

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik II
Direktor: Prof. Dr. med. H. Serve

**Oligomerisierungshemmung und Biologie von BCR/ABL und seinen
Resistenzmutanten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

vorgelegt von
Alena Hundertmark

aus Aschaffenburg

Frankfurt am Main, 2010

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Dr. med. M. Ruthardt

Korreferent: Prof. Dr. P. Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Normale Hämatopoese	9
1.2	Leukämien	11
1.2.1	Akute Leukämien	11
1.2.1.1	Akute lymphatische Leukämie	11
1.2.1.2	Akute myeloische Leukämie	13
1.2.2	Chronische Leukämien	13
1.2.2.1	Chronische myeloische Leukämie	13
1.2.2.2	Chronische lymphatische Leukämie	14
1.3	Zytogenetik der Leukämien	15
1.4	Philadelphia-Chromosom positive Leukämien	16
1.4.1	Die Translokationsprodukte p185 ^(BCR/ABL) und p210 ^(BCR/ABL)	18
1.4.2	Die Biologie von p185 ^(BCR/ABL) und p210 ^(BCR/ABL)	18
1.5	BCR, ABL und die leukämogene Signaltransduktion durch BCR/ABL	19
1.5.1	Aufbau und Funktion von c-ABL	19
1.5.2	Aufbau und Funktion von BCR	20
1.5.3	Das Fusionsprotein BCR/ABL	21
1.6	Therapeutische Strategien bei Ph ⁺ Leukämien	23
1.6.1	Therapie der CML	23
1.6.2	Therapie der ALL	24
1.7	Molekulare Therapie der Ph ⁺ Leukämie	25
1.7.1	Imatinib	25
1.7.2	Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation	26
1.7.3	Strukturelle Grundlagen für die Bindung von Kinase-Inhibitoren	27
1.7.4	Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib	27

1.8	Überwindung der Resistenz gegenüber Kinase-Inhibitoren durch Angreifen alternativer Zielstrukturen	28
1.9	Die Coiled-Coil Domäne als neues molekulares Target zur Inaktivierung von BCR/ABL	29
1.9.1	Aufbau und Funktion der Coiled-Coil-Region bei BCR/ABL	29
1.9.2	Das Targeting der Coiled-Coil verstärkt die Wirkung von Imatinib	30
1.10	Zielsetzung	30
2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Chemikalien	35
2.1.3	Verbrauchsmaterial	41
2.1.4	Bakterienkultur	43
2.1.5	Zellkultur	43
2.1.6	Antikörper	44
2.1.6.1	Primäre Antikörper	44
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper	45
2.1.6.3	FACS Antikörper	45
2.1.7	Enzyme	46
2.1.8	Tyrosinkinaseinhibitoren	47
2.2	Methoden	47
2.2.1	Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	47
2.2.1.1	Bakterienkultur	47
2.2.1.2	Transformation von kompetenten E. coli-Zellen	48
2.2.1.2.1	Präparation von chemokompetenten E. coli-Zellen	48
2.2.1.2.2	Transformationen rekombinanter Plasmide in E. coli	48
2.2.1.3	Plasmidpräparation Maxi	48
2.2.1.4	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	49
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.2.1.6	Restriktionsverdau	50
2.2.2	Immunpräzipitation (IP)	50

2.2.3	Charakterisierung von Hochmolekulargewichtskomplexen (HMG-Komplexe)	51
2.2.4	Proteinanalytische Methoden	51
2.2.4.1	Lyse von Suspensionszellen mit SDS Lysis-Puffer	51
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektrophotometer	51
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.2.4.4	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran	52
2.2.4.5	Immundetektion von Proteinen	53
2.2.4.6	Regenerieren der Proteinmembran zur erneuten Immundetektion	54
2.2.5	Zellkultur	54
2.2.5.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	54
2.2.5.2	Zellpassage	54
2.2.5.2.1	Suspensionszellen	54
2.2.5.2.2	Adhärente Zelllinien	55
2.2.5.3	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien	55
2.2.5.3.1	Einfrieren	55
2.2.5.3.2	Auftauen	55
2.2.5.4	Bestimmung der Zellzahl	55
2.2.6	Subklonierung von Bulkpopulationen mittels Limiting Dilution	55
2.2.7	Transfektion von Zelllinien	56
2.2.7.1	Herstellung von 2-fach HEPES-gepufferter Salzlösung, pH 7,0 (2x HBS)	56
2.2.7.2	Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärenen Zelllinien	56
2.2.7.3	Infektion von Zelllinien	57
2.2.7.4	Bestimmung der Infektionseffizienz mittels Fluoreszenz aktivierter Durchflußzytometrie „fluorescence activated cell sorting“ (FACS)	58
2.2.7.4.1	GFP-Messung	58
2.2.7.4.2	NGFR-Rezeptor-Färbung	58
2.2.8	Apoptosemessung	59
2.2.8.1	Messung der Apoptose mittels 7-AAD	59

2.2.8.2	Messung der Apoptose mittels XTT-Assay (Cell-Proliferation Kit II, Roche)	59
2.2.9	Transformationsassay (Faktorentzug) bei IL-3 abhängigen murinen hämatopoetischen Vorläuferzelllinien (Wachstumskurven) . . .	60
2.2.10	Proliferation Competition Assay	61
2.2.11	Focus Formation-Assay	61
2.2.12	Methylcelluloseassay	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Interaktion der Helix-2-Peptide mit Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Punktmutationen	64
3.2	Auflösen der HMG-Komplexe von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Punktmutationen durch Helix-2-Peptide	65
3.3	Reduzierung der Autophosphorylierung von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Punktmutationen durch die Helix-2	67
3.4	Beeinflussung der Sensitivität durch Helix-2-Peptide gegenüber Imatinib und Dasatinib bei Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	69
3.5	Beeinflussung des Transformationspotentials von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen durch die Helix-2	71
3.5.1	Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen in Progenitorzellen	72
3.5.2	Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen in Progenitorzellen durch die Helix-2 bei Anwesenheit von Kinaseinhibitoren	73
3.5.2.1	Bestimmung der subapoptotischen Konzentration von Imatinib und Dasatinib	74
3.5.2.2	Nachweis der Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums mittels des Proliferation Competition Assays . . .	76
3.6	Biologie der Coiled-Coil-Deletionsmutanten von p185 ^(BCR/ABL)	79
3.6.1	Faktorunabhängiges Wachstum von p185 ^(BCR/ABL) Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Progenitorzellen	79
3.6.2	Aufhebung der Kontaktinhibition in p185 ^(BCR/ABL) Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Fibroblasten	80

3.6.3	Induktion von Support unabhängigem Wachstum von p185 ^(BCR/ABL) Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Fibroblasten	81
-------	--	----

4	Diskussion	83
5	Zusammenfassung	91
6	Abstract	94
7	Literatur	97

Abbildungsverzeichnis

1.1	Normale Hämatopoese	10
1.2	Die Translokation t(9;22)(nach Faderl et al., 1999)	17
1.3	BCR/ABL-abhängige Signaltransduktionswege (Faderl et al., 1999).	22
1.4	Aufbau der BCR-coiled-coil Domäne	29
3.1	Die Helix-2 interagiert mit p185 ^(BCR/ABL) Mutationen.	64
3.2	Die Helix-2 unterbindet die Bildung von HMG-Komplexen von p185 ^(BCR/ABL) WT und Mutationen.	66
3.3	Effekt der Helix-2 auf die Autophosphorylierung von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen.	68
3.4	IC-50 von Imatinib bei p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	70
3.5	IC-50 von Dasatinib bei p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	71
3.6	Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	73
3.7	Schematische Darstellung der Funktionsweise des „Proliferation Compe- tition Assays“	74
3.8	IC-50 Konzentrationbestimmung von Imatinib mittels 7AAD Messung	75
3.9	IC-50 Konzentrationbestimmung von Dasatinib mittels 7AAD Messung	75
3.10	Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	77
3.11	Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185 ^(BCR/ABL) Mutationen	78
3.12	Effekt der fehlenden Coiled-Coil (Δ CC) Domäne auf die Proliferation von Ba/F3 und 32D	80
3.13	Effekt der fehlenden Coiled-Coil (Δ CC) Domäne auf die Kontaktinhibi- tion von Fibroblasten	81

3.14 Effekt der fehlenden Coiled-Coil (CC) Domäne auf das adhäsionsabhängige Wachstum der Fibroblasten	82
---	----

Tabellenverzeichnis

1.1	Akute lymphatische Leukämie. FAB-Klassifikation (nach Faderl et al, 2003)	12
1.2	Akute lymphatische Leukämie. Immunologische Subtypen (nach Faderl et al, 2003)	12
2.1	Geräte	34
2.2	Chemikalien	41
2.3	Verbrauchsmaterial	42
2.4	Bakterienkultur	43
2.5	Zellkultur	44
2.6	Primäre Antikörper	45
2.7	Sekundäre Antikörper	45
2.8	FACS Antikörper	45
2.9	Enzyme	46
2.10	Tyrosinkinaseinhibitoren	47

1 Einleitung

1.1 Normale Hämatopoese

Die Zellen des Blutsystems des Erwachsenen werden im Knochenmark gebildet und stammen von den gemeinsamen Vorläufern aller Blutzellen ab, der hämopoetischen Stammzelle (Abb.1.1). Die nächste Differenzierungsstufe stellen die determinierten Vorläuferzellen dar, auf deren Niveau sich die myeloische von der lymphatischen Differenzierung abzweigt. Die weitere Ausdifferenzierung der lymphatischen Vorläuferzellen, aus denen B- und T- Lymphozyten hervorgehen, läuft im Knochenmark und in den sekundären lymphatischen Organen ab. Aus der myeloischen Linie bilden sich die Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten und die Thrombozyten. Myeloblasten und Promyelozyten stellen die Zwischenstadien auf dem Weg der Ausdifferenzierung der Granulozyten dar. Diese Blutzellen haben ihren Namen von den Granula, die nach den etablierten Fixations- und Färbeverfahren in ihrem Protoplasma zu finden sind (Lee et al., 1998).

Die Differenzierung der Stamm- und Progenitorzellen ist abhängig vom sogenannten hämopoetischen „Microenvironment“, welches aus verschiedenen Stromazellen sezernierten und membrangebundenen Zytokinen und einer komplexen extrazellulären Matrix besteht. Die nicht hämopoetischen, sesshaften Stromazellen synthetisieren und sezernieren sowohl Zytokine wie die „colony stimulating factors“ (CSF), Interleukine und Interferone, als auch Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Laminine und Proteoglycane (Kronenwett et al., 2000). Ein wechselseitiges Zusammenspiel von adhäsiven und anti-adhäsiven Komponenten der extrazellulären Matrix sowie membranständiger Moleküle auf der Oberfläche von Stromazellen im Knochenmark ist verantwortlich für das Verbleiben der unreifen Zellen im Knochenmark. Reifende hämopoetische Zellen exprimieren je nach Entwicklungsstatus verschiedene Rezeptor- und Zelladhäsionsmoleküle, anhand derer der Stand der Differenzierung bzw. der eigentliche Determinierungszieltyp kenntlich gemacht werden kann. In Abbildung 1.1 ist die Hämatopoese schematisch dargestellt.

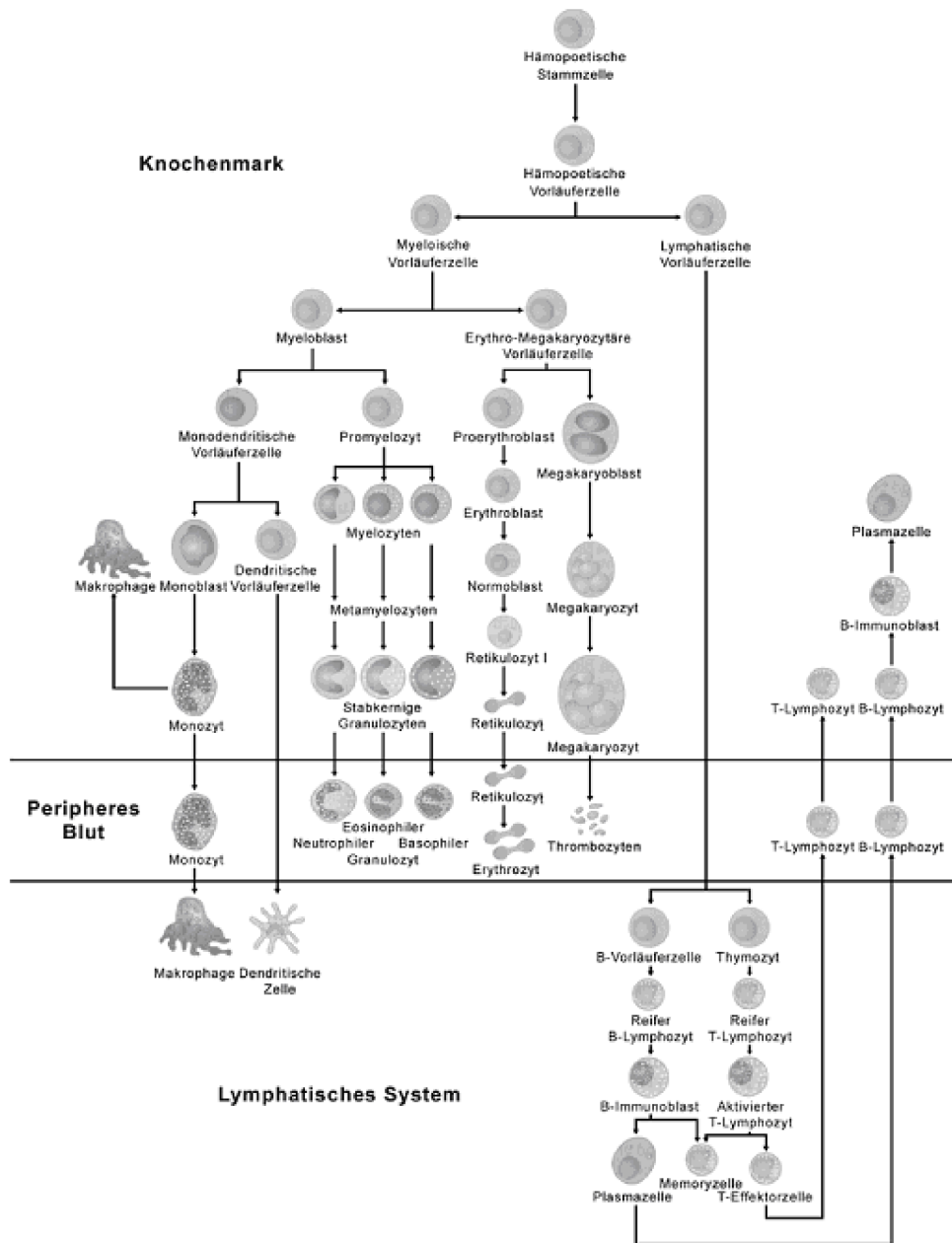


Abbildung 1.1: Normale Hämatopoese

Ausgehend von der totipotenten Stammzelle sind die verschiedenen Differenzierungsstufen gezeigt, die bei der Bildung der unterschiedlichen Blutzellen durchlaufen werden (nach Freund, 1999).

1.2 Leukämien

Leukämien sind eine heterogene Gruppe von malignen Erkrankungen der hämatopoetischen Zellen. Sie sind definitionsgemäß monoklonal, das heisst, dass die Leukämie-induzierende Ereignis sich auf die maligne Transformation einer Zelle zurückführen lässt. Die Leukämien werden ihrem Zelltyp entsprechend in myeloische oder lymphatische und ihrem natürlichen Verlauf entsprechend in akute oder chronische Leukämien unterteilt.

1.2.1 Akute Leukämien

Akute Leukämien sind maligne monoklonale Erkrankungen hämatopoetischer Stammzellen. Sie sind durch das unkontrollierte Wachstum von unreifen Vorstufen der Blutzellen charakterisiert, die der normalen Hämatopoese im Knochenmark den nötigen Raum nehmen, so dass es zur hämatopoetischen Insuffizienz mit Anämie, Thrombopenie und Neutropenie kommt, durch welche die Leukämie klinisch manifest wird (Hoelzer und Seipelt, 1998). Neben reifen Granulo- und Lymphozyten liegen undifferenzierte Zellen der Granulo- bzw. Lymphozytopoese im Blutbild vor, wobei die Zwischenstufen meist fehlen. Unbehandelt führen die akuten Leukämien innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod (Hoelzer und Seipelt, 1998). Aufgrund des variablen natürlichen Verlaufs, der verschiedenen Therapien und der unterschiedlichen Prognose ist es notwendig, die akute lymphatische Leukämie (ALL) von der akuten myeloischen Leukämie (AML) zu unterscheiden. Diese Unterscheidung erfolgt aufgrund zytomorphologischer, zytochemischer, immunologischer sowie zyto- und molekulargenetischer Charakteristika (Begemann, 1998).

1.2.1.1 Akute lymphatische Leukämie

Die ALL hat ihren Ursprung in der malignen Transformation unreifer lymphatischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, dem Thymus oder dem lymphatischen Gewebe. Es kommt zu einer extremen Proliferation von lymphatischen Blasten, die einerseits zu hämatopoetischer Insuffizienz führen, andererseits Lymphknoten, Milz und andere Organe disseminiert infiltrieren (Hoelzer und Seipelt, 1998). Wie in Tabelle 1.1 gezeigt, gliedert die French-American-British- (FAB-) Klassifikation die ALL nach morphologischen und zytochemischen Merkmalen in drei Untergruppen (L1 - L3).

Untergruppe	bevorzugte Altersgruppe	Zellgröße	Kern	Chromatin	Nukleolus
L1	Kinder	homogen, klein	rund	homogen	selten
L2	Erwachsene	heterogen	polymorph	homogen bis gepunktet	1/Zelle
L3	keine Altersbevorzugung	homogen	groß	homogen bis gepunktet	mindestens 1/Zelle, groß

Tabelle 1.1: Akute lymphatische Leukämie. FAB-Klassifikation (nach Faderl et al, 2003)

Wie in Tabelle 1.2 dargestellt, wird eine andere Untergliederung nach immunologischen Gesichtspunkten in drei Gruppen und verschiedene Subtypen vorgenommen, da sich Unterschiede hinsichtlich klinischer Merkmale, Verlauf, Prognose und Konsequenz für die Therapieplanung herausgestellt haben (Begemann, 1998).

Gruppe	Subtyp	Zytogenetik	FAB-Klassifikation
B-Vorläufer-ALL	Prä-Prä-B-ALL	t(4;11)	L1 oder L2
	Common-ALL	t(9;22)	L1 oder L2
	Prä-B-ALL	t(1;19) t(9;22)	L1 (selten L2)
Reife B-ALL		t(8;14) t(8;22) t(2;8)	L3
T-Linien-ALL	Prä-Prä-T-ALL	t(11;14) t(10;14) t(8;14)	L1 oder L2
	Common-ALL		L1 oder L2
	frühe T-ALL		L1 oder L2
	reife T-ALL		L3

Tabelle 1.2: Akute lymphatische Leukämie. Immunologische Subtypen (nach Faderl et al, 2003)

Bei der akuten lymphatischen Leukämie kann im Blutbild die Leukozytengesamtzahl normal, erhöht oder auch vermindert sein. Typischerweise findet sich eine Leukozytose mit durchschnittlich 30.000 Zellen/ μl (Normwert 1.000 bis 4.500 Zellen/ μl), allerdings sind auch Werte bis zu 100.000/ μl nicht selten. Rund ein Viertel der Erkrankten weist jedoch eine erniedrigte Leukozytenzahl mit Werten um 500 Zellen/ μl auf.

Im Knochenmark beherrschen selbst bei leukopenen Patienten leukämische Blasten das Bild und meist gehören Symptome einer ausgeprägten Anämie und Thrombozytopenie, die durch Verdrängung der normalen Hämpoese bedingt sind, zu den Initialerscheinungen der Erkrankung (Begemann, 1998). Die ALL, die zu 80% im Kindesalter auftritt, führt unbehandelt innerhalb weniger Wochen, höchstens Monate, zum Tode (Faderl et al, 2003).

1.2.1.2 Akute myeloische Leukämie

Bei der akuten myeloischen Leukämie handelt es sich um eine klonale Erkrankung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle. Die Blasten sind bei dieser Form der Leukämie in ihrer normalen Differenzierung blockiert. Auf diese Art der Leukämie soll in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

1.2.2 Chronische Leukämien

Die chronischen Leukämien werden in chronisch myeloische (CML) oder chronisch lymphatische Leukämien (CLL) unterteilt. Die CML wird heute zu den myeloproliferativen Erkrankungen, die CLL zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt.

1.2.2.1 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie, die zu den myeloproliferativen Syndromen gehört, liegt eine maligne Entartung einer pluripotenten Stammzelle zugrunde, die zur unkontrollierten Expansion myeloischer Zellen bei erhaltener Differenzierungsfähigkeit führt. Charakteristisch ist das Vorkommen aller granulozytären Vorstufen von Myeloblasten bis zu segmentkernigen Granulozyten im peripheren Blut.

Klinisch steht die Verdrängung der gesunden Hämatopoese durch die Zunahme der Granulozyten und ihrer Vorstufen im Vordergrund (Ren, 2005). Die Erkrankung verläuft in drei Phasen.

In der etwa vier Jahre dauernden chronischen Phase findet sich in der Regel eine ausgeprägte Leukozytose (meist zwischen 100.000 und 300.000/ μl) mit Granulozytenvorstufen im peripheren Blut bei noch kompensierter Thrombo- und Erythropoese. Die Patienten sind weitgehend asymptomatisch. Der Anteil der Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut beläuft sich auf unter 5% (Melo et al., 2007). Die wenige Wochen bis einige Monate dauernde akzelerierte Phase geht mit einem Anstieg der Blastenzahl im Knochenmark auf bis zu 30% einher. Hinzu kommen weitere Befunde wie eine therapieresistente Anämie, Thrombozytopenie oder Thrombozytose, rascher Leukozytenanstieg, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust oder eine progrediente Splenomegalie (Melo et al., 2007). Man vermutet, dass der Übergang von der chronischen zur akzelerierten Phase und Blastenkrise auf einen leukämischen Klon zurückzuführen ist (Melo et al., 2007).

Die Zunahme der Blasten auf über 30% im Knochenmark oder im peripheren Blut kennzeichnen die Blastenkrise. Der Phänotyp der Blasten ist meist myeloisch, in einem kleineren Teil der Fälle lymphatisch. Die Verdrängung der Hämatopoese aus dem Knochenmark führt zur extramedullären Blutbildung in Milz und Leber, später auch in anderen Organen. Daraus resultiert neben einer Spleno- und Hepatomegalie eine zunehmende Anämie und Thrombozytopenie mit Blutungskomplikationen sowie ein Mangel an funktionsfähigen Granulozyten. Dies führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko des Patienten und zu dem klinischen Bild einer akuten Leukämie. In diesem Stadium ist die CML weitgehend therapieresistent und führt unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod (Riede und Schaefer, 1999).

Die mittlere Lebenserwartung bei Patienten mit CML liegt derzeit bei etwa fünf Jahren nach Diagnosestellung, wobei sich in Abhängigkeit vom Risikoprofil individuelle Schwankungen zwischen drei und über acht Jahren ergeben (Freund, 1999).

1.2.2.2 Chronische lymphatische Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie, die häufigste Leukämie des Erwachsenenalters, gehört zur Gruppe der leukämisch verlaufenden B-Zell-Lymphome von niedrigem Malignitätsgrad (Riede und Schaefer, 1999), auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen

werden soll.

1.3 Zytogenetik der Leukämien

Bei 80-85% der AML- und ALL-Patienten können numerische oder strukturelle Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden, denen eine ursächliche Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben wird (Faderl et al., 2003). Bei den strukturellen Chromosomenaberrationen handelt es sich in den meisten Fällen um reziproke Translokationen zwischen unterschiedlichen Chromosomen. Außerdem kann es zu Inversionen innerhalb eines Chromosoms kommen. Diese Aberrationen führen entweder zur Aktivierung von Genen, die normalerweise während der Hämatopoese nicht oder nur wenig exprimiert sind, oder zur Bildung von chimären Genen, die der hämatopoetischen Vorläuferzelle Funktionen vermittelt, über die sie normalerweise nicht verfügt (Melo et al., 2007).

Chromosomenbruchstellen, die in internen Intronen oder Exonen der beteiligten Gene liegen, führen zur Bildung von Chimärengenen, deren Produkte entweder in anderer Weise reguliert werden als die entsprechenden Wildtyp-Genprodukte oder zu einer Modifizierung ihrer Funktion. Am häufigsten treten reziproke Translokationen zwischen zwei unterschiedlichen Chromosomen auf. Die unmittelbare Folge dieser chromosomalen Translokationen sind entstehende Fusionsgene, denen eine bedeutende Rolle in der Leukämogenese zugeschrieben wird. Wie diese Fusionsgene Leukämien induzieren ist bisher ungeklärt. Die Translokationsprodukte spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Steuerung der Differenzierung oder Apoptose der leukämischen Zellen (Melo et al., 2007). Die häufigste Translokation beim Erwachsenen ist die Translokation von Chromosom 9 und Chromosom 22, $t(9;22)$ (Faderl et al., 2003). Das Philadelphia-Chromosom, eine andere Bezeichnung der Translokation $t(9;22)$, war die erste Translokation, die in eine direkte Verbindung mit der Entstehung von Leukämien gebracht werden konnte. In den 60er Jahren von Janet Rowley in ihrem Labor in Philadelphia entdeckt, erhielt es den Namen seines Entdeckungsortes (Koiti, 2006).

Das Philadelphia-Chromosom ist ein gekürztes Chromosom 22, das durch die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 entsteht. 95% der CML-Patienten und 25-30% der erwachsenen ALL-Patienten sind Philadelphia-Chromosom positiv (Ph+) (Zhao et al. 2002). Bei 2% der Patienten mit erstdiagnostizierter AML kann die $t(9;22)$ ebenfalls nachgewiesen werden, wobei es sich wahrscheinlich

um nicht diagnostizierte CML-Blastenkrisen handelt (Faderl et al., 2003).

1.4 Philadelphia-Chromosom positive Leukämien

Bei der $t(9;22)$ handelt es sich um eine reziproke Translokation. Ein Bruchstück von Chromosom 9 transloziert auf Chromosom 22 ($22q+$) und ersetzt dort ein Chromosomenfragment, das sich seinerseits am Chromosom 9 anstelle des verloren gegangenen Fragments anlagert ($9q+$) (Faderl et al., 1999) (Abbildung 1.2). Dabei kommt es zu einer Fusion zweier Gene, des ABL-Gens und des BCR-Gens. Das ABL-Gen ist nach einem Retrovirus mit dem Namen „Abelson murine leukemia virus“ benannt, in dessen Genom homologe Sequenzen zum humanen ABL-Gen nachgewiesen werden konnten. Das BCR-Gen („breakpoint cluster region“) verdankt seinen Namen der Tatsache, dass der BCR-Genlocus der erste Genlocus war, in dem Translokationsbruchpunkte genau definiert wurden (Faderl et al., 1999).

