

Molekulares Targeting des BCR/ABL-
Translokationsprodukts als Therapieansatz für Philadelphia-
Chromosom positive Leukämien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Tim Beißert
aus Hamburg

Frankfurt am Main (2004)

(DF 1)

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Starzinski-Powitz
Prof. Dr. Hoelzer

Datum der Disputation: 22.12.2003

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit in der Abteilung für Hämatologie der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums Frankfurt

Ich danke Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz für die Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Hoelzer möchte ich mich für die externe Betreuung als Doktorand bedanken, und dafür, daß er mir ermöglicht hat, in der Abteilung für Hämatologie eine Doktorarbeit durchzuführen.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. habil. Martin Ruthardt für die Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas, seine unermüdliche wissenschaftliche Betreuung, Hilfe und Kritik.

Ich danke Elena Puccetti für ihre geduldige technische Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn PD Dr. Oliver G. Ottmann für seine Unterstützung und seine Anregungen.

Ich danke Reinhard Henschler und Orinta Schneider für ihre Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der Mausexperimente sowie Prof. Dr. Mitrou für seine Hilfe bei der morphologischen Begutachtung primärer Mauszellen.

Ich bedanke mich ganz besonders herzlich bei meiner Freundin Sandra für ihre Liebe und Geduld mit einem Naturwissenschaftler.

Ich danke meinen Eltern dafür, daß sie mir das Biologiestudium ermöglicht haben, ohne das ich diese Dissertation nicht hätte anfertigen können. Ich danke meinem Vater außerdem für die Korrektur der Dissertation („das ist kein Deutsch“).

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ruthardt und der Labore i40, i50, i45, i33 sowie „Haus 33“ für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	14
1.1	Normale Hämpoese	14
1.2	Leukämien	16
1.2.1	Akute Leukämien	16
1.2.1.1	Akute lymphatische Leukämie (ALL)	16
1.2.1.2	Akute myeloische Leukämie (AML)	18
1.2.2	Chronische Leukämien	19
1.2.2.1	Chronisch myeloische Leukämie (CML)	19
1.2.2.2	Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)	20
1.3	Zytogenetik der Leukämien	20
1.3.1	Die Translokation t(15;17) und die Akute Promyelozytenleukämie	21
1.3.2	Das Philadelphia-Chromosom und die Ph ⁺ Leukämien: CML und Ph ⁺ ALL	21
1.3.2.1	Die Translokation t(9;22): Bruchpunkte auf Chromosom 9 und 22	22
1.3.2.2	Die Translokation t(9;22): Translokationsprodukte	24
1.3.2.2.1	Chromosom 22q ⁺ : p185 ^(BCR-ABL) und p210 ^(BCR-ABL)	24
1.3.2.3	Biologie von p185 ^(BCR-ABL) und p210 ^(BCR-ABL)	24
1.3.3	BCR, ABL und die leukämogene Signaltransduktion durch BCR/ABL	25
1.3.3.1	Aufbau und Funktion von c-ABL	25
1.3.3.2	Aufbau und Funktion von BCR	26
1.3.3.3	Das Fusionsprotein BCR/ABL	27
1.3.4	Tyrosinkinasen als Translokationspartner in Ph-Chromosom negativen akuten und chronischen myeloproliferativen Krankheiten	29
1.4	Therapie der Ph⁺ Leukämien	30
1.4.1	Therapie der CML in der chronischen und akzelerierten Phase	30
1.4.2	Therapie der Ph ⁺ ALL	31
1.4.3	Der spezifische ABL-Kinase-Inhibitor STI571	32
1.5	Arsenderivate in der Therapie maligner Erkrankungen	33
1.5.1	Geschichte der Anwendung von Arsenderivaten	33
1.5.2	Behandlung der APL und Tumoren mit As ₂ O ₃	34
1.5.3	Anwendung von Arsen in der Klinik bei der Behandlung der APL	34
1.5.4	Molekulare Mechanismen der Arsenwirkung	35

1.6	Zielsetzung der Arbeit	37
2	MATERIALIEN	39
2.1	Geräte.....	39
2.2	Chemikalien.....	41
2.3	Spezielle Reagenzien und Materialien.....	41
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme	41
2.3.2	Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide.....	42
2.3.3	Verwendete primäre Antikörper	42
2.3.4	Verwendete sekundäre Antikörper	43
2.3.5	Verwendete Zelllinien.....	43
2.3.5.1	Etablierte Zelllinien	43
2.3.5.2	Nicht etablierte Zelllinien	44
2.3.6	Verwendeter Mausstamm	45
2.3.7	Sonstige molekular- und zellbiologische Reagentien und Materialien.....	45
3	METHODEN	48
3.1	Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	48
3.1.1	Bakterienkultur	48
3.1.2	Bakterienlagerung.....	48
3.1.3	Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation).....	48
3.1.4	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA mit PEG-Fällung	49
3.1.5	Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren.....	50
3.2	RNA-Extraktion aus Zellen.....	50
3.2.1	RNA-Extraktion durch Ultrazentrifugation	50
3.2.2	RNA-Extraktion mit RNA-zol.....	51
3.3	cDNA-Synthese aus RNA.....	51
3.4	Klonierung von cDNA-Konstrukten und Analyse von Plasmid-DNA.....	52
3.4.1	Allgemeine Klonierungsmethoden	52
3.4.1.1	Restriktionsverdau	52
3.4.1.2	Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	52
3.4.1.3	„Site-directed Mutagenesis“	53

3.4.1.4	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	54
3.4.1.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	54
3.4.1.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	55
3.4.1.7	Glätten von überhängenden Enden („Klenow-fill-in“).....	55
3.4.1.8	Dephosphorylierung linearisierter Vektoren mittels CIP.....	56
3.4.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	56
3.4.1.10	Anfügen von 3'-A Überhängen an PCR-Produkte und "TA-Klonierung".....	56
3.4.1.11	Rekombination („gateway LR clonase enzyme kit“ von Invitrogen).....	57
3.4.2	Klonierung von „gateway destination“ Vektoren.....	58
3.4.3	Klonierung der verwendeten cDNA-Konstrukte.....	58
3.5	Transformation von kompetenten E. coli-Zellen.....	63
3.5.1	Präparation von chemokompetenten E. coli-Zellen.....	63
3.5.2	Transformationen rekombinanter Plasmide in E. coli.....	63
3.6	Produktion von GST-Fusionsproteinen in Bakterien.....	64
3.6.1	Proteinminipräparation.....	64
3.6.2	Proteinmaxipräparation.....	65
3.7	GST-„pull-down-assays“.....	66
3.8	RAS Activation Assay Kit.....	67
3.9	Charakterisierung von Hochmolekulargewichtskomplexen (HMG-Komplexe).....	67
3.10	Proteinanalytische Methoden.....	68
3.10.1	Lyse von Suspensionszellen mit SDS Lysis-Puffer.....	68
3.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektrophotometer.....	68
3.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	69
3.10.4	“Western Blotting”.....	69
3.10.4.1	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran.....	69
3.10.4.2	Immundetektion von Proteinen.....	70
3.11	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	70
3.11.1	Vorbereitung der Präparate.....	70
3.11.2	Färbung der Präparate.....	71
3.12	Durchflußzytometrie (FACS) mit direkt konjugierten Antikörpern.....	72
3.13	Magnetische Zellseparation (MACS).....	72

3.14	Zellkultur	73
3.14.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	73
3.14.2	Verwendete Zellmedien	73
3.14.3	Zellpassage	74
3.14.3.1	Suspensionszellen	74
3.14.3.2	Adhärente Zelllinien.....	74
3.14.4	Einfrieren und Auftauen der Zelllinien.....	74
3.14.4.1	Einfrieren	74
3.14.4.2	Auftauen.....	75
3.14.5	Patientenmaterial	75
3.15	Transfektion von Zelllinien	75
3.15.1	Herstellung von 2-fach HEPES-gepufferter Salzlösung, pH 7,0 (2x HBS).....	75
3.15.2	Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärennten Zelllinien	76
3.15.3	Stabile Transfektion von Suspensionszelllinien (U937) mittels Elektroporation	76
3.15.4	G418-Selektion von transfizierten Zellen.....	76
3.15.5	Infektion von Zelllinien und primärer muriner Knochenmarkszellen.....	77
3.16	Induktion der Expression der Transgene in den jeweiligen U937-Klonen	78
3.17	Induktion der Apoptose mit As₂O₃	78
3.18	Messung der Apoptose mittels 7-AAD	78
3.19	Methylcelluloseassay	79
3.19.1	Herstellung der Methylcellulose, 2,25%:	79
3.19.2	Kolonie-Assay	79
3.20	Transformationsassay (Faktorentzug) bei IL-3 abhängigen murinen hämopoetischen Vorläuferzelllinien	80
3.21	STI571-Sensibilitätsassay mit IL-3 unabhängigen, infizierten murinen hämopoetischen Vorläuferzelllinien	80
3.22	Tierversuche	81
3.22.1	Isolierung von Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur von Mäusen.....	81
3.22.2	Sca-1 Multisort Kit	81
3.22.3	Transplantation von murinen Knochenmarkszellen in Empfängermäuse.....	82
3.22.4	Überwachung des Gesundheitsstatus transplantierte Mäuse	82
3.22.5	Analyse moribunder Mäuse.....	82

3.22.5.1	Blutbilder	82
3.22.5.2	Präparation von Knochenmark- und Milzzellen.....	83
3.22.5.3	Analyse der Oberflächenmarkerexpression von Knochenmark und Milzzellen	83
3.22.5.4	Morphologische Analyse der Knochenmarks- und Milzzellen	83
3.22.5.5	Kontrolle der Transgenexpression in murinen Knochenmarks- und Milzzellen.....	84
3.22.6	Applikation von As ₂ O ₃	84
4	ERGEBNISSE	85
4.1	Rolle der N-terminalen „coiled-coil“-Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL für die Sensibilität gegenüber STI571.....	85
4.1.1	Charakterisierung der Bildung von Hochmolekulargewichtskomplexen verschiedener ABL-Mutanten.....	85
4.1.2	Oligomerisierungsoberflächen, die von unterschiedlichen Proteinen stammen, aktivieren die ABL-Kinase und induzieren Faktorunabhängigkeit in Ba/F3-Zellen	88
4.1.3	Faktorunabhängige Ba/F3-Zellen, die verschiedene chimäre ABL-Fusionskonstrukte exprimieren, zeigen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber STI571.....	90
4.1.4	X-ABL Konstrukte sind nicht in der Lage, RAT-1 Zellen zu transformieren	91
4.1.5	Die Deletion der Aminosäuren 1-63 verzögert die p185 ^(BCR/ABL) -vermittelte Faktorunabhängigkeit von hämopoetischen Vorläuferzellen	92
4.1.6	Faktorunabhängige Ba/F3-Zellen, die ΔCCp185 exprimieren, reagieren gegenüber STI571 sensibler als p185 ^(BCR/ABL) exprimierende Ba/F3-Zellen.....	94
4.1.7	Die isolierte BCR-„coiled-coil“ interagiert in vitro und in vivo mit BCR/ABL.....	95
4.1.8	Die Expression von BCC reduziert das transformierende Potential von p185 ^(BCR-ABL)	97
4.2	Untersuchungen zum Mechanismus der As₂O₃-induzierten Apoptose durch Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte.....	101
4.2.1	Die Überexpression von PML erhöht die Sensibilität gegenüber As ₂ O ₃ -induzierter Apoptose ..	101
4.2.2	In prä-B-Lymphoblasten verändert die Expression von BCR/ABL das PML-Immunofärbungsmuster	102
4.2.3	Die Expression von BCR/ABL führt zu einer Modifizierung der PML-NB Morphologie.....	104
4.2.4	Das t(8;21) Translokationsprodukt AML-1/ETO vermittelt wie PML/RARα und BCR/ABL den As ₂ O ₃ -induzierten Zelltod	105
4.2.5	Die Expression sowohl von BCR/ABL als auch von AML-1/ETO führt zur Aktivierung von endogenem RAS in U937-Zellen und die Expression von konstitutiv aktiviertem RAS führt zu einer Sensibilisierung von U937-Zellen gegenüber der As ₂ O ₃ -induzierten Apoptose	107
4.2.6	Die As ₂ O ₃ -induzierte Apoptose kann unabhängig von p53 erfolgen.....	109

4.2.7	Im Gegensatz zu PLZF/RAR α erhöht die Expression von BCR/ABL und AML-1/ETO die Sensibilität gegenüber INF α -induziertem Zelltod.....	110
4.2.8	Die retrovirale Expression von p185 ^(BCR/ABL) in murinen Sca-1 positiven Knochenmarkzellen führt nach Transplantation in sublethal bestrahlten Mäusen zu einer CML-ähnlichen Krankheit	112
4.2.8.1	Überprüfung des Anwachsens des Transplantats.....	113
4.2.8.2	Induktion einer BCR/ABL positiven Leukämie in Mäusen.....	115
4.2.9	Bei großer Tumormasse führt As ₂ O ₃ im retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell zu einer Erniedrigung der BCR/ABL Expression, ohne die Leukämieentwicklung signifikant zu verzögern	117
4.2.10	Effekte von As ₂ O ₃ auf die Entwicklung einer CML-ähnlichen Leukämie im retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell bei geringer Tumormasse.....	119
4.2.10.1	As ₂ O ₃ stört das Engraftment des Transplantats nicht.....	120
4.2.10.2	As ₂ O ₃ führt zum Überleben von 25% der Tiere.....	122
4.2.10.3	As ₂ O ₃ führt in zwei von acht Tieren zu deutlichen Veränderungen des Blutbildes CML-kranker Mäuse.....	123
4.2.10.4	As ₂ O ₃ kann die Splenomegalie nicht reduzieren.....	126
4.2.10.5	As ₂ O ₃ führt bei langem Überleben zu einer geringeren Expression myeloischer Oberflächenmarker in der Milz und im Knochenmark	127
5	DISKUSSION	130
5.1	Untersuchungen zur Rolle der N-terminalen „coiled-coil“-Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL für die Sensibilität gegenüber STI571.....	130
5.2	Untersuchungen zum Mechanismus der As ₂ O ₃ -induzierten Apoptose durch Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte.....	133
6	ZUSAMMENFASSUNG	139
7	LITERATUR	142

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Normale Hämopoese.....	15
Abbildung 2: Die Translokation t(9;22).....	23
Abbildung 3: BCR/ABL-abhängige Signaltransduktionswege.....	28
Abbildung 4 : Schematische Darstellung der BCR-ABL Konstrukte und des Provirus.	86
Abbildung 5: Bildung von Hochmolekulargewichtskomplexen durch BCR-ABL Mutanten.....	87
Abbildung 6: Retrovirale Expression der chimären #ABL-Fusionskonstrukte in Ba/F3-Zellen und Induktion von faktorunabhängigem Wachstum.	89
Abbildung 7: Sensibilität des faktorunabhängigen Wachstum von transduzierten Ba/F3-Zellen gegenüber STI571.	91
Abbildung 8: Retrovirale Expression von WT p185 ^(BCR/ABL) und ΔCCp185 in Ba/F3-Zellen und Induktion von faktorunabhängigem Wachstum.	93
Abbildung 9: Sensibilität des faktorunabhängigen Wachstum von transduzierten Ba/F3-Zellen gegenüber STI571.	95
Abbildung 10: <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Interaktion der BCR-“coiled-coil” Domäne mit p185 ^(BCR-ABL)	96
Abbildung 11: Retrovirale Koexpression von BCC und p185 ^(BCR-ABL) in Ba/F3-Zellen	99
Abbildung 12: Überexpression von PML3 in transfizierten U937 Zellen und Apoptoseinduktion durch As ₂ O ₃	102
Abbildung 13: Analyse des PML-Immunofärbungsmuster in prä-B-Lymphoblastenzelllinien und Ph+ Patientenzellen.	103
Abbildung 14: Immunfluoreszenzanalysen von PML-NBs in AML-1/ETO oder BCR/ABL exprimierenden U937-Zellen.....	105
Abbildung 15: As ₂ O ₃ -induzierte Apoptose in Zellen, die Leukämie-assozierte Translokationsprodukte exprimieren.....	106
Abbildung 16: RAS-Aktivierung und As ₂ O ₃ -induzierte Apoptose.....	108
Abbildung 17: P53 und As ₂ O ₃ -induzierte Apoptose.	109
Abbildung 18: INFα-induzierte Apoptose in Zellen, die Leukämie-assozierte Translokationsprodukte exprimieren.....	111

Abbildung 19: Mausmodell für die CML.....	113
Abbildung 20: Transgenexpression in hämopoetischen Zellen transplanteder Mäuse.....	114
Abbildung 21: Phänotyp des BCR/ABL positiven, CML-ähnlichen myeloproliferativen Syndroms in Mäusen.	116
Abbildung 22: Effekt von As ₂ O ₃ auf die Entwicklung eines BCR/ABL-positiven CML- ähnlichen myeloproliferativen Syndroms in Mäusen nach Transplantation einer großen Tumormasse.....	118
Abbildung 23. Effekte von As ₂ O ₃ auf das Engraftment transplanteder Knochenmarkzellen	121
Abbildung 24: Einfluß von As ₂ O ₃ auf das Überleben von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse.	123
Abbildung 25: Effekt von As ₂ O ₃ auf die Leukozytenzahl von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse.	124
Abbildung 26: Einfluß von As ₂ O ₃ auf das Blutbild kranker Mäuse nach Transplantation einer geringen Tumormasse.....	125
Abbildung 27: Effekt von As ₂ O ₃ auf die Expression myeloischer und lymphatischer Marker von Milz- und Knochenmarkzellen von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse.	129

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Akute lymphatische Leukämie. FAB-Klassifikation	17
Tabelle 2: Akute lymphatische Leukämie. Immunologische Subtypen	17
Tabelle 3: RAT-1 Colonie-Assay mit chimären #ABL-Fusionskonstrukten.	92
Tabelle 4: Koloniebildung p185 ^(BCR/ABL) und GFP bzw. BCC-GFP koexprimierender RAT-1 Zellen.....	97
Tabelle 5: Gewicht der Milz kranker Mäuse nach Transplantation einer großen Tumormasse	117
Tabelle 6: Normalbefund des peripheren Bluts von Mäusen	122
Tabelle 7: Überlebensdauer und Gewicht der Milz nach Transplantation einer geringen Tumormasse.....	127

1 Einleitung

1.1 Normale Hämpoese

Die Zellen des Blutsystems des Erwachsenen werden im Knochenmark gebildet und stammen von den totipotenten Stammzellen, den gemeinsamen Vorfahren aller Blutzellen, ab. Die nächste Differenzierungsstufe stellen die determinierten Vorläuferzellen dar, auf deren Niveau sich die myeloische von der lymphatischen Differenzierung abzweigt (Abb. 1). 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. Wie die Erythrozyten und die Thrombozyten stammen auch die Granulozyten von der pluripotenten, hämpoetischen Stammzelle ab. Granulozyten und Monozyten entstehen im Knochenmark unter dem Einfluß bestimmter Glykoproteingewebshormone mesenchymalen Ursprungs, den sogenannten „colony stimulating factors“ (CSF), deren Struktur erst teilweise aufgeklärt ist (Kronenwett et al., 2000). Die Differenzierung der Stamm- und Progenitorzellen ist abhängig vom sogenannten hämpoetischen „Microenvironment“, welches aus verschiedenen Stromazellen, sezernierten und membrangebundenen Zytokinen und einer komplexen extrazellulären Matrix besteht. Die nicht-hämpoetischen, seßhaften Stromazellen synthetisieren und sezernieren sowohl Zytokine wie die 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 hämpoetische Zellen exprimieren je nach Entwicklungsstatus verschiedene Rezeptor- und Zelladhäsionsmoleküle, anhand derer der Stand der Differenzierung bzw. der eigentliche Determinierungszieltyp kenntlich gemacht werden kann. 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). In Abbildung 1 ist die Hämpoese schematisch dargestellt.

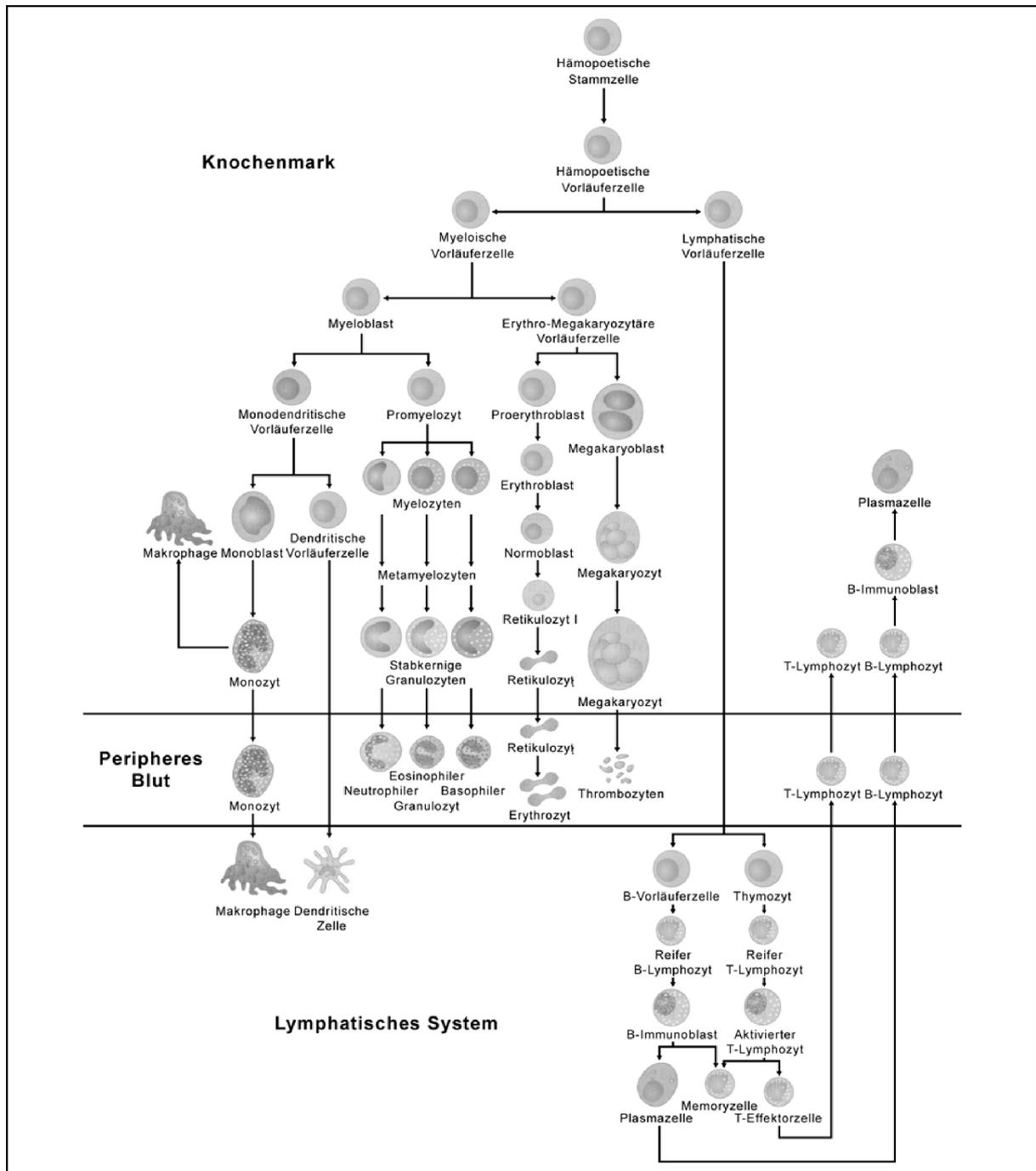


Abbildung 1: Normale Hämoese. Ausgehend von der totipotenten Stammzelle sind die verschiedenen Differenzierungsstufen gezeigt, die bei der Bildung der unterschiedlichen Blutzellen durchlaufen werden (nach Freund, 1999).

