

Zusammenfassung der Dissertation

Es ist allgemein akzeptiert, dass die kontinuierliche Inhibition onkogener Kinasen durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) Voraussetzung für den klinischen Erfolg ist. Kürzlich wurde dies durch Daten in Frage gestellt, die vermuten lassen, dass eine kurzzeitige potente Inhibition der BCR-ABL Kinase ausreichend ist, um Apoptose irreversibel auszulösen. **Teil I** der Arbeit sollte den molekularen Mechanismus aufklären, welcher der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit Hochdosis TKI (**HD-TKI**) zu Grunde liegt. Zu diesem Zweck wurden murine Ba/F3-BCR-ABL/ -FLT3-ITD/ -JAK2V617F Zellen, sowie humane Leukämiezelllinien verwendet und mit den entsprechenden TKI behandelt. Der Nachweis der aktivierten Caspase3 in Western Blot und Durchfluss-Zytometrie zeigte, dass die Apoptoseinduktion unabhängig von der verwendeten TKI-Konzentration, nur durch die TKI-Expositionszeit determiniert wird. Repetitives *Wash Out* nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI rette die Zellen vor Apoptoseinduktion, was durch verschiedene Apoptose-Assays gezeigt wurde. Die Expression von ABC-Transporterproteinen in K562 Zellen verlieh Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion nach Kurzzeit-Inkubation mit hohen Imatinib-Konzentrationen. Dies wurde durch pharmakologische Inhibition von ABCB1 revertiert. Detaillierte Analysen der BCR-ABL Signaltransduktion in Western Blot und Durchfluss-Zytometrie nach repetitivem *Wash Out* zeigten eine differentielle Rekonstitution sowie Inhibition der BCR-ABL Phosphorylierung Y177 und Y412, sowie von STAT5 und CRKL. Dabei korrelierten die Phosphorylierungen von BCR-ABL (Y412) und STAT5 mit dem Überleben der Zellen.

Die Bestimmung der intra- und extrazellulären TKI-Konzentrationen mittels HPLC und IUR-Assay (¹⁴C-Imatinib) ergaben eine starke intrazelluläre Anreicherung der TKI nach Kurzzeit-Inkubation mit HD-TKI, verbunden mit der TKI-Freisetzung über die Zeit nach dem *Wash Out*. Diese Daten identifizierten somit die verlängerte intrazelluläre TKI-Aktivität verbunden mit einer protrahierten Kinaseinhibition nach der HD-TKI Kurzzeit-Inkubation als den Mechanismus, der der Apoptoseinduktion zu Grunde liegt. Darüber hinaus zeigen die Daten, dass eine kontinuierliche Kinaseinhibition erforderlich ist, um in leukämischen Zellen Apoptose auszulösen. Aus klinischer Sicht könnten diese Daten dazu beitragen, dass künftig neben der Plasma- auch die intrazelluläre TKI-Konzentration bestimmt wird, um die TKI-Dosierung in klinischen Studien zu optimieren. Letztlich ist die Bioverfügbarkeit einer Substanz in der Zelle entscheidend für die zu erzielende therapeutische Wirkung.

FLT3-Mutationen sind häufig assoziiert mit dem Auftreten einer akuten myeloischen Leukämie. Im FLT3-Rezeptor können Punktmutationen und interne Tandem Duplikationen (ITD) unterschieden werden. Die Integration der ITD kann nicht nur in juxtamembranäre Bereiche erfolgen, sondern auch in die Tyrosinkinase-Domäne 1. Der FLT3-ITD-627E Rezeptor ist eine prototypische Mutante einer TKD1-ITD. Bislang ist nicht bekannt, ob die Integration der ITD in die TKD1 auch ohne Beteiligung der Kinaseaktivität zu einer Aktivierung des Rezeptors führen kann.

In **Teil II** der vorliegenden Arbeit wurden daher eine *kinase dead* Variante des FLT3-ITD-627E sowie das FLT3-ITD-627E Konstrukt in Ba/F3 Zellen exprimiert. Im Western Blot konnte eine konstitutive Aktivierung der FLT3-Signaltransduktion nur für das FLT3-ITD-627E Konstrukt festgestellt werden. Ebenso konnte nur für diese Zelllinie die Koloniebildung in Abwesenheit von IL-3 sowie IL-3-abhängiges Wachstum nachgewiesen werden. Es wurde somit festgestellt, dass der transformierende Phänotyp des FLT3-ITD-627E Rezeptors durch die konstitutive Kinaseaktivität vermittelt wird.