Der Bruchpunkt auf Chromosom 9 liegt im elf Exone umfassenden Genlocus des ABL-Gens, und ist im Normalfall zwischen Exon 1 und 2 lokalisiert (a1 und a2). Somit werden durch die Translokation die Exone 2 bis 11 (a2 bis a11) auf die Bruchstelle des Chromosoms 22 übertragen (Abbildung 1.2). Auf dem Chromosom 22 involviert die $t(9;22)$ den BCR-Genlocus, bestehend aus 20 Exonen (e1 bis e20). In diesem Gen existieren mindestens drei verschiedene Bruchpunkte. Der sogenannte „major breakpoint“ (M-BCR) liegt zwischen den Exonen e12 und e16 (historisch als b1 bis b5 bezeichnet). M-BCR liegt nun entweder zwischen b2 und b3, oder aber zwischen b3 und b4, wodurch das Fusionsgen BCR/ABL die Verbindung b2a2 oder b3a2 enthält. Der „minor breakpoint“ (m-BCR) liegt im ersten Intron von BCR, das heißt, dass durch die Fusion mit ABL die Verbindung e1a2 entsteht. Auf eine dritte Bruchzone, „ μ -BCR“ (e19a2), soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden (Faderl et al., 1999) (Abbildung 1.2).

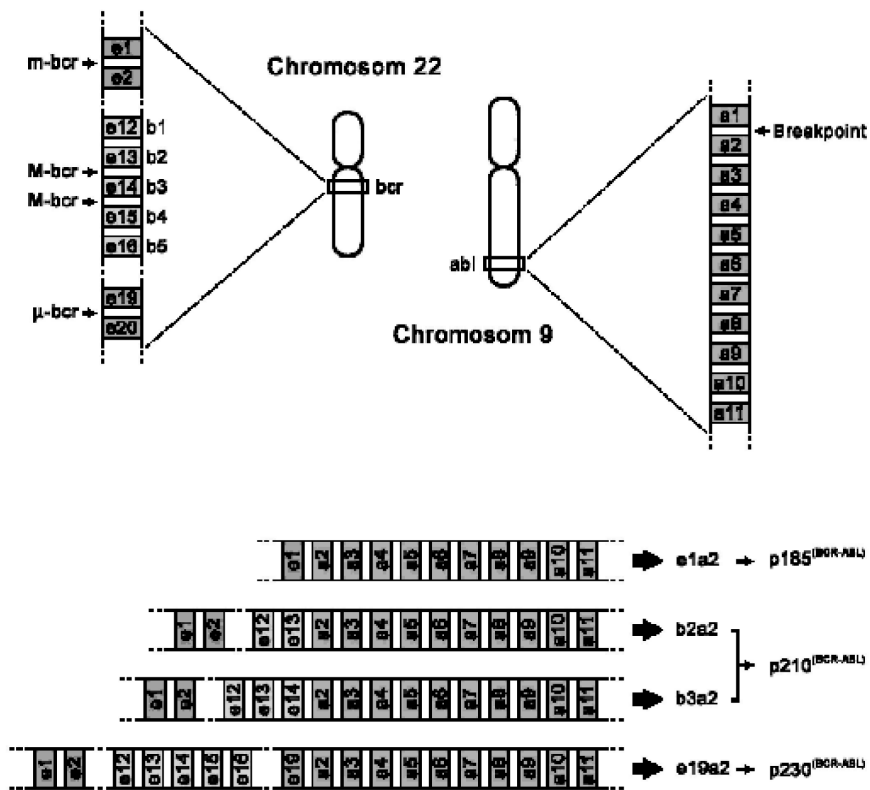


Abbildung 1.2: Die Translokation t(9;22)(nach Faderl et al., 1999)

Im oberen Teil der Abbildung sind die Gene *bcr* und *abl* mit Numerierung der Exone (e1 bis e20 bzw. b1 bis b5 für *bcr*, a1 bis a11 für *abl*) und den Bruchpunkten dargestellt. Während *bcr* die drei Bruchpunkte m-*bcr* (minor breakpoint cluster region), M-*bcr* (major breakpoint cluster region) und μ-*bcr* (dritter Breakpoint downstream von M-*bcr*) beinhaltet, hat *abl* nur einen Bruchpunkt (Breakpoint). Je nach Lage des Bruchpunktes von *bcr* entstehen die im unteren Teil der Abbildung dargestellten Translokationen (e1a2, b2a2, b3a2, e19a2) mit den entsprechenden Translokationsprodukten p185^(BCR/ABL), p210^(BCR/ABL) oder p230^(BCR/ABL).

1.4.1 Die Translokationsprodukte p185^(BCR/ABL) und p210^(BCR/ABL)

Die biologischen Unterschiede zwischen der Ph+ CML und der Ph+ ALL lassen sich möglicherweise auf Unterschiede zwischen den Translokationsprodukten der t(9;22) zurückführen. Das Genprodukt der Fusion von M-BCR mit ABL ist ein Protein von ca. 210 kDa, dem p210^(BCR/ABL). p210^(BCR/ABL) ist in der Regel mit der CML assoziiert (Faderl et al., 2003). In Abhängigkeit davon, zwischen welchen Exonen der Bruchpunkt genau liegt, gibt es zwei verschiedene p210(BCR ABL): b2a2-p210^(BCR/ABL) und b3a2-p210^(BCR/ABL). Da die unterschiedlichen p210(BCR ABL)-Proteine von den verschiedensten Forschergruppen zu biologischen Untersuchungen eingesetzt werden, ohne dem Bruchpunkt besondere Beachtung zu schenken, dürften sie sich in ihrer biologischen Aktivität tatsächlich nicht grundlegend unterscheiden (Faderl et al., 1999).

Das Protein p185^(BCR/ABL) ist mit der Ph+ ALL assoziiert. Dessen Entstehung ist auf Bruchereignisse in m-BCR zurückzuführen (Faderl et al., 2003).

1.4.2 Die Biologie von p185^(BCR/ABL) und p210^(BCR/ABL)

In Studien mit p185^(BCR/ABL) und p210^(BCR/ABL) infiziertem Mausknorpel wurde der eindeutige Beweis des kausalen Zusammenhanges zwischen BCR/ABL-Expression in hämopoetischen Vorläuferzellen und Induktion der Leukämie geliefert (Huettner et al., 2000; Kelliher et al., 1990).

Kürzlich wurde in einem Infektions-/Transplantationsmodell gezeigt, dass die Expression der drei Translokationsprodukte, p185^(BCR/ABL), p210^(BCR/ABL) und p230^(BCR/ABL), in gleicher Weise ein CML ähnliches myeloproliferatives Syndrom in der Maus hervorrufen, wenn das infizierte Spendermark aus mit 5-Fluorouracil (5-FU) vorbehandelten Mäusen stammt. Der BCR/ABL kodierende Provirus konnte in diesen Studien in myeloischen, lymphatischen und erythroiden hämopoetischen Zellen nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass die CML-ähnliche Erkrankung der Mäuse durch Infektion von multipotenten Vorläuferzellen hervorgerufen wird.

Dagegen scheint p185^(BCR/ABL) eher eine B-ALL-ähnliche Leukämie hervorzurufen, wenn Spendermark aus nicht 5-FU-vorbehandelten Mäusen für die Infektion/Transplantation verwendet wird (Li et al., 1999). Allerdings war p185^(BCR/ABL) auch bei nicht 5-FU vorbehandeltem Spenderknorpel in der Lage zum Teil CML-ähnliche Leukämien hervorzurufen. Außerdem waren in diesem experimentellen Ansatz sowohl p210^(BCR/ABL) als auch p230^(BCR/ABL) in der Lage, neben CML-ähnlichen Leukämien auch B-ALLs in

den Mäusen zu induzieren.

Die alleinige Expression von BCR/ABL ist also in der Lage, eine CML- oder ALL-ähnliche Erkrankung hervorzurufen. Der genaue leukämische Phänotyp, der von den verschiedenen BCR/ABL Fusionsproteinen hervorgerufen wird, scheint aber durch noch nicht bekannte Faktoren bestimmt zu sein. (Li et al., 1999).

1.5 BCR, ABL und die leukämogene Signaltransduktion durch BCR/ABL

BCR/ABL ist ein Oncogen, welches die Entstehung von Leukämien hervorruft (Ren, 2005). Bei der Entstehung von Leukämien im Zusammenhang mit BCR/ABL handelt es sich um einen komplexen Prozess, der zum einen auf den Einfluss von BCR/ABL auf hämatopoetischen Zellen, zum anderen auf die Interaktionen von BCR/ABL exprimierenden Zellen mit dem Milieu der hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist (Ren, 2005). Um die Bedeutung des Oncoproteins BCR/ABL und dessen Fusionsprodukt bei der Entstehung der Prognose und der Entwicklung neuer Therapieansätzen der Ph⁺-Leukämien zu verstehen muss man sich als erstes über die „normale“, d. h. der nicht fehlregulierten Biologie des c-ABL- und BCR-Gens bzw. Proteins bewusst werden.

1.5.1 Aufbau und Funktion von c-ABL

Das c-ABL-Protein ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums spielt. Durch die Fusion mit BCR wird die Kinase-Aktivität von ABL, die im Normalfall streng reguliert ist, konstitutiv, das heißt dauerhaft aktiviert (Faderl et al., 1999).

c-ABL ist ein 145 kDa großes Protein (Raitano et al., 1997), das in der Zelle sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Ren, 2005). Es kann zwischen beiden Zellkompartimenten hin- und herwechseln, da in seinen zentralen Sequenzen drei „nuclear localization signals“ (NLS) (Wen et al., 1996) enthalten sind und am C-Terminus ein „nuclear export signal“ (NES) nachgewiesen wurde (Taagepera et al., 1998). Neue Ergebnisse weisen darauf hin, dass die NES im gefalteten Protein nicht funktional ist. Es wird vermutet, dass die Interaktion mit Aktin/Cytoskelet für die cytoplasmatische Lokalisation verantwortlich ist (Hantschel et al., 2005).

Im Kern assoziiert c-ABL mittels C-terminal gelegenen DNA-bindenden Domänen an Chromatin (Kipreos und Wang, 1992; Wetzler et al., 1993). Ein N-terminal gelegenes Myristoylierungssignal ermöglicht zudem die Membraninsertion von ABL (Hantschel et al., 2003).

c-ABL enthält drei N-terminale SRC Homology Domänen (SH1, SH2 und SH3): Die SH1-Domäne enthält die Tyrosinkinase-Funktion von ABL, die SH2-Domäne bindet an Phosphotyrosine-Reste und die SH3-Domäne an Prolin-reiche Sequenzen in anderen Proteinen (Deininger et al., 2000; Hantschel et al., 2003). Prolin-reiche Sequenzen im Zentrum von c-ABL können wiederum mit SH3-Domänen anderer Proteine interagieren, wie zum Beispiel Crk (Deininger et al., 2000).

Für die strenge Regulierung der ABL-Kinase unter physiologischen Bedingungen scheint die SH3-Domäne eine entscheidende Rolle zu spielen, da ihre Deletion die ABL-Kinase aktiviert (Van Etten et al., 1989). Der C-terminale Teil von ABL enthält eine Bindungsstelle für Aktin (Hantschel et al., 2005)

Unter physiologischen Bedingungen ist die ABL-Kinase streng reguliert. Die Kinaseaktivität von c-ABL wird zum Beispiel durch strahlungsbedingte oder chemotherapieinduzierte DNA-Schädigungen stimuliert (Kharbanda et al., 1996). Während des Zellzyklus ist die ABL-Kinaseaktivität am Übergang zur S-Phase erhöht. Außerdem erhöht sich die ABL-Kinaseaktivität nach Zelladhäsion vorübergehend (Raitano, 1997).

1.5.2 Aufbau und Funktion von BCR

Das 160 kDa große BCR-Protein ist ein zytoplasmatisches Protein (Laurent et al., 2000). Im ersten Exon des bcr-Gens sind eine Oligomerisierungsdomäne, eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne sowie, mehrere SH2-bindende Domänen kodiert (Laurent et al., 2001). Die N-terminale „coiled-coil“ (CC) Domäne ermöglicht die Homotetramerisierung von BCR (Ren, 2005).

Die Serin/Threonin-Kinase ermöglicht die Autophosphorylierung von BCR an Serin- oder Threoninresten (Ren, 2005). Als einziges exogenes Substrat der BCR-Kinase wurde bisher Bap-1 identifiziert (Reuther et al., 1994).

Über drei SH2-bindende Domänen interagiert BCR mit anderen Proteinen. Die beiden von den Aminosäuren 192-242 bzw 298-413 gebildeten SH-2 bindenden Domänen interagieren mit der SH2-Domäne von c-ABL in einer ungewöhnlichen Phosphoserin- und Phosphothreonin-abhängigen und nicht Phosphotyrosin-abhängigen Weise (Muller et al.,

1992; Pendergast et al., 1991). Die dritte SH2-bindende Domäne interagiert über den Phosphotyrosinrest 177 mit dem Adaptorprotein GRB-2 (growth factor receptor-bound protein 2), welches ein essentielles Protein des RAS-Signalwegs ist (Ren, 2005).

C-terminal von den durch Exon 1 kodierten Regionen enthält BCR „dbl-like“ und Pleckstrin-Homologie (PH) Domänen, die den Austausch von GTP durch GDP an Rho-“Guaninnucleotid-exchange factors“ (Rho-GEFs) stimulieren, wodurch nachfolgend Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B aktiviert werden können (Ren, 2005).

Am C-Terminus enthält BCR eine GTPase Aktivität für RAC, eine kleine GTPase der RAS-Superfamilie, die eine wichtige Rolle für die Reorganisation des Zytoskeletts bildet (Ren, 2005).

1.5.3 Das Fusionsprotein BCR/ABL

Das BCR/ABL Fusionsprotein enthält alle Funktionsdomänen des c-ABL Proteins, mit Ausnahme des Myristoylierungssignals (Deininger et al., 2000). Sowohl p185^(BCR/ABL) als auch p210^(BCR/ABL) enthalten die BCR-Domänen, die im ersten Exon des bcr-Gens kodiert sind, p210^(BCR/ABL) enthält zusätzlich die „dbl-like“ und PH-Domäne von BCR (Laurent et al., 2001).

Im Gegensatz zu c-ABL spricht die Kinaseaktivität von BCR/ABL nicht mehr auf Stimuli wie DNA-Schädigungen an, die normalerweise die Funktion von c-ABL streng regulieren (Faderl et al., 1999).

Die N-terminale „coiled-coil“ Region von BCR vermittelt sowohl die Homotetramerisierung von BCR/ABL als auch eine Hetero-Oligomerisierung von BCR/ABL und BCR (Laurent et al., 2001). Der Homo-Tetramerisierung wird eine Schlüsselrolle bei der konstitutiven Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase im BCR/ABL Fusionsprotein zugeschrieben (Zhao et al., 2002). Im Gegensatz dazu kann die Heterooligomerisierung dieser Aktivierung entgegenwirken (Zhao et al., 2002).

Die zentrale Rolle der Oligomerisierung wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass eine direkte Fusion der isolierten BCR-“coiled-coil“ Domäne an den ABL-Teil von BCR/ABL die ABL-Kinase aktiviert. Allerdings ist das Transformationspotential einer solchen Mutante, verglichen mit BCR/ABL, geringer, da sie zwar hämatopoetische Zelllinien faktorunabhängig machen kann, aber nicht in der Lage ist Fibroblasten zu transformieren (He et al., 2002; McWhirter et al., 1993; Zhang et al., 2001, Beissert et al., 2003). Außerdem aktiviert die Tetramerisierung von BCR/ABL dessen Aktin-

Bindedomäne (McWhirter et al., 1993).

Obwohl es ebenfalls die NLS von c-ABL enthält, ist BCR/ABL ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Dafür wird zumindest teilweise die verstärkte Bindung an F-Aktin verantwortlich gemacht (Hantschel et al., 2005). BCR/ABL interagiert mit Adapterproteinen wie GRB-2, CRK, CRKL, CBL und SHC (SRC homology and collagen homology) (Abbildung 1.3).

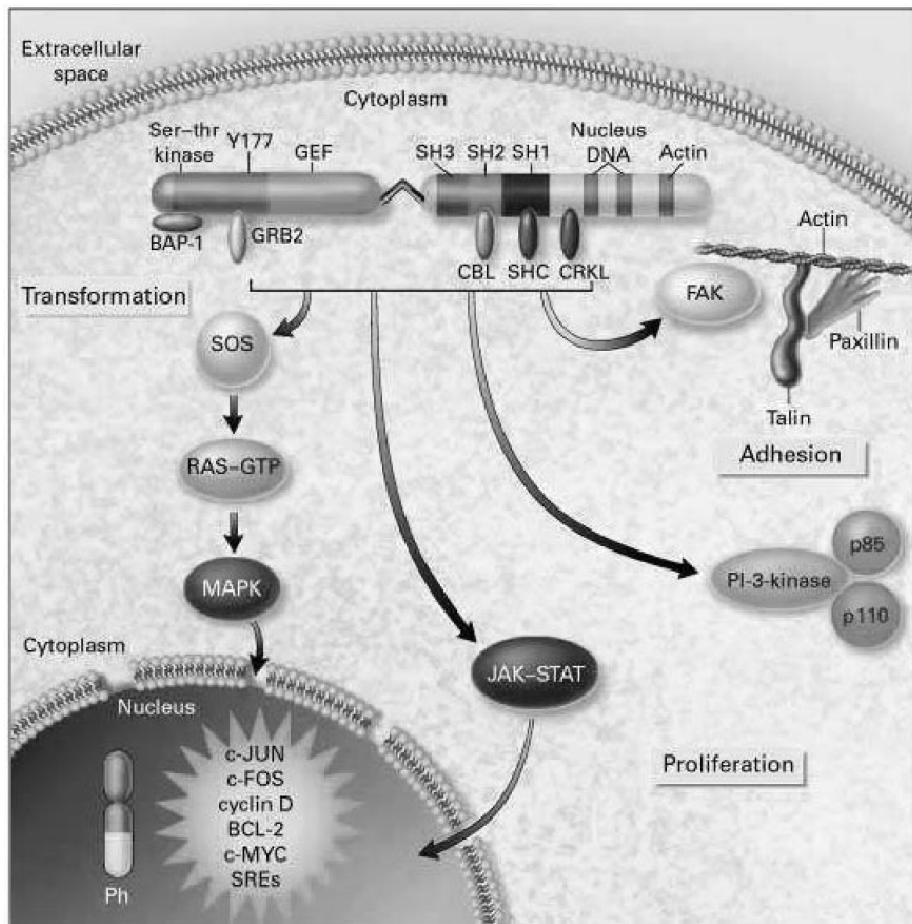


Abbildung 1.3: BCR/ABL-abhängige Signaltransduktionswege (Faderl et al., 1999).

Der Tyrosinrest 177 im BCR-Teil von BCR/ABL wird durch die konstitutive Kinaseaktivität von BCR/ABL phosphoryliert, wodurch GRB-2 eine dauerhafte Aktivierung des RAS- Signalwegs vermittelt. BCR/ABL interagiert ebenfalls mit dem RAS-

aktivierenden Protein SHC (Puil et al., 1994). RAS ist in die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung involviert und wird primär für die Pathogenese der CML verantwortlich gemacht (Faderl et al., 1999).

CRKL bindet mit seiner SH3-Domäne an BCR/ABL und ist außerdem ein Substrat der ABL-Kinase (Ren, 2005). CRKL reguliert die Zellbeweglichkeit und die Integrin-vermittelte Zelladhäsion, indem es mit anderen „focal adhesion“ Proteinen wie Paxillin oder der „focal adhesion kinase“ (FAK) assoziiert (Deininger et al., 2000; Faderl et al., 1999). BCR/ABL bildet mit den Adapterproteinen CRK, CRKL und CBL multimere Komplexe, wodurch die PI3-Kinase aktiviert wird (Ren, 2005).

Weitere durch BCR/ABL beeinflusste Signalwege gehen über die Adapterproteine JAK-STAT (Janus kinase-signal transducers and activators of transcription) zum Zellkern (Faderl et al., 1999). Auch MYC wird über die SH2-Domäne von BCR/ABL aktiviert (Deininger et al., 2000) (Abb.1.3). Jeder der beschriebenen durch BCR/ABL aberrant aktivierten Signalwege trägt zum Transformationspotential von BCR/ABL bei.

1.6 Therapeutische Strategien bei Ph⁺ Leukämien

Die Therapiestrategien der Leukämien richten sich nach Art der Leukämie und nach dessen Verlauf. Ebenfalls wird die Strategie der Therapie je nach Risikoprofil dem jeweiligen Patienten angepasst. Neben Zytostatika erreicht die molekulare und zielgerichtete Therapie speziell gegen Leukämiezellen einen immer höheren Stellenwert in der Klinik.

1.6.1 Therapie der CML

Die derzeit einzige kurative Behandlung der CML stellt die allogene Knochenmark- (KMT) bzw. Stammzelltransplantation (PBSCT) dar. Die Standardtherapie der CML besteht in einer Fremdspendertransplantation noch während der chronischen Phase. Ist diese ausgeschlossen, wird versucht, die Zeit bis zum Übergang in die Blastenkrise mit Hilfe einer zytoreduktiven Therapie mit Hydroxyurea und Interferon- α zu verlängern (Hoelzer und Seipelt, 1998).

In der Blastenkrise unterscheidet sich die CML nicht von einer akuten Leukämie und ist weitgehend therapierefraktär. Deshalb wird sie, je nachdem ob es sich um eine myeloische oder lymphatische Blastenkrise handelt, nach Hochrisikoprotokollen für die AML bzw. ALL behandelt. Deshalb wird auch hier, wenn es gelingt durch die konventionelle

Chemotherapie eine Vollremission zu erreichen, eine allogene Transplantation angestrebt (Hoelzer und Seipelt, 1998).

1.6.2 Therapie der ALL

Bei der Therapie der ALL muss grundlegend zwischen B-Vorläufer-/T-Linien-ALL und der reifen B-ALL unterschieden werden. Die Standardtherapie der B-Vorläufer-/T-Linien-ALL erfolgt in drei Phasen: Induktionstherapie, Konsolidationstherapie und Erhaltungstherapie

Die Induktionstherapie hat das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission (CR) zum Ziel. Sie besteht meist aus einer Vorphase und 2 Phasen einer Kombinationschemotherapie mit Dexamethason, Vincristin, einem Anthrazyklin und Asparaginase. Zur frühen Intensivierung werden weiterhin Cyclophosphamid, Ara-C und Mercaptopurin eingesetzt (Gokbuget et al. 2000).

Der Einsatz von Granulozyten-Colony stimulierenden Faktoren (G-CSF) während der Induktion ist mit einem schnelleren Anstieg der Neutrophilen verbunden (Faderl, 2003). Die Prognose therapierefraktärer Patienten ist äußerst ungünstig. Um die leukämischen Blasten, die auch nach Erreichen der kompletten Remission bei den meisten Patienten noch nachzuweisen sind und die Gefahr eines Rezidivs in sich tragen, weiter zu reduzieren, folgt im Anschluss an die Induktion die Konsolidationstherapie. Diese besteht aus einer zyklischen Gabe wechselnder Polychemotherapien, um eine Resistenzentwicklung zu vermindern. Diese Polychemotherapien bestehen aus in der Induktionstherapie noch nicht verwendeten Substanzen wie Vindesin, Etoposid, Teniposid, Hochdosismethotrexat oder Hochdosis-Ara-C. Ein modifizierter Einsatz der Induktionstherapie ist ebenfalls möglich (Re-Induktion).

Für Hochrisikopatienten hat sich zudem eine Familien- oder Fremdstammzellspende durchgesetzt. Höchststrisikopatienten (Ph+ ALL) werden während der Induktion und Konsolidierung zusätzlich mit Imatinib behandelt.

Um Spätrezidive zu verhindern erhalten die Patienten anschließend eine Erhaltungstherapie. Standard ist die Kombination von Methotrexat und Mercaptopurin bis zu einer Gesamttherapiedauer von zweieinhalb Jahren (Hoelzer und Gokbuget, 2002).

Durch diese Behandlung kann bei Kindern in 80% (Faderl, 2003) und bei Erwachsenen in 40% der Fälle eine Langzeitremission erreicht werden (Hoelzer und Seipelt, 1998). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Erwachsenen mit einer Ph+ALL beträgt nach einer

allogenen Stammzelltransplantation in erster kompletter Remission etwa 81% (Faderl, 2003).

1.7 Molekulare Therapie der Ph+ Leukämie

Da die Therapieergebnisse im Laufe der Jahre zwar entscheidend verbessert, nicht aber auf ein zufriedenstellendes Niveau gehoben werden konnten, und da limitierende Faktoren der Behandlung häufig durch die Wirkung der eingesetzten Medikamente auf gesunde, nichtmaligne Zellen entstehen, wird weiterhin intensiv nach Tumorzell-spezifischen Therapieansätzen gesucht. Angesichts der Tatsache, dass BCR/ABL die molekulare Ursache der Ph+ Leukämien ist, eignet sich BCR/ABL hervorragend als molekulares Target für die Therapie der Ph+ CML und ALL.

1.7.1 Imatinib

BCR/ABL weist eine konstitutive ABL-Kinase-Aktivität auf, die eine wichtige Rolle in der biologischen Aktivität der Fusionsproteine spielt. Als bekannt wurde, dass die transformierende Wirkung von BCR/ABL abhängig von der Tyrosinkinase-Aktivität ist (Lugo et al., 1990), führte die intensive Suche nach einem spezifischen Inhibitor der ABL-Kinase-Aktivität zur Entwicklung einer Klasse von Tyrosinkinase-spezifischen Inhibitoren, den sogenannten Tyrphostinen und anschließend zur Entdeckung eines Inhibitors der ABL-Tyrosinkinase, dem Imatinib (Glivec; Novartis, Basel, Schweiz), der eine toxische Wirkung auf die humane CML Zelllinie K562 zeigte.

