendeten Pfeile

Pfeil	Dargestellte Struktur
	Zelle mit Zytoplasmaausläufern
	Vakuolisiertes Zytoplasma
	Zelle in Auflösung
	Zelle mit kondensiertem Zellkern
	Zelle mit zwei Kernelementen

Die 72-stündige Inkubation mit MK-2206 bewirkte in jeder der vier B-ALL-Zelllinien eine im Vergleich zu den nicht-exponierten Zellen konzentrationsabhängige Veränderung der Morphologie.

Bei der Zelllinie **SEM** zeigten sich in der Kontrolle sowie bei den mit 0,1 μM und 0,5 μM MK-2206 inkubierten Zellen morphologisch keine Unterschiede. Einige der mit 5 μM inkubierten Zellen hingegen wiesen eine aufgetriebene Gestalt mit Zytoplasmaausstülpungen () auf. Außerdem war in manchen Zellen ein unregelmäßiger Zellkern und eine vermehrte Vakuolisierung des Zytoplasmas () nachweisbar.

Bereits die Inkubation mit der geringsten Konzentration MK-2206 führte bei den **RS4;11**-Zellen zu einer Zunahme der Vakuolen im Zytoplasma (). Die mit 0,5 μM inkubierten Zellen wiesen zusätzlich z.T. eine größere Gestalt mit Zytoplasmaausläufern () auf. Bei 5 μM waren viele Zellen in Auflösung und zeigten teilweise einen fragmentierten Zellkern ().

Viele der nicht-exponierten sowie der mit 0,1 μM inkubierten **NALM-6**-Zellen befanden sich in Mitose. Es konnten zwei Kernelemente nachgewiesen werden (). Bei den beiden höheren Konzentrationen des Akt-Inhibitors kam es insgesamt zu einer Schrumpfung der Zellen sowie zur Kondensation einiger Zellkerne (). In einer der NALM-6-Zellen zeigten sich außerdem Einschlusskörperchen im Zytoplasma.

Bei der Zelllinie **REH** war nach Inkubation mit MK-2206 das Hauptmerkmal die starke Verkleinerung der Zellen. Manche befanden sich in Auflösung (—→) oder zeigten ein ausgestülptes Zytoplasma (.....→).

4.1.3 Effekte von MK-2206 auf die Expression von Schlüsselproteinen des PI3K/Akt-Signalweges und der Caspase-3

Die Inhibition der Proteinkinase Akt wurde mittels Western Blot untersucht. Dafür wurden verschiedene Proteine hinsichtlich ihrer Phosphorylierungsformen in den B-ALL-Zellen SEM, RS4;11, NALM-6 und REH nach 0,5- bis 72-stündiger Inkubation mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 analysiert. Bei den Proteinen handelt es sich um Akt selbst sowie um einige Downstream-Substrate der Akt-Kinase, welche Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges darstellen. Außerdem wurde das Protein ERK1/2 analysiert, um den Einfluss der Akt-Inhibition auch auf einen anderen Signalweg, neben dem PI3K/Akt-Signalweg, zu betrachten. Um zusätzlich den Apoptosemechanismus zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Cleaved Caspase-3, dem Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen zusammengestellt.

4.1.3.1 Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in SEM

Die Effekte des Akt-Inhibitors MK-2206 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges, auf die Proteinexpression von ERK1/2 sowie der Einfluss auf die Apoptose sind in der Abbildung 12 dargestellt.

Ergebnisse

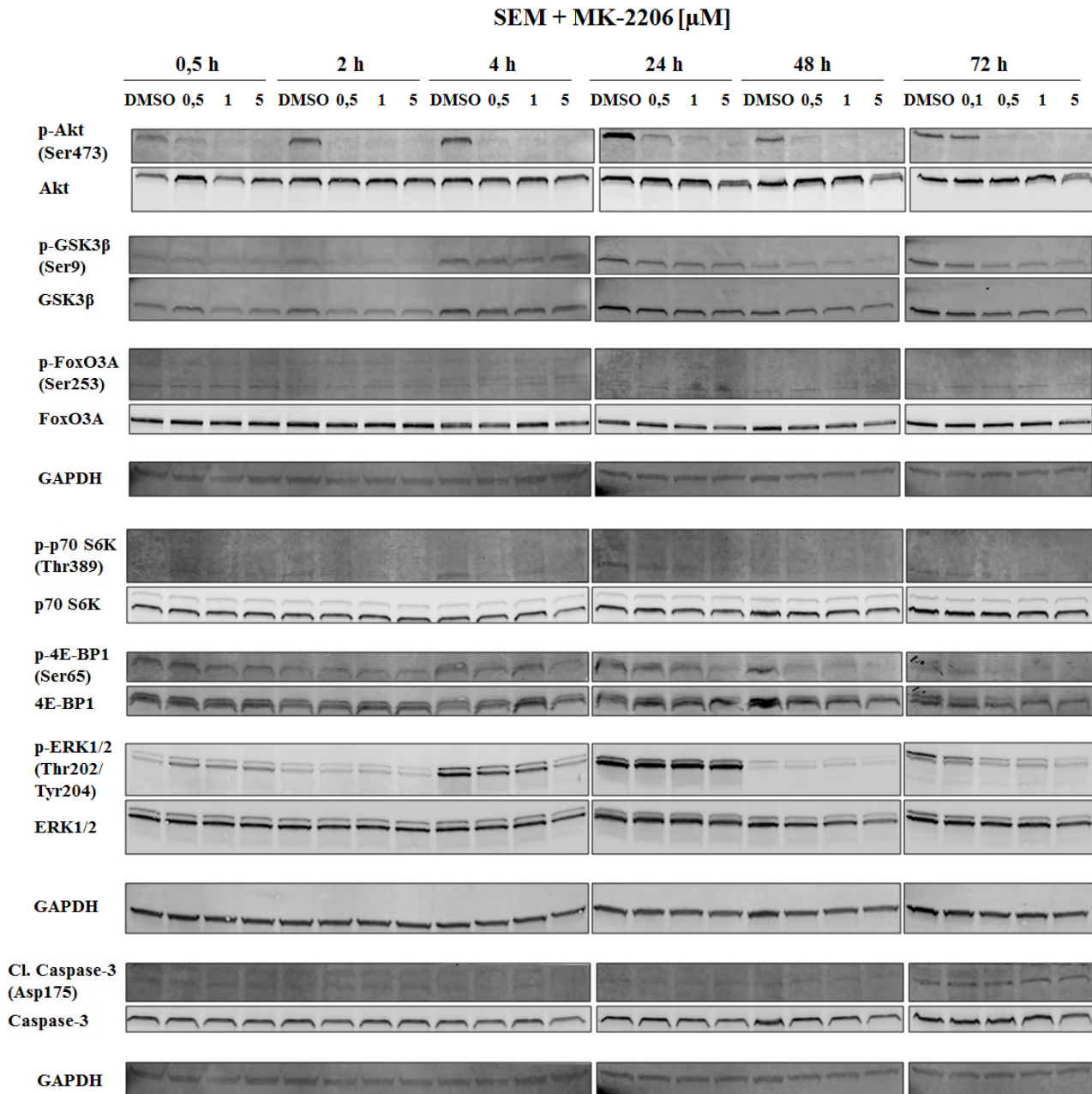


Abbildung 12: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von SEM.

Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie SEM mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3 β (Ser9), Gesamt-GSK3 β , p-FoxO3A (Ser253), Gesamt-FoxO3A, p-p70 S6K (Thr389), Gesamt-p70 S6K, p-4E-BP1 (Ser65), Gesamt-4E-BP1, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Cleaved Caspase-3 (Cl. Caspase-3), dem Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3 analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. N \geq 2 biologische Replikate.

Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proteinkinase Akt konnte durch die Abnahme der Phosphorylierung bereits nach 0,5 h Inkubation ab 0,5 μ M MK-2206 nachgewiesen

werden. Diese Inhibition zeigte sich auch noch nach 72 h. Eine Konzentration von 0,1 μM , mit welcher die Zellen ausschließlich über 72 h inkubiert wurden, hatte keinen Effekt auf p-Akt. Die Expression von Gesamt-Akt blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Eine verminderte Phosphorylierung von GSK3 β zeigte sich ebenfalls ab einer Inkubationszeit von 0,5 h mit steigender Konzentration von MK-2206. Die MK-2206-Inkubation führte zudem zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme von Gesamt-GSK3 β . Eine veränderte Expression von p-FoxO3A konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Nach 4 und 24 h stellte sich eine Verringerung von p-p70 S6K dar. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 nahm ab einer Inkubationsdauer von 24 h mit zunehmender Konzentration von MK-2206 ab. Die Expression von p-ERK1/2 war nicht konstant. Während ERK1/2 in den exponierten Zellen nach 0,5 h im Vergleich zu den Kontrollzellen stärker phosphoryliert war, führte die Inkubation über 4 h und 72 h mit steigender Konzentration von MK-2206 zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2. Die Expression von Gesamt-p70 S6K, -4E-BP1 und -ERK1/2 änderte sich nicht.

Eine im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöhte Expression der Cleaved Caspase-3 konnte in den exponierten Zellen zu keinem der Zeitpunkte detektiert werden. Die Caspase-3 war in allen Zellen exprimiert. In den inkubierten Zellen konnte entsprechend jedoch keine Abnahme dieser Effektorcaspase verzeichnet werden.

4.1.3.2 Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in RS4;11

Die Effekte des Akt-Inhibitors MK-2206 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges, auf die Proteinexpression von ERK1/2 sowie der Einfluss auf die Apoptose sind in der Abbildung 13 dargestellt.

Ergebnisse

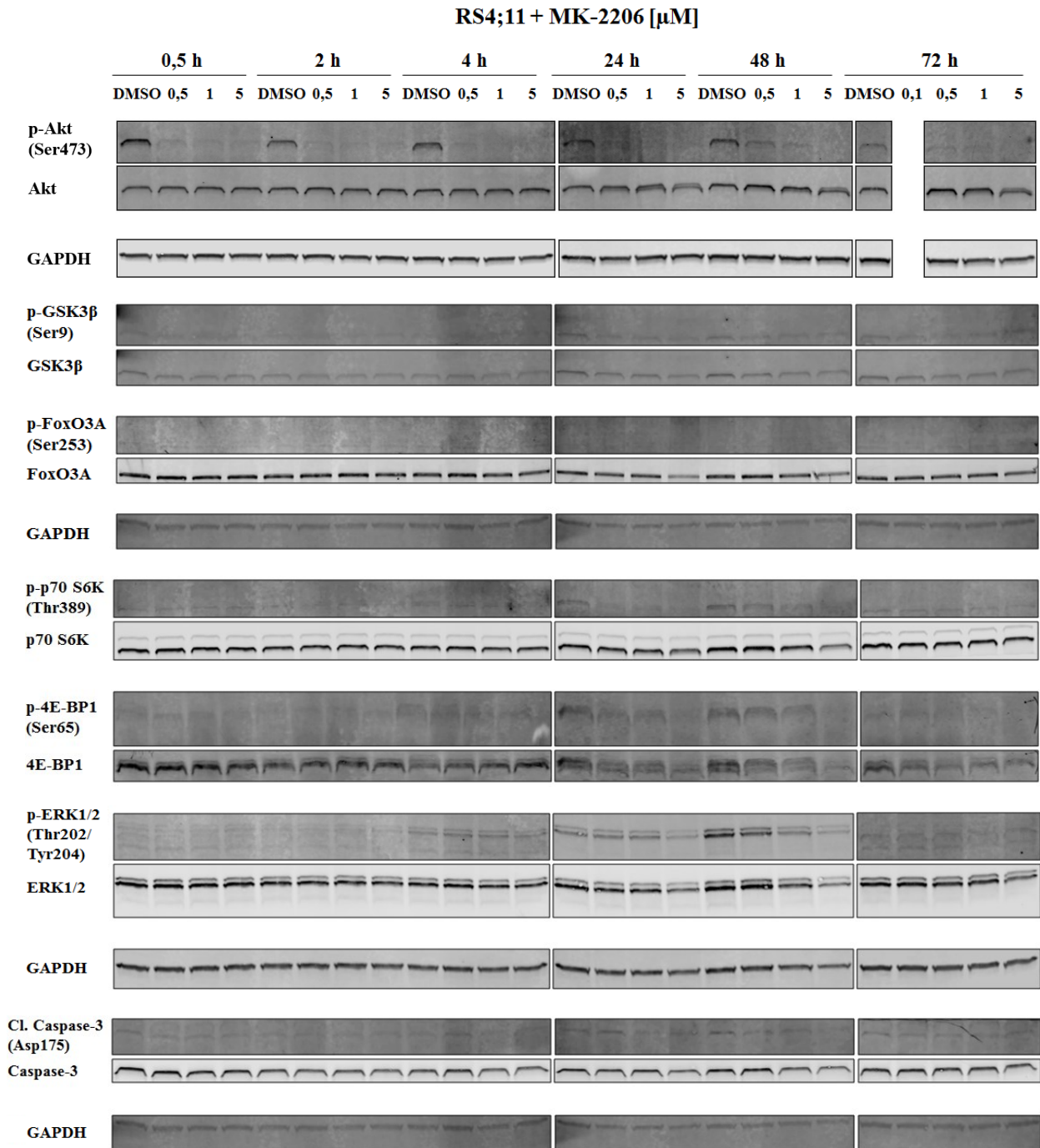


Abbildung 13: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.

Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie RS4;11 mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3β (Ser9), Gesamt-GSK3β, p-FoxO3A (Ser253), Gesamt-FoxO3A, p-p70 S6K (Thr389), Gesamt-p70 S6K, p-4E-BP1 (Ser65), Gesamt-4E-BP1, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Cleaved Caspase-3 (Cl. Caspase-3), dem Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3 analysiert. P-Akt (Ser473) und Gesamt-Akt wurden nach 72 h nicht mit 0,1 µM MK-2206 untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. N ≥ 2 biologische Replikate.

Wie bei SEM konnte in der Zelllinie RS4;11 ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition von Akt nachgewiesen werden. Auch hier zeigte sich bereits nach 0,5 h ab 0,5 μM MK-2206 eine verminderte Aktivität von Akt. Je höher die Konzentration des Akt-Inhibitors war, desto stärker verringerte sich die Expression von p-Akt. Auch noch nach 72 h war Akt in den exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen weniger aktiv. Die Expression von Gesamt-Akt blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Das Protein GSK3 β war in den mit MK-2206 inkubierten Zellen nach 24 h und 48 h im Vergleich zu den Kontrollzellen weniger phosphoryliert. Zudem zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme von Gesamt-GSK3 β . Eine veränderte Expression von p-FoxO3A konnte nicht nachgewiesen werden. Nach 24 h und 48 h zeigte sich in den inkubierten RS4;11-Zellen, verglichen zur Kontrolle, eine verminderte Expression von p-p70 S6K und p-4E-BP1. Eine veränderte Phosphorylierung dieser beiden Proteine konnte zu den anderen Zeitpunkten nicht gezeigt werden. Während Gesamt-p70 S6K konstant exprimiert war, zeigte sich ab 24 h eine verringerte Expression von Gesamt-4E-BP1. P-ERK1/2 war mit steigender Konzentration von MK-2206 nach 24 h und 48 h schwächer, Gesamt-ERK1/2 über die gesamte Zeit konstant, exprimiert.

Wie bei SEM konnte auch in den inkubierten RS4;11-Zellen im Vergleich zur Kontrolle keine verstärkte Expression der Cleaved Caspase-3 nachgewiesen werden. Die Caspase-3 war in allen Zellen exprimiert. In den mit MK-2206 inkubierten Zellen zeigte sich entsprechend jedoch keine Abnahme dieser Effektorcaspase.

4.1.3.3 Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in NALM-6

Die Effekte des Akt-Inhibitors MK-2206 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges, auf die Proteinexpression von ERK1/2 sowie der Einfluss auf die Apoptose sind in der Abbildung 14 dargestellt.

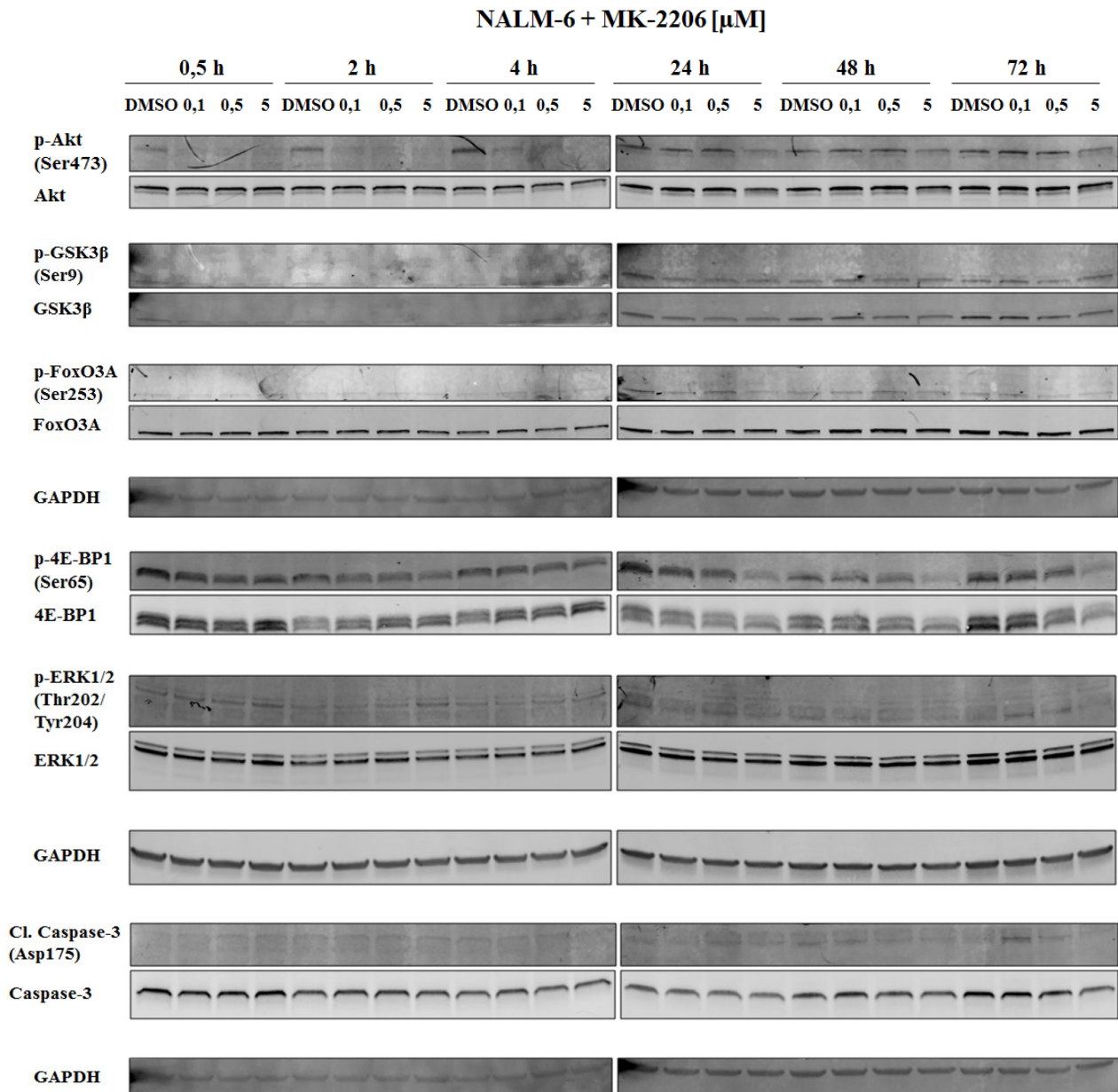


Abbildung 14: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von NALM-6.

Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie NALM-6 mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3 β (Ser9), Gesamt-GSK3 β , p-FoxO3A (Ser253), Gesamt-FoxO3A, p-4E-BP1 (Ser65), Gesamt-4E-BP1, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Cleaved Caspase-3 (Cl. Caspase-3), dem Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3 analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. $N \geq 2$ biologische Replikate.

Nach 0,5 h, 2 h und 4 h Inkubation konnte bereits ab einer Konzentration von 0,1 μM MK-2206 eine Inhibition von Akt nachgewiesen werden. Die Hemmung blieb jedoch nicht konstant. Ab 24 h zeigte sich nur bei 5 μM eine Abnahme der Akt-Aktivität, wohingegen es

bei SEM und RS4;11 ab dieser Zeit bereits bei 0,5 μM zu einer verminderten Phosphorylierung von Akt kam. Die Expression von Gesamt-Akt blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Das Protein GSK3 β zeigte keine veränderte Phosphorylierung in den exponierten Zellen. Eine mit steigender Konzentration verminderte Expression von p-FoxO3A konnte nach 24 h und nach 72 h dargestellt werden, während Gesamt-FoxO3A konstant blieb. Die Expression von p-4E-BP1 verringerte sich wie in SEM mit steigender Konzentration ab 24 h Inkubationszeit. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich zudem ein vermindert exprimiertes Gesamt-4E-BP1. Bis einschließlich 4 h Inkubationszeit zeigte sich bei 5 μM MK-2206 eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2, bei unveränderter Gesamtform.

Wie in SEM und RS4;11 kam es auch in den exponierten NALM-6-Zellen zu keiner Zunahme der Cleaved Caspase-3. Die Caspase-3 war in allen Zellen exprimiert. In den mit MK-2206 inkubierten Zellen konnte entsprechend keine Verringerung dieser Effektorcaspase nachgewiesen werden.

4.1.3.4 Proteinexpression nach MK-2206-Inkubation in REH

Die Effekte des Akt-Inhibitors MK-2206 auf Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges, auf die Proteinexpression von ERK1/2 sowie der Einfluss auf die Apoptose sind in der Abbildung 15 dargestellt.

