

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung dualer PPAR α / γ -Liganden auf das Wachstum von
Zelllinien der chronischen myeloischen Leukämie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janina Bertz

aus Pasewalk

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Kurt Possinger
2. Prof. Dr. med. Wolf-Karsten Hofmann
3. Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow

Datum der Promotion: 18.09.2009

Meiner Familie
Wolfgang, Ramona und Martin Bertz
und Thomas Lepel
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronische myeloische Leukämie.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Verlauf und Diagnose.....	1
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Therapie	4
1.2 PPAR.....	6
1.2.1 PPAR-Unterformen und -Wirkungsweise.....	6
1.2.2 PPAR-Liganden und Krebs	9
1.2.3 Duale PPAR α / γ -Liganden	10
2 Fragestellung.....	12
3 Materialien und Methoden	13
3.1 Geräte und Materialien	13
3.2 Antikörper	14
3.3 Reagentien, Lösungen und Puffer	14
3.4 Rezepte	15
3.5 Kits	16
3.6 Primer.....	16
3.7 Zelllinien und Kultivierung	16
3.8 Verwendung der zu untersuchenden Substanzen.....	17
3.9 MTT-Test.....	17
3.10 Isolierung der CD34+ Zellen	18
3.11 Clonogenic Assay	19
3.12 Cell Death Detection Elisa plus.....	19
3.13 GM-CSF-ELISA	20
3.14 Zellzyklusanalyse.....	20
3.15 RNA-Isolierung	21
3.16 Reverse Transkription.....	22
3.17 Real-Time-quantitative PCR	22
3.18 Proteinisolierung.....	23
3.19 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	23
3.20 Western Blot.....	24

3.21	Statistische Auswertung.....	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Expression von PPAR α und PPAR γ	26
4.2	Effekt von C48 auf die Viabilität von CML-Zelllinien	26
4.3	Effekt von C48 auf die Viabilität von Imatinib-resistenten CML-Zelllinien	31
4.4	Unabhängigkeit des proliferationshemmenden Effektes von PPAR α / γ	34
4.5	Unabhängigkeit der Wirkung von C48 vom BCR-ABL-Signalweg	35
4.6	Beeinflussung des Zellzyklus durch C48.....	36
4.7	Einfluss von C48 auf die Apoptose	38
4.8	Beeinflussung der GM-CSF-Sekretion durch C48 und TZD18	39
4.9	Regulation von Akt- und Stat-Molekülen	41
4.10	Kombinationseffekt von C48 und Imatinib auf das Wachstum von CML-Zelllinien.....	42
5	Diskussion	46
5.1	C48 inhibiert das Wachstum von CML-Zelllinien	46
5.2	C48 hemmt die Progression des Zellzyklus und induziert Apoptose	48
5.3	Unabhängigkeit von PPAR	50
5.4	C48 inhibiert das Wachstum Imatinib-resistenter Zelllinien	51
5.5	Hemmung der GM-CSF-Sekretion.....	53
5.6	Regulation von Akt-/ STAT-Molekülen	54
5.7	Kombinationseffekte von C48 und Imatinib.....	55
6	Zusammenfassung.....	59
7	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung.....	V
	Eidesstattliche Erklärung.....	VI
	Lebenslauf	VII
	Publikationsliste	VIII

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Tyrosinkinase
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BCR	Breakpoint cluster region
C48	Compound 48
CEN	Chicken erythrocyte nuclei (Hühnererythrozytenkerne)
CFU	Colony forming unit (Kolonie-bildende Einheit)
CGZ	Ciglitazon
CML	Chronische myeloische Leukämie
CrkL	CRK-like protein
CTN	Calf thymocyte nuclei (Kälberthymozytenkerne)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN α	Interferon- α
JAK	Janus-Kinasen
MRD	Minimal residual disease (minimale Resterkrankung)
MTT	1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol
NHR	Nukleohormonrezeptor
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
PGZ	Pioglitazon
Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom-positiv
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

PPAR	Peroxisome-proliferator activated receptor
PPRE	PPAR response element
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rb	Retinoblastom
RGZ	Rosiglitazon
RXR	Retinoid X-Rezeptor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGZ	Troglitazon
TKI	Tysrosinkinase-Inhibitor
TZD	Thiazolidinedione
ZKM	Zellkulturmedium

1 Einleitung

1.1 Chronische myeloische Leukämie

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) wurde erstmals im Jahre 1845 von Virchow, Craigie und Bennett beschrieben [1-3] und zählt zu den myeloproliferativen Erkrankungen, die durch eine maligne Transformation der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entsteht. Die Inzidenz der CML beträgt 1,6/100000 pro Jahr [4], wobei Männer im Durchschnitt etwa 1,4 mal häufiger betroffen sind als Frauen. Diese Erkrankung macht 20 % aller Leukämien im Erwachsenenalter aus und weist bei Diagnosestellung ein Durchschnittsalter von 65 Jahren auf. Im Kindesalter dagegen ist die Inzidenz extrem gering [5]. Weder die Ätiologie, noch hereditäre, familiäre, geographische, ethnische oder ökonomische Assoziationen zur CML sind bekannt [6]. Als einziger möglicher Risikofaktor konnte die Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung beobachtet werden [7].

1.1.2 Verlauf und Diagnose

Kennzeichnend für die CML ist der dreiphasige Verlauf. Beginnend mit der chronischen Phase, in der sich die Mehrzahl der Patienten bei Diagnosestellung befindet, geht die Erkrankung unbehandelt nach im Mittel drei bis sechs Jahren in die akzelerierte Phase über [8]. Häufig wird die Diagnose der CML zufällig im Rahmen einer Blutbildkontrolle gestellt, da in der chronischen Phase eher unspezifische Symptome wie Leistungsabfall und Müdigkeit vorherrschen und die Patienten über ein noch kompetentes Immunsystem verfügen [6]. Hämatologisch lassen sich in diesem Stadium eine Leuko- und/oder Thrombozytose sowie eine deutliche Linksverschiebung mit myeloischen Vorstufen im Differentialblutbild feststellen, welche mit einer Eosinophilie und Basophilie vergesellschaftet sein können.

Die akzelerierte Phase ist laut European Leukemia Net 2006 gekennzeichnet durch folgende Kriterien: 15–29 % Blasten im peripheren Blut (PB) oder Knochenmark (KM), > 30 % Blasten und Promyelozyten im PB oder KM, aber insgesamt, < 30 % Blasten, ≥ 20 % Basophile im PB und persistierende, nicht therapieassoziierte Thrombozytopenie (< 100 G/l) [9]. Verstärkt treten nun klinische Symptome durch Splenomegalie und Leukozytose auf. Nach wenigen Monaten bis zwei Jahren folgt das

Stadium der Blastenkrise, in der die Anzahl der Blasten im PB oder KM 30 % überschreitet und die klinischen und hämatologischen Befunde denen einer akuten Leukämie entsprechen. Auch ein Tumorbefall von Lymphknoten, Haut und Knochen ist möglich [10]. Symptome aufgrund der wachsenden Tumormasse mit unkontrollierbaren Leukozytenzahlen (Fieber, Nachtschweiß, Anorexie, Gewichtsverlust), massiver Splenomegalie (Milzinfarkt), Knochenschmerzen und ein erhöhtes Risiko von Infektionen und Blutungen treten in den Vordergrund [9]. Die Blasten weisen in mehr als 50 % der Fälle einen myeloiden Charakter auf, bei 20-30 % handelt es sich um lymphoide und bei 25 % der Patienten um undifferenzierte Zellen [11, 12]. Das Überleben nach Beginn des Blastenschubes beträgt im Durchschnitt nur wenige Monate. Die zur Progression der Erkrankung beitragenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnten Erkenntnisse über die Mitverantwortlichkeit eines Differenzierungsarrestes, einer genetischen Instabilität als Konsequenz der Translokation für zusätzliche chromosomale Aberrationen oder Mutationen, Telomerverkürzung und der Verlust von Tumorsuppressorfunktionen als mögliche Ursachen beobachtet werden [13].

Zur zytogenetischen und molekulargenetischen Diagnostik werden die klassische Chromosomenanalyse, die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und die quantitative sowie qualitative PCR zur Detektion des BCR-ABL-Transkriptes verwendet. Ebenfalls sind diese Methoden zur Einschätzung der Prognose, Verlaufsbeurteilung und Erfassung einer minimalen Resterkrankung (MRD) im Einsatz.

1.1.3 Pathogenese

Die charakteristische genetische Abnormalität der CML ist das Philadelphia-Chromosom (Ph), das bei mehr als 90 % der CML-Patienten und 15-30 % aller erwachsenen Betroffenen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) zu finden ist. Dieses wurde 1960 in Philadelphia von Nowell und Hungerford als erste konstant auftretende chromosomale Veränderung in Tumorzellen beschrieben. Dabei handelt es sich um eine reziproke chromosomale Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22, die 1973 von Rowley gezeigt werden konnte [14-16].

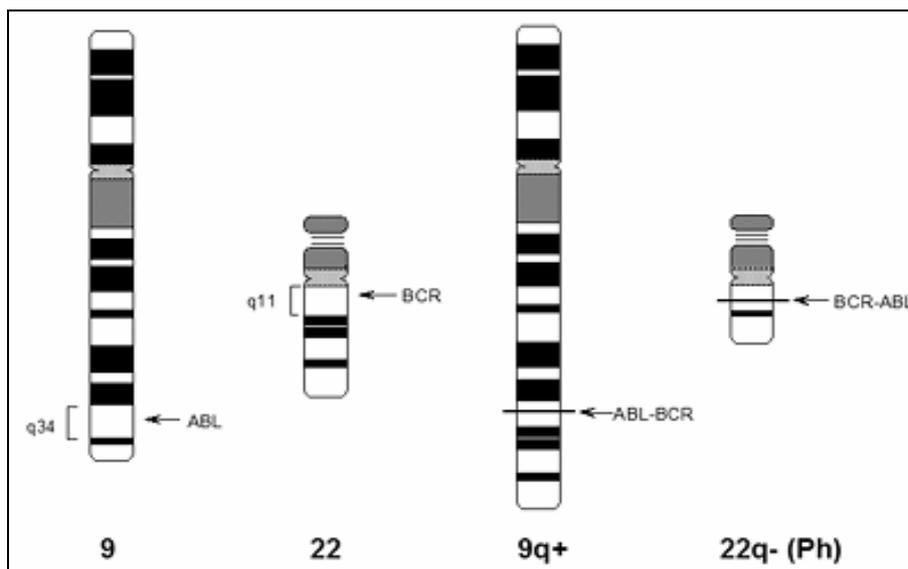


Abbildung 1: Philadelphia-Translokation. Nach Brüchen im Bereich der langen Arme der Chromosomen 9 (Bande q34) und 22 (Bande q11) erfolgt eine reziproke Translokation der telomeren Fragmente. Es entstehen das verlängerte Chromosom 9q+ und das verkürzte Chromosom 22q-, welches das eigentliche Ph darstellt [17].

Durch die Fusion der auf Chromosom 9 liegenden Abelson-Tyrosinkinase (ABL) [18] und der „Breakpoint cluster“-Region (BCR) auf Chromosom 22 [19-21] entsteht ein Onkogen, aus dem das BCR-ABL-Protein hervorgeht, welches eine aktive zytoplasmatische Form der ABL-Kinase darstellt [22]. Auf dem BCR-Gen finden sich drei potentielle Bruchstellen: die „Major-“ (M-BCR), „Minor-“ (m-BCR) und „Micro-“ Region (μ -BCR) [23, 24]. Bei einem Großteil der CML- und einem Drittel der ALL-Patienten liegt die Bruchstelle in M-BCR, wodurch nach alternativem Spleißen zwei ähnliche Versionen des Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von etwa 210 kDa entstehen [25, 26]. Selten finden Brüche in μ -BCR und m-BCR statt, die zur Bildung eines Protein mit 230 bzw. 190 kDa führen, welches mit der Entstehung von Ph-positiver (Ph⁺) AML und Ph⁺-ALL sowie einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

Durch die Expression der BCR-ABL-Tyrosinkinase werden in der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert, die die gesteigerte Proliferation der CML-Zellen bewirken. Die Hauptmechanismen der durch BCR-ABL induzierten Transformation sind eine veränderte Adhäsionsfähigkeit der CML-Zellen zum Knochenmarkstroma und zur extrazellulären Matrix, die Aktivierung mitogener Signale, die Inhibition der Apoptose und der Abbau hemmender Proteine [5]. Durch eine durch BCR-ABL bedingte Phosphorylierung und Interaktion mit Proteinen der zellulären Adhäsion und Zellmotilität, wie z.B. Paxillin, β 1-Integrin, der fokalen Adhäsionskinase oder Actin,

entstehen die für BCR-ABL⁺ Zellen typischen Adhäsionsdefekte und Zytoskelettabnormalitäten, die auch für eine vermehrte Zellfreisetzung in die Peripherie verantwortlich sind [27, 28]. Intrazelluläre Signalwege, die an der transformierenden Aktivität von BCR-ABL als Konsequenz der erhöhten Tyrosinkinaseaktivität beteiligt sind und so unter anderem zur Inhibition der Apoptose beitragen, sind das Ras/MAPK-System und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche beide über das BCR-ABL-bindende Adapterprotein "CRK-like protein" (CrkL) aktiviert werden und die "Signal transducer and activator of transcription" (STAT)-Proteine, die von Janus-Kinasen (JAKs) phosphoryliert werden und anschließend die Transkription von antiapoptotischen und wachstumsfördernden Zielgenen aktivieren können [29].

1.1.4 Therapie

Vor Entdeckung der Zytostatika wurde die CML mit Methoden wie Splenektomie, Verabreichung von Arsen und Radiotherapie behandelt, die eher palliativen Charakter hatten. Durch die Einführung zytostatischer Therapien wie Busulfan und später Hydroxyurea konnte die Prognose der CML in kurative Behandlungsabsicht verbessert werden. In den 80er Jahren wurde Interferon- α (IFN α) zur Standardtherapie der CML. Mit Hilfe dieser Substanz konnte ein 10-Jahresüberleben von 20-53 % erreicht werden [30, 31]. Die einzige im Rahmen von Studien erwiesene kurative Therapieoption bei CML ist die allogene Stammzelltransplantation. Durch Reduktion der Transplantations-assoziierten Mortalität konnte die Zwei-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Stammzelltransplantation in den Jahren 2000-2003 bereits auf 61 % erhöht werden [32]. Als Hauptrisikofaktoren, die über einen Therapieerfolg entscheiden, konnten folgende Aspekte eruiert werden, aus denen sich das relative Transplantationsrisiko berechnen lässt: Histokompatibilität, Stadium der Erkrankung zur Zeit der Transplantation, Alter und Geschlecht von Spender und Empfänger sowie Zeitspanne zwischen Diagnosestellung und Transplantation [33].

Revolutioniert wurde die Therapie der CML mit der Zulassung von Imatinib (auch STI 571, Glivec[®]) im Jahre 2001. Dabei handelt es sich um ein kleines Molekül, das kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle der BCR-ABL-Tyrosinkinase binden kann und den Prototyp der so genannten zielgerichteten („targeted“) Therapie darstellt [34, 35]. Heute gilt die Therapie mit 400 mg des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) Imatinib pro Tag bei Patienten mit neudiagnostizierter CML in chronischer Phase als Standard [36].

Diese Behandlung weist fünf Jahre nach Beendigung der IRIS-Studie, in der Imatinib gegen Interferon- α verglichen wurde, beeindruckende Ansprechraten auf: eine hämatologische Remission von 98 %, 92 % „Major cytogenetic response“ und 87 % komplette zytogenetische Remission. Die Progressionsfreiheit zu akzelerierter oder Blastenphase lag bei 93 % [37]. Die Nebenwirkungen der Imatinib-Therapie sind vergleichsweise mild und umfassen das Auftreten von hämatologischer Toxizität, erhöhten Transaminasen und peripheren Ödemen [38].

Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse bestehen auch weiterhin Probleme in der CML-Therapie. Zum Einen ist das Ansprechen auf Imatinib und das Überleben bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien trotz Erhöhung der Imatinib-Dosis auf 800 mg pro Tag weiterhin nicht zufriedenstellend [39, 40]. Außerdem bleibt trotz Gabe von Imatinib bei einer Mehrheit der Patienten ein MRD, auch bei undetektierbaren BCR-ABL-Transkripten, bestehen, das zu Rezidiven nach Unterbrechung der Imatinib-Therapie führen kann [41]. Darüber hinaus kann bei primär responsiven Patienten mit zunehmender Behandlungsdauer eine Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib auftreten, für die in der Mehrzahl der Fälle folgende Mechanismen verantwortlich sind: BCR-ABL-Genmutationen [42, 43], die Überexpression und verstärkte Amplifikation von BCR-ABL [42, 43], zytogenetische Aberrationen, die Aktivierung BCR-ABL-unabhängiger Signalwege wie die Src-Kinase-Familie [44], die Bindung von Imatinib an α -1 saures Glykoprotein (AGP) [45] und gesteigerter Wirkstoffefflux oder verminderter Influx von Imatinib durch „Multidrug-Resistenz“-Gene [46, 47].

BCR-ABL-Mutationen können in etwa 50 % der resistenten Patienten nachgewiesen werden und lassen sich durch Mutationsanalysen in hochgradig resistente Formen der Kinase-Domäne (z. B. Y253F/H, E255K/V, T315I oder H396P/R), die eine alternative Therapiestrategie erfordern, und milde resistente Mutationen (z. B. M244V, M351T, F359V), die möglicherweise durch Anpassung der Imatinibdosis auf 600 oder 800 mg/d behandelbar sind, unterteilen [41, 42, 48-50].

Mit Dasatinib [51] und Nilotinib [52] stehen bereits zwei neue TKI zur Verfügung, deren Wirksamkeit bei Imatinibversagen demonstriert werden konnte. Nach erfolgreichen Phase II-Studien wurde Dasatinib nun in der EU und den USA für die Behandlung der Imatinib-resistenten CML zugelassen, wobei für beide Substanzen weitere ausführlichere Studien zur Beurteilung der optimalen Dosis, des Nutzens als Ersttherapie und des Auftretens von Langzeiterfolgen nötig sind. Obwohl bei Vorliegen zahlreicher bekannter Imatinib-resistenter Mutationen ein Ansprechen durch die neuen

TKI gewährleistet ist, besteht auch für diese beiden Substanzen eine Resistenz gegenüber der T315I-Mutation [53].

1.2 PPAR

1.2.1 PPAR-Unterformen und -Wirkungsweise

Der Peroxisome-proliferator activated receptor (PPAR) gehört zur Familie der Nukleohormonrezeptoren (NHR), zur der ebenfalls Rezeptoren für Östrogen, Vitamin D, Schilddrüsenhormon, Retinolsäure und Retinoid X zählen. PPAR fungiert als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor und ist so an der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder Differenzierung beteiligt. Der Name PPAR leitet sich von der Entdeckung ab, dass dieser Rezeptor das Ziel von Substanzen ist, die die Zellorganellen Peroxisomen in ihrer Proliferation anregen [54]. Heute sind drei Untertypen, die von unterschiedlichen Genen codiert werden, bekannt, namentlich PPAR α , PPAR β (oder δ) und PPAR γ . Diese drei Formen zeigen erhebliche Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäurestruktur, vor Allem in den Domänen der DNA- und Ligandenbindung [55].

Die Aktivierung des PPAR durch Liganden resultiert in einer Konformationsänderung im PPAR-Molekül, das zur Verlagerung des Rezeptors aus dem Zytosol in den Zellkern führt. Die Bindung an ein PPAR-Response-Element (PPRE) in der Promotorregion des Zielgens erfolgt nach Heterodimerisierung mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) [56]. Das PPAR-RXR-Heterodimer bindet mit der idealen Basensequenz AGGTCA n AGGTCA als „Direct repeat“, getrennt von einer Base, an die DNA [57]. Eine Vielzahl an Proteinen agiert bei diesem Bindungsvorgang als Co-Aktivatoren oder -Repressoren, die die Fähigkeit von PPAR zur Initialisierung oder Suppression des Transkriptionsprozesses modulieren [55]. In der Abwesenheit von Liganden ist der heterodimerisierte NHR-Komplex mit Co-Repressorproteinen, die Histondeacetylaseaktivität aufweisen, assoziiert, wodurch die Transkription der Zielgene unterdrückt wird. Durch Interaktion mit PPAR-Liganden löst sich dieser Repressorkomplex und wird durch bindende Co-Aktivatoren mit Histonacetylaseaktivität ersetzt, die nun die Initiation der Transkription ermöglichen [58].

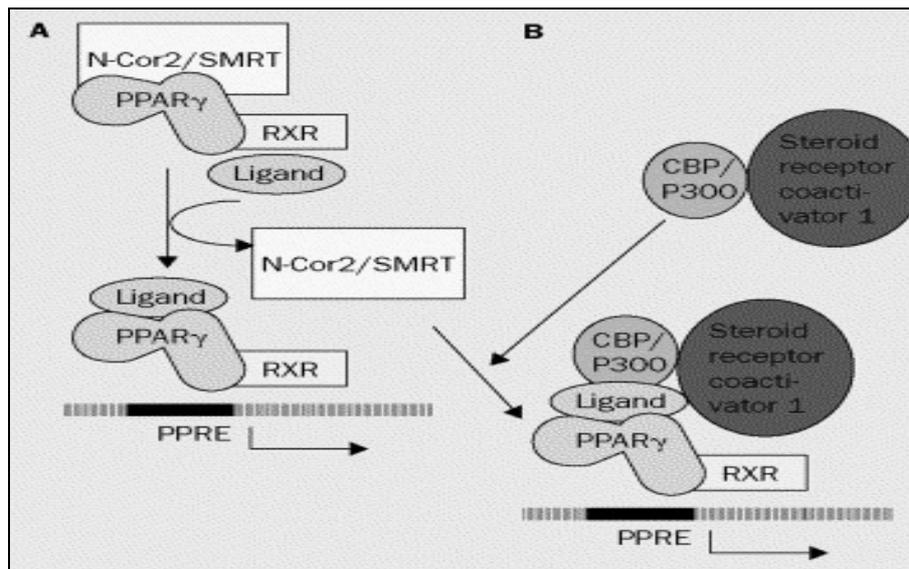


Abbildung 2: Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung am Beispiel von PPAR γ . (A) Im Zellkern ist das inaktive PPAR/RXR Heterodimer an Co-Repressoren, wie „Nuclear receptor corepressor“ (N-CoR) oder „Silencing mediator for retinoid- and thyroid-hormone receptors“ (SMRT), gebunden, die die Bindung des Komplexes an die DNA verhindern. (B) Nach der Ligandenbindung werden die Co-Repressoren durch transkriptionelle Co-Faktoren, wie „cAMP-response element binding protein“ (CBP/P300) und „Steroid receptor coactivator 1“, ersetzt. Das Heterodimer kann nun mit dem PPRE in der Promotorregion des Zielgens interagieren [59].

PPAR α wird vor Allem in der Leber und Geweben mit hohem Fettsäuremetabolismus exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Lipidhomöostase, indem Serumtriglyceride gesenkt und „High-density lipoprotein“ (HDL)-Cholesterin erhöht werden. Diese Effekte werden durch verstärkte Clearance und verminderte Synthese von Triglycerid-reichen „Very low-density lipoprotein“ (VLDL) erreicht [60]. Die PPAR α -Agonisten der Klasse der Fibrate werden in der Klinik erfolgreich zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt. Des Weiteren wurden für Agonisten von PPAR α auch antiinflammatorische Wirkungen in Gefäßzellen durch Eingreifen in verschiedene Regulationsprozesse nachgewiesen [58].

Die Funktion der Unterform PPAR β ist weiterhin unklar. PPAR β wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe und Zellen exprimiert und scheint besonders in den Ablauf des Lipidmetabolismus, der Entzündungsreaktion und Arteriosklerose involviert zu sein [58].

Das Hauptvorkommen von PPAR γ dagegen ist das Fettgewebe, jedoch weisen auch eine Menge anderer Gewebe- und Zelltypen, wie Makrophagen [61], Kolon, Leber [62] oder Skelettmuskel [63] eine Expression von PPAR γ auf. Durch alternatives Splicing entstehen drei Isoformen von PPAR γ , wobei die Isoformen PPAR γ 1 und 3 ein

identisches Protein als Produkt haben und PPAR γ 2 gegenüber den anderen Isoformen am N-Terminus um 30 Aminosäuren verlängert ist [64].

PPAR γ reguliert vor Allem die Adipozytendifferenzierung, Insulinsensitivierung und den Lipidmetabolismus [65, 66] und wird von verschiedenen lipophilen Substanzen aktiviert, von denen sich 15-desoxy-12,14-Prostaglandin J₂ (15-dPGJ₂) als bisher potentester endogener Ligand erwiesen hat. Zu den synthetischen PPAR γ -Agonisten zählen die Thiazolidindione (TZD), z. B. Pioglitazon (PGZ), Rosiglitazon (RGZ) oder Troglitazon (TGZ), die einen antidiabetischen Effekt durch Insulinsensitivierung und Senkung des Blutglucosespiegels ausüben [67] und deshalb in der Klinik für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 angewendet werden, wobei TGZ aufgrund hepatotoxischer Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen werden musste. Auch nicht-steroidale antiinflammatorische Wirkstoffe wie Indometacin oder Ibuprofen können als PPAR γ -Agonisten agieren, was die antiinflammatorische Wirkung dieser Substanzen bei höheren Konzentrationen erklären könnte [68]. Neben antiinflammatorischen Effekten ist PPAR γ auch in pathogenetische Prozesse der Arteriosklerose eingebunden [58].

Die folgende Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der Wirkungen der drei PPAR-Unterformen.