1.2 Leukämien

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

1.2.1 Akute Leukämien

Akute Leukämien sind maligne monoklonale Erkrankungen hämopoetischer Stammzellen. Sie sind durch das unkontrollierte Wachstum von unreifen Vorstufen der Blutzellen charakterisiert, die der normalen Hämpoese im Knochenmark den nötigen Raum nehmen, so daß es zur hämopoetischen 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- und 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, zyto- und molekulargenetischer Charakteristika (Begemann, 1998).

1.2.1.1 Akute lymphatische Leukämie (ALL)

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 hämopoetischer Insuffizienz führen, andererseits Lymphknoten, Milz und andere Organe disseminiert infiltrieren (Hoelzer und Seipelt, 1998).

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	groß	homogen bis gepunktet	mindestens 1/Zelle, groß

Tabelle 1: Akute lymphatische Leukämie. FAB-Klassifikation (nach Begemann, 1998)

Wie in Tabelle 1 gezeigt, gliedert die French-American-British- (FAB-) Klassifikation die ALL nach morphologischen und zytochemischen Merkmalen in drei Untergruppen (L1 – L3).

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 2: Akute lymphatische Leukämie. Immunologische Subtypen (nach Begemann, 1998))

Wie in Tabelle 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).

Bei der ALL kann im Blutbild die Leukozytengesamtzahl normal, erhöht oder auch vermindert sein. Typischerweise findet sich eine Leukozytose mit durchschnittlich 30.000 Zellen/ μ l, allerdings sind auch Werte bis zu 100.000/ μ l nicht selten. Rund ein Viertel der Erkrankten weist jedoch eine erniedrigte Leukozytenzahl mit Werten um 500 Zellen/ μ l 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 Hämopoese 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 Tod (Hoelzer und Seipelt, 1998).

1.2.1.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie ist eine klonale Erkrankung einer frühen myeloischen Vorläuferzelle, die klinisch zur hämopoetischen Insuffizienz mit Anämie, Thrombopenie und Neutropenie führt. Man unterscheidet die primäre „de novo“-AML von der sekundären AML, der entweder ein myelodysplastisches Syndrom, die Behandlung von Neoplasien mit zytotoxischen Substanzen, wie zum Beispiel Alkylantien (Cyclophosphamid u.a.) oder Topoisomerase-II-Hemmer (Etoposid), oder die Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen vorausgegangen ist. Weitere Risikofaktoren für eine sekundäre AML stellen Benzolexposition sowie angeborene genetische Veränderungen (Trisomie 21, Fanconi-Anämie u.a.) dar (Hoelzer und Seipelt, 1998).

Bei den akuten myeloischen Leukämien sind die Blasten in ihrer normalen Differenzierung blockiert. Im Knochenmark und im peripheren Blut kommt es zu einer massiven Anreicherung proliferierender hämopoetischer Vorläufer, die unfähig sind, terminal auszudifferenzieren. Dadurch wird der normalen Hämopoese im Knochenmark der nötige

Platz genommen, so daß es schließlich zur hämopoetischen Insuffizienz mit Anämie, Thrombopenie und Neutropenie kommt, durch welche die Leukämie klinisch manifest wird.

1.2.2 Chronische Leukämien

1.2.2.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Der CML, 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 Hämopoese durch die Zunahme der Granulozyten und ihrer Vorstufen im Vordergrund (Begemann, 1998).

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/ μ l) mit Granulozytenvorstufen im peripheren Blut bei noch kompensierter Thrombo- und Erythrozytopoese. Der Anteil der Blasten im Knochenmark und im peripheren Blut beläuft sich auf unter 5 %. (Hoelzer und Seipelt, 1998). 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 therapierefraktäre Anämie, Thrombozytopenie oder Thrombozytose, rascher Leukozytenanstieg, Fieber oder eine progrediente Splenomegalie (Hoelzer und Seipelt, 1998). Man vermutet, daß der Übergang von der chronischen zur akzelerierten Phase und Blastenkrise auf die Akquisition von zusätzlichen Mutationen im Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph+) Klon zurückzuführen ist (Faderl et al., 1999). 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 Hämopoese aus dem Knochenmark führt zur extramedullären Blutbildung in Milz und Leber, später auch in anderen Organen. Daraus resultiert 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 therapierefraktär 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 Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

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 (Begemann, 1998; Faderl et al., 1999). 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 Hämpoese nicht oder nur wenig exprimiert sind, oder zur Bildung von chimären Genen, die der hämopoetischen Vorläuferzelle Funktionen vermittelt, über die sie normalerweise nicht verfügt (Seipelt und Hoelzer, 1995). Chromosomenbruchstellen, die in internen Intronen oder Exonen der beteiligten Gene liegen, führen zur Bildung von Chimärenengen, 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 von

Differenzierung oder Apoptose der leukämischen Zellen (Look, 1997). Die häufigste Translokation beim Erwachsenen ist die Translokation von Chromosom 9 und Chromosom 22, t(9;22) (Secker-Walker et al., 1997).

1.3.1 Die Translokation t(15;17) und die Akute Promyelozytenleukämie

Die akute Promyelozytenleukämie (APL) ist eine Untergruppe der akuten myeloischen Leukämien und wird als FAB-M3 klassifiziert (Bennett et al., 1982). Im Knochenmark dieser Patienten akkumulieren Blasten, die im Promyelozytenstadium blockiert sind. Dieser Differenzierungsblock kann mit All-Trans-Retinsäure (t-RA) durch Induktion terminaler Differenzierung überwunden werden, was im Patienten zur klinischen Vollremission führt (Degos, 1993; Degos et al., 1995; Huang et al., 1988; Warrell et al., 1991). Zytogenetisch wird in 80% und molekular in 98% der APL Patienten eine t(15;17) Translokation nachgewiesen (Übersicht in (Melnick und Licht, 1999). In seltenen Fällen wurden stattdessen auch andere Translokationen nachgewiesen, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll. Es handelt sich dabei in allen Fällen um bilanzierte, reziproke und APL-spezifische Translokationen (Mitelman et al., 1986). Bei allen APL Translokationen liegt ein Bruchpunkt auf dem Chromosom 17 im 2° Intron des Retinsäurerezeptor alpha Gens (RAR α). Bei der t(15;17) Translokation liegt der zweite Bruchpunkt auf dem Chromosom 15 im „Promyelocytic Leukemia Gene“ (PML), was zur Bildung der Translokationsprodukte PML/RAR α und RAR α /PML führt. (Chen et al., 1993).

1.3.2 Das Philadelphia-Chromosom und die Ph⁺ Leukämien: CML und Ph⁺ ALL

Das Philadelphia-Chromosom 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 (Faderl et al., 1999).

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 Ph⁺. 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., 1999).

Die biologischen Unterschiede zwischen der CML und der Ph⁺ ALL lassen sich möglicherweise auf Unterschiede zwischen den Translokationsprodukten der t(9;22) zurückführen.

1.3.2.1 Die Translokation t(9;22): Bruchpunkte auf Chromosom 9 und 22

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 verlorengegangenen Fragments anlagert (9q+) (Faderl et al., 1999) (Abb. 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 (Abb. 2).

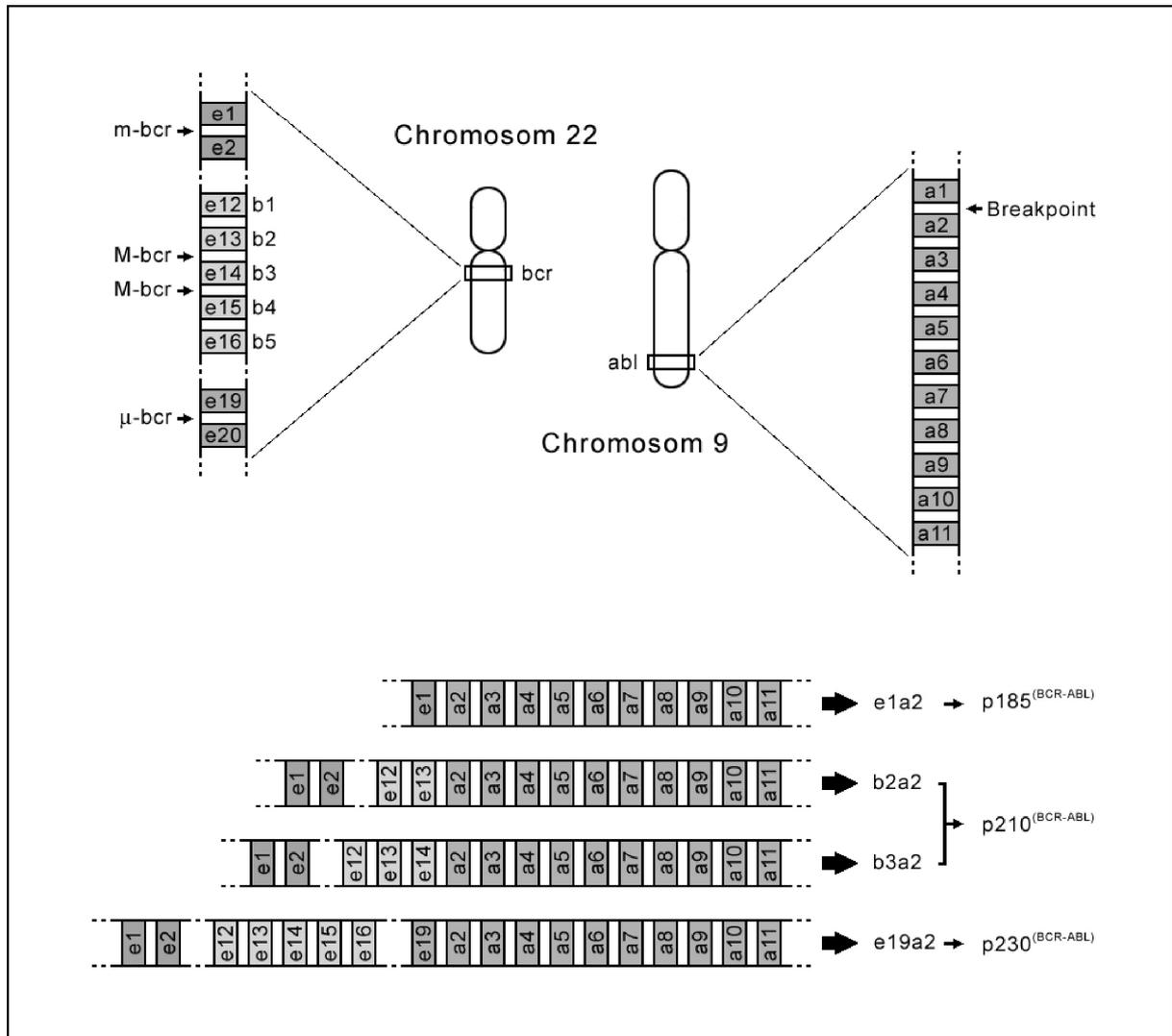


Abbildung 2: Die Translokation t(9;22) (Faderl et al., 1999). Im oberen Teil der Abbildung sind die Gene bcr und abl mit Numerierung der Exone (e1 bis e20 bzw. b1 bis b5 für bcr, a1 bis a11 für abl) und den Bruchpunkten dargestellt. Während bcr die drei Bruchpunkte m-bcr (minor breakpoint cluster region), 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 Bruchpunkts 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).

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 sog. „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, durch Fusion mit ABL

entsteht die Verbindung e1a2. Kürzlich wurde eine dritte Bruchzone, „ μ -BCR“, gefunden (e19a2), auf die aber an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll (Faderl et al., 1999) (Abb. 2).

1.3.2.2 Die Translokation t(9;22): Translokationsprodukte

1.3.2.2.1 Chromosom 22q+: p185^(BCR-ABL) und p210^(BCR-ABL)

Das Genprodukt der Fusion von M-BCR mit ABL ist ein Protein von ca. 210 kDa, dem p210^(BCR-ABL). P210^(BCR-ABL) ist weitgehend spezifisch für die CML. 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, 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 spezifisch für die Ph⁺ ALL, und dessen Entstehung ist auf Bruchereignisse in m-BCR zurückzuführen. (Faderl et al., 1999).

1.3.2.3 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 Zusammenhangs 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 Spenderknochenmark 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).

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

1.3.3.1 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. 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). 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 (Daley et al., 1992). 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; Raitano et al., 1997). 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 (McWhirter und Wang, 1993; Van Etten et al., 1994). 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 und außerdem erhöht sich die ABL-Kinaseaktivität nach Zelladhäsion vorübergehend (Raitano et al., 1997).

1.3.3.2 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“ Domäne ermöglicht die Homotetramerisierung von BCR (McWhirter et al., 1993). Die Serin/Threonin-Kinase ermöglicht die Autophosphorylierung von BCR an Serin- oder Threoninresten (Maru und Witte, 1991). 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-Signalweg ist (Pendergast et al., 1993). 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 (Deininger et al., 2000). 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 (Deininger et al., 2000; Laurent et al., 2001).

1.3.3.3 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 (Campbell et al., 1990; Laurent et al., 2001). Der Homotetramerisierung wird eine Schlüsselrolle bei der konstitutiven Aktivierung der ABL-Tyrosinkinase- im BCR/ABL Fusionsprotein zugeschrieben (McWhirter et al., 1993; Tauchi et al., 1997). Im Gegensatz dazu kann die Heterooligomerisierung dieser Aktivierung entgegenwirken (Lin et al., 2001; Wu et al., 1999). 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 hämopoetische 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). 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 (Laurent et al., 2001). BCR/ABL interagiert mit Adaptorproteinen wie GRB-2, CRK, CRKL, CBL und SHC (SRC homology and collagen homology) (Abb. 3).

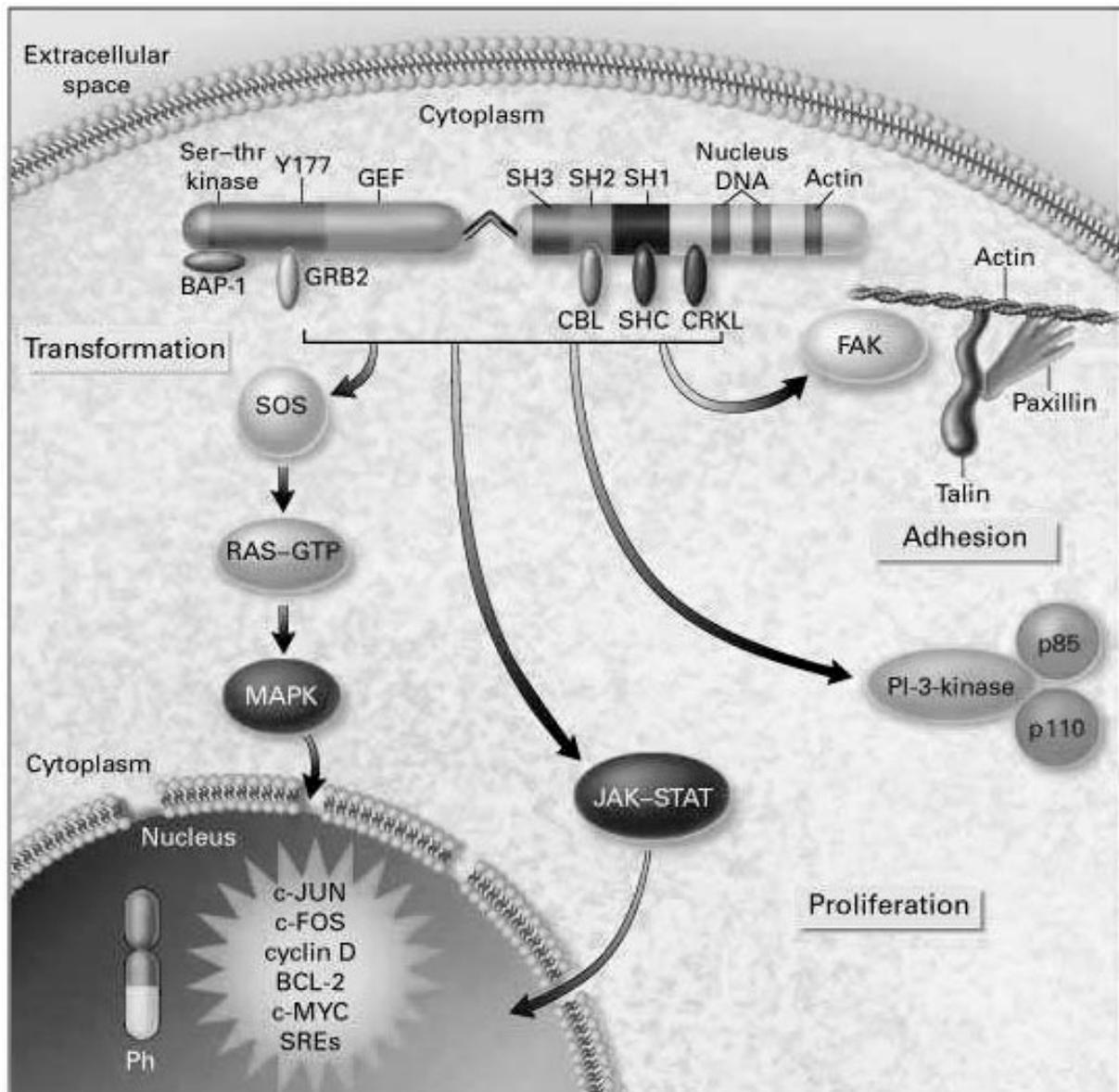


Abbildung 3: BCR/ABL-abhängige Signaltransduktionswege (Faderl et al., 1999).

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 (Oda et al., 1994). 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 (Sattler et al., 1996). 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. 3). Jeder der beschriebenen durch BCR/ABL aberrant aktivierten Signalwege trägt zum Transformationspotential von BCR/ABL bei.

1.3.4 Tyrosinkinasen als Translokationspartner in Ph-Chromosom negativen akuten und chronischen myeloproliferativen Krankheiten

Die weitaus häufigste Chromosomenaberration bei chronisch myeloproliferativen Krankheiten ist die Translokation t(9;22), die BCR an ABL fusioniert. Es wurden jedoch eine Reihe anderer Translokationen beschrieben, die strukturell und funktionell analoge Eigenschaften zu BCR/ABL haben: die aberrante Oligomerisierung und konstitutive Aktivierung einer Tyrosinkinase durch den Translokationspartner.

Neben BCR wurde TEL, ein Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie, als Fusionspartner der ABL-Tyrosinkinase identifiziert. Das Produkt der Translokation t(12;22), TEL/ABL, wurde in erwachsenen Patienten mit B-lymphoblastischer Leukämie und mit akuter undifferenzierter myeloischer Leukämie beschrieben, sowie bei Kindern mit T-lymphoblastischer Leukämie (Andreasson et al., 1997; Golub et al., 1996; Papadopoulos et al., 1995; Van Limbergen et al., 2001). Im TEL-abgeleiteten Teil des t(12;22) Translokationsprodukts ist eine „helix-loop-helix“-Domäne (HLH) enthalten, die eine Oligomerisierungsoberfläche darstellt. Diese Domäne spielt analog zur „coiled-coil“ von BCR/ABL eine entscheidende Rolle für die transformierenden Eigenschaften des Translokationsprodukts. Eine Deletion der HLH aus TEL/ABL hebt die transformierenden Eigenschaften des Fusionsproteins auf (Golub et al., 1996). TEL ist in weiteren Leukämie-assoziierten Translokationsprodukten enthalten, bei denen durch TEL Tyrosinkinasen oligomerisiert und aktiviert werden. Im Rahmen der mit chronischer myelomonozytischer Leukämie assoziierten Translokation t(5;12) wird TEL an den PDGFβR (platelet-derived

growth factor β receptor) fusioniert. Die Fusion mit TEL führt ebenfalls zur Oligomerisierung-abhängigen Aktivierung der PDGF β R-Kinasedomäne (Carroll et al., 1997; Jousset et al., 1997). Im Rahmen der t(9;12) wird TEL mit der Tyrosinkinase JAK2 fusioniert. Auch in diesem Fall konnte gezeigt werden, daß die Transformation hämopetischer Zellen von der HLH-Domäne von TEL abhängig ist (Schwaller et al., 1998). Auch BCR wurde als Translokationspartner von JAK2 in Ph- CML-Patienten beschrieben (Cross und Reiter, 2002). In 2 Fällen von AML wurde eine Translokation t(1;12) beschrieben, die zur Bildung des TEL/ARG Fusionsproteins führt. Die Tyrosinkinase ARG („ABL-related gene“) hat eine sehr ähnliche Gesamtstruktur wie ABL, allerdings ist über ihre Funktion wenig bekannt (Okuda et al., 2001). Aberrante Oligomerisierung von unter physiologischen Bedingungen streng regulierten Kinasen ist also bei einer Reihe von Leukämie-assoziierten Translokationen ein wichtiger molekularer Mechanismus, der zur Entstehung der Krankheit führt.