Ergebnisse

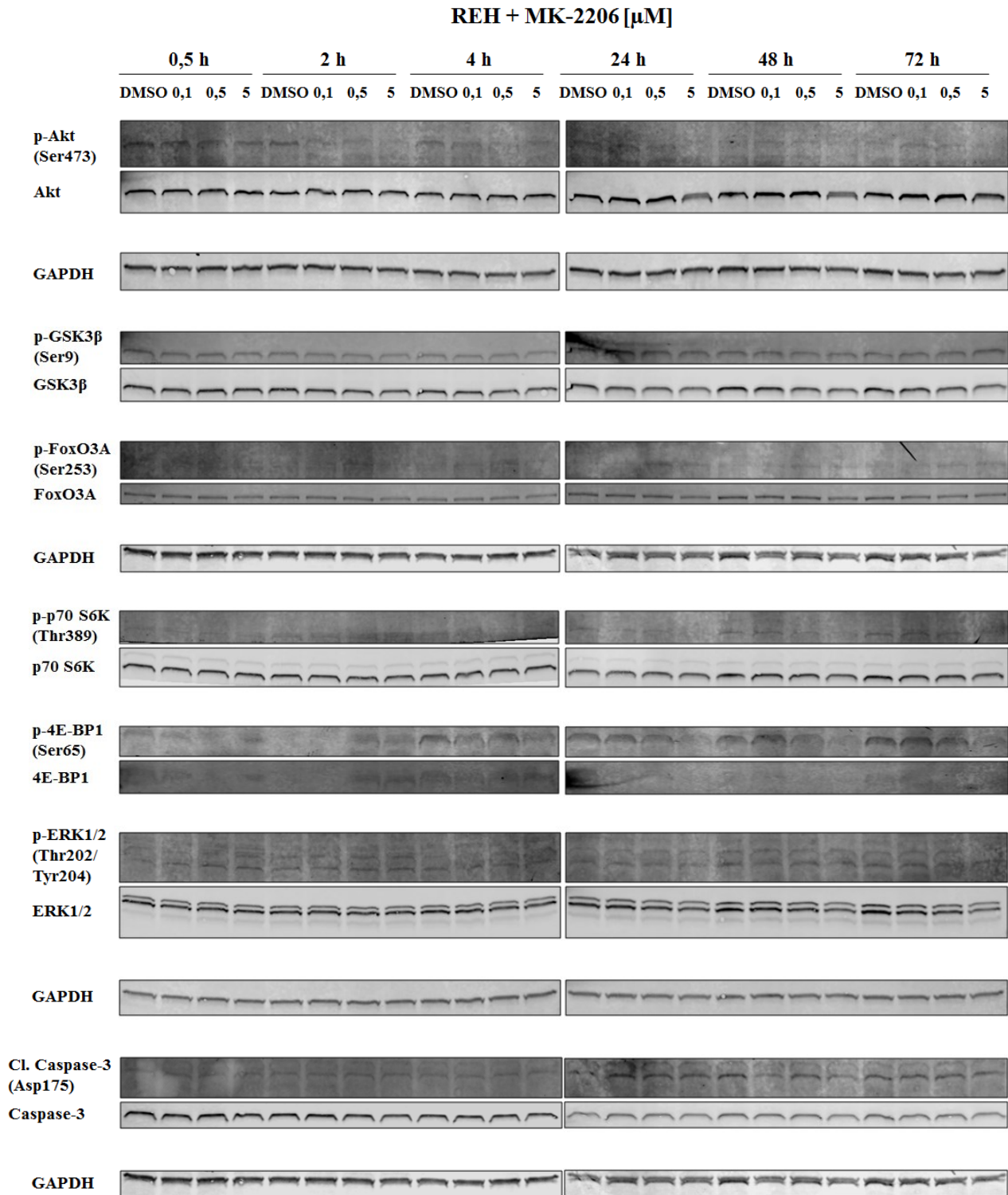


Abbildung 15: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von REH.

Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie REH mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3 β (Ser9), Gesamt-GSK3 β , p-FoxO3A (Ser253), Gesamt-FoxO3A, p-p70 S6K (Thr389), Gesamt-p70 S6K, p-4E-BP1 (Ser65), Gesamt-4E-BP1, p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und Gesamt-ERK1/2 untersucht. Außerdem wurde die Expression der Cleaved Caspase-3 (Cl. Caspase-3), dem Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3 analysiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. N \geq 2 biologische Replikate.

Auch in der Zelllinie REH konnte eine durch MK-2206 induzierte Reduktion der Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Nach 2 h und 4 h Exposition zeigte sich bereits ab 0,1 μM eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Expression von p-Akt. Die Beurteilung der Phosphorylierung zu späteren Zeitpunkten war nicht ausreichend möglich. Die Expression von Gesamt-Akt blieb über den gesamten Zeitraum konstant. Wie bei den NALM-6-Zellen war auch in REH zu keinem Zeitpunkt eine durch Inkubation mit MK-2206 induzierte Expressionsänderung von p-GSK3 β darstellbar. Der Phosphorylierungsstatus des Proteins FoxO3A konnte nicht ausreichend beurteilt werden. Ab 24 h Inkubation mit einer Konzentration von 5 μM MK-2206 zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle verringerte Phosphorylierung der Proteine p70 S6K und 4E-BP1. Gesamt-4E-BP1 war nicht ausreichend beurteilbar. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien änderte sich p-ERK1/2 in REH zu keinem Zeitpunkt.

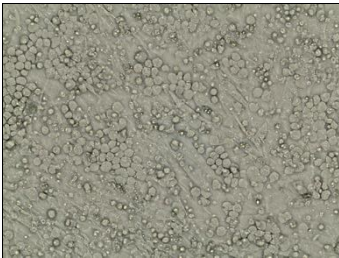

Wie in SEM, RS4;11 und NALM-6 konnte in den mit MK-2206 inkubierten REH-Zellen zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg der Cleaved Caspase-3 aufgezeigt werden. Die Caspase-3 war in allen Zellen exprimiert. In den inkubierten Zellen zeigte sich entsprechend keine Abnahme dieser Effektorcaspase.

4.2 Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf B-ALL-Primärzellen in Kokultur

Neben der Wirkung auf humane B-ALL-Zelllinien wurde auch der Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane Primärzellen untersucht. Diese primären B-ALL-Zellen wurden m.H. des PDX-Mausmodells amplifiziert und anschließend *ex vivo* als PDX-abgeleitete Zellen (Primärzellen von Patient 0159 aus Maus „PDX-26“ und von Patient 0122 aus Maus „PDX-29“) auf OP-9-Feederzellen kultiviert und inkubiert.

Die Bilder in Tabelle 10 zeigen ein gutes Anwachsen der humanen Primärzellen sowie deren direkten Zell-Zell-Kontakt mit den OP-9-Zellen unter dem Lichtmikroskop (EVOS™ XL Core Cell Imaging System) bei 40x Vergrößerung. Für die nachfolgenden Analysen wurden nur aktiv proliferierende Primärzellen genutzt.

Tabelle 10: Humane B-ALL-Primärzellen in Kokultur auf OP-9-Feederzellen

40x Vergrößerung	Zellen in Kokultur
	<p>Primärzellen von Patient 0159 auf OP-9 an Tag 8 in Kokultur</p>
	<p>Primärzellen von Patient 0122 auf OP-9 an Tag 10 in Kokultur</p>

4.2.1 Effekte von MK-2206 auf die Zellviabilität

Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit MK-2206 (0,05 μM – 5 μM) konnte in den PDX-abgeleiteten Zellen beider Patienten mit steigender Konzentration des Akt-Inhibitors eine Verringerung der viablen Zellen nachgewiesen werden. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse veranschaulicht.

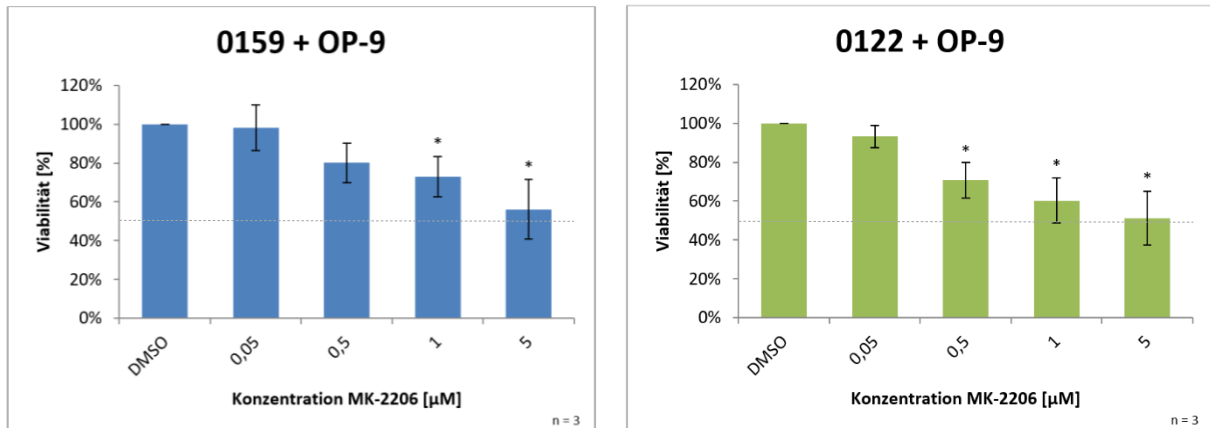


Abbildung 16: Viabilität nach 72 h Inkubation mit MK-2206.

Die PDX-abgeleiteten Zellen beider Patienten (Patienten-ID: 0159 und 0122) wurden auf OP-9-Feederzellen kultiviert und für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. In den Diagrammen sind die Mittelwerte der Anzahl viabler Zellen mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert einen Anteil viabler Zellen von 50 %. Die Viabilität wurde mittels CellTiter-Blue® Viabilitäts-Assay bestimmt. Die Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * $p \leq 0,05$.

Die Primärzellen beider Patienten zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. Während die Inkubation mit der geringsten Konzentration MK-2206 kaum bis keine Verringerung des Anteils viabler Zellen zeigte, sank dieser bei Inkubation mit 0,5 μM bei Patient 0159 um 20 % und bei Patient 0122 signifikant um 29 %. Ab einer Konzentration von 1 μM wurde die Verringerung auch bei Patient 0159 signifikant. Die Inkubation mit der höchsten Konzentration des Akt-Inhibitors führte zur stärksten Reduktion der viablen Zellen: im Vergleich zur Kontrolle um 44 % bei Patient 0159 und bei Patient 0122 um 49 %.

4.2.2 Effekte von MK-2206 auf Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose

Zusätzlich wurde die Wirksamkeit des Akt-Inhibitors auf die Induktion von Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose untersucht. Hierfür wurden die PDX-abgeleiteten Primärzellen in Kokultur für 72 h mit 0,05 μM – 5 μM MK-2206 exponiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei beiden Patienten konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der vitalen Zellen sowie ein Anstieg früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 veranschaulicht.

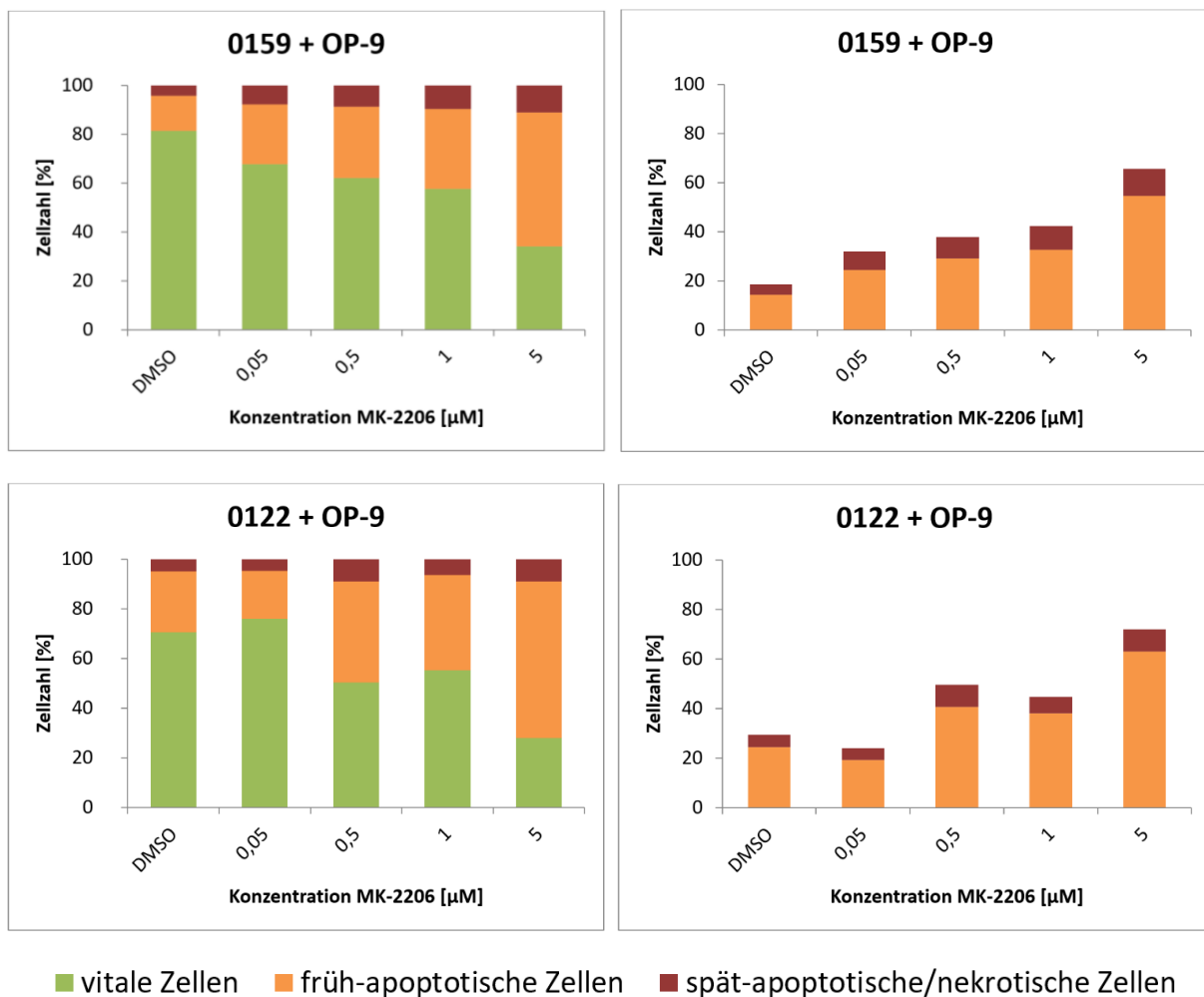


Abbildung 17: **Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose nach 72 h Inkubation mit MK-2206.**

Die PDX-abgeleiteten Zellen beider Patienten (Patienten-ID: 0159 und 0122) wurden auf OP-9-Feederzellen kultiviert und für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. In den beiden Diagrammen auf der linken Seite sind jeweils die prozentualen Anteile vitaler, früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen dargestellt. In den beiden Diagrammen auf der rechten Seite sind gezielt die Anteile früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen in Vergrößerung abgebildet. Die Analyse erfolgte durch Hinzugabe eines CD19-Antikörpers bzw. Anfärbung mittels Annexin V-FITC und PI sowie anschließender Durchflusszytometrie.

Bei den Primärzellen von **Patient 0159** in Kokultur führte die Inkubation mit 5 μ M MK-2206 im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion der vitalen Zellen um 47,1 %. Der Anteil der früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen lag nach 72 h in der Kontrolle bei 18,6 % (Früh-Apoptoserate: 14,4 % und Spät-Apoptose-/Nekroserate: 4,2 %). Bei den mit 5 μ M inkubierten Zellen stieg der Anteil auf 65,8 % (Früh-Apoptoserate: 54,7 % und Spät-Apoptose-/Nekroserate: 11,1 %) – dies entspricht einem Anstieg um 47,2 %.

Bei den Primärzellen von **Patient 0122** in Kokultur zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Vitalität, jedoch kam es erst ab 0,5 μ M zu einem Rückgang der vitalen Zellen und einer Zunahme von Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose. Wie die Primärzellen von Patient 0159 zeigten auch die Zellen von Patient 0122 nach Inkubation mit 5 μ M die stärkste Verringerung der vitalen Zellen und den größten Anstieg von Früh-Apoptose- und Spät-Apoptose-/Nekroseraten. Der Anteil vitaler Zellen reduzierte sich bei dieser Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um 42,6 %. Der Anteil früh-apoptotischer und spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen stieg von 29,5 % bei den nicht-exponierten Zellen (Früh-Apoptoserate: 24,5 % und Spät-Apoptose-/Nekroserate: 5,0 %) auf 72,1 % (Früh-Apoptoserate: 63,0 %, Spät-Apoptose-/Nekroserate: 9,1 %) bei den mit 5 μ M inkubierten Zellen. Dies entspricht einem Anstieg um 42,6 %.

Auch bei alleiniger Betrachtung der humanen Primärzellen (ohne OP-9) konnte die Reduktion vitaler Zellen und der Anstieg von Apoptose/Nekrose bestätigt werden. Dies ist in Abbildung 18 dargestellt.

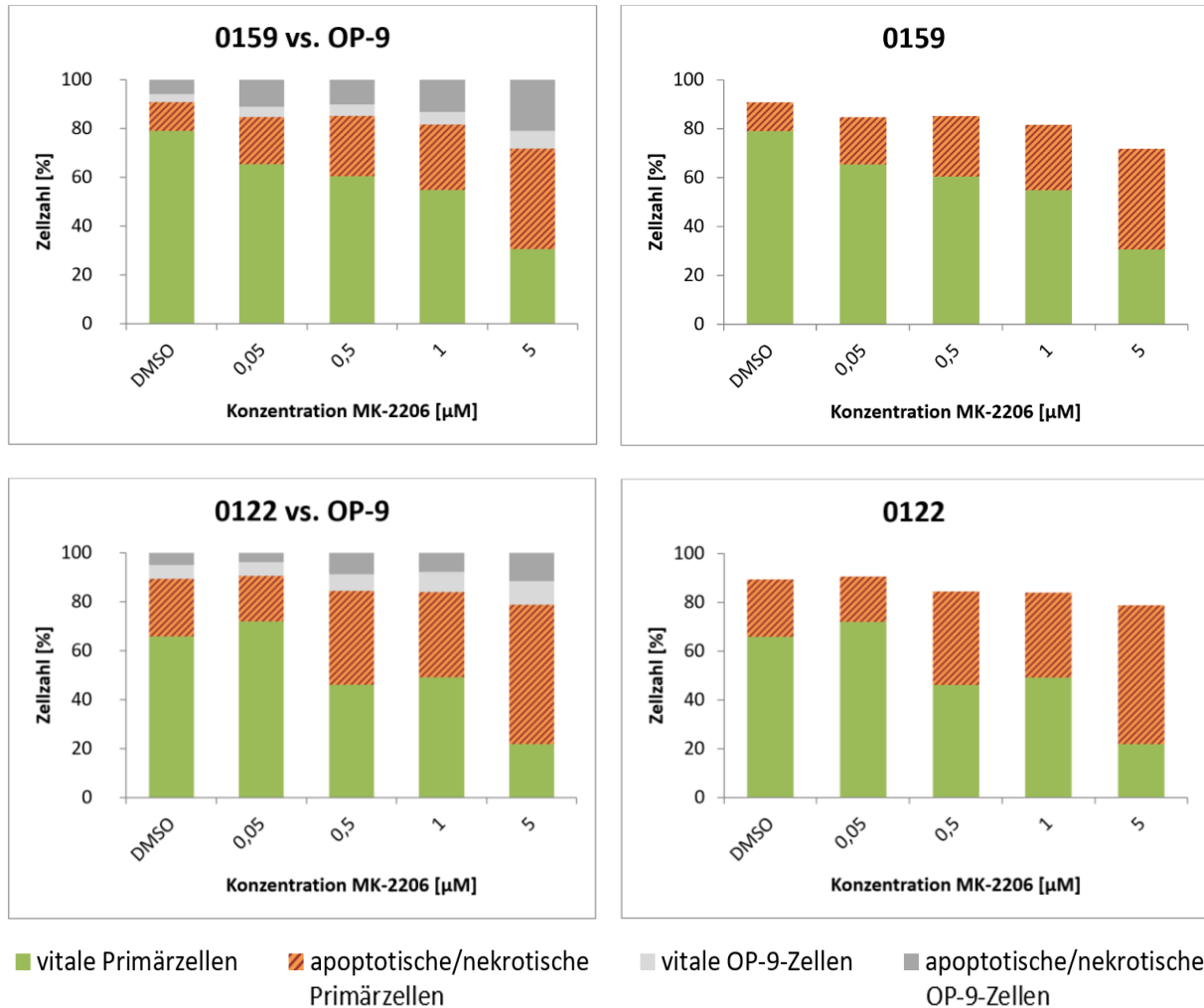


Abbildung 18: Anteil vitaler sowie apoptotischer/nekrotischer Zellen nach 72 h Inkubation mit MK-2206.

Die PDX-abgeleiteten Zellen beider Patienten (Patienten-ID: 0159 und 0122) wurden auf OP-9-Feederzellen kultiviert und für 72 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. Die beiden Diagramme auf der linken Seite stellen vergleichend den Anteil vitaler und apoptotischer/nekrotischer Primärzellen (von Patient 0159 und 0122) sowie den Anteil vitaler und apoptotischer/nekrotischer OP-9-Feederzellen dar. In den beiden Diagrammen auf der rechten Seite sind gezielt die Anteile vitaler und apoptotischer/nekrotischer Primärzellen in Vergrößerung dargestellt. Die Analyse erfolgte durch Hinzugabe eines CD19-Antikörpers bzw. Anfärbung mittels Annexin V-FITC und PI sowie anschließender Durchflusszytometrie.