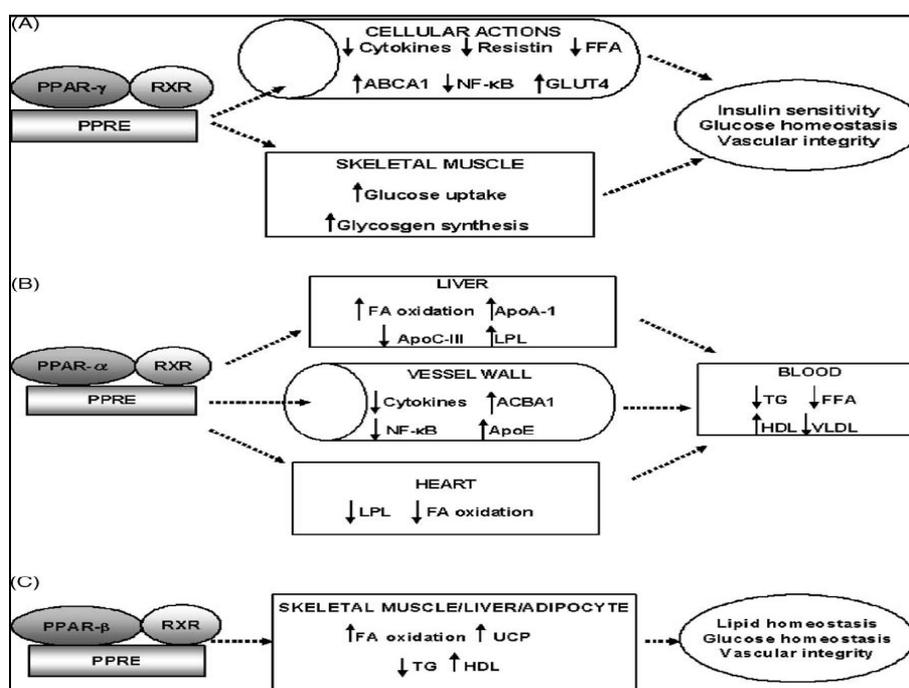


Abbildung 3: Mechanismen der PPAR-Gentranskription und ihre biologischen Effekte in verschiedenen Organen. (A) PPAR γ , (B) PPAR α (C) PPAR β [58]

1.2.2 PPAR-Liganden und Krebs

Neben den positiven Einflüssen von PPAR-Liganden auf den Metabolismus kristallisierte sich in den vergangenen Jahren verstärkt auch der antineoplastische Effekt dieser Substanzen heraus. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über bisher veröffentlichte Studien zur Wirkung von PPAR α - und PPAR γ -Liganden auf verschiedene Tumorarten und die dabei eruierten Wirkungsmechanismen. Während PPAR γ -Liganden klar gegen das Wachstum bestimmter Krebsentitäten gerichtet wirken, bleibt der Effekt von PPAR α -Agonisten auf die Proliferation von Tumorzellen weiterhin nicht eindeutig geklärt, da unterschiedliche Arbeiten antiproliferative, aber auch kanzerogene Eigenschaften dieser Substanzen, vor allem in Bezug auf Leberzellen diskutieren [69-71].

TUMORART	EFFEKT AUF ZELLINIEN / TIERMODELLE
<u>PPARα-Liganden</u>	
AML	Auslösung von Zelldifferenzierung [72, 73]
Endometriumkarzinom	Proliferationsinhibition, Induktion von Apoptose [74]
Glioblastom	Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose [75]
Malignes Melanom	Inhibition von Proliferation und Invasion, Stimulation der Melanogenese [76]
Ovarialkarzinom	Wachstumshemmung, Angiogenesereduktion, Apoptoseinduktion [77, 78]
<u>PPARγ-Liganden</u>	
ALL	Wachstumshemmung, Induktion von Zelldifferenzierung und Apoptose [79]
Blasenkarzinom	Wachstumshemmung, Induktion von Differenzierung [80]
Glioblastom	Proliferationsarrest, Auslösung von Apoptose [81]
Hypophysenadenom	Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion, Hormonsekretionshemmung [82]
Kolonkarzinom	Inhibition der Proliferation und Invasion, Induktion von Apoptose und Differenzierung [83, 84]
Liposarkom	Induktion von Differenzierung [85]
Lungenkarzinom	Proliferationsarrest, Auslösung von Apoptose [86]
Magenkarzinom	Proliferationsinhibition, Induktion von Apoptose [87]
Malignes Melanom	Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose [88-90]
Mammakarzinom	Inhibition der Proliferation und Invasion, Induktion von Apoptose und Differenzierung [91-94]
Multiples Myelom	Proliferationshemmung, Induktion von Apoptose [95]
Prostatakarzinom	Wachstumshemmung, Induktion von Apoptose [80, 96]
Schilddrüsenkarzinom	Inhibition von Proliferation und Invasion, Induktion von Apoptose [97]

Tabelle 1: Zusammenfassung von *In vitro*- und *In vivo*-Studien zur antineoplastischen Wirkung von PPAR α - bzw. - γ -Liganden auf verschiedene Tumorarten.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu bisher durchgeführten klinischen Studien, die die Wirkung von PPAR γ -Liganden auf unterschiedliche Tumoren untersuchten.

KLINISCHE STUDIE	SUBSTANZ	EFFEKT
Patienten mit intermediärem bis hochgradigem Liposarkom (Fallbericht)	TGZ	Histologische und biochemische Differenzierung [85]
Phase-II-Studie bei Patienten mit histologisch gesichertem Prostatakarzinom, ohne symptomatische Metastasen	TGZ	Verlängerte Stabilisierung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) [98]
75-jähriger Patient mit rezidivierendem Prostatakarzinom (Fallbericht)	TGZ	Reduzierung des PSA [96]
Phase-II-Studie bei Patienten mit Liposarkom	RGZ	Verlängerte mittlere Progressionszeit [99]
Phase-II-Studie bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom	TGZ	Kein signifikanter Effekt [100]
Phase-II-Studie bei Patienten mit rezidivierendem Mammakarzinom	TGZ	Kein signifikanter Effekt [101]

Tabelle 2: Klinische Studien zu den antineoplastischen Effekten von PPAR γ -Liganden.

1.2.3 Duale PPAR α / γ -Liganden

Mit dem Gedanken, den lipidsenkenden Effekt von PPAR α -Agonisten mit der antidiabetischen Wirkung der PPAR γ -Liganden zu kombinieren, um so die Behandlung des metabolischen Syndroms zu verbessern, wurden in den letzten Jahren eine Reihe dualer PPAR α / γ -Liganden entwickelt, die spezifisch beide Untereinheiten von PPAR aktivieren können. Zwei Vertreter dieser Substanzklasse, Muraglitazar und Tesaglitazar, wurden bereits im Rahmen von klinischen Studien untersucht und zeigten signifikante Reduktionen der Blutspiegel von Glucose, Triglyceriden und Apolipoprotein B sowie einen Anstieg von HDL-Cholesterin [102, 103]. Eingeschränkt wurde die weitere klinische Entwicklung jedoch aufgrund des Spektrums an Nebenwirkungen, das dem der TZD entspricht, sowie einem möglicherweise erhöhten kardiovaskulären Risiko bei Einnahme dieser Substanzen, das in weiteren Studien abzuklären bleibt [104].

Zur Klasse der dualen PPAR α / γ -Liganden zählen ebenfalls die in dieser Arbeit verwendeten Verbindungen TZD18 und Compound 48 (C48). TZD18 wurde als 5-(3-[3-(4-Phenoxy-2-Propylphenoxy)Propoxy]Phenyl)-2,4-Thiazolidindion synthetisiert und zählt zur Gruppe der TZD, da es den für diese Substanzklasse typischen Thiazolidin-2,4-dion-Ring aufweist, der sich jedoch im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Klasse in Meta- und nicht Para-Stellung befindet und die neu eingebrachte PPAR α -Aktivität bewirkt [105]. C48, chemisch als (2R)-7-(3-[2-chloro-4-(4-Fluorophenoxy)Phenoxy]Propoxy)-2-Ethylchroman-2-Carboxylsäure zu benennen, entstand dagegen

durch Zyklisierung des PPAR α -Liganden Fibratsäure. Damit wies dieser Ligand zunächst eine PPAR α -Aktivität auf, die durch chemische Modifikation der Seitenkette um die PPAR γ -Aktivität ergänzt werden konnte [106]. Beide Substanzen wiesen im Tierversuch bei oraler Verfügbarkeit vielversprechende lipidsenkende und antidiabetische Eigenschaften auf.

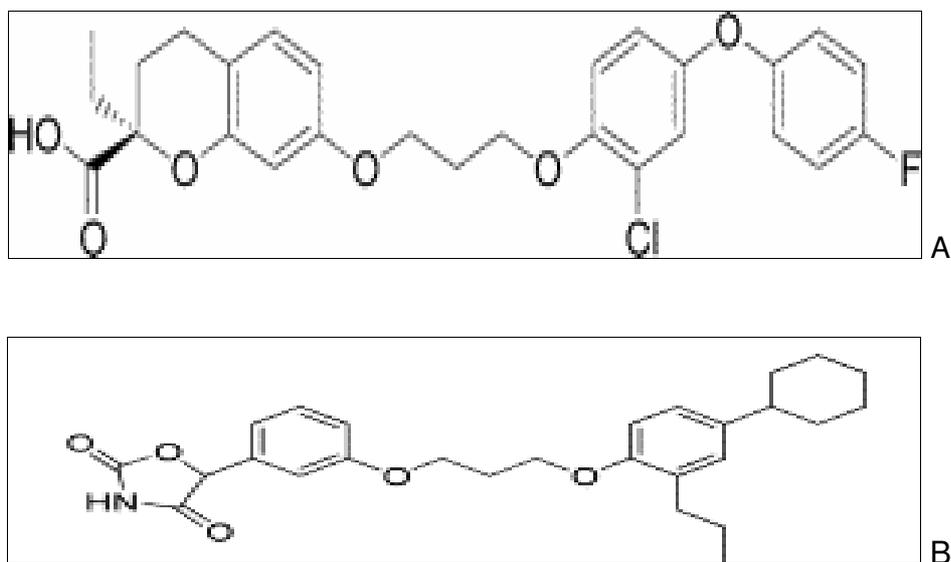


Abbildung 4: Chemische Struktur der Substanzen C48 (A) und TZD18 (B).

2 Fragestellung

Basierend auf der Idee, die anti-kanzerogenen Eigenschaften von PPAR α - und PPAR γ -Liganden zu kombinieren, konnte in mehreren Arbeiten bereits der Effekt dualer PPAR α/γ -Liganden auf verschiedene Krebszelllinien nachgewiesen werden. So konnte für die Substanz TZD18 bereits eine Wirksamkeit bei humanen Glioblastom-, BCR-ABL⁺ ALL- und CML-Zelllinien gezeigt werden [107-109].

Anknüpfend an diese Ergebnisse sollten in dieser Arbeit nun die Wirkungen des neuen, von der Firma Merck entwickelten dualen PPAR α/γ -Liganden C48 auf Zelllinien der CML ermittelt werden. Dabei galt zu eruieren, welche Mechanismen eine Inhibition der Proliferation bedingen. Daher wurden einerseits die Auslösung von Apoptose sowie der Einfluss von C48 auf den Zellzyklus mit Regulation wichtiger Zellzykluseffektoren untersucht. Andererseits sollten bisher unbekannte Mechanismen, die für den wachstumshemmenden Effekt von C48 und TZD18 mitverantwortlich sind, aufgedeckt werden. Interessant schien dabei ein eventuell inhibitorischer Einfluss dieser Substanzen auf die GM-CSF-Sekretion von CML-Zelllinien, welche wesentlich zum Überleben von CML-Zellen beiträgt, sowie die Modulation essentieller intrazellulärer Signaltransduktoren. Um zu klären, ob der anti-kanzerogene Effekt dualer PPAR α/γ -Liganden signifikant besser ist als der bisher verwendeter Liganden für entweder PPAR α oder PPAR γ , mussten die Zellen mit allen drei Substanzklassen inkubiert und die Wirkungen ermittelt werden. Da für PPAR γ - als auch PPAR α/γ -Liganden in zahlreichen Arbeiten eine PPAR-unabhängige Signalvermittlung festgestellt werden konnte, wurde C48 mit Hilfe von Rezeptorantagonisten auch diesbezüglich untersucht. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Feststellung einer eventuellen Wirksamkeit von C48 gegenüber Imatinib-resistenten CML-Zelllinien, da die Entwicklung einer Imatinib-Resistenz nach wie vor eines der entscheidenden Probleme bei der Therapie der CML darstellt. Auch eine eventuelle Wirkungsverstärkung von Imatinib durch Kombination mit C48 bei Imatinib-sensitiven Zellen sollte analog zu TZD18 als möglicher neuer Ansatzpunkt in der Therapie der CML analysiert werden sowie Hypothesen zum Zustandekommen dieses Effektes aufgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ziel dieser Arbeit das Aufzeigen eines eventuellen neuen Ansatzpunktes in der Therapie der Imatinib-sensitiven als auch –resistenten CML darstellt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

Blot	Trans-Blot SD SEMI-DRY Transfer Cell, BIO-RAD
Brutschrank	CO2 UNITHERM 150
Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply-EPS 601, Amersham Pharmacia Biotech; BIO-RAD Power Pac 200; BIO-RAD PP4000
ELISA-Reader	Anthos ht 2, Software WinRead
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Gerät	Calibur, BD Immunocytometry Systems
Lichtmikroskop	Leica, Leitz DMIL
Nukleinsäure-Elektrophorese-Kammer	BIORAD Subcell GT, mini Subcell GT
Protein Elektrophorese-Kammer	BIORAD Mini Protean Electrophoresis System
Schüttler	IKA® KS 130 basic
ABI Prism 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Stickstofftank	Cryo 2000, Thermo Scientific
Thermoblock	Trio-Thermoblock, Biometra
Thermocycler	Biometra
Thermomixer	Thermomixer 4536, Eppendorf
Vortexer	Janke & Kunkel IKA – Labortechnik VF-2
Wasserbad	UNITHERM, Model 1225PC
Zentrifuge	Heraeus Instruments Zentrifuge, Biofuge primo

Extra dickes Blotpapier	BIO-RAD
15 ml, 50 ml Röhrchen	Polypropylene Conical Tube, BLUE MAX™ Jr. BD Falcon
Film	Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences
Filter	Filter Cards, Thermo Shandon
Kassetten	Hypercassette™ Amersham LIFE SCIENCE
Membran	Immun-Blot™ PVDF-Membrane, BIO-RAD
Multikanalpipette	Transferpette®-8, 20-200 µl, Eppendorf
Multistep-Pipette	Multipette® Plus, Eppendorf
Nabelschnurblutbeutel	Macopharma
Neubauer Zählkammer	Optik Labor
Pipette	Polystyrene Pipets, BD Falcon, 5 ml , 10 ml, 25 ml
Polysterol- Röhrchen	5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, BD Falcon
6-, 96-Well-Platte (Zellkultur)	Becton Dickinson
96-Well-Platte (Real Time-PCR) + Verschluss	MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, Optical Caps, Applied Biosystems
Zellkulturflasche 25 cm ² , 75 cm ²	BD Falcon

3.2 Antikörper

Primär	200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology oder Cell Signaling
PPAR α	(H98) sc-9000, rabbit polyclonal IgG
PPAR γ	(N-20) sc-1984, goat polyclonal IgG
Actin	(I-19) sc-1616, goat polyclonal IgG
P27	(C-19) sc-529, rabbit polyclonal IgG
CDK2	(D-12) sc-6248, mouse monoclonal IgG1
CDK 4	(C-22) sc-260, rabbit polyclonal IgG
Cyclin E	(HE12) sc-247, mouse monoclonal IgG2b
AKT	#9272, rabbit monoclonal IgG
p-AKT	#9271S, rabbit monoclonal IgG
STAT3	#9132, rabbit monoclonal IgG
p-STAT3	#9131S, rabbit monoclonal IgG
STAT5	#9310, rabbit monoclonal IgG
p-STAT5	#9351S, rabbit monoclonal IgG
p-CrkL (Tyr207)	#3181, rabbit monoclonal IgG
eIF4E	#9742, rabbit monoclonal IgG
Sekundär	
ECL™ Anti-mouse-IgG	HRP linked whole antibody (from sheep), 1 ml, NA931V, GE Healthcare
Goat-anti-rabbit-IgG-HRP	sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, 200 µg/0,5 ml
Donkey-anti-goat-IgG-HRP	sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, 200 µg/0,5 ml

3.3 Reagentien, Lösungen und Puffer

Albumin	BSA & BGG Protein Assay Standard Sets, PIERCE
Biocoll	Biochrom AG
c-kit-Ligand (Stammzell-Faktor)	Peptotech
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM	Biochrom AG
Erythropoetin	Roche
FKS	Gibco, Invitrogen Corporation
Gentamycin	Biochrom
GM-CSF	Peptotech
IMDM	Gibco
Interleukin 3	Roche
L-Glutamin	Gibco
Lymphozyten	Aus Blut von Normal Spendern 1:2 mit PBS verdünnt, Ficoll-Gradienten, Thrombozyten entfernt, in Methanol fixiert
Methylcellulose-Medium	Stem Cell Technologies
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)	Roche Applied Science
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
PhosphoSafe™ Extraction Buffer	Novagen
Ponceau S Solution (w/v)	in 5 % acetic acid, Sigma
Protein-Standard	Precision Plus Protein™ Standard, BIO-RAD
RotiBlock, 10x Konzentrat	Roth
RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	PAA
10x Stripping-Puffer	ReBlot™Plus Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon
Trypanblau	Sigma, 0,4 %
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
C48	Merck
GW 9662	GlaxoSmithKline
Imatinib	Novartis
PGZ	TAKEDA Chemical Industries Ltd.
MK 886	Alexis Biochemicals
TZD18	Merck
WY 14643	Alexis Biochemicals

3.4 Rezepte

MTT 1-Reagenz labeling reagent	3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid (Sigma), 5mg/ml PBS (PAA)
MTT 2-Reagenz solubilization solution	10 % SDS (Roth) in 0,01 M HCl (Merck) 1:200 mit Aqua dest. verdünnen
MACS-Puffer	500 ml PBS 2,5 ml Humanalbumin (Baxter) 3 ml ACD-A (Fresenius HemoCare)
Hemin-Stammlösung	104 mg Hemin 0,8 ml 1M NaOH 2 ml 1 M Trispuffer Auf 40 ml mit Aqua dest. auffüllen, sterilfiltrieren
Lösung B für Zellzyklusanalyse (pH 7,6)	1 g Trisodiumcitrat-2 H ₂ O (Merck) 1 % Igepal (Sigma) 522 mg Sperminhydrochlorid (Sigma) 61 mg Tris(Hydromethyl)aminomethan (Merck) 100 mg RNase A (Sigma) mit Aqua dest. auf 1000 ml
Lösung C für Zellzyklusanalyse (pH 7,6)	1 g Trisodiumcitrat-2 H ₂ O 1 % Igepal 522 mg Sperminhydrochlorid 61 g Tris(Hydromethyl)aminomethan 208 mg Propidiumjodid mit Aqua dest. auf 1000 ml
Sodium-Orthovanadat (10 mM), 100 ml	0,183 g Sodium-Orthovanadat (Sigma) 3,722 g EDTA (100 mM) (Sigma) 20 ml 10 % SDS
Lysispuffer, 50 ml	20 mM Tris-HCl (SAFC), pH 8 137 mM NaCl (Merck) 10 % Glycerol (Sigma) 1 % Triton X-100 (Sigma) 2 mM EDTA 1 mM Sodium-Orthovanadat 1x Complete Protease Inhibitor-Tablette (Roche)
10 % Trenngel, 10 ml	4,8 ml Aqua dest. 2,5 ml Acrylamid (40%ig, Roth) 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS (Sigma) 5 µl TEMED (Roth)
4 % Sammelgel, 5 ml	3,2 ml Aqua dest. 0,5 ml Acrylamid 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 10 µl TEMED
2x SDS, 10 ml	0,2 ml (250 mM) 0,5 M Tris-HCl 8 ml (4 % SDS) 10 % SDS 2 ml (10 %) Glycerol
Ladepuffer (4x)	1,25 ml 0,5 M Tris HCl 2,5 ml Glycerol 5 ml 20 % SDS 1,25 ml 1 % Bromphenolblau (Sigma) 20 % β-Mercaptoethanol (Sigma)
Elektrophoresepuffer (10x)	125 mM Tris-Base 960 mM Glycin (Roth) 4 mM SDS
Transferpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin

	In 900 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch 10 % Methanol (Merck) dazugeben
Waschpuffer PBST	1x PBS mit 1 % Tween 20 (Sigma)

3.5 Kits

Cell Death Detection ELISA PLUS	Roche Applied Science
Zellzyklus-Kit CTN (calf thymocyte nuclei) / CEN (chicken erythrocyte nuclei)	DNA QC Particles Kit, BD
Human GM-CSF Elisa Kit	Diaclone
MACS-Isolierungskit	Miltenyi Biotech
RNeasy Mini Kit	Qiagen
PCR	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, 6 x 250 units with Gold Buffer and MgCl ₂ solution; Applied Biosystems
Proteinbestimmung BCA	Reagenz A (BCA™ Protein Assay Reagent A, PIERCE) Reagenz B (BCA™ Protein Assay Reagent B, PIERCE)
Western Blot Detektion	ECL-Plus (ECL PLUS Western Blotting Detection System, GE Healthcare)

3.6 Primer

Die PCR-Primer und -Sonden wurden von TIB MOLBIOL bezogen: p27 (F1-290203, R1-290202, TM-294132), CDK2 (F-294124, R-294125, TM-294126), CDK4 (F-294136, R-294137, TM-294138), Cyclin E (161R-294142, 93F-294141). Die Cyclin E-Sonde war bei Sigma und die β -Actin-Kontrolle bei Applied Biosystems erhältlich.

Alle weiteren Chemikalien und Hilfsmittel wurden von den Firmen Biorad, Roth, Sigma, Ritter und Eppendorf bezogen.

3.7 Zelllinien und Kultivierung

Bei den verwendeten Linien K562, KCL22 und KU812 handelt es sich um Ph⁺ Zellen, die in der Phase der Blastenkrise aus Blut von CML-Patienten isoliert und etabliert wurden. Erhältlich waren diese Zelllinien über die Deutsche Sammlung für Zellen und Mikroorganismen (DSMZ). Die Imatinib-resistenten Zelllinien K562/SR, KCL22/SR und KU812/SR wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Dr. Tadashi Nagai (Tochigi, Japan) zur Verfügung gestellt [110]. Alle CML-Zelllinien wurden in Zellkulturmedium (ZKM), bestehend aus RPMI-Medium ergänzt um 10 % bzw. für KU812 20 % fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S), kultiviert und wuchsen unter sterilen Bedingungen in einer H₂O-gesättigten, 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C als Zellsuspension. Alle drei bis vier Tage erfolgte die Passage

im Verhältnis 1:5. Bei den Imatinib-resistenten Zellen wurde zusätzlich zum oben genannten ZKM 1 μM Imatinib hinzugefügt, um die Resistenz aufrecht zu erhalten. Die humane Glioblastomzelllinie GMS-10 konnte ebenfalls über die DSMZ bezogen werden und wurde in ZKM aus DMEM-Medium mit 10 % FKS + 1 % P/S kultiviert. Von Dr. Paul La Rosée (Mannheim) und Dr. Brian J. Druker (Portland, USA) wurden freundlicherweise die transfizierten Ba/F3-Zelllinien bereitgestellt. Dabei handelt es sich eine Pro-B-Zelllinie der Maus, die entweder mit dem Gen für das Wildtyp BCR-ABL-Protein p210 oder der hochresistenten BCR-ABL-Mutation p210-T315I transfiziert wurde [111]. Sie wuchsen ebenfalls in RPMI + 10 % FKS + 1 % P/S. Die humanen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen wurden, nach Einwilligungserklärung durch die Eltern, aus umbilikalem Nabelvenenblut gewonnen, welches direkt nach Abnabelung des Kindes durch aseptische Venenpunktion in einen Nabelschnurblutbeutel mit 21 ml Citrat-Phosphat-Dextrose aufgenommen wurde.

Zur Bestimmung der in den Experimenten benötigten Zellzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.8 Verwendung der zu untersuchenden Substanzen

Alle Substanzen wurden mit DMSO auf eine Konzentration von 10^{-2} M gelöst und die Stammlösungen dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt aufbewahrt. Zum Einsatz in zellbiologischen Experimenten wurden die Substanzen mit ZKM auf die gewünschten Endkonzentrationen verdünnt und unmittelbar weiter verwendet.

3.9 MTT-Test

Bei dem MTT-Test handelt es sich um einen Assay zur Bestimmung von Zellproliferation und -vitalität. Das Prinzip des Tests beruht auf der Metabolisierung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT-Reagenz 1) in wasserunlösliche violette Formazan-Kristalle durch mitochondriale Dehydrogenasen in stoffwechselaktiven Zellen. Die entstandenen Kristalle können mit angesäuertem Isopropanol (MTT-Reagenz 2) gelöst und die Extinktion quantitativ im ELISA-Reader bei 550 nm bestimmt werden. Dabei ist die gemessene Intensität des gebildeten Farbstoffes direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Die Zellsuspension wurde mit ZKM auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt und jeweils 90 μl

Suspension pro Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Dazu wurden 10 µl Substanz in entsprechender Konzentration bzw. ZKM als Negativkontrolle gegeben. Die Kultivierung erfolgte für 24, 48 oder 72 h, wobei jeder Wert als Sechsfachbestimmung angesetzt wurde. Anschließend wurde für 4 h mit 10 µl MTT-Reagenz 1 pro Well und daraufhin über Nacht mit 100 µl MTT-Reagenz 2 inkubiert. Am darauf folgenden Tag schloss sich die Messung der Extinktion am ELISA-Reader an.

3.10 Isolierung der CD34⁺ Zellen

Das durch aseptische Venenpunktion gewonnene Nabelblut wurde 1:2 mit Magnesium- und Kalzium-freier Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (pH 7,4) verdünnt, auf Biocoll überschichtet und für 40 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Im Interphase-Ring befanden sich nun mononukleäre Zellen (MNC), welche mittels einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen und in ein neues Röhrchen überführt wurden. Die MNC wurden zweimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet anschließend in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und pro 10⁸ Zellen wurden 100 µl FcR-Blockingreagens, 100 µl Hapten-Antikörper sowie 300 µl MACS-Puffer hinzu pipettiert. Nach 15 min Inkubation im Dunkeln bei 6-12 °C wurde das Röhrchen mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und für 10 min zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets mit 300 µl MACS-Puffer wurden der Suspension Anti-Hapten-Micro-Beads und MACS-Puffer hinzugegeben. Nach erneuter Inkubation für 15 min bei 6-12 °C wurden die Zellen gewaschen und das Pellet in 1000 µl MACS-Puffer aufgenommen.

Zur immunomagnetischen Selektion der CD34⁺ Zellen wurde die Säulen-Größe entsprechend der Zellzahl gewählt (Zellzahl < 2x10⁹: LS Separation Column; Zellzahl < 2x10⁸: MS Separation Column). Die Selektionssäule wurde in den Magneten des MACS-Ständers gesetzt, mit einem MACS-Preseparation-Filter versehen und mit 500 µl (MS-Collumn) bzw. 3000 µl (LS-Collumn) MACS-Puffer benetzt. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Dann folgten drei Waschschrte mit jeweils 500 µl (MS-Collumn) bzw. 3000 µl (LS Collumn) MACS-Puffer. Um die in der Säule durch das Magnetfeld zurückgehaltenen CD34⁺ Zellen zu gewinnen, wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, auf ein 15 ml-Röhrchen aufgesetzt und 1000 µl MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Mittels des Spritzenstempels wurden die Zellen nun sofort unter Druck in das Röhrchen gespült. Es schloß sich dann ein zweiter

Säulenlauf über eine MS-Säule an. Anschließend wurden die CD34⁺ Zellen gezählt und für den Clonogenic Assay verwendet.