1.4 Therapie der Ph+ Leukämien

1.4.1 Therapie der CML in der chronischen und akzelerierten Phase

Bis Ende der 1980er Jahre bestand die Therapie der chronischen Phase der CML in einer zytoreduktiven Chemotherapie mit Busulfan oder Hydroxyurea. Durch diese beiden Substanzen können bei 70 bis 80 % der Patienten hämatologische Remissionen mit Normalisierung der Blutwerte erreicht werden, zytogenetisch bleibt der maligne Klon jedoch nahezu immer bestehen und führt nach Absetzen der Therapie mehr oder weniger schnell zum Rezidiv (Hoelzer und Seipelt, 1998).

Einen weiteren Therapieansatz in der chronischen Phase stellt Interferon- α (IFN- α) dar. Hierbei konnten bei über 20 % der Patienten komplette und partielle zytogenetische Remissionen bei Langzeitüberlebensraten von 80 % beobachtet werden (Hoelzer und Seipelt, 1998). Da IFN- α derzeit die einzige Behandlungsmöglichkeit darstellt, die den Beginn der Blastenkrise hinauszögern kann, gilt es bei Patienten ohne passenden Familienspender als Therapie der Wahl (Faderl et al., 1999).

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).

1.4.2 Therapie der Ph+ ALL

Die Standardtherapie der ALL erfolgt in drei Phasen: Die Induktionstherapie hat das Erreichen einer kompletten Remission zum Ziel, die bei rund 80 % der Patienten eintritt. 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. Durch eine niedrig dosierte Erhaltungstherapie kann die Langzeitüberlebensrate günstig beeinflusst werden (Hoelzer und Seipelt, 1998). Durch diese Behandlung kann bei Kindern in 70 % (Koletzko, 1999) und bei Erwachsenen in 40 % der Fälle eine Langzeitremission erreicht werden (Hoelzer und Seipelt, 1998). Eine allogene Knochenmarktransplantation wird bei Hochrisikopatienten in der ersten kompletten Remission, im Falle eines Rezidivs in der zweiten kompletten Remission durchgeführt.

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.

1.4.3 Der spezifische ABL-Kinase-Inhibitor STI571

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 STI571 (Glivec; Novartis, Basel, Schweiz), der eine toxische Wirkung auf die humane CML Zelllinie K562 zeigte. Bei STI571 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 STI571 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).

Fast alle CML-Patienten in der chronischen Phase erreichen durch die Behandlung mit STI571 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-Chromosoms verschwindet vollständig. STI571 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). Die Hauptursache für diese Resistenzentwicklung sind wahrscheinlich Mutationen in der ATP-Bindetasche der ABL-Kinase. Diese Mutationen verhindern die Bindung von STI571, indem sie hochkonservierte

Aminosäurereste betreffen, die mit STI571 interagieren (Branford et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Shah et al., 2002). Die Frequenz, mit der diese Mutationen bei Ph⁺ ALL auftreten, scheint hoch zu sein, 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. Resistenz gegen STI571 scheint also in erster Linie durch eine klonale Evolution unter dem selektiven Druck des Medikaments hervorgerufen zu werden (Ottmann und Hoelzer, 2002).

Für die Resistenzentwicklung gegenüber einer weiteren Behandlung mit STI571 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 STI571 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).

1.5 Arsenderivate in der Therapie maligner Erkrankungen

1.5.1 Geschichte der Anwendung von Arsenderivaten

Arsenderivate stellen eine der ältesten Behandlungsmethoden maligner Erkrankungen dar. Von Cabanne et al. wird aus Sammlungen wie „Ramayana oder Rigweda“ überliefert, daß hinduistische Ärzte schon im Jahre 2000 v. Chr. Tumoren durch lokale Anwendung von arsenhaltigen Heilmitteln zu behandeln pflegten. Diese Autoren beschreiben auch, daß Avicenna Arsen in Kombination mit Aderlaß zur Behandlung von Tumoren verwendet haben soll. (Cabanne et al., Illustrated history of medicine).

Das wichtigste Arzneimittel in der jüngsten Geschichte, das dreiwertiges Arsen enthielt, war Fowlers Lösung. Thomas Fowler, ein englischer Arzt, verwendete 1786 eine aromatisierte Lösung von As₂O₃ „zur Heilung von Schüttelfrost, remittierendem Fieber und periodischen Kopfschmerzen“ (Sears, 1988).

Die Geschichte der Verwendung von Arsen als Therapeutikum verläuft parallel zur Geschichte der Behandlung der CML. Die moderne Ära der Chemotherapie bei Leukämien begann 1865 mit Fallberichten zweier deutscher Ärzte, Valentiner und Lissauer, die Fowlers Lösung zur Behandlung der Leukämie heranzogen. Der Patient, der von Valentiner behandelt

wurde, konnte von dieser Anwendung nicht profitieren (Valentiner, 1865). Lissauer jedoch berichtet von der Behandlung einer Leukämiepatientin mit Arsen, deren Zustand sich zwar deutlich, aber nur vorübergehend besserte und ihrer Leukämie bald darauf erlag, weil die Behandlung unterbrochen worden war (Lissauer, 1865). Es ist nicht bekannt, unter welcher Leukämie diese Patientin litt, aber die detaillierte Beschreibung des klinischen Befundes mit Hepatosplenomegalie und „weißem Blut“ deutet auf eine CML hin (Lissauer, 1865). Mit Aufkommen der Radiotherapie in der Behandlung der Leukämien wurde die Arsenbehandlung vorübergehend aufgegeben. Fowlers Lösung wurde für die Therapie der CML im Jahre 1931 von Forkner und Scott „wiederentdeckt“. Diese Autoren führten Arsen in Kombination mit Radiotherapie als Standardtherapie der CML ein (Forkner und Scott, 1931). Bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde Arsen in Deutschland, kombiniert mit einer Radiotherapie, zur Behandlung der CML und einiger Lymphome verwendet (Schulten, 1953). Dieses Therapieschema wurde durch das Aufkommen von Busulfan immer mehr zurückgedrängt (Sears, 1988).

1.5.2 Behandlung der APL und Tumoren mit As_2O_3

Das Wiederaufkommen von As_2O_3 Ende der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts nahm seinen Ursprung in den 60er Jahren in China. Shen et al. berichten, daß eine Gruppe der Harbin Medical University im Nordosten Chinas bei der Untersuchung der Wirkstoffe der traditionellen chinesischen Medizin auf ein Heilmittel gestoßen ist, das bei der Behandlung von Hauttumoren wirksam ist (Shen et al., 1997). Arsensteinpulver stellte sich als die wirksame Komponente des Arzneimittels heraus. Daraufhin wurde die Wirksamkeit von As_2O_3 bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen in einer Studie mit mehr als 1000 Patienten untersucht. Dabei ergab sich ein sehr hohes Ansprechen von APL-Patienten auf die Therapie mit As_2O_3 .

1.5.3 Anwendung von Arsen in der Klinik bei der Behandlung der APL

In den 70er Jahren wurde in China mit großem Erfolg die Behandlung der APL mit As_2O_3 eingeführt (Shen et al., 1997). Die ersten 32 APL-Patienten, von denen die Harbin Gruppe berichtet, zeigten eine langanhaltende Vollremission mit einer Überlebensrate von über

fünf Jahren bei ca. 50 % der Patienten (Shen et al., 1997). Diese Daten wurden durch eine andere Studie mit 72 Patienten, die in einer in Europa nicht zugänglichen chinesischen Fachzeitschrift publiziert wurde, bestätigt (Shen et al., 1997; Zhang et al., 1998). Chen et al. zitiert eine zweite Literaturstelle aus dem Jahre 1994, in der Huang et al. eine Studie über die Behandlung von APL-Patienten mit Indigo naturalis Tabletten, die Arsendisulfid enthalten, vorstellen (Chen et al., 1996).

Insgesamt zeigen diese chinesischen Studien eine Rate klinischer Vollremission unter Behandlung mit As_2O_3 (10 mg/d i.v. infundiert über 28 bis 60 Tage) von 65,5 % bis 84 %. Rund 30 % der Patienten überlebten mehr als zehn Jahre (Shen et al., 1997). Shen et al. wie auch Soignet et al. berichten von einer 90 %igen Vollremissionsrate bei Patienten, die nur mit Arsen behandelt worden waren, wobei es sich hier um sehr niedrige Patientenzahlen handelt (Shen et al., 1997; Soignet et al., 1998).

1.5.4 Molekulare Mechanismen der Arsenwirkung

Die Wirkung von As_2O_3 beruht auf einer tumorzellspezifischen Induktion von Apoptose, die durch die Translokationsprodukte PML/RAR α oder BCR/ABL vermittelt wird (Puccetti et al., 2000; Sternsdorf et al., 1999). Über die genauen Mechanismen der Signalwege der As_2O_3 -induzierten Apoptose ist bisher wenig bekannt. In Zellen, die das APL-assoziierte Translokationsprodukt PML/RAR α exprimieren, wurde gezeigt, daß die Einwirkung von As_2O_3 auf diese Zellen zu einer Modifikation von PML/RAR α durch kovalent bindendes SUMO-1 (small ubiquitin like modifier-1) führt. Die Morphologie der subzellulären bzw. nukleären Verteilung von PML, die sogenannten „PML nuclear bodies“, wird durch As_2O_3 ebenfalls verändert (Sternsdorf et al., 1999). Diese Arbeiten konnten zeigen, daß das ebenfalls APL-assoziierte Translokationsprodukt PLZF/RAR α weder die As_2O_3 -induzierte Apoptose vermitteln kann noch PLZF/RAR α unter Einwirkung von As_2O_3 modifiziert wird. Die As_2O_3 -induzierte Apoptose verläuft in PML/RAR α exprimierenden Zellen unabhängig von den Molekülen klassischer Apoptosewege BCL-2 und Caspase-3 und läßt sich durch Caspaseinhibitoren nur teilweise blockieren (Sternsdorf et al., 1999). In BCR/ABL exprimierenden Zelllinien verläuft sie ebenfalls ohne die Beteiligung von BCL-2, Caspase-3 und BCL-X_L (Puccetti et al., 2000). Damit bleibt als einziger Hinweis die Beteiligung von

PML in der As₂O₃-vermittelten Apoptose in APL-Blasten. Von PML ist bekannt, daß es bei apoptotischen Signalwegen eine Rolle spielt und auch caspase-unabhängige Apoptose vermitteln kann (Quignon et al., 1998; Wang et al., 1998). Man weiß, daß PML in nicht-transformierten Zellen durch aktiviertes RAS bzw. onkogene Varianten von RAS hochreguliert wird (Ferbeyre et al., Dev 2000 Aug 15). Da auch BCR/ABL RAS aktiviert (Faderl et al., 1999), könnte PML tatsächlich eine gemeinsame molekulare Schnittstelle in der As₂O₃ vermittelten Apoptose bei so unterschiedlichen Krankheiten wie APL und Ph⁺ ALL bzw. CML sein.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit dem Inhibitor STI571 steht seit wenigen Jahren ein Wirkstoff für die Therapie der Ph⁺ Leukämien zur Verfügung, der hochspezifisch an die ABL-Kinasedomäne bindet und deren Aktivität ausschaltet. Einem Teil der BCR/ABL exprimierenden Zellen gelingt es jedoch, sich durch Punktmutationen im Bereich der ABL-Kinasedomäne der Wirkung von STI571 zu entziehen. Dies führt im Patienten zum Rezidiv der Krankheit. Dies ist besonders häufig bei der Ph⁺-positiven ALL, die wegen ihrer sehr schlechten Prognose eine Hochrisikogruppe unter den ALLs darstellt. Aus diesem Grund ist eine weitere Entwicklung von Substanzen, alternativ oder ergänzend zur Behandlung mit STI571, die eine besondere Bedeutung für die Therapie von STI571 resistenten Patienten haben würden, von herausragender therapeutischer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Grundlagen für neue Therapiestrategien bei der Behandlung der BCR/ABL positiver Leukämien untersucht werden. Um einen Tumorzell-spezifischen Ansatz zu finden, wurde ein molekularer Angriffspunkt im für die Leukämogenese verantwortlichen BCR/ABL Fusionprotein gesucht. In der Literatur wird der Tetramerisierung des BCR/ABL Moleküls für die Aktivierung der ABL-Kinase und damit der transformierende Aktivität von BCR/ABL, eine grundlegende Rolle zugeschrieben.

Daher wurde im ersten Teil dieser Doktorarbeit die Bedeutung der Oligomerisierung für die transformierende Aktivität und Sensibilität gegenüber STI571 von leukämogenen ABL-Fusionprotein geklärt. Darauf aufbauend sollte die Möglichkeit untersucht werden, über die Hemmung der Bildung von Oligomeren das Transformationspotential von BCR/ABL zu hemmen und damit die Antwort auf STI571 zu erhöhen.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß auch As₂O₃, eine bereits seit mehr als hundert Jahren zur Therapie der CML eingesetzte Substanz, Tumorzell-spezifisch Apoptose in BCR/ABL exprimierenden Zellen induziert. Die Renaissance des As₂O₃ als Leukämietherapeutikum basiert auf der exzellenten Wirksamkeit dieser Substanz als Monotherapie in Patienten mit t(15;17) positiver akuter Promyelozytenleukämie (APL). Es konnte gezeigt werden, daß das t(15;17) assoziierte Translokationsprodukt PML/RAR α die As₂O₃-induzierte Apoptose vermittelt, da Zellen gegenüber As₂O₃ sensibilisiert werden

können, wenn man sie mit PML/RAR α transfiziert. Auch Zellen, die mit BCR/ABL transfiziert sind, zeigen eine massiv erhöhte Sensibilität für As₂O₃-induzierte Apoptose.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollten die Gemeinsamkeiten herausgearbeitet werden, die sowohl bei der t(9;22) (Ph⁺) Leukämie als auch bei der t(15;17) positiven APL zur Induktion von Apoptose durch As₂O₃ führt. Dabei wurde der Hauptschwerpunkt auf die Rolle von PML gelegt, da PML einerseits im APL-Fusionprotein enthalten ist und andererseits ein Zielgen des RAS-Signalwegs ist, der konstitutiv von der aberranten Kinaseaktivität von BCR/ABL angeschaltet ist. Des weiteren sollte in einem Mausmodell der BCR/ABL-positiven Leukämie die Wirksamkeit von As₂O₃ als Monotherapie wieder gefestigt werden, um die Grundlagen eines therapeutischen Einsatz von As₂O₃ zur Behandlung der Ph⁺ CML und ALL zu legen.

Zusammenfassend sollten in dieser Arbeit Möglichkeiten weiterer Tumorzell-spezifischer Therapieansätze, die entweder die onkogene Kinaseaktivität von BCR/ABL beeinflussen oder molekulare Folgeerscheinungen dieser Kinaseaktivität in den Zellen als Angriffspunkt gegen die entarteten Zellen ausnutzen, aufgezeigt werden.

2 Materialien

2.1 Geräte

Bakterienkultur

Schüttelinkubator *New Brunswick Scientific*, Edison N.J. (USA)

Petrischalen, Schüttelkulturröhrchen und Kryoröhrchen von *Greiner*, Heidelberg

Bestrahlung von Mäusen

Betatron 500A von *Siemens*,

Blutbilder

Technicon H3 RTX von *Bayer*, Leverkusen

Chemilumineszenzdetektion

Filme X-omat AR und BioMax von *Eastman-Kodak*, Rochester (USA)

Durchflußzytometrie

FACScan von *Beckton Dickinson*, Heidelberg

Elektroporation

Gene Pulser System mit Elektroporationsküvetten 0,4 cm von *BioRad*, München

Fluoreszenzmikroskop

„Axioplan II-imaging microscope“ von *Zeiss*, Göttingen, Deutschland)

Gelelektrophoresen

DNA-Subcell und Mini-Subcell System, Spannungsgeber ST504, Sequenzierapparaturen

Modelle S1 und S2, Spannungsgeber 2297 Macrodrive 5 von *Gibco BRL*,

Bethesda (USA)

Geltrockner 583 von *BioRad*, München

Protean II-Minigelapparaturen von *BioRad*, München

Glasfaserfilter, rund, von *Schleicher & Schuell*, Dassel

Glaswaren von *Schott*, Mainz

Konfokales Mikroskop

Leica TCS-NT von *Leica*, Wetzlar, Deutschland

Magnetische Zellseparation (MACS)

„MiniMACS separation unit“, „MidiMACS separation unit“ und „MACS multistand“ von
Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland

PCR

PCR-Gerät und Thermal Cycler von *Perkin Elmer Cetus*, Norwalk (USA)

Sequenzierung

ABI PRISM™ 310 GENETIC ANALYZER von *Perkin Elmer Cetus*, Norwalk (USA)

Spektralphotometrie

DNA-Photometer GeneQuant von *Pharmacia*, Uppsala (Schweden)

Spektrophotometer Ultrospec III von *Pharmacia*, Freiburg

Umkehrmikroskop von *Zeiss*, Oberkochen

Sterilbank Class II von *Nuair*, *Zapf Instruments*, Sarstedt

Zentrifugen

Zentrifuge J2-MC mit Rotor JA 20 und JA 10 von *Beckman Instruments*, München

Megafuge 1.0 mit Rotor BS4402/A von *Heraeus*, Hanau

Kühlzentrifuge Z320K von *Hermle*, Gosheim

Tischzentrifuge 5415C von *Eppendorf Gerätebau*, Hamburg

Zentrifuge Rotina 48 RS mit Rotor 4394 und 4344 von *Hettich*, Tuttlingen

Zytozentrifuge Cytospin3 von *Thermo Shandon*, Pittsburgh, USA

2.2 Chemikalien

Borsäure, Bromphenolblau, CaCl₂, CAPS, CDTA, DEPC, 3,3'-Diaminobenzidin, 2,4-Dichlornaphthol, DMSO, DTT, EDTA, Ethidiumbromid, Ficoll, Glukose, Glycerin, Guanidinthiocyanat, HEPES, H₂O₂, Laurylsarkosyl, Methylenblau, Mineralöl, MOPS, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Na N₃, Nonidet P-40, PEG 8000, PMSF, Ponceau S, PVP, SDS, Thioglykolat, TRIS, Triton X-100 und Tween20, Xylencyanol von *Sigma*, Deisenhofen

MgCl₂ und Saccharose von *Serva*, Heidelberg

Wasser, ultrarein von *Biochrom*, Berlin

Essigsäureanhydrid, Guanidinhydrochlorid, β-Mercaptoethanol und Triethanolamin von *Fluka Feinchemikalien GmbH*, Neu-Ulm

Ammoniumpersulfat, Chloroform, Ethylacetat, Salzsäure, Isoamylalkohol, Isopropanol, MgSO₄, Natriumacetat, Natriumcitrat, Natronlauge, Paraformaldehyd und Silikagel-Chromatographie-Platten von *Merck*, Darmstadt

Aceton, BSA, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Glycin, Harnstoff, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Methanol, NaCl, NaOH, Phenol und X-Gal von *Roth GmbH*, Karlsruhe

SDS von *Pierce*, Rockford (USA)

2.3 Spezielle Reagenzien und Materialien

2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

E. coli – HB101: sup E44, hsd s20, (r_B⁻m_B⁻)rec A13 ara-14, pro A2, lacY1, galK2, rps L20 xyl-5mtl-1

E. coli – DB3.1: F⁻ gyrA462 endA⁻ D(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2L20(Sm^r)5 λ⁻ leu mtl1

Beide von *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2 Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide

pCDNA3 (CMV-Pro, lacP, lacZ, fl(-) ori, SV 40 ori, Neo, TK poly(A), Col E1 ori) von *Stratagene*, La Jolla (USA) mit folgenden Konstrukten: p185^(BCR-ABL), ΔCCp185, BCC-ABL, PCC-ABL, POZ-ABL, HLH-ABL

pGMTSVneo (MT1-Pro, lacZ, fl(-) ori, SV40 ter, Neo, Amp, Col E1 ori) (Grignani et al., 1993) mit folgenden Konstrukten: PML3 (Jensen et al., 2001), RasV12

pCR2.1 (lacZ', Amp, Col E1, fl ori, M13rev/T7-Pro) von *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland
pGEX4T3 von *Amersham Biosciences*, Freiburg

pENTR1A (attL1, ccdB, attL2, Km^r, pUCori, T1, T2) von *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland
PINCO (MoMulv LTR5', Mo-MuPS, Mo-Mu-Pol, CMV-Pro, eGFP, Mo-Mulv-LTR3', puro^r, PGK-1-Pro, EBNA-1, oriP, TK-term, Amp^r) (Grignani et al., 1998) mit dem Konstrukt p185^(BCR/ABL)

PINCO-GWB (modifizierter PINCO)(MoMulv LTR5', Mo-MuPS, Mo-Mu-Pol, attR1, ccdB, Cm^r, attR2, CMV-Pro, eGFP, Mo-Mulv-LTR3', puro^r, PGK-1-Pro, EBNA-1, oriP, TK-term, Amp^r) mit folgenden Konstrukten: ΔCCp185, BCC-ABL, PCC-ABL, POZ-ABL, HLH-ABL

PIDep185-GWB (modifizierter PINCO) (MoMulv LTR5', Mo-MuPS, Mo-Mu-Pol, p185^(BCR-ABL), CMV-Pro, attR1, ccdB, Cm^r, attR2, Mo-Mulv-LTR3', puro^r, PGK-1-Pro, EBNA-1, oriP, TK-term, Amp^r) mit folgenden Konstrukten: BCC-GFP, BCC-FLAG