Bei Imatinib handelt es sich um einen hochwirksamen und selektiven ABL-Tyrosinkinase-Inhibitor aus der Klasse der 2 Phenyl-Amino-Pyrimidine. Diese Verbindung, die die Struktur der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen nutzt, inhibiert selektiv das „Anchorage-unabhängige“ Wachstum und die tumorigenen Eigenschaften von v-ABL-transformierten Zellen, inhibiert die Fähigkeit von BCR/ABL-positiven Zellen zu proliferieren und Tumore zu entwickeln und unterdrückt die für BCR/ABL typische „colony formation“ von primären CML-Blasten (Deininger et al., 1997; Druker et al., 1996; Weisberg und Griffin, 2000). Darüber hinaus induziert Imatinib Apoptose in Zellen, die durch BCR/ABL transformiert sind (Gambacorti-Passerini et al., 1997). Die Induktion der Apoptose beschränkt sich nicht nur auf Ph+ Zellen, die die CML-assoziierte Form p210^(BCR/ABL) exprimieren, sondern findet auch bei Zellen statt, die durch das ALL-

assoziierte p185^(BCR/ABL) transformiert sind (Beran et al., 1998).

Imatinib bindet mit einer hohen Affinität kompetitiv an die ATP-Bindetasche des ABL-Anteils der inaktiven BCR/ABL-Tyrosinkinase (Schindler, 2000). Fast alle CML-Patienten in der chronischen Phase erreichen durch die Behandlung mit Imatinib eine hämatologische Vollremission (Druker und Lydon, 2000). Unter einer verlängerten Therapie spricht ein wachsender Anteil dieser Patienten zytogenetisch an, bis hin zur zytogenetischen Vollremission, d.h. das Philadelphia-Chromosom verschwindet vollständig. Imatinib ist außerdem in der Lage als Einzelsubstanz hämatologische Vollremission bei Patienten mit CML in der Blastenkrise oder mit Ph+ ALL zu induzieren. Diese Vollremissionen sind jedoch in der großen Mehrzahl der Patienten nur von kurzer Dauer (ca. 4-6 Monate) (Druker und Lydon, 2000; Ottmann, 2000).

Imatinib wird als Initialdosis von 400 mg/d p.o. in der chronischen Phase und von 600 mg/d p.o. in fortgeschrittenen Phasen verabreicht. Es werden hohe hämatologische Remissionsraten von 95 -97% in der chronischen Phase erreicht. Ebenso werden hohe zytogenetische Remissionsraten von 82% bei der Primärtherapie erreicht.

Häufigste Nebenwirkungen sind: Gastrointestinale Symptome, Flüssigkeitsretention, Muskelkrämpfe, Exanthem (Kantarjian et al., 2002; Ottmann et al., 2002; Sawyers et al., 2002; Talpaz et al., 2002)

1.7.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation

Die klinische Effizienz von Imatinib steht außer Frage. Der Erfolg von Imatinib beruht auf dessen Spezifität und der kritischen Rolle von BCR/ABL für die Leukämogenese, obwohl die Affinität für BCR/ABL eher gering ist (O'Hare et al., 2005a).

Aufgrund der Problematik Imatinib-resistenter Rezidive wurden und werden „Nachfolger“ von Imatinib mit dem Ziel entwickelt, die hohe Spezifität beizubehalten und wesentlich höhere Affinitäten zu erreichen. Derzeit befinden sich zwei vielversprechende Substanzen in klinischen Studien: Nilotinib (AMN107, Novartis, Basel) ist ein spezifischer ABL-Kinase Inhibitor der eine ca. 20-mal höhere Affinität gegenüber BCR/ABL hat als Imatinib. Dasatinib (BMS-354825, Bristol-Myers Squibb; New York) hat eine 325-fach höhere Affinität als Imatinib und wurde ursprünglich als Src-Kinase Inhibitor entwickelt. Die sehr hohe Affinität für die ABL-Kinase wurde erst später festgestellt (O'Hare et al., 2005b).

Bei beiden Substanzen konnte eine Wirksamkeit auf die meisten klinisch relevanten

Imatinib-resistenten BCR/ABL-Mutationen gezeigt werden (O'Hare et al., 2005b). Die Mutation T315I bildet die wichtigste Ausnahme.

1.7.3 Strukturelle Grundlagen für die Bindung von Kinase-Inhibitoren

Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität von c-ABL streng reguliert und die meiste Zeit sehr gering (Faderl et al., 1999). Die allgemeine Struktur der katalytischen Domäne der ABL-Tyrosinkinase und die anderer Tyrosinkinasen, insbesondere der SRC-Kinasen, ist hochkonserviert hinsichtlich der Sequenz und der Struktur. Die Kinasedomäne hat eine zweifache Lappenstruktur („bilobal structure“). Der sog. N-Lappen enthält ein β -Faltblatt und eine konservierte β -Helix, der C-Lappen hat insgesamt eine helikale Struktur. Zwischen den Oberflächen der beiden Lappen liegt die ATP-Bindetasche mit einigen hochkonservierten Aminosäuren. Alle bisher gefundenen Tyrosinkinaseinhibitoren binden in dieser Spalte zwischen den Lappen (Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000).

Bei der Aktivierung von Tyrosinkinasen kommt es zu phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderungen. Interessanterweise ähneln sich die Konformationen der aktiven ABL-Kinase und der aktiven SRC-Kinase, die inaktiven Konformationen unterscheiden sich jedoch (Schindler et al., 2000).

Die ABL-spezifischen Inhibitoren Imatinib und Nilotinib binden an die inaktive ABL-Kinase-Konformation und können aufgrund der strukturellen Unterschiede nicht an inaktive SRC-Kinasen binden. Inhibitoren der SRC-Kinase wie Dasatinib wiederum binden aufgrund der Ähnlichkeit der aktiven Kinasekonformationen auch an die aktive ABL-Kinase (O'Hare et al., 2005c).

1.7.4 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib

In der Klinik gilt die Vermeidung subtherapeutischer Imatinib-Dosen ($\geq 300\text{mg/d}$) als wichtigste Maßnahme um das Auftreten von Resistenzen zu vermeiden (Hochhaus et al., 2004). Je nach molekularer Ursache der Resistenz ist eine Dosis-Steigerung (bis 800mg/d) eine therapeutische Option, genauso wie die Anwendung alternativer Kinase-Inhibitoren, was derzeit in der klinischen Erprobung ist.

Wird die Imatinibtherapie bei einem Patienten begonnen, so muss diese auch nach Er-

reichen einer kompletten Remission in unveränderter Dosis fortgesetzt werden, da eine weitere Depletion der Tumormasse beobachtet wurde und eine Unterdosierung die Resistenzentwicklung begünstigt (Hochhaus et al., 2002; Hochhaus und La Rosée, 2004; Müller et al. 2003). Die Hauptursache für diese Resistenzentwicklung sind Mutationen in der ATP-Bindetasche der ABL-Kinase. Diese Mutationen verhindern die Bindung von Imatinib, indem sie hochkonservierte Aminosäurereste betreffen, die mit Imatinib interagieren (Branford et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Shah et al., 2002).

Die Frequenz mit der diese Mutationen bei Ph+ ALL auftreten ist hoch und die Zeitspanne die die mutierten Zellen benötigen um zum dominierenden Klon zu werden ist kurz. Zum Teil entwickelt sich diese Resistenz innerhalb von 3 Wochen.

Die Resistenz gegen Imatinib scheint also in erster Linie durch eine klonale Evolution unter dem selektiven Druck des Medikamentes hervorgerufen zu werden (Ottmann und Hoelzer, 2002).

Für die Resistenzentwicklung gegenüber einer weiteren Behandlung mit Imatinib wurden weitere Mechanismen vorgeschlagen, darunter Amplifikationen von BCR/ABL auf genomischer oder transkriptioneller Ebene, der verstärkten Expression sogenannter „multiple drug resistance“ Proteine und funktionelle Inaktivierung von Imatinib durch dessen Bindung an das saure Glycoprotein „acute phase protein alpha 1“ (Gambacorti-Passerini et al., 2000; Mahon et al., 2000; Ottmann und Hoelzer, 2002; Weisberg und Griffin, 2000).

1.8 Überwindung der Resistenz gegenüber Kinase-Inhibitoren durch Angreifen alternativer Zielstrukturen

Da es wahrscheinlich ist, dass auch bei den neuen Inhibitoren spezifische Resistenzmutationen auftreten werden, ist die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen unerlässlich, die die alternativen Zielstrukturen im BCR/ABL-Molekül angreifen. Der therapeutische Nutzen dieser Wirkstoffe kann neben einer eigenständigen Inhibition von BCR/ABL auch darin liegen die therapeutische Dosis von Kinase-Inhibitoren herabzusetzen.

1.9 Die Coiled-Coil Domäne als neues molekulares Target zur Inaktivierung von BCR/ABL

1.9.1 Aufbau und Funktion der Coiled-Coil-Region bei BCR/ABL

Die Tetramerisierung von BCR/ABL durch die N-terminale Coiled-Coil (CC) führt zur konstitutiven Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase im BCR/ABL Fusionsprotein (McWhirter et al., 1993; Tauchi et al., 1997). Die Struktur der N-terminalen 72 Aminosäuren (AA) von BCR besteht aus einer kurzen N-terminalen Helix-1 (AA 5-15) gefolgt von einem flexiblen Linker (AA 16-27) und einer langen C-terminalen Helix-2 (AA 28-67). Die Interaktion zwischen BCR Monomeren wird im Wesentlichen durch die Helix-2 vermittelt (Zhao et al., 2002) (Abbildung 1.4). Die Deletion der CC reduziert die Kinaseaktivität von BCR/ABL so stark, dass in Mäusen keine myeloproliferative Krankheit mehr induziert wird. CC-Deletionsmutanten sind aber noch in der Lage eine Faktorunabhängigkeit in hämatopoetischen Zelllinien und nach langen Latenzzeiten T-Zelleukämien oder Lymphome in Mäusen zu induzieren (Zhang et al., 2001). Die CC vermittelt sowohl die Homotetramerisierung von BCR/ABL als auch eine Heterooligomerisierung von BCR/ABL und BCR (Campbell et al., 1990; Laurent et al., 2001). Die Heterooligomerisierung von BCR und BCR/ABL inhibiert die Kinaseaktivität des Fusionsproteins (Lin et al., 2001). Auch die Heterooligomerisierung mit den ersten 160 Aminosäuren von BCR reduziert das Transformationspotential von BCR/ABL (Guo et al., 1998).

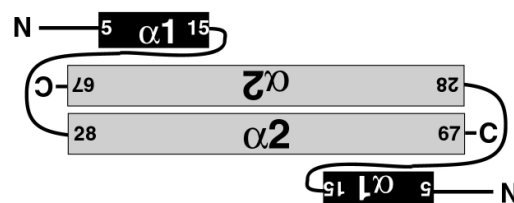


Abbildung 1.4: Aufbau der BCR-coiled-coil Domäne

Die Helix-1 reicht von Aminosäure 5-15, Helix-2 von Aminosäure 28-67 (Zhao et al. 2002)

1.9.2 Das Targeting der Coiled-Coil verstärkt die Wirkung von Imatinib

Nach der Deletion der CC-Domäne (Δ CC-BCR/ABL) ist BCR/ABL nicht mehr in der Lage Tetramere zu bilden (McWhirter et al., 1993). Die Deletion der CC entspricht einer experimentellen Monomerisierung von BCR/ABL. Dementsprechend weist Δ CC-BCR/ABL eine stark reduzierte Kinaseaktivität auf. Dennoch sind Δ CC-BCR/ABL Monomere pathobiologisch nicht völlig inert (Zhang et al., 2001). Imatinib bindet nur an die inaktive Konformation der ABL-Kinase (Schindler et al., 2000), wie sie in BCR/ABL-Monomeren vorliegt, die temporär in der Zellen existieren, da die Tetramerisierung eine Gleichgewichtsreaktion ist. Dementsprechend kann die Kinaseaktivität der Δ CC-BCR/ABL Monomere sehr effizient durch Imatinib inhibiert werden (Beissert et al., 2003). Die Koexpression von BCR1-63 und BCR/ABL führt zu einer BCR1-63/BCR/ABL-Heterooligomerisierung und so zu einem höheren Anteil von inaktiven BCR/ABL Monomeren in der Zelle. Die Sensibilität der Kinaseaktivität von BCR1-63/BCR/ABL Heterooligomeren gegenüber Imatinib ist folglich genauso stark erhöht wie die Imatinib-Sensibilität der Δ CC-BCR/ABL Monomere (Beissert et al., 2003). Inzwischen konnten wir zeigen, dass auch Helix-2-Peptide die Sensibilität von BCR/ABL gegenüber Imatinib ebenso stark erhöhen wie BCR1-63 .

1.10 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es die Effektivität der Inhibierung der Oligomerisierung von BCR/ABL Mutationen durch ein Peptid, der Helix-2, die Hauptbindedomäne der Coiled-Coil-Struktur, zu untersuchen. Dieses Peptid könnte in der Zukunft nützlich für die Behandlung Ph+ Leukämien sein oder ein Anhaltspunkt für die Entwicklung noch kleinerer Moleküle zur Unterbrechung der Tetramere von BCR/ABL darstellen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die therapeutische Relevanz eines solchen Ansatzes dahingehend gegeben ist, da die Helix-2 nicht nur in der Lage ist die Funktion von p185^(BCR/ABL) in einem Zellmodell wie Ba/F3 Zellen, die retroviral transduziert wurden und anschließend durch einen IL3 Entzug selektiert wurden, zu inhibieren, sondern diese Inhibierung auch in Patienten abgeleiteten lymphatischen Ph+ Zelllinien, SupB15 und BV173, funktioniert.

In meiner Arbeit ging es um die Untersuchung der Effektivität der Helix-2 bei p185^(BCR/ABL)

Mutationen bezogen auf deren Resistenz gegenüber Imatinib verglichen mit dem Kinaseinhibitor Dasatinib, der im Gegensatz zu Imatinib an die aktive Form der Kinase bindet, sowie der Vermittlung eines besseren Verständnisses für den Effekt der Peptide auf HMG-Komplexformationen. Des Weiteren wurde die besondere Rolle der p185^(BCR/ABL-T315I) Mutation näher untersucht. Die Bedeutung der Punktmutationen nimmt in der Klinik einen immer größeren Stellenwert ein, da sie ein Grund für die auftretenden Imatinibresistenzen sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese Kammer „Horizon“	Gibco BRL, Bethesda USA
Bakterieninkubator	Kendro Heraeus, Hanau Deutschland
Binocular-Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen Deutschland
Blotting Apparatur Novex	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Chemikalien-Abzug	Waldner, Wangen Deutschland
Entwickler-Maschine	Agfa-Gevaert, Mortsel Belgien
Eppendorf Schüttler	Eppendorf, Hamburg Deutschland
FACScan II	Becton Dickinson, Heidelberg Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan II-imaging microscope	Carl Zeiss, Oberkochen Deutschland
Gefrierschränke	Liebherr, Deutschland
Gelelektrophorese Apparatur Novex	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland

Geräte	Hersteller
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach Deutschland
Invert-Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen Deutschland
Konfokales Mikroskop Leica TCS-NT	Leica, Wetzlar Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Deutschland
Kühlzentrifuge Groß Rotor BS4402/A	Heraeus, Hanau Deutschland
Kühlzentrifuge Mini	Hettich, Tuttlingen Deutschland
Laminarflow; Sterilbank Class II Nuaire	Zapf Instruments, Sarstedt Deutschland
Laminarflow, Sterilbank Class II	W.H. Mahl, Trendelburg-Langenthal Deutschland
Luminometer	Tecan, Schweiz
Magnetkernrührer	Heidolph, Schwabach Deutschland
Mehrkanalpipette	Brandt, Lemgo Deutschland
Membran-Vakuumpumpe, Vakuubrandt	Brandt, Lemgo Deutschland
Mikropipetten 10,20,200,1000 μL	Gilson, Middletown USA
Multipipette	Brandt, Lemgo Deutschland
PCR-Maschine „Robocycler“	Perkin Elmer Cetus, Norwalk USA
pH-Meter	Mettler Toledo, Greifensee Schweiz
Photoapparatur	Kodak, USA
Photometer Ultrospec III	Pharmacia, Uppsala Schweden
Photometer „DNA-Concentrator“	Gene Quant Pharmacia, Uppsala Schweden
Pipettierhilfe „Pipettboy“	Brandt, Lemgo Deutschland
Power Supply	Biorad, München Deutschland
Rotier-Schüttler	Heidolph, Schwabach Deutschland

Geräte	Hersteller
Scanner	Hewlett Packard, Böblingen Deutschland
Spannungsgeber ST504	Gibco BRL, Bethesda USA
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific, Edison N.J. USA
Schwannenhalslampe	Schott, Wien Österreich
Folien-Schweissgerät	Gaerner, Deutschland
Speed Vac Zentrifuge	Thermo Shandon, Pittsburgh USA
Sterilfiltrationsanlage für Wasser	Millipore, Billerica MA USA
Stickstoff-Lagerbehälter	Nunc, Wiesbaden Deutschland
Superzentrifuge	Heraeus-Sorvall, Langenselbold Deutschland
Tecan Spectra Mikrotiterplattenleser	Tecan, Schweiz
Thermoblock	Eppendorf, Göttingen Deutsch- land
Thermomixer	Eppendorf, Göttingen Deutsch- land
Tiefgefriertruhe HERAFreeze	Heraeus, Hanau Deutschland
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg Deutsch- land
Ultraschallbad SONOREX	Bandelin, Berlin Deutschland
Ultraschallsonde	Bandelin, Berlin Deutschland
UV-Tisch	Kodak, USA
Vortexer	Heidolph, Schwabach Deutsch- land
Wasserbad	Heidolph, Schwabach Deutsch- land
Zell-Inkubator Kendro	Heraeus, Hanau Deutschland

Tabelle 2.1: Geräte

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen-Polymethobromid (Hexamethrinbromid, Polybrene)	Sigma-Aldrich, München Deutschland
10x FACS-Lysing Solution	BD Biosciences, San José CA USA
10x Restriktionspuffer 1,2,3,4	New England Biolabs
10x Taq-Polymerase Puffer	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
20x MES Puffer	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
20x MOPS Puffer	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
20x SDS-Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
20x Tris-Acetat Puffer	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
5x First Strand Buffer (Superscript)	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt Deutschland
Acetonitril „Chromasolv“	Merck, Darmstadt Deutschland
Acrylamid Lösung 37,5%	Applichem, Darmstadt Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, München Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Antioxidant (Thioglykolat)	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Benzidin	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm Deutschland
Bicin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Bromphenolblau	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm Deutschland
Butanol	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Calmodulin Resin	Calbiochem, Schwalbach Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt Deutschland
DEPC	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, München Deutschland
DMSO	Applchem, Darmstadt Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Fetal Calf Serum	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
Fetal Calf Serum	Hyclone, Logan UT USA
Fetal Calf Serum	Bio Whittaker, Cambrex
Ficoll	PAA, Cölbe Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe Deutsch- land
Geneticin G418	PAA, Cölbe Deutschland
Gentamycin	PAA, Cölbe Deutschland
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe Deutsch- land
Glycin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Glyzerin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
H_2O ultrarein	Biochrom, Berlin Deutschland
H_2O_2	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Ha-Matrix	Roche, Basel Schweiz
Harnstoff	Sigma-Aldrich, München Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Hygromycin	Roche, Basel Schweiz
IgG Beads Fast Flow	GE-Healthcare, Uppsala Schwe- den
Imidazol	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, München Deutschland
IPTG	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt Deutschland
K_2Ac	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Kolloidal Coomassie (Rotiblu)	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Längenstandard DNA und RNA	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
Längenstandard Protein Precision Plus	Biorad, München Deutschland
L-Glutamin	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
LiCl	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Lithium Dodecyl-sulfat	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Low Fat Milk „Carnation“	USA
Low Fat Milk „Naturaflor“	Töpfer, Österreich
Low Melting Agarose	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Medium Bakterienkultur LB	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Medium Bakterienkultur TB	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Medium Zellkultur DMEM	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Medium Zellkultur McCoy's	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
Medium Zellkultur RPMI	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt Deutschland
Methylenbisacrylamid	Biorad, München Deutschland
MgAc	Sigma-Aldrich, München Deutschland
$MgCl_2$	Sigma-Aldrich, München Deutschland
$MgSO_4$	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Milli-Q Sterilfiltriertes Wasser	MilliPore-Anlage
Na_2Ac	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich, München Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, München Deutschland
NaCl, isotonische Lösung	Braun, Melsungen Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Natriumthiosulfat	Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm Deutschland
Natriumzitat	Carl Roth, Karlsruhe Deutsch- land
Nukleotide	Sigma-Genosys, München Deutschland
Neo Kodan	Schülke und Mayr, Norderstedt Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Oligonucleotide	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Penicillin/Streptomycin (5000U/5000 μ g)	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
Phenol	Applichem, Darmstadt Deutsch- land
Phosphat buffered Saline	PAA, Cölbe Deutschland
Picrin Säure	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Protease-Inhibitoren „Roche Complete“	Roche, Basel Schweiz
Protein G Sepharose	GE-Healthcare, Uppsala Schwe- den
Puromycin	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Retronectin	Takara, Otsu Shiga Japan
RNA-Bee	Tel-test, Friendswood Texas USA
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe Deutsch- land
Semisoliden Medium Bakterienkultur LB- Agar	Carl Roth, Karlsruhe Deutsch- land
Semisoliden Medium Zellkultur Methylcellu- lose w/o EPO	Stem Cell Technologies, Vancou- ver BC Canada
Sodium dodecyl sulfat	Sigma-Aldrich, München Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt Deutschland
Temed	Merck, Darmstadt Deutschland
Trichloressigsäure	Applichem, Darmstadt Deutsch- land
Tris	Sigma-Aldrich, München Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Triton-X-100	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Trockenmilch „Glücksklee“	Nestle, Friedrichsdorf Deutschland
Trypan Blau	Gibco-BRL, Invitrogen München Deutschland
Trypsin	PAA, Cölbe Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München Deutschland
$ZnSO_4$	Sigma-Aldrich, München Deutschland
Zytokine, muIL3, muSCF, muIL6, huEPO	Cell Concepts, Umkirch Deutschland

Tabelle 2.2: Chemikalien

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Bakterienkulturschalen	Greiner, Heidelberg Deutschland
Double Cytofunnel	Thermo Shandon, Pittsburgh USA
Dual Luciferase Assay	Promega, Mannheim Deutschland
Einfrierröhrchen 3,6mL, 1,8mL	Nunc, Roskilde Dänemark
Einwegpipetten	Sartorius, Göttingen Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcon Zentrifugenröhrchen 50mL, 15mL	Sartorius, Göttingen Deutschland
Fertiggele, Bis-Tris HCl 4-12%, 10Well, 12Well, 15Well, 17Well	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Fertiggele, Tris-Acetat 3-8%, 12Well, 15Well, 17Well	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Kanülen Microlance	Becton Dickinson, Franklin Lakes USA
MACS LD, LS, MS Separation Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach Deutschland
Mikrotiterplatten 96Well, 48Well, 24Well, 12Well, 6Well	Greiner, Heidelberg Deutschland
Millipore Filter „Millex“ 0,22 μ m, 0,45 μ m	Millipore, Cork Irland
Nucleobond Plasmid Kits, Maxi, Mini	Nucleobond, Mountain View CA USA
Protease Inhibitoren Roche Complete	Roche, Basel Schweiz
Qiagen GelExtraktion Kit	Qiagen, Düsseldorf Deutschland
Qiagen PCR-Purification Kit	Qiagen, Düsseldorf Deutschland
Qiagen Plasmid Kits, Maxi, Midi, Mini	Qiagen, Düsseldorf Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2mL für PCR Anwendung Perkin Elmer	Cetus, Norwalk USA
Reaktionsgefäße 2mL, 1,5mL, 0,5mL	Sarstedt, Sarstedt Deutschland
Röntgenfilme Agfa Cronex 5000	Agfa-Gevaert, Mortsel Belgien
Schüttelkulturröhrchen	Greiner, Heidelberg Deutschland
Steckpipetten Einsätze, normal und Filter-tips, 1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L, 10 μ L	VWR, Darmstadt Deutschland
Vakuumfiltereinheiten 0,22 μ m	Nunc, Roskilde Dänemark
Western Blot Restoring Solution	Pierce Biotech, Bonn Deutschland
Zellfilter, „Cell Stainer“ 70 μ m, 40 μ m	BD Labware, Franklin Lakes NJ USA
Zellkulturschalen und -flaschen	Nunc, Roskilde Dänemark

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterial

2.1.4 Bakterienkultur

Bakterienstamm	Hersteller
E.coli HB101: sup E44, hsd s20, (r-Bm-B)rec A13 ara-14, pro A2, lacY1, galK2, rps L20 xyl-5mtl-1	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
E.coli DB 3.1: F- gyrA462 endA- D(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2L20(Smr)5 l- leu mtl1	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland

Tabelle 2.4: Bakterienkultur

2.1.5 Zellkultur

Zelllinie	Derivat	Kulturbedingungen
Ba/F3	murine pro B-Zelllinie, IL-3 abhängige Mauszelllinie aus peripherem Blut etabliert, Mausstamm BALB/C	Rpmi +10% FCS +1% L-Glu +1% P/S +IL3
32D		Rpmi +10% FCS +1% L-Glu +1% P/S +IL3
PhNX	ecotrop 293 derivat zur Verpackung von murin-infektiösen Retroviren, Sicherheitsstufe S1, Expressieren die viralen Verpackungsproteine gag, pol und env stabil in episomaler Form	DMEM +10% Gibco FCS +1% L-Glu +1% P/S

Zelllinie	Derivat	Kulturbedingungen
-----------	---------	-------------------

Tabelle 2.5: Zellkultur

Alle Zelllinien wurden aus dem Labor von Pier Giuseppe Pelicci, Universität Perugia/IEO Mailand (Italien) bezogen, mit Ausnahme der ecotropen Phoenix Zellen. Diese wurden von Harald Melchner von Dydiowa, Universitätsklinikum Frankfurt, zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Firma	Anwendung	Blockierung	Konzentration
c-ABL	24-11	mouse	Santa Cruz	WB	5% Carnation	1:1000 in TBST
CRK-L (H-62)		rabbit	Santa Cruz	WB	5% Naturaflo	1:1000 in 0,5% Naturaflo
Phospho-CRKL (Tyr207)		rabbit	Cell Signaling	WB	5% Naturaflo	1:500 in TBST
GFP	B-2	mouse	Santa Cruz	WB	5% Carnation	1:500 in 0,5% Carnation
Phospho-cABL (Tyr245)		rabbit	Cell Signaling	WB	5% Carnation	1:1000 in 0,5% Carnation
Phospho-cABL (Tyr412)		rabbit	Cell Signaling	WB	5% Naturaflo	1:1000 in TBST
Phospho-Tyr	4G10	mouse	Upstate	WB	5% Naturaflo	1:1000 in TBST

Antigen	Klon	Spezies	Firma	Anwendung	Blockierung	Konzentration
Phospho-Bcr (Tyr177)		rabbit	Cell Signaling	WB	5% Naturaflor	1:1000 in 0,5% Naturaflor
β -tubulin	Ab-4	mouse	NeoMarkers	WB	5% Naturaflor	1:5000 in TBST

Tabelle 2.6: Primäre Antikörper

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Firma	Anwendung	Konzentration
anti-mouse-POD	Santa Cruz	WB	1:1000 bzw. 1:2000 bzw. 1:5000 in 0,5% Naturaflor bzw. Carnation oder TBST
anti-rabbit-POD	Santa Cruz	WB	1:500 bzw 1:1000 in 0,5% Naturaflor bzw. Carnation oder TBST

Tabelle 2.7: Sekundäre Antikörper

2.1.6.3 FACS Antikörper

Antigen	Spezies	Firma
NGFR-PE	Human	Becton Dickinson

Tabelle 2.8: FACS Antikörper

2.1.7 Enzyme

Enzym	Firma
Alkaline Phosphatase CIP	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
Gateway LR-Clonase-Mix	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Klenow Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
m-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim Deutschland
Pfu-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Frankfurt Deutschland
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe Deutschland

Tabelle 2.9: Enzyme

2.1.8 Tyrosinkinaseinhibitoren

Inhibitoren	Firma
Imatinib	Novartis
Nilotinib	Novartis
Dasatinib	Bristol-Myers Squibb

Tabelle 2.10: Tyrosinkinaseinhibitoren

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

2.2.1.1 Bakterienkultur

LB-Medium, pH 7,5:

1,0 % (w/v) Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) NaCl

Nach dem Autoklavieren wird dem Medium vor Gebrauch das erforderliche Antibiotikum zugesetzt:

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in ddH₂O

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in ddH₂O

Die aufgeführten Antibiotika-Lösungen werden im Verhältnis 1:1000 zu den Medien gegeben. Für Agarplatten wird dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Das Antibiotikum wird nach Abkühlung auf 48 °C zugegeben.