3.11 Clonogenic Assay

Für den Kulturansatz des Clonogenic Assays wurden 4×10^3 CD34⁺ Zellen pro Well in 4 ml Medium ausgesät, welches neben dem Kulturmedium (bestehend aus IMDM, 20 % FKS, 200 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin und 50 mM Mercaptoethanol) auch 3,5 ml Methylcellulose-Medium und 100 µl Hemin-Stammlösung enthielt. Desweiteren wurden in die Kulturschälchen 1 U/ml Erythropoetin, 20 ng/ml c-kit-Ligand (Stammzell-Faktor), 20 ng/ml Interleukin-3 und 100 ng/ml GM-CSF gegeben.

Die Zellen wurden daraufhin für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den entsprechenden Konzentrationen an C48 inkubiert und anschließend wurden die Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units, CFU) im Umkehrmikroskop bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt, um Aussagen über Proliferation und Differenzierung der Zellen treffen zu können.

3.12 Cell Death Detection Elisa plus

Der Assay basiert auf dem Prinzip des quantitativen "Sandwich enzyme immunoassays", bei dem monoklonale Maus-Antikörper gegen DNA und Histone verwendet werden. Das erlaubt die spezifische Unterscheidung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten, die Hinweis auf den Anteil apoptotischer Zellen in der Probe geben.

Die mit der entsprechenden Substanz behandelten Zellen wurden für 72 h inkubiert, dann geerntet und gezählt. Für einen Ansatz wurden $2-5 \times 10^4$ Zellen in Suspension eingesetzt. Der abzentrifugierte Überstand wurde verworfen und 200 µl Lysispuffer zum Zellpellet gegeben. Daraufhin erfolgten eine Inkubationsphase für 30 min bei Raumtemperatur und eine erneute Zentrifugation. Pro Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Jeweils 20 µl Überstand der Proben, sowie 20 µl der im Kit enthaltenen Positivkontrolle (lyophilisierter DNA-Histon-Komplex) und 20 µl Inkubationspuffer als Hintergrundkontrolle wurden in ein Well der Streptavidin-benetzen Mikrotiterplatte pipettiert. Dann erfolgte die Zugabe von 80 µl Immunoreagenz (besteht für ein Well aus 72 µl Inkubationspuffer, 4 µl anti-Histon-Biotin, 4 µl anti-DNA-POD) pro Well. Nach einer Inkubationszeit von 2 h auf dem Schüttler wurde die Lösung

verworfen, jedes Well der Platte dreimal mit 250 μ l Inkubationspuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und schließlich 100 μ l 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS)-Lösung pro Well hineinpipettiert, welche als Substrat für die Meerrettichperoxidase (HRP) dient. Die Farbentwicklung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm im ELISA-Reader gegen ABTS als Blank bei einer Referenzwellenlänge von 490 nm gemessen.

3.13 GM-CSF-ELISA

Die GM-CSF-Sekretion wurde mit Hilfe eines humanen GM-CSF-ELISAs nach den Angaben des Herstellers gemessen. Dazu wurden die mit C48 bzw. TZD18 in FKS-freiem ZKM für 24 h inkubierten Zellsuspensionen geerntet, zentrifugiert und die gewonnenen Überstände auf einer mit monoklonalen GM-CSF-Antikörpern bestückten Mikrowell-Platte inkubiert. Nach Zugabe von konjugierter HRP und weiterer Inkubation folgte ein Waschschrift zur Entfernung ungebundener Antikörper-HRP-Komplexe. Daraufhin wurde Substratlösung zugegeben und die auftretende colorimetrische Reaktion, nach Beendigung durch Stopplösung, als Absorption bei 450 nm am ELISA-Reader gemessen.

3.14 Zellzyklusanalyse

Als Vorbereitung wurden die Zellen für 24 h in RPMI + 1 % FKS inkubiert, um eine Synchronisation mit Akkumulation in der G0/G1-Phase zu erreichen. Pro Ansatz wurden dann 1×10^6 Zellen in 6 ml ZKM aufgenommen und mit der entsprechenden Konzentration C48 für 24, 48 oder 72 h inkubiert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen pro Ansatz in PBS gewaschen und mit eiskaltem 70%igen Ethanol fixiert, um die Zellmembran für den später verwendeten RNA/DNA-Farbstoff Propidiumjodid permeabel zu machen. Auf diese Weise präpariert konnten die Zellen bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt werden. Für die FACS-Analyse am Durchflusszytometer mussten die Ansätze erneut mit PBS gewaschen und dann für jeweils 15 min mit Lösung B und C inkubiert werden. Die Lösung B ermöglicht einen RNA-Verdau zur Verhinderung der Anfärbung von RNA und Lösung C die Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid, das in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert. Gemessen wurde nun der DNA-Gehalt der Proben, wobei die Zellen an einem gebündelten Laserstrahl der Wellenlänge 550 nm vorbei geleitet werden. Bei Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch

den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen dann unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die durch einen Photodetektor registrierte emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Farbstoff pro Zelle. Da die Fluoreszenz einer Zelle wiederum proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, kann diese Färbung genutzt werden, um den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus der einzelnen Zelle zu analysieren. Dies erfolgte mit Hilfe der Darstellung in Histogrammen des Programms CellQuestPro. Um die Stabilität und Reproduzierbarkeit des Systems zu überprüfen, wurde ein Standard in Form von normalen humanen Lymphozyten verwendet. Diesem Standard können spezifische Fluoreszenz- und Streulichtwerte zur Kalibrierung des Gerätes zugeordnet werden. Auch wurde vor der eigentlichen Messung ein Abgleich gegen CEN und CTN vorgenommen. Die CEN sind Zellen, die nur ein Drittel des DNA-Gehalts einer normalen diploiden Säugetierzelle enthalten und nicht echt teilungsfähig sind. Sie durchlaufen weder eine S- noch eine G2/M-Phase. Sie bieten die Möglichkeit zur Bestimmung der Geräteauflösung und Linearität. Die teilungsunfähigen CTN sind so manipuliert, dass sie vorrangig Dubletten bilden und werden dazu verwendet, die Fähigkeit des Zytometers zu bewerten, Dubletten von sich teilenden Zellen in der G2/M- Phase zu unterscheiden.

3.15 RNA-Isolierung

1×10^6 Zellen wurden für 72 h mit verschiedenen Konzentrationen an C48 in ZKM kultiviert, dann geerntet, mit PBS gewaschen und die Suspension in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstand wurde pro Pellet 350 μ l RLT-Puffer (mit 1 % β -Mercaptoethanol) hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde nun in die im Kit enthaltene Spin-Säule übernommen und wieder zentrifugiert. Anschließend wurden 350 μ l Ethanol (70%ig) zum Lysat gegeben und die gesamten 700 μ l in eine Mini-Säule überführt. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Durchlaufes folgte ein Waschschrift mit 700 μ l RW1-Puffer und zwei weitere mit 500 μ l RPE-Puffer. Die Säule mit enthaltener RNA wurde nun in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und erneut zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 40 μ l RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran der Säule und anschließender Zentrifugation. Daraufhin folgte die RNA-Konzentrationsbestimmung am GeneQuant pro DNA/RNA Calculator, für welche 2 μ l RNA im Verhältnis 1:40 mit

10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) verdünnt wurden. Für den Nullabgleich wurde ebenfalls oben genannter Puffer verwendet. Entscheidend für die Reinheit der RNA ist dabei der Quotient der Wellenlängen 260/280, der einen Wert von 1,8-2,1 aufweisen sollte.

3.16 Reverse Transkription

Diese Methode dient der Umschreibung von RNA in cDNA, welche für anschließende PCR-Analysen verwendet wird. Zunächst wurde je Ansatz 1 µg RNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 12,5 µl gebracht. Daraufhin wurden 0,5 µl oligoDT pro Ansatz dazugeben und das Gemisch für 5 min zur Denaturierung der RNA im Thermocycler bei 65 °C erwärmt, um es dann sofort auf Eis zu stellen. Währenddessen konnte der Master-Mix wie folgt angesetzt werden: 5 µl 5x Puffer, 2,5 µl DTT (0,1 M), 2,5 µl dNTP (10 mM), 0,75 µl RNAsin (40 U/µl), 1,25 µl M-MLV. Nun folgte die Zugabe von 12 µl Master-Mix zu dem bereits hergestellten RNA-Ansatz. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und für den Ablauf der reversen Transkription für etwa 1 h 30 min in den Cycler gestellt. Die gewonnene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

3.17 Real-Time-quantitative PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine DNA-Vervielfältigungsmethode basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR mit zusätzlicher Möglichkeit der Quantifizierung der gewonnenen PCR-Produkte. Diese wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt.

Die PCR-Amplifikation der Zielgene wurde in Dreifachbestimmung angesetzt, wobei jeweils 1 µg cDNA mit folgendem Mastermix versehen wurde: 1xPCR-Puffer, 4,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM jeweils), 0,4 µl TE Puffer, 0,25 µl Rox Solution (100 µM), 5 pmol Sonde, 20 pmol je Primermix sowie 0,1 µl Platinum Taq Polymerase (5 U/µl) aufgefüllt mit RNase-freiem Wasser auf 25 µl Reaktionsvolumen. Als Negativkontrolle wurde dieser Mastermix ohne cDNA pipettiert und als interne Kontrolle diente die Amplifikation von β-Actin der entsprechenden cDNA-Probe. Die PCR erfolgte mittels ABI Prism 7700 Sequence Detection System, das folgende Schritte ausführte: initiale Inkubation bei 50 °C für 2 min und 95 °C für 10 min, Amplifikation mit 45 Zyklen bei 95 °C für je 15 s, gefolgt von 60 °C für 1 min. Die Sequence Detection

System Software analysierte anschließend das während der Reaktion generierte Fluoreszenzsignal und bestimmte die Nummer des Zyklus, in dem das Instrument begann das steigende Signal zu detektieren. Diese Zyklusnummer, bezeichnet als "threshold cycle" (CT), hängt von der Menge der eingesetzten DNA sowie der PCR-Effizienz ab. Indem nun der CT-Wert der internen β -Actin-Kontrolle vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert wird, kann die relative Expression dieses Gens bestimmt werden.

3.18 Proteinisolierung

Pro Ansatz wurden 2×10^6 Zellen für 96 h mit den Substanzen inkubiert. Für die anschließende Isolierung von Gesamtprotein mussten die Zellen zweimal mit PBS + 1 mM Natrium-Orthovanadat gewaschen werden. Abhängig von der Größe des Zellpellets wurden die Proben für 2 h mit 20-80 μ l Lysispuffer auf Eis inkubiert. Nach 30minütiger Zentrifugation wurde der gewonnene Überstand bei -80 °C aufbewahrt. Zur Isolierung phosphorylierter Proteine wurde statt des oben genannten Lysispuffers PhoshoSafe™ Extraction Buffer benutzt, der vier Phosphatase-Inhibitoren enthält.

3.19 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die BCA-Methode verknüpft die Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem, wobei es zunächst zur Komplexbildung von Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion) kommt. Die Cu^{2+} -Ionen werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, welche nach Komplexbildung mit BCA durch Absorptionmessung bei 562 nm detektiert werden können. Das BCA Protein Assay Reagent A und B wurden für die Bestimmung im Verhältnis 50:1 gemischt. Daraufhin wurden 2 μ l des isolierten Proteins im Verhältnis 1:50 mit PBS verdünnt und 30 μ l des Lysats mit 200 μ l Reaktionsgemisch in Dreifachbestimmung versehen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h konnte die entstandene Farbstoffmenge am ELISA-Reader detektiert und unter Verwendung einer Standardkonzentrationsreihe aus Albumin in Konzentrationen von $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ umgerechnet werden.

3.20 Western Blot

Die Methode des Western Blots bietet die Möglichkeit, nach Größe aufgetrennte Proteine auf eine Membran zu übertragen, um nun mittels Antikörperreaktionen die zu untersuchenden Proteine sichtbar zu machen.

Für die Western Blot Analyse wurden jeweils 50 µg Protein mit Loading Buffer + β-Mercaptoethanol (1:5) und SDS + β-Mercaptoethanol (1:50) auf ein Volumen von 24 µl gebracht. Inkubiert wurde bei 95 °C und 800 U/min für 10 min auf dem Thermomixer, um die Proteine zu denaturieren. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert. Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden jeweils 20 µl der Proben und 10 µl Protein-Standard auf das Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, 25 mA und 100 W für etwa 2 h. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran wurde zur Aktivierung für 1 min in Methanol gelegt. Daraufhin wurde der Blot in folgender Reihenfolge geschichtet: Blotpapier, Membran, Gel, Blotpapier und mit konstanter Spannung von 15 V für 45 min zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran geblottet. Die Überprüfung des Proteintransfers erfolgte mit 0,1 % Ponceau S Solution. Anschließend folgte eine Waschung der Membran für 10 min mit PBST. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 1 h in 5 ml 1xRotiBlock auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Primärantikörper konnte nun in entsprechender Konzentration in 5 ml 1xRotiBlock verdünnt dazugegeben werden und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Am zweiten Tag folgte ein Waschvorgang für 3x15 min mit PBST, woraufhin der Sekundärantikörper verdünnt in 5 ml 1xRotiBlock auf die Membran gegeben wurde. Dieser inkubierte für 1,5 h auf dem Schüttler. Danach folgten erneut vier Waschschrte à 15 min mit PBST. Schließlich wurden 1,5 ml ECL-Plus-Lösung für 1 min auf die Membran gegeben und die Membran in Klarsichtfolie gehüllt in eine Filmkassette eingelegt. Der Film wurde in der Dunkelkammer entwickelt, indem er nach unterschiedlicher Belichtungszeit für 2 min in Entwickler, dann kurz in Wasser und letztendlich für 2 min in den Fixierer gelegt wurde, um die nachzuweisenden Proteine sichtbar zu machen. Für eine weitere Verwendung der Membran wurde diese für 20 min mit 1xStripping-Puffer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend für 1 h erneut in 1xRotiBlock blockiert. Dadurch wurde der zuletzt benutzte Antikörper von der Membran entfernt und eine erneute Zugabe eines Primärantikörpers konnte erfolgen.

3.21 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in zwei bzw. drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Auswertung der Daten aus mindestens dreifacher Bestimmung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Statistik-Programm SPSS. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis mit Mittelwert und Standardabweichung. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Student's T-Test durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von PPAR α und PPAR γ

Alle drei verwendeten CML-Zelllinien exprimieren die PPAR α - sowie die PPAR γ -Unterform des PPAR-Rezeptors, wie mit Hilfe einer Western Blot Analyse nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5). Während die PPAR α -Form bei allen drei Zelllinien in ähnlich starkem Maße exprimiert wird, weist KCL22 eine wesentlich deutlichere PPAR γ -Expression auf als die Zelllinien K562 und KU812.

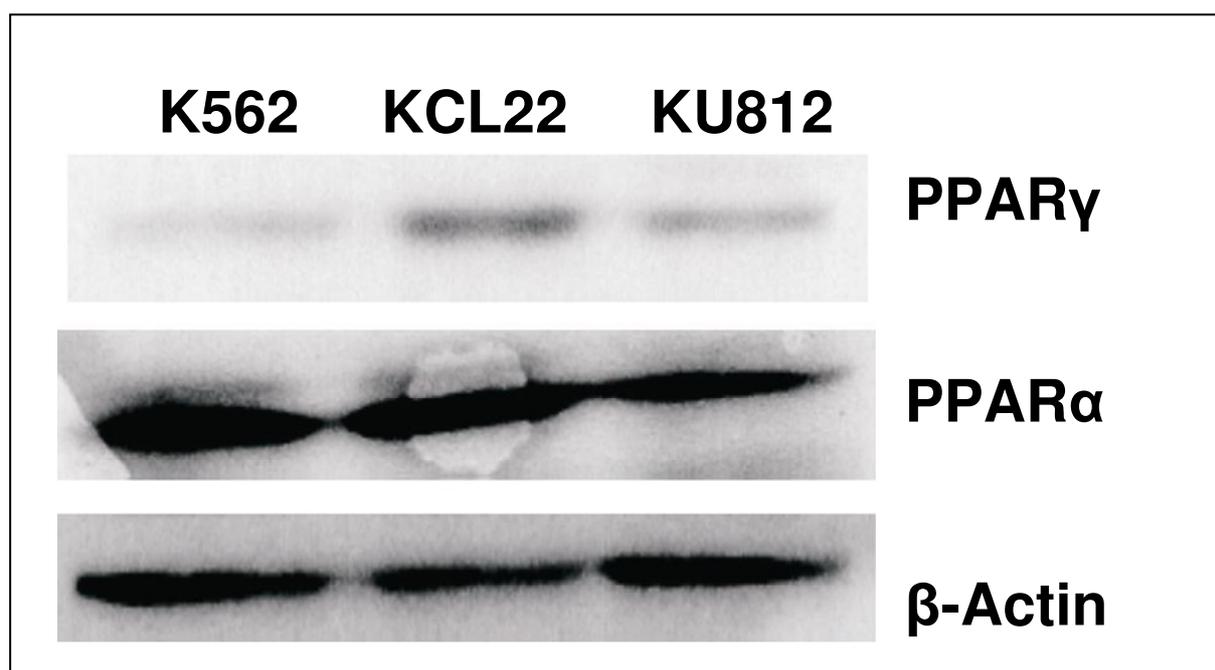


Abbildung 5: Proteinexpression von PPAR α und PPAR γ in K562-, KCL22- und KU812-Zellen, nachgewiesen durch Western Blot. Der β -Actin-Antikörper dient als Kontrolle zum Vergleich der jeweils aufgetragenen Proteinmengen.

4.2 Effekt von C48 auf die Viabilität von CML-Zelllinien

Nachdem der wachstumshemmende Effekt des dualen PPAR α/γ -Liganden TZD18 auf CML-Zelllinien bereits nachgewiesen werden konnte [109], wurde nun in den Zelllinien K562, KCL22 und KU812 der Einfluss von C48 auf die Proliferation mittels MTT-Test untersucht. Nach dreitägiger Inkubation mit Konzentrationen von 0 bis 50 μ M bewirkte C48 stets eine dosisabhängige Proliferationshemmung, ähnlich wie TZD18. Dabei konnte eine signifikante Inhibition der Proliferation bei allen drei Zelllinien ab einer Konzentration von 5 μ M C48 erreicht werden. K562, KCL22 und KU812 sind sich in ihrer Sensitivität gegenüber C48 relativ ähnlich und weisen einen

IC50-Wert, der die Konzentration angibt, die zur 50%igen Wachstumshemmung der Zellen notwendig ist, von etwa 35-40 μM auf (Abbildung 6).

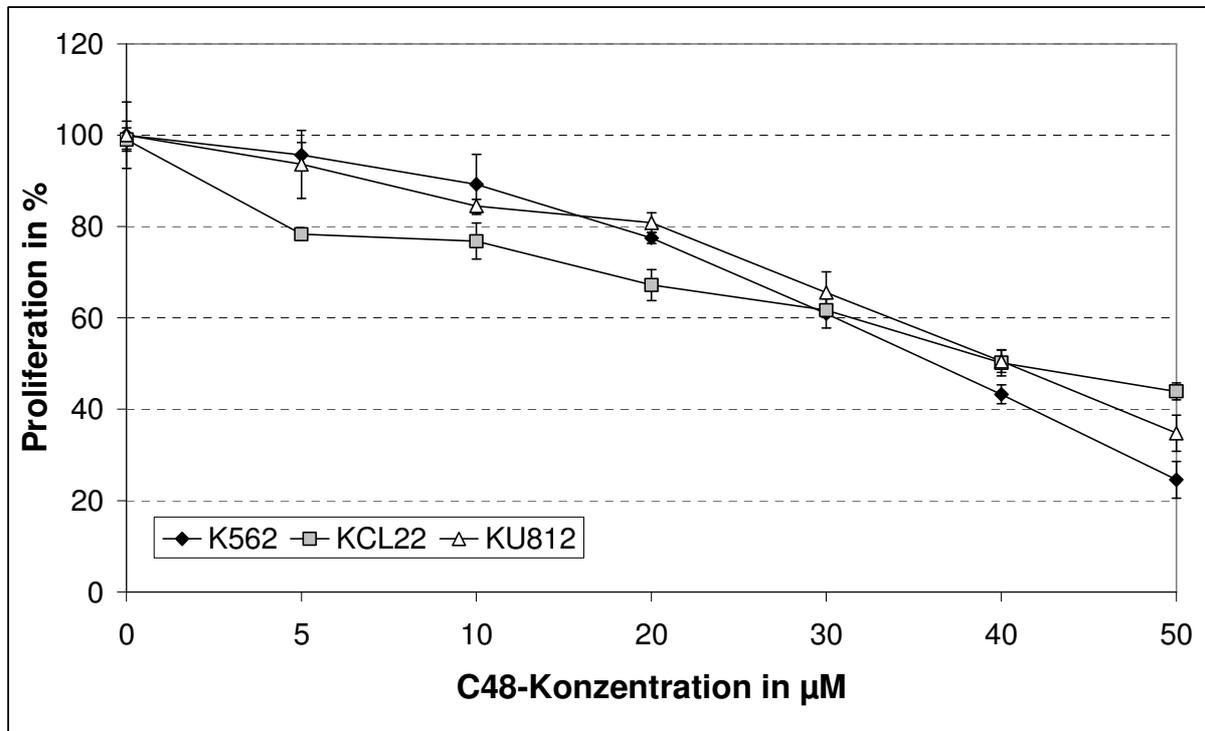


Abbildung 6: Zellwachstumskurven, dargestellt in Prozent der Kontrolle für die CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von C48 (0-50 μM) für 72 h und Messung im MTT-Test. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Neben der Dosisabhängigkeit konnte ebenfalls eine zeitabhängige Proliferationshemmung durch C48 nachgewiesen werden, indem K562-Zellen für 24, 48 und 72 h mit 25 bzw. 50 μM C48 inkubiert wurden. Die Auswertung des MTT-Tests ergab eine signifikant stärker inhibierte Wachstumsrate, je länger die Zellen mit C48 behandelt wurden. Zu allen drei Messpunkten verlief die Wachstumshemmung ebenfalls in dosisabhängiger Art und Weise (Abbildung 7).

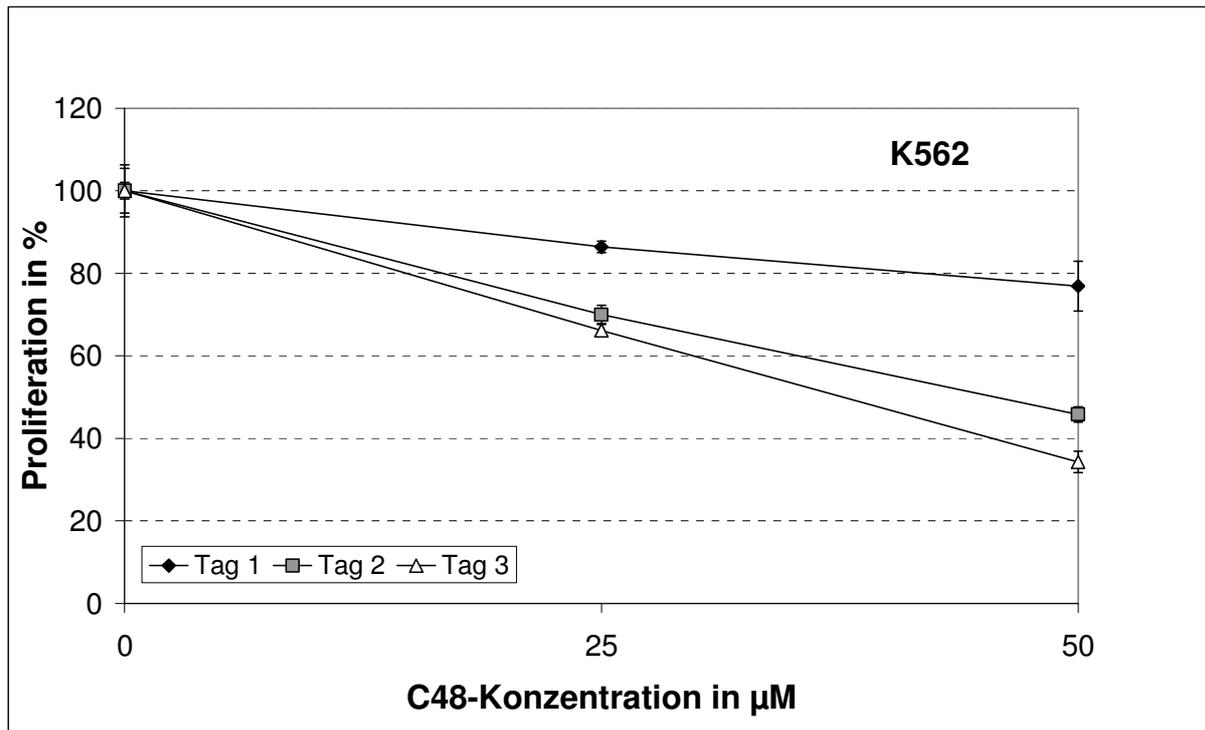


Abbildung 7: Darstellung der Proliferation, gemessen im MTT-Test, in Prozent der Kontrolle für die CML-Zelllinie K562 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von C48 (0, 25, 50 μM) für 24, 48 und 72 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Damit sicher gestellt werden konnte, dass der erzielte Effekt nicht durch eine zelltoxische Wirkung des Lösungsmittels DMSO, sondern allein durch die Wirkung von C48 zustande kommt, wurde eine DMSO-Konzentrationsreihe aufgestellt, in der DMSO, gemessen im MTT-Test, keine Auswirkung auf die Proliferation der CML-Zelllinien zeigte (Daten nicht gezeigt).