2.3.3 Verwendete primäre Antikörper

monoklonaler Maus-anti-c-ABL (Klon 24-11)-IgG₁-Antikörper (α-ABL)

monoklonaler Maus-anti-p53 (Klon DO-1) IgG_{2a} Antikörper (α-p53)

polyklonaler Kaninchen-anti-c-ABL (Klon K-12)-IgG-Antikörper (α-ABL)

alle von *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz (CA)

monoklonaler Maus-anti-Phosphotyrosin (Klon 4G10)-IgG_{2bκ}-Antikörper (α-PY) von *Upstate*, Lake Placid (NY)

monoklonaler Maus-anti-PML Antikörper PGM3 von *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA

monoklonaler Ratte IgG_{2a,κ} Immunglobulin, Isotypkontrolle, R-Phycoerythrin konjugiert

monoklonaler Ratte IgG_{2b,κ} Immunglobulin, Isotypkontrolle, R-Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler Ratte anti-Maus Sca-1 IgG_{2a,κ} Antikörper, R-Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler Ratte anti-Maus Gr-1 IgG_{2b,κ} Antikörper, R-Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler Ratte anti-Maus Mac-1 IgG_{2b,κ} Antikörper, R-Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler Ratte anti-Maus CD45R/B220 IgG_{2a,κ} Antikörper, R-Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler armenischer Hamster anti-Maus CD3ε IgG Gruppe 1, κ Antikörper, R-
Phycoerythrin konjugiert
monoklonaler Ratte anti-Maus Ter-119 IgG_{2b,κ} Antikörper, R-Phycoerythrin konjugiert
alle von *BD Biosciences*, San José, CA, USA
„mouse lineage panel“ von *PharMingen*, San Diego, CA, USA

2.3.4 Verwendete sekundäre Antikörper

Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L-Ketten)-Antikörper, konjugiert mit CyTM3, orange fluoreszierend von *ZYMED*, San Fransisco (CA)
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), grün fluoreszierend von *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz (CA)
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, konjugiert mit Rhodamin, rot fluoreszierend von *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz (CA)
Schwein-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, Peroxidase-konjugiert von *DAKO*, Glostrup (Dänemark)
Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper, Peroxidase-konjugiert von *DAKO*, Glostrup (Dänemark)
Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, konjugiert mit Peroxidase von *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz (CA)

2.3.5 Verwendete Zelllinien

2.3.5.1 Etablierte Zelllinien

BV173: B-Vorläufer-Zelllinie, die von peripheren Blasten eines CML-Patienten in der Blastenkrise abgeleitet wurde; exprimiert p210^(BCR-ABL)

- Sup-B15: B-Vorläufer-Zelllinie, die im Rezidiv aus dem Knochenmark eines ALL-Patienten abgeleitet wurde; exprimiert p185^(BCR-ABL)
- Tom-1: B-Vorläufer-Zelllinie, die aus dem Knochenmark eines Therapie-refraktären ALL-Patienten abgeleitet wurde; exprimiert p185^(BCR-ABL)
- U937: humane promonozytäre Zelllinie, die mit Vitamin D₃ oder PMA zu reifen Monozyten ausdifferenziert; Ph-
- Nalm-6: lymphoblastische B-Zelllinie; Ph-
- K-562: Humane Lymphozytenzelllinie, die aus einer Pleuraleffusion einer 53-jährigen Frau mit CML in der Blastenkrise etabliert wurde. Exprimiert p210^(BCR/ABL)
- Kasumi-1: Humane Lymphozytenzelllinie die aus dem peripheren Blut eines 7-jährigen männlichen Japaner mit akuter myelopischer Leukämie etabliert wurde, Exprimiert das AML-1/ETO Fusionsprotein
- Ba/F3: murine pro-B Zelllinie, IL-3 abhängig, aus peripherem Blut etabliert.
- Phoenix: Humane embryonale Nierenzelllinie abgeleitet von 293T. Exprimiert die retroviralen Strukturgene *gag*, *pol* und *env* (Verpackungszelllinie). Ecotrope Phoenix-Zellen produzieren Retroviren, die nur Maus- oder Rattenzellen infizieren.
- Rat-1: Rattenfibroblasten-Zelllinie

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.

2.3.5.2 Nicht etablierte Zelllinien

- U937 MT: U937-Zellklone, die mit dem leeren Expressionsvektor pGMTSVneo transfiziert sind
- U937 MTp185: U937-Zellklone, die das p185^(BCR-ABL)-Translokationsprodukt durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren (Puccetti et al., 2000)
- U937 MTp210: U937-Zellklone, die das p210^(BCR-ABL)-Translokationsprodukt durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren

U937 MTP/R9: U937-Zellklone, die das PML/RAR α -Translokationsprodukt durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren (Grignani et al., 1993)

U937 MTPML3: U937-Zellklone, die das PML3-Protein durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren (Jensen et al., 2001)

U937 Mt4B/RAR α : U937-Zellklone, die das PLZF/RAR α -Translokationsprodukt durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren (Ruthardt et al., 1997)

U937 MTV12RAS: U937-Zellklone, die das V12Ras-Protein durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren

U937 MTHA-AML-1/ETO: U937-Zellklone, die das Hämagglutinin-markierte AML-1/ETO-Translokationsprodukt durch Zn²⁺ induzierbar exprimieren (Ferrara et al., 2001)

2.3.6 Verwendeter Mausstamm

C57BL/6N von *Charles River*, Sulzfeld

2.3.7 Sonstige molekular- und zellbiologische Reagentien und Materialien

Mikrobiologische Materialien

Bacto-Trypton, Hefeextrakt und Bacto-Agar von *Biotest*, Dreieich

Gelatine, Maltose und Milchpulver von *Difco*, Detroit (USA)

Isopropylthio- β -D-Galaktosid (IPTG), Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Caseinhydrolysat und Lysozym von *Sigma*, Deisenhofen

DNA-Präparation und Reinigung

Qiagen Plasmid Maxi Präparationskit von *Qiagen*, Düsseldorf

Qiagen Plasmid Mini Präparationskit von *Qiagen*, Düsseldorf

Qiagen PCR-Purifikation Kit von *Qiagen*, Düsseldorf

Polyethylenglycol von *Sigma*, Deisenhofen

0,22 μ M Zelluloseacetatfilter von *Corning*, Schiphol-Rijk (Niederlande)

Proteinpräparation

Gluthationsepharose von *Amersham Biosciences*, Freiburg

Zellkultur

DMEM- und RPMI-Medium, FCS, L-Glutamat, Penicillin/Streptomycin und Trypsin von *Gibco BRL*, Paisley (Schottland)

0,9 %ige NaCl-Lösung von *Braun*, Melsungen

Zellkulturschalen und Einfrierröhrchen von *Greiner*, Heidelberg und *Nunc*, Roskilde (Dänemark)

MACS „LS-separation columns“, MACS „pre separation filter“ und „Sca-1 multisort kit“ von *Miltenyi Biotech*, Bergisch Gladbach, Deutschland

Retronektin von *Takara*, Otsu, Shiga, Japan

1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen-Polymethobromid (Hexamethrinbromid, Polybrene) von *Sigma*, Deisenhofen

0,2 und 0,45 µm Spritzenfilter (Millex-HA) von *Millipore*, Cork, Irland

„FACS Lysing solution“ von *BD Biosciences*, San José, CA, USA

Methylcellulose „Methocel MC“ von *Fluka Feinchemikalien GmbH*, Neu-Ulm

Zellsiebe („cell strainer“) 40µm und 70 µm Porengröße von *BD Labware*, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Double cytofunnel von *Thermo Shandon*, Pittsburgh, USA

Erstellen von Blutbildern

Unopette von *Becton Dickinson Vacutainer Systems*, Franklin Lakes, USA

35 µl-Clinitube von *Radiometer*, Kopenhagen, Dänemark

Zellstimulantien

Arsentrioxid (As_2O_3) von *Sigma*, Deisenhofen

STI571 (Glivec) von *Novartis*, Basel (Schweiz)

Doxorubicin von *Sigma*, Deisenhofen

Cytokine

Murine IL-3 (Interleukin 3), murine IL-6 (Interleukin 6), murine SCF (stem cell factor) alle aus *E. coli* von *CELL CONCEPTS*, Umkirch, Deutschland.

Enzyme

Restriktionsendonukleasen von New England Biolabs, Frankfurt am Main *Gibco BRL*, Bethesda (USA), *Biolabs*, *Promega Cooperation*, Madison (USA) und *Stratagene*, La Jolla (USA)

Proteinase K, Taq und Pfu-DNA-Polymerase, T3- und T7-RNA-Polymerase von *Stratagene*, La Jolla (USA) und *Gibco BRL*, Bethesda (USA)

CIP, Klenow-Enzym, T4-Polynukleotidkinase und T4-Ligase von *New England BioLabs*, Frankfurt am Main

T4-Ligase und DNase I von *Gibco BRL*, Bethesda (USA)

Rnase A von *Sigma*, Deisenhofen

Abi Prism Terminator Ready Reaction Mix von *Perkin Elmer Cetus*, Norwalk (USA)

Prime-It II Random Primer Labeling Kit von *Stratagene*, La Jolla (USA)

„Gateway LR clonase enzyme mix“ von *Invitrogen*, Karlsruhe, Deutschland

„TA-Cloning-Kit“ von *Stratagene*, Mannheim, Deutschland

Sonstiges

Acrylamid von *Sigma*, Deisenhofen

TEMED, Methylenbisacrylamid und BioRad-Bradford-Reagenz von *BioRad*, München

Agarose, DNA-Längenstandards und dGTP/dATP/dTTP/dCTP-Nukleotide von *Gibco BRL*, Gaithersburg (Schottland)

Neo-Kodan von Schülke & Mayr, Norderstedt

Forene (Isofluran) von Abbott GmbH, Wiesbaden

27 GA $\frac{3}{4}$ Kanülen (Microlance 3) von Beckton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Tritriplex III, 1,1% von *Apotheke des Klinikums der JWG Universität*, Frankfurt

DMS und Piperidin von *Fluka Feinchemikalien GmbH*, Neu-Ulm

Oligonukleotide von *Interactiva*; Ulm und *MWG-Biotech*, Ebersberg

„superose 6 HR 10/30 size exclusion column“ von *Pharmacia*, Uppsala, Schweden

„RAS Activation Assay Kit“ von *Upstate Biotechnology*, Lake Placid, New York, USA

3 Methoden

3.1 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

3.1.1 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.

3.1.2 Bakterienlagerung

Lagermedium: 65 % (v/v) Glycerin
0,1 M MgSO₄
0,025 M TrisHCl, pH 8,0

In ein Einfrierröhrchen werden zu 900 µl einer Bakterien-Übernachtskultur ein gleiches Volumen Lagermedium gegeben, alles gemischt und bei -20 °C oder -75 °C aufbewahrt.

3.1.3 Präparation geringer Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) (Sambrook und Russel, 1989)

Lösung 1: 24 mM TrisHCl, pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA

Lösung 2: 0,2 M NaOH; 1 % (v/v) SDS;

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat, pH 4,8

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol:

Phenol (mit TrisHCl, pH 8,0 equilibriert):

Chloroform : Isoamylalkohol

im Verhältnis 25 : 24 : 1; v/v/v

1,5 ml einer Bakterienübernachtskultur werden sedimentiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Bakterien werden in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Danach werden 200 µl Lösung 2 zur Lyse der Bakterien zugegeben und der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3, die die genomische DNA ausfällt, wird weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien werden für 5 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Nach Extraktion der Plasmid-DNA mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch wird sie anschließend aus der Oberphase durch die Zugabe des zweifachen Volumens Ethanol bei -20 °C ausgefällt. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 15 min) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 20 bis 30 µl ddH₂O oder TE-Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert. Ein Aliquot wird unter dem Zusatz von Ribonuklease A (10 mg/ml) zum Abbau der RNA in einer Endkonzentration von 10 µg/ml für einen analytischen Restriktionsverdau eingesetzt. Hierdurch wird bestimmt, welche der verwendeten Bakterienkolonien erfolgreich mit dem gewünschten Plasmid transformiert wurden.

3.1.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA mit PEG-Fällung (Sambrook und Russel, 1989)

Die Maxi-Präparation dient der Herstellung von großen Mengen der zur Transformation benötigten DNA. Dazu werden 250 ml einer Übernachtskultur sedimentiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C). Die Bakterien werden entsprechend der oben beschriebenen Mini-Präparation in 6 ml Lösung 1 resuspendiert. Danach werden 12 ml Lösung 2 zugegeben und der Ansatz für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 9 ml Lösung 3 wird der Ansatz weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien werden für 5 min bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Auf der Oberphase wird Ribonuklease A (10 mg/ml) in einer

Endkonzentration von 20 µg/ml eingesetzt und bei 37 °C 20 min inkubiert. Nach zwei Extraktionen mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zwei Extraktionen mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol wird aus der Oberphase die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,2 faches Volumen Ethanol bei -20 °C ausgefällt. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 15 min) wird die DNA vakuumgetrocknet und in 1,6 ml ddH₂O resuspendiert. Danach werden zur weiteren Aufreinigung der DNA 400 µl 4 M NaCl und 2 ml 13 % PEG 8000 Lösung dazugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 4 °C, 15 min) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 500 bis 1000 µl ddH₂O oder TE-Puffer (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) rückgelöst.

3.1.5 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren (*Sambrook und Russel, 1989*)

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

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

(C = Konzentration in µg/ml; OD = optische Dichte; f = Verdünnungsfaktor; n = 50 µg/ml für DNA, n = 40 µg/ml für RNA und n = 37 µg/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 OD₂₆₀/OD_{280nm} sollte für DNA 1,8 und für RNA 2,0 betragen.

3.2 RNA-Extraktion aus Zellen

3.2.1 RNA-Extraktion durch Ultrazentrifugation

Die Zellen mit der zu extrahierenden RNA werden zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 4 M Guanidiniisothiocyanat (BRL, Ultra Pure) resuspendiert und gevortext. Anschließend wird der Ansatz mit Caesiumchlorid (BRL, Ultra Pure) überschichtet und bei 18 °C mit 31.000 rpm 16 h lang zentrifugiert. Die obere Schicht wird zusammen mit der genomischen DNA entfernt. Danach wird der obere Teil des Tubes mit einem heißen Skalpell abgeschnitten und der Überstand im verbliebenen Tube bis auf ca. 1 ml entfernt. Der restliche

Überstand wird in ein steriles Tube überführt und das RNA Pellet 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Dann wird die RNA in RNase freiem ddH₂O resuspendiert und die Proteine mit Phenol (anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (14.000 rpm für 5 min) und Chloroform/Isoamylalkohol (14.000 rpm für 3 min) beseitigt. Die RNA wird dann in 0,3 M NaAc mit 2 Volumina kaltem EtOH präzipitiert. Mit dieser Methode können pro 1.000.000 Zellen 0,5 bis 2 µg RNA gewonnen werden.

3.2.2 RNA-Extraktion mit RNA-zol

Lösungen: RNAzol™ B
 Chloroform
 Isopropanol
 75% Ethanol
 1 mM EDTA, pH 7

Die Zellen werden gezählt, bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert und 1 ml mit PBS gewaschen. Pelletierte Zellen werden in 0,2 ml RNAzol (0,2 ml für $1 \cdot 10^6$ Zellen einer Suspensionszelllinie bzw. $4 \cdot 10^6$ primäre hämopoetische Zellen) durch auf- und abpipettieren resuspendiert und dabei gleichzeitig lysiert. Pro 2 ml Homogenisat werden 0,2 ml Chloroform zugefügt und durch Schütteln gut gemischt. Diese Mischung wird 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird 15 min bei 4°C mit 12000*g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Röhrchen übertragen, mit demselben Volumen Isopropanol gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Das RNA-Präzipitat wird durch 15 min Zentrifugation bei 4°C mit 12000*g pelettiert. Das Pellet wird einmal mit 75% Ethanol unter Vortexen gewaschen und anschließend 8 min bei 4°C mit 7500*g zentrifugiert. Der Ethanol wird anschließend abgesaugt und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird in 1 mM EDTA, pH 7 unter Vortexen gelöst.

3.3 cDNA-Synthese aus RNA

Zur Synthese von cDNA aus RNA werden ca. 4 µg RNA in 10 µl DEPC H₂O aufgenommen. Zu der RNA werden 0,5 µg Hexamere (dN6) gegeben und der Ansatz für 5 min auf 70 °C

erhitzt. Anschließend werden auf Eis 1 µl dNTP, 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT (GIBCO BRL) und 1 µl RNase Inhibitor (Amersham pharmacia biotech) hinzugefügt. Die Tubes werden gut gemischt und je 1 µl Reverse Transcriptase (Super Script; GIBCO BRL) zugegeben. Die Ansätze werden für 1 h bei 42 °C inkubiert und danach bei 70 °C 10 min lang inaktiviert. Die so entstandene cDNA wird mit 30 µl DEPC H₂O aufgefüllt.

3.4 Klonierung von cDNA-Konstrukten und Analyse von Plasmid-DNA

3.4.1 Allgemeine Klonierungsmethoden

3.4.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionen von Plasmid-DNA werden für analytische oder präparative Zwecke durchgeführt. Ein Ansatz enthält den vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer, die gewünschte DNA-Menge (0,5-3 µg für analytische bzw. 4-10 µg für präparative Restriktionsansätze) und 5 U Enzym pro µg DNA und wird 1 h unter den erforderlichen Temperaturbedingungen inkubiert.

3.4.1.2 Herstellung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten, die in Plasmid- oder Expressionsvektoren inkloniert werden sollen. Die notwendigen Oligonukleotidprimer werden so entworfen, daß sie zu definierten DNA-Sequenzen komplementär sind. Des weiteren besteht die Möglichkeit, innerhalb von flankierenden komplementären Primersequenzen nicht-komplementäre Abschnitte einzufügen. Dadurch können Restriktionsenzymstellen eingefügt werden, die später für die Klonierung gebraucht werden. Außerdem können Sequenzänderungen vorgenommen werden, die sich nach Transkription und Translation in Aminosäuresequenzänderungen niederschlagen (= gerichtete Mutagenese).

Ein standardisierter 50 µl PCR-Ansatz enthält 5 bis 50 ng Matrizen-DNA, 1x Reaktionspuffer (10 mM KCl; 6 mM Ammoniumsulfat; 20 mM TrisHCl, pH 8,0; 2 mM MgCl₂; 0,1 % Triton X-100; 10 µg/ml BSA), beide Oligonukleotid-Primer (je 25 pmol = 0,25 µM), je

2,5 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP und 2,5 U Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene). Die PCR wird in einem DNA Thermal Cycler von Perkin Elmer durchgeführt.

Es wird folgendes Temperaturprofil verwendet: Denaturierung: 98 °C für 5 min; Hybridisierung: 60°C für 1 min; Elongation: 68 °C für 2 min je Kilobase Fragmentlänge; insgesamt werden 25 Zyklen durchgeführt.

Falls diese Bedingungen nicht zu dem gewünschten Reaktionsprodukt führen, werden die Reaktionsbedingungen wie folgt optimiert: Die Denaturierungsdauer wird auf 10 min erhöht und den Ansätzen wird 10 % DMSO zugesetzt. Die Hybridisierungstemperatur wird geändert und in einem Bereich von 55°C bis 65°C optimiert.

Zur Quantifizierung der Ausbeute wird 1/10 des Volumens von jedem Reaktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (s.u.) aufgetrennt. Die DNA-Konzentration wird nach Färbung der Gele mit Ethidiumbromid unter UV-Licht optisch abgeschätzt, indem gleichzeitig eine DNA-Lösung bekannter Konzentration auf demselben Gel aufgetrennt wird. Die PCR-Produkte werden mit Hilfe des PCR-Purification-Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4.1.3 „Site-directed Mutagenesis“

Die „site-directed-mutagenesis“ ist eine PCR basierte Mutagenesetechnik, bei der an definierter Stelle innerhalb einer DNA-Sequenz Mutationen (Deletionen, Insertionen oder Basenaustausche), die typischerweise eine bis mehrere Basenpaare umfassen, eingeführt werden. Für diese Mutagenese werden drei Oligonukleotidprimer benötigt, die in zwei aufeinanderfolgenden PCRs eingesetzt werden: Primer 1 flankiert am 5'-Ende, Primer 2 enthält die Mutation und liegt mittig, und Primer 3 flankiert am 3'-Ende des jeweiligen Sequenzabschnitts. Die erste PCR wird mit dem mutationstragenden Primer und einem der flankierenden Primer durchgeführt. Als Matrize dient die zu mutierende cDNA. Nach durchgeführter PCR wird für die zweite PCR 1/10 des ersten Reaktionsgemischs ohne reinigende Zwischenschritte als Matrize eingesetzt. Der PCR-Ansatz wird mit den beiden flankierenden Primern versetzt. Das resultierende PCR-Produkt stellt eine mutierte Variante der eingesetzten cDNA-Matrize dar, die von den beiden flankierenden Primern begrenzt wird.

3.4.1.4 Sequenzierung von DNA-Fragmenten (Perkin Elmer)

Die in der PCR amplifizierte Fragmente werden sequenziert. Zur Sequenzierung werden der ABI PRISM™ 310 PERKIN ELMER und der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit benutzt. Ein Sequenzierungsansatz enthält 0,5 µg Plasmid bzw. PCR-Produkt, 4 µl Abi Prism Terminator Ready Reaction Mix und 0,5 pmol Oligonukleotid (T7 oder M13) in einem Volumen von 20 µl. Die Sequenzierung wird im DNA Thermal Cycler von Perkin Elmer durchgeführt. Es wird folgendes Temperaturprofil verwendet: Denaturierung: 96 °C, 30 sec; Hybridisierung: 50 °C, 15 sec ; Elongation: 60 °C, 4 min für 25 Zyklen. Der Reaktionsansatz wird durch eine Säule "Centri-Sep column" (PRINCETON Separation) von restlichen Nukleotiden gereinigt. Schließlich wird der Ansatz im ABI PRISM™ 310 PERKIN ELMER Sequencer analysiert.

3.4.1.5 Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook und Russel, 1989)

1x TAE-Puffer:	0,04 M Tris-Acetate 0,001 mM EDTA
Agarosegele:	0,6-2,0 % Agarose in 1x TAE-Puffer 0,1 µg/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 µg/ml zugesetzt. Die Proben werden mit 0,2fachem 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.

3.4.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mittels "SPIN-X 0,22 μm " Zelluloseacetatfilter der Firma Corning durchgeführt.

Das zu präparierende DNA-Fragment wird unter UV-Licht ($\lambda = 302 \text{ nm}$) mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Das zerkleinerte Agarosestück wird in den "SPIN-X 0,22 μm " Zelluloseacetatfilter gegeben und dreimal abwechselnd für 10 min bei -80°C eingefroren und für 10 min bei 60°C aufgetaut. Der Filter wird anschließend bei $12.000 \times g$, 15 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die gefilterte Pufferlösung wird erst mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und anschließend mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die DNA wird durch die Zugabe von 0,1fachem Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,2 fachem Volumen Ethanol bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation ($12.000 \times g$, 4°C , 15 min) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol gewaschen, und 5 min bei 25°C an der Luft getrocknet. Schließlich wird die DNA in 10 bis 20 μl ddH₂O resuspendiert.