Bei den Primärzellen von **Patient 0159** verringerte sich der Anteil vitaler Zellen mit steigender Konzentration des Akt-Inhibitors und fiel bei 5 µM im Vergleich zur Kontrolle um 48,6 %. Der Anteil apoptotischer/nekrotischer Zellen lag nach 72 h in der Kontrolle bei

11,7 % und stieg bei den mit der höchsten Konzentration MK-2206 inkubierten Zellen um 29,5 % auf 41,2 %.

Der Anteil vitaler Primärzellen von **Patient 0122** reduzierte sich ab einer Konzentration von 0,5 μM und fiel bei 5 μM im Vergleich zu den nicht-exponierten Zellen um 43,9 %. Die Apoptose-/Nekroserate stieg nach 72 h von 23,5 % bei den Kontrollzellen auf 57,0 % bei den mit 5 μM inkubierten Zellen. Dies entspricht einem Anstieg um 33,5 %.

4.3 Aufarbeitung von Proteinen aus humanen B-ALL-Zelllinien für eine Proteom- und Phosphoproteom-Analyse

Nachdem die beiden humanen B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 über einen Zeitraum von 0,5 h – 12 h mit 0,5 μM des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert wurden, erfolgte die Gewinnung der Proteinlysate. Nach weiteren Aufarbeitungsschritten, sowie einem Verdau der Proteine zu Peptiden, wurde eine Qualitätskontrolle durch Auftrennung des Peptidgemischs m.H. einer Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC) durchgeführt [115].

In Abbildung 19 ist exemplarisch das Ergebnis der Auftrennung des Peptidgemischs der Zelllinie SEM nach einem Durchlauf am UHPLC-System mit Monolithen-Technologie veranschaulicht. Die aufgetrennten Peptide wurden durch UV-Absorption detektiert. Je nachdem, wie lange sich die unterschiedlichen Peptide in Wechselwirkung mit der stationären Phase befanden, wurden verschiedene Retentionszeiten (in min, x-Achse) detektiert. Die y-Achse spiegelt das Detektionssignal der Peptide (in mAU) wider. Gleiche Peptide, mit gleicher Durchlaufzeit durch die stationäre Phase, werden zur selben Zeit detektiert. Je mehr Peptide dies sind, desto höher der Peak. Das Chromatogramm in Abbildung 19 zeigt, dass das Peptidgemisch der Zelllinie SEM nicht verunreinigt war, da alle Peaks zu ähnlichen Zeiten detektiert wurden. Verspätete Peaks würden für eine Verunreinigung oder beispielsweise unverdautes Material sprechen. Diese Ergebnisse ermöglichen eine anschließende Durchführung von Proteom- und Phosphoproteom-Analysen mittels LC-MS.

Ergebnisse

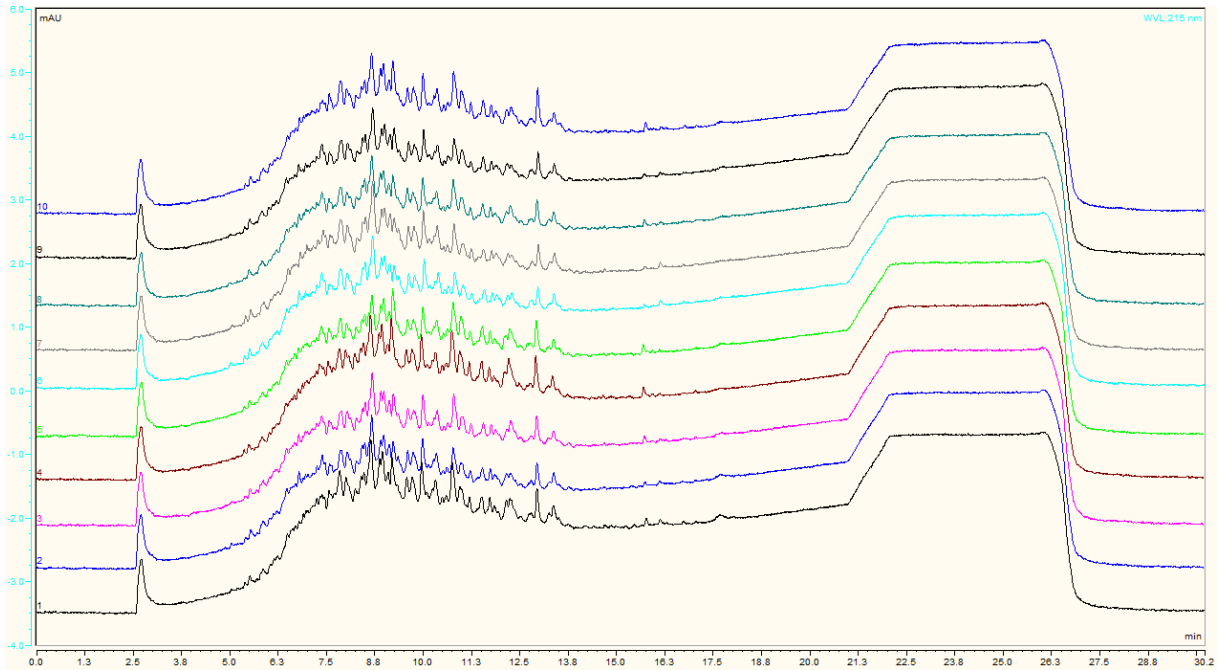


Abbildung 19: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.

Die oberen fünf UV-Traces zeigen jeweils die Auftrennungen der Peptidgemische aus mit $0,5 \mu\text{M}$ über $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$ inkubierten SEM-Zellen. Die unteren fünf UV-Traces hingegen stellen die Peptide aus nicht-exponierten Zellen (ebenfalls $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$) dar. X-Achse: Retentionszeit (min), y-Achse: Detektionssignal der Peptide (mAU).

Im Anhang sind die Ergebnisse weiterer Peptid-Auftrennungen von biologischen Replikaten der SEM-Zellen (Abbildungen 27 und 28) sowie die Durchläufe der Peptidgemische aus der Zelllinie RS4;11 (Abbildungen 29 und 30) zu finden. Die erforderlichen Proben für die weiterführende Proteom- und Phosphoproteom-Analyse wurden somit abschließend aufgearbeitet.

5 Diskussion

Die zielgerichtete Inhibition des häufig bei der B-ALL dysregulierten PI3K/Akt-Signalweges, insbesondere die Hemmung der aberrant aktivierten Akt-Kinase, könnte die Spezifität und Effektivität der Therapie dieser Erkrankung erhöhen. Zudem wäre es möglich, dass durch die zielgerichtete Hemmung weniger Nebenwirkungen als bei der bisher eingesetzten intensiven Kombinations-Chemotherapie auftreten und die Lebensqualität der an B-ALL erkrankten Patienten verbessert werden könnte [2,13-16]. Der pan-Akt-Inhibitor MK-2206 zeigte (allein oder in Kombination) in präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Studien bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Inkubation von Zelllinien verschiedenster solider Tumoren und hämatologischer Erkrankungen, wie der T-ALL [17,18,48-60,69]. Auch in klinischen Arbeiten konnten durch den Akt-Inhibitor teilweise anti-tumorale Effekte bei soliden Tumoren oder in Kombinationstherapie bei der CLL nachgewiesen werden [61-65].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von MK-2206 auf Vitalität, Apoptose, Morphologie und Proteinexpression humaner B-ALL-Zelllinien analysiert. In weiteren Experimenten erfolgte zudem die Analyse der Effekte auf Viabilität und Apoptose von PDX-abgeleiteten Primärzellen in Kokultur. Es konnte nachgewiesen werden, dass MK-2206 auf B-ALL-Zelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und unterschiedlicher p-Akt-Expression sowie auf B-ALL-Primärzellen in einer protektiven Kokultur-Umgebung konzentrationsabhängige anti-leukämische Effekte zeigt.

5.1 Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane B-ALL-Zelllinien

5.1.1 Einfluss von MK-2206 auf Proliferation und metabolische Aktivität

Die hier untersuchten Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH reagierten alle sensibel auf die Inkubation mit dem Akt-Inhibitor MK-2206. Die Zelllinie NALM-6 exprimiert das Fusionsprotein ETV6-PDGFRB (t(5;12)), welches einen konstitutiv aktiven Rezeptor darstellt. PDGFRB ist in der Lage, die PI3K zu stimulieren [41]. REH hingegen ist Träger des ETV6-RUNX1-Fusionsproteins (t(12;21)), welches ebenfalls zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beitragen kann [40]. Die Inhibition der Akt-Kinase über 48 h und 72 h führte zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Reduktion von Zellzahl und metabolischer Aktivität aller Zelllinien. Auch Naderali *et al.* und Neri *et al.* untersuchten grundlegende Effekte von MK-2206 auf verschiedene B-ALL-Zelllinien. Zwar zeigte sich in beiden Arbeiten bereits eine Reduktion der Zellviabilität, diese wurde allerdings mittels MTT-Assay bestimmt. Auch

konnten Naderali *et al.* eine verminderte Proliferation der Zellen nachweisen, was jedoch über eine Ki67-Expressionsanalyse und Durchflusszytometrie erfolgte. Zudem betrug der Expositionszeitraum für die meisten Zellen lediglich 48 h [5,13]. Während in diesen beiden Studien die verwendeten Konzentrationen von MK-2206 oberhalb der physiologisch erreichbaren Konzentration von 0,23 μM [61] lagen, konnten in der hier vorliegenden Arbeit anti-leukämische Effekte auch im Bereich dieser Konzentration sowie unterhalb von 0,23 μM nachgewiesen werden [5,13]. In der Studie von Naderali *et al.* betrug der IC₅₀-Wert von NALM-6 0,79 μM und von REH 0,89 μM [13]. Diese Werte waren somit im Durchschnitt um ca. 0,4 μM höher als in der hier vorliegenden Arbeit, was daran liegen könnte, dass bei Naderali *et al.* die Bestimmung der IC₅₀ mit den Werten des MTT-Assays und nicht mit denen des WST-1-Assays erfolgte.

SEM und RS4;11 tragen die Translokation t(4;11)(q21;q23), die zum Rearrangement des *KMT2A*-Gens und somit zur Expression des KMT2A-AF4-Fusionsproteins führt [118-120]. Besonders nach 48-stündiger Inkubation mit MK-2206 reagierten SEM und RS4;11 etwas weniger sensibel als die beiden anderen Zelllinien. Das zeigte sich bei der Betrachtung von metabolischer Aktivität und Proliferation und stimmt mit den Ergebnissen von Neri *et al.* überein [5]. Auch lagen die IC₅₀-Werte von SEM und RS4;11 im Durchschnitt bei 1,6 μM und somit 1,2 μM über der IC₅₀ von NALM-6 und REH. In anderen präklinischen Studien wurde bereits gezeigt, dass B-ALL-Zellen, welche die Translokation t(4;11) tragen, resistenter gegenüber neuen Therapien waren als Zellen ohne KMT2A-Rearrangement [5,88,121-123].

Die hier untersuchten Zellen weisen außerdem einen unterschiedlichen Immunphänotyp auf [79]. SEM und RS4;11 sind zwei pro-B-ALL-Zelllinien, exprimieren kein CD10-Antigen und sind somit die unreifsten der hier analysierten Zellen. Die Zelllinie REH ist eine common-B-ALL und CD10-positiv. Die reifste ist die prä-B-ALL-Zelllinie NALM-6, welche bereits einen (Vorläufer-)B-Zell-Rezeptor exprimiert (cyIgM+). In einer Studie von Ramakers-van Woerden *et al.* waren pro-B-ALL-Patientenzellen *in vitro* resistenter gegenüber L-Asparaginase, Prednisolon und Thiopurinen als common-/prä-B-ALL-Patientenzellen. Dies könnte zur ungünstigeren Prognose der pro-B-ALL, im Vergleich zur common-/prä-B-ALL, beitragen [88] und ebenfalls für das unterschiedliche Ansprechen der hier untersuchten B-ALL-Zellen auf die MK-2206-Inkubation verantwortlich sein.

Auch in den Verdopplungszeiten unterscheiden sich die hier analysierten B-ALL-Zelllinien. RS4;11 und REH haben eine Verdopplungszeit von 50 h bzw. 50 h – 70 h. Ebenso verdoppeln sich SEM und NALM-6 in einer ähnlichen Zeit: 30 h bzw. 36 h. Man könnte vermuten, dass die Zellen mit gleicher Verdopplungszeit aufgrund gleicher Zellzykluslängen ähnlich schnell

auf den Akt-Inhibitor reagieren. Dies war in dieser Arbeit jedoch nicht der Fall, denn selbst in den langsamer proliferierenden Zelllinien war ein signifikanter anti-proliferativer Effekt bereits nach 48 h nachweisbar. Im Western Blot verringerte sich die Akt-Phosphorylierung in allen Zelllinien schon nach 0,5 h bzw. 2 h.

Die NALM-6-Zellen zeigten nach 72 h bis 0,1 μM keine Reduktion der metabolischen Aktivität, während sie nach 48 h bei dieser Konzentration bereits um 26 % gefallen war. Eine zu kurze Halbwertszeit des Inhibitors ist nicht wahrscheinlich, denn in der Literatur sind für MK-2206 Werte zwischen 55 h – 78 h [50] und 60 h – 80 h [63] beschrieben. Außerdem würde dies den Ergebnissen der 72-stündigen Exposition der anderen Zelllinien widersprechen. Zudem führten höhere Konzentrationen bei den NALM-6-Zellen wieder zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität. Auch sank die Proliferation von NALM-6, im Vergleich zur metabolischen Aktivität, bereits bei 0,1 μM ab. Dieser Unterschied zwischen Proliferation und metabolischer Aktivität könnte beispielweise darauf beruhen, dass sich die Zellen bei der Zellzahlbestimmung im Zellzyklus-Arrest befanden und somit nicht proliferierten, was jedoch nicht bedeuten muss, dass sie keine metabolische Aktivität mehr aufweisen. Das verzögerte Ansprechen bewirkte bei NALM-6 als einzige Zelllinie ein Ansteigen des IC₅₀-Wertes nach 72 h Inkubationszeit.

Alles in allem führte der Akt-Inhibitor jedoch zu vielversprechenden anti-leukämischen Ergebnissen mit signifikanten anti-proliferativen und anti-metabolischen Effekten auf alle hier untersuchten Zelllinien – auch auf jene mit der Translokation t(4;11).

5.1.2 Einfluss von MK-2206 auf Morphologie und Apoptose

Der Akt-Inhibitor MK-2206 bewirkte in den Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH eine Proliferationshemmung sowie eine Reduktion der metabolischen Aktivität. Diese zytotoxischen Effekte könnten auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Um dies weiter zu untersuchen, wurden alle vier Zelllinien mit MK-2206 inkubiert und deren Zellmorphologie analysiert. Um zu eruieren, ob die durch den Akt-Inhibitor reduzierte Vitalität der Zellen auf Apoptosemechanismen beruhen könnte, wurden neben der morphologischen Betrachtung auch Western Blots durchgeführt und die Apoptose-spezifische Caspase-3 untersucht.

Ein Grund für die verringerte Proliferationsrate könnte beispielsweise ein Zellzyklus-Arrest in G₀/G₁ sein [124]. Bei Betrachtung der Morphologie der NALM-6-Zellen waren viele der nicht-exponierten und mit 0,1 μM inkubierten Zellen in Mitose – es konnten zwei Kernelemente nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen MK-2206 bewirkten hingegen

eine Abnahme der sich in Mitose befindlichen Zellen, was darauf hindeuten könnte, dass sich vermehrt Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus befanden. Diese Erkenntnisse decken sich mit der nach 72 h Inkubation gemessenen metabolischen Aktivität, welche sich zunächst bis zu einer Konzentration von 0,1 µM nicht reduzierte und dann abfiel.

Die Inkubation der Zellen könnte außerdem zu einer Induktion von Apoptose und/oder Autophagie führen. Die Auslösung einer kontrollierten Apoptose von entarteten Zellen stellt ein Ziel der Krebsforschung dar. Bei der Apoptose handelt es sich um einen programmierten und durch Genexpression gesteuerten Zelltod, welcher aktiv und unter Energieverbrauch abläuft. Zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität sowie zur Bildung von Apoptosekörperchen dient hierbei der Energieträger ATP. Der Verlust der Membranintegrität erfolgt dann zu einem späteren Zeitpunkt [125]. Bei der Apoptose spielen außerdem proteolytische Enzyme, sogenannte Caspasen, eine wichtige Rolle [126]. Eine bedeutende Effektor-Caspase, deren Expression in dieser Arbeit mittels Western Blot untersucht wurde, ist die Caspase-3. Durch Proteolyse entsteht das aktive Spaltprodukt, die Cleaved Caspase-3. Nach Aktivierung schneidet sie verschiedene Zielproteine und führt somit den Zelltod herbei [127]. Die Reduktion von Zellzahl und metabolischer Aktivität aller vier B-ALL-Zelllinien könnte für eine Apoptoseinduktion durch MK-2206 sprechen. Die Inkubation mit dem Akt-Inhibitor führte in allen Zelllinien zu morphologischen Veränderungen, welche ebenfalls als Anzeichen für einen Apoptose-induzierten Zelltod gedeutet werden könnten. Studien, in denen die Morphologie von mit MK-2206 inkubierten B-ALL-Zellen untersucht wurden, existieren aktuell (Stand: September 2021), außerhalb dieser Arbeit, noch nicht. Morphologisch typische Apoptose-Zeichen sind eine Zellschrumpfung sowie die Bildung von Zytoplasmaausläufern. Außerdem kommt es schrittweise zur Chromatinkondensation, der Zellkern wird dichter und schrumpft (Kernpyknose), bis er letztlich fragmentiert (Karyorrhexis) [128]. Anschließend löst sich die Zelle auf und zerfällt in kleine Vesikel, sogenannte Apoptosekörper. Eine zunehmende Vakuolisierung des Zytoplasmas stellt ein weiteres Apoptosezeichen dar, dieses Phänomen kann jedoch auch auf eine Autophagie hindeuten [129]. Die Exposition mit 0,5 µM und 5 µM MK-2206 bewirkte vor allem bei NALM-6 und REH eine Zellschrumpfung. Im Gegensatz dazu würde es bei der Nekrose, welche eine unkontrollierte Form des Zelltodes darstellt und durch eine plötzliche Schädigung (Strahlung, Hitze, Chemikalien, Hypoxie, etc.) ausgelöst wird, zum Anschwellen der Zelle (Oncosis) kommen [130]. Einige der NALM-6-Zellen wiesen zudem einen kondensierten Zellkern auf und in einer Zelle fanden sich Einschlusskörperchen im Zytoplasma, was ebenfalls auf eine beginnende Apoptose hindeuten könnte. Auch die exponierten REH-Zellen

zeigten Apoptose-typische Veränderungen. Diese Erkenntnisse decken sich mit den durchflusszytometrischen Analysen von Naderali *et al.* [13] und anderen Studien, in welchen die Akt-Kinase indirekt – beispielsweise mittels Torin-2, einem mTOR-Inhibitor oder einem pan-PI3K p110 Inhibitor – gehemmt wurde [77,128,131]. Die Zelllinien SEM und RS4;11 wiesen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Apoptose-typische Morphologie auf. Ob es sich bei den zum Teil aufgetriebenen SEM-Zellen um einen apoptotischen oder möglicherweise einen nekrotischen Vorgang handelt, ist nicht eindeutig zu klären. Bei allen Zelllinien konnten zudem „Kernschatten“ (Zelltrümmer) beobachtet werden, welche für eine geringere Membranstabilität mit erhöhter Fragilität der Zellen sprechen könnten. Da diese auch bei den Kontrollzellen auftraten ist es möglich, dass die Zentrifugalkraft für dieses Phänomen verantwortlich ist – d.h., dass die „Kernschatten“ durch das Übertragen der Zellen mittels Zentrifugation auf die Objektträger entstanden sein könnten. Jedoch bewirkte eine steigende Konzentration von MK-2206 v.a. bei SEM und RS4;11 eine Zunahme der Zelltrümmer, weshalb der Einfluss des Akt-Inhibitors nicht auszuschließen ist.

Während die morphologischen Veränderungen der B-ALL-Zellen als Hinweise für eine Apoptoseinduktion durch MK-2206 gedeutet werden könnten, bestätigte sich dies in den Western Blots nicht. Bis zu einer Inkubationszeit von 72 h zeigte sich bei keiner Zelllinie ein Anstieg der Cleaved Caspase-3, während die inaktive Caspase-3 in allen Proben gleichmäßig exprimiert war. Sevrioukova *et al.* konnten bereits zeigen, dass die T-ALL-Zelllinie Jurkat unter der Wirkung von *T-cell ubiquitin ligand-apoptosis-inducing factor* (TULA-AIF) Caspase-unabhängig in die Apoptose eintreten kann [132]. Möglicherweise spielt dieser Mechanismus auch bei der B-ALL eine Rolle, dennoch konnten Naderali *et al.* bereits durchflusszytometrisch nachweisen, dass die Caspase-3 in den mit MK-2206 inkubierten Zelllinien NALM-6 und REH aktiviert war [13]. Auch Zhou *et al.* zeigten in mit dem Akt-Inhibitor exponierten RS4;11-Zellen eine mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermittelte erhöhte Expression von Caspase-3 mRNA [48]. Jedoch wurden die Zellen für die Apoptose-Analyse in beiden Arbeiten lediglich mit einer Konzentration MK-2206 inkubiert. Dies waren 1 μM über 24 h und 48 h bei den RS4;11-Zellen und 0,79 μM bzw. 0,89 μM über 48 h bei NALM-6 bzw. REH [13,48], während in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen zwischen 0,1 μM – 5 μM und ein Zeitraum über 0,5 h – 72 h im Western Blot untersucht wurden. Dass sich in der vorliegenden Arbeit kein Anstieg der Cleaved Caspase-3 zeigte, könnte jedoch auch darauf beruhen, dass MK-2206 hier bei den B-ALL-Zellen nicht zu einer Apoptoseinduktion führte. Im Anschluss an meine Experimente wurden durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Junghanß weitere Analysen durchgeführt, in

welchen mittels Durchflusszytometrie ebenfalls keine Apoptose-Induktion nachgewiesen werden konnte. Hierfür wurden SEM- und RS4;11-Zellen über 72 h mit 0,25 μ M MK-2206 inkubiert [110].