Um des Weiteren unspezifische zelltoxische Wirkungen als Ursache für den proliferationshemmenden Effekt von C48 auszuschließen, wurde ein Clonogenic Assay mit gesunden humanen CD34^+ hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt. Nach 14tägiger Inkubation im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 μM C48 konnten keine negativen Auswirkung auf das Wachstum und die Differenzierung dieser Zellen nachgewiesen werden, da keine Reduktion der Anzahl der gezählten „burst forming units-erythroid“ (BFU-E), „colony forming units-granulocyte, macrophage“ (CFU-GM), „colony forming units-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte“ (CFU-GEMM) und Gesamtkoloniezahl (CFU-total) ermittelt werden konnte. Auch die Verteilung der Kolonien in den jeweiligen Differenzierungsrichtungen zeigte nach

Behandlung mit C48 keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Tabelle 3).

C48	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM	CFU-total
<i>0 μM</i>	40 \pm 3	35 \pm 4	8 \pm 3	83 \pm 7
<i>10 μM</i>	51 \pm 2	54 \pm 10	10 \pm 4	115 \pm 14
<i>25 μM</i>	50 \pm 9	41 \pm 2	10 \pm 2	102 \pm 9
<i>50 μM</i>	43 \pm 3	48 \pm 6	10 \pm 4	102 \pm 11

Tabelle 3: Einfluss von C48 auf das Wachstum und die Differenzierung humaner CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelvenenblut, gemessen nach 14tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an C48 im Clonogenic Assay. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten in je Dreifachansatz.

Auch wurde der Effekt von C48 auf nicht hämatopoetische Zellen getestet, indem die humane Glioblastomzelllinie GMS-10 für 72 h mit bis zu 50 μ M C48 behandelt wurde. Nach Auswertung des MTT-Tests konnte in dieser Zelllinie kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation durch C48 festgestellt werden (Abbildung 8).

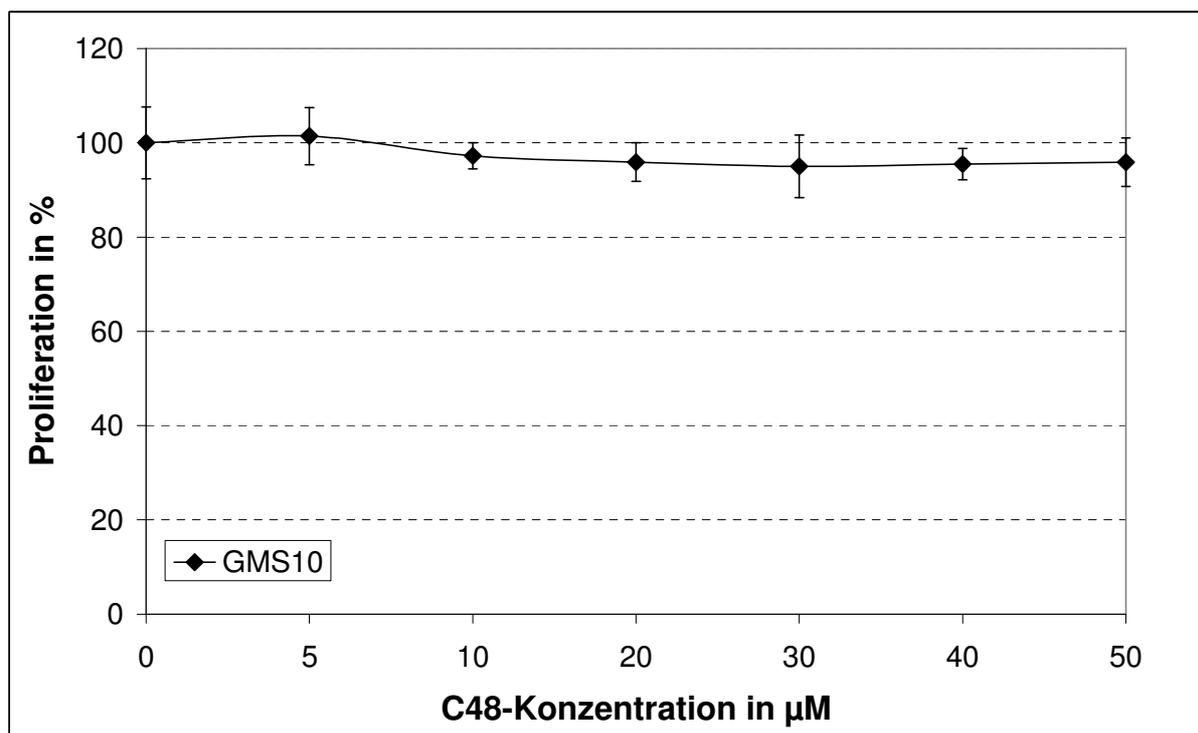


Abbildung 8: Effekt von C48 auf das Wachstum der Glioblastomzelllinie GMS-10, dargestellt in Prozent der Kontrolle, nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von C48 (0-50 μM) für 72 h. Gezeigt ist ein repräsentatives MTT-Test-Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Dies spricht ebenfalls gegen eine ungerichtete toxische Wirkung der an C48 verwendeten Konzentrationen auf das Wachstum von Zelllinien.

Um Vergleiche in der Wirkung des dualen PPAR α / γ -Agonisten C48 gegenüber PPAR α - und PPAR γ -Liganden auf die Proliferation der verwendeten Zelllinien aufstellen zu können, wurden 2×10^5 Zellen/ml für drei Tage mit jeweils 30 μM C48, 30 μM des PPAR α -Liganden WY 14643 oder 30 μM des PPAR γ -Liganden PGZ inkubiert und anschließend die Wachstumsrate per MTT-Test ermittelt. Dabei zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung auf die verwendeten CML-Zelllinien durch 30 μM C48 und 30 μM PGZ. Die Verwendung von 30 μM WY 14643 resultierte in keiner signifikanten Änderung der Wachstumsrate. Ausserdem konnte eine signifikant stärkere Inhibition der Proliferation durch C48 im Vergleich zu PGZ und WY 14643 gefunden werden (Abbildung 9). Der duale PPAR α / γ -Agonist ist somit deutlich potenter als Inhibitor der Proliferation von CML-Zelllinien im Vergleich zu alleinigen PPAR α - oder PPAR γ -Liganden.

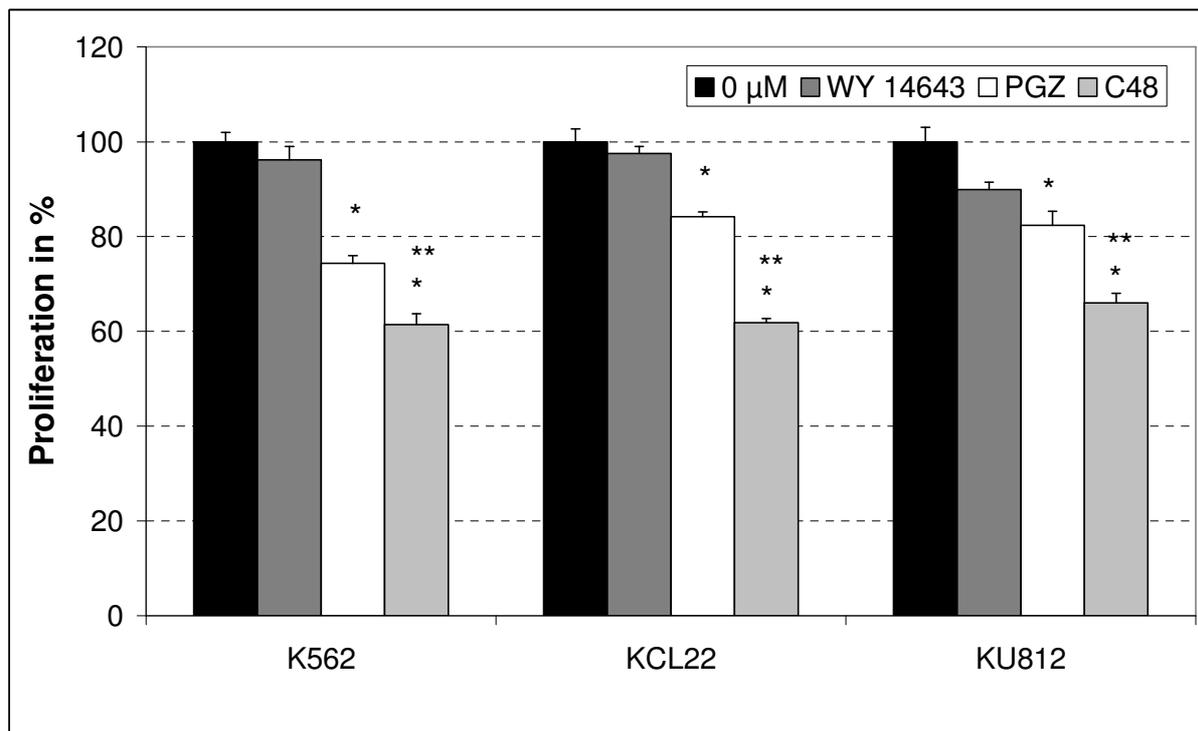
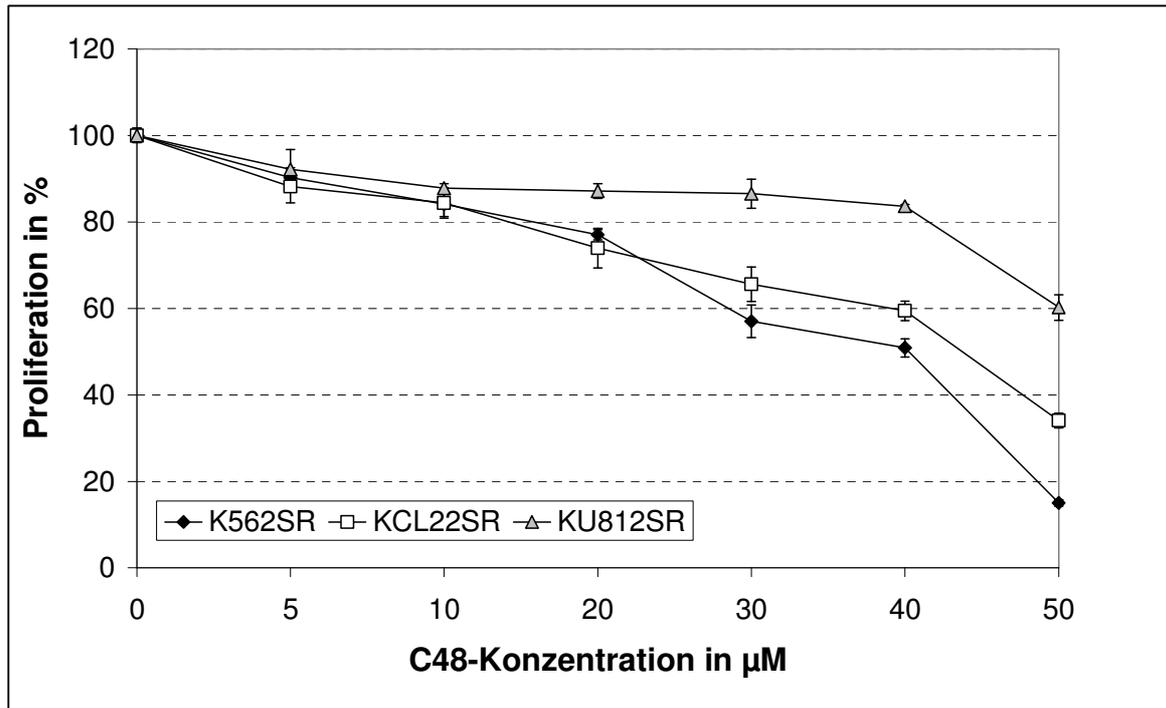


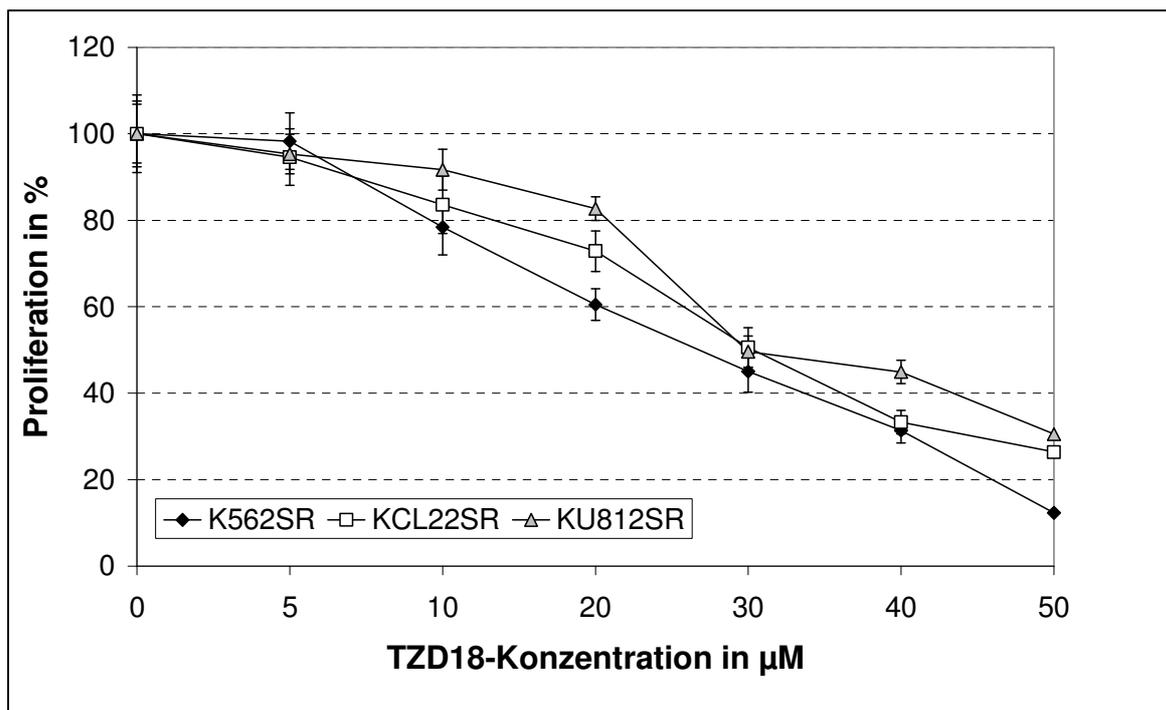
Abbildung 9: Die CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 wurden unbehandelt oder mit 30 μM C48, 30 μM WY14643 oder 30 μM PGZ für drei Tage inkubiert, um anschließend die Wachstumsrate per MTT-Test zu ermitteln. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber 0 μM), **: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber WY 14643 bzw. PGZ)

4.3 Effekt von C48 auf die Viabilität von Imatinib-resistenten CML-Zelllinien

Die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Imatinib stellt nach wie vor eine große Herausforderung in der Therapie der CML dar. Um zu testen, ob C48 und TZD18 in der Lage sind, neben Imatinib-sensiblen Zellen auch das Wachstum Imatinib-resistenter Zelllinien zu inhibieren, wurden die Imatinib-resistenten Klone K562/SR, KCL22/SR und KU812/SR der in dieser Arbeit verwendeten CML-Zelllinien für drei Tage mit C48 bzw. TZD18 im Konzentrationsbereich von 0-50 μM inkubiert. Die Auswertung des MTT-Tests zeigte bei beiden Substanzen eine dosisabhängige Proliferationshemmung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. TZD18 verhielt sich in seiner Wirkung dabei ähnlich zu den Ergebnissen der Imatinib-sensiblen Ursprungszelllinien, während C48 im gleichen Konzentrationsbereich zu einer schwächeren Hemmung der Proliferation führte und sich die Zelllinie KU812/SR sogar relativ resistent gegenüber C48 erwies (Abbildung 10).



A

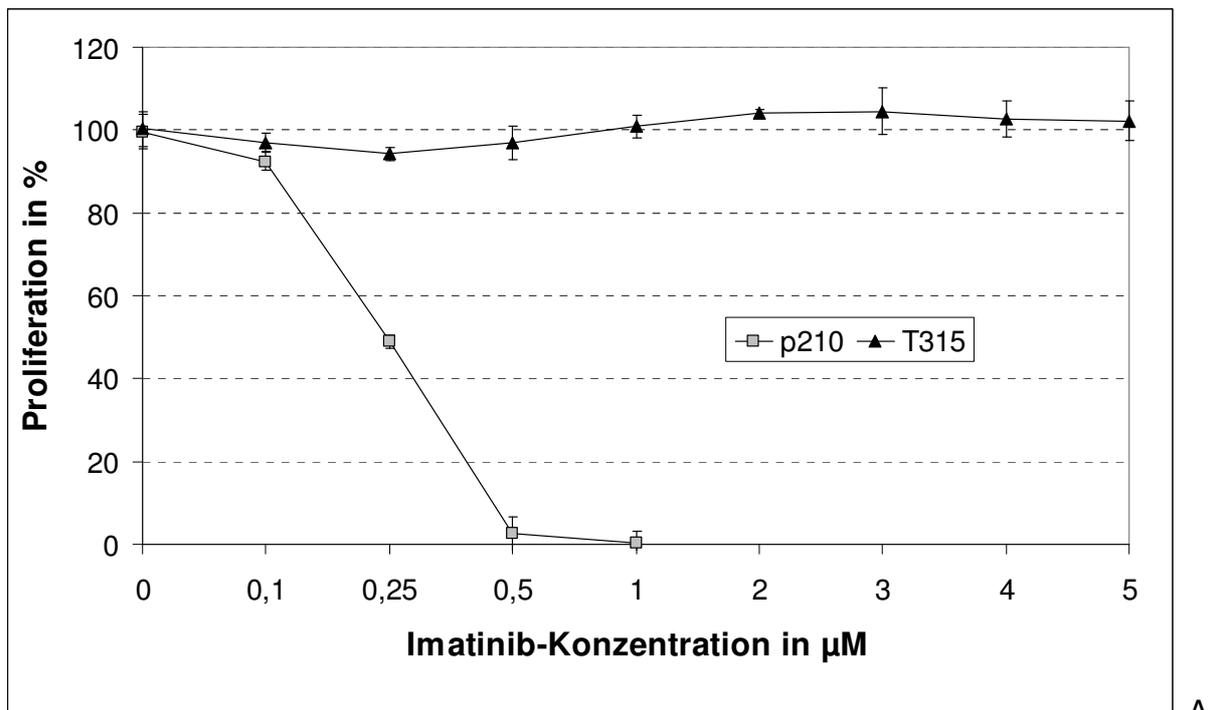


B

Abbildung 10: Darstellung der Proliferation, gemessen im MTT-Test, in Prozent der Kontrolle für Imatinib-resistente CML-Zelllinien nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von C48 (A) oder TZD18 (B) für 72 h. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Bei etwa 50 % der Imatinib-resistenten Patienten können Mutationen im BCR-ABL-Gen als Ursache gefunden werden. Eine besonders aggressive, da durch Imatinib und auch die bereits klinisch geprüften TKI Dasatinib und Nilotinib bisher

nicht beeinflussbare Variante ist die T315I-Mutation, bei der die Aminosäure Threonin an Stelle 315 im BCR-ABL-Protein gegen Interleucin vertauscht ist und so die Imatinib-Bindungsstelle im BCR-ABL-Protein verändert wird [42]. Zur Untersuchung der Wirksamkeit von C48 gegen diese Mutation, wurde eine mit dem T315I-mutierten BCR-ABL-Protein p210 transfizierte Ba/F3-Zelllinie vier Tage mit 0-100 μM C48 im Vergleich zur mit Wildtyp-p210 transfizierten Ba/F3-Zelllinie inkubiert. Wie in Abbildung 11 B dargestellt, ergab diese Exposition im MTT-Test eine signifikante dosisabhängige Proliferationshemmung, welche bei der Zelllinie mit T315I-Mutation sogar stärker ausgeprägt war als bei Zellen mit dem Wildtyp-BCR-ABL. Um die Imatinib-Resistenz der mit der T315I-Mutation transfizierten Zelllinie bzw. die Imatinib-Sensitivität der Wildtyp-Zellen nachzuweisen, erfolgte eine 96stündige Inkubation dieser Zelllinien mit steigenden Konzentrationen an Imatinib. Dabei zeigte die T315I-Zelllinie bis zu einer Konzentration von 5 μM kein Ansprechen auf Imatinib, während bei der p210-Zelllinie bereits bei 1 μM Imatinib keine Viabilität der Zellen mehr festzustellen war (Abbildung 11 A).



A

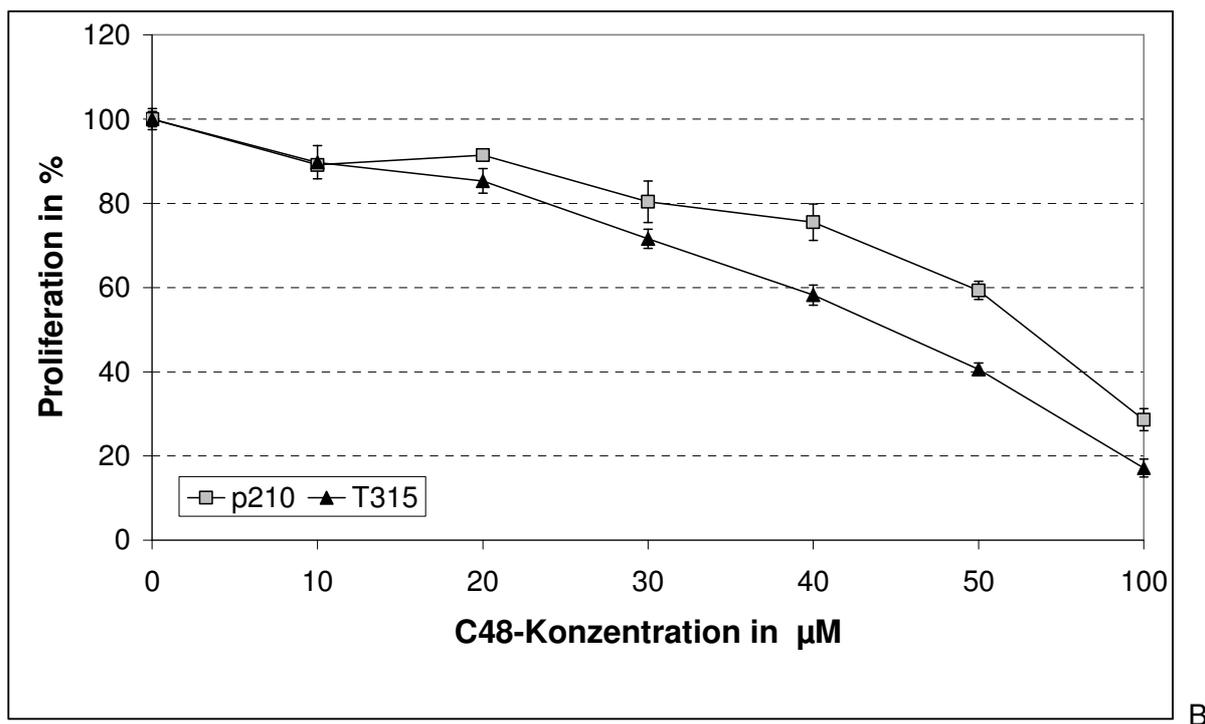


Abbildung 11: (A) Wirkung von Imatinib (0-5 μM) auf die Viabilität der transfizierten Ba/F3-Zelllinien p210 und p-210-T315I. (B) Effekt von C48 auf das Wachstum der transfizierten Ba/F3-Zelllinien p210 und p-210-T315I nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von C48 (0-100 μM) für 96 h, jeweils dargestellt in Prozent der Kontrolle. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives MTT-Test-Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

4.4 Unabhängigkeit des proliferationshemmenden Effektes von PPAR α/γ

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass PPAR γ -Liganden, sowie der duale PPAR α/γ -Agonist TZD18 in der Lage sind, ihren wachstumshemmenden Effekt auf Tumorzelllinien unabhängig von der Aktivierung des PPAR-Rezeptors auszuüben [80, 109, 112, 113]. Um zu untersuchen, ob für die Wirkung von C48 eine Abhängigkeit von PPAR α und/oder PPAR γ besteht, wurden die CML-Zelllinien für drei Tage mit C48 in An- oder Abwesenheit von Antagonisten für PPAR α und/oder γ inkubiert. Zum Ausschluss eines proliferationshemmenden Effektes durch die Antagonisten MK886 und GW9662 selbst wurden die CML-Zellen ebenfalls mit diesen in Abwesenheit von C48 kultiviert, was im MTT-Test in keiner signifikanten Wachstumshemmung bei Verwendung von 2 μM pro Antagonist resultierte. Bei Behandlung mit C48 waren nun weder der PPAR α -Antagonist MK886, noch der PPAR γ -Antagonist GW9662 und auch nicht die Kombination beider Antagonisten in der Lage, die Hemmung der Proliferation durch C48 in den CML-Zelllinien aufzuheben (Abbildung 12).

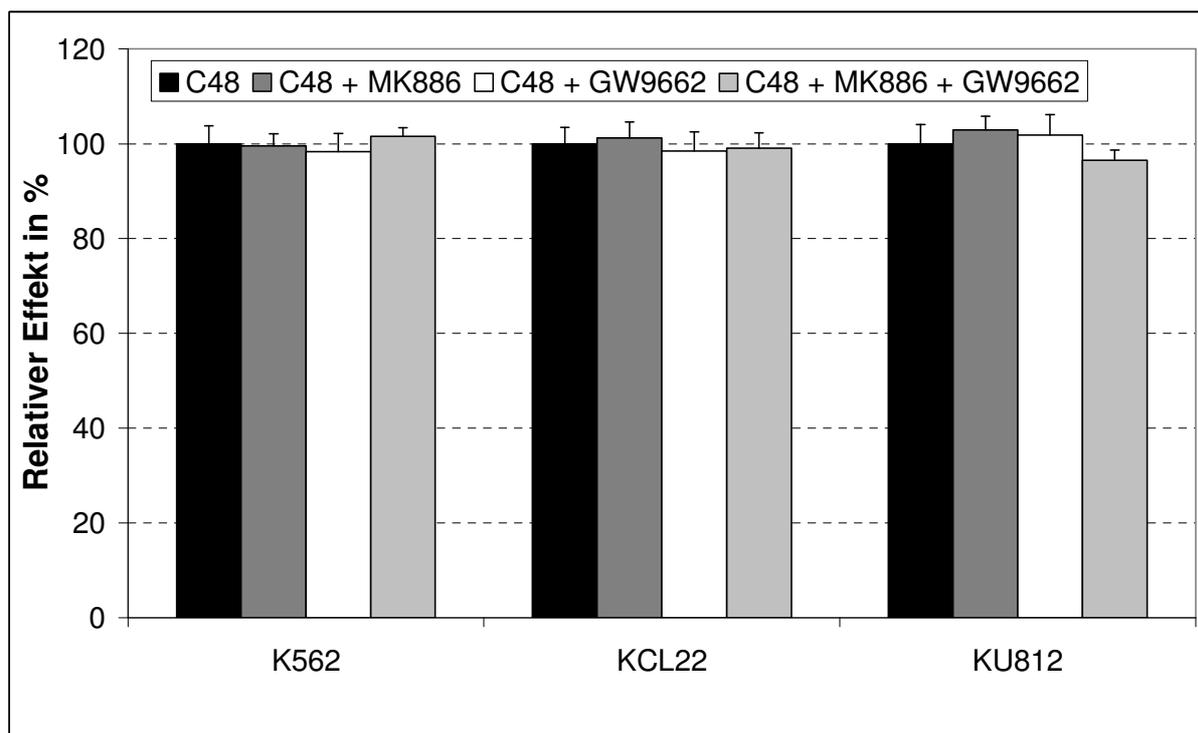


Abbildung 12: 2×10^5 /ml Zellen wurden für 72 h mit $30 \mu\text{M}$ C48 in An- oder Abwesenheit des PPAR α -Antagonisten MK886 und/oder des PPAR γ -Antagonisten GW9662 inkubiert. Die Proliferation wurde mittels MTT-Test ermittelt und dargestellt ist die relative Wirkung der Antagonisten auf den proliferationshemmenden Effekt von $30 \mu\text{M}$ C48. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus zwei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Somit scheint auch C48 seine Effekte, zumindest zum Teil, auf anderen als den PPAR-abhängigen Signalwegen zu bewirken.