3.4.1.7 Glätten von überhängenden Enden („Klenow-fill-in“)

Zur Generierung glatter Enden nach einem Restriktionsverdau bedient man sich des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I, um 5'-überhängende Enden in glatte Enden umzuwandeln. Das Enzym baut die fehlenden komplementären Basen ein. Die Reaktion wird wie folgt durchgeführt: Die verdaute und mittels „Qiagen PCR-Purification Kit“ gereinigte DNA wird auf ungefähr 50ng/ μl DNA-Konzentration in EcoPol-Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂, 7,5 mM DTT) verdünnt. Man fügt dNTPs zu einer Endkonzentration von 33 μM je dNTP und 1 unit Klenow-Polymerase pro 1 μg DNA hinzu. Die Reaktion wird 15 min bei 25°C inkubiert und anschließend 10 min mit 10 mM EDTA bei 75°C abgestoppt.

3.4.1.8 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren mittels CIP

Um eine Rezirkularisierung von linearisierten Vektoren während der Ligation zu verhindern, wird die DNA zur Abspaltung der 3'-Phosphatgruppe mit alkalischer Phosphatase (aus Kalbsdarm, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase = CIP) behandelt.

Ein 40 µl Dephosphorylierungsansatz enthält 5 µg linearisierter Vektor-DNA, 4 µl NEBuffer 3 (1 M NaCl; 500 mM TrisHCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithiothreitol) und 20 U alkalische Phosphatase. Der Ansatz wird für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann werden erneut 20 U Enzym zugegeben und wieder für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzymaktivität wird der Ansatz für 10 min auf 75 °C erhitzt. Nach zwei Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen und anschließender Präzipitation mit Ethanol wird die DNA-Konzentration auf 50 ng/µl eingestellt.

3.4.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion von Plasmid- und Expressionsvektoren für die verschiedenen Versuchsansätze werden die mit Restriktionsenzymen behandelten Vektoren und PCR-Produkte oder DNA-Fragmente miteinander ligiert.

Die dephosphorylierte Vektor-DNA wird mit dem dreifachen molaren Überschuß freier Enden an Insert-DNA in 1x T4 DNA-Ligase Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 250 µg/ml BSA, pH 7,5) mit 1 U T4 DNA-Ligase (*Gibco BRL*) in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht, mindestens jedoch 4 h lang bei 14 °C inkubiert.

3.4.1.10 Anfügen von 3'-A Überhängen an PCR-Produkte und "TA-Klonierung"

Die *Taq*-DNA-Polymerase hat die Eigenschaft, am 3'-Ende von PCR-Produkten einen Adenosinrest anzuhängen, der nicht in der Matrizen-DNA vorhanden ist. Die hier verwendete *Pfu*-DNA-Polymerase hat diese Eigenschaft nicht. Die 3'-A-Überhänge lassen sich aber durch Zugabe von 1 U *Taq*-DNA-Polymerase zum PCR-Reaktionsgemisch nach Beendigung der *Pfu*-Polymerase-Reaktion und Inkubation bei 72°C für 10 min anfügen. Die Reaktion muß sofort danach durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung abgestoppt werden.

Diesen 3'-A Überhang kann zur Klonierung verwendet werden, indem ein Vektor mit 5'-T-Überhang als Ligationspartner gewählt wird. Dieser Vektor (pCR2.1) sowie die anderen benötigten Ligationsreagentien werden kommerziell vertrieben („TA-Cloning-Kit“, Stratagene, Mannheim, Deutschland). In einem Endvolumen von 10 µl pipettiert man 1 µl T4-DNA-Ligase (4 Weiss units/µl), 1 µl 10x Reaktionspuffer (60 mM Tris-HCl, pH7,5; 60 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mg/ml BSA; 70 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM ATP; 20 mM DTT, 10 mM Spermidin), 2 µl pCR2.1 (25 ng/µl), 2 µl frisches PCR-Produkt und 4 µl steriles Wasser. Die Inkubation erfolgt bei 4°C für mindestens 4 Stunden.

3.4.1.11 Rekombination („gateway LR clonase enzyme kit“ von Invitrogen)

Kürzlich wurde eine alternative Klonierungsmethode zur Ligation entwickelt, die auf den gerichteten Rekombinationsreaktionen des Bakteriophagen λ beruht. Dabei werden Sequenzen, die von zwei verschiedenen sogenannten „attachment sites“ flankiert sind, durch einen speziellen Enzymmix (Integrase und Excisionase des Bakteriophagen λ; „integration host factor“ von *E. coli*) von einem Donorplasmid (pENTR1A, auch „entry“-Klon genannt) in ein Akzeptorplasmid („destination vector“) übertragen. Die vorher im „destination vector“ vorhandenen Sequenzen zwischen den „attachment sites“ werden dabei durch die entsprechenden Sequenzen des „entry“-Klons ersetzt. Die „attachment sites“ von Donor- und Akzeptorplasmid sind voneinander verschieden, so daß eine gerichtete, nicht reversible Reaktion stattfindet. Dadurch daß auch die 5'- bzw. 3'-flankierenden „attachment sites“ unterschiedlich sind, bleibt die 5'-3'-Orientierung der flankierten Sequenzen wie sie im „entry“-Klon vorliegen im „destination vector“ erhalten. Die für die Rekombination benötigten Reagentien sind im „Gateway LR-clonase enzyme kit“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) enthalten. Man pipettiert 4 µl „LR-reaction buffer“ (Zusammensetzung vom Hersteller nicht genannt), 300 ng DNA des „entry“-Klons, 300 ng DNA des „destination“ Vektors und füllt mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH7,4; 1 mM EDTA, pH8,0) auf 16 µl auf und mischt. Anschließend gibt man 4 µl der „LR-Clonase“ Enzymmischung (Zusammensetzung vom Hersteller nicht genannt) zu, mischt und inkubiert 1 Stunde bei Raumtemperatur. 4 µl des Reaktionsgemisch werden anschließend in *E. coli* HB101 transformiert.

3.4.2 Klonierung von „gateway destination“ Vektoren

Für die Rekombination werden folgende Vektoren mit der „gateway reading frame cassette B“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in „gateway destination“ Vektoren umkloniert:

pCDNA3 (*Stratagene*, La Jolla, USA) wird mit EcoRV verdaut, dephosphoryliert und mit der „gateway reading frame cassette B“ ligiert (pCDNA3-RFB).

PINCO (Grignani et al., 1998) wird mit EcoRI verdaut, die Schnittstelle wird geglättet, dephosphoryliert und mit der „gateway reading frame cassette B“ ligiert (PINCO-RFB).

PIDep185: PINCO wird mit NotI und BstBI verdaut und die Enden geglättet, um das GFP zu deletieren. Der Vektor wird mit sich selbst ligiert (PIDE). pCp185^(BCR/ABL)DNA3 (Pucetti et al., 2000) wird mit EcoRI verdaut und mit einem EcoRI verdauten und dephosphorylierten PIDE-Vektor ligiert (PIDep185). Daraufhin wird PIDep185 mit HindIII verdaut, geglättet und mit der „gateway reading frame cassette B“ ligiert (PIDep185-RFB).

3.4.3 Klonierung der verwendeten cDNA-Konstrukte

Alle PCR-Reaktionen werden mit Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt. Im Anschluß an jede Ligation eines PCR-Produkts mit einem Vektor wird eine Sequenzierung nach Sanger zur Überprüfung der Sequenz durchgeführt. Alle eingesetzten Vektoren werden nach dem Verdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen dephosphoryliert.

Ras^{V12}: Für die Klonierung von Ras^{V12} wird eine PCR mit folgenden Primer und H-Ras cDNA als Matrize durchgeführt: 5'-ggagcgatgacggaatataagctggtggtggtggcgctgtaggcgtggg-3' – Start-ATG unterstrichen, Valin-Kodon kursiv) und 5'-tcaggagagcacacactgacagctcatgc-3' – Stop-Kodon unterstrichen). Anschließend werden mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pCRas^{V12}). PCRas^{V12} wird mit XbaI und SpeI verdaut und mit XbaI-verdauten Vektor pGMTSVneo (Grignani et al., 1993) ligiert (pGMTRas^{V12}Svneo).

PML3: cDNA von PML 3 (Jensen et al., 2001) wird mit XbaI und SpeI verdaut und mit XbaI-verdauten Vektor pGMTSVneo (Grignani et al., 1993) ligiert (pGMTPML3Svneo).

Δ CCp185: Um die „coiled-coil“-Region (Aminosäuren 1-63) aus der cDNA von p185^(BCR/ABL) (Puccetti et al., 2000) zu entfernen und durch ein Startcodon zu ersetzen werden folgende Oligonukleotidprimer entworfen und in einer PCR mit pCp185^(BCR/ABL)DNA3 als Matrize eingesetzt: Primer A (5'-atctacctgcagacgacgatggccaag-3' - Startcodon unterstrichen) und Primer B (5'-atggcccttgccgatccgctcg-3' - BamHI-Schnittstelle unterstrichen). Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (p Δ ACC). Der Expressionsvektor pCp185^(BCR/ABL)DNA3 (Puccetti et al., 2000) wird mit BamHI verdaut, wodurch das „coiled-coil“ kodierende 5'-Ende von p185^(BCR/ABL) als Fragment isoliert und entfernt werden konnte. p Δ ACC wird mit BamHI verdaut, das gewünschte Fragment isoliert und mit dem BamHI-verdauten pCp185^(BCR/ABL)DNA3-Vektor zur Δ CCp185 kodierenden cDNA ligiert (p Δ CCp185DNA3).

BCC-ABL: pCp185^(BCR/ABL)DNA3 dient als Matrize für eine PCR-Reaktion mit folgenden Primern: Primer 1 (5'-ccaccatgggtggaccgggtgggcttc-3' - Start-codon unterstrichen) und Primer 2 (5'-cgctgaagggcttcttcagcaacgtctgcaggt-3' - ABL-komplementäre Sequenzen unterstrichen, BCR-komplementäre Sequenzen kursiv). Das resultierende PCR-Produkt umfaßt die ersten 189 Basenpaare von BCR sowie die ersten 17 ABL-Basenpaare nach dem m-BCR Bruchpunkt. Es wird in einer zweiten PCR als sogenannter „Megaprimer“ zusammen mit dem Primer 3 (5'-aggcccatggtaccaggagtg-3' - KpnI-Schnittstelle unterstrichen) eingesetzt. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pCBCC-ABL-Kpn). pCBCC-ABL-Kpn wird mit KpnI verdaut, das gewünschte Fragment isoliert und mit KpnI-verdauten pCp185^(BCR/ABL)DNA3-Vektor zur BCC-ABL kodierenden cDNA ligiert (pCBCC-ABLDNA3)

HLH-ABL: Zunächst wird für die Klonierung weiterer Konstrukte ein Hilfsvektor kloniert. Er kodiert für eine BCR-ABL abgeleitete Sequenz, die vom m-BCR Bruchpunkt, an

dem eine EcoRV-Schnittstelle eingefügt wird, bis zur KpnI-Schnittstelle in den ABL-Sequenzen reicht. Dazu werden Primer 4 (5'-catggagacggatatcaagcccttcagcgg-3' – EcoRV-Schnittstelle unterstrichen) und Primer 3 für eine PCR mit pCp185^(BCR/ABL)DNA3 als Matrize eingesetzt. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-EcoRV-ABL-Kpn). Die TEL-HLH-codierende cDNA wird durch PCR mit dem Primer 5 (5'-gcgcacctgagcatggagccaatttactgga-3' – HLH-Start-Kodon unterstrichen) und Primer 6 (5'-ggtgaaaaagaatcccgggttcctctgc-3' - SmaI Schnittstelle unterstrichen) hergestellt. Als Matrize diene cDNA, die durch RT-PCR aus HL-60 Zellen gewonnen wird. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-HLH-Sma). pC-EcoRV-ABL-Kpn wird mit EcoRV verdaut. pC-HLH-Sma wird mit SmaI verdaut, dephosphoryliert und mit dem EcoRV-Fragment von pC-EcoRV-ABL-Kpn ligiert (pC-hlh-abl-Kpn). Anschließend wird die Fusionsstelle von HLH mit ABL mittels „site-directed-mutagenesis“ so korrigiert, daß die ABL-Sequenzen dem des m-BCR Bruchpunkts entsprechen. Dazu wird mit Primer 3 und Primer 7 (5'-cagaggaaacc/gaagaagcccctcagcgg-3' – der Schrägstrich markiert die Fusionsstelle) die erste PCR-Runde mit pC-hlh-abl-Kpn als Matrize durchgeführt. Die zweite PCR-Runde wird mit Primer 5 und Primer 3 durchgeführt. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-HLH-ABL-Kpn). pCHLH-ABL-Kpn wird mit KpnI verdaut, das gewünschte Fragment isoliert und mit KpnI-verdauten pCp185^(BCR/ABL)DNA3-Vektor zur HLH-ABL kodierenden cDNA ligiert (pCHLH-ABLDNA3)

PCC-ABL: Die „coiled-coil“ umfassenden Sequenzen von PML (PCC) werden mittels PCR gewonnen. Als Matrize diene die publizierte cDNA von PML/RAR (Grignani et al., 1993). Vor der „coiled-coil“ wird ein Kozak-ATG eingeführt. Für diese PCR werden Primer 8 (5'-ccgccatgacgcagcgcgctgcag-3' – Kozak-ATG unterstrichen) und Primer 9 (5'-agagctgaggttagctagcggacctgaact-3' – SnaBI-Schnittstelle unterstrichen) verwendet. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-

Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-PCC-SnaBI). pC-EcoRV-ABL-Kpn wird mit EcoRV verdaut. pC-PCC-SnaBI wird mit SnaBI verdaut, dephosphoryliert und mit dem EcoRV-Fragment von pC-EcoRV-ABL-Kpn ligiert (pC-pcc-abl-Kpn). Anschließend wird die Fusionsstelle von PCC mit ABL mittels „site-directed-mutagenesis“ so korrigiert, daß die ABL-Sequenzen dem des m-BCR Bruchpunkts entsprachen. Dazu wird mit Primer 3 und Primer 10 (5'-cgagttcaaggtgcgcta/gaagaagcccctcagcgg-3' – der Schrägstrich markiert die Fusionsstelle) die erste PCR-Runde mit pC-pcc-abl-Kpn als Matrize durchgeführt. Die zweite PCR-Runde wird mit Primer 8 und Primer 3 durchgeführt. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-PCC-ABL-Kpn). pC-PCC-ABL-Kpn wird mit KpnI verdaut, das gewünschte Fragment isoliert und mit KpnI-verdauten pCp185^(BCR/ABL)DNA3-Vektor zur PCC-ABL kodierenden cDNA ligiert (pC-PCC-ABLDNA3).

POZ-ABL: Die „Pox-virus and Zinc-finger domain“ umfassenden Sequenzen von PLZF (POZ) wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und StuI aus der zuvor publizierten cDNA von PLZF (Ruthardt et al., 1998) ausgeschnitten. Die HindIII-Schnittstelle wird geglättet. pC-EcoRV-ABL-Kpn wird mit EcoRV und KpnI verdaut und das resultierende Fragment mit einem EcoRV und KpnI verdauten pENTR1A ligiert (pE-EcoRV-ABL-Kpn). pE-EcoRV-ABL-Kpn wird mit EcoRV verdaut und mit dem geglätteten HindIII/EcoRV geschnittenen POZ-Fragment ligiert (pE-POZ-ABL-Kpn). pCp185^(BCR/ABL)DNA3 wird mit EcoRI verdaut und mit einem EcoRI verdauten pENTR1A ligiert (pEp185^(BCR/ABL)). pEp185^(BCR/ABL) wird mit KpnI verdaut und mit dem kleineren Fragment eines KpnI verdauten pE-POZ-ABL-Kpn ligiert, so daß eine POZ-ABL kodierende cDNA entstand (pE-POZ-ABL). pE-POZ-ABL wird mit EcoRI verdaut und das resultierende POZ-ABL Fragment wird mit einem EcoRI verdauten pCDNA3-Vektor ligiert (pC-POZ-ABLDNA3).

Im Anschluß an diese Klonierungen werden die Expressionsvektoren pCACCp185DNA3, pCBCC-ABLDNA3, pCHLH-ABLDNA3 und pC-PCC-ABLDNA3 mit EcoRI verdaut und

die resultierenden Fragmente mit einem EcoRI-verdauten pENTR1A ligiert (pE- Δ CCp185, pE-BCC-ABL, pE-HLH-ABL und pE-PCC-ABL). Die „entry“-Klone pE-POZ-ABL, pE-p185^(BCR/ABL), pE- Δ CCp185, pE-BCC-ABL, pE-HLH-ABL und pE-PCC-ABL werden mittels „LR-clonase enzyme kit“ mit dem retroviralen „destination“ Vektor PINCO-RFB rekombiniert. Die resultierenden retroviralen Expressionsvektoren (PINCO-p185^(BCR/ABL)-GWB, PINCO- Δ CCp185-GWB, PINCO-HLH-ABL-GWB, PINCO-BCC-ABL-GWB, PINCO-PCC-ABL-GWB und PINCO-POZ-ABL-GWB) werden in dieser Arbeit verwendet.

BCC-FLAG: Das BCC-FLAG Fusionspeptid, bestehend aus den ersten 63 Aminosäuren von BCR (BCC), gefolgt von einem sogenannten FLAG-Tag (Aminosäure-Sequenz: MDYKDDDDK) mit abschließendem Stop-Codon, wird mittels PCR mit pCp185^(BCR/ABL)DNA3 als Matrize und Primer 1 und Primer 11 (5'-tcattgtcatcgtcatccttgtagtccatcagcaacgtctgcaggtagatc-3' – FLAG-tag unterstrichen, Stop-Codon kursiv) gewonnen. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-BCC-FLAG). pC-BCC-FLAG wird mit EcoRI verdaut und mit einem EcoRI verdauten pENTR1A ligiert (pE-BCC-FLAG). Mittels einer Rekombination zwischen pE-BCC-FLAG und PIDEp185-RFB wird ein retroviraler Vektor kloniert, der p185^(BCR/ABL) und BCC-FLAG koexprimiert (PIDEp185/BCC-FLAG). Um ein GST-Fusionsprotein mit BCC-FLAG zu klonieren, wird pE-BCC-FLAG mit EcoRI verdaut und mit einem EcoRI-verdauten pGEX4T3 ligiert (pGEX-BCC-FLAG).

BCC-GFP: Um ein C-terminal mit GFP fusioniertes BCC-Peptid herzustellen wird zunächst eine PCR mit Primer 12 (5'-ggattcccaccatggtggaccgg-3' – BamHI Schnittstelle unterstrichen) und Primer 13 (5'-ggattcagcaacgtctgcagg-3' – BamHI Schnittstelle unterstrichen) und pCp185^(BCR/ABL)DNA3 als Matrize durchgeführt. Anschließend werden mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase an das PCR-Produkt 3'-A Überhänge angefügt. Mittels TA-Klonierung wird das PCR-Produkt in den Vektor pCR2.1 einkloniert (pC-Bam-BCC-GFP-Bam). Die GFP-kodierende cDNA wird aus dem Vektor PINCO-cmyc-GFP (eine freundliche Gabe von Lucia Tomassoni, Mailand) mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI ausgeschnitten und mit einem mit

denselben Enzymen geschnittenen pENTR1A ligiert (pEfusGFP). Daraufhin wird pC-Bam-BCC-GFP-Bam mit BamHI verdaut und das BCC-GFP enthaltende Fragment wird mit einem BamHI verdauten pEfusGFP ligiert (pE-BCC-GFP). Mittels einer Rekombination zwischen pE-BCC-GFP und PIDEp185-RFB wird ein retroviraler Vektor kloniert, der p185^(BCR/ABL) und BCC-GFP koexprimiert (PIDEp185/BCC-GFP).

3.5 Transformation von kompetenten E. coli-Zellen

3.5.1 Präparation von chemokompetenten E. coli-Zellen

Eine 400 ml LB-Kultur wird mit 5 ml 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, $4000 \times g$, $4^\circ C$), in 80 ml sterile $CaCl_2$ Lösung (50 mM $CaCl_2$, 10 mM TrisHCl pH 7.4) auf Eis für 25 min resuspendiert und anschließend für 15 min, bei $4^\circ C$ und $4000 \times g$ abzentrifugiert. Danach werden die Zellen in 11 ml $CaCl_2$ plus 2 ml Glycerol aufgenommen. Die Bakterien werden in 100 μl -Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei $-75^\circ C$ aufbewahrt.

3.5.2 Transformationen rekombinanter Plasmide in E. coli

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis überführt und 2 μl 0,5 M β -Mercaptoethanol und 2 μl des Ligationsansatzes zugegeben, mit den Bakterien vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 sec bei $42^\circ C$ werden die Bakterien weitere 2 min auf Eis gelagert. Anschließend werden 500 μl auf $37^\circ C$ vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und sie für 60 min bei $37^\circ C$ im Inkubator bei 225 rpm geschüttelt. Danach werden die Zellen auf eine LB/Ampicillin-Platte (mit je 50 $\mu g/ml$ Ampicillin, 40 mg/ml X-Gal, 100 mM IPTG) aufgebracht und über Nacht bei $37^\circ C$ inkubiert. Durch den Zusatz von Ampicillin zum LB-Agar können nur Bakterien mit dem im aufgenommenen Plasmid (pcDNA3) vorhandenen Ampicillinresistenzgen auf dem Nährboden wachsen. Da der Vektor pcDNA3 zusätzlich ein Gen für die Expressierung von Galaktosidase trägt, das zerstört

wird, wenn ein Konstrukt in den Vektor inkloniert wird, sind nur mit dem leeren Vektor transformierte *E. coli* Kolonien in der Lage, die im Agar enthaltene X-Galactose zu schneiden. Sie färben sich dadurch blau und sind somit von den gewünschten Bakterienkolonien zu unterscheiden. Einzelne Kolonien werden zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung für analytische Plasmid-DNA-Präparationen abgeimpft.