Übernachtskulturen: 5 ml LB-Medium (mit dem erforderlichen Antibiotikum) werden entweder mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte oder mit 10 bis 50 µl einer Bakterien-Lagerkultur beimpft und bei 37 °C und 250 rpm über Nacht im Schüttler

inkubiert. Die Übernachtskultur wird für die Mini-Präparation von Plasmid-DNA oder zum Animpfen von 250 ml Bakterienkulturen eingesetzt.

2.2.1.2 Transformation von kompetenten E. coli-Zellen

2.2.1.2.1 Präparation von chemokompetenten E. coli-Zellen Eine 400ml LB-Kultur wird mit 5ml der Übernachtskultur eines für die Transformation geeigneten Bakterienstammes E. coli - HB101 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 0,5 bis 0,6 herangezogen. Nach Abkühlung der Bakterien für 15 min auf Eis werden sie sedimentiert (15 min, 4000 x g, 4°C), in 80ml sterile *CaCl*₂ Lösung (50mM *CaCl*₂, 10mM TrisHCl pH7.4) auf Eis für 25 min resuspendiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 4000 x g abzentrifugiert. Danach werden die Zellen in 11ml *CaCl*₂ plus 2ml Glycerol aufgenommen. Die Bakterien werden in 100µl-Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -75°C aufbewahrt.

2.2.1.2.2 Transformationen rekombinanter Plasmide in E. coli Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis überführt und 2µl 0,5M β- Mercaptoethanol und 2µl des Ligationsansatzes zugegeben, mit den Bakterien vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sec bei 42°C werden die Bakterien weitere 2 min auf Eis gelagert. Anschließend werden 500µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und sie für 60 min bei 37°C im Inkubator bei 225 rpm geschüttelt. Danach werden die Zellen auf eine LB/Ampicillin-Platte (mit je 50 µg/ml Ampicillin, 40 mg/ml X-Gal, 100 mM IPTG) aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch den Zusatz von Ampicillin zum LB-Agar können nur Bakterien mit dem im aufgenommenen Plasmid (pcDNA3) vorhandenen Ampicillinresistenzgen auf dem Nährboden wachsen. Einzelne Kolonien werden zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung für analytische Plasmid-DNA-Präparationen abgeimpft.

2.2.1.3 Plasmidpräparation Maxi

Für die Plasmidpräparation wurden die Kits von Nucleobond (Macheray und Nagel) oder der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Anweisungen der Hersteller.

2.2.1.4 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird durch die Absorption bei 260 nm unter Verwendung folgender Gleichung bestimmt:

$$C = OD_{260nm} \times f \times n$$

(C = Konzentration in $\mu\text{g/ml}$; OD = optische Dichte; f = Verdünnungsfaktor; n = $50\mu\text{g/ml}$ für DNA, n = $40\mu\text{g/ml}$ für RNA und n = $37\mu\text{g/ml}$ für Oligonukleotide bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 1 cm).

Ferner wird zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure die OD bei 280 nm gemessen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280nm} sollte für DNA 1,8 und für RNA 2,0 betragen.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer:

0,04 M Tris-Acetate

0,001 mM EDTA

Agarosegele:

0,6-2,0 % Agarose in 1x TAE-Puffer

0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid

6x Probenpuffer:

15 % (v/v) Ficoll

0,025 % (v/v) Bromphenolblau

0,025 % (v/v) Xylencyanol in 6x TAE-Puffer

Die Agarose wird, je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, 0,6 bis 2,0%ig durch Aufkochen in 1x TAE-Puffer gelöst. Vor dem Gießen der Gele wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die Proben werden mit 0,2 fachem Volumen 5x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm in 1x TAE-Laufpuffer. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente werden zusätzlich DNA-Längenstandards aufgetragen. Die DNA-Banden werden durch Anregung mit UV-Licht auf einem Transilluminator ($\lambda = 302\text{nm}$) sichtbar gemacht und mit Hilfe einer Polaroidkamera dokumentiert (Beissert 2003).

2.2.1.6 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der Plasmidpräparation wurde mittels geeignetem Restriktionsverdau eine Kontrollrestriktion durchgeführt.

Enzyme von NEB (KpnI) nach Angaben des Herstellers

2.2.2 Immunpräzipitation (IP)

Lyse und Waschpuffer: E1A

50mM HEPES

50mM Tris-HCl, pH 8,0

50mM-300mM NaCl

0,1% NP₄₀

1:50 Protease Inhibitoren Roche Complete

Die Salzkonzentration des Puffers beeinflusst die Spezifität der Proteinbindung und muss bei Optimierungsschritten variiert werden.

Die Zellen werden zunächst in einer Dichte von mind. 5Mio Zellen 2x mit PBS gewaschen (Zentrifugation jedes Mal bei 1200rpm, 10min, Raumtemperatur) und in ein 1,5mL Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse erfolgt mit E1A Puffer (200-500 μ L) unter vortexen. Das Lysat wird 30min auf Eis inkubiert und periodisch gevortext. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 13500rpm, 4°C für 40min. Der Überstand enthält die Proteine.

Die Proteinbestimmung erfolgt nach Bradford in Triplikaten. Es werden 250-500 μ g Protein auf Protein-G Sepharose(GE-Healthcare) 1 Stunde rotierend bei 4°C vorgeklärt, um unspezifische Matrixbindung auszuschließen. Vor der Nutzung muß die Protein-G Sepharose(GE-Healthcare) 2x mit 500 μ L E1A Puffer äquilibriert werden (zentrifugation 950rpm, 30sec, 4°C). Das vorgeklärte Lysat wird kurz zentrifugiert 950rpm, 3sec, 4°C und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der gegen das zu präzipitierende Protein gerichtete Antikörper wird in einer Konzentration von 1-10% zugesetzt und 1h- über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend werden die Immunkomplexe mittels frischer Protein G-Sepharose(GE-Healthcare) gebunden und 3 \times mit 500 μ l E1A Puffer gewaschen (zentrifugation 950rpm, 30sec, 4°C).

Die Protein-G-Perlen werden getrocknet und in PAGE-Ladepuffer resuspendiert und mit DTT oder β -Mercaptoethanol zur Reduktion versetzt. Die Hälfte der Immunpräzipitation wird auf ein Gel geladen und als Referenz 10% des Einsatzes.

Die SDS-PAGE und der nachfolgende Transfer, sowie die Immundetektion des Proteins von Interesse, erfolgen wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben.

2.2.3 Charakterisierung von Hochmolekulargewichtskomplexen (HMG-Komplexe)

Die HMG-Komplexe wurden wie vorher beschrieben dedektiert (Beissert et al., 2003). Es wurden IL3 unabhängige Ba/F3 Zellen, die p185^(BCR/ABL) und GFP oder Helix-2-GFP expremierten, verwendet. Von 1 bis 5 x 10⁸ Zellen wurden zytosolische Extrakte gewonnen und bei 4°C mit HPLC fraktioniert bei Verwendung von Superose 6 HR 10/30 großen Filtersäulen (Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). Die Durchflussrate betrug 0.4ml/min. Die Fraktionen von 0.4ml Menge wurden gewonnen, konzentriert und durch Western-Blots analysiert. (In Zusammenarbeit mit C.Nervi und Lorena Travaglini)

2.2.4 Proteinanalytische Methoden

2.2.4.1 Lyse von Suspensionszellen mit SDS Lysis-Puffer

SDS- Lysis Puffer:

1,5ml 1M TrisHCl pH 6,8

3ml SDS 20%

3 ml Glycerol

19,5 ml ddH₂O

Die Zellen werden pelletiert und mit PBS in Eppendorfbecher überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 10.000rpm werden sie resuspendiert, mit 50µl Lysis-Puffer pro 1.000.000 Zellen überschichtet und gevortext. Zur Scherung genomischer DNA werden die Lysate 3x20sec lang mit einer Ultraschallsonde bei 70%iger Leistung sonifiziert und bei 20°C aufbewahrt (Beissert 2003).

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektrophotometer

Zellextrakte verschiedener Zelllinien werden nach der im Punkt zuvor beschriebenen Methode isoliert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt dann mittels des Spektrophotometers Ultrospec III (Pharmacia, Freiburg). Dazu werden die Lysate 1:100 in ddH₂O verdünnt und diese mit 1% Lysis Buffer in ddH₂O abgeglichen. Nach Messung der Extinktion bei 280 nm wird die Konzentration berechnet.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für das NOVEX-System werden je nach Proteingröße 4-12%ige Bis-Tris-HCl oder 3-8% Tris-Acetat Fertig-Gradientengele verwendet. Gradientengele ermöglichen eine möglichst hohe Auftrennung der Proteinmischung. Für kleine bis mittelgroße Proteine eignen sich die Bis-Tris-HCl-Gele besonders. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Tris-HCl-Gelen ist ihre höhere Stabilität. Je nach Wunsch können im MES-Puffer (20x:50mM MES, 50mM Tris-Base, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH7,3) kleinere Proteine oder im MOPS-Puffer (20x:50mM MOPS, 50mM Tris-Base, 0,1% SDS, 1mM EDTA, pH7,7) größere Proteine aufgetrennt werden.

Tris-Acetat-Gele eignen sich für große Proteine und werden mit Tris-Acetat Puffer (20x: 50mM Tricin, 50mM Tris-Base, 0,1% SDS, pH8,24) aufgetrennt. Dem Gel-Laufpuffer wird Thioglykolat als Antioxidanz zugesetzt (500µL 2mM Thioglykolat in 200mL Puffer), was eine schärfere Bandenauftrennung ermöglicht.

Die Proben werden in 4x LDS-Probenpuffer (106mM Tris-HCl, 141mM Tris-base, 2% LDS, 10% Glycerol, 0,51mM EDTA, 0,22mM Bromphenolblau, 0,175mM Neutralrot, pH8,5) verdünnt und mit DTT für 10min bei 70°C reduziert und auf das Gel aufgetragen.

2.2.4.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

20x SDS-Transferpuffer:

25mM Bicin

25mM Bis-Tris (freie Base)

1mM EDTA

pH7,2

Für den Transfer eines einzelnen Gels je Kammer und für große Proteine wird der 1x Puffer mit 10% Methanol, für den Transfer zweier Gele je Kammer und kleine Proteine mit 20% Methanol hergestellt.

Um die Kammer feucht und das Gel-Membran-Sandwich zusammen zu halten werden passende Schwämmchen in 1x Transferpuffer eingeweicht und evtl. Luftblasen durch Quetschung der Schwämmchen entfernt. Ist das Gel fertig wird es mittels eines Streifens Whatmanpapiers von der Gelkammer gelöst und die Nitrocellulose-Membran ($0,2\mu\text{M}$) wird auf dem Gel positioniert und mit einem weiteren Streifen Whatman Papier abgedeckt. Dieses „Sandwich“ wird luftblasenfrei gerollt und zwischen die eingeweichten Schwämmchen so positioniert, das die Gelseite zur Kathode und die Membranseite zur Anode liegt. Geblottet wird mit 30-55V für 1-2h bei Raumtemperatur.

Zur Kühlung der Apparatur wird dd H_2O verwendet. Die Proteine werden mit Ponceau S-Färbelösung auf der Membran sichtbar gemacht. Die Färbung wird durch mehrmaliges Waschen mit 1x TBST wieder entfernt.

2.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

1xTBS(T):

10mM Tris-HCl, pH8,0

150mM NaCl

0,05% Tween-20

Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wird die Nitrocellulosemembran in 5% fettfreiem Milchpulver (w/v) in 1x TBS-T für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert.

Nach Zugabe des Primärantikörpers (Anwendung siehe Materialteil Primäre Antikörper“) wird die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Membran wird viermal in TBS 0,1% (v/v) Tween 20 gewaschen und der Sekundärantikörper (siehe Materialteil „Sekundäre Antikörper“) zugegeben.

Nach einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollinkubator wird viermal mit 1x TBST gewaschen und der Blot im Dunkeln mit den ECL Lösungen 1min inkubiert. Die Signale werden mit Autoradiographiefilmen (Agfa Cronex 5) detektiert.

Die folgenden ECL Lösungen werden im Dunkeln kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 zusammengemischt:

ECL Lösung 1:

2,50mM Luminol

0,44ml p-Coumaric Säure (90mM in DMSO)
10ml 1M TrisHCl, pH8,5
ddH₂O ad 100ml.

ECL Lösung 2:

64 µl 30% ddH₂O₂
10ml 1M TrisHCl, pH8,5
ddH₂O ad 100ml.

2.2.4.6 Regenerieren der Proteinmembran zur erneuten Immundetektion

Um die Membran erneut mit einem primären Antikörper zu inkubieren kann sie in einer „Western Blot Restoring“ Lösung der Firma Pierce regeneriert werden. Die Lösung enthält reduzierende Agenzien, welche die Antikörper-Protein Bindung lösen.

Dazu wird die Membran zunächst 3x5min in TBST gewaschen und anschließend 30min bei Raumtemperatur in 10mL der Regenerations-Lösung inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut 3x10min mit TBST gewaschen und kann dann von neuem der Immundetektion zugeführt werden (siehe vorhergehender Abschnitt).

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen (Laminar Air Flow Hood) durchgeführt. Plastikmaterialien und Lösungen, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, werden 30min bei 121°C und 1bar Überdruck autoklaviert, Glaswaren für 5 bis 8h bei 250°C hitzesterilisiert.

Die Zellen werden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂ kultiviert. Das Zellmedium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt.

2.2.5.2 Zellpassage

2.2.5.2.1 Suspensionszellen Dreimal in der Woche werden die Zellen zum Passagieren in ihrem Medium in Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 rpm und Raumtemperatur sedimentiert. Nach Auf-

nahme und Resuspension in frischem Medium werden die Zellen in neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.5.2.2 Adhärente Zelllinien Dreimal in der Woche wird das Medium von den Zellen abgenommen und verworfen. Die Zellen werden durch Überschichten mit PBS gewaschen. Das PBS wird vollständig angenommen und der Zellrasen wird bis zum Ablösen der Zellen mit Trypsin behandelt. Durch Zugabe von frischem Medium wird das Trypsin inhibiert. Die Zellen werden in frischem Medium auf neue Zellkulturplatten verteilt.

2.2.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

2.2.5.3.1 Einfrieren Die Zellen einer 25ml Flasche werden mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und in einem Volumen von 1ml Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Zunächst werden sie für 2h bei -20°C eingefroren, für weitere 16-24 Stunden bei -75°C gelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

2.2.5.3.2 Auftauen Die gefrorenen Zellen werden bei 37°C aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen mit 10ml Medium überführt und durch eine fünfminütige Zentrifugation (1200rpm, Raumtemperatur) sedimentiert. Nach dem Entfernen des Mediums werden die Zellen zum wiederholten Mal mit Medium gewaschen, abzentrifugiert und nach Resuspension in 10 ml Medium in einer Kulturflasche herangezogen.

2.2.5.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde anhand einer Trypan-Blau-Färbung durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.6 Subklonierung von Bulkpopulationen mittels Limiting Dilution

Die Limiting Dilution beschreibt eine Verdünnung von Zellen, die dazu führt, dass man Klone bekommt, die aus einer Zelle abstammen und somit eine homogene Population ausbilden. Dazu werden für Bulks die Zellen wie folgt verdünnt und in 96 Well Platten ausplattiert:

Platte 25 Zellen/Well
Platte 5 Zellen/ Well
Platte 1 Zellen/Well
Platte 0,2 Zellen/Well

Die Verdünnungen für Platte 2-4 werden aus der 1. Platte in 1:5 Verdünnungsschritten hergestellt und stellen statistische Werte dar.

Einen Klon definiert man derart, dass in einer 96Well Platte nicht mehr als 20Wells bewachsen werden dürfen. Hält man diese Werte ein, hat man eine statistisch hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Population die aus einem Well erhalten wird klonal ist. Ob Klone exprimieren wurde mittels Western Blot überprüft und nur exprimierende Klone wurden konserviert.

2.2.7 Transfektion von Zelllinien

2.2.7.1 Herstellung von 2-fach HEPES-gepufferter Salzlösung, pH 7,0 (2x HBS)

Zunächst wird eine Na_2HPO_4 Vorratslösung (5,25g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ in 500ml H_2O) angesetzt. Für die Herstellung von 2x HBS löst man 24g NaCl und 19,5g HEPES in 1170ml H_2O und fügt 30ml Na_2HPO_4 Vorratslösung hinzu. Da der pH-Wert exakt 7,0 betragen muss, wird die Lösung à 400ml auf drei Flaschen verteilt und der pH-Wert mit HCl bzw. NaOH (je nach Ausgangs-pH) auf 6,95 / 7,00 / 7,05 eingestellt, um Messungenauigkeiten auszugleichen.

Anschließend füllt man jede Flasche auf 500ml mit H_2O auf und kontrolliert noch einmal den pH-Wert. Die Lösung wird sterilfiltriert und bei 4°C zwischengelagert. Man führt eine Testtransfektion von Phoenix-Zellen mit jeder der drei 2x HBS Lösungen durch, ermittelt die beste Effizienz und aliquotiert die entsprechende Flasche. Die Aliquots werden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärennten Zelllinien

Subkonfluente Zellen werden mit 5µg DNA pro 10cm Zellkulturschale in 1ml Präzipitativolumen transfiziert. Für 1ml Präzipitat löst man 5µg DNA in 438µl H_2O , gibt 62µl 2M $CaCl_2$ hinzu und mischt die Lösung gut. Dann werden 500µl 2x HBS unter vortexen hinzugetropft.

Man lässt das Präzipitat ca. 20min bei Raumtemperatur ausfallen. Anschließend saugt man das Medium von den Zellen ab, lässt 1ml Präzipitat pro Platte langsam zutropfen und inkubiert die Zellen 30min ohne Medium bei 37°C.

Danach fügt man 9 ml frisches, vorgewärmtes Medium mit 2,5 μ l 0,1M Chloroquin hinzu und inkubiert die Zellen mindestens 8 - 12 Stunden bei 37°C. Danach wechselt man das Medium.

2.2.7.3 Infektion von Zelllinien

Am ersten Tag wird die virenproduzierende Zelllinie "packaging cell line" (hier ecotrope Phoenix Zellen) in einer Dichte von 1,25-1,75 \times 10⁶ Zellen pro 10cm Zellkulturschale ausplattiert, so dass die Zellen am nächsten Tag zu etwa 70% konfluent sind.

Am zweiten Tag werden die Phoenix-Zellen nach der Kalzium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode transfiziert. Für jede Platte werden 5 μ g der jeweiligen retroviralen DNA eingesetzt.

Am Tag 3 wird bei den transfizierten Zellen das Medium abgenommen und durch 7ml neues Medium ersetzt. Für die Infektion von Suspensionszelllinien wird eine 24-Loch-Platte, die nicht für die Zellkultur vorbehandelt ist, einen Tag vor Infektion mit Retronektin beschichtet: 200 μ l der Retronektin Gebrauchslösung (0,1mg/ml in PBS) werden in jedes Loch pipettiert, gut verteilt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag blockiert man nach dem Entfernen des Retronektin die beschichteten Wells für 30 Minuten mit 2% BSA in PBS. Danach wäscht man die Löcher zweimal gut mit PBS. Die vorbeschichteten Wells können mit PBS eine Woche bei 4°C gelagert werden. Zur Infektion gibt man 200 μ l Virusüberstand auf die beschichteten Wells und zentrifugiert diese bei 4000rpm bei 15°C für 15 Minuten. Danach entfernt man den verwendeten Überstand und wiederholt diesen Vorgang insgesamt 4 x.

Den verwendeten Überstand gewinnt man am Tag 4 der zuvor beschriebenen Transfektion von Phoenix-Zellen. Man nimmt die 7 ml Medium (= viraler Zellkulturüberstand) von den Phoenix-Zellen ab und gibt erneut 7 ml Medium auf die Zellen. Der virale Überstand wird zur Beseitigung von Zellpartikeln der Phoenixzellen durch einen 0,45 μ m Spritzenfilter gedrückt. Die benötigte Menge viraler Überstand wird ggf. mit Zytokinen versetzt. Zur Steigerung der Infektionseffizienz wird je nach Zelllinie 0 - 4 μ g/ml Polybren zugefügt (nur Zelllinien, primäre Maus-Knochenmarkszellen kein Polybren). Nicht benötigter Überstand wird in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren

und bei -80°C gelagert.

Nach Beendigung der Zentrifugationsschritte plattiert man die zu infizierenden Zellen („target cells“) nach zweimaligem Waschen mit PBS in einer geeigneten Zellzahl aus: pro Well einer 24 Well-Platte 200000 Suspensionszellen oder primäre Mausstammzellen. Am darauffolgenden Tag löst man die infizierten Zellen vom Boden der Wells und übernimmt diese in geeignete Medien.

2.2.7.4 Bestimmung der Infektionseffizienz mittels Fluoreszenz aktivierter Durchflußzytometrie „fluorescence activated cell sorting“ (FACS)

2.2.7.4.1 GFP-Messung $0,1-1 \times 10^6$ Zellen werden in 5ml Polypropylen-Röhrchen überführt und direkt im Medium innerhalb einer Stunde nach Abnahme der Zellen mittels FACS-Messung analysiert. Die Zellen können auch nach einmaliger Zentrifugation mit PBS bei 1200rpm gewaschen und nach dekantieren mit 200 - 400 μ l FACS-Fixierung resuspendiert und eine Woche bei 4°C und Licht geschützt gelagert werden.

FACS Fixierung:

PBS + 2% Formaldehyd

2.2.7.4.2 NGFR-Rezeptor-Färbung $0,1-1 \times 10^6$ Zellen werden in 5ml Polypropylen-Röhrchen bei 1200rpm zentrifugiert. Man wäscht einmal mit FACS Waschpuffer. Der Überstand wird dekantiert und zurückfließende Pufferreste dienen als Reaktionspuffer für die Antikörperfärbung. Man gibt 1 - 2 μ l der unverdünnten Antikörperlösung in jedes Röhrchen, vortext kurz und inkubiert 15 - 30min bei 4-8°C. Anschließend zentrifugiert man die Proben bei 1200rpm. Man wäscht einmal mit FACS Waschpuffer. Der Überstand wird komplett dekantiert und die Zellen werden in 200 - 400 μ l resuspendiert. Die fixierten Proben können gegen Licht geschützt bei 4°C bis zur Messung (max. 1 Woche) gelagert werden.

FACS Waschpuffer:

PBS + 1%FCS + 1% NaN_3

FACS Fixierung:

PBS + 2% Formaldehyd

2.2.8 Apoptosemessung

2.2.8.1 Messung der Apoptose mittels 7-AAD

7AAD:

7-Aminoactinomycin

FACS Fixierung:

PBS + 2% Formaldehyd

Wachstumsinhibitoren:

Imatinib, Dasatinib

Verwendete Zellen:

Ba/3-Paulo p185 WT, Ba/3-Paulo p185-Y253F, Ba/3-Paulo p185 -E255K, Ba/3-Paulo p185 T315I

Es werden IL3 unabhängige Zellen in einer Zahl von 100.000 Zellen/ml ausplattiert, der Wachstumsinhibitor in verschiedenen Konzentrationen (Konzentrationsreihe) dazugegeben und für 72h bei 37°C inkubiert. Nach 3 Tagen werden $0,1-1 \times 10^6$ Zellen in 5ml Polypropylen-Röhrchen bei 1200rpm mit PBS zentrifugiert und dekantiert. Danach gibt man zu den Zellen μl 7AAD-Lösung und inkubiert für 20 Minuten bei 4°C. Anschließend werden die Zellen nochmals mit PBS bei 1200rpm gewaschen und mit 200 - 400 μl FACS-Fixierung resuspendiert. Die fixierten Proben können gegen Licht geschützt bei 4°C bis zur Messung (max. 1 Woche) gelagert werden.

Die Messung der angefärbten apoptotischen Zellen erfolgt mittels FACS-Analyse. Die Konzentration bei der 50% der Zellen apoptotisch sind wird anschließend durch graphische Interpolation ermittelt.