4.5 Unabhängigkeit der Wirkung von C48 vom BCR-ABL-Signalweg

Da BCR-ABL das pathologische Korrelat der CML darstellt, wurde untersucht, ob C48 seinen proliferationshemmenden Effekt über Inhibierung der BCR-ABL-Signalkaskade ausübt. Dafür wurde ein Western Blot nach dreitägiger Inkubation von K562- und KCL22-Zellen mit 10 und $30 \mu\text{M}$ C48 durchgeführt. Als Indikator für die Aktivität von BCR-ABL wurde das Adapterprotein p-CrkL untersucht, das an BCR-ABL binden kann und auf diese Art eine Verbindung zu anderen Proteinmolekülen herstellt. Es konnte keine Reduktion des Proteingehalts von p-CrkL durch Behandlung mit C48 bzw. TDZ18 nachgewiesen werden (Abbildung 13).

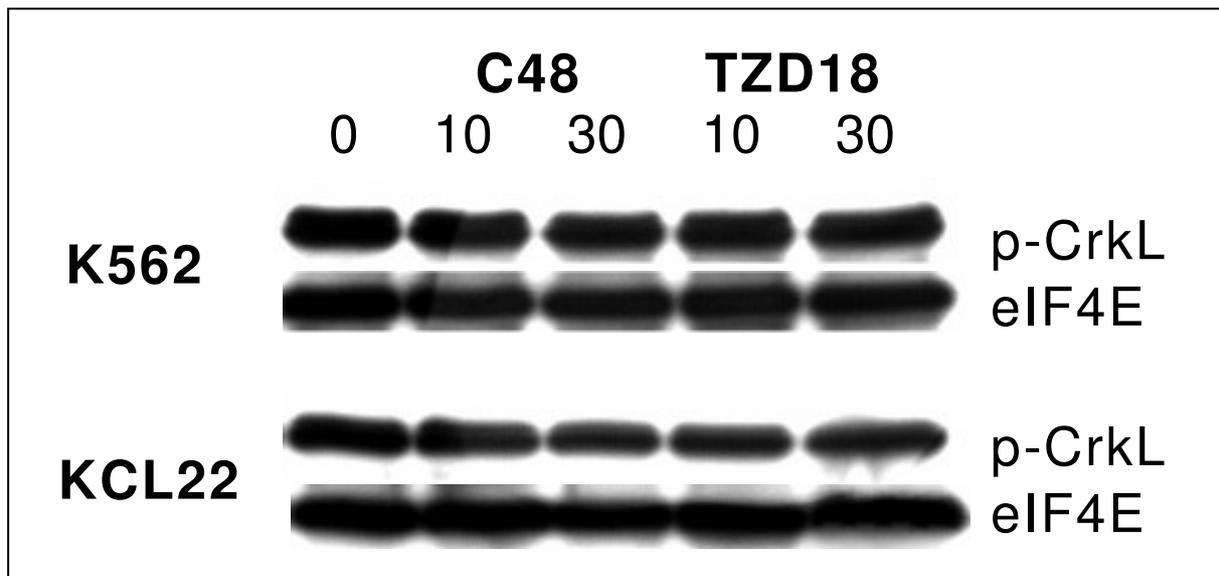


Abbildung 13: Gezeigt ist die Proteinexpression von phosphoryliertem CrkL nach dreitägiger Inkubation der Zelllinien K562 und KCL22 mit 10 bzw. 30 μM C48 bzw. TZD18. Der eIF4E-Antikörper diente als Kontrolle zum Vergleich der jeweils aufgetragenen Proteinmengen.

4.6 Beeinflussung des Zellzyklus durch C48

Eine mögliche Ursache für die durch C48 ausgelöste Wachstumshemmung ist die Beeinflussung des Zellzyklus. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden die Zelllinien KU812 und K562 für 24 bzw. 48 h mit 25 oder 50 μM C48 inkubiert, nachdem sie zuvor für 24 h zur Synchronisation in serumfreiem Medium inkubiert wurden. Die durchgeführte FACS-Analyse am Durchflusszytometer ergab für beide Zelllinien einen Anstieg des prozentualen Zellanteils in der G₀/G₁-Phase, sowie eine Abnahme der Zellzahl in den Phasen S und G₂/M (Tabelle 4).

<u>Zelllinie</u>	<u>Konzentration C48</u>	<u>G₀/G₁ (%)</u>	<u>S (%)</u>	<u>G₂/M (%)</u>
K562	0 μM	40	39	19
	25 μM	45	33	20
	50 μM	58	19	13
KU812	0 μM	46	32	21
	25 μM	53	31	11
	50 μM	54	27	7

Tabelle 4: Effekt von verschiedenen Konzentrationen an C48 (0, 25, 50 μM) auf die prozentuale Zellzahlverteilung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen nach 24- (KU812) bzw. 48-stündiger (K562) Inkubation. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Ergebnisses aus zwei unabhängigen Durchflusszytometer-Analysen.

Um die Ergebnisse der FACS-Analyse zu bestätigen, wurde ein Western Blot wichtiger Zellzyklusregulatoren durchgeführt. Untersucht wurden Proteine, die alle den Übergang von der Zellwachstumsphase (G1) zur DNA-Replikationsphase (S) regulieren, da eine Hemmung dieser Effektoren den beobachteten G0/G1-Arrest mit bedingen könnten. Wie in Abbildung 14 dargestellt, resultierte die viertägige Behandlung der CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 mit jeweils 10 bzw. 30 μM C48 in einer dosisabhängigen verstärkten Proteinexpression des Zellzyklusinhibitors p27^{kip}. Die Proteinmengen der zellzyklusfördernden Regulatoren CDK2, CDK4 und Cyclin E dagegen wurden abhängig von der eingesetzten Konzentration in allen verwendeten CML-Zelllinien reduziert.

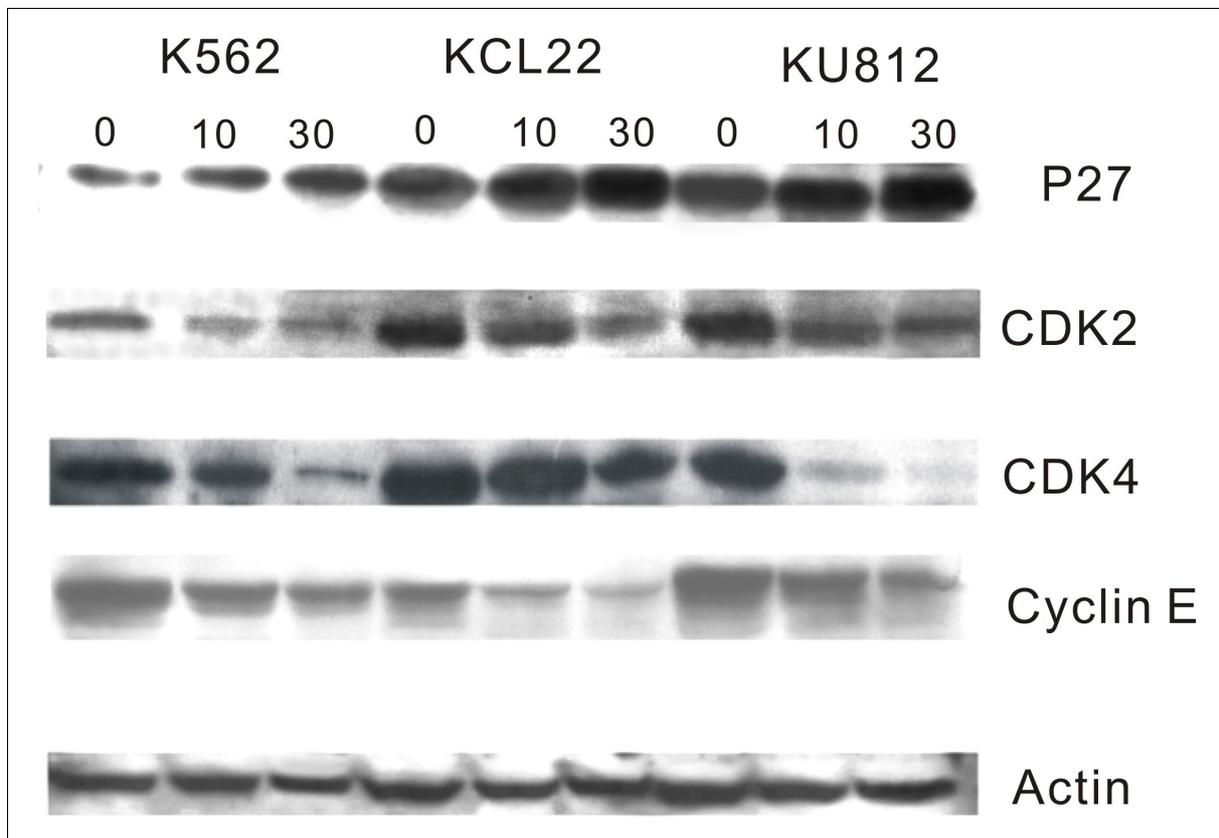


Abbildung 14: Modulation der Proteinexpression von Zellzyklusregulatoren nach viertägiger Inkubation von CML-Zelllinien mit 0, 10 oder 30 μM C48, nachgewiesen durch Western Blot Analyse. Der β -Actin-Antikörper diente als Kontrolle zum Vergleich der jeweils aufgetragenen Proteinmengen.

Auch die Ergebnisse der in Abbildung 15 präsentierten quantitativen Real-Time-PCR dieser Zellzyklusregulatoren konnten die in der FACS-Analyse gewonnenen hemmenden Effekte von C48 auf die Zellzyklusprogression bestätigen, denn C48 bewirkte nach dreitägiger Exposition von KU812-Zellen einen etwa 2-

fachen Anstieg des mRNA-Gehalts von p27^{kip} (signifikant für 30 μ M), sowie eine verminderte relative Expression der mRNA von CDK2, CDK4 und Cyclin E bei Behandlung mit 10 μ M, die dosisabhängig durch Behandlung mit 30 μ M gesteigert werden konnte. Die Expression dieser drei Effektoren konnte bei Behandlung mit 30 μ M C48 jeweils um etwa 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden. Diese Regulation auf mRNA-Ebene könnte im Folgenden wiederum für die im Western Blot aufgezeigte veränderte Proteinexpression dieser Moleküle verantwortlich sein.

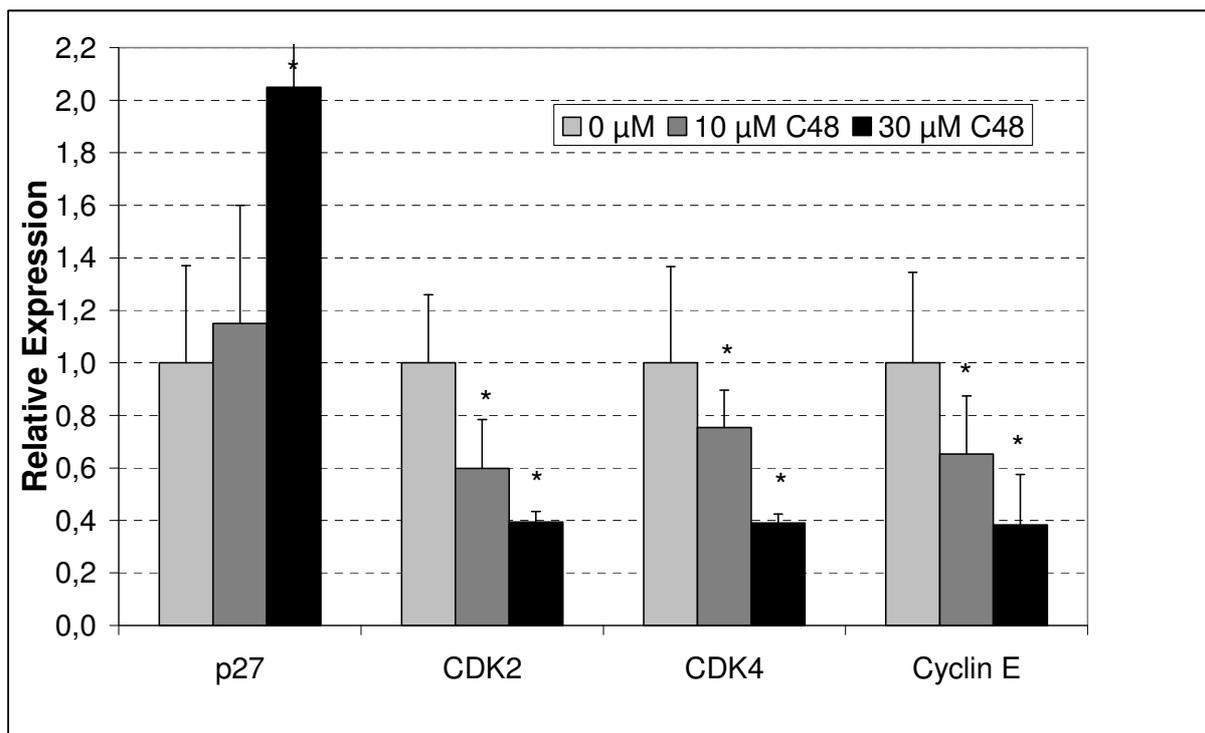


Abbildung 15: Regulation der mRNA-Expression von Zellzyklusregulatoren nach 72-stündiger Inkubation der Zelllinie KU812 mit 0, 10 oder 30 μ M C48, untersucht mittels Real-Time-quantitativer PCR. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression in Relation zur unbehandelten Kontrolle (0 μ M). Normalisiert wurden die Werte auf die interne β -Actin-Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen. *: $p < 0,05$

4.7 Einfluss von C48 auf die Apoptose

Als weiterer potentieller Mechanismus, der die von C48 bewirkte Proliferationshemmung erklären könnte, wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA die Induktion von Apoptose nach Inkubation mit C48 untersucht. Dazu waren die CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 für drei Tage der Wirkung von C48 ausgesetzt. Eine Konzentration von 50 μ M C48 bewirkte eine signifikante Erhöhung

der Apoptoserate verglichen zur unbehandelten Kontrolle und einer Konzentration von 25 μM . Somit könnte die Auslösung des spezifischen Zelltodes ebenfalls zu einem verminderten Wachstum von CML-Zelllinien nach C48-Exposition beitragen (Abbildung 16).

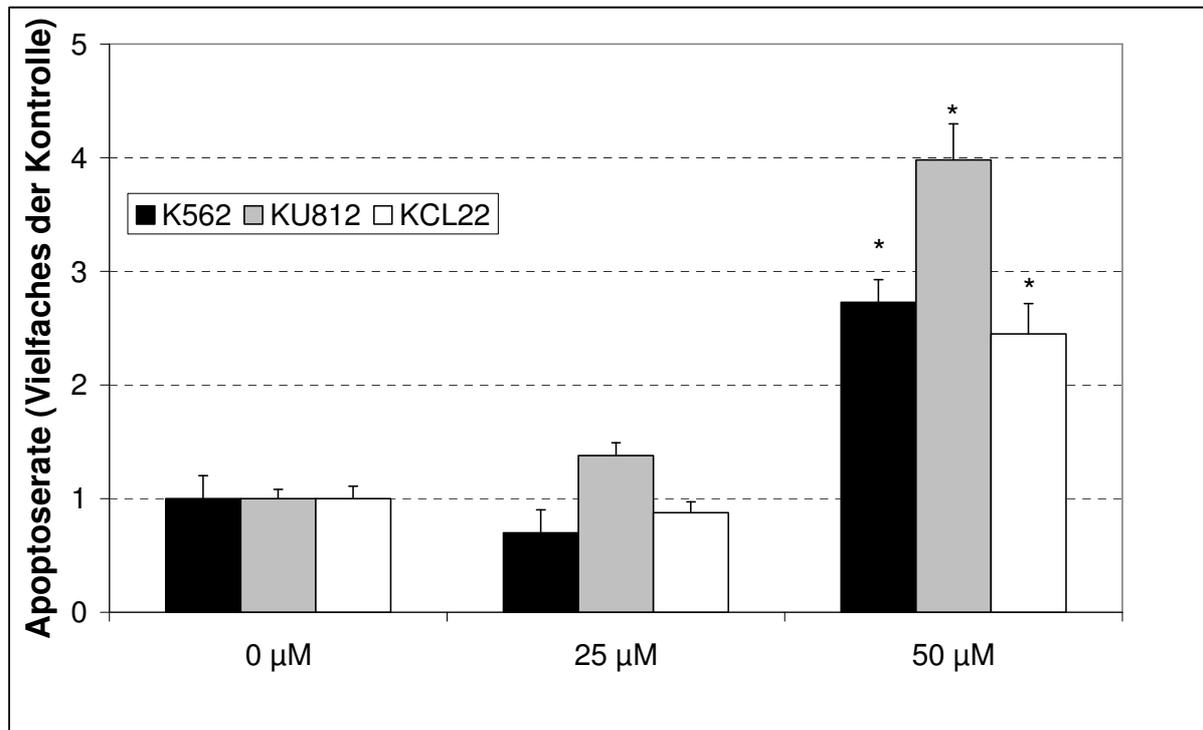


Abbildung 16: Einfluss von C48 auf die Induktion von Apoptose in CML-Zelllinien. Die Apoptoserate wurde mittels Cell Death Detection ELISA bestimmt und versteht sich als relative Anreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0 μM). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen. *: $p < 0,05$

4.8 Beeinflussung der GM-CSF-Sekretion durch C48 und TZD18

Während normale hämatopoetische Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierung abhängig von Wachstumsfaktoren wie dem Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) sind, konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden, dass Zellen der CML auch in Abwesenheit dieses Faktors proliferieren [114, 115]. Diese Beobachtung führte zu der Annahme einer autokrinen GM-CSF-Sekretion durch die CML-Zellen, die für das autonome Wachstum bei Entzug von Wachstumsfaktoren verantwortlich zu machen ist. Aufgrund dieser Überlegungen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die dualen PPAR α/γ -Liganden TZD18 und C48 in der Lage sind, die autokrine GM-CSF-

Sekretion von CML-Zelllinien zu inhibieren und so zu dem beobachteten proliferationshemmenden Effekt beizutragen. Dafür wurden K562-Zellen zunächst für 24 h in serumfreien Medium inkubiert, um den Einfluss von im Serum enthaltenen GM-CSF auszuschließen, und anschließend für 24 h mit 10 bzw. 20 μM der PPAR α/γ -Liganden behandelt. In der anschließenden ELISA-Messung konnte eine signifikante dosisabhängige Inhibierung der GM-CSF-Produktion der K562-Zellen durch TZD18, als auch C48 festgestellt werden (Abbildung 17). Insgesamt war die gemessene GM-CSF-Sekretion in dieser Zelllinie jedoch sehr gering und lag bei Inhibierung durch C48 bzw. TZD18 unter der Nachweisgrenze von 4,4 pg/ml, weshalb zur Auswertung der regulatorischen Effekte durch die Substanzen die im ELISA gemessenen OD-Werte verwendet und jeweils ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt wurden.

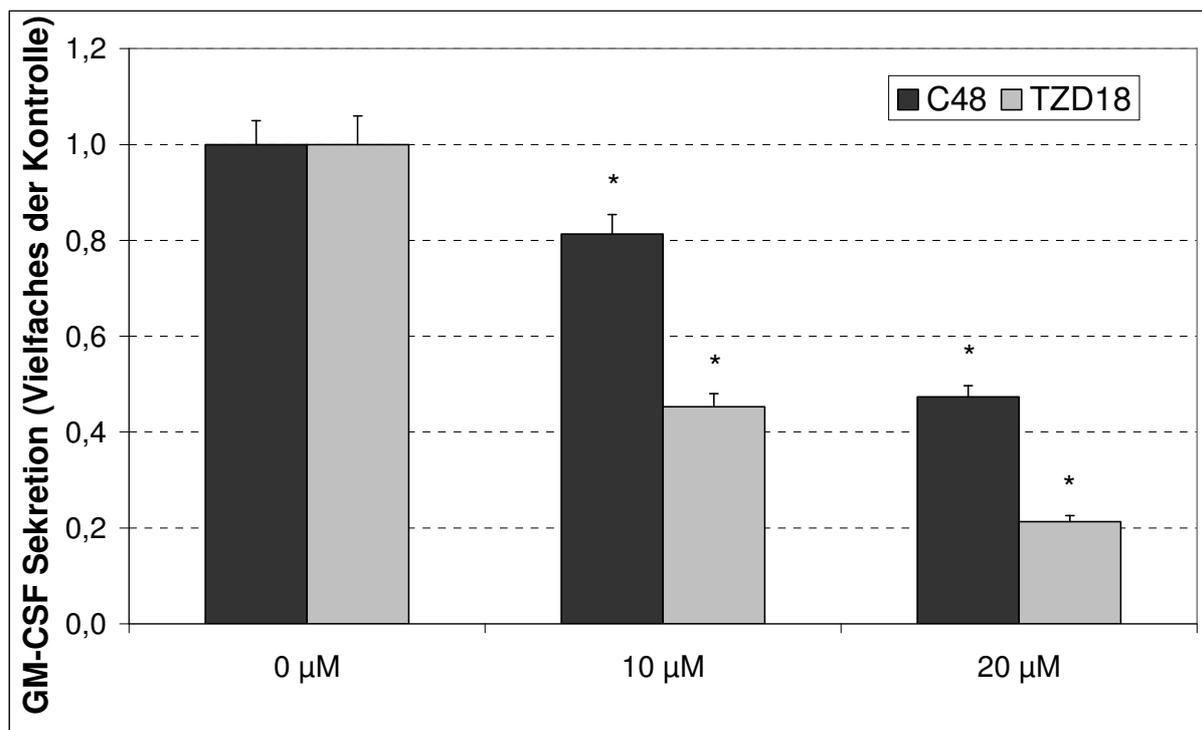


Abbildung 17: Effekt von C48 und TZD18 auf die GM-CSF-Sekretion von K562-Zellen, gemessen mittels ELISA und dargestellt als relative Veränderung verglichen zur unbehandelten Kontrolle (0 μM). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus zwei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen. *: $p < 0,05$

Um nun nachzuweisen, dass die Gegenwart von GM-CSF wesentlich zum Wachstum dieser Zellen beiträgt, wurden K562 erneut für 24 h in serumfreien Medium kultiviert und anschließend mit TZD18 in An- oder Abwesenheit von 10 ng/ml

externem GM-CSF behandelt. Bei diesem Versuch wurden nur Konzentrationen von 0 bis 20 μM TZD18 verwendet, da die Zellen durch Kultivierung in serumfreiem Medium wesentlich sensitiver auf die Wirkung des PPAR α/γ -Liganden reagierten. Dabei ergab sich eine teilweise Aufhebung des proliferationshemmenden Effekts von TZD18 bei Zugabe von GM-CSF, was auf einen Bedarf an GM-CSF zur Proliferation von CML-Zellen hinweist (Abbildung 18). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Hemmung der autokrinen GM-CSF-Sekretion zu der von dualen PPAR α/γ -Liganden ausgelösten Proliferationshemmung in CML-Zelllinien beiträgt.

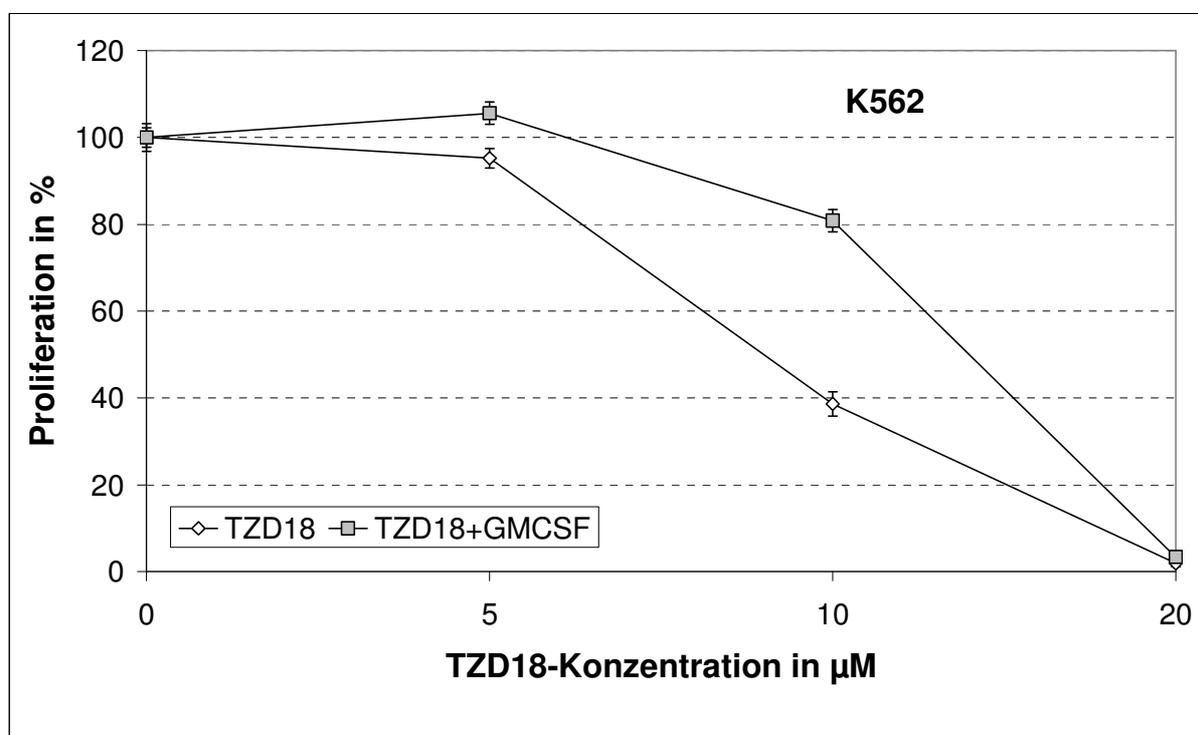


Abbildung 18: Wirkung von TZD18 (0-20 μM) auf die Proliferation von K562-Zellen, die entweder in An- oder Abwesenheit von GM-CSF (10 ng/ml) in FBS-freiem ZKM kultiviert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives MTT-Test-Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

4.9 Regulation von Akt- und Stat-Molekülen

Des Weiteren wurde der eventuelle Effekt von TZD18 und C48 auf verschiedene Signaltransduktoren evaluiert. Die Proteine AKT, STAT3 und STAT5, die entscheidend am Wachstum und Überleben von CML-Zellen beteiligt sind [29], wurden daher nach viertägiger Inkubation der Zelllinien K562 und KCL22 mit 10 und 30 μM an C48 bzw. TZD18 in ihrer Expression mittels Western Blot analysiert. Die

Auswertung ergab eine dosisabhängige Reduktion des phosphorylierten Proteinanteils an AKT, STAT3 und STAT5, während die Gesamtproteinmenge durch Behandlung mit den dualen PPAR α/γ -Liganden nicht beeinflusst wurde (Abbildung 19). Da die Phosphorylierung dieser Moleküle ein Zeichen für deren Aktivierung darstellt, kann eine Hemmung der AKT- und STAT-Signaltransduktionswege durch C48 und TZD18 angenommen werden, die für die beobachtete Wachstumshemmung mitverantwortlich sein könnte.