3.6 Produktion von GST-Fusionsproteinen in Bakterien

3.6.1 Proteinminipräparation

E1A-Puffer, 150 mM NaCl:

HEPES 50 mM

NaCl, 150mM

EDTA 5 mM, pH8,0

Triton X-100 1%(v/v)

Protease-Inhibitoren (100 µg/ml PMSF; 2 ng/ml

Leupeptin; 2 ng/ml Aprotinin; 2 mM Natriumorthvanadat;

50 mM Natriumfluorid)

2-fach SDS-PAGE Proben-Puffer:

TrisHCl pH 6,8 0,1 M

SDS 4 %

Glycerol 20%

Bromophenolblau 0,02%

E. coli HB101 werden mit dem Vektor pGEX4T3 mit dem entsprechenden GST-Fusionskonstrukt und zur Kontrolle mit pGEX4T3-Leervektor transformiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien werden in je 2 ml LB/Ampicillin-Flüssigmedium inokuliert und 3 Stunden unter Schütteln bei 7°C inkubiert. Anschließend wird 2µl IPTG (100mM) zugefügt und die Bakterien weitere 3 Stunden geschüttelt. Die Bakterien werden in Eppendorfröhrchen überführt und 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200µl E1A-Lysispuffer (150 mM NaCl)

resuspendiert und sonifiziert. Je 10 μ l Lysat werden mit 10 μ 2-fach SDS-PAGE-Probenpuffer vermischt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird 20 min mit Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol) inkubiert. Danach wird das Gel in „destain“-Lösung (10 % (v/v) Essigsäure und 50 % (v/v) Methanol) so weit entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Der Vergleich mit der Leervektorkontrolle zeigt, welche Klone das GST-Fusionprotein exprimieren.

3.6.2 Proteinmaxipräparation

E1A-Puffer, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100:

HEPES 50 mM
NaCl, 150mM
EDTA 5 mM, pH8,0
Triton X-100 1%(v/v)
Protease-Inhibitoren (s.o.)

E1A-Puffer, 150 mM NaCl:

HEPES 50 mM
NaCl, 150mM
EDTA 5 mM, pH8,0
Protease-Inhibitoren (s.o.)

E1A-Puffer, 50 mM NaCl, 0,1% Nonidet P-40:

HEPES 50 mM
NaCl, 50mM
EDTA 5 mM, pH8,0
Nonidet P-40 0,1%(v/v)
Protease-Inhibitoren (s.o.)

2-fach SDS-PAGE Proben-Puffer:

TrisHCl pH 6,8 0,1 M

SDS 4 %

Glycerol 20%

Bromophenolblau 0,02%

E. coli HB101 werden mit dem Vektor pGEX4T3 mit dem entsprechenden GST-Fusionskonstrukt transformiert. Eine exprimierende Einzelkolonien wird in 100 ml LB/Ampicillin-Flüssigmedium inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wird diese Kultur mit LB/Ampicillin-Flüssigmedium auf 1 l aufgefüllt und 3 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,1mM IPTG wird die Expression des Fusionsproteins induziert. Dazu werden die Bakterien weitere 3 Stunden geschüttelt. Durch Inkubation auf Eis für 10 min wird das Wachstum arretiert. Die Bakterien werden 15 min bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20 ml eiskaltem E1A-Lysispuffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100) resuspendiert und sonifiziert. Die Lysate werden 5 min bei 4°C und 10000*g zentrifugiert. Die Überstände werden zusammengefügt. Je 10 ml Lysat werden 1 ml Glutathion-Sepharose Kügelchen zugefügt und 2 Stunden oder länger bei 4°C unter langsamen mischen inkubiert. Der Ansatz wird 30 sec bei 4000 rpm zentrifugiert um die Sepharose-Kügelchen zu sammeln. Die Sepharose-Kügelchen werden 4 mal mit je 10 ml E1A (150 mM NaCl, ohne Detergenz) gewaschen. Zum Schluß werden die Sepharose-Kügelchen in E1A-Puffer (50 mM NaCl, 0,1% NP-40) aufgenommen und bei 4°C gelagert. 10 µl der Präparation werden mit 10 µl 2-fach SDS-PAGE-Probenpuffer vermischt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wird 20 min mit Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol) inkubiert. Danach wird das Gel in „destain“-Lösung (10 % (v/v) Essigsäure und 50 % (v/v) Methanol) soweit entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Anhand einer BSA-Konzentrationreihe wird die Proteinkonzentration abgeschätzt.

3.7 GST-„pull-down-assays“

E1A-Puffer, 50 mM NaCl, 0,1% Nonidet P-40:

HEPES, 50 mM

NaCl, 50mM

EDTA 5 mM, pH8,0
Nonidet P-40 0,1%(v/v)
Protease-Inhibitoren (s.o.)

Etwa $5 \cdot 10^7$ Suspensionszellen, die das zu präzipitierende Protein exprimieren, werden bei 1200 rpm pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die das Protein nicht exprimieren. Die Zellen werden mit E1A-Puffer (50 mM NaCl, 0,1% NP-40) lysiert und sonifiziert. Die Proteinkonzentration wird spektrophotometrisch bestimmt. 20 μ g GST-Fusionsprotein gekoppelt an Glutathionsepharose-Kügelchen und – als Negativkontrolle - 20 μ g GST gekoppelte Glutathionsepharose-Kügelchen werden mit den Lysaten der Zellen gemischt. Die Proteinmenge in den Lysaten sollte bei ungefähr 1 mg liegen und das Gesamtvolumen nicht mehr als 200 μ l betragen. Die Lysat/Sepharose Mischungen werden 2-16 Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend pelletiert man die Sepharose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen bei 5000 rpm und 4°C. Das Pellet wird 4 mal in 200 μ l E1A-Puffer (50 mM NaCl, 0,1% NP-40) gewaschen. Die Kügelchen werden in 20 μ l 2-fach SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, 3 min im kochenden Wasserbad denaturiert und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.8 RAS Activation Assay Kit

Aktiviertes RAS wird mit dem "RAS Activation Assay Kit" (Upstate Biotechnology, *Lake Placid*, NY, USA) detektiert. Das Prinzip beruht auf einem „pull-down“ von aktiviertem RAS mit der GST-fusionierten RAS –Bindedomäne von RAF-1 (RAF1-RBD-GST). Transfizierte Zelllinien werden nach Angaben des Herstellers lysiert und der Assay nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.9 Charakterisierung von Hochmolekulargewichtskomplexen (HMG-Komplexe)

Die Bildung von HMG-Komplexen wird wie zuvor beschrieben durchgeführt (Minucci et al. 2000). COS-1 Zellen werden transient mittel Elektroporation transfiziert mit einem CMV-Promotor getriebenen Expressionsvektor (pCDNA3), der die cDNAs verschiedener ABL-Mutanten enthielt. Es werden zytosolische Extrakte von $1 - 5 \cdot 10^8$ Zellen hergestellt, und

mittels HPLC bei 4°C mit einer „superose 6 HR 10/30 size exclusion column“ (*Pharmacia*, Uppsala, Schweden) fraktioniert. Die Flußrate beträgt 0.4 ml/min. Fraktionen von 0.4 ml werden gesammelt und mittels SDS-PAGE und anschließendem „western blotting“ mit einem anti-ABL Antikörper, der sowohl endogenes ABL als auch die Konstrukte erkannte, analysiert.

3.10 Proteinanalytische Methoden

3.10.1 Lyse von Suspensionszellen mit SDS Lysis-Puffer (Sambrook und Russel, 1989)

Lysis-Puffer: 1,5 ml 1M TrisHCl pH 6,8
 3 ml 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 10.000 rpm werden sie resuspendiert, mit 50 µl Lysis-Puffer pro 1.000.000 Zellen überschichtet und gevortext. Zu den Lysaten wird je 1 µl Benzonase pro 500 µl Lysis-Puffer zugesetzt und die Proben nach weiterem Vortexen bei -20 °C aufbewahrt.

3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Spektrophotometer

Zellextrakte verschiedener Zelllinien werden nach der unter 3.9.2 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. 1 OD₂₈₀ entspricht einer Menge von 0,75 mg/ml IgG. Da sich die Lysate aus unterschiedlichen Proteinen mit verschiedenen Absorptionsspektren zusammensetzen, wird die Proteinmenge auf IgG bezogen verwendet: 1 OD₂₈₀ ergab die Menge an Lysat in µl, was in etwa der Proteinmenge aus 200.000 lysierten Zellen entspricht, der Menge, die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese pro Tasche aufgetragen wird.

3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine werden mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Je nach gewünschtem Molekulargewichtsbereich der zu trennenden Proteine werden unterschiedliche Anteile von Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-Acrylamid verwendet. Die Gele werden nach den in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen gegossen. Die Auftrennung erfolgte in Minigel-Apparaturen (Protean II von BioRad).

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wird ein Standard bereits gefärbter Proteine definierter Größe (NOVEX) aufgetragen. Die Proteinproben werden für 3 min auf 95 °C erhitzt und in die gespülten Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V für 1,5 bis 2 h. Zum Anfärben der Proteine wird das Gel 15 min in Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 10 % (v/v) Essigsäure; 30 % (v/v) Methanol) inkubiert. Danach wird das Gel in 10 % (v/v) Essigsäure und 50 % (v/v) Methanol für 2 h oder über Nacht entfärbt.

3.10.4 “Western Blotting”

3.10.4.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran

Blotpuffer: 48 mM TrisHCl
 39 mM Glycin
 0,038 % (w/v) SDS
 20 % (w/v) Methanol.

Es wird der Semi Dry Elektroblob (BioRad) benutzt. Auf der unteren Elektrodenplatte werden zwei Lagen Filterpapier, die mit Blotpuffer benetzte Nitrocellulosemembran (BioRad 2 µ), das SDS-Gel, nochmals zwei Lagen Filterpapier luftblasenfrei und darauf die obere Elektrodenplatte positioniert und die Kammer verschlossen. Der Transfer erfolgt bei 200-400 mA für 1-1,5 h. Die Proteine werden mit Ponceau S-Färbelösung auf der Membran sichtbar gemacht. Die Färbung wird durch mehrmaliges Waschen mit 1x TBST wieder entfernt.

3.10.4.2 Immundetektion von Proteinen

Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wird die Nitrocellulosemembran in 5 % fettfreiem Milchpulver (w/v) in 1x TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Zugabe des Primärantikörpers (1:1000) wird sie für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Membran wird viermal in TBS 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen und der Sekundärantikörper (Schwein-anti-Kaninchen-IgG bzw. Kaninchen-anti-Maus-IgG, jeweils Peroxidase-gekoppelt, 1:1000) zugegeben. Nach 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rollinkubator wird viermal mit 1x TBST gewaschen und der Blot im Dunkeln mit den ECL Lösungen 1 min inkubiert. Die Signale werden mit Autoradiographiefilmen detektiert.

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

ECL Lösung 1:	2,50 mM Luminol
	0,44 ml p-Coumaric Säure (90 mM in DMSO)
	10 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5
	ddH ₂ O ad 100 ml.
ECL Lösung 2:	64 µl 30 % H ₂ O ₂
	10 ml 1 M TrisHCl, pH 8,5
	ddH ₂ O ad 100 ml.

3.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.11.1 Vorbereitung der Präparate

Zuerst werden die gereinigten und entfetteten Deckgläser für 30 min mit Poly-D-Lysine (1 mg/ml in ddH₂O) beschichtet. Nach dem Trocknen werden pro Deckglas 500.000 bis 1.000.000 Zellen abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm), mit PBS gewaschen und in wenig PBS resuspendiert. Nach gleichmäßigem Auftragen auf die beschichteten Deckgläser werden sie für 30 min bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend werden die an der Poly-D-Lysine-Schicht haftenden Zellen für 10 min mit 3,7 %igem Paraformaldehyd fixiert und nach mehreren Waschschritten mit PBS für 5 min mit 0,1 %igem Triton in PBS permeabilisiert. Zuletzt werden sie wieder mit PBS gewaschen.

3.11.2 Färbung der Präparate

Zur Färbung von Ba/F3-Zellen wird als Primärantikörper ein α -ABL Mausantikörper (Santa Cruz Biotechnology, St.Cruz, CA) und zur anschließenden Markierung dieser Antikörper ein cy3-konjugierter Ziege α -Maus-Antikörper (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Somit wird ABL unter dem Fluoreszenzmikroskop rot sichtbar. NALM-6, BV173, U937 und primäre mononukleäre Zellen werden mit einem α -PML Mausantikörper (PGM3 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) und einem Cy2-konjugierter Ziege α -Maus-Sekundärantikörper (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) grün fluoreszierend angefärbt.

Die Färbelösung für die Präparate enthält die Primär- bzw. Sekundärantikörper im Verhältnis 1:100 und BSA (1:100) zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen. Die Deckgläser werden mit der Oberseite nach unten in einer feuchten Kammer für 60 min mit dem Primär- bzw. 45 min mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellkerne für wenige Sekunden mit DAPI (1:30.000) angefärbt, das sofort durch Waschschriffe wieder entfernt wird. Nach dem Trocknen werden die Zellen in Mowiol eingebettet und damit die fertigen Deckgläser auf Objektträgern fixiert. Das anschließende Aushärten des Mowioms über mehrere Stunden bereitet die Präparate für die Betrachtung mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Axioplan II-imaging microscope, Zeiss, Göttingen, Deutschland) oder dem konfokalen Mikroskop (Leica TCS-NT, Wetzlar, Deutschland) vor. Die Bilder werden mit der Axiovision Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland) oder mit der Leica TCS-NT V1.6.551 Software (Leica, Wetzlar, Deutschland) digitalisiert. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen erfolgt mit Adobe Photoshop 6.01 und Imaris 3 (Bitplane, Zürich, Switzerland) Software. Sämtliche Bilder werden unter mit identischen Mikroskopeinstellungen aufgenommen und bei der Nachbearbeitung der Bilder mit der Imaris 3 Software werden auf alle Aufnahmen eines Experiments identische Parametern angewendet.

3.12 Durchflußzytometrie (FACS) mit direkt konjugierten Antikörpern

FACS Waschpuffer: PBS + 1%FCS + 1% NaN₃

FACS Fixierung: PBS + 2% Formaldehyd

0,1-1*10⁶ Zellen werden in 5 ml Polypropylen-Röhrchen bei 1200 rpm zentrifugiert. Man wäscht einmal mit FACS Waschpuffer. Der Überstand wird dekantiert und zurückfließende Pufferreste dienen als Reaktionspuffer für die Antikörperfärbung. Man gibt 1 – 2µl der unverdünnten Antikörperlösung in jedes Röhrchen, vortext kurz und inkubiert 15 – 30 min bei 4-8°C. Anschließend zentrifugiert man die Proben bei 1200 rpm. Man wäscht einmal mit FACS Waschpuffer. Der Überstand wird komplett dekantiert und die Zellen werden in 200 – 400 µl resuspendiert. Die Fixierten Proben können gegen Licht geschützt bei 4° C bis zur Messung (max. 1 Woche) gelagert werden.

3.13 Magnetische Zellseparation (MACS)

MACS-Puffer 1: BSA 0,5%(w/v)
EDTA 2mM
Penicillin/Streptomycin 1%

MACS-Puffer 2: BSA 0,5%(w/v)
EDTA 2mM
Penicillin/Streptomycin 1%
MgCL₂ 6mM
DNaseI, 40 u/ml

Je nach verwendeter MACS-Säulengröße, wird eine Säule in eine „MiniMACS separation unit“ (für „MS-separation columns“) oder „MidiMACS separation unit“ (für „LS-separation columns“) an einen Metallständer („MACS multistand“) geheftet. Für eine Gesamtzellzahl von 2*10⁸, bzw. 1*10⁷ positive Zellen, verwendet man eine kleine Säule („MS-separation column“), mit einer großen Säule („LS-separation column“) kann maximal eine

Gesamtzellzahl von $1 \cdot 10^9$ d.h. $1 \cdot 10^8$ positive Zellen aufgereinigt werden. Zunächst werden die Säulen mit 0,5 ml MACS-Puffer für MS-Säulen bzw. 3 ml MACS-Puffer für LS-Säulen equilibriert. Die mit den Antikörper-beschichteten „microbeads“ markierten Zellen werden in einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml in MACS-Puffer 2 aufgenommen und zur Beseitigung von Zellklumpen durch ein $30 \mu\text{m}$ Zellsieb (MACS „pre separation filter“) passiert. Man gibt sie in Aliquots von 0,5 ml auf die Säulen. Bei einer Negativselektion befinden sich die gewünschten Zellen im Eluat und in den Waschfraktionen und werden aufgefangen. Bei einer Positivselektion werden die gewünschten Zellen in der Säule zurückgehalten. Man wäscht die Säulen dreimal mit 3 ml MACS-Puffer 2 und verwirft das Eluat. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten genommen und die positiven Zellen werden mit $4 \cdot 2$ ml MACS-Puffer 2 eluiert.

Nach der Separation werden die Zellen in geeignetes Medium aufgenommen.

3.14 Zellkultur

3.14.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

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

Die Zellen werden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % (v/v) CO_2 kultiviert. Das Zellmedium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt.

3.14.2 Verwendete Zellmedien

U937, K562, BV173, Nalm-6: RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamat, 40 U/ml Penicillin, 40 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

Sup-B15, Kasumi-1: RPMI 1640-Medium mit 20 % FCS, 2 mM L-Glutamat, 40 U/ml Penicillin, 40 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

Tom-1: IMDM Medium (Isocove Medium) mit 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 40 U/ml Penicillin, 40 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

Ba/F3: RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamat, 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin und 10ng/ml murines rekombinantes IL-3

Phoenix, RAT-1: Dulbeccos Modified eagle Medium (DMEM) mit 10%FCS, 2 mM L-Glutamat, 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin

Primäre murine Knochenmarkszellen: DMEM mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamat, 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin, 20 ng/ml murines rekombinantes IL-3, 20 ng/ml murines rekombinantes IL-6, 100 ng/ml murines rekombinantes SCF

3.14.3 Zellpassage

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

3.14.3.2 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.

3.14.4 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

3.14.4.1 Einfrieren:

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

3.14.4.2 Auftauen:

Die gefrorenen Zellen werden bei 37 °C aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt und durch eine fünfminütige Zentrifugation (500 x g, Raumtemperatur) sedimentiert. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen zum wiederholten Mal mit Medium gewaschen, abzentrifugiert und nach Resuspension in 10 ml Medium in einer Kulturflasche herangezogen.

3.14.5 Patientenmaterial

Mononukleären Zellen von Knochenmarksproben zweier Patienten mit neu diagnostizierter Ph+ ALL und einem Patienten in partieller Remission (< 10% Blasten) werden durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Zellen werden 24h in Ab- und Anwesenheit von 2 μ M STI571 (zur Verfügung gestellt von E. Buchdunger, Novartis, Basel, Schweiz) inkubiert und anschließend für die „western blot“ Analyse mit SDS Lysis Puffer (s.u.) aufgeschlossen.

3.15 Transfektion von Zelllinien

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

Zunächst wird eine Na_2HPO_4 Vorratslösung (5,25 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml H_2O) angesetzt. Für die Herstellung von 2x HBS löst man 24 g NaCl und 19,5 g HEPES in 1170ml H_2O und fügt 30 ml Na_2HPO_4 Vorratslösung hinzu. Da der pH-Wert exakt 7,0 betragen muß, wird die Lösung à 400 ml 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 500 ml 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.

3.15.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion von adhärenen Zelllinien

Subkonfluente Zellen werden mit 5 µg DNA pro 10-cm Zellkulturschale in 1 ml Präzipitatvolumen transfiziert. Für 1 ml Präzipitat löst man 5 µg DNA in 438 µl H₂O, gibt 62 µl 2M CaCl₂ hinzu und mischt die Lösung gut. Dann werden 500µl 2x HBS unter Vortexen hinzugegeben.

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

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

3.15.3 Stabile Transfektion von Suspensionszelllinien (U937) mittels Elektroporation

Zuerst werden die Elektroporationsküvetten mit 70 % EtOH sterilisiert und auf Eis gekühlt. Gleichzeitig werden 1×10^7 Zellen bei 4 °C pelletiert und der Mediumüberstand abgegossen. Die Zellen werden anschließend in 200 µl kaltem Medium aufgenommen. Dazu werden 40 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA zugegeben und das Ganze in die inzwischen auf Eis gekühlte Küvette überführt und für 10 min auf Eis inkubiert.

Die Elektroporation wird im "GenePulser" mit einer Spannung von 250 mV und einer Kapazität von 960 µF durchgeführt. Sofort nach dem Elektroimpuls wird 1 ml kaltes Medium zugegeben, die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 5 min inkubiert. Danach wird die Zellsuspension in 3,7 ml Medium aufgenommen, in eine 6-Lochplatte überführt und weiter bebrütet.

3.15.4 G418-Selektion von transfizierten Zellen

Die transfizierten Zellen werden mit Hilfe von G418 (Geneticin = Neomycinanalogon) auf die Neomycinresistenz, die mit dem pGMTSVneo Expressionvektor in die Zelle eingeführt worden war, selektioniert. Zwei Tage nach der Elektroporation wird dem Medium Geneticin

in einer Konzentration von 750 μM zugegeben. Bei Bedarf werden die toten Zellen über Ficoll-Trennmedium von den lebenden getrennt. Außerdem werden die Zellen je nach Bedarf in Gefäße mit größerer oder kleinerer Oberfläche umgesetzt. Die G418-Selektion war beendet, wenn in einer nicht transfizierten Kontrollpopulation keine lebenden Zellen mehr sichtbar waren und die transfizierten Zellen im Selektionsmedium angefangen hatten zu proliferieren. Auf diese Weise werden G418-resistente Zellpopulationen selektioniert (Bulkpopulationen).

3.15.5 Infektion von Zelllinien und primärer muriner Knochenmarkszellen

Am ersten Tag wird die virenproduzierende Zelllinie („packaging cell line“, hier ecotrope Phoenix Zellen) in einer Dichte von $1,25\text{-}1,75 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm 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 μg der jeweiligen retroviralen DNA eingesetzt.