Neben der Apoptose kann auch die Autophagie wichtig bei der Behandlung maligner Zellen sein [5], da dieser Mechanismus ebenso eine zentrale Rolle des programmierten Zelltodes darstellen [133] und somit ein Grund für die hier beobachtete Hemmung von Proliferation und metabolischer Aktivität sein kann. Die Autophagie mündet jedoch nicht zwangsläufig im Tod der Zelle. Sie kann auch zum Recycling nicht-essentieller oder geschädigter Organellen [135] und somit als ein Programm zur Rettung der Zellen dienen.

5.1.3 Einfluss von MK-2206 auf Expression und Aktivität von PI3K/Akt-Signalwegproteinen

Untersucht wurden verschiedene Schlüsselproteine des PI3K/Akt-Signalweges hinsichtlich ihrer Expression und Phosphorylierung. Hierfür wurden die Zelllinien mit MK-2206 inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von ERK1/2 untersucht, um eine mögliche Beeinflussung des Ras/Raf/Mek/ERK1/2-Signalweges, welcher gemeinsame Schnittstellen mit dem PI3K/Akt-Signalweg aufweist, zu analysieren [32].

Die Proteinkinase Akt, welche durch Phosphorylierung aktiviert wird, zeigte in den nicht-exponierten t(4;11)-Zellen SEM und RS4;11 die stärkste Aktivität. Etwas geringer schien p-Akt in den Kontrollzellen der Zelllinie NALM-6 exprimiert zu sein und die schwächste Phosphorylierung war in REH nachweisbar. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen anderer Studien [5,137,138]. In allen vier Zelllinien konnte jedoch eine starke Reduktion von Proliferation und metabolischer Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.1.1), welche somit unabhängig von der basalen Akt-Aktivität sowie der Dauer der Dephosphorylierung durch MK-2206 (s. u.) zu sein scheint. Dies würde für das bisher unbekanntes Phänomen sprechen, dass MK-2206, neben der Akt-Kinase, zusätzlich andere strukturell verwandte Proteine beeinflussen kann [110].

Der Inhibitor MK-2206 bewirkte in der vorliegenden Arbeit bei allen untersuchten B-ALL-Zellen eine Abnahme von p-Akt. Laut aktuellem Kenntnisstand (September 2021) wurde hier erstmalig eine konzentrationsabhängige Reduktion der Akt-Phosphorylierung – und somit der Akt-Aktivität – nach MK-2206-Inkubation humaner B-ALL-Zelllinien gezeigt. In einer Studie von Naderali *et al.* zeigte sich im Western Blot eine Abnahme von p-Akt (Ser473) in

verschiedenen T- und B-ALL-Zelllinien nach MK-2206-Inkubation. Sie untersuchten jedoch lediglich eine Konzentration sowie einen Zeitpunkt. In dieser Studie konnte außerdem in allen Zelllinien ein Anstieg der Akt mRNA festgestellt werden, aber wie in der hier vorliegenden Arbeit kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamtprotein-Level von Akt. Dies spricht für eine Inaktivierung der Proteinkinase auf posttranskriptioneller Ebene [13].

Während die Inhibition der Akt-Kinase in den pro-B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 über die gesamte Inkubationszeit von 72 h aufrechterhalten blieb, war sie in der prä-B-ALL-Zelllinie NALM-6 nicht konstant. Ab einer Inkubationsdauer von 24 h waren höhere Konzentrationen MK-2206 für eine Abnahme von p-Akt notwendig. Dies könnte durch negative Feedback-Mechanismen und einer Hochregulierung von Akt begründet sein. mTORC2 stellt einen Regulator der Proteinkinase Akt dar und aktiviert diese via Phosphorylierung. Liu *et al.* fanden heraus, dass mTORC2 durch die mTORC1-S6K-Achse reguliert wird [142]. So kommt es durch einen negativen Feedback-Mechanismus nach Aktivierung von mTORC2, Akt, mTORC1 und dessen Substrat S6K zur Inhibition von mTORC2 durch Akt oder S6K [143]. Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener mTOR-Inhibitoren wurde jedoch gezeigt, dass diese zur Hemmung der negativen Feedback-Schleife via mTORC1/p70 S6K und somit zur Verstärkung der mTORC2-abhängigen Akt-Phosphorylierung führen [144,145]. So könnte es sein, dass es nach Hemmung der Akt-Kinase, welche einen Teil der negativen Feedback-Schleife darstellt, ebenfalls zu einer Hochregulierung von mTORC2 und dementsprechend von Akt kommt. In einer Studie von Simioni *et al.* zeigte sich nach Inkubation verschiedener T-ALL-Zelllinien mit MK-2206 zwar eine Verringerung der mTORC2-Aktivität, allerdings wurden die Zellen lediglich über 4 h inkubiert [17]. Es könnte also sein, dass dieser negative Feedback-Mechanismus nach längerer Expositionsdauer zur Hochregulierung von mTORC2 und somit zur Zunahme der Akt-Phosphorylierung in den NALM-6-Zellen geführt hat.

Die Proteinkinase Akt aktiviert den Proteinkomplex mTORC1 durch Phosphorylierung. mTORC1 wiederum phosphoryliert die p70 S6K sowie das 4E-BP1 [7,23], zwei Effektoren, welche eine wichtige Rolle bei der Translationskontrolle verschiedener Proteine und somit dem Zellwachstum spielen [146,147]. Die Inkubation mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 führte in allen vier B-ALL-Zelllinien, entsprechend der Abnahme von p-Akt, zu einer Abnahme von p-p70 S6K (nicht untersucht für NALM-6) und p-4E-BP1, was für eine reduzierte Aktivierung von mTORC1 durch Akt spricht. Im Gegensatz zur p-Akt-Expression, die sich bereits nach wenigen Minuten bis Stunden Inkubation mit MK-2206 verringerte, nahmen p-p70 S6K und p-4E-BP1 teilweise erst nach längerer Inkubationszeit und oft nicht über die

gesamte Zeit (bis 72 h) ab. Ein Grund für das spätere Ansprechen der beiden mTORC1-Substrate könnte darin liegen, dass MK-2206 bzw. Akt keinen direkten Einfluss auf diese haben. In der Studie von Neri *et al.*, in welcher mTORC1 in verschiedenen B-Vorläufer-ALL-Zelllinien direkt mittels RAD001 gehemmt wurde, zeigte sich in SEM, RS4;11 und REH bereits nach 4-stündiger Exposition eine komplette Dephosphorylierung von p70 S6K [5]. Auch in einer Arbeit von Sangai *et al.*, in welcher Brustkrebs-Zelllinien über 1 h – 48 h mit MK-2206 inkubiert wurden, war die Phosphorylierung von p70 S6K und 4E-BP1 nicht konstant. Trotz kontinuierlicher Inhibition der Akt-Kinase zeigte sich zu späteren Zeitpunkten wieder ein Anstieg von p-p70 S6K und p-4E-BP1 [51]. Dieses Phänomen könnte dafür sprechen, dass andere Signalwege am Proteinkomplex mTORC1 angreifen, wie beispielsweise der Ras-Signalweg via TSC1/TSC2.

Bei aktiver Akt-Kinase wird die GSK3 β durch Phosphorylierung gehemmt [20], wodurch Proliferation und Zellzyklus indirekt hochreguliert werden. In den beiden t(4;11)-Zelllinien konnte entsprechend der Abnahme von p-Akt ab 0,5 h (SEM) bzw. 24 h (RS4;11) auch eine verminderte Phosphorylierung und somit verstärkte Aktivität der GSK3 β nachgewiesen werden. In den beiden Zelllinien NALM-6 und REH zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine durch den Inhibitor veränderte Phosphorylierung der GSK3 β . Die Gesamtexpression sowie die Expression der phosphorylierten Form dieses Proteins war jedoch bereits in den NALM-6-Kontrollzellen sehr schwach. In der Studie von Simioni *et al.*, in welcher verschiedene T-ALL-Zelllinien über 4 h mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 inkubiert wurden, zeigte sich in allen Zellen eine Abnahme von p-GSK3 β , jedoch waren hierfür teils sehr hohe Konzentrationen (bis 10 μ M) erforderlich, während die Expression von p-Akt bereits bei der kleinsten untersuchten Konzentration MK-2206 (1 μ M) in zwei von drei Zelllinien enorm zurückging [17]. Es könnte demnach sein, dass für eine effizientere Inhibition der GSK3 β in B-ALL-Zellen höhere Konzentrationen MK-2206 erforderlich sind, allerdings werden dadurch auch unspezifische Effekte induziert.

Auch der Transkriptionsfaktor FoxO3 wird durch Akt gehemmt, wodurch es u.a. zur vermehrten Proliferation der Zellen sowie zur Inhibition der Apoptose kommt. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte das FoxO3A-Gesamtprotein in allen vier Zelllinien eine gleichmäßige Expression und war gut detektierbar, während p-FoxO3A bereits in den Kontrollzellen aller vier Zelllinien kaum exprimiert war. Nach längerer Inkubationszeit mit MK-2206 (24 h und 72 h) konnte lediglich in der Zelllinie NALM-6 eine verringerte Phosphorylierung des FoxO3A-Proteins festgestellt werden.

Der TSC1/TSC2-Komplex stellt einen Schnittpunkt zwischen PI3K/Akt- und Ras/Raf/Mek/ERK1/2-Signalweg dar. Eine Phosphorylierung von TSC1/TSC2 – und somit von dessen Downstream-Substrat mTOR – ist sowohl durch Akt als auch durch ERK1/2 möglich [24,32]. Im phosphorylierten Zustand ist ERK1/2 aktiv [148]. Während Gesamt-ERK1/2 in allen hier untersuchten B-ALL-Zelllinien über 72 h konstant exprimiert war, wies p-ERK1/2 in den Zelllinien SEM und RS4;11 starke Schwankungen auf. Während sich zu einigen Zeitpunkten eine gleichermaßen in den Kontroll- und exponierten Zellen hohe oder auch niedrige Expression von p-ERK1/2 zeigte, führte die Inkubation mit MK-2206 zu anderen Zeitpunkten zur Abnahme oder – wie auch in der Zelllinie NALM-6 – Zunahme der Phosphorylierung. Die Expression in den REH-Zellen hingegen war unverändert. Dieser sich zu unterschiedlichen Zeiten ändernde Phosphorylierungsstatus könnte darauf beruhen, dass das Protein zellzyklusabhängig aktiviert wird. So wurde in einigen Arbeiten bereits eine vom Zellzyklus abhängige Aktivierung von Mek/ERK festgestellt [149,150], u.a. in kultivierten Säugetierzellen (Maus-Fibroblasten) [151]. In einer Studie von Morgan *et al.* zeigte sich eine zellzyklusabhängige Aktivierung des ERK-Signalweges in myeloischen Leukämie-Zelllinien. Hier wurde gezeigt, dass die Aktivierung der *Mitogen-activated protein kinase kinase* (Mek), welche ERK1/2 stimuliert, in direktem Zusammenhang mit dem Zellzyklus steht. Die Hochregulierung von Mek trat in der G0/G1- und G2/M-Zellzyklusphase auf [152]. Auch in der Literatur sind sehr unterschiedliche Auswirkungen von MK-2206 auf ERK1/2 beschrieben. In einer Arbeit von Sefton *et al.* zeigten sich nach *in vivo*-Behandlung von Leiomyom-Zellen mit MK-2206 keine Effekte auf ERK1/2 [153], während es in einer Studie von Ramakrishnan *et al.* bei Myelomzellen und in einer Arbeit von Zhai *et al.* bei humanen Stammzellen eines hepatozellulären Karzinoms zu einem Anstieg von p-ERK1/2 kam [154,155]. Die Hochregulierung von p-ERK1/2 könnte auch für einen Gegenregulationsmechanismus sprechen, durch welchen versucht wird, mTOR zu aktivieren, um so Proliferation und Überleben der Zellen zu sichern, da die Stimulation der Akt-Kinase auf den Proteinkomplex vermindert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirksamkeit von MK-2206 dennoch nachgewiesen werden, da es in allen Zelllinien, trotz der möglichen mTORC1-Stimulation durch p-ERK1/2, zu einer mit der Inhibition von Akt übereinstimmenden verringerten Expression der mTORC1-Downstream-Substrate p-p70 S6K und p-4E-BP1 kam.

5.2 Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf B-ALL-Primärzellen in Kokultur

Insbesondere bei Patienten mit rearrangiertem *KMT2A*-Gen fehlt es an Therapiemöglichkeiten und entsprechend schlecht ist deren Prognose [89]. Der Akt-Inhibitor MK-2206 zeigte in dieser Arbeit eine vielversprechende Wirkung auf die Zelllinien SEM und RS4;11, welche die Translokation t(4;11) und somit ein rearrangiertes *KMT2A*-Gen aufweisen. Daher wurden die Effekte von MK-2206 auf Primärzellen zweier an B-ALL erkrankter erwachsener Patienten mit dieser Aberration näher untersucht. Patient 0159 weist eine starke, Patient 0122 eine moderate basale p-Akt-Expression auf. Nach Amplifikation der Primärzellen m.H. des von der Arbeitsgruppe etablierten PDX-Mausmodells erfolgte deren Kultivierung *ex vivo* in direktem Zell-Zell-Kontakt auf einem Feederlayer, den OP-9-Zellen (Stromazellen aus murinem Knochenmark) und somit in einer schützenden Mikroumgebung [73].

Aktuell (Stand: September 2021) gibt es kaum Studien, in welchen der Akt-Inhibitor MK-2206 an Primärzellen von Patienten mit B-ALL erforscht wurde [5]. Lediglich Neri *et al.* untersuchten bisher den Einfluss von MK-2206 auf primäre B-ALL-Zellen. Im Gegensatz zur hier vorliegenden Arbeit verwendeten sie jedoch nur eine Konzentration des Akt-Inhibitors und sie kultivierten die Patientenzellen in einer Monokultur [5]. Eine Kokultur scheint dieser jedoch überlegen zu sein. Das Überleben der Leukämie-Zellen wird maßgeblich durch die Mikroumgebung des Knochenmarkes und somit auch durch die Stromazellen beeinflusst. Diese tragen durch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen sowie mittels direkter Zell-Zell-Interaktion vermittelter Signale maßgeblich zum Überleben leukämischer Zellen bei [156]. Es konnte gezeigt werden, dass B-ALL-Zellen in Anwesenheit von aus dem Knochenmark-abgeleiteten Stromazellen länger überleben [157]. Als Kokultur-Technik wurde in der vorliegenden Arbeit ein direkter Zell-Zell-Kontakt verwendet, da Leukämie-Zellen bei direktem Kontakt zu einem Feederlayer stärker proliferieren [158]. Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass durch die Kultivierung der Patientenzellen in einer protektiven Kokultur-Umgebung der eigentliche Effekt von MK-2206 besser charakterisiert werden kann, da ein Zelltod aufgrund der Kultivierung unwahrscheinlicher ist [157]. Arbeiten, in welchen primäre Zellen von an B-ALL erkrankten Patienten auf einem OP-9-Feederlayer kultiviert und mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 inkubiert wurden, existieren bisher (Stand: September 2021), außerhalb dieser Arbeit, noch nicht.

Einige Studien berichten, dass die schützende Mikroumgebung der Stromazellen – trotz der Inkubation leukämischer Zellen mit verschiedenen Chemotherapeutika – die Apoptose

verhinderte [139,140,156,158]. So kam es in einer Arbeit von Mudry *et al.* nach Inkubation von B-ALL-Zellen in Kokultur mit Cytarabin bzw. Etoposid zu keiner Proliferationshemmung oder Apoptoseinduktion. Hieran schien die Interaktion mit dem *Vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) der Stromazellen von entscheidender Rolle zu sein [140]. In weiteren Arbeiten konnten auch bei akute myeloische Leukämie (AML)- und CLL-Zellen, durch deren direkten Kontakt mit Stromazellen, keine Apoptose durch Cytarabin, Daunorubicin bzw. Hydrokortison induziert werden [139,158].

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte die 72-stündige MK-2206-Inkubation der Primärzellen beider Patienten jedoch – trotz protektiver Mikroumgebung – vielversprechende Ergebnisse. So konnte bei beiden PDX-abgeleiteten Zellen, in Anwesenheit von OP-9, eine konzentrationsabhängige, ebenfalls von der basalen pAkt-Expression unabhängige, Verringerung der Viabilität und entsprechend eine Zunahme apoptotischer/nekrotischer Zellen nachgewiesen werden. Die anti-leukämischen Effekte wurden, wie auch bei den hier untersuchten Zelllinien, durch physiologisch erreichbare Konzentrationen erzielt [61].

In der Studie von Neri *et al.* reduzierte sich die Viabilität, welche mittels MTT-Assay ermittelt wurde, nach 72 h mit 1 μM MK-2206 im Durchschnitt um 20 % [5]. In der hier vorliegenden Arbeit verringerten sich die in Kokultur kultivierten und mittels CellTiter-Blue[®]-Assay analysierten viablen Patientenzellen um durchschnittlich 34 % und bei 5 μM um die Hälfte. In einer Studie von Simioni *et al.* wurden Primärzellen von an T-ALL erkrankten Kindern isoliert und anschließend *in vitro* als Monokultur kultiviert [17]. Die Kultivierung erfolgte in Anwesenheit von IL-7, da dieses Zytokin als starker proliferativer Stimulus auf die Zellen wirkt [134,136]. Die Inkubation der primären T-ALL-Zellen mit MK-2206 bewirkte, wie in der hier vorliegenden Arbeit, ausgeprägte anti-leukämische Effekte. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine Abnahme der Akt-Phosphorylierung sowie eine Wachstumshemmung der Primärzellen nachgewiesen werden. Auch die mittels MTT-Assay bestimmte Zellviabilität reduzierte sich nach 72 h deutlich. Der Akt-Inhibitor beeinträchtigte die Proliferation von T-Zellen gesunder Spender nur sehr geringfügig, während die zytotoxischen Effekte spezifisch bei den Leukämie-Zellen beobachtet wurden [17].

Die Verringerung der Viabilität der Primärzellen von Patient 0159 und 0122 war vereinbar mit den durchflusszytometrischen Messungen. Die in Kokultur kultivierten Zellen beider Patienten zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion vitaler Zellen sowie korrelierend damit eine Zunahme der früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen. Nach Inkubation der Primärzellen mit 1 μM MK-2206 war die Apoptoserate in der Studie von Neri *et al.* mit durchschnittlich 25 % ein wenig geringer als in der vorliegenden Arbeit [5].

Auch bei den primären T-ALL-Zellen in der Arbeit von Simioni *et al.* konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden [17]. In einer Studie von Kuijjer *et al.*, in welcher der Einfluss des Akt-Inhibitors auf Osteosarkom-Zelllinien untersucht wurde, kam es in einer Zelllinie mit *KRAS*-Mutation, im Gegensatz zu den anderen Zellen, zu keiner Proliferationshemmung durch MK-2206 [49]. In der hier vorliegenden Arbeit hingegen reagierten die Primärzellen beider B-ALL-Patienten sensibel auf die Inkubation mit MK-2206 und trotz der *KRAS*-Mutation von Patient 0122 konnten deutliche anti-leukämische Effekte nachgewiesen werden.

Während in dieser Arbeit bei den Primärzellen eine Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte, war dies bei den Zelllinien nicht der Fall. Dies könnte daran liegen, dass Primärzellen *in vitro* eine höhere Fragilität als Zelllinien aufweisen. In einem PDX-Mausmodell hingegen, hätten die primären Zellen eine ähnliche Kinetik wie die Zelllinien. Deshalb sollte die MK-2206-Inkubation der B-ALL-Primärzellen in einem Xenograft-Mausmodell zur Bestätigung der Apoptoseinduktion weiter untersucht werden.

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Unter den aktuell vorhandenen Therapien können v.a. bei erwachsenen Patienten mit B-ALL oftmals keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, weshalb neuartige Therapieansätze notwendig sind. Verschiedenste Tumorerkrankungen, so auch die B-ALL, weisen häufig einen dysregulierten PI3K/Akt-Signalweg auf. Dadurch kommt es zu einer mit einer schlechten Prognose assoziierten verstärkten Proliferation der malignen Zellen. Die Proteinkinase Akt kann fehlreguliert und konstitutiv aktiviert sein und spielt als zentrales Effektorprotein dieses Signalweges eine entscheidende Rolle bei der Stimulation von Zellwachstum und der Hemmung der Apoptose. Der Akt-Inhibitor MK-2206 konnte bereits in zahlreichen präklinischen sowie teilweise in klinischen Studien vielversprechende Effekte bei soliden Tumoren und der T-ALL zeigen. Der Einfluss auf B-ALL-Zellen wurde bisher jedoch kaum untersucht. Die zielgerichtete Inhibition der Akt-Kinase könnte einen erfolgversprechenden neuartigen therapeutischen Ansatz bei der B-ALL darstellen, weshalb in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Akt-Inhibitors MK-2206 auf B-ALL-Zelllinien und -Primärzellen untersucht wurde.

Die vier B-ALL-Zelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition von Proliferation und metabolischer Aktivität.

Lichtmikroskopisch konnten mit steigender Konzentration Veränderungen der Zellmorphologie nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung der Akt-Kinase wurde durch MK-2206 in allen Zelllinien reduziert und es zeigten sich Effekte auf die Downstream-Kaskade.