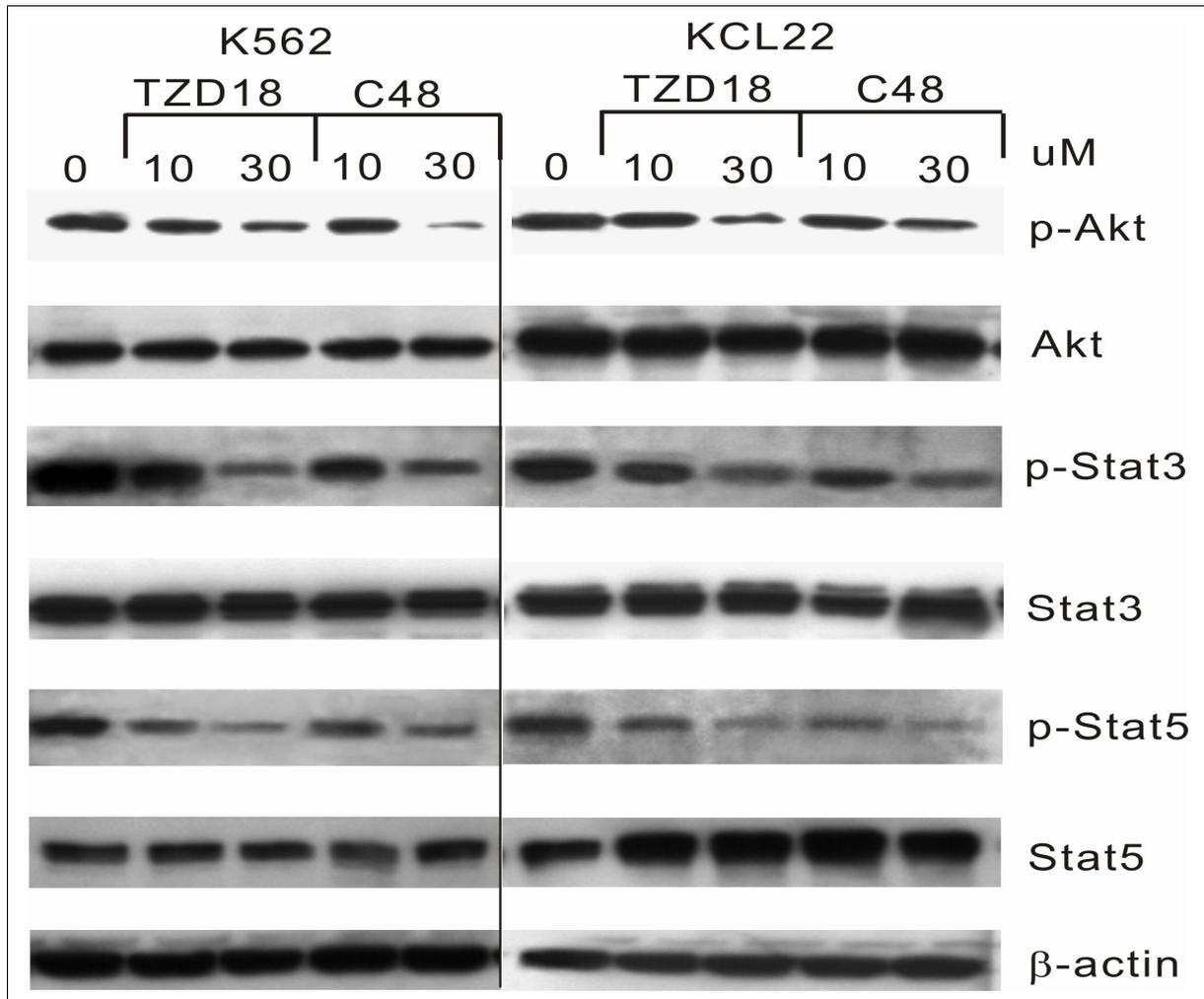
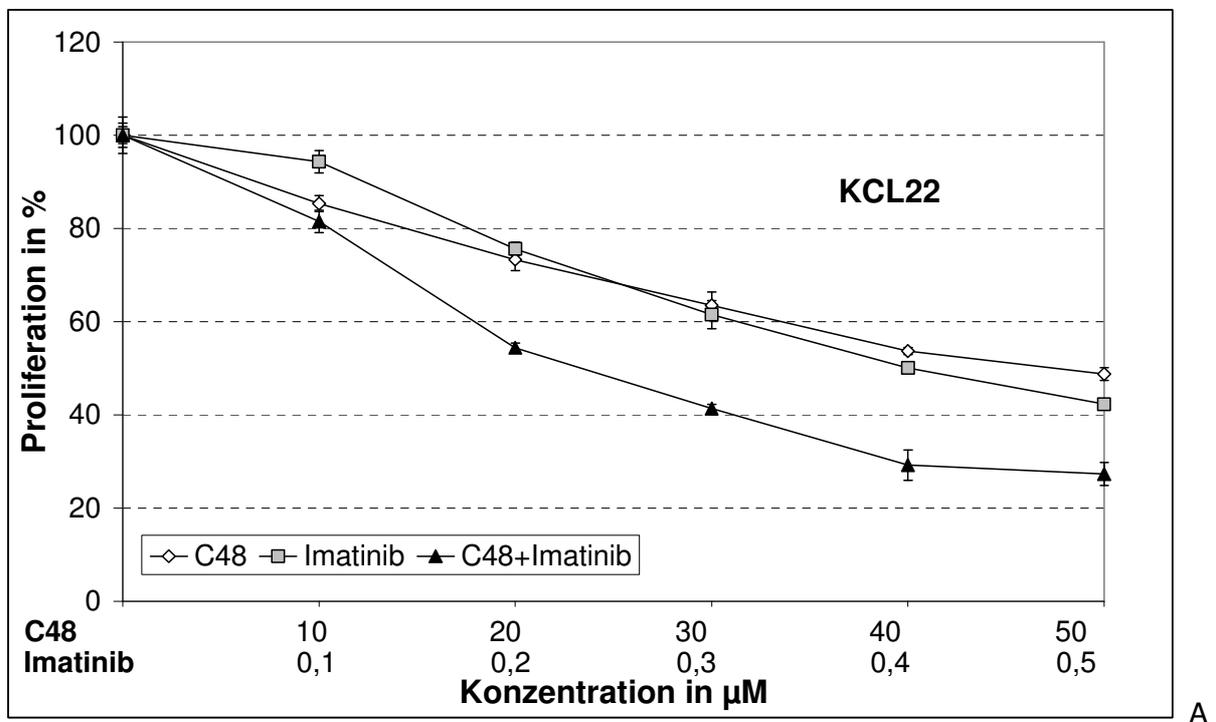


Abbildung 19: Regulation der Proteine Akt, STAT3, STAT5 sowie derer aktivierter phosphorylierter Formen p-Akt, p-STAT3 und p-STAT5 nach 72 h Behandlung von K562- bzw. KCL22-Zellen mit TZD18 oder C48, untersucht mittels Western Blot-Analyse.

4.10 Kombinationseffekt von C48 und Imatinib auf das Wachstum von CML-Zelllinien

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Überlegungen dieser Arbeit war die Untersuchung des Kombinationseffektes von C48 und Imatinib auf das Wachstum von CML-Zelllinien. Die Zelllinien KCL22 und K562 wurden für drei Tage mit 0 bis

50 μM C48, 0 bis 0,5 μM Imatinib oder einer Kombination beider Substanzen im festen Konzentrationsverhältnis von 100:1 inkubiert. Für beide Substanzen zeigten sich K562 und KCL22 sensibel im verwendeten Konzentrationsbereich. Bei K562 lagen die IC₅₀-Werte für C48 bei etwa 35 μM und für Imatinib bei etwa 0,35 μM . Die KCL22-Zellen dagegen wurden bei etwa 40 μM C48 bzw. 0,4 μM Imatinib zu 50 % in ihrem Wachstum gehemmt. Bei Kombination beider Wirkstoffe ergab die Messung der Proliferation mittels MTT-Test nun eine deutlich stärkere Inhibition der Proliferation im Vergleich zum Effekt von C48 oder Imatinib allein. Eine 50%ige Wachstumshemmung der Zellen konnte nun bereits bei Verwendung von 25 μM C48 und 0,25 μM Imatinib festgestellt werden (Abbildung 20).



A

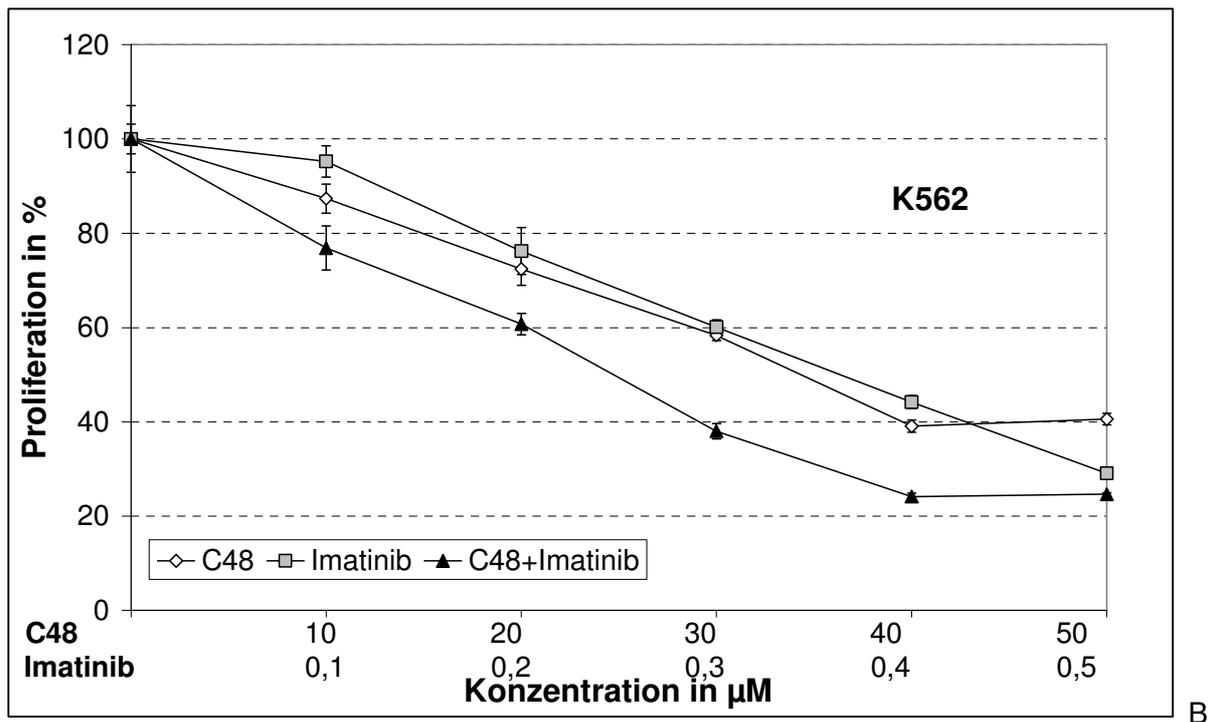


Abbildung 20: Effekt von C48 (0-50 μM) und Imatinib (0-0,5 μM), sowie die Kombination beider Substanzen im Verhältnis 100:1 auf das Wachstum der CML-Zelllinien KCL22 (A) und K562 (B), dargestellt in Prozent der Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives MTT-Test-Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Sechsfachansätzen.

Nachdem nun bei gleichzeitiger Behandlung der CML-Zelllinien mit C48 und Imatinib dieser gesteigerte proliferationsinhibierende Effekt nachgewiesen werden konnte, galt es, die zugrunde liegenden Mechanismen zu eruieren. Eine mögliche Ursache, die die verstärkte Wachstumshemmung bei Kombination von C48 und Imatinib erklären könnte, ist die Sensibilisierung der Zellen für eine durch Imatinib ausgelöste Apoptoseinduktion.

Um dies zu untersuchen, wurden die drei CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 jeweils für drei Tage mit 25 μM C48, 0,1 μM Imatinib oder gleichzeitig mit einer Kombination dieser beiden Agentien in entsprechender Konzentration inkubiert. Nach Durchführung eines Cell Death Detection ELISAs konnte für K562 und KU812 eine signifikant erhöhte Apoptoserate bei der Kombination von C48 und Imatinib festgestellt werden. So wurde die Anzahl apoptotischer KU812-Zellen, bei denen durch 25 μM C48 keine und bei 0,1 μM Imatinib eine etwa 3-fach erhöhte Anreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma, als Marker für die Apoptose, erreicht wurde, nach gleichzeitiger Behandlung mit 25 μM C48 und 0,1 μM Imatinib ein 7-facher Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Für K562 konnte die zur Kontrolle 3-fache Apoptoseinduktion

durch Imatinib allein nach Kombination mit C48 auf das 5,5-Fache gesteigert werden. Die Zelllinie KCL22 zeigte sich resistent gegen die apoptoseinduzierenden Wirkungen der verwendeten Konzentrationen an C48 und Imatinib und auch die Kombination beider Substanzen bewirkte keine Auslösung des spezifischen Zelltods (Abbildung 21).

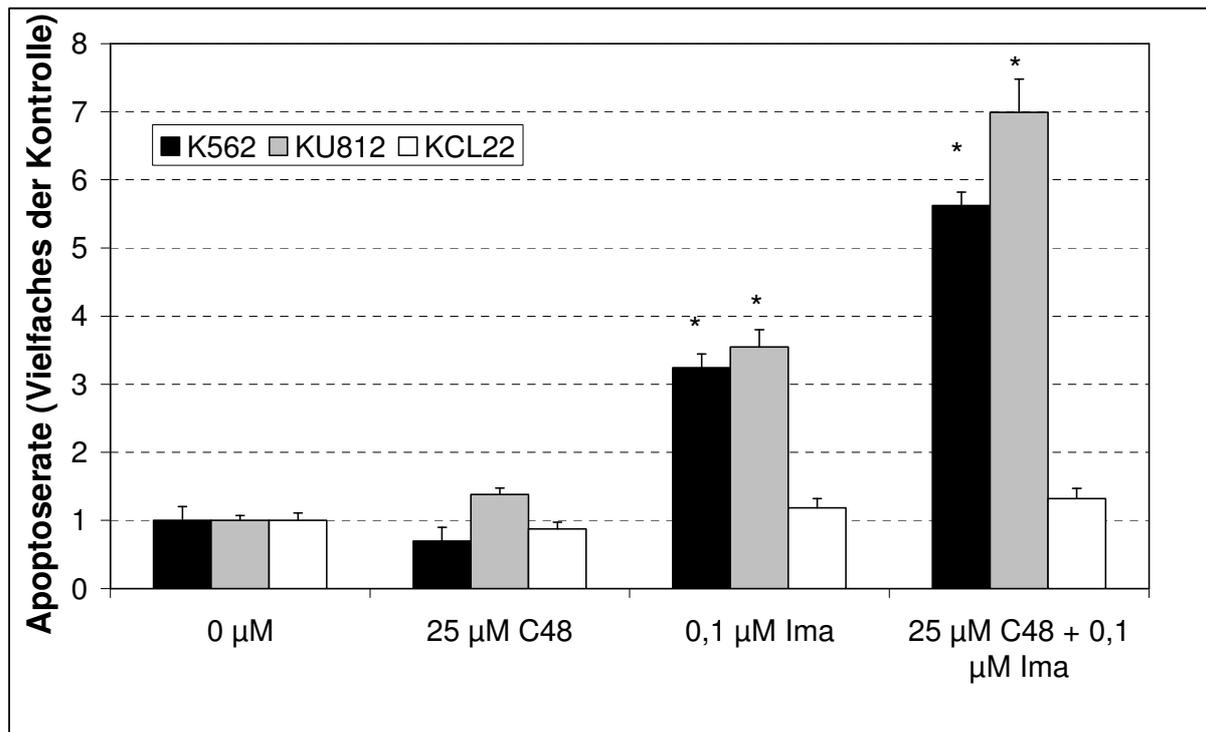


Abbildung 21: Einfluss von 25 µM C48, 0,1 µM Imatinib oder die Kombination dieser beiden Substanzen auf die Induktion von Apoptose in CML-Zelllinien. Die Apoptoserate wurde mittels Cell Death Detection ELISA bestimmt und versteht sich als relative Anreicherung von Nukleosomen im Zytoplasma als Indikator für apoptotische Vorgänge in behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (0 µM). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen. *: $p < 0,05$

5 Diskussion

Die Einführung von Imatinib in die Therapie der chronischen Phase der CML war ein bahnbrechender Erfolg und resultierte in einer enormen Zunahme an Häufigkeit und Dauer von Remissionen dieser Krankheit. Jedoch bleibt die Behandlung fortgeschrittener Stadien sowie die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Imatinib weiterhin eine große Herausforderung im Management der CML. Daher ist es sinnvoll, neue therapeutische Ansätze zu schaffen, die zum Einen die Effektivität von Imatinib durch Kombinationseffekte steigern, und zum Anderen der Entwicklung von Resistenzen vorbeugen bzw. diese in ihrem therapeutischen Outcome verbessern können.

Die Erkenntnis, dass Liganden für PPAR α bzw. PPAR γ antiproliferative Wirkungen gegenüber verschiedenen Krebszellentitäten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ausüben, bildet die Grundlage dieser Arbeit. So erschienen in den letzten Jahren auch zahlreiche Arbeiten, die die Wirksamkeit der TZDs gegenüber Zelllinien der myeloischen Leukämien beurteilten. Verursacht wurde die gefundene Proliferationshemmung zumeist durch die Induktion von Apoptose, Blockierung des Zellzyklus sowie die Auslösung von Differenzierung in den untersuchten myeloischen Zelllinien [79, 116, 117].

Duale Liganden für PPAR α und PPAR γ , wie C48 und TZD18, wurden entwickelt, um die Therapieoptionen des metabolischen Syndroms mit seinen charakteristischen Symptomen wie Hyperlipidämie, Insulinresistenz und Hyperglykämie zu verbessern, aber auch für diese Substanzklasse konnte vermehrt ein antiproliferativer Effekt auf verschiedene Krebszelllinien nachgewiesen werden [107-109, 118]. In dieser Arbeit wurden nun die Wirkungen des neuen dualen Liganden C48 auf Zelllinien der CML und dessen mögliche zugrunde liegenden Mechanismen untersucht sowie das Wissen über bereits bekannte Effekte des PPAR α/γ -Liganden TDZ18 auf CML-Zelllinien erweitert.

5.1 C48 inhibiert das Wachstum von CML-Zelllinien

Nach Behandlung der humanen CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 mit C48 konnte eine signifikante dosisabhängige Hemmung des Wachstums dieser Zellen nachgewiesen werden, ähnlich wie dies bereits für TZD18 gezeigt wurde [109]. Für eine 50%ige Wachstumshemmung wurden dabei im Mittel etwa 40 μ M

C48 benötigt. Damit liegt der IC₅₀-Wert von C48 bei diesen Zelllinien höher als der des dualen PPAR α / γ -Liganden TZD18, der mit 12-20 μ M angegeben wird. Durch Inkubation von normalen, aus Nabelvenenblut gewonnenen CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen mit bis zu 50 μ M C48 konnte jedoch eine unspezifische toxische Wirkung durch C48 auf gesunde Zellen in dem in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsniveau ausgeschlossen werden, da diese in ihrer Proliferation und Differenzierung bei Verwendung des gewählten Konzentrationsbereichs an C48 nicht gehemmt wurden. Auch die humane Glioblastom-Zelllinie GMS-10 spricht nicht auf Konzentrationen von bis zu 50 μ M C48 an, was ebenfalls einen unspezifischen Effekt durch toxische Zellschädigung als Ursache für die Wachstumshemmung in CML-Zelllinien ausschließen lässt.

In bisherigen Arbeiten konnte bereits die Wirkung von synthetischen PPAR γ -Liganden, den Thiazolidindionen, auf CML-Zelllinien nachgewiesen werden. Saiki et al. zeigten einen proliferationshemmenden Effekt von PGZ auf die Zelllinie K562, jedoch im wesentlich höheren Konzentrationsbereich von 100-300 μ M [119]. Auch in dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied in der Effektivität von C48 und PGZ auf die verwendeten CML-Zelllinien eruiert werden, bei dem sich C48 als signifikant potenterer Inhibitor der Zellproliferation herausstellte. Der von Liu et al. ermittelte IC₅₀-Wert des PPAR γ -Liganden TGZ bei der Zelllinie K562 lag nach dreitägiger Inkubation mit etwa 60 μ M ebenfalls deutlich über dem IC₅₀-Wert von C48 [120] und auch Hirase et al. konnten nur beim Einsatz von 100 μ M TGZ eine Reduktion viabler K562-Zellen nach drei Tagen erreichen [121]. Dies bestätigt eine potentere Wirkung von C48 gegenüber konventionellen PPAR γ -Liganden auf die Zelllinie K562 und da auch TZD18 als weiterer Vertreter der dualen PPAR α / γ -Liganden deutlich effektiver als Wachstumsinhibitor fungiert, kann ein Substanzklasseneffekt angenommen werden, der die verbesserte Wirksamkeit dualer PPAR α / γ -Liganden auf die Proliferation dieser Zelllinie bestätigt. Die CML-Zelllinie KU812 zeigte in der Arbeit von Abe et al. nach vier Tagen eine etwa 50%ige Hemmung der Proliferation durch TGZ, PGZ und RGZ mit Konzentrationen im Bereich von 20-50 μ M, wobei TGZ sich als stärkster Ligand erwies [122]. Die durch PGZ verursachten Effekte im von Abe verwendeten Konzentrationsbereich an PGZ konnten in eigenen Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden, da wesentlich höhere Konzentrationen an PGZ, als durch von Abe vorgegeben, zur Wachstumshemmung von KU812 nötig waren.

Der PPAR α -Ligand WY 14643 konnte in dieser Arbeit, in einer Konzentration von bis zu 100 μ M, die Proliferation der CML-Zelllinien nicht beeinflussen. Scatena et al. konnten für den PPAR α -Agonisten Bezafibrat, nicht aber Gemfibrozil und Clofibrinsäure, eine signifikante Hemmung des Wachstums der Zelllinie K562 ebenfalls erst ab Konzentrationen von 0,5 mmol/l, also 500 μ M, nachweisen, die durch eine Differenzierung der Zellen in Richtung der erythroiden Reihe erklärt wurde [72]. Somit üben alleinige PPAR α -Liganden nur einen geringen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von CML-Zelllinien aus und erscheinen aufgrund der bisherigen Studienlage nicht sinnvoll als Monotherapie der CML.

5.2 C48 hemmt die Progression des Zellzyklus und induziert Apoptose

Der in dieser Arbeit nachgewiesene Proliferationsarrest könnte durch zwei wesentliche Mechanismen verursacht werden: zum Einen aufgrund einer Blockierung des Zellzyklus und zum Anderen durch die Auslösung des spezifischen Zelltodes. Um zu untersuchen, ob C48 Einfluss auf den Zellzyklus der CML-Zelllinien ausübt, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt, die als Ergebnis für die Zelllinien K562 und KU812 eine Ansammlung der Zellen in der G0/G1-Phase und eine Abnahme der Zellzahl in den Phasen S und G/M aufwies. Die G1-Phase stellt den Abschnitt des Zellzyklus dar, in dem entschieden wird, ob die Zelle weiter den Zyklus aus DNA-Synthese und Zellteilung durchläuft oder, bei bestehendem Mangel an Wachstumsfaktoren, von der G1- in die G0-Phase übertritt, in der die Zelle über einen langen Zeitraum verharren kann. Assoziiert mit dem G0/G1-Arrest konnte eine Reduktion der mRNA- und Proteinlevel von CDK2, CDK4 und Cyclin E sowie eine verstärkte Expression des CDK-Inhibitor p27^{kip1} gezeigt werden. Diese Proteine sind entscheidend an der Regulation des G1-Restriktionspunktes, kurz vor dem Start der DNA-Replikation, beteiligt, welcher durch D-Typ-Cycline reguliert wird, die in der frühen G1-Phase mit CDK2 und CDK4 Komplexe bilden. Cyclin E dagegen bindet in der späten G1-Phase an CDK2. Die gebildeten Cyclin/CDK-Komplexe führen zu einer Phosphorylierung des Rb (Retinoblastom)-Proteins, das sich dadurch nun von Transkriptionsfaktoren löst, welche die Aktivierung wichtiger Gene bewirken, die z.B. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. P27^{kip1} inhibiert seinerseits die Cyclin/CDK-Komplexe und somit den Fortgang des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase.