Am Tag 3 wird bei den transfizierten Zellen das Medium abgenommen und durch 7 ml neues Medium ersetzt. Unter dem Invert-Fluoreszenzmikroskop wird die Transfektionseffizienz abgeschätzt, sofern GFP als Reportergen vorhanden ist. Nur bei einer Transfektionseffizienz von mehr als 70% wird mit dem Protokoll fortgefahren. Für die Infektion von Suspensionszelllinien wird eine 24-Loch-Platte, die nicht für die Zellkultur vorbehandelt ist, mit Retronektin beschichtet: 200 μl der Retronektin Gebrauchslösung (0,1 mg/ml in PBS) werden in jedes Loch pipettiert, gut verteilt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wäscht man die Löcher zweimal gut mit PBS und plattiert dann die zu infizierenden Zellen („target cells“) in einer geeigneten Zellzahl aus: pro Loch 100000 Ba/F3-Zellen, 200000-300000 primäre Knochenmarkszellen.

Adhärente Zelllinien werden in zellkulturgeeigneten 24-Loch-Platten in geeigneter Zellzahl ausplattiert: 20000-40000 NIH3T3 oder 20000 RAT-1 Zellen pro Loch.

Am Tag 4 nimmt man 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 μm Spritzenfilter gedrückt.

Die benötigte Menge viraler Überstand wird ggf. mit Zytokinen versetzt. Zur Steigerung der Infektionseffizienz wird je nach Zelllinie 0 – 4 µg/ml Polybrene zugefügt (Ba/F3 und NIH3T3 4 µg/ml, RAT-1 und primäre Maus-Knochenmarkszellen kein Polybrene). Nicht benötigter Überstand wird in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Man nimmt das Medium von den Zielzellen ab und pipettiert in jedes Loch 0,5 ml viralen Überstand. Die Platte wird 45 min bei 2200 rpm (primäre Zellen) bis 2500 rpm (Zelllinien) zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend 2-3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wiederholt man die Zentrifugation und Inkubation mit frischem viralen Überstand. Danach wird das Medium gewechselt.

Am Tag 5 wiederholt man die beiden Infektionsrunden wie am Tag 4. Am Ende der Infektion plattiert man die Zellen aus den Wells in frischem Medium und in einer ZK-Schale und läßt sie 2-3 Tage proliferieren.

3.16 Induktion der Expression der Transgene in den jeweiligen U937-Klonen

Zur Induktion des Metallothioninvektors pGMTSVneo werden die Zellen für 6-12 h mit 100-200 µM Zn²⁺ behandelt. Anschließend werden sie einmal mit PBS gewaschen, lysiert und im Westernblot auf die induzierbare Expression des transfizierten Konstrukts untersucht oder nach zweimaligem Waschen mit PBS für die Inkubation mit As₂O₃ vorbereitet.

3.17 Induktion der Apoptose mit As₂O₃

Die U937 Zellen, deren transfizierter Vektor vor der As₂O₃-Inkubation mit Zn²⁺ induziert wurde, müssen zweimal mit PBS gewaschen werden, um Zn²⁺ zu entfernen. Wie alle anderen Zelllinien werden auch sie anschließend auf 1x10⁵ Zellen/ml verdünnt, bevor sie einer Endkonzentration von 1 µM As₂O₃ durch Verdünnung einer 1 mM Stammlösung in PBS ausgesetzt werden.

3.18 Messung der Apoptose mittels 7-AAD (Schmid et al., 1994)

Die Methode nach Schmid et al., 1994, erlaubt die Diskriminierung lebender Zellen von frühen apoptotischen Zellen und von Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben (späte

apoptotische oder nekrotische, tote Zellen). Auf dem Verlust der Membranintegrität beruht die Permeabilität für das Molekül 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), das in die DNA der Zellkerne (zwischen Cytosin- und Guanin-Basen) interkalieren kann (Wadkins und Jovin, 1991) und damit die Identifikation von apoptotischen und toten Zellen im Rotlichtfluoreszenzkanal ermöglicht.

Nach der Inkubation der Zellen mit As_2O_3 werden sie durch Zentrifugation (5 min bei 1200 rpm) sedimentiert. Das Zellpellet wird mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 7-AAD in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , jedoch mit 2 % Kälberserum und 0,1 % Natriumazid (PBS Az, Sigma) versetzt und resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C im Dunkeln werden die Zellen im Durchflußzytometer in ihrer Färbelösung analysiert. Die Daten werden durch die Lysis II Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

3.19 Methylcelluloseassay

3.19.1 Herstellung der Methylcellulose, 2,25%:

Für die Herstellung von 2-fach DMEM-Medium werden 5 g DMEM-Pulver, 1,85 g NaHCO_3 und 5 ml Penicillin/Streptomycin in 230 ml H_2O gelöst und sterilfiltriert. 121 ml H_2O werden in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit sterilem Rührfisch aufgekocht. Man gibt 5.63 g „Methocel MC“ Methylcellulose hinzu und kocht die Mischung 5 min unter Rühren. Man läßt die Methylcellulosemischen unter Rühren auf 37°C abkühlen. Dann mischt man die Methylcellulose mit 37°C warmem 2-fach DMEM-Medium. Diese Lösung wird 48 Stunden bei 4°C langsam gerührt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.19.2 Kolonie-Assay

5000 pro ml Endvolumen Trypsin-behandelte RAT-1 Zellen werden in 10 ml 1-fach DMEM-Medium aufgenommen. Die zum Ausplattieren benutzte Methylcellulosemischung besteht 50%(v/v) Methylcellulose (2,25%), 10% FCS(v/v), 1% Glutamin(v/v), 10%(v/v) Medium mit den Zellen und 29%(v/v) 1-fach DMEM-Medium. Je 1 ml dieser Mischung wird mit einer 5-ml Spritze in einer 35-mm Bakterienpetrischale ausplattiert. 2 dieser Schälchen werden zum

Schutz vor Austrocknung mit einer dritten, wassergefüllten Schale in eine 10-cm Petrischale gestellt und 10-14 Tage bei 37°C inkubiert.

3.20 Transformationsassay (Faktorentzug) bei IL-3 abhängigen murinen hämopoetischen Vorläuferzelllinien

Infizierte IL-3 abhängige hämopoetischen Vorläuferzelllinien werden 48 – 72 Stunden nach der Infektion in IL-3-freies Medium übertragen. Dazu muß IL-3 aus dem Medium durch 3 maliges Waschen mit PBS restlos entfernt werden. Die gewaschenen Zellen werden in einer Dichte von 100000 Zellen pro ml ausplattiert. Die Proliferation der Zellen wird 4 Tage lang mittels Trypanblaufärbung ermittelt. An jedem Tag wird im FACS der Anteil GFP-positiver Zellen ermittelt (die GFP-Expression korreliert direkt mit dem Prozentsatz infizierter Zellen). Vor und nach dem Faktorentzug werden zur Kontrolle der Expression der transduzierten Proteine Zelllysate hergestellt.

3.21 STI571-Sensibilitätsassay mit IL-3 unabhängigen, infizierten murinen hämopoetischen Vorläuferzelllinien

Infizierte IL-3 abhängige hämopoetischen Vorläuferzelllinien werden 48 – 72 Stunden nach der Infektion in IL-3-freies Medium übertragen. Dazu muß IL-3 aus dem Medium durch 3 maliges Waschen mit PBS restlos entfernt werden. Die gewaschenen Zellen werden in einer Dichte von 100000 Zellen pro ml ausplattiert. Man läßt die Zellen 7 Tage proliferieren. Gegebenenfalls splittet man die Zellen. Am Tag 7 nach Beginn des Faktorentzugs werden die Zellen in einer Dichte von 100000 Zellen pro ml ausplattiert und 0 bzw. 1 µM STI571 ins Medium pipettiert. Die Proliferation der Zellen wird 4 Tage lang mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Nach dem Faktorentzug werden zur Kontrolle der Expression der transduzierten Proteine Zelllysate hergestellt.

3.22 Tierversuche

3.22.1 Isolierung von Knochenmarkszellen aus Tibia und Femur von Mäusen

Alle Arbeiten werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Tiere werden 10 – 15 Sekunden in Isofluran-gesättigter Atmosphäre betäubt und durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Man durchnässt das Fell der Tiere mit Kodan-Spray und entfernt die Hinterläufe der Tiere oberhalb des Hüftgelenks. Tibia und Femur werden getrennt, das restliche Fleisch vom Knochen entfernt und die Knochen in PBS mit 2% Penicillin/Streptomycin gelegt. In einer sterilen Arbeitsbank werden die Knochen oben und unten mit einem Scalpel angeschnitten. Mit einer 1 ml Spritze mit 27GA $\frac{3}{4}$ Kanüle wird das Knochenmark mit PBS mit 2% Penicillin/Streptomycin ausgespült und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Um die Zellen zu vereinzeln wird das ausgespülte Knochenmark durch ein 70 μm und anschließend durch ein 40 μm Zellsieb („cell strainer“, BD Labware, Franklin Lakes, New Jersey, USA) passiert. Die mononukleären Zellen werden durch Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation (2000 rpm, 20 min) gereinigt und anschließend in 15 ml MACS-Puffer 1 aufgenommen und bei 1800 rpm 10 min zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 2 ml MACS-Puffer 1 pro präparierter Maus aufgenommen und die Gesamtzellzahl ermittelt.

3.22.2 Sca-1 Multisort Kit

Isolierte und gewaschene mononukleäre Mausknochenmarkszellen werden in einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml in MACS-Puffer 2 (s.o.) resuspendiert. Man fügt mit anti-Sca-1 konjugierte magnetische „microbeads“ hinzu (100 μl für $2 \cdot 10^8$ Zellen), mischt kurz und inkubiert 15 min bei 6 – 12°C. Anschließend zentrifugiert man die Zellen vorsichtig (900 rpm, 10 min) und wäscht mit 2 ml MACS-Puffer pro präparierter Maus. Erneut wird mit 900 rpm 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in einer Dichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml in MACS-Puffer 2 (s.o.) resuspendiert. Es erfolgt eine Positivselektion der Sca-1 exprimierenden Knochenmarkszellen mittels magnetische Zellseparation. Nach dem Zählen werden die Zellen bei 900 rpm 10 min zentrifugiert und in einer Dichte von $2 - 2,5 \cdot 10^6$ Zellen

pro ml in DMEM-Medium versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 10% FCS, 20ng/ml IL-3; 20 ng/ml IL-6 and 100 ng/ml SCF ausplattiert.

3.22.3 Transplantation von murinen Knochenmarkszellen in Empfänger-mäuse

Weibliche Empfänger-Mäuse (C57BL/6N) werden 5 - 48 Stunden vor der Transplantation mit einer Dosisleistung von 42 MeV (= 4,5 Gy) sublethal bestrahlt. Infizierte Sca-1 positive murine Knochenmarkszellen (Donor-Knochenmark) werden einmal mit sterilem PBS gewaschen und bei 1200 rpm pelletiert und anschließend in sterilem PBS so resuspendiert, daß pro Empfängermaus ein Injektionsvolumen von 200 µl zur Verfügung steht. Mit einer 1-ml Spritze mit 27G Kanüle werden die Zellen retroorbital in die Mäuse injiziert.

3.22.4 Überwachung des Gesundheitsstatus transplantierte Mäuse

Die mit infizierten Knochenmarkszellen transplantierten Mäuse werden täglich überwacht. Als Anzeichen von Krankheit gelten: ein Gewichtsverlust von mehr als 20%, ungepflegtes Fell, Apathie, Durchfall, Atembeschwerden oder eine unphysiologische Körperhaltung bzw. Fortbewegung. Bei einem oder mehreren Anzeichen von Krankheit, werden die Tiere getötet und analysiert.

3.22.5 Analyse moribunder Mäuse

3.22.5.1 Blutbilder

Lebenden Tieren wird 0,5 – 1 mm der Schwanzspitze abgeschnitten und aus dem austretenden Blut ein Blutastrich auf einem Objektträger angefertigt. Dieser wird nach Pappenheim (Hallmann, 1980) gefärbt und unter dem Mikroskop morphologisch begutachtet.

Mit einem 35 µl-Clinitube werden 20 µl Blut aus der abgeschnittenen Schwanzspitze abgenommen und mit 250 µl PBS/0,11% Tritriplex verdünnt, um Koagulation zu verhindern. Mit diesem verdünnten Blut wird ein Blutbild erstellt. Die Zahl der weißen Blutzellen („white blood cell count“, WBC) des verdünnten Bluts wird manuell mit der Unopette (Beckton Dickinson) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Bei beiden Methoden muß der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden.

3.22.5.2 Präparation von Knochenmark- und Milzzellen

Die kranken Tiere werden unter Betäubung getötet und die Hinterläufe präpariert (s. o.). Man präpariert ebenfalls die Milz aus den Tieren heraus und legt sie in PBS.

Aus Tibia und Femur werden wie oben beschrieben (Kapitel 3.22.1) Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus etwa 4/5 der Zellen werden mit Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen aufgereinigt, 1/5 der Zellen wird ohne Aufreinigung für weitere Analysen beiseite gestellt.

Die Milz wird gewogen und zusammen mit einem Lineal als Maßstab photographiert. Dann wird die Milz auf einem 70 µm Zellsieb in eine 35 mm Petrischale gelegt. Man fügt 2-3 ml PBS hinzu, zerquetscht die Milz mit dem Stempel einer 1 ml Spritze und passiert sie so durch das Zellsieb. Das Sieb wird mit 2 ml PBS nachgespült. Anschließend wird die Zellsuspension zusätzlich durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen passiert. Aus etwa 4/5 der Zellen werden mit Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen aufgereinigt, 1/5 der Zellen wird ohne Aufreinigung für weitere Analysen beiseite gestellt.

3.22.5.3 Analyse der Oberflächenmarkerexpression von Knochenmarks und Milzzellen

Etwa $2 \cdot 10^6$ der nicht mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten murinen Zellen werden bei 1800 rpm 5 min abzentrifugiert und einmal in FACS-Waschpuffer gewaschen. In 100 µl Endvolumen werden jeweils 200000 Knochenmarks- oder Milzzellen mit 1 µl folgender, PE-konjugierter Antikörperlösungen gemischt: Gr-1, Mac-1, CD45R/B220, CD3ε und Ter-119. Als Negativkontrolle dienen je 200000 mit IgG_{2a} und IgG_{2b} Isotypkontrollen unspezifisch gefärbte Zellen und 200000 nicht gefärbte Zellen. Die Färbung der Zellsuspensionen ist oben beschrieben.

3.22.5.4 Morphologische Analyse der Knochenmarks- und Milzzellen

Etwa $1 \cdot 10^6$ der nicht mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten murinen Zellen werden bei 1800 rpm 5 min abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. In 100 µl Endvolumen werden jeweils einmal 400000, 200000 und 100000 Zellen

resuspendiert und mittels spezieller Objekträgeraufsätze („cytofunnel“) in einer Zytozentrifuge auf Objekträger zentrifugiert („Cytospins“). Präparate, die aus gleichmäßig verteilten, dicht aber einzeln liegenden Zellen bestehen werden 1 Stunde getrocknet und anschließend nach Pappenheim (Hallmann, 1980) gefärbt.

3.22.5.5 Kontrolle der Transgenexpression in murinen Knochenmarks- und Milzzellen

Nachdem die mononukleären Zellen mittels Ficoll-Hypaque Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt werden, wird die Hälfte dieser Zellen mit SDS-Lysis-Puffer (Laemmli-Puffer) lysiert. Später werden Western-Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt

3.22.6 Applikation von As₂O₃

10 Tage nach der Transplantation mit BCR/ABL infiziertem Knochenmark wird den Tieren einmal täglich 50 µg As₂O₃ in 400 µl 0,9% physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert.

4 Ergebnisse

4.1 Rolle der N-terminalen „coiled-coil“-Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL für die Sensibilität gegenüber STI571.

4.1.1 Charakterisierung der Bildung von Hochmolekulargewichtskomplexen verschiedener ABL-Mutanten

Die aberrante Autophosphorylierung von ABL ist mit seiner Oligomerisierung verbunden. Phosphoryliertes ABL vermittelt Faktor-unabhängiges Wachstum in hämopoetischen Vorläuferzellen und Verankerung-unabhängiges Wachstum von Fibroblasten (McWhirter et al., 1993). Außerdem führt chemische Dimerisierung von c-ABL zu seiner onkogenen Aktivierung (Smith und Van Etten, 2001). Um die Rolle der Di- bzw Oligomerisierung für die Aktivierung der transformierenden Aktivität von der ABL-Teil von BCR/ABL (#ABL) weiter aufzuklären, wurden an #ABL die Oligomerisierungsdomänen von TEL, PML, PLZF und BCR selbst fusioniert. Bei diesen Oligomerisierungsdomänen handelte es sich um die „helix-loop-helix“ Domäne (HLH) von TEL (AS 51-124)(Golub et al., 1996), die „coiled-coil“ enthaltende Sequenz von PML (PCC) (AS 221-361 von PML II)(Grignani et al., 1996; Jensen et al., 2001), die Pocken-Virus und Zinkfinger Domäne von PLZF (POZ) (AS 1-125)(Puccetti et al., 2001) und die „coiled-coil“ von BCR (BCC) (AS 1-63)(McWhirter et al., 1993)(Abb. 4). Um die Frage zu beantworten, ob die Oligomere, die von diesen chimären ABL-Fusionskonstrukten (X-ABL) gebildet werden, Unterschiede aufweisen, wurde deren Quartärstruktur untersucht, die sich in der Größe der gebildeten Hochmolekulargewichtskomplexe (HMG-Komplexen) widerspiegelt. Zu diesem Zweck wurden Cos-1 Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert, der p185^(BCR/ABL), BCC-ABL, POZ-ABL, PCC-ABL und HLH-ABL unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. In die Analyse wurde ebenfalls eine BCR/ABL-Mutante miteinbezogen, bei der die „coiled-coil“-Domäne fehlt (Δ CCp185). 36 bis 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschlossen und die erhaltenen Zellysate wurden mittels Größenausschluß-HPLC aufgetrennt und in Fraktionen gesammelt. Die einzelnen HPLC-Fraktionen wurden anschließend mit Hilfe von „western blot“ Analyse mit einem ABL-spezifischen Antikörper (α -ABL) auf Anwesenheit der verschiedenen ABL-Fusionsproteine hin untersucht.

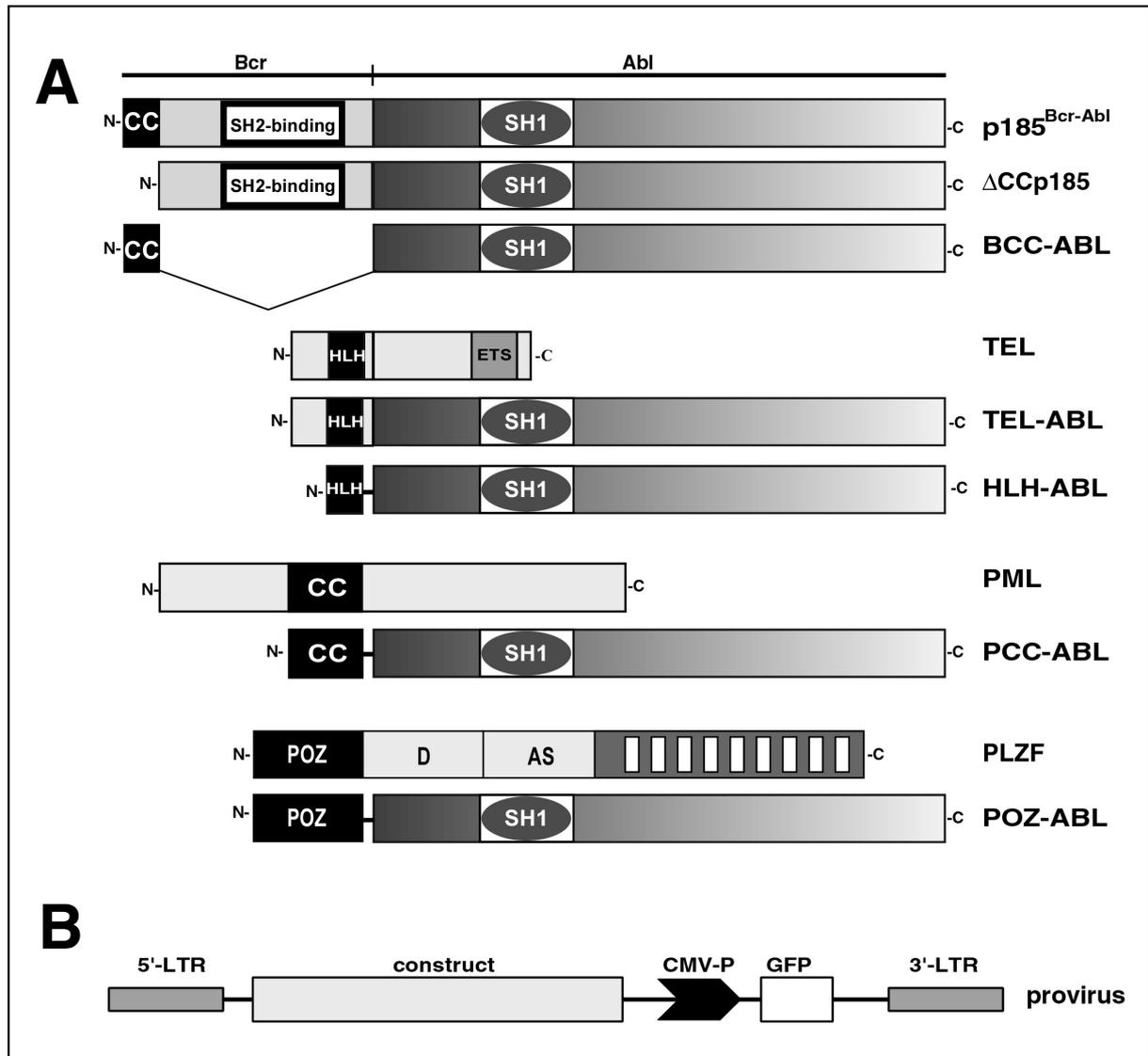


Abbildung 4 : Schematische Darstellung der BCR-ABL Konstrukte und des Provirus. **(A)** Verwendete cDNA-Konstrukte: Wildtyp p185^(BCR-ABL), N-terminale Deletionsmutante der „coiled-coil“ Oligomerisierungsdomäne (ΔCCp185); Fusion der N-terminalen „coiled-coil“-Domäne (CC) of BCR (AS 1-63) an den ABL-Teil von BCR/ABL (#ABL) (BCC-ABL); Fusion der „helix-loop-helix“ (HLH) Dimerisierungsdomäne von TEL (AS 52-124) an #ABL (HLH-ABL), Fusion der „coiled-coil“- Oligomerisierungsdomäne von PML3 (AS 244-383) an #ABL (PCC-ABL), Fusion der PLZF-POZ Oligomerisierungsdomäne (AS 1-125) an #ABL. Zum besseren Verständnis wurden schematische Darstellungen von TEL; TEL-ABL; PML und PLZF zu dieser Abbildung hinzugefügt. **(B)** Schema des Provirus, der zur Transduktion der Ba/F3-Zellen verwendet wurde: die Transkription der Transgene wird vom 5'-LTR, die des GFP-Reportergens durch den CMV-promotor (CMV-P) kontrolliert.