Zum Nachweis einer möglichen Aktivierung der NFκB-Signaltransduktion durch TKD1-ITDs wurden FLT3-ITD und FLT3-ITD-627E exprimierende Ba/F3 Zellen auf die Translokation von p65 nach fraktionierter Proteinextraktion im Western Blot verglichen. Für beide Zelllinien war eine p65-Kernlokalisation nachweisbar. Die pharmakologische Inhibition der NFκB-Aktivierung machte eine starke Abhängigkeit beider Zelllinien von der Aktivierung des Signalwegs für das Überleben deutlich. Der siRNA-vermittelte *knock down* von p65 konnte eine signifikante Relevanz für das Überleben beider Zelllinien unter Midostaurin-Exposition nachweisen. Zukünftige Experimente *ex vivo* müssen den additiven Effekt der p65-Inhibition bei gleichzeitiger Gabe von Midostaurin bestätigen, bevor von einem neuem therapeutischen Ansatzpunkt gesprochen werden kann.

Dissertation summary

It is widely accepted that continuous target inhibition is a prerequisite for clinically effective TKI treatment. Recently, this assumption has been questioned by data suggesting that transient potent kinase inhibition is sufficient to induce apoptosis in BCR-ABL positive cells.

In **part I** of this dissertation the underlying molecular mechanism of apoptosis induction after pulse incubation of high dose tyrosine kinase inhibitor (**HD-TKI**) was investigated. Therefore murine Ba/F3 cells stably transfected with BCR-ABL, FLT3-ITD or JAK2-V617F as well human leukemia cell lines were treated with respective TKI. Detection of activated caspase3 by Western Blot and FACS analysis over time during TKI incubation provided evidence that apoptosis induction is independent from applied TKI concentrations and determined by exposure time only. Repetitive wash out of TKI pulse exposed cells rescued these cells from induction of apoptosis which was validated by several apoptosis assays. Expression of ABC-transporter proteins in K562 cells rescued cells from apoptosis after pulse incubation of high imatinib concentrations. This was abrogated by pharmacologic inhibition of ABCB1. A detailed investigation of BCR-ABL signal transduction in Western Blot and FACS analysis suggested a differential reconstitution and inhibition of BCR-ABL phosphorylation Y177 and Y412 as well as of STAT5 and CRKL. Thereby phosphorylation of BCR-ABL (Y412) and STAT5 correlated well with survival of cells.

Determination of intra- and extracellular TKI concentration by HPLC measurement and of ¹⁴C-imatinib by IUR assay revealed strong intracellular accumulation of TKI after pulse incubation of HD-TKI, which was associated with a release of TKI over the time after wash out. These data identified a prolonged intracellular TKI activity as the underlying mechanism of apoptosis induction after HD-TKI pulse incubation in leukemic cells. From a clinical perspective these data point to a new cornerstone in clinical development of tyrosine kinase inhibitors: monitoring both, plasma and intracellular drug levels will be informative to optimize dosing schedules in upcoming clinical trials. Finally, bioavailability of a drug is determining the therapeutic outcome.

FLT3 mutations are a common genetic event in acute myeloid leukemia. Besides point mutations, internal tandem duplications (ITD) in the FLT3 receptor can be discriminated. Integration of ITDs does not occur in juxtamenbrane regions only, but also in Tyrosinkinase domain 1. The FLT3-ITD-627E receptor is a prototypic mutant of TKD1-ITD. Integration of ITD in TKD1 may lead to activation of downstream signaling without the activation of the kinase activity.

Therefore in **part II** of this work a kinase dead mutant of FLT3-ITD-627E as well as FLT3-ITD-627E construct was expressed in Ba/F3 cells. Western Blot analysis revealed a constitutive activation of FLT3 signaling only for the FLT3-ITD-627E construct. Similarly, colony formation in absence of cytokines IL-3 as well as factor independent growth was detected for this cell line. This demonstrated that the transforming phenotype of FLT3-ITD-627E is mediated by kinase activity of FLT3 receptor.

To test for possible activation of NFκB signal transduction by TKD1-ITDs FLT3-ITD and FLT3-ITD-627E expressing Ba/F3 cells were analyzed for translocation of p65 by fractionated protein extraction in Western Blot. For both constructs a translocation of p65 into the nucleus was detected. Pharmacologic inhibition of NFκB activation showed a relevance of ITD expressing cells on activation of NFκB signaling. SiRNA mediated knock down of p65 suggested a significant relevance for survival of both cell lines during exposure to the TKI midostaurin. Prior to talk about a new therapeutic approach, future experiments will need to confirm the additive effect of p65 inhibition by simultaneous administration of Midostaurin.