Die durch C48 ausgelösten Veränderungen im Proteinlevel von Cyclin E, CDK2, CDK4 und $p27^{kip1}$ weisen alle auf eine Blockierung des G1-Restriktionspunktes und damit Unterbrechung des Zellzyklus auf G1-Ebene als eine mögliche Ursache für die gefundene Hemmung der Proliferation von CML-Zelllinien durch C48 hin. Die bisher untersuchten Effekte von C48 auf Zellzyklusregulatoren der G1-Phase sind in Abbildung 22 zusammengefasst. Auch für den dualen PPAR α / γ -Liganden TZD18 war der Einfluss auf den Zellzyklus in Arbeiten an humanen Glioblastom-, BCR-ABL⁺ ALL- und CML-Zelllinien entscheidend an der beobachteten Wachstumshemmung beteiligt. Der bei der Glioblastomzelllinie T98G durch TZD18 ausgelöste Arrest in der G0/G1-Phase war vergesellschaftet mit einer Hochregulierung von $p27^{kip1}$ [107]. Bei den untersuchten ALL-Zelllinien konnte eine Ansammlung der Zellen in der G0/G1-Phase sowie eine Abnahme der Zellzahl in der S-Phase nachgewiesen werden. Diese Veränderungen wurden mit der Hochregulation von $p27^{kip1}$ sowie der Expressionsreduktion von CDK2, CDK4, c-myc, Cyclin E und Cyclin D1 in Zusammenhang gebracht [108]. Auch die Behandlung der CML-Zelllinien K562, KCL22 und KU812 mit TZD18 bewirkte einen G0/G1-Arrest und eine verringerte Zellzahl in der S-Phase, die mit einer Herunterregulierung der Proteinlevel an Cyclin D2, Cyclin E und CDK2 sowie ebenfalls einer verstärkten Expression an $p27^{kip1}$ erklärt wurden [109].

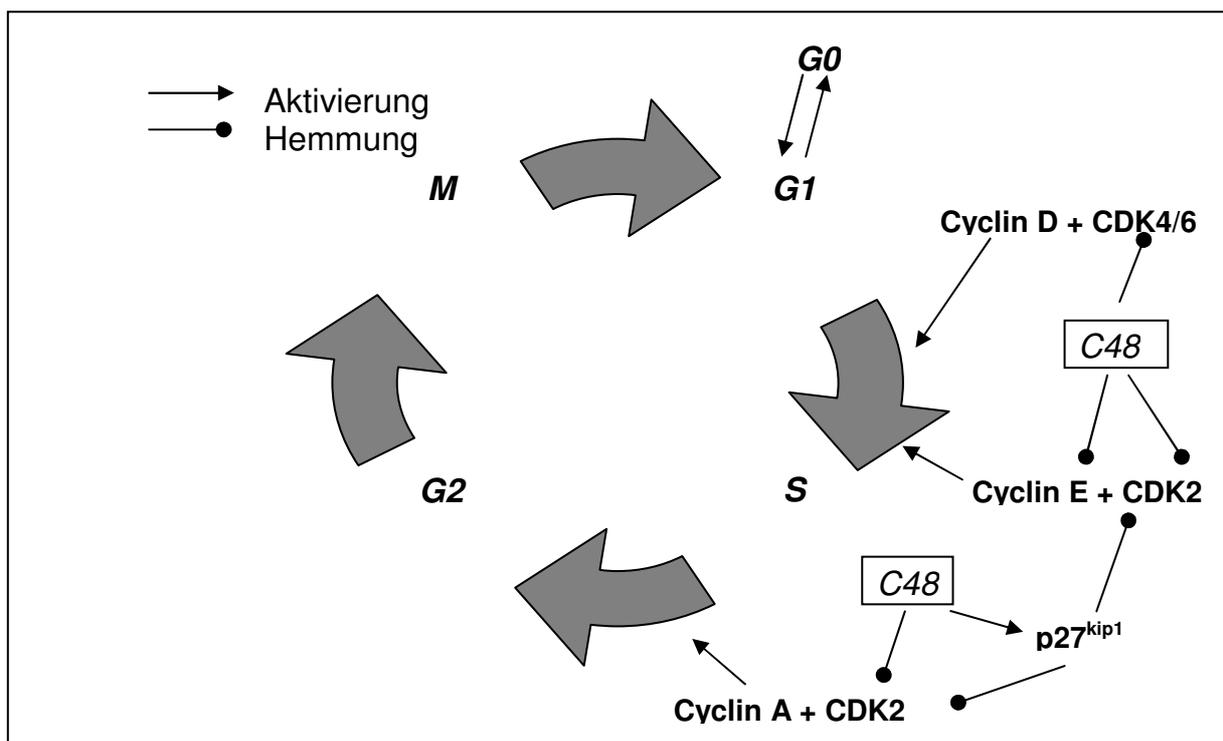


Abbildung 22: Einfluss von C48 auf verschiedene Zellzyklusregulatoren der G1-Phase.

Alleinige PPAR γ -Liganden scheinen ebenfalls ihre proliferationshemmenden Effekte auf CML-Zelllinien zum Teil über eine Blockierung des Zellzyklus auszuüben. So konnten Abe et al. bei der Zelllinie KU812 die Induktion eines G0/G1-Arrestes sowie eine Reduktion der Zellzahl in der G2/M-Phase nach Exposition gegenüber TGZ feststellen, denen die gefundene Hyperphosphorylierung von Rb und eine Abnahme der Proteinexpression an Cyclin D1 und Cyclin E zugrunde liegen könnten [122].

Da die Auslösung von Apoptose nur bei Verwendung hoher Konzentrationen an C48 erreicht werden konnte, scheint die Blockierung des Zellzyklus einer der Hauptmechanismen zu sein, der zu der beobachteten Inhibition der Proliferation in CML-Zelllinien bei Behandlung im niedrigeren Konzentrationsniveau führt. Im Grad der Apoptoseinduktion unterscheidet sich C48 deutlich von TZD18, das bereits bei Verwendung von 20 μ M deutliche Apoptosemechanismen in den Zelllinien K562, KCL22 und KU812 induzieren kann, die mit einer verstärkten Aktivität der Caspasen 8 und 9 sowie einer Heraufregulierung des proapoptotischen Proteins Bax einhergehen [109]. Diese Tatsache könnte für die geringeren IC50-Werte an TZD18 im Gegensatz zu C48 zur Proliferationshemmung dieser Zelllinien verantwortlich sein, da sich die Prozesse der Zellzyklusblockierung und der spezifischen Zelltodauslösung durch TZD18 als proliferationshemmende Mechanismen ergänzen. Auch Liu et al. betrachteten die Aktivierung von Bax, verbunden mit einer Hemmung der antiapoptotischen Proteine Bcl2 und Survivin als involvierten Mechanismus der durch TGZ und 15d-PGJ2 ausgelösten Apoptose in K562-Zellen. Aufgrund des geringen proapoptotischen Effekts von C48 wurden die zugrunde liegenden Mechanismen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

5.3 Unabhängigkeit von PPAR

In früheren Arbeiten konnte bereits demonstriert werden, dass der antiproliferative Effekt von PGZ und TZD18 auf Leukämiezelllinien der CML und ALL unabhängig von der Aktivierung von PPAR α und/oder γ auftritt [79, 108, 109]. Auch C48 scheint seine Wachstumshemmung auf CML-Zelllinien über andere Mechanismen als die klassischen PPAR-Signalwege auszuüben, da der PPAR γ -Antagonist GW9662, der PPAR α -Antagonist MK886 sowie die Kombination aus beiden Substanzen nicht in der Lage waren, die Wirkung von C48 aufzuheben. Daher kommen z. B. die Aktivierung anderer, PPAR-unabhängiger

Transkriptionsfaktoren oder eine direkte Proteinaktivierung bzw. -inhibierung als grundlegende Wirkmechanismen der dualen PPAR α / γ -Liganden in Frage. Das Phänomen der PPAR-Unabhängigkeit ist jedoch nicht leukämiespezifisch, sondern tritt auch bei einer Vielzahl anderer Tumorentitäten auf, unter anderem bei Zelllinien des Mammakarzinoms, Glioblastoms, Blasen- oder Prostatakarzinoms [80, 107, 123].

Die Aufklärung der Mechanismen, die eine PPAR-unabhängige Proliferationshemmung ermöglichen, ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Ein Ansatz beschreibt die Inaktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 2 (eIF2 α) durch TZDs in PPAR^{-/-}-Zellen. Dieser ist an der Translationsinitiation vieler zellzyklusregulierender Proteine sowie Onkogene beteiligt und eine Hemmung durch TZDs könnte somit zum Anti-Tumor-Effekt dieser Substanzen beitragen [124]. Auch die von Straus et al. gefundene Hemmung an verschiedenen Stellen der Signalkaskaden des Transkriptionsfaktors NF κ B durch 15-dPGJ₂ in Zellen ohne PPAR γ -Expression kommt als mögliche Erklärung zur PPAR-unabhängigen Wachstumshemmung in CML-Zellen in Frage, da NF κ B wesentlich an der Transkription apoptosehemmender sowie überlebensfördernder Gene beteiligt ist [125].

5.4 C48 inhibiert das Wachstum Imatinib-resistenter Zelllinien

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit dualer PPAR α / γ -Liganden auf die Proliferation Imatinib-resistenter CML-Zelllinien, da die Entwicklung einer Imatinib-Resistenz eines der Hauptprobleme darstellt, das die Therapie der CML verkomplizieren kann.

Um zunächst zu klären, ob duale PPAR α / γ -Liganden selbst direkten Einfluss auf die durch BCR-ABL-induzierten Signaltransduktionswege haben, wurde die Expression des pCrkL-Proteins in CML-Zellen nach Behandlung mit C48 bzw. TZD18 bestimmt. CrkL verbindet als Adapterprotein BCR-ABL mit wichtigen Zielproteinen wie CBL, HEF1, CAS oder Paxillin. Die Rolle des durch BCR-ABL tyrosinphosphorylierten p-CrkL in Zusammenhang mit leukämischen Transformationsprozessen ist noch nicht ausreichend geklärt. Da es jedoch ein biologisch signifikantes Substrat für BCR-ABL darstellt, kann die Proteinexpression von p-CrkL als Marker für den Proteingehalt an BCR-ABL in CML-Zelllinien betrachtet werden [126]. Die Exposition von K562- und KCL22-Zellen gegenüber effektiven Konzentrationen an C48 bzw. TZD18 hatte keinen Einfluss auf die durch

Western Blot-Analyse zeigte Proteinexpression des pCrkL-Proteins. Somit scheint die durch duale PPAR α / γ -Liganden ausgelöste Proliferationsinhibition in CML-Zelllinien unabhängig von der Regulation des für die CML pathogenetisch charakteristischen BCR-ABL-Signalweges zu funktionieren. Diese Erkenntnis unterstützt die Fragestellung nach einer Wirksamkeit dualer PPAR α / γ -Liganden gegenüber Imatinib-resistenten Zelllinien, da BCR-ABL-unabhängige Mechanismen und damit von Imatinib verschiedene Angriffspunkte eine Proliferationshemmung der Zellen bedingen müssten.

In eigenen Experimenten konnte nun eine durch C48 bedingte Hemmung des Wachstums von Imatinib-resistenten Zelllinien nachgewiesen werden, die sich, ähnlich zu Imatinib-sensiblen Zellen, in dosisabhängiger Art und Weise darstellte. Dafür wurden zunächst die Imatinib-resistenten Klone K562/SR, KCL22/SR und KU812/SR der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien K562, KCL22 und KU812 getestet, die durch Behandlung mit schrittweise steigenden Konzentrationen an Imatinib (0,1–1,0 μ M) etabliert wurden [110]. Der ursächliche Mechanismus für die beobachtete Imatinib-Resistenz in diesen Zelllinien ist unklar. Da durch Analyse des Genexpressionsprofils von KCL22/SR keine Mutationen im BCR-ABL-Gen aufgedeckt werden konnten und auch die Menge an exprimiertem BCR-ABL-Protein in diesen Zellen nicht gesteigert war, scheint die beobachtete Imatinib-Resistenz unabhängig von einer direkten Aktivierung des BCR-ABL-Signalweges zu sein. Microarray-Analysen deuten auf eine Störung des Ras-Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweges als mögliche Ursache für die Resistenzentwicklung in diesen Zellen hin [127]. Inwieweit C48 Einfluss auf diesen Signalweg nimmt, bleibt in weiteren Untersuchungen noch zu klären.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde nun untersucht, ob duale PPAR α / γ -Liganden ebenfalls das Wachstum von Zelllinien beeinflussen können, die eine häufige, Imatinib-induzierende Mutation des BCR-ABL-Proteins aufweisen. Dafür wurde die pro-B-Mauszelllinie Ba/F3 verwendet, die zum Einen mit dem Wildtyp-BCR-ABL p210 und zum Anderen mit der BCR-ABL-T315I-Mutation transfiziert wurde [111]. Diese Mutation bewirkt am häufigsten eine klinische Imatinib-Resistenz bei CML-Patienten und spricht des Weiteren nicht auf eine Therapie mit den neuen TKI Dasatinib oder Nilotinib an [53]. Verursacht wird diese Mutation durch einen Aminosäureaustausch von Threonin gegen Isoleucin in der 579-Basenpaarregion, welche die ATP-Bindungsstelle und die Aktivierungsschleife der Kinasedomäne des

BCR-ABL-Proteins bildet und folglich zu einer sterischen Veränderung der Imatinib-Bindungsstelle führt, die die Bindung von Imatinib verhindert. Nach viertägiger Inkubation mit C48 und Messung der Viabilität konnte nun eine dosisabhängige Proliferationshemmung der mit Wildtyp-BCR-ABL- als auch der mit T315I-transfizierten Ba/F3-Zelllinie festgestellt werden. Dabei schienen die T315I-tragenden Zellen sogar sensitiver auf C48 zu reagieren als die unmutierten Zellen. Da C48 somit sowohl in Zelllinien mit intaktem als auch mutiertem BCR-ABL wirksam ist, weisen diese Daten ebenfalls auf einen BCR-ABL-unabhängigen Mechanismus der Proliferationshemmung hin.

5.5 Hemmung der GM-CSF-Sekretion

Über GM-CSF ist bekannt, dass es autokrine Wachstumsschleifen in verschiedenen BCR-ABL⁺ Zelllinien verursachen kann [114]. Außerdem wurden erhöhte Serumspiegel an GM-CSF im Blut von CML-Patienten [128] sowie in Mäusen, die mit BCR-ABL-transduziertem Knochenmark transplantiert wurden [129], nachgewiesen. Diese Daten führten zu der Hypothese einer pathophysiologischen Relevanz von GM-CSF am Wachstum und Überleben von CML-Zellen. In dieser Arbeit konnte ein inhibitorischer Effekt von C48 und TZD18 auf die GM-CSF-Sekretion von K562-Zellen demonstriert werden. Da die Zugabe von externem GM-CSF zu den in serumfreiem, also GM-CSF-defizientem, Medium kultivierten K562-Zellen die durch TZD18 bewirkte Proliferationshemmung zum Teil aufheben konnte, scheint eine Beeinflussung der autokrinen GM-CSF-Wachstumsregulation ein möglicher Mechanismus für die beobachtete Hemmung der Proliferation von CML-Zellen durch duale PPAR α / γ -Liganden zu sein, denn dieses Ergebnis zeigt, dass K562-Zellen besser in An- als Abwesenheit von GM-CSF überleben und dem inhibitorischen Effekt von TZD18 widerstehen können.

Auch in anderen Arbeiten konnte der hemmende Einfluss von PPAR γ -Liganden auf die Sekretion von GM-CSF verschiedener Zelllinien bereits nachgewiesen werden, während PPAR α -Liganden in dieser Hinsicht unwirksam waren. So zeigten Kumagai et al. einen inhibitorischen Effekt von 15d-PGJ2 auf die GM-CSF-Produktion von Endothelzellen und bronchialen Epithelzellen über einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus [130, 131]. 15d-PGJ2 hemmt ebenfalls die GM-CSF-Sekretion in Monozyten auf PPAR γ -unabhängige Weise [132]. In diesen Arbeiten zeigte der synthetische PPAR γ -Ligand Ciglitazon (CGZ) keinen

inhibitorischen Effekt auf die GM-CSF-Sekretion, wohingegen er in glatten Muskelzellen der Atemwege diese Wirkung ausübt [133]. In den erwähnten Zelllinien trägt die Hemmung von GM-CSF jeweils zu der antiinflammatorischen Wirkung von PPAR γ -Liganden bei. Unklar bleibt, über welche Mechanismen K562-Zellen auf die Wirkung von GM-CSF reagieren, da sie weder den transmembranösen noch den im Zytosol gelösten GM-CSF-Rezeptor exprimieren [134, 135]. Daher scheinen andere Rezeptoren bzw. rezeptorunabhängige Mechanismen die wachstumsfördernde Wirksamkeit von externem und autokrinem GM-CSF zu vermitteln, um die beobachteten Effekte zu erklären. Ein weiterer Ansatzpunkt, der zu klären bleibt, ist, inwieweit die Hemmung der GM-CSF-Sekretion auch an der Wachstumsinhibition in Imatinib-resistenten Zellen beteiligt ist, da eine verstärkte GM-CSF-Sekretion bedingt durch eine BCR-ABL-unabhängige Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges eine Resistenz gegenüber Imatinib und Nilotinib hervorrufen kann und die Unterdrückung dieses Prozesses somit das Überleben der resistenten Zellen reduzieren könnte.

5.6 Regulation von Akt-/ STAT-Molekülen

Da GM-CSF ebenfalls als starker Aktivator von STAT5 bekannt ist, welches ein antiapoptotisches Substrat von BCR-ABL darstellt [136], interessieren nun mögliche Wirkungen von C48 und TZD18 auf diesen und andere wachstumsfördernde Effektoren. Dabei erschienen die Proteine pAKT, pSTAT3 und pSTAT5 von besonderem Interesse, da sie im Rahmen der JAK/STAT- und PI3K/AKT-Signalwege die Proliferation und das Zellüberleben fördern sowie die Zellen vor Apoptose bewahren. STAT3 und STAT5 wirken als Transkriptionsfaktoren, die nach Aktivierung durch JAKs ihre Funktion aufnehmen, welche ihrerseits durch Aktivierung von Zytokinrezeptoren stimuliert werden. Die Proteinkinase AKT wird dagegen durch PI3K aktiviert und kann durch Phosphorylierung antiapoptotische Proteine wie Bad aktivieren bzw. proapoptotische Ziele wie die Caspase 9 hemmen.

Um einen Zusammenhang von Exposition gegenüber dualen PPAR α/γ -Liganden und Regulation dieser Effektoren zu untersuchen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt, die der Beurteilung der Proteinexpression von pAKT, pSTAT3 und pSTAT5 nach Behandlung mit den dualen PPAR α/γ -Liganden C48 und TZD18 diente. In dieser Arbeit war es möglich, eine Reduktion der Proteinlevel dieser phosphorylierten Moleküle nachzuweisen, während die Gesamtmenge der Proteine als Summe aus phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Anteil keine

Unterschiede nach Behandlung mit C48 bzw. TZD18 aufzeigte. Da die Phosphorylierung dieser Proteine ihren Aktivitätszustand widerspiegelt, könnte eine Hemmung der AKT- und STAT-Signalwege an der durch duale PPAR α / γ -Liganden induzierten Wachstumshemmung von CML-Zelllinien beteiligt sein. Da der PI3K/AKT- sowie der JAK/STAT-Signalweg zwei Hauptsignalübertragungswege von BCR-ABL darstellen [29], greifen TZD18 und C48 somit in dessen Signalkaskaden ein, ohne BCR-ABL selbst zu beeinflussen und erreichen dadurch möglicherweise zum Teil auch die Wachstumshemmung BCR-ABL-mutierter bzw. Imatinib-resistenter Zelllinien.

Über TZD18 ist des Weiteren bekannt, dass es die Aktivität des Transkriptionsfaktor NF κ B, welcher in die Regulation von Genen der Immunantwort, Zellproliferation und –differenzierung involviert ist, hemmen kann [109]. Die NF κ B-gesteuerten Genprodukte üben außerdem eine antiapoptotische Schutzfunktion sowie eine regulatorische Funktion im Zellzyklus aus. NF κ B ist nun wiederum ein Substrat von AKT, da AKT den I κ B (I κ B-Kinase)-Komplex aktiviert, der durch Phosphorylierung von I κ B (inhibitory κ B) die Freisetzung sowie anschließende DNA-Bindung von NF κ B ermöglicht [29]. Folglich könnte die untersuchte Hemmung der Proteinexpression von pAKT durch duale PPAR α / γ -Liganden auch für die verringerte Aktivität von NF κ B mitverantwortlich sein, die wiederum die Vulnerabilität der CML-Zellen für Apoptose und Zellzyklusblockierung steigert, um auf diese Weise zur Wachstumshemmung beizutragen.

5.7 Kombinationseffekte von C48 und Imatinib

In früheren Arbeiten konnte bereits der synergistische Effekt einer Kombination von Imatinib mit dem dualen PPAR α / γ -Liganden TZD18 auf die Proliferation von BCR-ABL⁺ ALL- und CML-Zelllinien nachgewiesen werden [108, 109]. Die Idee, Imatinib mit anderen Substanzen zu kombinieren, um somit einerseits eine Wirkungsverstärkung des TKI zu erreichen, als auch andererseits die Aktivität gegenüber Imatinib-resistenten Zellen zu gewährleisten bzw. zu erhöhen, wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Für die CML-Zelllinie K562 wurde unter anderem ein synergistischer wachstumshemmender Effekt bei Kombination von Imatinib mit entweder I α , Daunorubicin oder Cytosin-Arabinosid (Ara-C) ermittelt [137].

Auch die Kombination von Imatinib mit C48, in einer Konzentration, die einzeln keine Apoptose auslöste, resultierte in einer signifikant höheren Zelltodrate als die Behandlung mit Imatinib allein, was eine Verstärkung der durch Imatinib induzierten Apoptose durch gleichzeitige Behandlung mit C48, möglicherweise durch Sensibilisierung der Zellen für den Zelltod-auslösenden Effekt von Imatinib annehmen lässt. Diese Ergebnisse könnten wiederum ein Ansatzpunkt zur Erklärung der gesteigerten Wachstumshemmung in CML-Zelllinien nach Kombination von C48 und Imatinib gegenüber der Behandlung mit den Einzelsubstanzen darstellen, wie sie im MTT-Test nachgewiesen wurde. Nur die Zelllinie KCL22 verhielt sich relativ resistent gegenüber der apoptose-induzierenden Wirkung von Imatinib bei der in diesem Experiment verwendeten Konzentration, was auch von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt wurde [110].

Die Schnittstellen, die den Kombinationseffekt beider Substanzen bedingen, könnten der PI3K/AKT- sowie der JAK/STAT-Signalweg sein, da, wie bereits beschrieben, BCR-ABL als auch C48 an unterschiedlichen Punkten auf diese Signalkaskaden einwirken. Dies ist in Abbildung 23 dargestellt. Ob die gleichzeitige Behandlung der CML-Zellen mit dualen PPAR α/γ -Liganden und Imatinib auch in einer verstärkten Hemmung der Proteinlevel von pAKT bzw. pSTAT3/5 gegenüber Inkubation mit den Einzelsubstanzen resultiert, bleibt noch zu klären. Dass jedoch die simultane Hemmung des JAK/STAT-Signalweges zu einer verbesserten Wirkung auf Imatinib-sensible als auch -resistente Zellen führt, konnte unter Anderem auch für die Kombination von Imatinib mit Ara-C, dem MEK1/2-Inhibitor PD184352 oder Mycophenolsäure nachgewiesen werden [138-140].

Auch NF κ B, das bekanntlich durch TZD18 als auch, direkt und vermittelt über BCR-ABL und AKT [29], durch Imatinib in seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor gehemmt wird, könnte ein wichtiger gemeinsamer Angriffspunkt beider Substanzen sein. Durch gleichzeitige Hemmung von NF κ B bei Inkubation mit beiden Substanzen könnte die durch NF κ B ausgeübte antiapoptotische Schutzfunktion stärker geschwächt werden als bei Behandlung mit einer der beiden Substanzen allein. Die Überwindung einer Imatinibresistenz in K562/SR- als auch KCL22/SR-Zellen durch Blockierung von NF κ B mittels Inhibitoren des I κ B-Komplexes in Kombination mit Imatinibgabe konnte bereits gezeigt werden [141]. Diese Erkenntnis, die mit erhöhter Sensibilität der Zellen für die Auslösung von Apoptose und Wachstumsinhibierung einhergeht, ist möglicherweise auch für den beobachteten Kombinationseffekt von

dualen PPAR α/γ -Liganden und Imatinib mitverantwortlich, da sich auch hier eine gesteigerte Apoptoserate bei gleichzeitigem Einsatz beider Substanzen nachweisen lässt.

Welche anderen Mechanismen den Kombinationseffekt mit Imatinib bedingen, bleibt Gegenstand weiterer Forschungsbemühungen. Auch wäre interessant zu untersuchen, ob dieses Phänomen sich auch auf andere TKI wie Dasa- oder Nilotinib übertragen lässt und wenn ja, ob durch diesen Ansatzpunkt die Behandlung Imatinib-resistenter Zellen verbessert werden könnte.