Die Primärzellen zweier an B-ALL erkrankter Patienten mit rearrangiertem *KMT2A*-Gen wurden *in vitro* in einem Kokultur-System kultiviert. Diese Methode ist technisch sehr anspruchsvoll, einer Monokultur jedoch weit überlegen. Die Inkubation mit MK-2206 führte trotz der schützenden Mikroumgebung zu deutlichen anti-leukämischen Effekten. So zeigte sich konzentrationsabhängig eine Verringerung der Zellviabilität sowie ein Anstieg apoptotischer Zellen.

Die zielgerichtete Inhibition der Akt-Kinase mittels MK-2206 bewirkte signifikante anti-leukämische Effekte sowohl auf B-ALL-Zelllinien als auch auf B-ALL-Primärzellen. MK-2206 stellt somit einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen, beispielsweise in Kombinationsstudien, dar. *In vivo*-Studien müssen zukünftig zeigen, ob eine klinische Evaluation bei der B-ALL sinnvoll ist. Spezifische Inhibitoren wie MK-2206 eröffnen zusammen mit weiteren neuartigen Therapiemöglichkeiten, beispielsweise Antikörpern, Tyrosinkinase-Inhibitoren und der CAR-T-Zell-Therapie, neue Perspektiven. Diese Behandlungsstrategien geben, auch in Kombination mit den bisher eingesetzten Chemotherapeutika, Hoffnung auf eine effektivere Therapie von Patienten mit B-ALL, bei denen aktuell noch keine zufriedenstellenden Behandlungsergebnisse erzielt werden können.

6 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	Translations-Initiationsfaktor 4E-bindendes-Protein-1
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AF4	<i>ALL1-fused gene from chromosome 4</i>
Akt	Proteinkinase Akt/ Proteinkinase B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Asp	Asparaginsäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF-R	<i>B-cell activating factor receptor</i>
B-ALL	B-lymphatische Leukämie
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK2	Casein Kinase II
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRLF2	<i>Cytokine receptor like factor 2</i>
CSF1R	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
cy	Intrazytoplasmatisch
dest.	Destillata

Abkürzungsverzeichnis

DLBCL	Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E17K	Austausch von Glutaminsäure (E) mit Lysin (K) an Aminosäureposition 17
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPOR	<i>Erythropoietin receptor</i>
ERK1/2	<i>Extracellular-signal regulated kinase1/2</i>
ETV6	<i>ETS variant transcription factor 6</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FASP	<i>Filter Aided Sample Preparation</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FLT-3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FMS	Tyrosinkinase FMS
FoxO3A	<i>Forkhead-Box-Protein O3A</i>
Fyn	<i>Fyn tyrosine kinase</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMALL	<i>German-Multicenter-ALL</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
HCl	Chlorwasserstoff
IAA	Iodacetamid

Abkürzungsverzeichnis

IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
<i>IKZF1</i>	<i>IKAROS family zinc finger 1</i>
IL-7	Interleukin-7
IL-7R α	Interleukin-7 Rezeptor alpha
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat-1
ISAS	Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften
J.	Jahre
JAK1/2	Januskinase 1/2
KCl	Kaliumchlorid
KIT	Tyrosinkinase KIT
KM	Knochenmark
<i>KMT2A</i>	Lysin Methyltransferase 2A
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
Lyn	<i>Lyn tyrosine kinase</i>
Mek	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
<i>MLL</i>	<i>Mixed lineage leukemia</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
NSG	<i>NOD scid gamma</i>

Abkürzungsverzeichnis

p	Phosphoryliert
p70 S6K	p70 S6-Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>PAX5</i>	<i>Paired box 5</i>
PB	Peripheres Blut
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate-buffered saline with Tween[®]</i>
PDGFRB	<i>Platelet derived growth factor receptor beta</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDX	Patienten-abgeleitetes Xenograft
PE	Phycoerythrin
PH	Pleckstrin-Homologie
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R 110	Rhodamin 110
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RUNX1	<i>RUNX family transcription factor 1</i>
RxRxxS/T-B	R – Arginin, x – beliebige Aminosäure, S – Serin, T – Threonin, B – Aminosäure mit hydrophoben Resten
s	<i>Surface</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
Src	<i>Sarcoma tyrosine kinase</i>
Syk	<i>Spleen associated tyrosine kinase</i>
T-ALL	T-lymphatische Leukämie
<i>TCF3</i>	<i>Transcription factor 3</i>
Thr	Threonin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSC1/TSC2	Tuberöse Sklerose Protein 1/2-Komplex
TULA-AIF	<i>T-cell ubiquitin ligand-apoptosis-inducing factor</i>
Tyr	Tyrosin
UHPLC	<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium</i>
ZNS	Zentralnervensystem

7 Literaturverzeichnis

- [1] Uko, N. E. *et al.* Akt Pathway Inhibitors. *Curr Top Med Chem* **20**, 883-900 (2020).
- [2] Simioni, C. *et al.* Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mechanistic target of rapamycin signaling pathway in B-lineage acute lymphoblastic leukemia: An update. *J Cell Physiol* **233**, 6440-6454 (2018).
- [3] Wymann, M. P. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 366-76 (2003).
- [4] Liu, P. *et al.* Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 627-44 (2009).
- [5] Neri, L. M. *et al.* Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia* **28**, 739-748 (2014).
- [6] Polak, R. *et al.* The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: Implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* **119**, 911-923 (2012).
- [7] Vignot, S. *et al.* mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* **16**, 525-37 (2005).
- [8] Kornblau, S. M. *et al.* Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood* **108**, 2358-2365 (2006).
- [9] Zhou, L. *et al.* The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* **27**, 255-261 (2010).
- [10] Liu, D. *et al.* Activation of mammalian target of rapamycin pathway confers adverse outcome in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **117**, 3763-3773 (2011).
- [11] Hirashima, K. *et al.* Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 2486-2493 (2010).
- [12] Morishita, N. *et al.* Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 83-89 (2012).
- [13] Naderali, E. *et al.* Positive Effects of PI3K/Akt Signaling Inhibition on PTEN and P53 in Prevention of Acute Lymphoblastic Leukemia Tumor Cells. *Adv Pharm Bull* **9**, 470-480 (2019).
- [14] Tasian, S. K. *et al.* Targeting the PI3K/ mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Front Oncol* **4**, 108 (2014).

- [15] Moriyama, T. *et al.* Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **125**, 3988–95 (2015).
- [16] Greaves, M. Leukaemia ‘firsts’ in cancer research and treatment. *Nat Rev Cancer* **16**, 163–172 (2016).
- [17] Simioni, C. *et al.* Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **26**, 2336–2342 (2012).
- [18] Gorlick, R. *et al.* Testing of the Akt/PKB inhibitor MK-2206 by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* **59**, 518-24 (2012).
- [19] Gomes, A. M. *et al.* Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. *Haematologica* **99**, 1062–1068 (2014).
- [20] Manning, B. D. *et al.* AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-74 (2007).
- [21] Sarbassov, D. D. *et al.* Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–1101 (2005).
- [22] Willems, L. *et al.* The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 1195–1202 (2012).
- [23] Thomas, G. V. mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr Opin Genet Dev* **16**, 78–84 (2006).
- [24] Crino, P. B. *et al.* The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med* **355**, 1345-56 (2006).
- [25] Wu, D. *et al.* GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* **35**, 161-8 (2010).
- [26] Farhan, M. *et al.* FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Int J Biol Sci* **13**, 815–827 (2017).
- [27] Tzivion, G. *et al.* FoxO transcription factors; regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1938–1945 (2011).
- [28] Xie, M. *et al.* Akt2 mediates glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies through FoxO3a/Bim axis and serves as a direct target for resistance reversal. *Cell Death Dis* **9**, 1013 (2018).
- [29] Dobson, M. *et al.* Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1453–1464 (2011).
- [30] Steelman, L. S. *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* **22**, 686-707 (2008).

- [31] Xie, Y. *et al.* Power of PTEN/AKT: Molecular switch between tumor suppressors and oncogenes. *Oncol Lett* **12**, 375–378 (2016).
- [32] Martelli, A. M. *et al.* The emerging role of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 991-1002 (2010).
- [33] Garnett, M. J. *et al.* Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* **6**, 313-319 (2004).
- [34] Osaki, M. *et al.* PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **9**, 667-76 (2004).
- [35] Rudelius, M. *et al.* Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* **108**, 1668-76 (2006).
- [36] Wang, J. *et al.* AKT Hyperactivation and the Potential of AKT-Targeted Therapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Pathol* **187**, 1700–1716 (2017).
- [37] Min, Y. H. *et al.* Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* **17**, 995-7 (2003).
- [38] Carpten, J. D. *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439–444 (2007).
- [39] Mullighan, C. G. *et al.* BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110–114 (2008).
- [40] Fuka, G. *et al.* Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. *Leukemia* **26**, 927–933 (2012).
- [41] Andrae, J. *et al.* Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* **22**, 1276–1312 (2008).
- [42] Okumura, N. *et al.* PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv Hematol* **2012**, 843085 (2012).
- [43] Dumble, M. *et al.* Discovery of Novel AKT Inhibitors with Enhanced Anti-Tumor Effects in Combination with the MEK Inhibitor. *PLoS One* **9**, e100880 (2014).
- [44] Trametinib and Akt Inhibitor GSK2141795 in Treating Patients With Acute Myeloid Leukemia. NCT01907815. *ClinicalTrials.gov*: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01907815?cond=GSK2141795&draw=2&rank=8> (letzter Zugriff am 02.05.2020).
- [45] Rhodes, N. *et al.* Characterization of an Akt Kinase Inhibitor With Potent Pharmacodynamic and Antitumor Activity. *Cancer Res* **68**, 2366-74 (2008).

- [46] Levy, D. S. *et al.* AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* **113**, 1723-9 (2009).
- [47] Study to Investigate AKT Inhibitor GSK690693 in Subjects With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies. NCT00666081. *ClinicalTrials.gov*: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00666081?cond=gsk690693&draw=2&rank=2> (letzter Zugriff am 29.12.2020).
- [48] Zhou, J. *et al.* Inducing Effect of Akt Kinase Inhibitor MK2206 on Apoptosis in U937 Cells and RS4;11 Cells, and Its Mechanism. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **23**, 627-32 (2015).
- [49] Kuijjer, M. L. *et al.* Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy. *BMC Med Genomics* **7**, 4 (2014).
- [50] Yan, L. AACR Annual Meeting 2009: Abstract Number: DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Proc Am Assoc Cancer Res* (2009).
- [51] Sangai, T. *et al.* Biomarkers of Response to Akt Inhibitor MK-2206 in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **18**, 5816-28 (2012).
- [52] Zhao, Y.-Y. *et al.* Effects of an oral allosteric AKT inhibitor (MK-2206) on human nasopharyngeal cancer in vitro and in vivo. *Drug Des Devel Ther* **8**, 1827–1837 (2014).
- [53] Meng, J. *et al.* Combination Treatment with MEK and AKT Inhibitors Is More Effective than Each Drug Alone in Human Non-Small Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo. *PLoS One* **5**, e14124 (2010).
- [54] Hirai, H. *et al.* MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **9**, 1956–1967 (2010).
- [55] Pistor, M. *et al.* 1,25-OH₂ vitamin D₃ and AKT-inhibition increase glucocorticoid induced apoptosis in a model of T-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res Rep* **9**, 38–41 (2018).
- [56] Alameen, A. A. M. *et al.* Healthy CD4⁺ T lymphocytes are not affected by targeted therapies against the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **7**, 55690–55703 (2016).
- [57] Cani, A. *et al.* Triple Akt inhibition as a new therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **6**, 6597–6610 (2015).
- [58] Spartà, A. M. *et al.* Therapeutic targeting of Polo-like kinase-1 and Aurora kinases in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Cycle* **13**, 2237–2247 (2014).

- [59] Tosello, V. *et al.* Calcineurin complex isolated from T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells identifies new signaling pathways including mTOR/AKT/S6K whose inhibition synergize with calcineurin inhibition to promote T-ALL cell death. *Oncotarget* **7**, 45715–45729 (2016).
- [60] Piovan, E. *et al.* Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **24**, 766–776 (2013).
- [61] Yap, T. A. *et al.* First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **29**, 4688-95 (2011).
- [62] Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* SU2C Phase Ib Study of Paclitaxel and MK-2206 in Advanced Solid Tumors and Metastatic Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* **107** (2015).
- [63] Yap, T. A. *et al.* Interrogating two schedules of the AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors incorporating novel pharmacodynamic and functional imaging biomarkers. *Clin Cancer Res* **20**, 5672-85 (2014).
- [64] MK 2206. *ClinicalTrials.gov*:
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=mk+2206&cntry=&state=&city=&dis>
 t= (letzter Zugriff am 07.08.2021).
- [65] Larsen, J. T. *et al.* Akt inhibitor MK-2206 in combination with Bendamustine and Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from the N1087 Alliance Study. *Am J Hematol* **92**, 759–763 (2017).
- [66] Richter, A. *et al.* Casein Kinase II Inhibition By CX-4945 and Epigenetic Modulation By Decitabine Demonstrate Significant Antiproliferative Activity As Single Agents As Well As in Combination in Acute B-Lymphoblastic Leukemia Cells. *Blood* **130** (Supplement 1), 3887 (2017):
<https://ashpublications.org/blood/article/130/Supplement%201/3887/71713/Casein-Kinase-II-Inhibition-By-CX-4945-and> (letzter Zugriff am 02.05.2020).
- [67] Nitulescu, G. M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **48**, 869–885 (2016).
- [68] Bilodeau, M. T. *et al.* Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: a naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 3178–3182 (2008).
- [69] Kapoor, I. *et al.* Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death and Disease* **10**, 924 (2019).
- [70] Oki, Y. *et al.* Phase II study of an AKT inhibitor MK2206 in patients with relapsed or refractory lymphoma. *Br J Haematol* **171**, 463-70 (2015).

- [71] Konopleva, M. Y. *et al.* Preclinical and Early Clinical Evaluation of the Oral AKT Inhibitor, MK-2206, for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **20**, 2226–2235 (2014).
- [72] Toosi, B. *et al.* VS-5584 as a PI3K/mTOR inhibitor enhances apoptotic effects of subtoxic dose arsenic trioxide via inhibition of NF- κ B activity in B cell precursor-acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Pharmacother* **102**, 428-437 (2018).
- [73] Richter, A. *et al.* Combined Casein Kinase II inhibition and epigenetic modulation in acute B-lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* **19**, 202 (2019).
- [74] Schult, C. *et al.* The Dual Kinase Inhibitor NVP-BEZ235 in Combination With Cytotoxic Drugs Exerts Anti-Proliferative Activity Towards Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Anticancer Res* **32**, 463-74 (2012).
- [75] Terwilliger, T. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* **7**, e577 (2017).
- [76] Gökbuget, N. Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen. *Onkologe* **23**, 522–531 (2017).
- [77] Evangelisti, C. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition potentiates glucocorticoid response in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* **233**, 1796-1811 (2018).
- [78] Gökbuget, N. *et al.* Recommendations of the European working group for adult ALL. 1. Auflage, UNI-MED Verlag (2011).
- [79] Gökbuget, N. *et al.* Akute Lymphatische Leukämie (ALL). *Onkopedia* (Stand: Juli 2020):
<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-lymphatische-leukaemie-all/@@guideline/html/index.html#ID0E2NAE> (letzter Zugriff am 08.09.2021).
- [80] Akute lymphatische Leukämie (ALL). *Kompetenznetz akute und chronische Leukämien*:
<https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/> (letzter Zugriff am 26.04.2020).
- [81] Akute Leukämien. *AMBOSS Wissen für Mediziner*:
https://next.amboss.com/de/article/iT0Jq2#wl0h_T (letzter Zugriff am 01.01.2021).
- [82] Herold, G. *et al.* Akute Leukämie. *Innere Medizin*, 96-98 (2018).
- [83] Iacobucci, I. *et al.* Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* **35**, 975–983 (2017).
- [84] Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764 (2007).

- [85] Armstrong, S. A. *et al.* Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 6306-15 (2005).
- [86] Huang, F.-L. *et al.* Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. *Oncol Lett* **20**, 448–454 (2020).
- [87] Roelf, C. *et al.* Decitabine demonstrates antileukemic activity in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *J Hematol Oncol* **11**, 62 (2018).
- [88] Ramakers-van Woerden, N. L. *et al.* In vitro drug-resistance profile in infant acute lymphoblastic leukemia in relation to age, MLL rearrangements and immunophenotype. *Leukemia* **18**, 521–529 (2004).
- [89] Winters, A. C. *et al.* MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. *Front Pediatr* **5**, 4 (2017).
- [90] Stam, R. W. MLL-AF4 driven leukemogenesis: what are we missing? *Cell Research* **22**, 948–949 (2012).
- [91] Xia, Z.-B. *et al.* The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14028–14033 (2005).
- [92] Andersson, A. K. *et al.* The landscape of somatic mutations in Infant MLL rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet* **47**, 330–337 (2015).
- [93] Schwab, C. *et al.* Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics. *Hemasphere* **2**, e53 (2018).
- [94] ETV6-PDGFRB. *Labor Berlin Kompetenz von Charité und Vivantes*: <http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=3&ue1=141&u=5399&index=> (letzter Zugriff am 29.04.2020).
- [95] Bujko, M. *et al.* Repetitive genomic elements and overall DNA methylation changes in acute myeloid and childhood B-cell lymphoblastic leukemia patients. *Int J Hematol* **100**, 79–87 (2014).
- [96] Stumpel, D. J. P. M. *et al.* Absence of global hypomethylation in promoter hypermethylated Mixed Lineage Leukaemia-rearranged infant acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* **49**, 175–184 (2013).
- [97] Inaba, H. *et al.* Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **381**, 1943–55 (2013).
- [98] Pasqualini, C. *et al.* Nouvelles perspectives dans l’immunothérapie des cancers pédiatriques. *Bull Cancer* **105** (Supplement 1), S68-S79 (2018).

- [99] Lanza, F. *et al.* New monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Minerva Med* **111**, 478-490 (2020).
- [100] CAR-T-Zelltherapie, Nachbeobachtung: Wie erfolgt die Nachbeobachtung der Patienten? *Kinderkrebsinfo.de*:
https://www.kinderkrebsinfo.de/patienten/behandlung/behandlungsmethoden/car_t_zelltherapie/nachbeobachtung/index_ger.html (letzter Zugriff am 14.03.2021).
- [101] June, C. H. *et al.* Chimeric Antigen Receptor Therapy. *N Engl J Med* **379**, 64–73 (2018).
- [102] Dong, Z. *et al.* Antitumor efficacy of BAFF-R targeting CAR T cells manufactured under clinic-ready conditions. *Cancer Immunol Immunother* **69**, 2139-2145 (2020).
- [103] Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* **111**, A3.B.1–A3.B.3 (2015).
- [104] Schröterová, L. *et al.* Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro* **23**, 1406-11 (2009).
- [105] Peskin, A. V. *et al.* A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta* **293**, 157-66 (2000).
- [106] Zimmermann, I. Kollaterale Chemosensitivität/ -resistenz bei akuten myeloischen Leukämien. Dissertation 2006, LMU München: Medizinische Fakultät.
- [107] Compton, S. J. *et al.* Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369–374 (1985).
- [108] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
- [109] “Technical Bulletin. CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay. Instructions for Use of Products G8080, G8081 and G8082.” *Promega* 2016,
<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf?la=en> (letzter Zugriff am 28.11.2020).
- [110] Richter, A. *et al.* Combined Application of Pan-AKT Inhibitor MK-2206 and BCL-2 Antagonist Venetoclax in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* **22**, 2771 (2021).
- [111] Van Engeland, M. *et al.* Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**, 1-9 (1998).
- [112] Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85 (1985).

- [113] Granvogl, B. Entwicklung neuer Methoden zur massenspektrometrischen Charakterisierung von Membranproteinen. Dissertation 2008, LMU München: Fakultät für Biologie.
- [114] Thiede, B. *et al.* Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**, 496-502 (2000).
- [115] Burkhart, J. M. *et al.* Systematic and quantitative comparison of digest efficiency and specificity reveals the impact of trypsin quality on MS-based proteomics. *Journal of proteomics* **75**, 1454-1462 (2012).
- [116] Lottspeich, F. *et al.* Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag* (2012).
- [117] Quest Graph™ IC50 Calculator. *AAT Bioquest, Inc.* 2020, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator> (letzter Zugriff am 24.04.2020).
- [118] Gu, Y. *et al.* The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* **71**, 701-708 (1992).
- [119] McCabe, N. R. *et al.* Cloning of cDNAs of the MLL gene that detect DNA rearrangements and altered RNA transcripts in human leukemic cells with 11q23 translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11794-11798 (1992).
- [120] Domer, P. H. *et al.* Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7884-7888 (1993).
- [121] Kersey, J. H. *et al.* Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia* **12**, 1561–1564 (1998).
- [122] Thomas, M. *et al.* Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* **106**, 3559-66 (2005).
- [123] Dörrie, J. *et al.* Regulation of CD95 Expression and CD95-mediated Cell Death by Interferon-Gamma in Acute Lymphoblastic Leukemia With Chromosomal Translocation t(4;11). *Leukemia* **13**, 1539-47 (1999).
- [124] Daniel, P. T. *et al.* Pharmakogenomik maligner Tumoren. *Der Onkologe, Springer Verlag*, 46-54 (2004).
- [125] Daniel, P. T. Molekulare Grundlagen der Apoptose. *Grundlagen der Molekularen Medizin, 3. Auflage, Springer Verlag*, 159-203 (2008).
- [126] Böhm, I. *et al.* Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. *Mol Imaging Biol* **5**, 2–14 (2003).