2.2.8.2 Messung der Apoptose mittels XTT-Assay (Cell-Proliferation Kit II, Roche)

XTT + Elektronen-bindendes-Reagenz:

25ml sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) ben-

zene sulfonic acid hydrate)

+

0,5ml PMS (N-methyldibenzopyrazine methyl sulfate)

Wachstumsinhibitoren:

Imatinib, Dasatinib

Verwendete Zellen:

Ba/F3-Paulo p185 WT-GFP, Ba/F3-Paulo p185-Y253F-GFP, Ba/F3-Paulo p185 - E255K-GFP, Ba/F3-Paulo p185 T315I-GFP

Ba/F3-Paulo p185 WT-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185-Y253F-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185 - E255K-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185 T315I-H2-GFP

Durch serielle Verdünnung entsteht eine Konzentrationsreihe des Wachstumsinhibitors, zu dem IL3 unabhängige Zellen in einer Zahl von 100.000 Zellen/ml in 96-Well-Platten dazugegeben werden. Die Zellen werden als Triplikate ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 72h wird den Zellen 50µl des XTT-Farbstoffes zugegeben und für weitere 6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption des von lebenden Zellen umgesetzten Farbstoffes mittels TECAN bei einer Wellenlänge von $\lambda=450-500\text{nm}$ gemessen. Die Konzentration bei der 50% der Zellen noch leben wird im Folgenden durch graphische Interpolation ermittelt.

2.2.9 Transformationsassay (Faktorentzug) bei IL-3 abhängigen murinen hämatopoetischen Vorläuferzelllinien (Wachstumskurven)

100.000 Zellen/ml werden bei 1200rpm abzentrifugiert und danach 4x mit PBS bei 1200rpm gewaschen. Die Zellen werden danach im IL3 freien Medium resuspendiert. Ba/F3 WT Zellen werden wie zuvor beschrieben mit PIDE- Δ CMV-GFP bzw. PIDE- Δ CMV- Helix2-GFP infiziert. Danach werden Klone durch Limiting-Dilution hergestellt. Anschließend werden die Klone mit Paulo-p185 WT bzw. deren Mutationen doppelt-infiziert.

Nach Bestimmung der Infektionseffizienz mittels NGFR-Rezeptorfärbung und darauffolgender FACS-Analyse wird den Zellen das IL3 entzogen und in einer Zahl von 100.000

Zellen/ml in IL3 freien Medium ausplattiert. Die Zellen werden in den darauffolgenden Tagen ausgezählt und die Proliferation graphisch dargestellt.

2.2.10 Proliferation Competition Assay

Verwendete Zellen:

Ba/F3-Paulo p185 WT-GFP, Ba/F3-Paulo p185-Y253F-GFP, Ba/F3-Paulo p185 - E255K-GFP, Ba/F3-Paulo p185 T315I-GFP

Ba/F3-Paulo p185 WT-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185-Y253F-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185 - E255K-H2-GFP, Ba/F3-Paulo p185 T315I-H2-GFP

Die Zellen werden mit PIDE- Δ CMV-GFP bzw. PIDE- Δ CMV- Helix2-GFP doppelt-infiziert. Am nächsten Tag werden die Zellen in IL3 freiem Medium in Kultur genommen.

Am Tag 4 wird ein Teil der Zellen in Medium mit Imatinib (0,4 μ mol für Paulo p185 WT, 3 μ mol) bzw Dasatinib (4nM) ausplattiert. Am Tag 1, 4, 6 und 8 nach der Infektion wird die GFP-Expression durch eine GFP-FACS-Analyse bestimmt und graphisch dargestellt.

2.2.11 Focus Formation-Assay

Verwendete Zellen:

Rat-1-WT, Rat-1-Pinco, Rat-1-Pinco-p185-WT, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-WT, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-Y253F, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-E255K, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-T315I

Die Zellen werden mit einer Anzahl von 40.000 Zellen/ml in 24-Well-Platten mit 1ml/Well ausplattiert. Danach werden die Platten für 14 Tage in einem Zellinkubator gelagert. Nach 7 Tagen empfiehlt es sich einen Mediumwechsel durchzuführen, ohne die adhärierenden Zellen dabei zu lösen, um den Zellen neue Nährstoffe zukommen zu lassen.

Nach 14 Tagen wird das Medium vorsichtig entfernt und die Platten einmal mit PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und anschließend mit PBS solange vorsichtig gewaschen bis sich die Zwischenräume entfärbt haben. Die angefärbten Platten werden fotografisch ausgewertet.

Um Ungenauigkeiten zu vermeiden sollten pro Versuch Triplikate ausplattiert und aus-

gewertet werden.

2.2.12 Methylcelluloseassay

Bactoagar:

3% in ddH₂O, steril

Verwendete Zellen:

Rat-1-WT, Rat-1-Pinco, Rat-1-Pinco-p185-WT, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-WT, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-Y253F, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-E255K, Rat-1-Pinco- Δ CC-p185-T315I

Der Bactoagar wird aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt und muss anschließend auf dieser Temperatur gehalten werden, so dass der Bactoagar beim Ausplattieren nicht wieder fest wird. Der 3%ige Agar wird mit auf 37°C vorgewärmtem Medium 1:10 verdünnt und mit je 2ml/Well in 6-Well-Platten ohne Luftblasen pipettiert. Der Bactoagar muss danach mind. 30 min aushärten.

Danach werden 5.000 Zellen/ml in Anzahl der Wells \times 0,8ml in 15ml Falcons ausplattiert und auf 37°C gehalten. Nachdem der schon ausplattierte Agar fest ist werden je 0,2ml 3% Agar pro 0,8ml angesetztem Medium in das Falcon pipettiert, wobei es wichtig ist den Mix gut durch dreimaliges schnelles auf- und abpipettieren zu durchmischen. Ohne Verzögerung muss der „Agar-Medium-Zell-Mix“ mit 1ml/Well ohne Luftblasen auf dem schon ausplattierten ausgehärteten Agar ausplattiert werden.

Die Platten werden für 14 Tage in einem Zellinkubator gelagert. Danach werden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl graphisch ausgewertet.

Um Ungenauigkeiten zu vermeiden sollten pro Versuch Triplikate ausplattiert und ausgewertet werden.

3 Ergebnisse

Die Schlüsselrolle der Aktivierung der BCR/ABL-Kinase stellt die Tetramerisation dar, die durch die N-terminale Coiled-Coil-Region (CC) des BCR-Anteils vermittelt wird (McWhirter et al. 1993, Beissert et al. 2003). Die Tetramerisation von p185^(BCR/ABL) spiegelt sich in der Bildung von intrazellulären Hochmolekulargewichts-Komplexen (HMG-Komplexen) wieder.

Bekannt ist, dass BCC mit BCR/ABL interagiert und die Größe der HMG-Komplexe bei Deletionsmutanten ohne N-terminale CC-Domäne, im Vergleich zu WT p185^(BCR/ABL), deutlich reduziert ist, was für ein Auflösen der HMG-Komplexe spricht (McWhirter et al. 1993, Beissert et al. 2003).

Strukturanalysen der Coiled-Coil haben gezeigt, dass sie aus zwei Helices gebildet wird: Helix-1 und Helix-2 (Zhao et al. 2002). Bei der Helix-2 handelt es sich um den Teil der CC-Domäne, der den größten Teil der Interaktionsoberfläche von BCR/ABL Monomeren bildet und deren Dimerisierung vermittelt (Zhao et al., 2002).

In Vorarbeiten zu der hier vorgelegten Arbeit konnten wir zeigen, dass Peptide, die von der Helix-2 abgeleitet wurden in der Lage sind HMG-Komplexe von p185^(BCR/ABL) aufzulösen (Beissert et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von Helix-2 Peptiden in p185^(BCR/ABL) abhängigen Zellen zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber Imatinib führte (Beissert et al. 2008). Durch die Inhibierung von Punktmutationen in der ABL-Kinase-Domäne, die die Resistenz gegenüber Kinase-Inhibitoren wie Imatinib, Dasatinib u.a. vermitteln, kann möglicherweise auch das Angreifen einer alternativen Zielstruktur gelingen.

Aufgrund dessen stellt sich die Frage nach dem Einfluss der Helix-2-Peptide auf Punktmutationen von p185^(BCR/ABL). Punktmutationen sind verantwortlich für die Imatinibresistenzen (Branford et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Shah et al., 2002) und sind der best untersuchte Resistenzmechanismus gegen Kinaseinhibitoren (O'Hare et al. 2005, O'Hare et al. 2005, von Bubnoff et al. 2005).

Daher untersuchten wir die Effekte der Helix-2 auf drei klinisch relevante Mutationen,

die verantwortlich sind für Imatinib-Resistenzen - zwei P-loop Mutationen Y253H und E255K, und die T315I Mutation.

3.1 Interaktion der Helix-2-Peptide mit Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Punktmutationen

Als erstes wurde die Interaktion der Helix-2 mit Imatinib resistenten BCR/ABL Punktmutationen untersucht. Um die Interaktion der Helix-2 Peptide mit BCR/ABL nachzuweisen, wurde eine Co-Immunoprecipitation (CO-IP) durchgeführt. Für die CO-IP wurden Ba/F3 Zellen, die entweder den WT oder eine der genannten Punktmutationen von p185^(BCR/ABL) zusammen mit GFP oder Helix-2-GFP exprimierten lysiert. Die CO-IP mit einem anti-GFP Antikörper und die anschließende anti-ABL Western-Blot-Analyse haben gezeigt, dass Helix-2-GFP-Fusionsproteine sowohl mit dem unmutiertem p185^(BCR/ABL) als auch mit p185^(BCR/ABL) Mutationen interagieren (Abbildung 3.1). Diese Daten weisen daraufhin, dass die Bindung von Helix-2 Peptiden an BCR/ABL unabhängig vom Mutationstatus der ABL-Kinase Domäne ist.

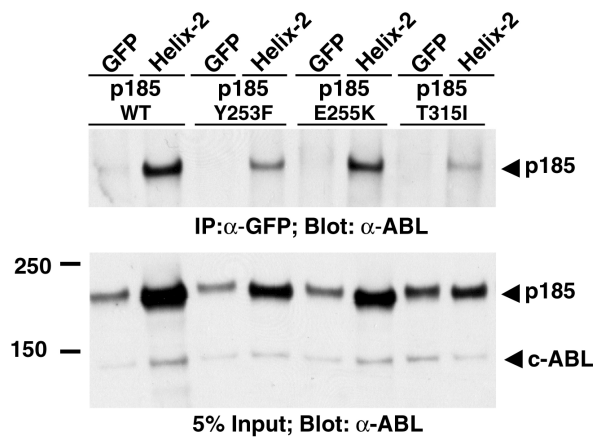


Abbildung 3.1: Die Helix-2 interagiert mit p185^(BCR/ABL) Mutationen.

Für die Co-Immunoprecipitation der Lysate IL-3 unabhängiger Ba/F3 Zellen, die entweder p185^(BCR/ABL) WT oder dessen Mutationen sowie entweder GFP oder Helix-2-GFP exprimierten, wurde ein GFP spezifischer Antikörper verwendet. Die anschließende Detektierung erfolgte mittels Western Blot mit einem anti-ABL Antikörper. 5% der Proteinmenge, die für die COIP eingesetzt wurde, wurde als Input aufgetragen.

3.2 Auflösen der HMG-Komplexe von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Punktmutationen durch Helix-2-Peptide

Daraufhin untersuchten wir den Einfluss der Interaktion der Helix-2 Peptide auf die HMG-Komplexe der p185^(BCR/ABL) Mutationen. Hierzu wurde eine Größenausschluss HPLC, in Gegenwart und Abwesenheit von Helix-2 Peptiden, durchgeführt. Dazu wurden cytoplasmatische Extrakte aus Ba/F3 Zellen, die unmutiertes oder mutiertes BCR/ABL sowie GFP oder Helix-2-GFP koexprimierten, gewonnen und mittels Größenausschluss HPLC unter nicht-denaturierenden Bedingungen fraktioniert.

Die Detektion von BCR/ABL in den Fraktionen erfolgte mittels anti-ABL Western Blot. Nach Fraktionierung von Ba/F3 Lysaten, die unmutiertes BCR/ABL und GFP koexprimierten, konnte BCR/ABL in den Fraktionen nachgewiesen werden, die einem Molekulargewicht (MG) von 670 kDa bis 1070 kDa entsprach.

In Gegenwart von Helix-2-GFP zeigt sich eine Größenreduktion der HMG-Komplexe auf ein MG von 440 bis 670kDa wobei der Scheitelpunkt bei 670kDa liegt.

Endogene c-ABL-Komplexe haben ein Molekulargewicht von 440 bis 670 kDa, welches nicht durch die Gegenwart von GFP oder Helix-2-GFP beeinflusst wurde (Abbildung 3.2).

Bei den p185^(BCR/ABL) Punktmutationen Y253F, E255K und T315I zeigt sich bei den Fraktionen der Zellen, die nur GFP exprimierten ebenfalls ein MG zwischen 670 und 1070kDa. Die Expression von Helix-2-GFP zeigte bei den Mutationen Y253F und E255K ebenfalls eine Reduktion des MG der detektierten Fraktionen. Zusätzlich zeigte sich ein Shift der Banden in die Fraktionen des höheren MG.

Auch das Bild der HMG-Komplexe der Punktmutation T315I wurde durch Helix-2 Peptide verändert. Die Anwesenheit der Helix-2 in dieser Mutation führte zu einer Elution der Fraktionen zu einem MG kleiner als 440 kDa . Der Peak der Fraktion 25 mit einem

MG von 1070kDa wurde durch die Helix-2 nicht beeinflusst (Abbildung 3.2).

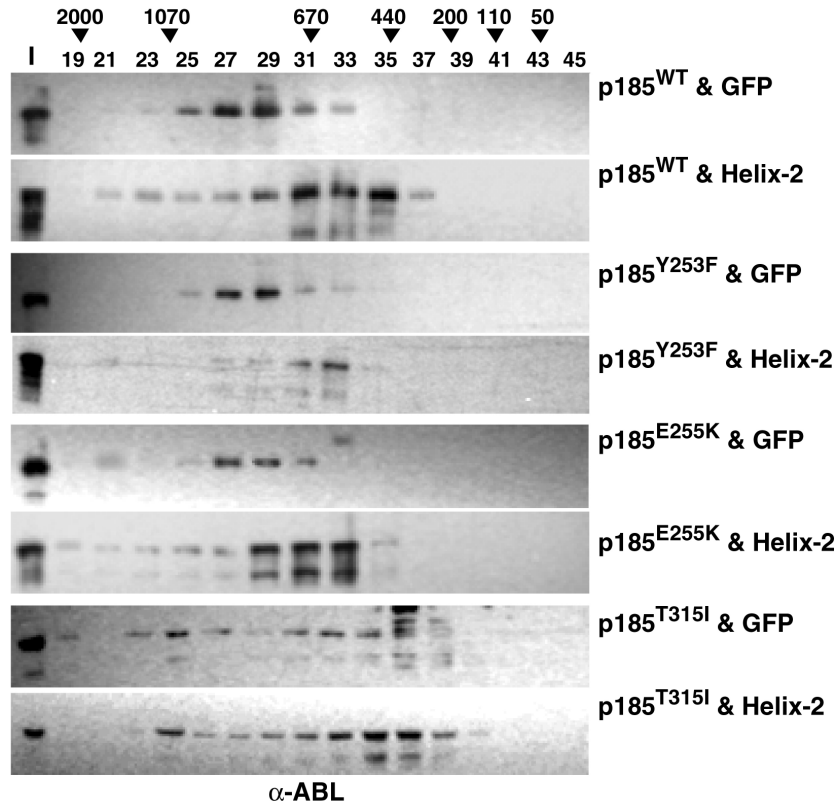


Abbildung 3.2: Die Helix-2 unterbindet die Bildung von HMG-Komplexen von p185^(BCR/ABL) WT und Mutationen.

Zytoplasmatische Extrakte von IL-3 unabhängigen Ba/F3 Zellen, die entweder p185^(BCR/ABL) WT oder dessen Mutationen sowie entweder GFP oder Helix-2-GFP exprimierten, wurden durch eine Größenausschluss HPLC fraktioniert. Anschließend wurde p185^(BCR/ABL) durch einen anti-ABL Western Blot dedektiert (in Zusammenarbeit mit Clara Nervi und Lorena Travaglini).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Helix-2 mit den HMG-Komplexen von p185^(BCR/ABL) WT und deren Mutationen interagiert. Die Bindung der Helix-2 behindert die Oligomerisation von p185^(BCR/ABL), was durch die Reduktion der Größe der HMG-Komplexe gezeigt wird. Gegenätzlich dazu interferiert die Gegenwart der T315I Mutation mit der Eigenschaft der Helix-2 die HMG-Komplexe von p185^(BCR/ABL) zu unterbrechen.

3.3 Reduzierung der Autophosphorylierung von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Punktmutationen durch die Helix-2

In unserer Arbeitsgruppe wurde zuvor gezeigt, dass sowohl CC-abgeleitete als auch Helix-2 Peptide die Autophosphorylierung von nicht mutiertem p185^(BCR/ABL) reduzieren (Beissert et al 2003, Beissert et al 2008). Da Helix-2 Peptide mit unmutiertem und mutiertem p185^(BCR/ABL) interagieren wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit von Helix-2 Peptiden auf die Autophosphorylierung von punktmutiertem BCR/ABL auswirkt.

Um dies zu untersuchen wurden GFP bzw. Helix-2 GFP exprimierende Ba/F3 Zellklone, mit vergleichbarer GFP Fluoreszenzintensität, mit unmutiertem p185^(BCR/ABL) bzw p185^(BCR/ABL) Mutationen (Y253F, E255K, T315I) infiziert und positiv infizierte Zellen durch einen IL3-Entzug selektiert.

Im Folgenden wurde die Phosphorylierung an zwei Phosphotyrosinstellen, die entscheidend für die ABL-Aktivierung sind (Y245 and Y412) (Hantschel und Superti-Furga, 2004), mit spezifischen Antikörpern detektiert. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt verhindert die Expression der Helix-2 die Autophosphorylierung von p185^(BCR/ABL) WT und dessen Mutationen an beiden Phospho-Tyrosinen.

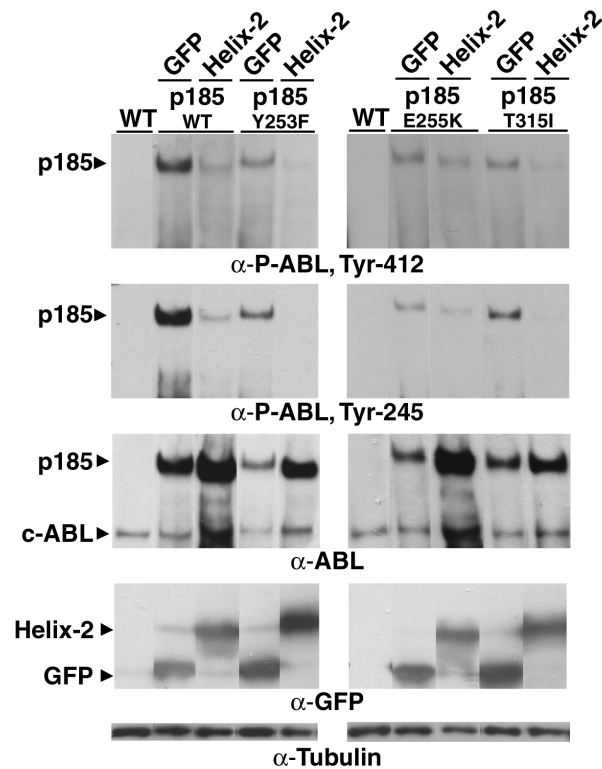


Abbildung 3.3: Effekt der Helix-2 auf die Autophosphorylierung von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen.

Autophosphorylierung von p185^(BCR/ABL) Mutationen bei Anwesenheit der Helix-2-Peptide. Lysate von GFP oder Helix-2-GFP Ba/F3 Zellklone, die entweder mit p185^(BCR/ABL) WT oder deren Mutationen infiziert wurden, wurden geblottet und mit einem anti-ABL(Tyr-245) spezifischen Antikörper und nach einmaligem Strippen mit einem anti-ABL(Tyr-412) spezifischen Antikörper dedektiert.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Helix-2 die Autophosphorylierung von p185^(BCR/ABL) unabhängig von dessen Mutationsstatus inhibiert und durch den IL3-Entzug p185-hoch-exprimierende Zellen, die zusätzlich die Helix-2 exprimierten, selektioniert wurden.

3.4 Beeinflussung der Sensitivität durch Helix-2-Peptide gegenüber Imatinib und Dasatinib bei Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen

Daraufhin stellte sich die Frage nach dem Verhalten der p185^(BCR/ABL) Mutationen, die zusätzlich die Helix-2 exprimieren, gegenüber verschiedenen ABL-Kinase-Inhibitoren. Die Molekulartherapie mit dem ABL-Kinase-Inhibitor Imatinib Mesylate (STI) führt zu kompletten hämatologischen Remissionen bei der Mehrzahl der Ph+Leukämien (O'Dwyer et al. 2003). Ein großes Problem bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien ist, dass die Imatinib-Resistenz stark zunimmt, was hauptsächlich auf Punktmutationen in der ABL-Kinasedomäne, die mit der Bindungsaffinität von Imatinib konkurrieren, verursacht wird (Cowan-Jacob et al. 2004, Deininger M, 2005).

Die regulierte Aktivierung von BCR/ABL Tyrosinkinase (TK) und der strukturell verwandten SRC Tyrosinkinase (TK) wird von einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung begleitet (Van Etten, 2003). Imatinib bindet selektiv die inaktive ABL Kinasekonformation und stabilisiert diese (Schindler et al., 2000), während SRC-Kinaseinhibitoren wie Dasatinib sowohl an der aktiven SRC, als auch an der strukturell ähnlichen aktiven ABL-Kinase bindet (O'Hare et al. 2005). Die Tatsache, dass Helix-2 Peptide die Kinaseaktivität reduzieren und Imatinib an die inaktive ABL-Kinase bindet, ist zu erwarten, dass Helix-2 koexprimierende Zellen sensitiver auf eine Imatinibbehandlung reagieren. Hingegen ist bei einer Behandlung mit Dasatinib kein Einfluss der Helix-2 auf die Sensitivität der behandelten Zellen zu erwarten, da Dasatinib an der aktiven Kinaseform angreift. Um das Ansprechen von p185^(BCR/ABL) Mutationen gegenüber zwei Kinaseinhibitoren, Imatinib und Dasatinib, bei Anwesenheit von Helix-2 Peptiden vergleichend zu untersuchen wurde die IC-50, die Konzentration, bei der 50% der Zellen apoptotisch bzw lebend sind, für diese zwei Inhibitoren, bei Coexpression von GFP bzw Helix-2-GFP, mittels eines Colorimetric (XTT) -Assays bestimmt.

Um dies zu untersuchen wurden GFP bzw. Helix-2 GFP exprimierende Ba/F3 Zellklone mit vergleichbarer GFP Fluoreszenzintensität, mit unmutiertem p185^(BCR/ABL) bzw p185^(BCR/ABL) Mutationen (Y253F, E255K, T315I) infiziert und positiv infizierte Zellen durch einen IL3-Entzug selektioniert. Die Zellen (100.000 Zellen /ml) wurden in einer Imatinib- (0 bis 9,6 μ M) bzw. Dasatinib- (0-32nM) -Konzentrationsreihe, die seriell verdünnt wurde, in 96Well-Platten als Tripletts ausplattiert.

Nach 72h wurde den Zellen 50 μl des XTT-Farbstoffs (bestehend aus den Komponenten siehe Punkt 2.2.10.2) zugesetzt. Der Farbstoff wird von lebenden Zellen umgesetzt, was durch eine Absorptionsmessung, die 6 Stunden später erfolgt, bei einer Wellenlänge von $\lambda=450\text{-}500\text{nm}$ bestimmt werden kann. Die IC-50s wurden mittels einer graphischen Interpolierung bestimmt.

Die IC-50 Konzentration von Imatinib bei unmutiertem p185^(BCR/ABL) beträgt 0,3 μM , bei den Mutationen Y253H 3,5 μM , E255K 5,6 μM und bei der Mutation T315I 7,2 μM . Bei gleichzeitiger Koexpression der Helix-2 beträgt die Konzentration von Imatinib, bei der 50% der Zellen apoptotisch sind, bei unmutiertem p185^(BCR/ABL) 0,2 μM und bei den Mutationen Y253H 1,97 μM , E255K 1,7 μM . Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Mutation T315I bei gleichzeitiger Helix-2 Expression keine Verstärkung des Effektes in Form einer Senkung der IC-50 Konzentration (Abbildung 3.4).

Bei der Verwendung von Dasatinib als Kinaseinhibitor ergaben sich bei unmutiertem p185^(BCR/ABL) eine IC-50 Konzentration von 10,7 nM, bei den Mutationen Y253H 14,5nM, bei E255K 28nM und bei der Mutation T315I $\geq 32\text{nM}$. Vergleichend zu Imatinib findet sich bei den Helix-2-GFP exprimierenden Zellen in Anwesenheit von Dasatinib keine Senkung der IC-50 (Abbildung 3.5).

Bei Zugabe des Kinaseinhibitors Imatinib zeigt sich zusammenfassend bei den Zellen, die die Helix-2-Peptide exprimierten, eine Steigerung der Sensitivität gegenüber Imatinib, was sich in einer Reduktion der IC-50 Konzentration gegenüber den GFP exprimierenden Zellen zeigt. Im Gegensatz dazu findet sich bei der Mutation T315I keine Verstärkung des Effektes in Form einer Senkung der IC-50 Konzentration. Wie vermutet findet sich bei den Helix-2-GFP exprimierenden Zellen in Anwesenheit von Dasatinib keine Steigerung der Sensitivität.

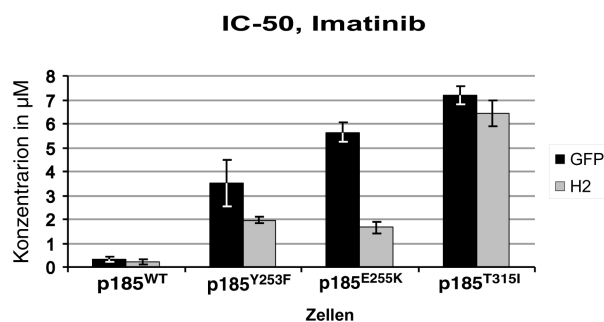


Abbildung 3.4: IC-50 von Imatinib bei p185^(BCR/ABL) Mutationen

Die IC-50 wurde mittels eines XTT-Assays bestimmt. Die Zellen wurden zuvor in einer Konzentrationsreihe von Imatinib ausplattiert und der Anteil der noch lebenden Zellen nach 6h mittels Absorptionmessung am TECAN ermittelt und anschließend graphisch ausgewertet.