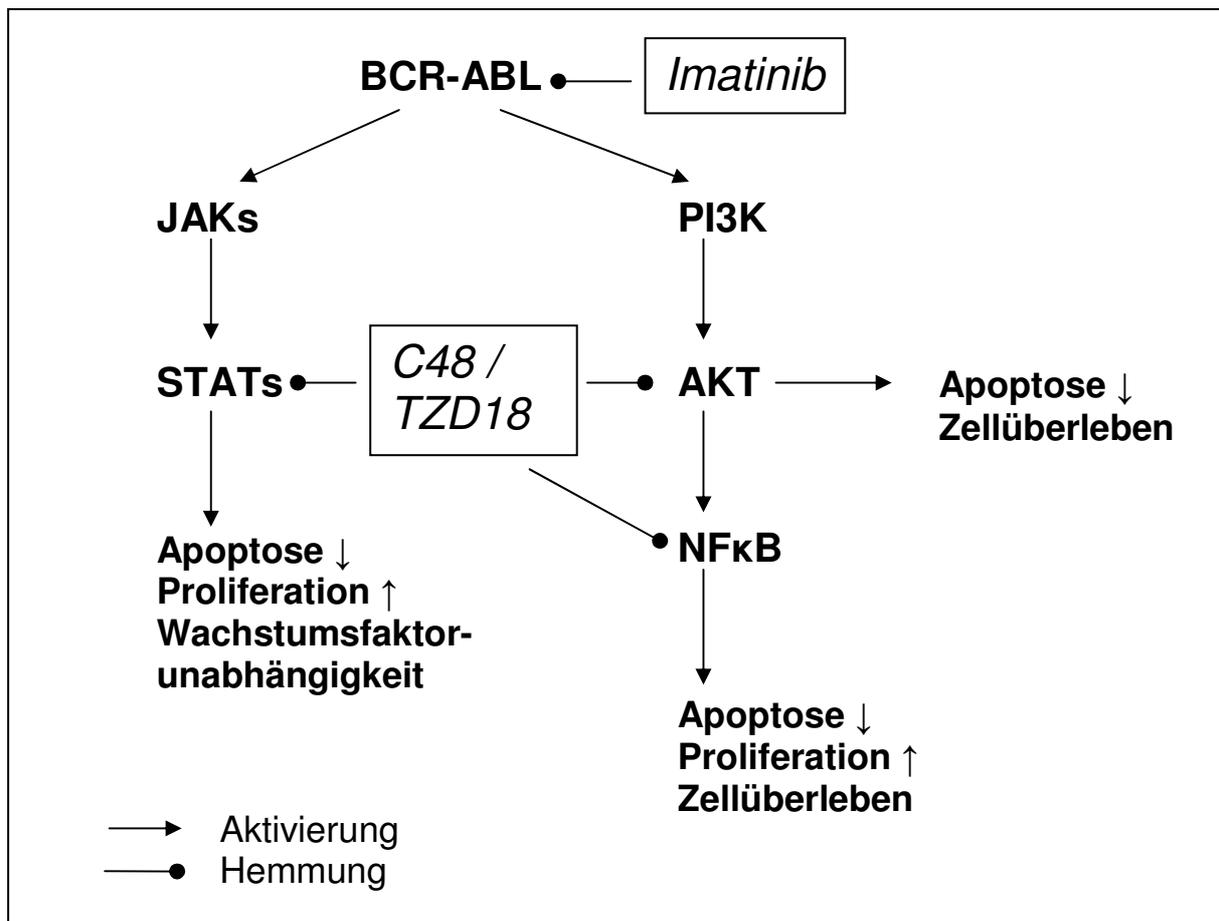


Abbildung 23: Überblick über die bisher bekannten Wirkungen im Zusammenspiel von Imatinib und dualen PPAR α/γ -Liganden auf Effektoren der PI3K/AKT- und JAK/STAT-Signalwege.

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten eine Reduktion der Proliferation von Imatinib-sensiblen und -resistenten CML-Zelllinien, vergesellschaftet mit der Auslösung eines Zellzyklusarrests, der Induktion von Apoptose und der Hemmung der autokrinen GM-CSF-Sekretion durch duale PPAR α/γ -Liganden, sowie einem kooperativen Effekt dieser Substanzen und Imatinib auf die Hemmung des

Wachstums von CML-Zelllinien *in vitro*. Weitere Studien sind nötig, um die molekularen Mechanismen genauer zu untersuchen, die die antiproliferativen Effekte von C48 und TZD18 bedingen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse könnten einen entwicklungsfähigen Ansatzpunkt zum klinischen Einsatz dualer PPAR α/γ -Liganden für eine verbesserte Behandlung der fortgeschrittenen CML oder bei Patienten mit Imatinib-Resistenz darstellen. Dabei könnten sie entweder als Mono- oder Kombinationstherapie mit Imatinib bzw. anderen antileukämischen Substanzen verwendet werden, um so die Sensitivität der CML-Zellen zu erhöhen und möglicherweise die Resistenz BCR-ABL⁺ Leukämien zu überwinden.

6 Zusammenfassung

PPAR gehört mit seinen drei Untereinheiten α , β und γ zur Familie der NHR und greift als Transkriptionsfaktor in verschiedenste Stoffwechselprozesse ein. Während die PPAR γ -Liganden PGZ und RGZ bereits klinische Anwendung zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 finden, konnte in letzter Zeit vermehrt gezeigt werden, dass diese Substanzen ebenfalls antineoplastische Effekte auf Zelllinien verschiedener Krebsentitäten wie Mammakarzinom [93, 94], Glioblastom [81] oder Leukämien [79] ausüben. Auch die hemmende Wirkung dualer PPAR α/γ -Liganden auf das Wachstum unterschiedlicher Krebs-Zelllinien konnte bereits demonstriert werden [107-109].

Trotz enormer Fortschritte in der Therapie der CML seit Einführung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib bleiben die Behandlung fortgeschrittener Erkrankungsstadien sowie die Entwicklung einer Imatinib-Resistenz die wesentlichen Herausforderungen in der Therapie dieser Erkrankung.

In dieser Arbeit wurden nun die Wirkung des dualen PPAR α/γ -Liganden C48 gegenüber Zelllinien der CML untersucht sowie weitere Erkenntnisse über die Aktivität des bereits untersuchten PPAR α/γ -Liganden TZD18 gewonnen.

Es konnte eine dosisabhängige Wachstumshemmung Imatinib-sensibler, als auch -resistenter Zelllinien durch C48 nachgewiesen werden, die unter Anderem auch eine Hemmung von Zellen mit der hochresistenten T315I-BCR-ABL-Mutation einschließt, welche sich resistent gegenüber allen bisher klinisch verfügbaren Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigt. Normale humane CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen wurden dagegen nicht in ihrer Proliferation beeinträchtigt, was gegen einen unspezifischen zelltoxischen Effekt von C48 als Ursache für die Wirksamkeit gegenüber CML-Zelllinien spricht. Die nachgewiesene Inhibition des Zellwachstums durch C48 war signifikant stärker als die der alleinigen PPAR α - bzw. γ -Liganden WY14643 bzw. PGZ. Nach Inkubation der CML-Zelllinien mit C48 konnte ein G0/G1-Zellzyklusarrest beobachtet werden, der vergesellschaftet war mit einer verminderten Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin E, CDK4 und CDK2 sowie einer Hochregulation des CDK-Inhibitors p27^{kip1} auf mRNA- und Proteinebene. Zusätzlich löste C48 bei Verwendung höherer Konzentrationen Apoptose aus. C48 sowie TZD18 verringerten beide die Proteinexpression der wachstumsfördernden Effektoren pSTAT3, pSTAT5 and pAKT in CML-Zellen, was auf eine Beeinflussung der PI3K/Akt- und JAK/STAT-Signalkaskaden als einen möglichen, für die

Proliferationshemmung verantwortlichen Mechanismus hinweist. Des Weiteren, und von eher klinischer Relevanz, konnten die antineoplastischen Effekte von Imatinib durch Kombination mit C48 verstärkt werden. Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse das Potential dualer PPAR α / γ -Liganden in der Therapie der CML, entweder allein oder in Kombination mit Imatinib sowie zum Einsatz bei der Behandlung Imatinib-resistenter Patienten.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Bennett, J.H., Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, **1845**. 64: p. 413-423.
- [2] Craigie, D., Case of disease of the spleen in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, **1845**. 64: p. 400-12.
- [3] Virchow, R., Weisses Blut. *Frorieps Notizen*, **1845**. 36: p. 151-6.
- [4] Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, **2004**. 54(1): p. 8-29.
- [5] Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, **2000**. 96(10): p. 3343-56.
- [6] Quintas-Cardama, A. and J.E. Cortes, Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, **2006**. 81(7): p. 973-88.
- [7] Bizzozero, O.J., Jr., et al., Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946--1964. II. *Ann Intern Med*, **1967**. 66(3): p. 522-30.
- [8] Kantarjian, H., et al., Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*, **2002**. 346(9): p. 645-52.
- [9] Baccarani, M., et al., Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, **2006**. 108(6): p. 1809-20.
- [10] Kantarjian, H.M., et al., New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med*, **2006**. 145(12): p. 913-23.
- [11] Cortes, J.E., M. Talpaz, and H. Kantarjian, Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med*, **1996**. 100(5): p. 555-70.
- [12] Kantarjian, H.M., et al., Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med*, **1987**. 83(3): p. 445-54.
- [13] Melo, J.V. and D.J. Barnes, Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*, **2007**. 7(6): p. 441-53.
- [14] Nowell, P.C. and D.A. Hungerford, Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*, **1960**. 25: p. 85-109.

- [15] Rowley, J.D., Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, **1973**. 243(5405): p. 290-3.
- [16] Kurzrock, R., J.U. Gutterman, and M. Talpaz, The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, **1988**. 319(15): p. 990-8.
- [17] http://www.onkodin.de/zms/content/e2/e13145/e13186/e14950/index_ger.html, BCR-ABL.
- [18] Groffen, J., et al., Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, **1984**. 36(1): p. 93-9.
- [19] Daley, G.Q., R.A. Van Etten, and D. Baltimore, Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, **1990**. 247(4944): p. 824-30.
- [20] Faderl, S., et al., Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, **2000**. 36(3-4): p. 263-73.
- [21] Heisterkamp, N., et al., Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature*, **1990**. 344(6263): p. 251-3.
- [22] Denny, C.T., et al., Localization of preferential sites of rearrangement within the BCR gene in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1989**. 86(11): p. 4254-8.
- [23] Faderl, S., et al., The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **1999**. 341(3): p. 164-72.
- [24] Sawyers, C.L., Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **1999**. 340(17): p. 1330-40.
- [25] Pane, F., et al., Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*, **1996**. 88(7): p. 2410-4.
- [26] Ravandi, F., et al., Chronic myelogenous leukaemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. *Br J Haematol*, **1999**. 107(3): p. 581-6.
- [27] Salgia, R., et al., Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem*, **1995**. 270(10): p. 5039-47.
- [28] Salgia, R., et al., BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest*, **1997**. 100(1): p. 46-57.

- [29] Steelman, L.S., et al., JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*, **2004**. 18(2): p. 189-218.
- [30] Baccarani, M., et al., Interferon-alfa for chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol*, **2003**. 40(1): p. 22-33.
- [31] Hehlmann, R., et al., Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia*, **2003**. 17(8): p. 1529-37.
- [32] Gratwohl, A., et al., Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*, **2006**. 91(4): p. 513-21.
- [33] Gratwohl, A., et al., Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet*, **1998**. 352(9134): p. 1087-92.
- [34] Druker, B.J., et al., Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, **1996**. 2(5): p. 561-6.
- [35] Druker, B.J., et al., Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **2001**. 344(14): p. 1031-7.
- [36] O'Brien, S.G., et al., Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **2003**. 348(11): p. 994-1004.
- [37] Druker, B.J., et al., Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **2006**. 355(23): p. 2408-17.
- [38] Deininger, M., E. Buchdunger, and B.J. Druker, The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, **2005**. 105(7): p. 2640-53.
- [39] Talpaz, M., et al., Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*, **2002**. 99(6): p. 1928-37.
- [40] Sawyers, C.L., et al., Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, **2002**. 99(10): p. 3530-9.

- [41] Hehlmann, R., A. Hochhaus, and M. Baccarani, Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, **2007**. 370(9584): p. 342-50.
- [42] Gorre, M.E., et al., Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, **2001**. 293(5531): p. 876-80.
- [43] Hochhaus, A., et al., Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*, **2002**. 16(11): p. 2190-6.
- [44] Donato, N.J., et al., BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood*, **2003**. 101(2): p. 690-8.
- [45] Gambacorti-Passerini, C., et al., Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst*, **2000**. 92(20): p. 1641-50.
- [46] Thomas, J., et al., Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, **2004**. 104(12): p. 3739-45.
- [47] Illmer, T., et al., P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia*, **2004**. 18(3): p. 401-8.
- [48] Hochhaus, A. and P. La Rosee, Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia*, **2004**. 18(8): p. 1321-31.
- [49] Corbin, A.S., et al., Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood*, **2003**. 101(11): p. 4611-4.
- [50] Kantarjian, H., et al., High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, **2004**. 103(8): p. 2873-8.
- [51] Talpaz, M., et al., Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*, **2006**. 354(24): p. 2531-41.
- [52] Kantarjian, H., et al., Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med*, **2006**. 354(24): p. 2542-51.
- [53] O'Hare, T., et al., In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*, **2005**. 65(11): p. 4500-5.

- [54] Issemann, I. and S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, **1990**. 347(6294): p. 645-50.
- [55] Lemberger, T., B. Desvergne, and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **1996**. 12: p. 335-63.
- [56] Gearing, K.L., et al., Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1993**. 90(4): p. 1440-4.
- [57] Juge-Aubry, C., et al., DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*, **1997**. 272(40): p. 25252-9.
- [58] Kota, B.P., T.H. Huang, and B.D. Roufogalis, An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*, **2005**. 51(2): p. 85-94.
- [59] Grommes, C., G.E. Landreth, and M.T. Heneka, Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*, **2004**. 5(7): p. 419-29.
- [60] Staels, B., et al., Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, **1998**. 98(19): p. 2088-93.
- [61] Wu, G.D. and M.A. Lazar, A gut check for PPARgamma. *Gastroenterology*, **1998**. 115(5): p. 1283-5.
- [62] Fajas, L., et al., The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **1997**. 272(30): p. 18779-89.
- [63] Park, K.S., et al., PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes*, **1997**. 46(7): p. 1230-4.
- [64] Fajas, L., J.C. Fruchart, and J. Auwerx, PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*, **1998**. 438(1-2): p. 55-60.
- [65] Spiegelman, B.M., PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, **1998**. 47(4): p. 507-14.
- [66] Tontonoz, P., E. Hu, and B.M. Spiegelman, Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*, **1995**. 5(5): p. 571-6.

- [67] Berger, J., et al., Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*, **1996**. 137(10): p. 4189-95.
- [68] Landreth, G.E. and M.T. Heneka, Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **2001**. 22(6): p. 937-44.
- [69] Canuto, R.A., et al., Apoptosis induced by clofibrate in Yoshida AH-130 hepatoma cells: role of HMG-CoA reductase. *J Lipid Res*, **2003**. 44(1): p. 56-64.
- [70] Peters, J.M., C. Cheung, and F.J. Gonzalez, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med*, **2005**. 83(10): p. 774-85.
- [71] Muzio, G., et al., Mechanisms involved in growth inhibition induced by clofibrate in hepatoma cells. *Toxicology*, **2003**. 187(2-3): p. 149-59.
- [72] Scatena, R., et al., Bezafibrate as differentiating factor of human myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ*, **1999**. 6(8): p. 781-7.
- [73] Bronfman, M., et al., Enhanced differentiation of HL-60 leukemia cells to macrophages induced by ciprofibrate. *Eur J Cell Biol*, **1998**. 77(3): p. 214-9.
- [74] Saidi, S.A., et al., In vitro and in vivo effects of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer*, **2006**. 5: p. 13.
- [75] Strakova, N., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors. *Neoplasma*, **2005**. 52(2): p. 126-36.
- [76] Grabacka, M., et al., Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. *Arch Dermatol Res*, **2004**. 296(2): p. 54-8.
- [77] Shigeto, T., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma ligands inhibit the growth of human ovarian cancer. *Oncol Rep*, **2007**. 18(4): p. 833-40.
- [78] Yokoyama, Y., et al., Clofibric acid, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. *Mol Cancer Ther*, **2007**. 6(4): p. 1379-86.
- [79] Zang, C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, **2004**. 28(4): p. 387-97.

- [80] Chaffer, C.L., et al., PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer*, **2006**. 6: p. 53.
- [81] Zang, C., et al., Ligands for PPARgamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas. *J Neurooncol*, **2003**. 65(2): p. 107-18.
- [82] Heaney, A.P., et al., Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nat Med*, **2002**. 8(11): p. 1281-7.
- [83] Kato, M., et al., Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol*, **2004**. 130(2): p. 73-9.
- [84] Sarraf, P., et al., Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med*, **1998**. 4(9): p. 1046-52.
- [85] Tontonoz, P., et al., Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**. 94(1): p. 237-41.
- [86] Tsubouchi, Y., et al., Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**. 270(2): p. 400-5.
- [87] Lu, J., et al., Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, **2005**. 65(11): p. 4769-74.
- [88] Liu, Y., et al., Growth inhibition and differentiation induced by peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand rosiglitazone in human melanoma cell line a375. *Med Oncol*, **2006**. 23(3): p. 393-402.
- [89] Placha, W., et al., The effect of PPARgamma ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res*, **2003**. 13(5): p. 447-56.
- [90] Freudlsperger, C., et al., Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs*, **2006**. 17(3): p. 325-32.
- [91] Yin, F., et al., Troglitazone inhibits growth of MCF-7 breast carcinoma cells by targeting G1 cell cycle regulators. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**. 286(5): p. 916-22.
- [92] Mueller, E., et al., Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*, **1998**. 1(3): p. 465-70.

- [93] Elstner, E., et al., Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**. 95(15): p. 8806-11.
- [94] Elstner, E., et al., Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **2002**. 74(2): p. 155-65.
- [95] Eucker, J., et al., Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induce apoptosis in multiple myeloma. *Anticancer Drugs*, **2004**. 15(10): p. 955-60.
- [96] Kubota, T., et al., Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **1998**. 58(15): p. 3344-52.
- [97] Ohta, K., et al., Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**. 86(5): p. 2170-7.
- [98] Mueller, E., et al., Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**. 97(20): p. 10990-5.
- [99] Debrock, G., et al., A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer*, **2003**. 89(8): p. 1409-12.
- [100] Kulke, M.H., et al., A phase II study of troglitazone, an activator of the PPARgamma receptor, in patients with chemotherapy-resistant metastatic colorectal cancer. *Cancer J*, **2002**. 8(5): p. 395-9.
- [101] Burstein, H.J., et al., Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat*, **2003**. 79(3): p. 391-7.
- [102] Buse, J.B., et al., Muraglitazar, a dual (alpha/gamma) PPAR activator: a randomized, double-blind, placebo-controlled, 24-week monotherapy trial in adult patients with type 2 diabetes. *Clin Ther*, **2005**. 27(8): p. 1181-95.
- [103] Fagerberg, B., et al., Tesaglitazar, a novel dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist, dose-dependently improves the metabolic abnormalities associated with insulin resistance in a non-diabetic population. *Diabetologia*, **2005**. 48(9): p. 1716-25.
- [104] Nissen, S.E., K. Wolski, and E.J. Topol, Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Jama*, **2005**. 294(20): p. 2581-6.

- [105] Desai, R.C., et al., 5-aryl thiazolidine-2,4-diones: discovery of PPAR dual alpha/gamma agonists as antidiabetic agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **2003**. 13(16): p. 2795-8.
- [106] Koyama, H., et al., (2R)-2-ethylchromane-2-carboxylic acids: discovery of novel PPARalpha/gamma dual agonists as antihyperglycemic and hypolipidemic agents. *J Med Chem*, **2004**. 47(12): p. 3255-63.
- [107] Liu, D.C., et al., A novel PPAR alpha/gamma dual agonist inhibits cell growth and induces apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Acta Pharmacol Sin*, **2004**. 25(10): p. 1312-9.
- [108] Liu, H., et al., Growth inhibition and apoptosis in human Philadelphia chromosome-positive lymphoblastic leukemia cell lines by treatment with the dual PPARalpha/gamma ligand TZD18. *Blood*, **2006**. 107(9): p. 3683-92.
- [109] Zang, C., et al., Dual PPARalpha/gamma ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. *Cell Cycle*, **2006**. 5(19): p. 2237-43.
- [110] Miyoshi, T., et al., Relative importance of apoptosis and cell cycle blockage in the synergistic effect of combined R115777 and imatinib treatment in BCR/ABL-positive cell lines. *Biochem Pharmacol*, **2005**. 69(11): p. 1585-94.
- [111] La Rosee, P., et al., Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res*, **2002**. 62(24): p. 7149-53.
- [112] Takenokuchi, M., et al., Troglitazone inhibits cell growth and induces apoptosis of B-cell acute lymphoblastic leukemia cells with t(14;18). *Acta Haematol*, **2006**. 116(1): p. 30-40.
- [113] Yang, Y.C., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cause growth arrest and apoptosis in human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Gynecol Cancer*, **2007**. 17(2): p. 418-25.
- [114] Sirard, C., P. Laneuville, and J.E. Dick, Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood*, **1994**. 83(6): p. 1575-85.
- [115] Wang, Y., et al., Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. *Blood*, **2007**. 109(5): p. 2147-55.
- [116] Konopleva, M., et al., The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, **2004**. 64(21): p. 7927-35.

- [117]Konopleva, M., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther*, **2004**. 3(10): p. 1249-62.
- [118]Kao, Y.H., et al., A novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma agonist, BPR1H0101, inhibits topoisomerase II catalytic activity in human cancer cells. *Anticancer Drugs*, **2008**. 19(2): p. 151-8.
- [119]Saiki, M., et al., Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol*, **2006**. 29(2): p. 437-43.
- [120]Liu, J., et al., Peroxisome proliferator activated receptor-gamma ligands induced cell growth inhibition and its influence on matrix metalloproteinase activity in human myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2005**. 56(4): p. 400-8.
- [121]Hirase, N., et al., Thiazolidinedione suppresses the expression of erythroid phenotype in erythroleukemia cell line K562. *Leuk Res*, **2000**. 24(5): p. 393-400.
- [122]Abe, A., et al., Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPARgamma. *Eur J Pharmacol*, **2002**. 436(1-2): p. 7-13.
- [123]Turturro, F., et al., Troglitazone acts on cellular pH and DNA synthesis through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism in breast cancer-derived cell lines. *Clin Cancer Res*, **2004**. 10(20): p. 7022-30.
- [124]Palakurthi, S.S., et al., Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res*, **2001**. 61(16): p. 6213-8.
- [125]Straus, D.S., et al., 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**. 97(9): p. 4844-9.
- [126]ten Hoeve, J., et al., Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood*, **1994**. 84(6): p. 1731-6.
- [127]Ohmine, K., et al., Analysis of gene expression profiles in an imatinib-resistant cell line, KCL22/SR. *Stem Cells*, **2003**. 21(3): p. 315-21.
- [128]Balleari, E., et al., Serum levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in treated patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Haematologica*, **1994**. 79(1): p. 7-12.
- [129]Zhang, X. and R. Ren, Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **1998**. 92(10): p. 3829-40.
- [130] Imaizumi, T., et al., 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **2003**. 71(3-4): p. 293-9.
- [131] Kumagai, M., et al., 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the IL-1beta-induced expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in BEAS-2B bronchial epithelial cells. *Tohoku J Exp Med*, **2004**. 202(2): p. 69-76.
- [132] Hinz, B., K. Brune, and A. Pahl, 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**. 302(2): p. 415-20.
- [133] Patel, H.J., et al., Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy. *J Immunol*, **2003**. 170(5): p. 2663-9.
- [134] Heaney, M.L., et al., Membrane-associated and soluble granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor receptor alpha subunits are independently regulated in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1995**. 92(6): p. 2365-9.
- [135] Sayani, F., et al., Identification of the soluble granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor protein in vivo. *Blood*, **2000**. 95(2): p. 461-9.
- [136] Horita, M., et al., Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med*, **2000**. 191(6): p. 977-84.
- [137] Thiesing, J.T., et al., Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood*, **2000**. 96(9): p. 3195-9.
- [138] Kindler, T., et al., In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia*, **2003**. 17(6): p. 999-1009.
- [139] Yu, C., et al., Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res*, **2002**. 62(1): p. 188-99.

[140]Gu, J.J., L. Santiago, and B.S. Mitchell, Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl. *Blood*, **2005**. 105(8): p. 3270-7.

[141]Cilloni, D., et al., The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia*, **2006**. 20(1): p. 61-7.

Danksagung

Als Erstes möchte ich Frau Dr. Elena Elstner für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danken. Ohne ihre großzügige und vertrauensvolle Unterstützung hätte diese Arbeit nicht zustandekommen können. Sie ermöglichte mir einen äußerst lehrreichen und spannenden Einblick in die Wissenschaft.

Auch Chuanbing Zang und Hongyu Liu verdienen ein besonderes Dankeschön für die Einführung in die zell- und molekularbiologischen Grundlagen. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat bei der Planung sowie Durchführung von Experimenten zur Seite und unterstützten mich bei der Erschliessung der Daten.

Bei allen Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Forschungslabors möchte ich mich für das herzliche Arbeitsklima bedanken, in das ich aufgenommen wurde und die ständige Bereitschaft, meine tausend kleinen Fragen zu beantworten. Besonderer Dank gilt Frau Maren Mieth für ihre ständige Anteilnahme und die konstruktive Unterstützung beim Korrekturlesen.

Frau Marlies Wächter möchte ich für die Erhebung einiger äußerst wichtiger Daten dieser Arbeit danken.

Von Herzen kommt mein Dank an meine Familie und meinen Freund für ihren Beistand, nicht nur zu Promotionszeiten, und das immer offene Ohr für all meine kleinen und großen Sorgen.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Janina Bertz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung dualer PPAR α / γ -Liganden auf Zelllinien der chronischen myeloischen Leukämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Janina Bertz

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Poster

The novel dual PPAR α / γ ligands TZD18 and Compound 48 inhibit the growth of CML cell lines (Poster und Vortrag; Auszeichnung als Best Abstract)

Bertz J, Zang C, Liu H, Wächter M, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E
IACRLRD 2007, Freiburg

Novel dual PPAR α / γ ligands, TZD18 and Compound 48, as growth inhibitors of CML cell lines (Poster)

Zang C, Bertz J, Liu H, Wächter M, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E
AACR-Jahrestreffen 2007, Los Angeles, USA

A novel dual ligand for PPAR α / γ inhibits growth of chronic myeloid leukemia cell lines (Poster)

Bertz J, Liu H, Zang C, Possinger K, Elstner E
DGHO-Jahrestagung 2006, Leipzig

A novel dual ligand for PPAR α / γ inhibits growth of Philadelphia chromosome positive leukemia cells (Poster)

Bertz J, Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E
XI. Acute-Leukemia-Symposium 2006, München

Induction of growth inhibition and apoptosis by TZD18, a novel dual ligand for PPAR α / γ , in human breast cancer cells in vitro (Poster)

Zang C, Liu H, Mieth M, Bertz J, Possinger K, Elstner E
AACR-Jahrestreffen 2006, Washington DC, USA

Publikationen

Bertz J, Zang C, Liu H, Wächter M, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E,
Compound 48, a novel dual PPAR α / γ ligand, inhibits the growth of human CML cell lines and enhances the anticancer-effects of imatinib. *Leukemia Research*, 2009 May;33(5):686-92.

Zang C, Liu H, Waechter M, Eucker J, Bertz J, Possinger K, Koeffler HP, Elstner E,
Dual PPAR α / γ ligand TZD18 either alone or in combination with imatinib inhibits proliferation and induces apoptosis of human CML cell lines. *Cell Cycle*, 2006. 5(19): p. 2237-43.