- [127] Porter, A. G. *et al.* Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 99-104 (1999).
- [128] Simioni, C. *et al.* Activity of the Novel mTOR Inhibitor Torin-2 in B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Potential to Prevent Akt Reactivation. *Oncotarget* **5**, 10034-47 (2014).
- [129] Saikumar P. *et al.* Apoptosis and Cell Death. *Basic Concepts of Molecular Pathology*, Springer Verlag, 29-40 (2009).
- [130] D'Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol Int* **43**, 582-592 (2019).
- [131] Thoreen, C. C. *et al.* An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *J Biol Chem* **284**, 8023–8032 (2009).
- [132] Sevrioukova, I. F. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2545–2579 (2011).
- [133] Saeki, K. *et al.* Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* **7**, 1263–1269 (2000).
- [134] Silva, A. *et al.* Intracellular reactive oxygen species are essential for PI3K/Akt/mTOR-dependent IL-7-mediated viability of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia* **25**, 960–967 (2011).
- [135] Hotchkiss, R. S. *et al.* Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med* **361**, 1570-1583 (2009).
- [136] Barata, J. T. The impact of PTEN regulation by CK2 on PI3K-dependent signaling and leukemia cell survival. *Adv Enzyme Regul* **51**, 37–49 (2011).
- [137] Richter, A. *et al.* Influence of Casein kinase II inhibitor CX-4945 on BCL6-mediated apoptotic signaling in B-ALL in vitro and in vivo. *BMC Cancer* **20**, 184 (2020).
- [138] Langhammer, T.-S. *et al.* PI3K/Akt Signaling Interacts With Wnt/ β -Catenin Signaling But Does Not Induce An Accumulation Of β -Catenin In The Nucleus Of Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Blood* **122**, 4886 (2013).
- [139] Panayiotidis, P. *et al.* Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* **92**, 97-103 (1996).
- [140] Mudry, R. E. *et al.* Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* **96**, 1926-32 (2000).

- [141] Evangelisti, C. *et al.* Preclinical testing of the Akt inhibitor triciribine in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* **226**, 822–831 (2011).
- [142] Liu, P. *et al.* Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **15**, 1340–50 (2013).
- [143] Yuan, H.-X. *et al.* The Sin1 PH domain connects mTORC2 to PI3K. *Cancer Discov* **5**, 1127–1129 (2015).
- [144] Tamburini, J. *et al.* Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood* **111**, 379-82 (2008).
- [145] Meric-Bernstam, F. *et al.* PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* **18**, 1777-89 (2012).
- [146] Evangelisti, C. *et al.* Targeted inhibition of mTORC1 and mTORC2 by active-site mTOR inhibitors has cytotoxic effects in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **25**, 781–791 (2011).
- [147] Yang, Q. *et al.* Expanding mTOR signaling. *Cell Research* **17**, 666–681 (2007).
- [148] Lake, D. *et al.* Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* **73**, 4397–4413 (2016).
- [149] Guadagno, T. M. *et al.* Requirement for MAPK activation for normal mitotic progression in *Xenopus* egg extracts. *Science* **282**, 1312-5 (1998).
- [150] Hayne, C. *et al.* MEK inhibition and phosphorylation of serine 4 on B23 are two coincident events in mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 675–680 (2004).
- [151] Shapiro, P.S. *et al.* Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J Cell Biol* **142**, 1533–1545 (1998).
- [152] Morgan, M. A. *et al.* Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood* **97**, 1823–1834 (2001).
- [153] Sefton, E. C. *et al.* MK-2206, an AKT Inhibitor, Promotes Caspase-Independent Cell Death and Inhibits Leiomyoma Growth. *Endocrinology* **154**, 4046-57 (2013).
- [154] Ramakrishnan, V. *et al.* Anti-Myeloma Activity of Akt Inhibition Is Linked to the Activation Status of PI3K/Akt and MEK/ERK Pathway. *PLoS One* **7**, e50005 (2012).

[155] Zhai, B. *et al.* MK2206 overcomes the resistance of human liver cancer stem cells to sorafenib by inhibition of pAkt and upregulation of pERK. *Tumor Biology* **37**, 8047–8055 (2016).

[156] Gibson, L. F. Survival of B lineage leukemic cells: signals from the bone marrow microenvironment. *Leuk Lymphoma* **43**, 19-27 (2002).

[157] Manabe, A. *et al.* Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **79**, 2370-7 (1992).

[158] Garrido, S. M. *et al.* Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol* **29**, 448-57 (2001).

8 Anhang

8.1 Materialien

8.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
6-, 24- und 96-Well-Platten	Greiner Bio-One
96-Deepwell-Filterplatten (AcroPrep™ <i>Advance Filter Plates for Aqueous Filtration</i>)	Pall
96-Deepwell-Platten	Eppendorf; Sarstedt
96-Well-Platten mit flachem Boden	Greiner Bio-One
Combitips für Multipipette	Eppendorf
Deckgläser (22x22 mm)	Thermo Fisher
Edelstahlclips	Tharmac
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt
FACS-Röhrchen, Falcon™ (5 ml)	BD
Filterkarten	Tharmac
Gelloader-Pipettenspitzen (20 µl, 100 µl)	Biozym
Glasplatte	
Inkubationsschälchen	
Midi-Fertiggele (Criterion™ TGX™ <i>Precast Gels</i>)	Bio-Rad
Objektträger	Engelbrecht

Anhang

Objektträger (Cytoträger)	Tharmac
Objektträgerkasten	
Pasteurpipetten aus Glas	Fisher Scientific
Pasteurpipetten, Einweg (1 ml)	Carl Roth
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter, SurPhob SafeSeal [®] <i>Low Binding</i> (10 µl, 100 µl, 300 µl, 1250 µl)	Biozym
PVDF-Membranen (Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer Pack Midi)	Bio-Rad
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße, Protein LoBind (1,5 ml)	Eppendorf
Rotilabo [®] -Faltenfilter	Carl Roth
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Single Cellfunnel [®]	Tharmac
Skalpell	Dahlhausen
T175-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
T25-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
T75-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Verschlussmatten für 96-Deepwell-Platten	Sarstedt

8.1.2 Geräte

Tabelle 12: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
Brutschrank (37 °C)	Heraeus Instruments
Brutschrank, INB 300 (37 °C)	Memmert
Brutschrank, INB 300 (56 °C)	Memmert
Captair™ Chem Filterabzug, Filtair 834	Erlab
Criterion™ Elektrophoresekammer	Bio-Rad
FACSVerse™	BD
Festphasenextraktionsgerät, Resolvex™ A200	Tecan Trading AG
Gamma-Bestrahlungsanlage, IBL 637	CIS Bio
Hybridisierungsofen, 7601	GFL
Hybridisierungsofen, Unitherm Model 12/24	Uniequip
Kühlschränke	Electrolux; Siemens; Liebherr
Kühltruhe (-20 °C)	Liebherr
Kühltruhen (-80 °C)	Heraeus Instruments; Sanyo; Thermo Fisher
Lichtmikroskop (EVOS™ XL Core Cell Imaging System)	Thermo Fisher
Lichtmikroskop, TELAVAL 3	Carl Zeiss Jena
Mehrkanalpipette	Eppendorf
Multipipette	Eppendorf
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Odyssey® CLx Imaging System	LI-COR

Anhang

pH-Meter	Mettler-Toledo
Photometer (GloMax [®] -Multi Detection System)	Promega
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe, acu	INTEGRA Biosciences
Pipettierhilfe, accu-jet [®] pro	Brand
Plattenschüttler, Duomax 1030	Heidolph
Plattenschüttler, ST 5	CAT
Präzisionswaage, 572	Kern & Sohn
Rotilabo [®] -Heiz- und Magnetrührer, MH 15	Carl Roth
Sterilwerkbank, Herasafe	Heraeus Instruments
Stromversorgungsgerät, PowerPac Universal [™]	Bio-Rad
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad
Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie-Gerät (UltiMate 3000 UHPLC-System mit Monolithen-Technologie)	Thermo Fisher
Ultraschalllanze, UW 2070	Bandelin
Vakuumpumpe, Vacusafe	INTEGRA Biosciences
Vortexer	Scientific Industries
Vortexer, MS 1	IKA
Wasserbad	GFL
Zentrifuge, 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge, 5418	Eppendorf
Zentrifuge, 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge, Cytospin 3	Shandon

Zentrifuge, J6-MI	Beckman
Zentrifuge, Mikro 22R	Hettich
Zentrifuge, ROTINA 38R	Hettich

8.1.3 Chemikalien

Tabelle 13: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10 %-ige Ameisensäure	Biosolve
Alpha-Medium, mit Ribo- und Desoxyribonukleosiden	Merck Millipore
Alpha-Medium, ohne Ribo- und Desoxyribonukleoside	Sigma-Aldrich
Annexin V Bindungspuffer (10x)	BD
BCA-Reagenz (Pierce™ <i>BCA Protein Assay Reagent A and B</i>)	Thermo Fisher
Bradford-Reagenz (<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Carl Roth
CaCl ₂	Merck
CellTiter-Blue®-Reagenz	Promega
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck Millipore
DMSO	Sigma-Aldrich
DPBS	PAN-Biotech
DTT	Roche
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol 96 Vol. %	Walter-CMP
FKS Superior	Biochrom

Anhang

Gibco™ DPBS	Thermo Fisher
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck
Glycerin	Merck Millipore
Glycin	Carl Roth
Harnstoff	Sigma-Aldrich
HCl	Zentralapotheke Universität Rostock
IAA	Sigma-Aldrich
Iscove Basal-Medium	Merck Millipore
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
KCl	Merck Millipore
May-Grünwald Eosin-Methylenblaulösung	Merck Millipore
Methanol	J.T. Baker
MK-2206 2HCl	Selleckchem
NaCl	Carl Roth; Merck Millipore
Natriumazid	Carl Roth
NH ₄ HCO ₃	Sigma-Aldrich
Odyssey® <i>Blocking Buffer</i> (PBS)	LI-COR
PBS <i>Powder</i>	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphatase-Inhibitor-Tabletten (PhosSTOP™)	Sigma-Aldrich
Ponceau S-Lösung	Serva
Protease-Inhibitor-Tabletten (cOmplete™, <i>Mini</i> , <i>EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>)	Sigma-Aldrich
Proteinstandard für SDS-PAGE (Chameleon® <i>Duo</i> <i>Pre-stained Protein Ladder</i>)	LI-COR

Proteinstandards für BCA-Assay (BSA-Standard)	Thermo Fisher
Proteinstandards für Bradford-Assay (BSA-Standard)	Serva
Puffertabletten (pH 7,2)	Merck
RIPA-Puffer (10x)	Cell Signaling Technology
RPMI 1640-Medium	Merck Millipore
SDS	Serva
SDS Pellets	Carl Roth
TRIS Base	Carl Roth
TRIS Base	PanReac AppliChem
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin	Promega
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom
Tween [®] 20	Carl Roth
WST-1-Reagenz	Roche

8.1.4 Zelllinien und Primärzellen

Tabelle 14: Liste der verwendeten Zelllinien und Primärzellen

Zelllinie	Erworben von	
NALM-6	DSMZ	
OP-9	ATCC	
REH	DSMZ	
RS4;11	DSMZ	
SEM	DSMZ	
Primärzellen	ID Maus	ID ALL-Patient
Viable Milzzellen	26	0159
Viable Milzzellen	29	0122

8.1.5 Antikörper

Tabelle 15: Liste der verwendeten Antikörper

Primär-Antikörper für den Western Blot	Klon	Hersteller
p-Akt (Ser473) <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology
Akt <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology
p-GSK3 β (Ser9) <i>Mouse Anti-human</i>	D2Y9Y	Cell Signaling Technology
GSK3 β <i>Mouse Anti-human</i>	3D10	Cell Signaling Technology
p-p70 S6K (Thr389) <i>Rabbit Anti-human</i>	108D2	Cell Signaling Technology
p70 S6K <i>Rabbit Anti-human</i>	49D7	Cell Signaling Technology
p-4E-BP1 (Ser65) <i>Rabbit Anti-human</i>	174A9	Cell Signaling Technology
4E-BP1 <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology
p-FoxO3A (Ser253) <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology
FoxO3A <i>Rabbit Anti-human</i>	75D8	Cell Signaling Technology
Cleaved Caspase-3 (Asp175) <i>Rabbit Anti-human</i>	D175	Cell Signaling Technology
Caspase-3 <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology

Anhang

p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) <i>Rabbit Anti-human</i>	polyklonal	Cell Signaling Technology
ERK1/2 <i>Rabbit Anti-human</i>	137F5	Cell Signaling Technology
GAPDH <i>Mouse Anti-human</i>	ZG003	Invitrogen
Sekundär-Antikörper für den Western Blot	Klon	Hersteller
IRDye® 680RD <i>Goat Anti-Mouse</i>	polyklonal	LI-COR
IRDye® 800CW <i>Goat Anti-Mouse</i>	polyklonal	LI-COR
IRDye® 680RD <i>Goat Anti-Rabbit</i>	polyklonal	LI-COR
IRDye® 800CW <i>Goat Anti-Rabbit</i>	polyklonal	LI-COR
Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	Klon	Hersteller
Annexin V-FITC	-	BD
CD19-PE	4G7	BD
Propidiumiodid (PI)	-	Sigma-Aldrich

8.1.6 Puffer

1x Elektrophoresepuffer

0,075 M TRIS Base
0,5 M Glycin
0,01 M SDS
Aqua dest. ad 9000 ml

10x PBS/Tween-Puffer (pH 7,4)

2,5 M NaCl
0,05 M KCl
0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
0,04 M Kaliumdihydrogenphosphat
0,5 % v/v Tween[®] 20
Aqua dest. ad 2000 ml

2x Probenpuffer

0,01 M SDS
22 Vol. % Glycerin
0,005 M EDTA (5 mM, pH 8)
25 Vol. % Sammelgelpuffer
1 Spatelspitze Bromphenolblau
Aqua dest. ad 100 ml

Anode II-Puffer (pH 10,4)

0,3 M Tris Base
20 Vol. % Methanol
Aqua dest. ad 1000 ml

Lysepuffer

50 mM TRIS Base
150 mM NaCl
1 Vol. % SDS

Pufferlösung (pH 7,2)

1 Puffertablette (pH 7,2)
Aqua dest. ad 1000 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

0,5 M TRIS Base

0,01 M SDS

Aqua dest. ad 100 ml

Stripping-Puffer (pH 2)

0,02 M Glycin

0,07 M SDS

Aqua dest. ad 1000 ml

Verdaupuffer

50 mM NH_4HCO_3

0,1 M Harnstoff

1 mM CaCl_2

11 Vol. % Trypsin

8.2 Ergänzende Abbildungen und Tabellen

Tabelle 16: Proliferation (relative Zellzahl) und metabolische Aktivität nach 48 h und 72 h Inkubation mit MK-2206.

Zeitpunkt	Konzentration	SEM		RS4;11		NALM-6		REH	
		relative Zellzahl	metabol. Aktivität	relative Zellzahl	metabol. Aktivität	relative Zellzahl	metabol. Aktivität	relative Zellzahl	metabol. Aktivität
48h	DMSO	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,01 μM	98%	97%	109%	93%	92%	92%	104%	100%
	0,05 μM	93%	81%	93%	82%	89%	83%	98%	82%
	0,1 μM	84%	73%	80%	80%	71%	74%	90%	75%
	0,5 μM	66%	59%	72%	60%	69%	43%	80%	43%
	1 μM	56%	60%	78%	61%	50%	45%	72%	36%
	5 μM	36%	43%	48%	40%	29%	21%	50%	25%
	10 μM	28%	20%	41%	28%	4%	0%	10%	1%
72h	DMSO	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,01 μM	113%	104%	99%	98%	127%	103%	90%	97%
	0,05 μM	98%	92%	103%	92%	103%	99%	82%	84%
	0,1 μM	95%	79%	84%	83%	79%	100%	79%	73%
	0,5 μM	56%	54%	72%	55%	50%	63%	62%	33%
	1 μM	51%	48%	70%	53%	53%	46%	51%	19%
	5 μM	28%	19%	45%	28%	18%	9%	40%	9%
	10 μM	17%	8%	31%	17%	5%	0%	7%	0%

Die B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH wurden für 48 h bzw. 72 h mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206 inkubiert. In der Tabelle sind die Mittelwerte der relativen Zellzahl bzw. der metabolischen Aktivität aus mind. drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung, die metabolische Aktivität mittels WST-1-Assay bestimmt.

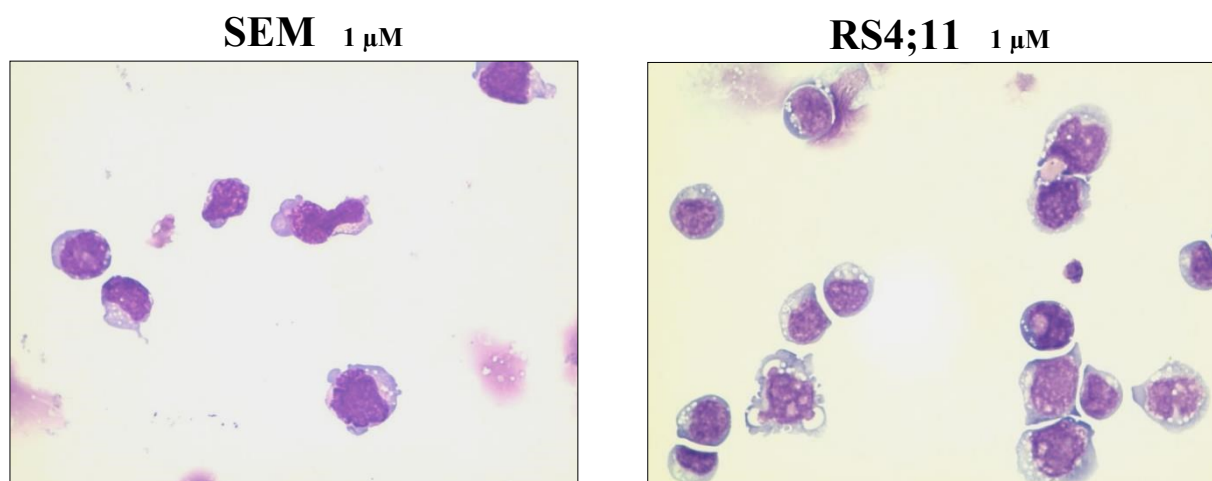
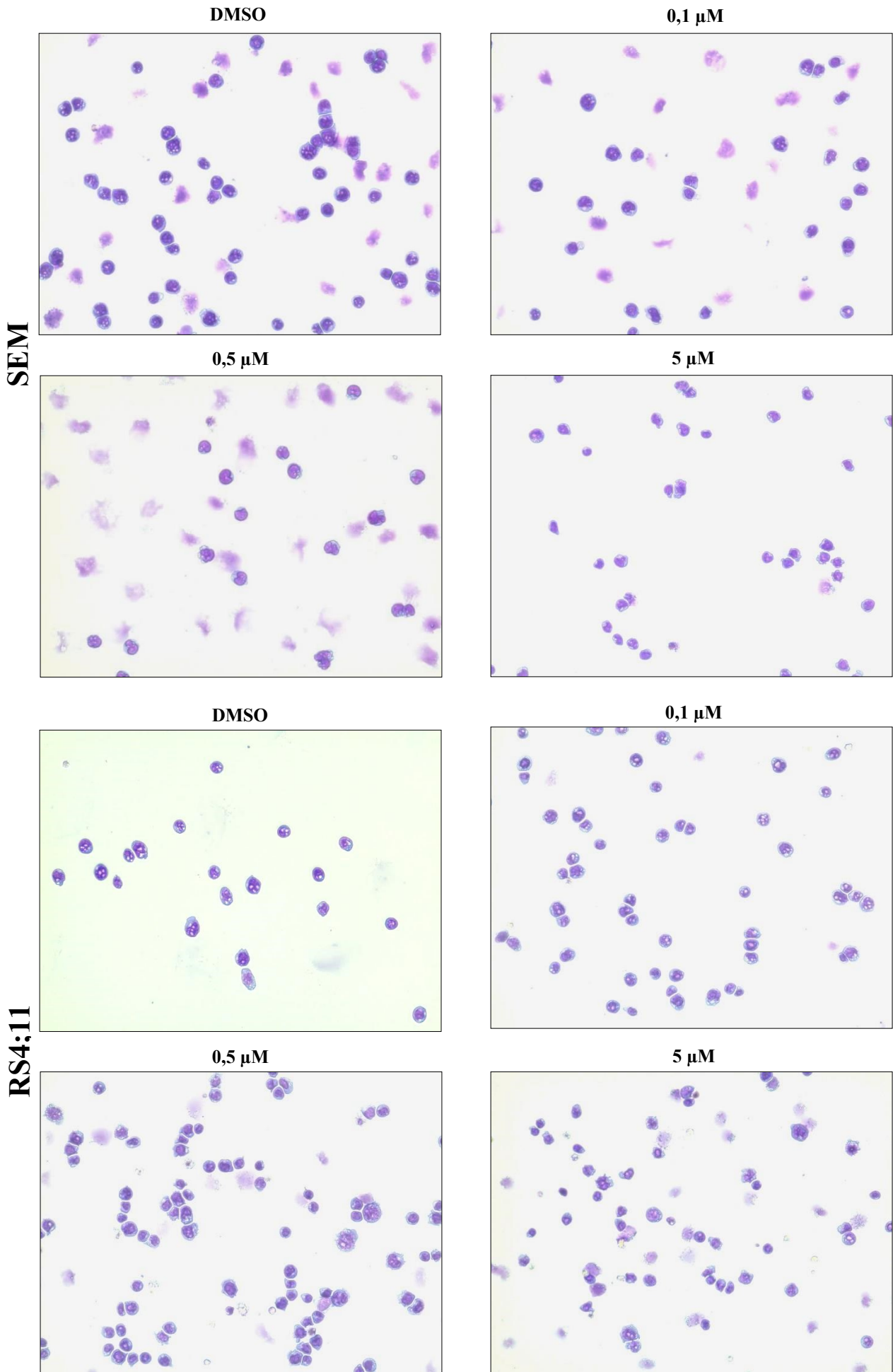


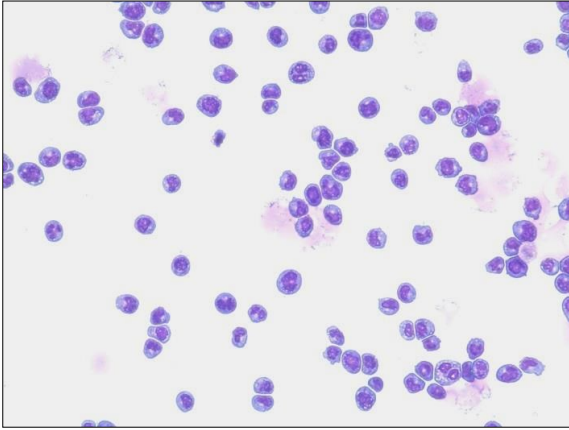
Abbildung 20: Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit 1 μM MK-2206.