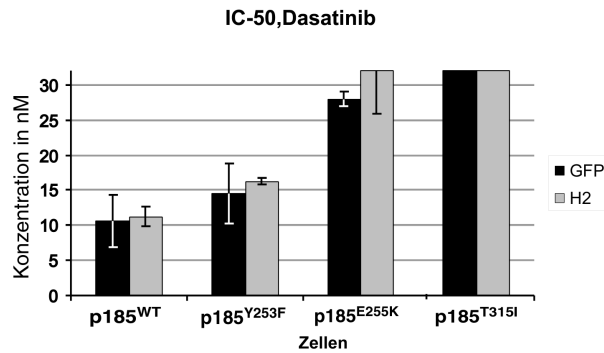


Abbildung 3.5: IC-50 von Dasatinib bei p185^(BCR/ABL) Mutationen

Die IC-50 wurde mittels eines XTT-Assays bestimmt. Die Zellen wurden zuvor in einer Konzentrationsreihe von Dasatinib ausplattiert und der Anteil der noch lebenden Zellen nach 6h mittels Absorptionmessung am TECAN ermittelt und anschließend graphisch ausgewertet.

Die Daten zeigen, dass die Helix-2 zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Imatinib, mit Ausnahme der T315I Mutation, führte, die Sensitivität gegenüber Dasatinib allerdings nicht verstärkt wurde.

3.5 Beeinflussung des Transformationspotentials von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen durch die Helix-2

Die Inhibierung der Tetramerisation hebt das Transformationspotential von BCR/ABL auf (Beissert et al. 2003). In der Tat weisen Deletionsmutanten von BCR/ABL, denen die CC-Region fehlt (Δ CC-BCR/ABL), eine erniedrigte TK Aktivität auf, welche sich in einer geminderten Autophosphorylierung von BCR/ABL zeigt (Beissert et al. 2003). Die Fähigkeit hämatopoetischen Zelllinien faktorunabhängiges Wachstum zu vermitteln ist gering (Beissert et al. 2003, He et al. 2002, Zhang et al. 2001) und sehr sensitiv gegenüber Imatinib (Beissert et al. 2003). In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass

auch Helix-2 Peptide in der Lage sind die Sensitivität von p185^(BCR/ABL) WT gegenüber Imatinib zu erhöhen.

Wie im vorherigen Punkt beschrieben weisen die p185^(BCR/ABL) Mutationen im Vergleich zu p185^(BCR/ABL) WT eine höhere IC-50 von Imatinib auf, was für eine Resistenz gegenüber Imatinib spricht. Das Einbringen der Helix-2 Peptide führt, mit Ausnahme der Mutation T315I, zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Imatinib, was an der Senkung der IC-50 Konzentration zu sehen ist. Diese Ergebnisse veranlassten uns weitere Versuche zu unternehmen um zu zeigen, dass die Helix-2 in der Lage ist die Resistenzen gegenüber Imatinib zu überwinden und nicht die Sensitivität gegenüber Dasatinib auf die p185^(BCR/ABL) Mutationen zu erhöhen.

Da die Proliferation der Zellen in IL3-freiem Medium ein Marker für die Aktivität der BCR/ABL TK ist, untersuchten wir das Wachstum der Zellen bei Coexpression der Helix2.

3.5.1 Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen in Progenitorzellen

Zuerst wurden Proliferationskurven erstellt. Dazu wurden Klone von GFP und Helix-2-GFP exprimierenden Ba/F3-Zellen hergestellt. Danach wurden je 3 Klone mit p185^(BCR/ABL) WT oder den drei Mutationen Y253F, E255K und T315I infiziert und nach einem IL-3 Entzug in IL-3 freiem Medium in gleicher Zahl (10⁵ Zellen/ml) ausplattiert. Deren Proliferation wurde über 5 Tage beobachtet, ausgezählt und es wurden Wachstumskurven erstellt. Als Kontrolle diente unmutiertes p185^(BCR/ABL) (p185^(BCR/ABL)-WT), dessen Proliferation durch die Helix-2 Peptide, wie schon zuvor gezeigt, reduziert wird (Abbildung 3.6).

Bei der Mutation E255K zeigt sich verglichen mit der Positivkontrolle ebenfalls eine deutliche Reduzierung des Wachstums der Zellen, die das Helix-2 Peptid enthalten, gegenüber den Zellen, die nur GFP exprimieren. Eine Proliferationshemmung zeigt sich bei den Mutationen Y253H und T315I nicht (Abbildung 3.6).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Helix-2-Peptide die Proliferation von Zellen, die Imatinib resistente BCR/ABL-Mutationen exprimieren, inhibieren können.

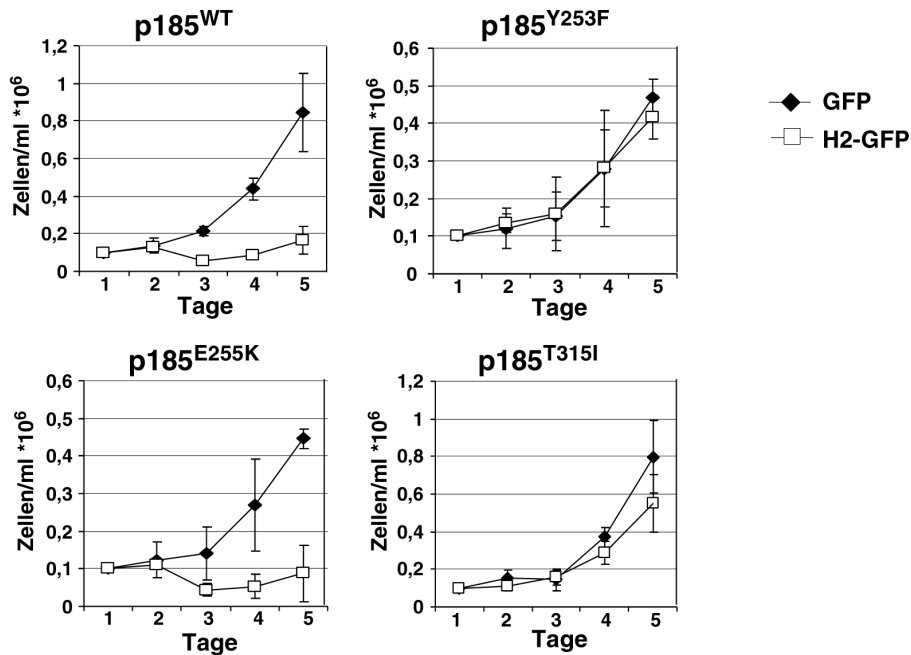


Abbildung 3.6: Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden Ba/F3 Zellen (bzw. 32D Zellen, hier nicht dargestellt), die mit GFP oder Helix-2-GFP infiziert wurden, mit p185^(BCR/ABL) WT oder deren Mutationen co-infiziert und nach einem IL3 Entzug in einer Anzahl von 100.000 Zellen/ml ausplattiert. Die Zellen wurden über 5 Tage ausgezählt und die Proliferation anschließend graphisch interpoliert.

3.5.2 Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen in Progenitorzellen durch die Helix-2 bei Anwesenheit von Kinaseinhibitoren

Wie zuvor beschrieben ist es möglich durch Coexpression der Helix-2-Peptide in p185^(BCR/ABL) Mutationen die Autophosphorylierung zu inhibieren sowie die IC-50 der Tyrosinkinaseinhibitoren zu senken. Um nun auch den sensitivitätssteigernden Effekt auf die Biologie, in diesem Fall die Proliferation gegenüber Imatinib und Dasatinib, abzuklären, verwendeten wir ein sogenanntes „Proliferation competition Assay“ (Abbildung3.7).

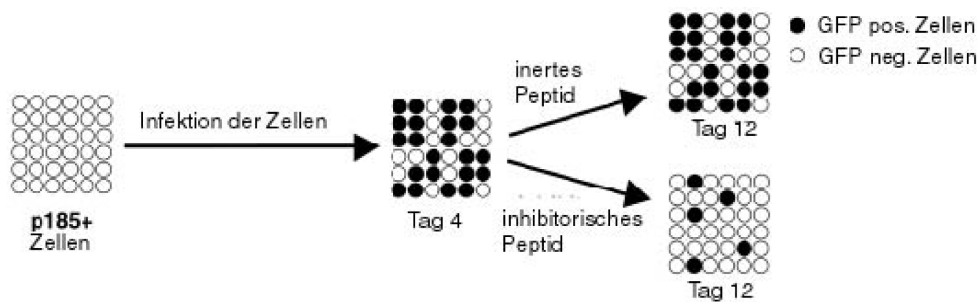


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Funktionsweise des „Proliferation Competition Assays“

Die Zellen werden mit einem inhibitorischen Peptid infiziert, welches an GFP gebunden ist. Die Zellen, die dieses inhibitorische Peptid anschließend exprimieren, sind nicht mehr in der Lage zu proliferieren, was sich bei anschließender GFP-Messung an einem FACS-Gerät in Form einer Abnahme der GFP-Expression zeigt.

3.5.2.1 Bestimmung der subapoptischen Konzentration von Imatinib und Dasatinib

Um in den weiteren Versuchen mit verwendeten Imatinib- und Dasatinib-Konzentrationen nicht in den apoptotischen Bereich der $p185^{(BCR/ABL)}$ WT und $p185^{(BCR/ABL)}$ Mutationen zu kommen, ermittelten wir die IC-50 von Imatinib und Dasatinib mittels Apoptosemessung mit 7-AAD mit anschließender graphischer Interpolation.

$\Delta LNFGR$ als Reportergen und WT $p185^{(BCR/ABL)}$ oder $p185^{(BCR/ABL)}$ Mutationen wurden retroviral in Ba/F3 Zellen expremiert und positiv infizierte Zellen durch einen IL3-Entzug über 7 Tage selektioniert. Die 100%ige Expression wurde mittels FACS-Messung durch eine $\Delta LNFGR$ -Rezeptorfärbung überprüft.

Danach wurden je 100.000 Zellen/ml in einer Konzentrationsreihe mit Imatinib (0-4 μM) und Dasatinib (0-8 nM) ausplattiert. Nach 72h wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt. 7AAD gelangt durch die Membran apoptotischer Zellen. Somit können apoptotische Zellen angefärbt und mittels einer FACS-Messung deren prozentualer Anteil gemessen werden. Durch anschließende graphische Auswertung kann die IC-50 ermittelt werden. Dabei ergaben sich für Imatinib bei unmutiertem $p185^{(BCR/ABL)}$ eine IC-50 von 1,4 μM , für $p185^{(BCR/ABL)}$ und Y253F, E255K und für T315I $\geq 8 \mu\text{M}$ (Abbildung3.8). Für Dasatinib ermittelten wir folgende Werte: unmutiertes $p185^{(BCR/ABL)}$ 6nM, $p185^{(BCR/ABL)}$ Y253F 14nM, E255K und für T315I ≥ 16 nM (Abbildung3.9).

IC-50 Konzentration von Imatinib

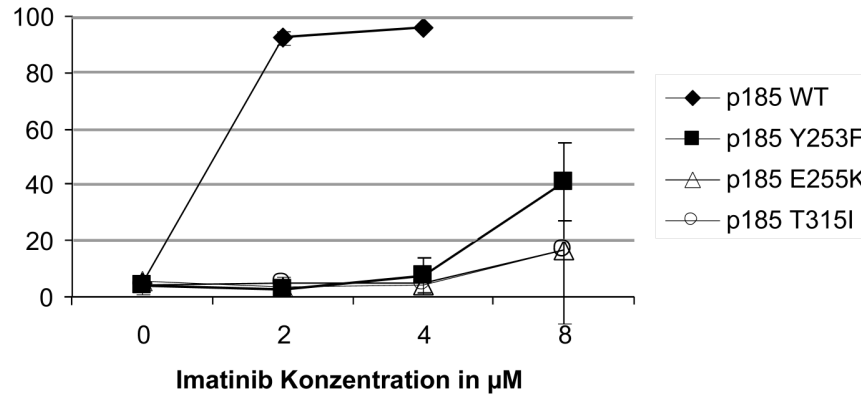


Abbildung 3.8: IC-50 Konzentrationbestimmung von Imatinib mittels 7AAD Messung

$\Delta L N G F R$ als Reporter gen und WT p185^(BCR/ABL) oder p185^(BCR/ABL) Mutationen wurden retroviral in Ba/F3 Zellen expremiert und durch einen IL3-Entzug über 7 Tage selektioniert. Die 100%ige Expression wurde mittels FACS-Messung durch eine $\Delta L N G F R$ -Rezeptorfärbung überprüft. Danach wurden je 100.000 Zellen/ml in einer Konzentrationsreihe mit Imatinib (0-4 µM) ausplattiert. Nach 72h wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt. 7AAD gelangt durch die Membran apoptotischer Zellen. Somit können apoptotischen Zellen angefärbt und mittels einer FACS-Messung deren prozentualer Anteil gemessen werden. Durch anschließender graphischer Auswertung kann die IC-50 ermittelt werden.

IC-50 Konzentration von Dasatinib

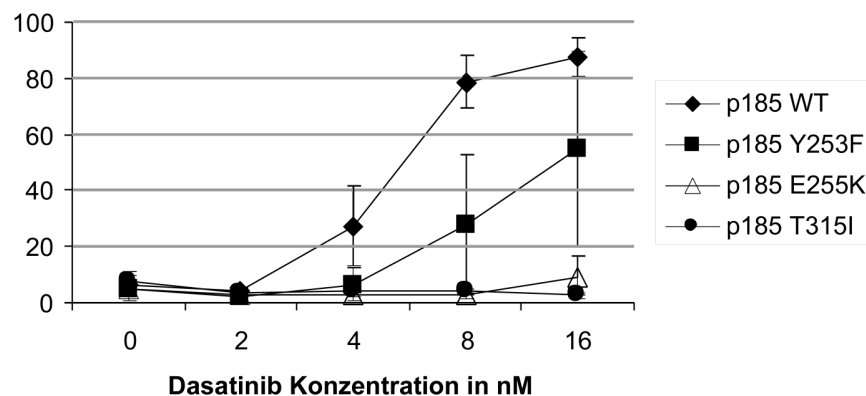


Abbildung 3.9: IC-50 Konzentrationbestimmung von Dasatinib mittels 7AAD Messung

$\Delta LNGFR$ als Reporter gen und WT p185^(BCR/ABL) oder p185^(BCR/ABL) Mutationen wurden retroviral in Ba/F3 Zellen expremiert und durch einen IL3-Entzug über 7 Tage selektioniert. Die 100%ige Expression wurde mittels FACS-Messung durch eine $\Delta LNGFR$ -Rezeptorfärbung überprüft. Danach wurden je 100.000 Zellen/ml in einer Konzentrationsreihe mit Dasatinib (0-8 nM) ausplattiert. Nach 72h wurden die Zellen mit 7AAD gefärbt. 7AAD gelangt durch die Membran apoptotischer Zellen. Somit können apoptotische Zellen angefärbt und mittels einer FACS-Messung deren prozentualer Anteil gemessen werden. Durch anschließender graphischer Auswertung kann die IC-50 ermittelt werden.

Diese Ergebnisse bildeten in den folgenden Versuchen die Grundlage der verwendeten Konzentrationen der Kinaseinhibitoren, deren Konzentration anhand dieser Werte so gewählt wurde, dass sie im subapoptotischen Bereich lag.

3.5.2.2 Nachweis der Hemmung des faktorunabhängigen Wachstums mittels des Proliferation Competition Assays

Als nächstes wurden diese Zellen mit dem Reporter gen GFP oder Helix-2-GFP infiziert. Die GFP- bzw. Helix-2-GFP-Expression diene als Reporter gen für die Expression, wobei eine Hemmung der Proliferation auch mit einer Abnahme der GFP-Expression korrelierte (Abbildung 3.7). Die GFP-Expression wurde in den nächsten 8 Tagen mittels FACS-Messung verfolgt. Die Expression am Tag 4 diene als Referenz um unterschiedliche Infektionseffizienzen auszugleichen. Am Tag 4 wurde einem Teil der Zellen eine subapoptotische Imatinibkonzentration (0.4 μ M für WT-p185^(BCR/ABL), 3 μ M für Mutationen p185^(BCR/ABL);) bzw. Dasatinib-Konzentrationen (4nM), ausgesetzt.

Wie in Abbildung 3.10 gezeigt wird die Proliferation von unmutiertem p185^(BCR/ABL), die nur GFP coexprimieren nicht beeinflusst. Die eingebrachten Helix-2 Peptide führen bei diesen Zellen allerdings zu einer Hemmung der Proliferation, was sich durch eine Abnahme der GFP Expression zeigt. Ebenso verhält es sich bei den Mutationen Y253F und E255K. Die Proliferation der Mutation T315I dagegen lässt sich durch die Anwesenheit der Helix-2 Peptide nicht beeinflussen.

Die Anwesenheit von Imatinib verstärkt, mit Ausnahme der T315I Mutation, die Inhibierung der Proliferation (Abbildung 3.10) .

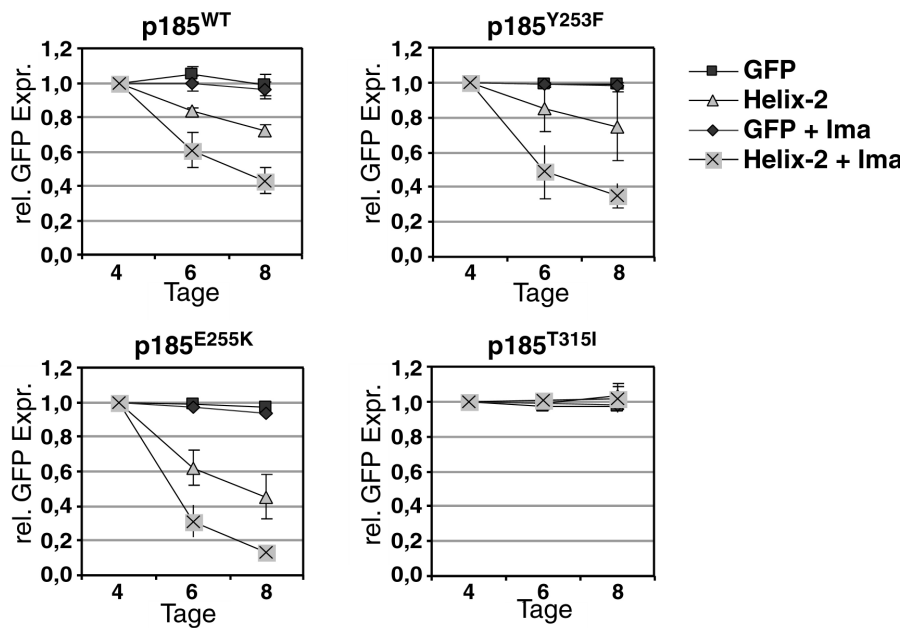


Abbildung 3.10: Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen

Für das Proliferation Competition Assay wurden IL3 unabhängige Ba/F3 Zellen, die mit p185^(BCR/ABL) WT oder deren Mutationen infiziert wurden, mit GFP oder Helix-2-GFP infiziert. Die Zellen wurden am 4.Tag nach der Co-Infektion in An- oder Abwesenheit einer sub-apoptischen-Konzentration von Imatinib (Ima) ausplattiert (0.4 μ M für WT und 3 μ M für p185^(BCR/ABL) Mutationen). Der prozentuale Anteil der GFP positiven Zellen wurde mit einer FACS-Analyse in den folgenden 10 Tagen gemessen, auf Tag 4 normalisiert und anschließend graphisch interpoliert.

Ebenso zeigt Dasatinib einen geringen Einfluss auf die Inhibierung (Abbildung 3.11).

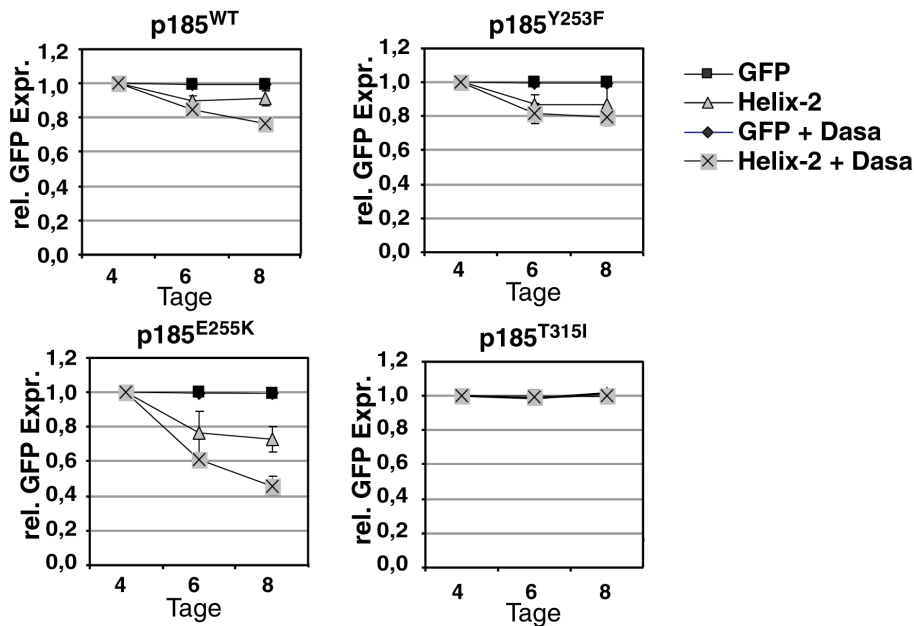


Abbildung 3.11: Effekt der Helix-2 auf die Proliferation von Imatinib resistenten p185^(BCR/ABL) Mutationen

Für das Proliferation Competition Assay wurden IL3 unabhängige Ba/F3 Zellen, die mit p185^(BCR/ABL) WT oder deren Mutationen infiziert wurden, mit GFP oder Helix-2-GFP infiziert. Die Zellen wurden am 4.Tag nach der Co-Infektion in An- oder Abwesenheit einer sub-apoptotischen Konzentration von Dasatinib (Dasa) ausplattiert (für WT und für p185^(BCR/ABL) Mutationen). Der prozentuale Anteil der GFP positiven Zellen wurde mit einer FACS-Analyse in den folgenden 10 Tage gemessen, auf Tag 4 normalisiert und anschließend graphisch interpoliert.

Diese Daten zeigen, dass die Helix-2-Peptide in der Lage sind die Proliferation von p185^(BCR/ABL)-E255K und p185^(BCR/ABL)-Y253F, aber nicht p185^(BCR/ABL)-T315I zu inhibieren, und mit Ausnahme von p185^(BCR/ABL)-T315I, die Sensitivität der Mutationen gegenüber Imatinib zu erhöhen. Die Anwesenheit von Dasatinib zeigte ebenso einen geringen, verstärkenden Einfluss auf die Inhibierung.

Zusammenfassend zeigten wir im ersten Teil dieser Arbeit, dass die Co-Expression der Helix-2-Peptide bei p185^(BCR/ABL) Mutationen in der Lage ist durch Auflösen der Tetramere die Sensitivität gegenüber Imatinib zu steigern und wie erwartet nicht gegenüber Dasatinib. Die Ausnahme stellt die Mutation T315I dar. Ebenso ist es der Helix-2 möglich das Transformationspotential, die Proliferation, von unmutiertem p185^(BCR/ABL)

und den Mutationen p185^(BCR/ABL)-Y253F und p185^(BCR/ABL)-E255K zu inhibieren, nicht jedoch bei der Mutation p185^(BCR/ABL)-T315I.

3.6 Biologie der Coiled-Coil-Deletionsmutanten von p185^(BCR/ABL)

Das unterschiedliche Verhalten der p185^(BCR/ABL) Mutation T315I bei Co-Expression der Helix-2 veranlasste uns die Biologie der Coiled-Coil-Deletionsmutanten von p185^(BCR/ABL) Mutationen Y253F, E255K und T315I genauer zu untersuchen.

Deletionsmutanten von BCR/ABL, denen die CC-Region (Δ CC) fehlt, weisen eine erniedrigte TK Aktivität auf, da Δ CC-BCR/ABL nicht zur Tetramerisation in der Lage ist. Dies zeigt sich in einer geminderten Autophosphorylierung von BCR/ABL (Beissert et al. 2003). Im Gegensatz zu BCR/ABL ist Δ CC-BCR/ABL nicht in der Lage Fibroblasten zu transformieren. Die Fähigkeit Faktor-unabhängiges Wachstum der hämatopoetischen Zelllinie zu vermitteln ist bei Δ CC-BCR/ABL WT gering (Beissert et al. 2003, He et al. 2002, Zhang et al. 2001) und sehr sensitiv gegenüber Imatinib (Beissert et al. 2003).

3.6.1 Faktorunabhängiges Wachstum von p185^(BCR/ABL)

Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Progenitorzellen

Um zu untersuchen, wie es sich mit dem Faktor-unabhängigen Wachstum von p185^(BCR/ABL) Mutationen nach der Deletion der Coiled-Coil-Domäne verhält, wurden Ba/F3- und 32D-WT Zellen mit einem Leervektor als Negativkontrolle, mit unmutiertem p185 als Positivkontrolle, mit unmutiertem Δ CC p185 und mit den Mutationen Δ CC-p185-Y253F, Δ CC-p185-E255K und Δ CC-p185-T315I infiziert. Die BCR/ABL positiven Zellen wurden danach durch einen IL3 Entzug selektiert und 100.000 Zellen/ml in IL3 freiem Medium ausplattiert. Daraufhin wurden die Zellen über 5 Tage ausgezählt und Wachstumskurven erstellt (Abbildung 3.12).

Wie schon zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt ist die Fähigkeit Faktor-unabhängiges Wachstum zu vermitteln in den Zellen, die die Deletionsmutante von unmutiertem p185^(BCR/ABL) erhalten, sehr gering. Genauso verhält es sich mit der p185^(BCR/ABL)

Mutation E255K. Die Proliferation der Mutationen Y253F und T315I wurde trotz der Deletion der Coiled-Coil-Domäne nicht unterbunden und ist mit der Proliferation der Positivkontrolle, nämlich unmutiertem p185^(BCR/ABL) vergleichbar. Trotz Aufhebung der Tetramerisierung durch Deletion der Coiled-Coil Domäne war es diesen Mutationen möglich in IL3 freien Medium zu proliferieren.

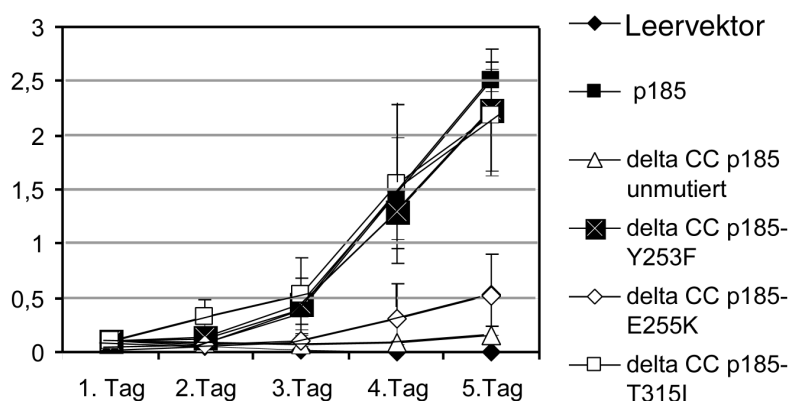


Abbildung 3.12: Effekt der fehlenden Coiled-Coil (Δ CC) Domäne auf die Proliferation von Ba/F3 und 32D

Ba/F3 bzw. 32D Zellen wurden mit den Deletionsmutanten infiziert und anschließend in IL3 freiem Medium ausplattiert. Die Zellen wurden über 5 Tage ausgezählt und graphisch interpoliert. Beispielhaft ist hier die Wachstumskurve der Ba/F3 Zellen aus 3 verschiedenen Versuchen dargestellt.

3.6.2 Aufhebung der Kontaktinhibition in p185^(BCR/ABL)

Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Fibroblasten

Neben der Vermittlung von Faktor-unabhängigen Wachstum der hämatopoetischen Zelllinie spricht auch die Aufhebung der Kontaktinhibition von Fibroblasten für oncogene Aktivität. Wir infizierten Rat-1-Zellen mit einem Leervektor als Negativkontrolle mit unmutiertem p185^(BCR/ABL) als Positivkontrolle, mit unmutiertem Δ CC-p185 und mit den Mutationen Δ CC-p185- Y253F, Δ – CC p185- E255K und Δ CC -p185- T315I. 40.000 Zellen/Well wurden in einer 24-Well Platte als Triplikate für ein Focus Forma-

tion Assay ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett angefärbt.

Eine Kontaktinhibition zeigt sich bei dem Leervektor und dem unmutiertem ΔCC p185 (Abbildung 3.13).

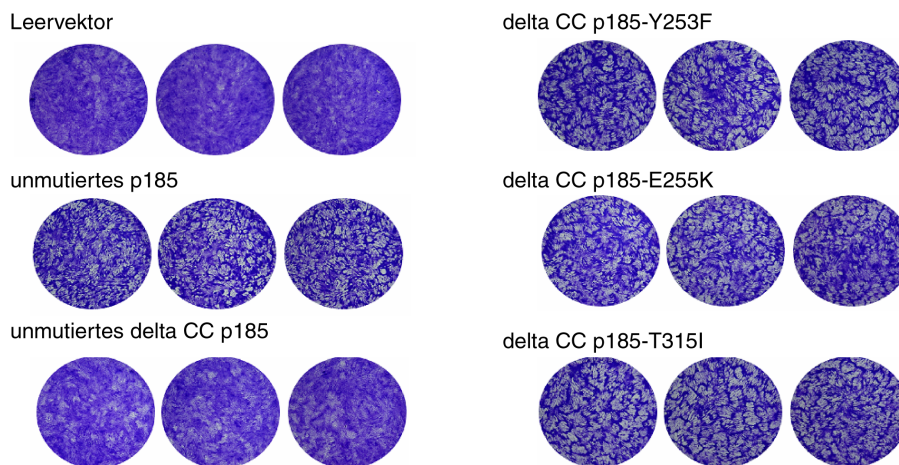


Abbildung 3.13: Effekt der fehlenden Coiled-Coil (ΔCC) Domäne auf die Kontaktinhibition von Fibroblasten

Rat-1 Zellen wurden mit den Deletionsmutanten infiziert und anschließend als Tripletts zu 40.000 Zellen/Well ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und fotografiert. Der Leervektor dient als Negativkontrolle.

Bei unmutierten p185 positiven Zellen zeigt sich, eine Aufhebung der Kontaktinhibition. Dies erkennt man daran, dass sich die Fibroblasten einander überwachsen (Abbildung 3.13). Diese Aufhebung der Kontaktinhibition zeigt sich ebenfalls bei den Deletionsmutanten der BCR/ABL-Mutationen.

Das Transformationspotential der BCR/ABL Mutationen bleibt im Gegensatz zu p185 WT nach Deletion der Coiled Coil Domäne erhalten.

3.6.3 Induktion von Support unabhängigem Wachstum von p185^(BCR/ABL) Mutationen nach Deletion der Coiled-Coil-Domäne in Fibroblasten

Die Induktion von Support-unabhängigem Wachstum in Fibroblasten ist eine weitere Eigenschaft, die für oncogene Aktivität sprechen. Um zu untersuchen, ob es auch hier den

Deletionsmutanten möglich ist Zellen zu transformieren, wurde ein Soft-Agar-Colony-Assay ausplattiert. Dazu wurden Rat-1 Zellen mit einem Leervektor als Negativkontrolle, mit unmutiertem p185 als Positivkontrolle, mit unmutiertem ΔCC -p185-WT und den Mutationen ΔCC -p185- Y253F, ΔCC -p185- E255K und ΔCC -p185- T315I infiziert und 7.500 Zellen/ml in einem Soft-Agar als Triplikate ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die Colonies ausgezählt und bezogen auf ihre Infektionseffizienz normalisiert (Abbildung 3.14).

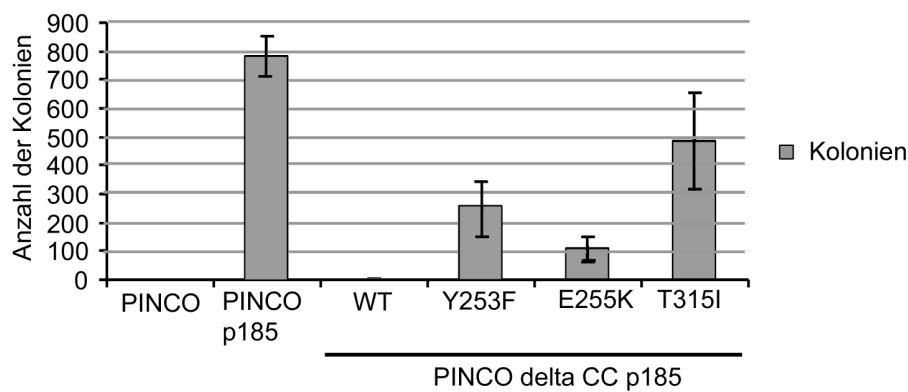


Abbildung 3.14: Effekt der fehlenden Coiled-Coil (CC) Domäne auf das adhäsionsabhängige Wachstum der Fibroblasten

Rat-1 Zellen wurden mit den Deletionsmutanten infiziert und anschließend als Triplet zu 7.500 Zellen/Well ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Foci gezählt und das Ergebnis graphisch dargestellt. Der Leervektor dient als Negativkontrolle.

4 Diskussion

Sowohl diese erzielten Ergebnisse, als auch diverse andere wissenschaftliche Veröffentlichungen, zeigen, dass die Tetramerisierung und die Bildung von HMG-Komplexen eine wichtige Rolle bei der Entfaltung des leukämogenen Potentials von BCR/ABL spielen und dessen Inhibierung zur Steigerung der Sensitivität gegenüber den Kinaseinhibitor Imatinib führt (Beissert et al. 2003, Mc Whirter et al. 1993, He et al. 2002, Zhang et al. 2001).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Unterbrechung der Tetramere als therapeutische Möglichkeit zu etablieren und neue Wege aufzuzeigen um die Resistenz gegenüber Imatinib bei BCR/ABL Mutationen zu überwinden. Die Reduzierung der Größe des inhibierenden Peptides wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe bewerkstelligt. Dabei wurde gezeigt, dass die relevante Interaktion durch eine 39 Aminosäure große Sequenz, die auf der N-terminalen BCR Coiled-Coil (CC) Struktur lokalisiert ist, der so genannten Helix-2, vermittelt wird. Bezüglich der verminderten Autophosphorylierung von p185^(BCR/ABL) und der Inhibierung der Proliferation von Ba/F3 Zellen, vermittelt die Helix-2 ähnliches inhibitorisches Potential wie das Peptid, welches die gesamte CC-Domäne repräsentiert, wobei in BV173 und SupB15 Zellen der inhibitorische Effekt der Helix-2 stärker war als der der CC.

Wie zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde bindet die Helix-2 an p185^(BCR/ABL) mit der gleichen Stärke wie die komplette Coiled-Coil Domäne, was zur Unterbrechung der HMG-Komplexe von p185^(BCR/ABL) führt.

Diese Tatsache veranlasste uns die Effektivität der Inhibierung der Oligomerisierung durch ein kleines Peptid weitergehend im Zusammenhang mit BCR/ABL Mutationen zu untersuchen. Dieses Peptid könnte in der Zukunft nützlich für die Behandlung Ph+ Leukämien sein oder ein Anhaltspunkt für die Entwicklung noch kleinerer Moleküle zur Unterbrechung der Tetramere von BCR/ABL darstellen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde außerdem gezeigt, dass die therapeutische Relevanz eines solchen Ansatzes dahingehend gegeben ist, da die Helix-2 nicht nur in der Lage

ist die Funktion von p185^(BCR/ABL) in einem artifiziellen Zellmodell wie Ba/F3 Zellen, die retroviral transduziert wurden und anschließend durch einen IL3 Entzug selektioniert wurden, zu inhibieren, sondern diese Inhibierung auch in Patienten abgeleiteten lymphatischen Ph+ Zelllinien, SupB15 und BV173 funktioniert.

In dieser Arbeit ging es um die Untersuchung der Effektivität der Helix-2 bei p185^(BCR/ABL) Mutationen bezogen auf deren Resistenz gegenüber Imatinib verglichen mit dem Kinaseinhibitor Dasatinib, sowie der Vermittlung eines besseren Verständnisses für den Effekt der Peptide auf HMG-Komplexformationen. Des Weiteren wurde die besondere Rolle der p185^(BCR/ABL)-T315I Mutation näher untersucht. Die Bedeutung der Punktmutationen nimmt in der Klinik einen immer größeren Stellenwert ein, da sie Grund für die auftretenden Imatinibresistenzen sind (Hochhaus et al., 2002; Hochhaus und La Rosée, 2004; Müller et al. 2003). Um abzuschätzen ob es möglich ist durch Inhibierung der Tetramerisation durch Helix-2 -Peptide die Imatinib-Resistenz zu überwinden, untersuchten wir die Effekte der Helix-2 auf drei klinisch relevante Mutationen, die mitverantwortlich sind für Imatinibresistenzen - zwei P-loop Mutationen, Y253H und E255K, und die T315I Mutation.

Bei genauerer Untersuchung der HMG-Komplexbildung, die Spiegelbild der gebildeten BCR/ABL Oligomere in p185^(BCR/ABL) positiven Zellen ist, der BCR/ABL Mutationen Y253F und E255K verglichen mit unmutiertem BCR/ABL (WT), zeigte sich bei Expression der Helix-2 das gleiche Bild:

Die Co-Expression der Helix-2 führte zu einer Verschiebung der HMG-Komplexe zu einem niedrigeren Molekulargewicht als bei den Zellen, die die Helix-2 nicht exprimierten, was für eine Unterbrechung der Tetramere spricht. Der Peak befindet sich bei den oben genannten Mutationen wie bei dem WT zwischen 440 und 670 kDa, wobei auch Banden mit höherem MG vorliegen, was dafür spricht, dass nicht alle Tetramere als Monomere vorliegen, sondern ebenso ein Teil als tetramere Form oder dimere Form erhalten bleibt. Das Vorhandensein von Banden in den Fraktionen, die höheren MG entsprechen, von unmutiertem p185^(BCR/ABL), p185^(BCR/ABL)-Y253F oder p185^(BCR/ABL)-E255K in Gegenwart der Helix-2, kann durch einen stoichiometrischen Shift zu Gunsten von p185^(BCR/ABL) Fusionsproteinen in Gegenwart der Helix-2 durch eine Selektion von Zellen mit hoher transgener Expression im Vergleich zu GFP positiven Zellen zugerechnet werden.

Die Mutation T315I dagegen zeigt ein anderes Bild. Zwar wird auch hier das Bild durch die Helix-2-Peptide verändert, aber im Gegensatz zu unmutiertem BCR/ABL und den

Mutationen Y253F und E255K, wird die Fraktion mit einem MG von 1070 kDa nicht beeinflusst. Zudem zeigt sich ein Shift der Banden in einen Molekularbereich kleiner 440 kDa. Das Vorhandenbleiben der Bande im 1070 kDa Bereich spricht nicht für eine Unterbrechung der Tetramere und somit nicht für eine effiziente Wirkung der Helix-2 auf diese BCR/ABL Mutation. Das veränderte Bild der Banden, verglichen mit dem Bandenbild der Mutation T315I, die die Helix-2 nicht zusätzlich exprimierten, könnte aber dennoch für eine uns noch unbekannte Interaktion der Helix-2 mit der Mutation T315I sprechen.

Das Fehlen der Interaktion zwischen Helix-2 und p185^(BCR/ABL)-T315I als ein Grund für die Resistenz gegenüber der Helix-2 wurde durch unsere Co-Immunoprecipitation Experimente ausgeschlossen.

Daher kann spekuliert werden, dass p185^(BCR/ABL)-T315I bei Anwesenheit der Helix-2 eine Teilmenge von Helix-2 resistenten Komplexen bildet.

Nachdem wir gezeigt haben, dass die Helix-2 bei unmutiertem p185^(BCR/ABL), p185^(BCR/ABL)-E255K und p185^(BCR/ABL)-Y253F in der Lage ist die Oligomerisierung zu unterbinden, stellt sich die Frage nach der Autophosphorylierung dieser Mutationen sowie der Mutation T315I bei Anwesenheit der Helix-2. Gezeigt werden konnte, dass die Autophosphorylierung bei allen 3 Mutationen bei Anwesenheit der Helix-2 an 2 ausgewählten Tyrosinresten (Y245 und Y412) inhibiert werden kann. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Helix-2 die Autophosphorylierung von p185^(BCR/ABL) inhibiert, unabhängig von dessen Mutationsstatus.

Die Tatsache, dass ebenso die Autophosphorylierung der Mutation T315I durch die Helix-2 inhibiert werden kann stimmt mit der Erkenntnis überein, dass das Transformationspotential, in diesem Fall die Fähigkeit zur Autophosphorylierung, von p210^(BCR/ABL)-T315I unabhängig von dessen intrinsischen Kinaseaktivität ist. Eine andere Mutation mit reduzierter Kinaseaktivität ist die P-loop Mutation p210^(BCR/ABL)-E255K (Griswold et al. 2006). Die Sensitivität der Mutation E255K gegenüber des inhibitorischen Effektes der Helix-2 lässt vermuten, dass seine Funktionsweise abhängig ist von der Kapazität der Tetramerisierung.

Die anti-ABL Detektion zeigt, dass im Gegensatz zu GFP die Anwesenheit der Helix-2 zu einer Selektion von Zellen führt, die hochexpmierend für unmutiertes p185^(BCR/ABL), p185^(BCR/ABL)-Y253F und p185^(BCR/ABL)-E255K, aber nicht p185^(BCR/ABL)-T315I sind. Dies spricht für eine effiziente Inhibition von Y253F und von E255K Mutationen und einer immanenten Resistenz von p185^(BCR/ABL)-T315I. Diese hochexpmierenden Zellen

wurden durch den zuverigen IL3 Entzug selektioniert. Dies zeigt, dass nur Zellen, die eine hohe Expression von BCR/ABL aufweisen, in der Lage sind bei Anwesenheit der Helix-2 zu überleben, mit Ausnahme der Mutation T315I. Imatinib bindet selektiv die inaktive ABL Kinasekonformation und stabilisiert diese (Schindler et al., 2000), während SRC-Kinaseinhibitoren wie Dasatinib sowohl an der aktiven SRC, als auch an der strukturell ähnlichen, aktiven ABL-Kinase bindet (O'Hare et al. 2005). Um das Verhalten von p185^(BCR/ABL) Mutationen gegenüber den zwei Kinaseinhibitoren Imatinib und Dasatinib bei Anwesenheit von Helix-2 Peptiden vergleichend zu untersuchen, wurde die IC-50, die Konzentration, bei der 50% der Zellen apoptotisch bzw. lebend sind, für diese zwei Inhibitoren bei Co-Expression von GFP bzw. Helix-2-GFP mittels eines XTT-Assays bestimmt.

Bei Anwesenheit des Kinaseinhibitors Imatinib zeigt sich bei den Zellen, die die Helix-2-Peptide exprimierten, eine Steigerung der Sensitivität gegenüber Imatinib, was sich in einer Reduktion der IC-50 Konzentration zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Mutation T315I keine Verstärkung des Effektes in Form einer Senkung der IC-50. Vergleichend zu Imatinib findet sich bei den Helix-2-GFP exprimierenden Zellen in Anwesenheit von Dasatinib keine Senkung der IC-50.

Diese Daten zeigen, dass die Helix-2 Peptide in der Lage sind die Sensitivität gegenüber Imatinib zu steigern. Dies lässt sich so erklären, dass Imatinib an die inaktive ABL-Kinase bindet und diese stabilisiert. Da bei Einbringen der Helix-2 in die BCR/ABL positiven Zellen das Gleichgewicht der als Tetramere vorliegenden und somit aktiven Kinaseformen, hin zu monomeren und dimeren Formen, und somit inaktiven Formen verschoben wird, liegt dem Kinaseinhibitor Imatinib eine größere Menge an inaktiven ABL-Tyrosinkinase vor. Sogar bei den Imatinib resistenten Mutationen Y253F und E255K ist es möglich durch Einbringen der Helix-2 deren Resistenz zu überwinden und eine Konzentrationssenkung von Imatinib zu erreichen.

Die Ausnahme bildet die Mutation T315I. Ihre Resistenz lässt sich auch durch Einbringen der Helix-2 nicht überwinden, was auch mit den Daten übereinstimmt, dass die Helix-2 bei dieser Mutation nicht in der Lage ist das Gleichgewicht zwischen tetrameren BCR/ABL und monomeren BCR/ABL zu verschieben (siehe HMG-Komplexe).

Die Tatsache, dass das Einbringen der Helix-2 nicht zu einer Sensitivitätssteigerung gegenüber Dasatinib führt, entspricht auch der bekannten Literatur, wonach Dasatinib sowohl an die aktive SRC, als auch an die strukturell ähnliche aktive ABL-Kinase bindet (O'Hare et al. 2005). Somit ist auch leicht zu erklären, dass die Verschiebung des

Gleichgewichtes hin zu den inaktiven Formen der ABL-Kinase keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Dasatinib hat, da dieses nur an die aktive ABL-Kinase bindet. Um die Biologie der BCR/ABL Mutationen bei Anwesenheit der Helix-2 zu untersuchen wurden zum einen Wachstumskurven erstellt, zum anderen ein Proliferation Competition Assay ausplattiert um das Proliferationsverhalten der BCR/ABL Mutationen bei gleichzeitiger Expression der Helix-2 bei Behandlung der Zellen mit Imatinib bzw. Dasatinib zu untersuchen.

In beiden Experimenten ging es darum die Proliferation der Zellen zu untersuchen. Bei der Erstellung der Wachstumskurven ohne Zugabe eines Inhibitors, zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Expression der Helix-2 die Proliferation von unmutiertem p185^(BCR/ABL) und p185^(BCR/ABL)-E255K im Vergleich zu dem Proliferationsverhalten der Zellen, die nur GFP exprimierten, vermindert ist. Bei den Mutationen p185^(BCR/ABL)-Y253F und p185^(BCR/ABL)-T315I dagegen zeigt sich keine Inhibierung bzw. Verminderung der Proliferation.

Bei BCR/ABL WT und dessen Mutation E255K zeigt sich durch die Hemmung der Tetramerisierung und somit Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität eine Hemmung der Proliferation im IL3 freiem Medium. Die Vermittlung von IL3 unabhängigem Wachstum ist ein Zeichen für das Transformationspotential onkogener Zellen welches in p185^(BCR/ABL) positiven Zellen durch die Tyrosinkinase vermittelt wird. Das Einbringen der Helix-2 verhindert hier dieses.

Bei der Mutation Y253F ist trotz des Nachweises der Unterbrechung der HMG-Komplexe und Inhibierung der Autophosphorylierung durch die Helix-2 keine Inhibierung der Proliferation zu erkennen. Dies führt zu der Vermutung, dass die noch verbleibende Tyrosinkinaseaktivität ausreicht IL3 unabhängiges Wachstum zu vermitteln. Die Ausbleibende Hemmung der Proliferation bei der Mutation T315I passt ebenso in das Bild der anderen schon erwähnten Ergebnisse. Entweder besteht eine Resistenz gegenüber der Helix-2, was die Unterbrechung der Oligomerisierung betrifft, oder das Transformationspotential wird unabhängig von dessen Tyrosinkinaseaktivität vermittelt.

Um das Proliferationsverhalten der BCR/ABL Mutationen weitergehend zu untersuchen, bei gleichzeitiger Expression der Helix-2 und Zugabe der Tyrosinkinsainhibitoren Imatinib bzw. Dasatinib, erstellten wir ein Proliferation Competition Assay. Bei Helix-2 co-exprimierenden Zellen und der Zugabe von Imatinib zeigte sich eine Zunahme der Sensitivität gegenüber dem TK-Inhibitor bei unmutiertem p185^(BCR/ABL), p185^(BCR/ABL)-Y253F und p185^(BCR/ABL)-E255K. Die Resistenz gegenüber Imatinib lies

sich bei der Mutation T315I nicht überwinden.

Trotz der fehlenden Proliferationshemmung bei Helix-2 exprimierenden Y253F Mutationen ohne Zugabe eines Inhibitors, ist es möglich bei Zugabe von Imatinib die Proliferation im Vergleich zu nur GFP exprimierenden Y253F Mutationen zu verringern und somit auch hier die Sensitivität zu steigern. Dies lässt sich so erklären, dass durch die Zugabe eines Kinaseinhibitors nun auch die Restfunktion der Tyrosinkinase so inhibiert wird, da das Gleichgewicht hin zu den inaktiven Tyrosinkinase-Formen durch Imatinib weiter verschoben und inhibiert wird, dass nun auch hier die Restfunktion der TK nicht mehr ausreicht um IL3 unabhängige Proliferation zu fördern.

Bei unmutiertem BCR/ABL und der Mutation E255K verhält es sich wie aus den vorherigen Versuchen abgeleitet wie erwartet.

Ausnahme bildet auch hier wieder die Mutation T315I. Bei ihr ist es auch trotz Zugabe eines Inhibitors, wie am Beispiel der Mutation Y253F, nicht möglich die Proliferation zu hemmen, was die Vermutung unterstützt, dass das Transformationspotential unabhängig der Tyrosinkinaseaktivität vermittelt wird.

Wie zu erwarten zeigt auch hier die Expression der Helix-2 keine Sensitivitätssteigerung gegenüber Dasatinib.

Wir haben hier erstmals gezeigt, dass p185^(BCR/ABL) Mutationen empfindlich sind bezüglich der Inhibierung der Oligomerisierung durch die Helix-2-Peptide. Dies ist von klinischer Relevanz, da es beweist, dass die Unterbrechung der Tetramerisierung einen neuen therapeutischen Weg aufweist um zusammen mit Imatinib noch effizienter zu arbeiten. Somit kann das Auftreten von Mutationen durch geringeren Einsatz von Imatinib-Konzentrationen eventuell verzögert und Imatinibresistenzen überwunden werden.

Die BCR/ABL Mutation T315I verhielt sich dabei als Ausnahme. Die Tatsache, dass sich weder deren HMG-Komplexe, noch die Resistenz gegenüber Imatinib durch die Helix-2 Peptide beeinflussen lässt, lässt vermuten, dass die Mutation T315I unabhängig von ihrer Tyrosinkinaseaktivität Transformationspotential besitzt. Um die Eigenschaften der T315I Mutation und die Vermutung, dass diese Mutation unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität ist, weiter abzuklären, bedienten wir uns einem neuen Modell, nämlich dem der Deletionsmutanten, denen die komplette Oligomerisierungsdomäne, die Coiled-Coil Domäne, fehlt. Dadurch wird erreicht, dass die Monomere nicht in der Lage sind Tetramere zu bilden und somit keine bzw. nur eine geringe Tyrosinkinaseaktivität vorliegt (Beissert et al. 2003). Sollte die Mutation T315I unabhängig von ihrer Tyrosinkinaseaktivität arbeiten, würde diese BCR/ABL Mutation auch als Deletions-

mutante ihr Transformationspotential behalten.

Auch hier bedienen wir uns wieder dem Versuchsmodell der Wachstumskurven um das Proliferationsverhalten der Deletionmutanten zu untersuchen.

Wie zu erwarten war zeigt unmutiertes ΔCC -p185^(BCR/ABL) (p185^(BCR/ABL)-WT) und die dazugehörige Mutation E255K nur eine sehr schwache Proliferation. Bei den Mutationen ΔCC -p185^(BCR/ABL)-Y253F und ΔCC -p185^(BCR/ABL)-T315I zeigt sich trotz der fehlenden Oligomerisierungsdomäne eine Proliferationsrate, die vergleichbar mit der Positivkontrolle p185^(BCR/ABL)-WT ist.

Das bedeutet, dass entweder eine schwache Tyrosinkinaseaktivität ausreicht die Zellen zur Proliferation zu bringen oder die Mutation unabhängig von ihrer Tyrosinkinaseaktivität ist.

Um diese Ergebnisse weiter zu untersuchen bedienen wir uns nun eines anderen Zellmodells, den Fibroblasten.

Mit diesem Zellmodell ist es möglich andere Eigenschaften des Transformationspotentials zu untersuchen.

Hier zeigt sich, dass alle Mutationen trotz Deletion der CC-Domäne in der Lage sind, Transformationspotential in Form einer Aufhebung der Kontaktinhibition zu entwickeln. Unmutiertes ΔCC -p185^(BCR/ABL) verhält sich wie aus der Literatur erwartet und ist nicht in der Lage die Kontaktinhibition aufzuheben. Vermutlich reicht bei diesem Versuchsmodell die restliche Kinaseaktivität der Mutationen aus, dass die Zellen Transformationspotential besitzen.

Um das Support-unabhängige Wachstum zu untersuchen wurde ein Colony-Assay in Softagar ausplattiert. Dadurch ist es möglich durch Auszählung so genannter Foci die Anzahl an gebildeten Colonien zu bestimmen. Die Foci werden im Agar nur gebildet, wenn die Fibroblasten adhäsionsunabhängig wachsen.