Die Abbildung zeigt repräsentative Lichtmikroskopie-Bilder der Pappenheim-Präparate der B-ALL-Zelllinien SEM und RS4;11 nach 72 h Inkubation mit 1 μM des Akt-Inhibitors MK-2206. Betrachtung bei 100-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop EVOS™ XL Core Cell Imaging System. N \geq 2 biologische Replikate.

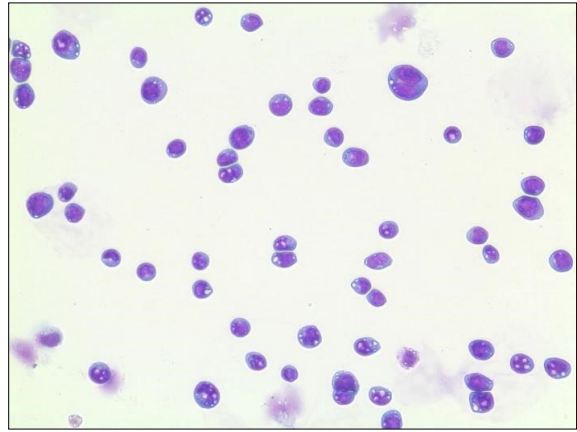


NALM-6

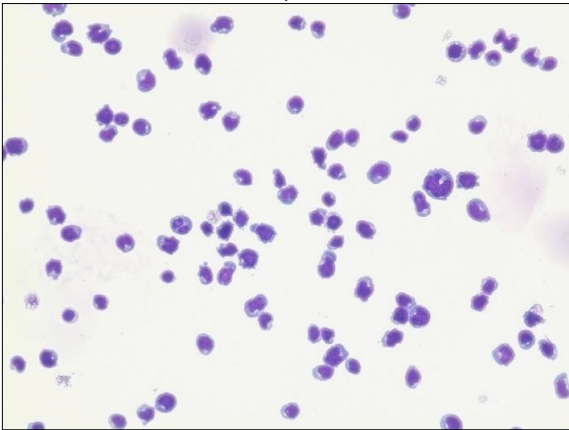
DMSO



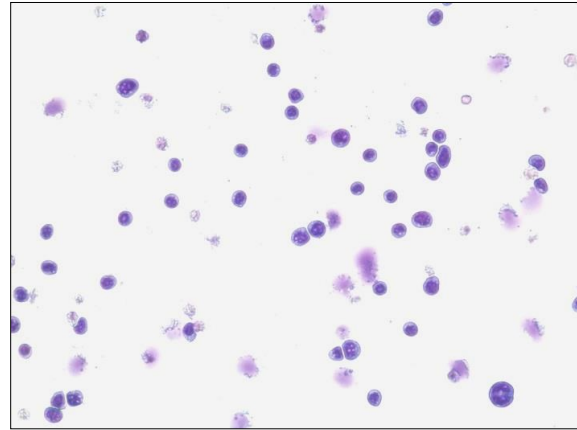
0,1 μ M



0,5 μ M

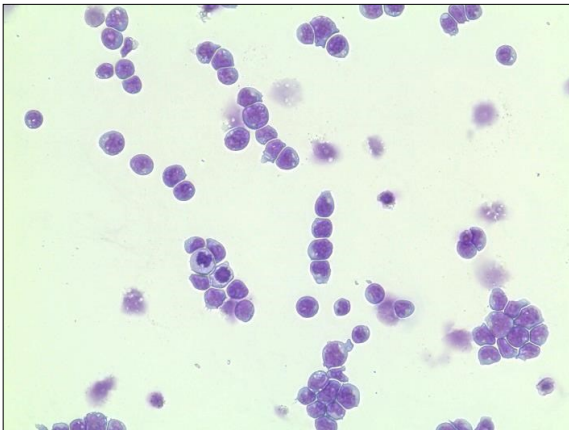


5 μ M

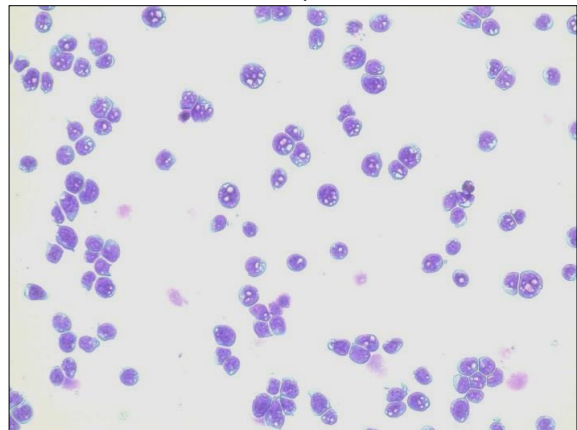


REH

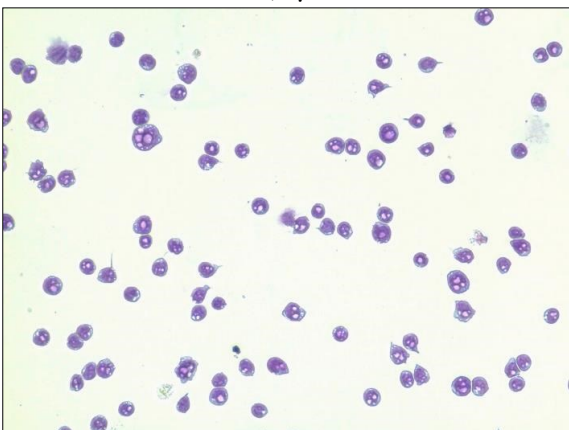
DMSO



0,1 μ M



0,5 μ M



5 μ M

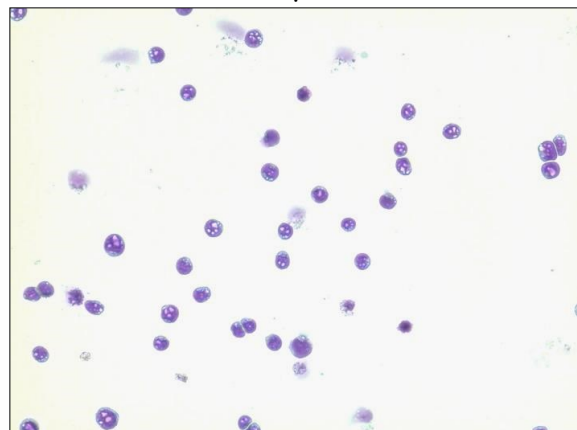


Abbildung 21: **Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit MK-2206.**

Die Abbildung zeigt repräsentative Lichtmikroskopie-Bilder der Pappenheim-Präparate der B-ALL-Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH nach 72 h Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen des Akt-Inhibitors MK-2206. Betrachtung bei 40-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop EVOS™ XL Core Cell Imaging System. N ≥ 2 biologische Replikate.

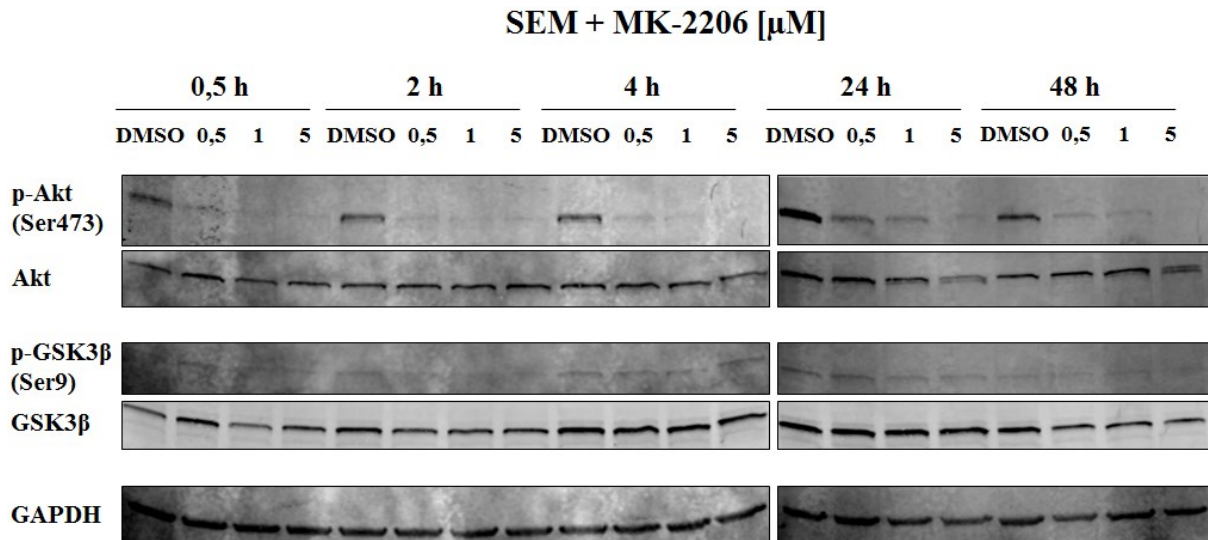


Abbildung 22: **Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von SEM.**

Dargestellt sind Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie SEM mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3β (Ser9) und Gesamt-GSK3β untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

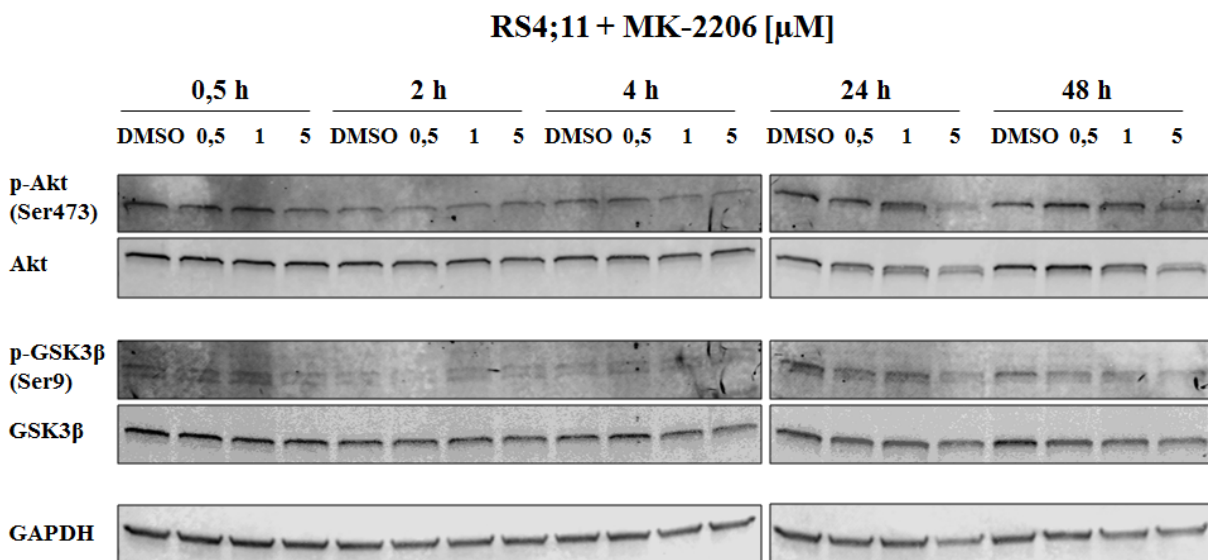


Abbildung 23: **Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.**

Dargestellt sind Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie RS4;11 mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473), Gesamt-Akt, p-GSK3β (Ser9) und Gesamt-GSK3β untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

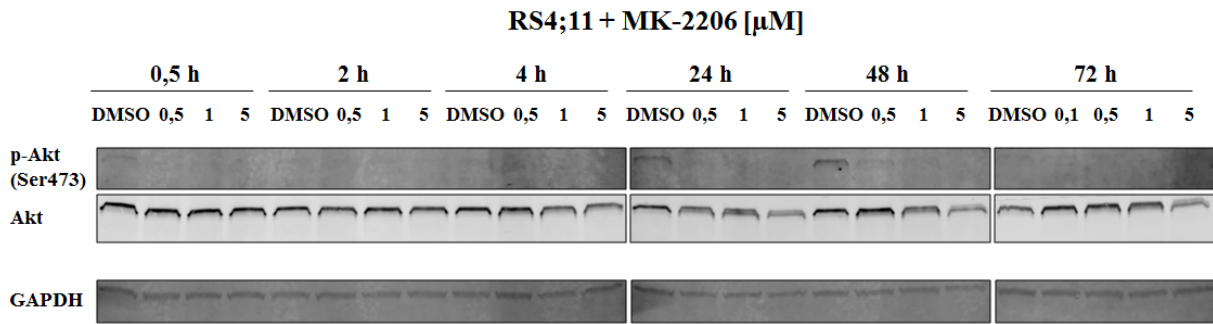


Abbildung 24: **Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.** Dargestellt sind Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie RS4;11 mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473) und Gesamt-Akt untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

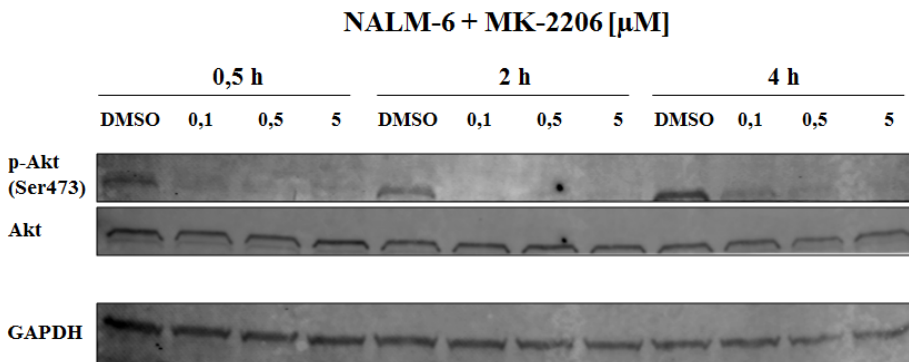


Abbildung 25: **Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von NALM-6.** Dargestellt sind Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie NALM-6 mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473) und Gesamt-Akt untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

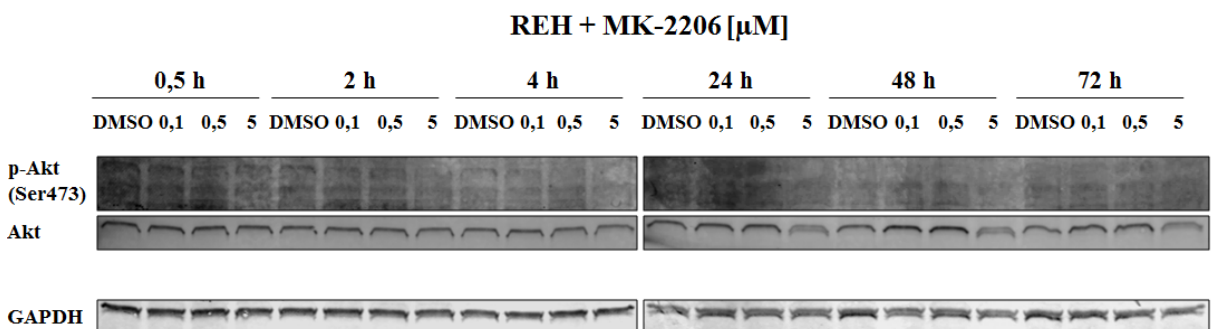


Abbildung 26: **Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von REH.** Dargestellt sind Western Blot-Banden nach Inkubation der Zelllinie REH mit MK-2206. Es wurde die Proteinexpression von p-Akt (Ser473) und Gesamt-Akt untersucht. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

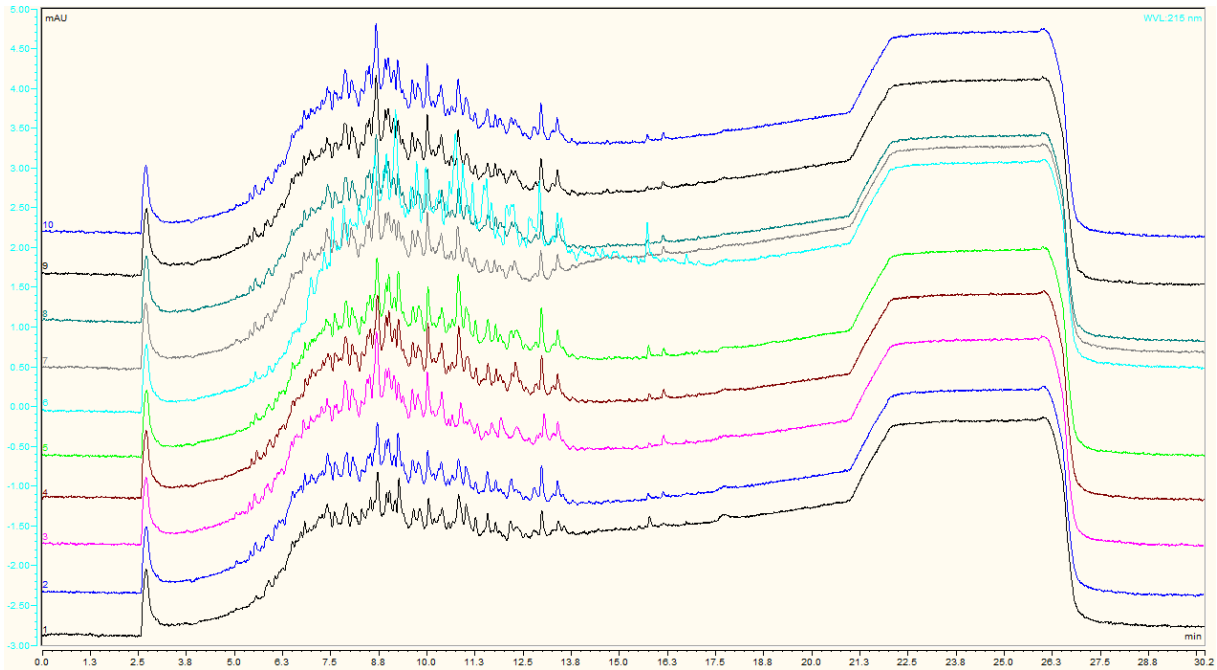


Abbildung 27: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.

Die oberen fünf UV-Traces zeigen jeweils die Auftrennungen der Peptidgemische aus mit $0,5 \mu\text{M}$ über $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$ inkubierten SEM-Zellen. Die unteren fünf UV-Traces hingegen stellen die Peptide aus nicht-exponierten Zellen (ebenfalls $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$) dar. X-Achse: Retentionszeit (min), y-Achse: Detektionssignal der Peptide (mAU).

Anhang

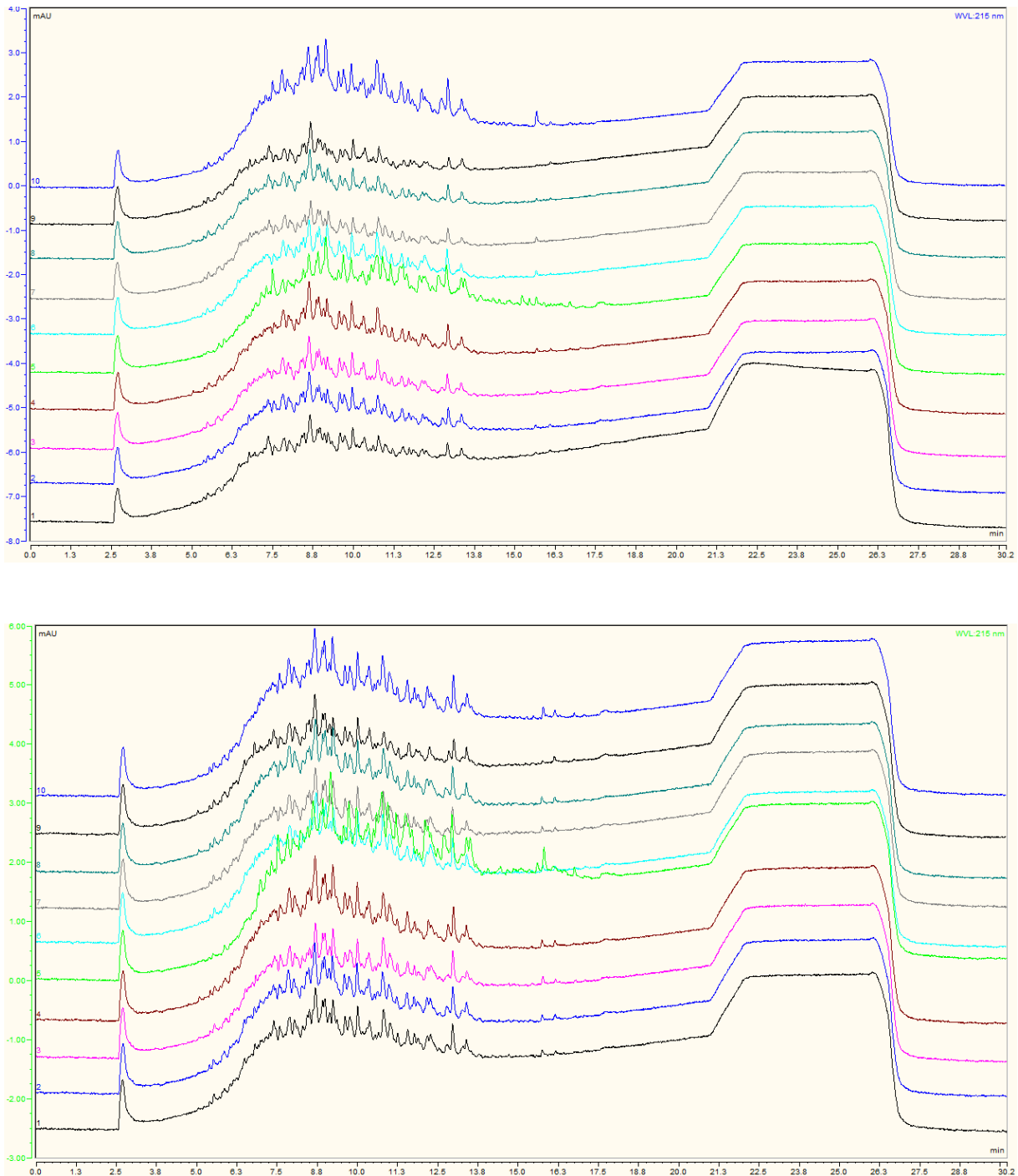


Abbildung 28: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.

Die unteren fünf UV-Traces zeigen jeweils die Auftrennungen der Peptidgemische aus mit $0,5 \mu\text{M}$ über $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$ inkubierten SEM-Zellen. Die oberen fünf UV-Traces hingegen stellen die Peptide aus nicht-exponierten Zellen (ebenfalls $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$) dar. X-Achse: Retentionszeit (min), y-Achse: Detektionssignal der Peptide (mAU).

Anhang

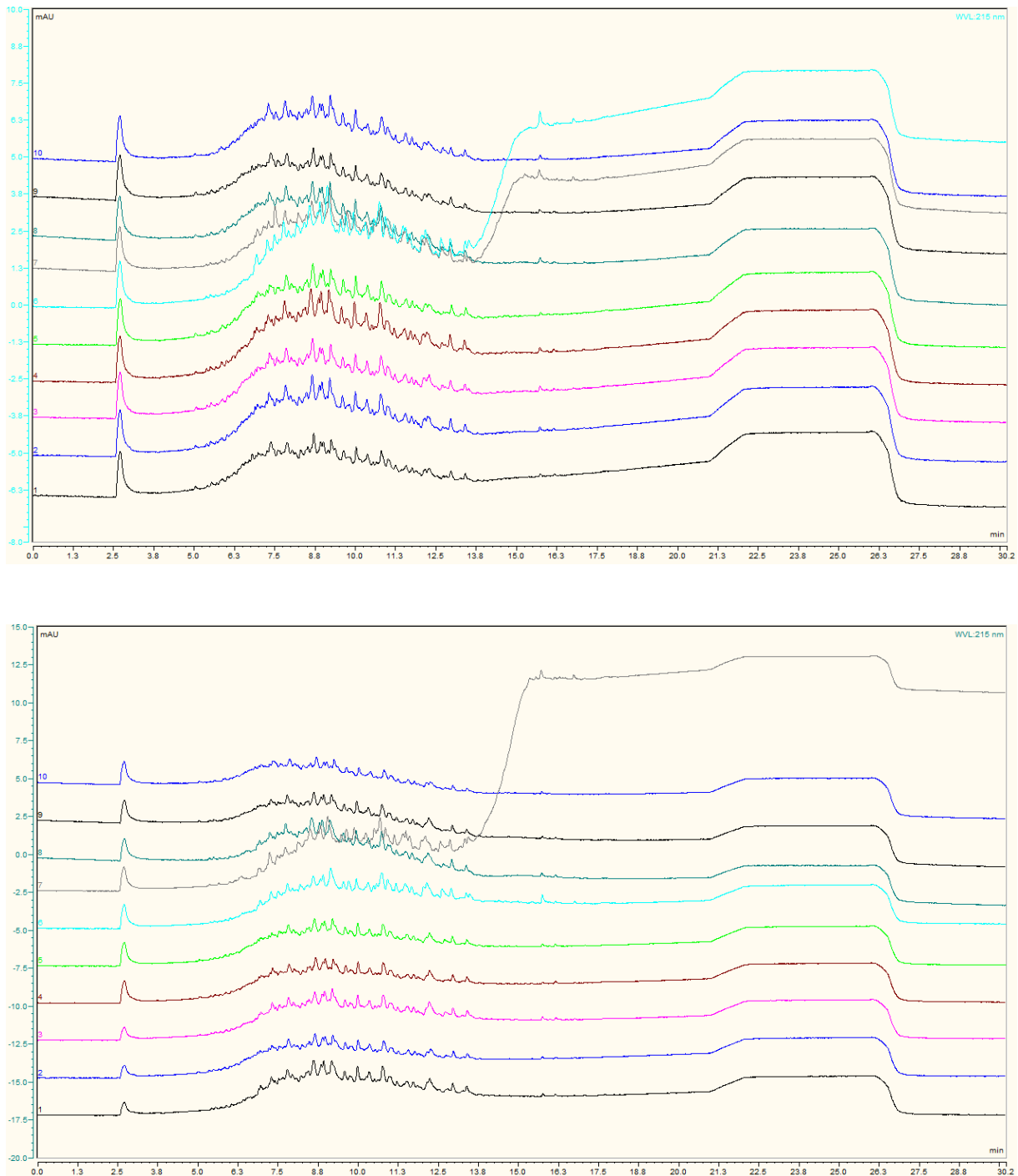


Abbildung 29: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie RS4;11 mittels UHPLC.

Die unteren fünf UV-Traces zeigen jeweils die Auftrennungen der Peptidgemische aus mit $0,5 \mu\text{M}$ über $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$ inkubierten RS4;11-Zellen. Die oberen fünf UV-Traces hingegen stellen die Peptide aus nicht-exponierten Zellen (ebenfalls $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$) dar. X-Achse: Retentionszeit (min), y-Achse: Detektionssignal der Peptide (mAU).

Anhang

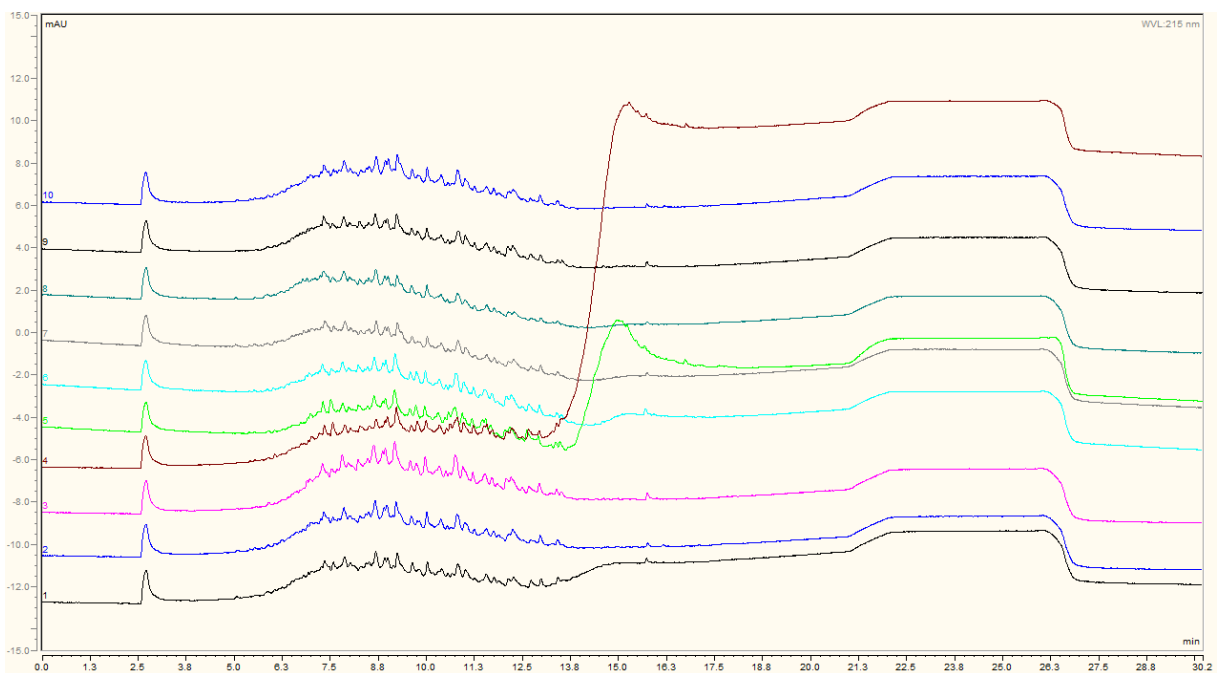
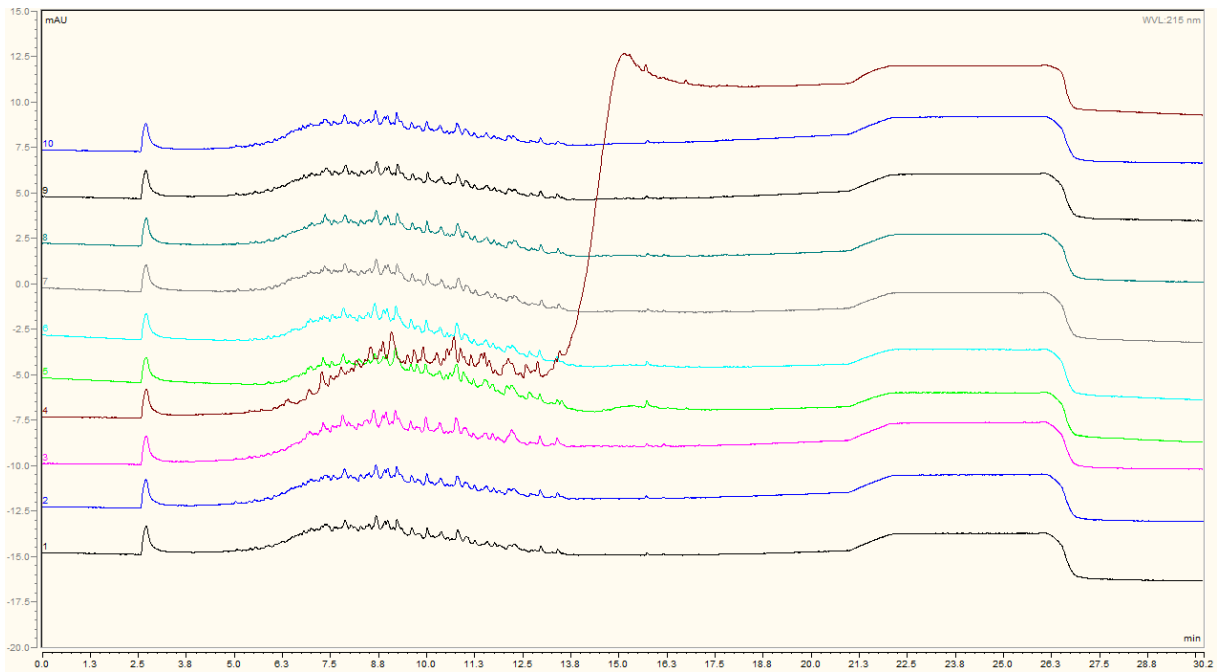


Abbildung 30: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie RS4;11 mittels UHPLC.

Die oberen fünf UV-Traces zeigen jeweils die Auftrennungen der Peptidgemische aus mit $0,5 \mu\text{M}$ über $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$ inkubierten RS4;11-Zellen. Die unteren fünf UV-Traces hingegen stellen die Peptide aus nicht-exponierten Zellen (ebenfalls $0,5 \text{ h} - 12 \text{ h}$) dar. X-Achse: Retentionszeit (min), y-Achse: Detektionssignal der Peptide (mAU).

8.3 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Übersicht zur Aktivierung der Proteinkinase Akt durch PI3K-vermittelte Phosphorylierung und ihr Einfluss auf verschiedene Downstream-Substrate.	2
Abbildung 2: Strukturformel des Akt-Inhibitors MK-2206.	6
Abbildung 3: Entstehung der B-ALL-Subgruppen aus lymphatischen Vorläuferzellen verschiedener Reifungsebenen.	10
Abbildung 4: Aussaat von OP-9-Zellen als Feederlayer für den Start einer Kokultur mit humanen B-ALL-Primärzellen sowie Umsetzen der Primärzellen auf frische OP-9-Zellen zum Aufrechterhalten der Kokultur.	25
Abbildung 5: Aussaat von OP-9-Feederzellen, Hinzugabe humaner B-ALL-Primärzellen und Inkubation der Primärzellen in Kokultur mit dem Akt-Inhibitor MK-2206.	26
Abbildung 6A, B: Durchflusszytometrische Analyse von apoptotischen und nekrotischen Zellen.	30
Abbildung 7: Proliferation und metabolische Aktivität nach 48 h Inkubation mit MK-2206.	38
Abbildung 8: Metabolische Aktivität der vier B-ALL-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit MK-2206.	38
Abbildung 9: Proliferation und metabolische Aktivität nach 72 h Inkubation mit MK-2206.	41
Abbildung 10: Metabolische Aktivität der vier B-ALL-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit MK-2206.	41
Abbildung 11: Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit MK-2206.	44
Abbildung 12: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von SEM.	46
Abbildung 13: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.	48
Abbildung 14: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von NALM-6.	50
Abbildung 15: Untersuchungen zur Inhibition der Proteinkinase Akt sowie von deren Downstream-Substraten, zusätzlich Analyse von ERK1/2 und des Apoptosemechanismus nach MK-2206-Inkubation von REH.	52
Abbildung 16: Viabilität nach 72 h Inkubation mit MK-2206.	55

Anhang

Abbildung 17: Früh-Apoptose und Spät-Apoptose/Nekrose nach 72 h Inkubation mit MK-2206.....	56
Abbildung 18: Anteil vitaler sowie apoptotischer/nekrotischer Zellen nach 72 h Inkubation mit MK-2206.....	58
Abbildung 19: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.....	60
Abbildung 20: Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit 1 μ M MK-2206.....	102
Abbildung 21: Zellmorphologie nach 72 h Inkubation mit MK-2206.....	105
Abbildung 22: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von SEM.....	105
Abbildung 23: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.....	105
Abbildung 24: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von RS4;11.....	106
Abbildung 25: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von NALM-6.....	106
Abbildung 26: Untersuchungen zur Akt-Inhibition nach MK-2206-Inkubation von REH.....	106
Abbildung 27: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.....	107
Abbildung 28: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie SEM mittels UHPLC.....	108
Abbildung 29: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie RS4;11 mittels UHPLC.....	109
Abbildung 30: UV-Traces nach Auftrennung verschiedener Peptide aus der Zelllinie RS4;11 mittels UHPLC.....	110

Anhang

Tabelle 1: Immunologische Subklassifikation der ALL in den GMALL-Studien, Auszug [79]	10
Tabelle 2: Charakteristik der Zelllinien SEM, RS4;11, NALM-6 und REH	15
Tabelle 3: Für den Western Blot verwendete Primär-Antikörper	21
Tabelle 4: Für den Western Blot verwendete Sekundär-Antikörper	21
Tabelle 5: Charakteristik der Zelllinie OP-9	23
Tabelle 6: Informationen zu den Patienten, deren B-ALL-Zellen in Kokultur kultiviert wurden	24
Tabelle 7: Errechnete IC50-Werte nach 48 h Inkubation mit MK-2206	38
Tabelle 8: Errechnete IC50-Werte nach 72 h Inkubation mit MK-2206	41
Tabelle 9: Legende der in Abbildung 11 verwendeten Pfeile	44
Tabelle 10: Humane B-ALL-Primärzellen in Kokultur auf OP-9-Feederzellen	54
Tabelle 11: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	91
Tabelle 12: Liste der verwendeten Geräte	93
Tabelle 13: Liste der verwendeten Chemikalien	95
Tabelle 14: Liste der verwendeten Zelllinien und Primärzellen	97
Tabelle 15: Liste der verwendeten Antikörper	98
Tabelle 16: Proliferation (relative Zellzahl) und metabolische Aktivität nach 48 h und 72 h Inkubation mit MK-2206.	102

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, September 2021

Elisabeth Fischer

Promotionserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen oder um eine Zulassung zu solchem beworben habe. Die eingereichte Schrift wurde an keiner anderen Hochschule vorgelegt.

Rostock, September 2021

Elisabeth Fischer

Publikationen

Originalarbeit veröffentlicht:

Richter, A., Fischer, E., Holz, C., Schulze, J., Lange, S., Sekora, A., Knübel, G., Henze, L., Roolf, C., Murua Escobar, H., Junghanss, C.. **Combined Application of Pan-AKT Inhibitor MK-2206 and BCL-2 Antagonist Venetoclax in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia.** *International Journal of Molecular Sciences* 22, 2771 (2021).

Beitrag im Einzelnen: Einfluss des pan-Akt-Inhibitors MK-2206 auf humane B-ALL-Zelllinien sowie auf B-ALL-Primärzellen in protektiver Kokultur-Umgebung.

Abstract veröffentlicht:

Fischer, E., Richter, A., Sekora, A., Henze, L., Murua Escobar, H., Roolf, C., Junghanss, C.. **Pan-AKT inhibitor MK-2206 demonstrates anti-leukemic potential in MLL-rearranged BCP ALL cell lines and primary samples.** *Oncology Research and Treatment* 43 (Supplement 4), 35; V492 (2020). Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie 2020.

Rostock, September 2021

Elisabeth Fischer

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Christian Junghanß, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, für meine Dissertation an seinem Institut mitarbeiten zu dürfen und dass er sich so oft die Zeit genommen hat, mit mir den aktuellen Stand sowie das weitere Vorgehen der Arbeit zu besprechen.

Besonders bedanke ich mich auch bei Dr. rer. nat. Catrin Roolf und PD Dr. rer. nat. habil. Hugo Murua Escobar für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung und die Zeit für die vielen Besprechungen und Tipps.

Außerdem danke ich Anett Sekora, die mir eine sehr große Hilfe im Labor war und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenso möchte ich mich bei Dr. rer. hum. Anna Richter dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte, mir bei all meinen Fragen behilflich war und mich insbesondere bei der Korrektur der Dissertationsschrift unterstützt hat.

Ich möchte auch dir, Annemarie Lenz, für deine Unterstützung danken und die Bereitstellung der Abbildung 3. Ein großes Dankeschön geht zudem an Dr. med. Larissa Henze für die Hilfe bei der Auswertung der Zellmorphologie-Analyse sowie an Vivien Krebs für die Unterstützung bei der Kokultur.

Auch bei Sina Sender, Gudrun Knübel, PD Dr. rer. nat. habil. Claudia Maletzki, Andrea Hobeck, Dipl. Biol. Saskia Krohn und Weibo Kong bedanke ich mich für die Unterstützung.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme, das gemeinsame Arbeiten sowie die unterhaltsamen Mittagspausen und Ausflüge mit euch bedanken.

Mir hat die Zeit im Labor sehr viel Spaß gemacht und ich bin sehr froh, dass ich mit so großartigen Menschen zusammenarbeiten durfte.

Zu guter Letzt danke ich auch meinen lieben Eltern und meinem Freund Martin, die immer für mich da sind und mich in allen Lebenslagen unterstützen.

Thesen der Dissertation

„Untersuchung zellulärer und molekularer Effekte nach Akt-Inhibition mittels MK-2206 bei der akuten B-lymphatischen Leukämie“

1. Der PI3K/Akt-Signalweg ist einer der am häufigsten mutierten und aberrant aktivierten Signaltransduktionswege bei verschiedensten Tumorentitäten, inklusive den akuten Leukämien.
2. Als zentrales Effektorprotein des PI3K/Akt-Signalweges reguliert die Akt-Kinase u.a. Zellwachstum und Apoptose.
3. In Studien wurde gezeigt, dass Akt bei der B-ALL häufig überexprimiert bzw. aberrant aktiviert ist.
4. MK-2206 ist ein pan-Akt-Inhibitor, welcher in präklinischen Arbeiten bereits vielversprechende Effekte auf T-ALL-Zellen und solide Tumoren gezeigt hat.
5. In der vorliegenden Arbeit war im Western Blot durch MK-2206 eine Dephosphorylierung der Akt-Kinase in B-ALL-Zelllinien nachweisbar. Auch weitere PI3K/Akt-Signalwegproteine in den Zelllinien wurden durch den Akt-Inhibitor beeinflusst.
6. Proliferation und metabolische Aktivität der Zelllinien, welche mittels Trypanblaufärbung bzw. WST-1-Assay analysiert wurden, konnten durch MK-2206 konzentrationsabhängig reduziert werden.
7. Nach Pappenheim-Färbung wurde die Zellmorphologie untersucht. Der Akt-Inhibitor bewirkte morphologische Veränderungen, welche auf apoptotische Prozesse hindeuteten. Dies war jedoch mittels Cleaved Caspase-3-Expression im Western Blot bei keiner der Zelllinien nachweisbar.
8. Die anti-leukämischen Effekte waren unabhängig von der basalen Akt-Aktivität in den B-ALL-Zelllinien. Dies könnte entgegen bisheriger Erkenntnisse dafür sprechen, dass MK-2206 nicht nur spezifisch an die Akt-Kinase bindet.
9. MK-2206 zeigte konzentrationsabhängige anti-proliferative Effekte auf B-ALL-Primärzellen in einer Kokultur-Umgebung. Dies wurde m.H. des CellTiter-Blue[®]-Assays analysiert.
10. Trotz der protektiven Mikroumgebung führte der Akt-Inhibitor zu einer mittels Durchflusszytometrie detektierten Apoptose-Induktion bei den Primärzellen.
11. MK-2206 stellt einen vielversprechenden Kandidaten für weitere Studien dar. *In vivo*-Studien müssen zukünftig zeigen, ob eine klinische Evaluation bei der B-ALL sinnvoll ist.