Hier zeigt sich zum einen wieder, dass ΔCC -p185^(BCR/ABL)-WT kein Transformationspotential besitzt und somit keine Foci bildet, und zum anderen, dass in diesem Versuchsmodell die Mutationen ΔCC -p185^(BCR/ABL)-Y253F und ΔCC -p185^(BCR/ABL)-E255K nicht in der Lage sind Support-unabhängige Wachstum zu vermitteln und somit in diesem Fall kein Transformationspotential besitzen.

Die Mutation T315I vermittelt auch in diesem Experiment Support-unabhängiges Wachstum. Die unterschiedlichen Ergebnisse des Focus-Formation und Colony-Assays bezüglich des Transformationspotentials kann sich dadurch erklären lassen, dass zur Aufhebung der Kontaktinhibition eine weniger ausgeprägte Kinaseaktivität ausreicht, verglichen

mit der benötigten Aktivität bei der Vermittlung Support-unabhängigem Wachstums. In beiden Versuchen ist es der Mutation p185^(BCR/ABL)-T315I möglich die Zellen zu transformieren, unbeeinflusst von der fehlenden Coiled-Coil Domäne.

5 Zusammenfassung

Das Philadelphia-Chromosom (Ph) ist das zytogenetische Korrelat der Translokation t(9;22). 95% der chronisch myeloischen Leukämien (CML) und 20-25% der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) des Erwachsenen sind Ph-positiv (Ph+). Bei der t(9;22) kommt es zur Fusion des *abl*-locus auf Chromosom 9 und des *bcr*-locus auf Chromosom 22. Dies führt zur Bildung des chimären *bcr/abl* Gens, welches für das BCR/ABL Fusionsprotein kodiert, das für die Pathogenese der Ph+ Leukämien verantwortlich gemacht wird. Das ABL-Protein ist eine nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion und der Regulation des Zellwachstums spielt. Im BCR/ABL-Fusionsprotein wird die Kinase-Aktivität von ABL, die im Normalfall streng reguliert ist, durch die Fusion mit BCR konstitutiv, das heißt andauernd, aktiviert. Dadurch kommt es zur Deregulierung vielfältiger intrazellulärer Signalwege, was die maligne Transformation hämopoetischer Zellen zur Folge hat.

Mit dem spezifischen ABL-Kinaseinhibitor Imatinib steht seit wenigen Jahren ein tumorzellenspezifischer Wirkstoff für die Therapie der Ph+ Leukämien zur Verfügung, der bei der Mehrzahl der Patienten zur hämatologischen Vollremission führt. Insbesondere bei Patienten mit CML-Blastenkrise und Ph+ ALL kommt es durch klonale Expansion Imatinib-resistenter Zellen jedoch zu einem frühen Therapie-refraktären Rezidiv der Krankheit.

Aufgrund der Problematik Imatinib-resistenter Rezidive wurden und werden „Nachfolger“ von Imatinib mit dem Ziel entwickelt, die hohe Spezifität beizubehalten und wesentlich höhere Affinitäten zu erreichen. Derzeit befinden sich vielversprechende Substanzen in klinischen Studien: Nilotinib (Nilotinib, Novartis, Basel) ist ein spezifischer ABL-Kinase Inhibitor der eine ca. 20-mal höhere Affinität gegenüber BCR/ABL hat als Imatinib. Dasatinib (BMS-354825, Bristol-Myers Squibb; New York) hat eine 325-fach höhere Affinität als Imatinib und wurde ursprünglich als Src-Kinase Inhibitor entwickelt. Die sehr hohe Affinität für die ABL-Kinase wurde erst später festgestellt (O'Hare et al., 2005b).

Bei beiden Substanzen konnte eine Wirksamkeit auf die meisten klinisch relevanten Imatinib-resistenten BCR/ABL-Mutationen gezeigt werden (O'Hare et al., 2005b). Die Mutation T315I bildet die wichtigste Ausnahme.

Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für neue, tumorzellspezifische Therapiestrategien für die Behandlung BCR/ABL-positiver Leukämien, sowie deren imatinibresistenten Mutationen zu legen.

Die Oligomerisierung spielt für die Aktivierung von BCR/ABL eine grundlegende Rolle und wird durch die N-terminale BCR-“coiled-coil“ Region vermittelt. In unserer Arbeitsgruppe konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL ein therapeutischer Angriffspunkt für ein kleines Peptid, der Helix-2, für die Behandlung Ph+ Leukämien darstellt. Der Einfluss der Helix-2 auf die Oligomerisierung des BCR/ABL Wildtyps und der damit verbundenen Sensitivitätssteigerung gegenüber Imatinib wurde in unserer Arbeitsgruppe genauestens untersucht und führte zu folgender Fragestellung:

Welchen Einfluss hat die Helix-2 auf BCR/ABL Mutationen? Inwieweit ist es möglich die Imatinibresistenz bestimmter Mutationen durch Helix-2 Peptide zu vermindern oder zu überwinden? Welchen Einfluss hat die Helix-2 auf die Wirkung des Kinaseinhibitors Dasatinib verglichen mit Imatinib? Von den drei ausgewählten Punktmutationen Y253F, E255K und T315I war es bei zweien, nämlich den Mutationen Y253F und E255K, möglich die Imatinibresistenz nach Einbringen der Helix-2 in die Zellen zu überwinden. In Gegenwart von Dasatinib konnte durch die Helix-2 Peptide keine Sensitivitätssteigerung erreicht werden. Dies ist durch das Verschieben des Gleichgewichtes von der aktiven hin zur inaktiven Konformation der ABL-Kinase durch die Helix-2 Peptide und durch die unterschiedlichen Angriffspunkte der zwei Tyrosinkinaseinhibitoren zu erklären. So bindet Dasatinib an der aktiven ABL-Kinase, Imatinib an der inaktiven ABL-Kinase.

Die Mutation T315I warf durch ihre Resistenz gegenüber den Helix-2 Peptiden und ihrer Unabhängigkeit von der Tyrosinkinaseaktivität, eine neue Fragestellung bezüglich ihrer Arbeitsweise auf, welche im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht wurde: Ist die p185^(BCR/ABL)-T315I Mutation unabhängig von ihrer Tyrosinkinaseaktivität?

Um dieser Fragestellung nach zu gehen untersuchten wir das Transformationspotential von unmutiertem p185^(BCR/ABL) Deletionsmutanten, denen die Oligomerisierungsdomäne, die Coiled-Coil Domäne fehlt, und deren dazugehörigen Mutationen Y253F, E255K und T315I, denen ebenfalls die CC Domäne fehlt.

Nach Analyse aller Ergebnisse zeigte sich, dass die Mutation T315I in allen Versuchen

eine Ausnahme darstellte und in allen Zellsystemen trotz fehlender CC-Domäne in der Lage ist die Zellen zu transformieren. Diese Tatsache beweist, dass die Mutation T315I unabhängig von ihrer Tyrosinkinaseaktivität das Potential zur Transformation besitzt. Die weitere Untersuchung dieser Mutation und ihrer Arbeitsweise könnte in Zukunft neue Wege aufweisen um die Aktivität dieser Mutation anzugreifen und therapeutisch gegen sie vorzugehen.

6 Abstract

The Philadelphia chromosome (Ph) is the cytogenetic correlate of the translocation t (9; 22). 95% of chronic myeloid leukemia (CML) and 20-25% of acute lymphoblastic leukemia (ALL) of adults are Ph-positive (Ph +). The t (9; 22) leads to the fusion of the abl locus on chromosome 9 and the bcr locus on Chromosome 22. The resulting formation of the chimeric bcr/abl gene, which is translated to the BCR/ABL fusion protein, is responsible for the pathogenesis of Ph+ leukemia. The ABL protein is a non-receptor tyrosine kinase that plays an important role in signal transduction and the regulation of cell growth. As a result of the fusion with BCR, the ABL-kinase activity, which is normally closely regulated, is constitutively (i. e. permanently) activated. Thereby BCR/ABL deregulates a variety of intracellular signaling pathways and results in the malignant transformation of hematopoietic cells.

The ABL kinase inhibitor Imatinib is a tumor cell-specific drug for the treatment of Ph+ leukemias that is available for more than a decade. It leads in the majority of patients to hematologic remission. However, especially in patients with CML blast crisis and Ph+ ALL the clonal expansion of Imatinib-resistant cells leads to an early relapse of the disease which is refractory to a further treatment with Imatinib. The most frequent reason for Imatinib resistance are point mutations within the ABL-kinase that interfere with the binding of Imatinib. In order to treat Imatinib-resistant leukemia improved ABL-kinase inhibitors were developed. The subsequent detection of BCR/ABL point mutants that conferred resistance to these second generation inhibitors revealed that alternative therapeutic approaches might be required to fully overcome kinase-inhibitor resistance. Due the problems of Imatinib-resistant relapses successors of Imatinib were and will be developed with the aim to maintain the high specificity and to achieve significantly higher affinity. Presently promising substances are in clinical studies. Nilotinib (Nilotinib, Novartis, Basel) is a specific ABL-Kinase inhibitor which shows an affinity twenty times higher against BCR-ABL. Dasatinib (BMS-354825, Bristol-Myers Squibb; New York) shows an affinity 325 times higher than Imatinib was originally developed

as Src-Kinase inhibitor. The very high affinity for the ABL-Kinase was detected later (O'Hare et al., 2005b). For both substances an effectivity to the most clinical related Imatinib resistance ABR/ABL mutations could be demonstrated (O'Hare et al., 2005b). The mutation T315I is an important exception.

Oligomerization plays a fundamental role for the activation of BCR/ABL. It is mediated by the N-terminal coiled-coil (CC) region of the BCR-part. Our group has shown before that the oligomerization domain of BCR/ABL represents a putative target for therapeutic intervention:

Peptides derived from the CC domain - representing either the complete CC domain or a substructure, the so called helix-2, interfered with the oligomerization of unmutated BCR/ABL and increased the sensitivity of BCR/ABL dependent cells towards Imatinib.

The aim of this study was to provide a prove of concept that targeting the oligomerization domain of BCR/ABL represents a tumor cell specific therapeutic strategy for the treatment of Imatinib-resistant BCR/ABL-positive leukemia. Thus we selected three frequent Imatinib-resistant BCR/ABL point-mutants conferring different degrees of Imatinib resistance - Y253F, E255K and T315I - and addressed the question wether a peptide inhibiting unmutated BCR/ABL interferes with the oligomerization, the oncogenic potential and the Imatinib-resistance of mutant BCR/ABL and what influence has the helix-2 on the effectiveness of the kinase inhibitor Dasatinib compared to Imatinib. We found that the coexpression of helix-2 derived peptides interfered with the oligomerization and autophosphorylation of all three selected mutants, while the Imatinib-resistance of only two of the mutants was reduced, namely Y253F and E255K.

In presence of Dasatinib no increase of sensitivity could be achieved by helix-2 peptides. This can be explained by the shift of the equilibrium from the active to the inactive conformation of the ABL kinase by the different points of attack of the two tyrosinkinase-inhibitors. Thus, Dasatinib attaches to the active ABL kinase, Imatinib to the inactive ABL kinase.

The finding that the biological activity of T315I proved to be unaffected by the presence of oligomerization-inhibiting peptides raised the question wether the oncogenic potential of T315I is independent from oligomerization induced kinase activation.

To elucidate this issue, we examined the transformation potential of coiled-coil deletion mutants of BCR/ABL, carrying the mutations Y253F, E255K and T315I within the ABL-kinase domain. We found that the T315I mutation is able to transform cells

despite the lack of the CC-domain. This fact indicates that the T315I mutation has a transformation potential regardless of its tyrosine kinase activity.

Taken together the results of this study show that the targeting of BCR/ABL oligomerization overcomes Imatinib-resistance of point-mutated BCR/ABL, with the exception of T315I. The mutation T315I requires further investigation in order to understand the mechanism of resistance and to develop new approaches for a targeted therapy of patients harbouring this mutation.

7 Literatur

A

B

Begemann, M., *Praktische Hämatologie. Diagnose, Therapie, Methodik*. 11. Auflage ed. 1998, Stuttgart: Thieme Verlag.

Beissert T, Puccetti E, Bianchini A, et al. *Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface of BCR interferes with the transformation potential of BCR-ABL and increases sensitivity to STI571*. *Blood*. 2003;102:2985-2993.

Bennet, J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel et al. *Proposals for the classification of acute leukaemias*. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br.J.Haematol.* 33 (4) (1976) 451-8

Beran, M., X. Cao, Z. Estrov, S. Jeha, G. Jin, S. O'Brien, M. Talpaz, R.B. Arlinghaus, N.B. Lydon, and H. Kantarjian, *Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148)*. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(7): p. 1661-72.

Branford, S., Z. Rudzki, S. Walsh, A. Grigg, C. Arthur, K. Taylor, R. Herrmann, K.P. Lynch, and T.P. Hughes, *High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance*. *Blood*, 2002. 99(9): p. 3472-5.

C

Campbell, M.L., W. Li, and R.B. Arlinghaus, *P210 BCR-ABL is complexed to P160 BCR and ph-P53 proteins in K562 cells*. *Oncogene*, 1990. 5(5): p. 773-6.

Cowan-Jacob SW, Guez V, Fendrich G, et al. *Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment*. *Mini Rev Med Chem*. 2004;4:285-299.

D

Deininger, M.W., J.M. Goldman, N. Lydon, and J.V. Melo, *The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3691-8.

Deininger, M.W., J.M. Goldman, and J.V. Melo, *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* Blood, 2000. **96**(10): p. 3343-56.

Deininger M. *Resistance to Imatinib: Mechanisms and Management.* J Natl Compr Canc Netw. 2005;3:757-768.

Druker, B.J. and N.B. Lydon, *Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia.* J Clin Invest, 2000. **105**(1): p. 3-7.

Druker, B.J., S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G.M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, and N.B. Lydon, *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.

E

F

Faderl, S., M. Talpaz, Z. Estrov, S. O'Brien, R. Kurzrock, and H.M. Kantarjian, *The biology of chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 1999. **341**(3): p. 164-72.

Faderl Stefan, Sima Jeha, Hagop M. Kantarjian, *The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia,* American Cancer Society , June 2003

Freund, M., *Thiemes Innere Medizin, Kapitel Hämatologie.* 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

G

Gambacorti-Passerini, C., P. le Coutre, L. Mologni, M. Fanelli, C. Bertazzoli, E. Marchesi, M. Di Nicola, A. Biondi, G.M. Corneo, D. Belotti, E. Pogliani, and N.B. Lydon, *Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis.* Blood Cells Mol Dis, 1997. **23**(1079-9796): p. 380-94.

Gambacorti-Passerini, C., R. Barni, P. le Coutre, M. Zucchetti, G. Cabrita, L. Cleris, F. Rossi, E. Gianazza, J. Brueggen, R. Cozens, P. Pioltelli, E. Pogliani, G. Corneo, F. Formelli, and M. D'Incalci, *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. 24: Bertazzoli C, et al. Differential recognition of a...[PMID:10815918]Related Articles, Links.

Gokbuget N., D. Hoelzer, R. Arnold et al. *Treatment of Adult ALL according to protocols of the German Multicenter Study Group for Adult ALL (GMALL).* Hematol. Oncol. Clin. North Am. **14** (6) (2000) 1307-25

Grignani, F., T. Kinsella, A. Mencarelli, M. Valtieri, D. Riganelli, L. Lanfranccone, C. Peschle, G.P. Nolan, and P.G. Pelicci, *High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein.* Cancer Res, 1998. **58**(1): p. 14-9.

Griswold IJ, MacPartlin M, Bumm T, et al. *Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib.* Mol Cell Biol. 2006;26:6082-6093.

Guo, X.Y., J.M. Cuillerot, T. Wang, Y. Wu, R. Arlinghaus, D. Claxton, C. Bachier, J. Greenberger, I. Colombowala, and A.B. Deisseroth, *Peptide containing the BCR oligomerization domain (AA 1-160) reverses the transformed phenotype of p210bcr-abl positive 32D myeloid leukemia cells.* Oncogene, 1998. 17(7): p. 825-33.

H

Hantschel Oliver, Bhushan Nagar, Sebastian Guettler, Jana Kretzschmar, Karel Dorey, John Kuriyan, Giulio Superti-Furga, *A Myristoyl/Phosphotyrosine Switch Regulates c-Abl,* Cell, Volume 112, 845-857, March 2003,

Hantschel O, Superti-Furga G. *Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5:33-44.

He Y, Wertheim JA, Xu L, et al. *The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl.* Blood. 2002;99:2957-2968.

Hochhaus, A., S. Kreil, A.S. Corbin et al. *Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy.* Leukemia 16 (2002) 2190-6

Hochhaus, A., P. La Rosée. *Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia : strategies to avoid and overcome resistance.* Leukemia 18 (2004) 1321-31

Hoelzer, D., N. Gokbuget: *Diagnostik und Therapie der akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen.* Onkologie 8 (7) (2002) 672-85

Hoelzer, D. and G. Seipelt, *Leukämietherapie.* 1998, Bremen: UNI-MED Verlag.

Hofmann, W.K., L.C. Jones, N.A. Lemp, S. de Vos, H. Gschaidmeier, D. Hoelzer, O.G. Ottmann, and H.P. Koefler, *Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation.* Blood, 2002. **99**(5): p. 1860-2.

Huettner, C.S., P. Zhang, R.A. Van Etten, and D.G. Tenen, *Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1.* Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 57-60.

J

Junia V. Melo and David J. Barnes, *Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer,* Nature Publishing Group, Volume 7, June 2007

K

Kantarjian, H., C. Sawyers, A. Hochhaus et al. *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia.* N. Engl. J. Med. 346 (2002) 645-52

Kelliher, M.A., J. McLaughlin, O.N. Witte, and N. Rosenberg, *Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6649-53.

Kharbanda, S., A. Bharti, D. Pei, J. Wang, P. Pandey, R. Ren, R. Weichselbaum, C.T. Walsh, and D. Kufe, *The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 6898-901.

Kipreos, E.T. and J.Y. Wang, *Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA.* Science, 1992. **256**(5055): p. 382-5. 2: Kipreos ET, et al. Differential phosphorylation ...[PMID:2183353]Related Articles, Links.

Koiti Inokuchi, *Chronic myelogenous Leukemia: From Molecular Biology to Clinical Aspects an Novel Targeted Therapies,* Nippon Medical School 73 (4), 2006

Kronenwett, R., S. Martin, and R. Haas, *The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells.* Stem Cells, 2000. **18**(5): p. 320-30.

L

Laurent, E., M. Talpaz, H. Kantarjian, and R. Kurzrock, *The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis.* Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2343-55. 2: Laurent E, et al. Cytoplasmic and nuclear local...[PMID:11069024]Related Articles, Links.

Laurent, E., M. Talpaz, M. Wetzler, and R. Kurzrock, *Cytoplasmic and nuclear localization of the 130 and 160 kDa Bcr proteins.* Leukemia, 2000. **14**(11): p. 1892-7. 3: Canitrot Y, et al. Mutator phenotype of BCR--ABL...[PMID:10348341]Related Articles, Links.

Lee, W., Y. Kim, and K. Han, *Eosinophils and basophils carry the fused BCR/ABL gene in chronic myelogenous leukemia: direct fluorescence in situ hybridization analysis on blood smears.* Acta Haematol, 1998. **100**(2): p. 106-9.

Li, S., R.L. Ilaria, Jr., R.P. Million, G.Q. Daley, and R.A. Van Etten, *The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity.* J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1399-412.

Lin, F., G. Monaco, T. Sun, J. Liu, H. Lin, C. Stephens, J. Belmont, and R.B. Arlinghaus, *BCR gene expression blocks Bcr-Abl induced pathogenicity in a mouse model.* Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1873-81.

Lugo, T.G., A.M. Pendergast, A.J. Muller, and O.N. Witte, *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.* Science, 1990. **247**(4946): p. 1079-82.

M

Mahon, F.X., M.W. Deininger, B. Schultheis, J. Chabrol, J. Reiffers, J.M. Goldman, and J.V. Melo, *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance.* Blood, 2000. **96**(3): p. 1070-9.

McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. *A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins.* Mol Cell Biol. 1993;13:7587-7595.

Muller, A.J., A.M. Pendergast, M.H. Havlik, L. Puil, T. Pawson, and O.N. Witte, *A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 5087-93.

Müller, M.C., N. Gattermann, T. Lahaye et al. *Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C.* Leukemia 17 (2003) 2392-400

N

O

O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. *STI571 as a targeted therapy for CML.* Cancer Invest. 2003;21:429-438.

O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. *Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib.* Clin Cancer Res. 2005;11:6987-6993.

O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, 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;65:4500-4505.

O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. *Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib.* Clin Cancer Res. 2005;11:6987-6993.

Ottmann, O., *Tyrosine-Kinase Inhibitors: From Bench to Bedside.* The Hematology Journal, 2000. **1**(Supplement 1 June): p. Abstract 209.

Ottmann, O.G., B.J. Druker, C.L. Sawyers et al. *A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias.* Blood 100 (2002) 1965-71

Ottmann, O.G. and D. Hoelzer, *The ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 (Glivec) in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia - promises, pitfalls and possibilities.* Hematol J, 2002. **3**(1): p. 2-6.

P

Pendergast, A.M., A.J. Muller, M.H. Havlik, Y. Maru, and O.N. Witte, *BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner.* Cell, 1991. **66**(1): p. 161-71.

Puccetti, E., S. Guller, A. Orleth, N. Bruggenolte, D. Hoelzer, O.G. Ottmann, and M. Ruthardt, *BCR-ABL mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity.* Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3409-13.

Puil, L., J. Liu, G. Gish, G. Mbamalu, D. Bowtell, P.G. Pelicci, R. Arlinghaus, and T. Pawson, *Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway.* Embo J, 1994. **13**(4): p. 764-73.

Q

R

Raitano, A.B., Y.E. Whang, and C.L. Sawyers, *Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins.* Biochim Biophys Acta, 1997. **1333**(3): p. F201-16. 3: Raitano AB, et al. The Bcr-Abl leukemia oncogene...[PMID:8524841]Related Articles, Links.

Reuther, G.W., H. Fu, L.D. Cripe, R.J. Collier, and A.M. Pendergast, *Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family.* Science, 1994. **266**(5182): p. 129-33.

Riede, U.-N. and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie.* 1999, Stuttgart: Thieme Verlag.

Ruibao Ren, *Mechanism of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia,* Nature Publishing Group, Volume 5, March 2005

S

Sawyers, C.L., A. Hochhaus, E. Feldman 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 99 (2002) 3530-9

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. *Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.* Science. 2000;289:1938-1942.

Shah, N.P., J.M. Nicoll, B. Nagar, M.E. Gorre, R.L. Paquette, J. Kuriyan, and C.L. Sawyers, *Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia.* Cancer Cell, 2002. **2**(2): p. 117-25.

Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA. *Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain.* Mol Cell. 2003;12:27-37.

T

Taagepera, S., D. McDonald, J.E. Loeb, L.L. Whitaker, A.K. McElroy, J.Y. Wang, and T.J. Hope, *Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(13): p. 7457-62. 2: Lewis JM, et al. Integrin regulation of c-Abl ...[PMID:8986783]Related Articles, Links.

Talpaz, M., R.T. Silver, B.J. Druker et al. *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase II study*. Ann. Intern. Med. 114 (1991) 532-8

Tauchi, T., K. Miyazawa, G.S. Feng, H.E. Broxmeyer, and K. Toyama, *A coiled-coil tetramerization domain of BCR-ABL is essential for the interactions of SH2-containing signal transduction molecules*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1389-94.

U

V

Van Etten RA. *c-Abl regulation: a tail of two lipids*. Curr Biol. 2003;13:R608-610.

Van Etten, R.A., P. Jackson, and D. Baltimore, *The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization*. Cell, 1989. **58**(4): p. 669-78.

von Bubnoff N, Veach DR, van der Kuip H, et al. *A cell-based screen for resistance of Bcr-Abl-positive leukemia identifies the mutation pattern for PD166326, an alternative Abl kinase inhibitor*. Blood. 2005;105:1652-1659.

W

Wen, S.T., P.K. Jackson, and R.A. Van Etten, *The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products*. Embo J,

Weisberg, E. and J.D. Griffin, *Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3498-505.

Wetzler, M., M. Talpaz, R.A. Van Etten, C. Hirsh-Ginsberg, M. Beran, and R. Kurzrock, *Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1925-39.

X

Xun Zhao, Saghi Ghaffari, Harvey Lodish, Vladimir N. Malashkevich and Peter S. Kim, *Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain*, Nature structural biology, Volume 9 number 2, february 2002

Y**Z**

Zhao X, Ghaffari S, Lodish H, Malashkevich VN, Kim PS. *Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain*. Nat Struct Biol. 2002;9:117-120.

Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. *The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl*. Mol Cell Biol. 2001;21:840-853.

Danksagung

*“Schaff das Tagwerk meiner Hände,
Hohes Glück, dass ichs vollende!
Laß, o laß mich nicht ermatten!
Nein, es sind nicht leere Träume:
Jetzt nur Stangen, diese Bäume
Geben einst noch Frucht und Schatten.“*
J. W. Goethe, Hoffnung

Ich danke meinem Doktorvater Dr. med. M. Ruthardt, seiner Arbeitsgruppe und vor allem meinem Betreuer Dr. T. Beisert für eine kompetente und freundliche Betreuung und die Geduld die mir entgegengebracht wurde.

Des Weiteren danke ich meiner Familie und meinem Lebensgefährten für die emotionale Unterstützung in einer erfahrungsreichen Zeit.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel „Oligomerisierungshemmung und Biologie von BCR/ABL und seinen Resistenzmutanten“ in der Medizinischen Klinik II, Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinik Frankfurt, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Dr. med. Martin Ruthardt mit

Unterstützung durch Herrn Dr. phil. nat. Tim Beissert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem

Publikationsorgan veröffentlicht:

Mian AA, Schüll M, Zhao Z, Oancea C, Hundertmark A, Beissert T, Ottmann OG, Ruthardt M.

„The gatekeeper mutation T315I confers resistance against small molecules by increasing or restoring the ABL-kinase activity accompanied by aberrant transphosphorylation of endogenous BCR, even in loss-of-function mutants of BCR/ABL.“

Leukemia. 2009 Sep;23(9):1614-21. Epub 2009 Apr 16.

Beissert T, Hundertmark A, Kaburova V, Travaglini L, Mian AA, Nervi C, Ruthardt

„Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface by a helix-2 peptide inhibits unmutated and imatinib-resistant BCR/ABL.“

M.Int J Cancer. 2008 Jun 15;122(12):2744-52.

Frankfurt am Main, den 20.04.2010

Alena Hundertmark