Wie in Abb. 5 dargestellt ist, waren die HMG-Komplexe von p185^(BCR/ABL) größtenteils in den Fraktionen zu finden, die einem anscheinenden Molekulargewicht (MG) von 670 bis 1070 kDa entsprachen. Im Gegensatz dazu wurde endogenes ABL von den Gelfiltrationssäulen in

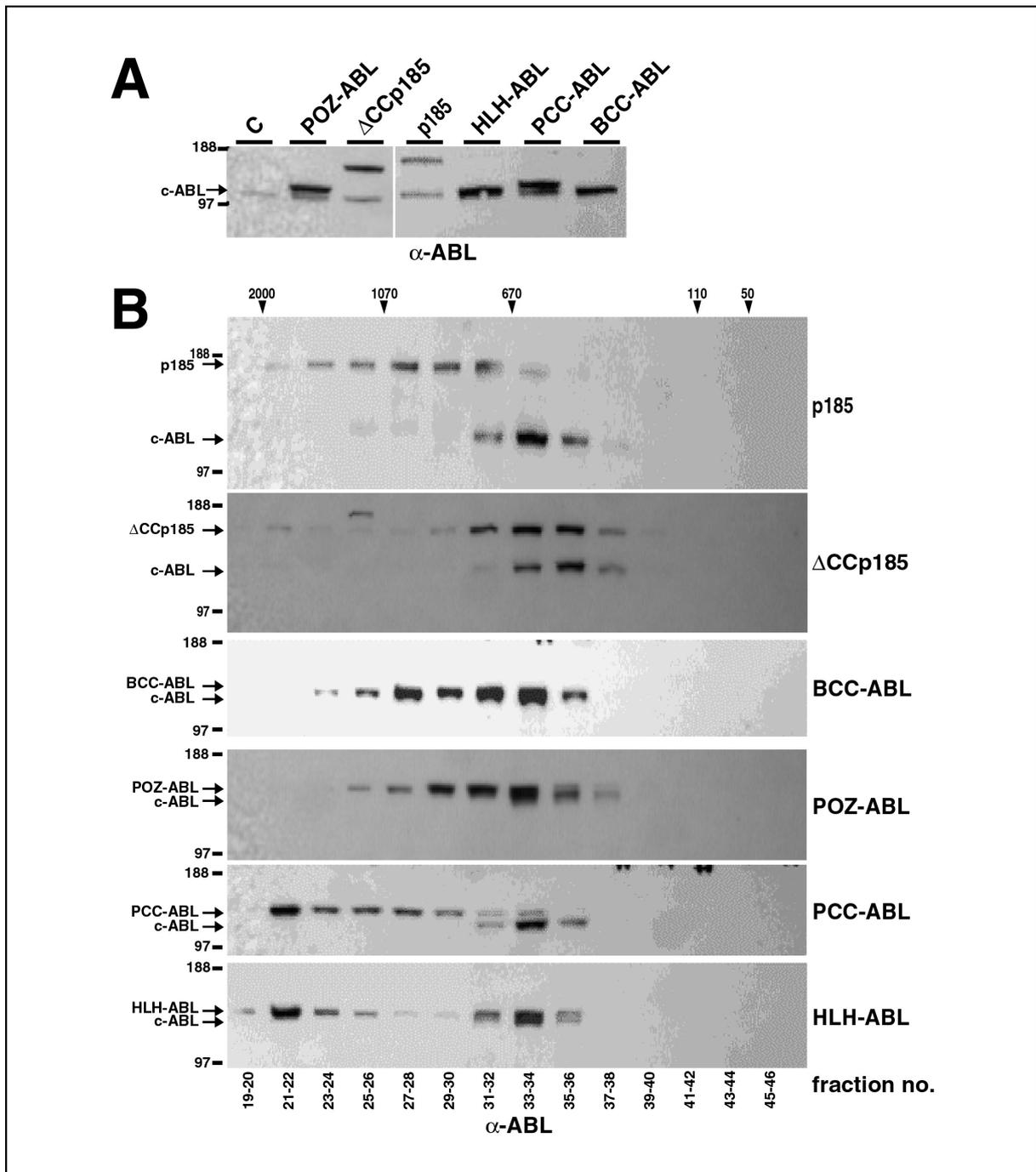


Abbildung 5: Bildung von Hochmolekulargewichtskomplexen (HMG-Komplexe) durch BCR-ABL Mutanten. Die angegebenen Konstrukte wurden transient in Cos-7 Zellen exprimiert. **(A)** Die Expression wurde mittels Western-Blots von Zellysaten unter Verwendung eines anti-ABL (α -ABL) Antikörpers überprüft. **(B)** Zellysate wurden mittels Größenausschluß-HPLC fraktioniert. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Vorhandensein von BCR-ABL Mutanten wurde mittels Western-Blots unter Verwendung eines α -ABL nachgewiesen. Die Zahlen oberhalb des Bildes geben das Molekulargewicht (MG) der entsprechenden HPLC-Fractionen wider, die Zahlen auf der linken Seite geben das MG im SDS-PA-Gel an. Unten ist die Nummer der Fraktionen aufgeführt.

Komplexen eluiert, die ein MG von ungefähr 400-670 kDa aufwiesen. Der theoretische Wert des MG von c-ABL liegt bei 145 kDa. Diese Ergebnisse bestätigen, daß durch die Fusion mit

BCR die Fähigkeit von ABL zu oligomerisieren erhöht wird. Dementsprechend verschiebt sich durch die Deletion der „coiled-coil“ Region von BCR das Elutionsmuster der HMG-Komplexe von p185^(BCR/ABL) nach rechts zu Fraktionen von ungefähr 670 kDa, wodurch das Elutionsprofil von Δ CCp185 dem von endogenem ABL sehr ähnlich erscheint. Allerdings sind anti-ABL reaktive HMG-Komplexe bei Δ CCp185 bis zu einem Molekulargewicht von 2000 kDa in sehr geringer Menge nachweisbar. Während BCC-ABL und POZ-ABL ähnliche Elutionsprofile wie p185^(BCR/ABL) aufwiesen, waren sowohl PCC-ABL als auch HLH-ABL hauptsächlich in den HPLC-Fraktionen enthalten, in denen HMG-Komplexe größer als 670 kDa eluierten. Das Elutionsprofil dieser beiden Konstrukte erreicht seine stärkste Fraktion bei einem Molekulargewicht von 2000 kDa.

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß die Fähigkeit HMG-Komplexe zu bilden von der Art der Oligomerisierungsfläche abhängt. Interessanterweise führen die HLH-Domäne von TEL und die „coiled-coil“-Domäne von BCR, beides Proteine, die in Leukämie-assoziierten Translokationen als Fusionspartner von ABL bekannt sind, zu unterschiedlichen HMG-Komplex Elutionsprofilen.

4.1.2 Oligomerisierungsflächen, die von unterschiedlichen Proteinen stammen, aktivieren die ABL-Kinase und induzieren Faktorunabhängigkeit in Ba/F3-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Art der Oligomerisierungsdomäne und die damit zusammenhängende Größe der gebildeten HMG-Komplexe das Transformationspotential der ABL-Fusionsproteine beeinflussen kann, wurde die Fähigkeit der X-ABL-Konstrukte, faktorunabhängiges Wachstum zu induzieren, mit derjenigen von p185^(BCR/ABL) verglichen. Dazu wurden die ABL-Fusionskonstrukte HLH-ABL, PCC-ABL, POZ-ABL und BCC-ABL sowie p185^(BCR/ABL) mittels retroviraler Transduktion in IL-3 abhängigen Ba/F3-Zellen exprimiert. 72 Stunden nach der Infektion wurde IL-3 aus dem Medium ausgewaschen. Die Expression der Transgene sowie deren Autophosphorylierung wurden mittels „western blot“ Analysen mit α -ABL und anti-Phosphotyrosin (α -p-Tyr) Antikörpern nachgewiesen (Abb. 6A).

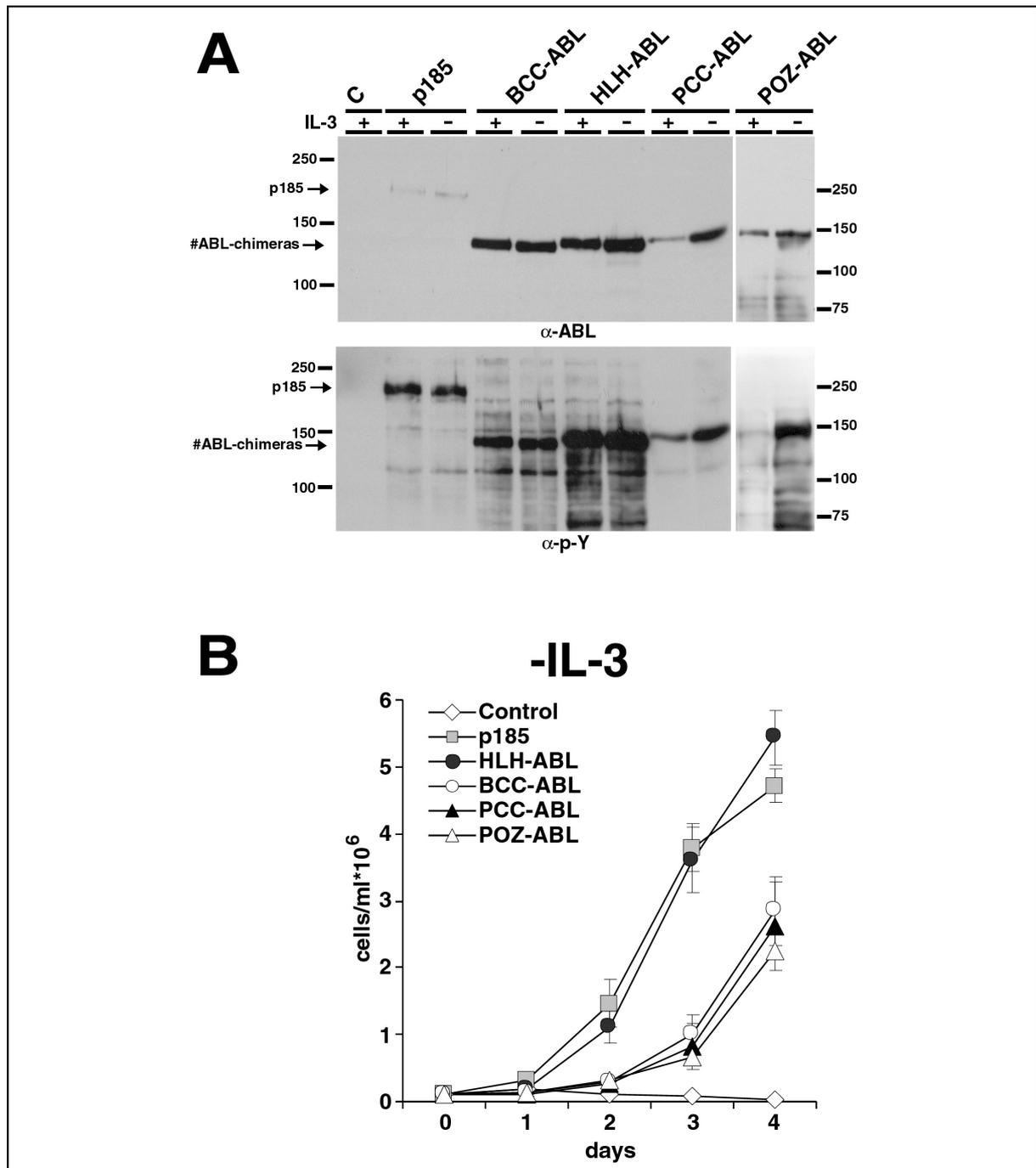


Abbildung 6: Retrovirale Expression der chimären #ABL-Fusionskonstrukte in Ba/F3-Zellen und Induktion von faktorunabhängigem Wachstum. **(A)** IL-3 abhängige Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor (control; c) oder den angegebenen Mutanten infiziert. Die Expression der Transgene wurde mittels Western-Blot von Gesamtzellsate mit einem α -ABL einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -p-Y) überprüft. **(B)** Infizierte Ba/F3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL-3 ausplattiert und die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt (gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten \pm Standardabweichung).

Wie in Abb. 6B gezeigt wird, wuchsen HLH-ABL-infizierte Ba/F3-Zellen nach dem Entzug von IL-3 mit einer vergleichbaren Kinetik wie p185^(BCR/ABL)-exprimierende Ba/F3-Zellen. Im Gegensatz dazu war der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase in BCC-ABL-

exprimierenden Ba/F3-Zellen um etwa 2 Tage verzögert. Die Wachstumsverzögerung von PCC-ABL und POZ-ABL scheint dagegen mit einem niedrigeren Expressionsniveau dieser Konstrukte zusammenzuhängen (Abb. 6A). Mit Hilfe der GFP-Expression wurde bestätigt, daß die Infektionsraten der Zellpopulationen vergleichbar waren, und bei Faktorentzug nur infizierte Zellen wachsen konnten (eigene, nicht gezeigte Daten). Nachdem die Transgen-exprimierenden Zellen durch den Faktorentzug selektioniert waren, konnte kein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau und Phosphorylierungsstatus der Transgene festgestellt werden (Abb. 6A).

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß #ABL, wenn es mit verschiedenen Oligomerisierungsoberflächen fusioniert wurde, in der Lage ist, Ba/F3 Zellen faktor-unabhängig zu machen.

4.1.3 Faktorunabhängige Ba/F3-Zellen, die verschiedene chimäre ABL-Fusionskonstrukte exprimieren, zeigen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber STI571

Der ABL-Kinase Inhibitor STI571 inhibiert selektiv die ABL-Kinase von c-ABL und Leukämie-assoziierten ABL-Fusionsproteinen (Buchdunger et al., 1996). Eine Behandlung mit STI571 ist in der Lage, die Transformation durch ABL-abgeleitete Onkoproteine zu unterbinden. Die Tatsache, daß nach der Selektion durch Faktorentzug augenscheinlich kein Unterschied in der Phosphorylierung der X-ABL Konstrukte feststellbar war, führte zu der Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen der Bildung unterschiedlich großer HMG-Komplexe und der Sensibilität gegenüber STI571 geben könnte. Daher wurden p185^(BCR/ABL), BCC-ABL, HLH-ABL, PCC-ABL und POZ-ABL retroviral in Ba/F3-Zellen exprimiert und diese einem 7 Tage dauernden Faktorentzug unterworfen. Anschließend wurden die Zellen in IL-3 freien Medium in An- und Abwesenheit von 1 µM STI571 neu ausplattiert und die Proliferation 4 Tage durch Trypanblaufärbung verfolgt. Wie in Abbildung 7A zu sehen ist, gab es in Abwesenheit von STI571 keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den Ba/F3-Zellpopulationen, die die verschiedenen Konstrukte exprimierten. Im Gegensatz zu Ba/F3-Zellen, die entweder p185^(BCR/ABL), HLH-ABL oder PCC-ABL exprimierten und durch 1µM STI571 nur geringfügig im Wachstum beeinträchtigt waren, wurde die Proliferation von BCC-ABL oder POZ-ABL exprimierenden Ba/F3-Zellen vollständig unterbunden (Abb. 7B).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß verschiedene Oligomerisierungsoberflächen, wenn sie an #ABL fusioniert werden, die STI571-Sensibilität von Zellen beeinflussen, deren Faktor-unabhängiges Wachstum von der Expression dieser Konstrukte abhängt.

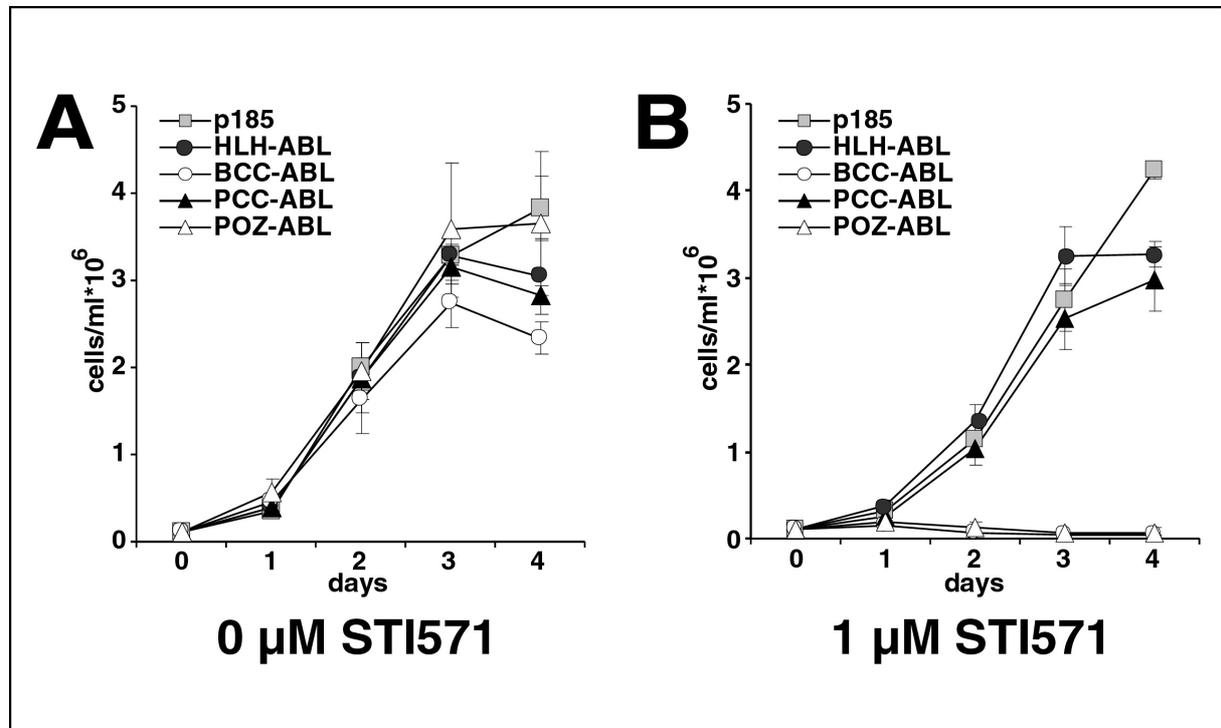


Abbildung 7: Sensibilität des faktorunabhängigen Wachstum von transduzierten Ba/F3-Zellen gegenüber STI571. Nach einer Woche Faktorentzug wurden transduzierte Ba/F3-Zellen in IL-3 freiem Medium in einer Zellzahl von 100000 Zellen/ml ausplattiert. STI571 wurde in Konzentrationen von (A) 0 µM oder (B) 1 µM zugesetzt. Die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt (gezeigt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ± Standardabweichung).

4.1.4 X-ABL Konstrukte sind nicht in der Lage RAT-1 Zellen zu transformieren

Um das Transformationspotential der X-ABL Konstrukte weiter abzuklären, wurde deren Fähigkeit, Adhäsion-unabhängiges Wachstum von immortalisierten Fibroblasten im semi-soliden Medium untersucht. Daher wurden RAT-1 Zellen mit den verschiedenen X-ABL Konstrukten retroviral transduziert. Die Infektionseffizienz wurde anschließend im FACS anhand des Prozentsatzes der Zellen, die GFP exprimieren, gemessen. 48 Stunden nach der Infektion wurden 5000 Zellen in Methyl-Zellulose ausplattiert und die Kolonien nach 14 Tagen gezählt. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die Anzahl der Kolonien wurde mit Hilfe der Infektionseffizienz normalisiert. Im Gegensatz zur Expression von p185^(BCR/ABL) führte die Expression der X-ABL Konstrukte nicht zur Bildung von Kolonien (Tab. 3). Daraus kann man schließen, daß X-ABL Konstrukte nicht in der Lage sind, Adhäsion-unabhängiges Wachstum von RAT-1 Zellen zu vermitteln, auch wenn sie sehr

große HMG-Komplexen bilden, oder eine mit p185^(BCR/ABL)-vergleichbare STI571-Sensibilität vermitteln.

Es bleibt also festzuhalten, daß die Expression von X-ABL Konstrukten, die in hämopoetischen Zellen mit unterschiedlicher Effizienz Faktorunabhängigkeit vermitteln, nicht in der Lage ist, Fibroblasten zu transformieren.

Transduziertes Konstrukt	Normalisierte Koloniezahl ± Standardabweichung
Kontrolle	0,0 ± 0,0
P185	159,9 ± 21,9
BCC-ABL	0,0 ± 0,0
HLH-ABL	0,0 ± 0,0
PCC-ABL	0,0 ± 0,0
POZ-ABL	0,0 ± 0,0

Tabelle 3: RAT-1 Colonie-Assay mit chimären #ABL-Fusionskonstrukten. RAT-1 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten infiziert. 5000 Zellen wurden in 1 ml Methylzellulose ausplattiert. Die Koloniezahlen wurden nach 14 Tagen gezählt und mit der Infektionseffizienz normalisiert. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben.

4.1.5 Die Deletion der Aminosäuren 1-63 verzögert die p185^(BCR/ABL)-vermittelte Faktorunabhängigkeit von hämopoetischen Vorläuferzellen

Kürzlich wurde gezeigt, daß eine p210^(BCR/ABL)-Mutante, der die N-terminale coiled-coil^{cc} Oligomerisierungsoberfläche fehlte (Δ CCp210), in der Lage war, hämopoetische Vorläuferzellen faktorunabhängig zu machen und in einem Transduktions-Transplantationsmodell T-Zell-Leukämie in Mäusen hervorzurufen (He et al., 2002).

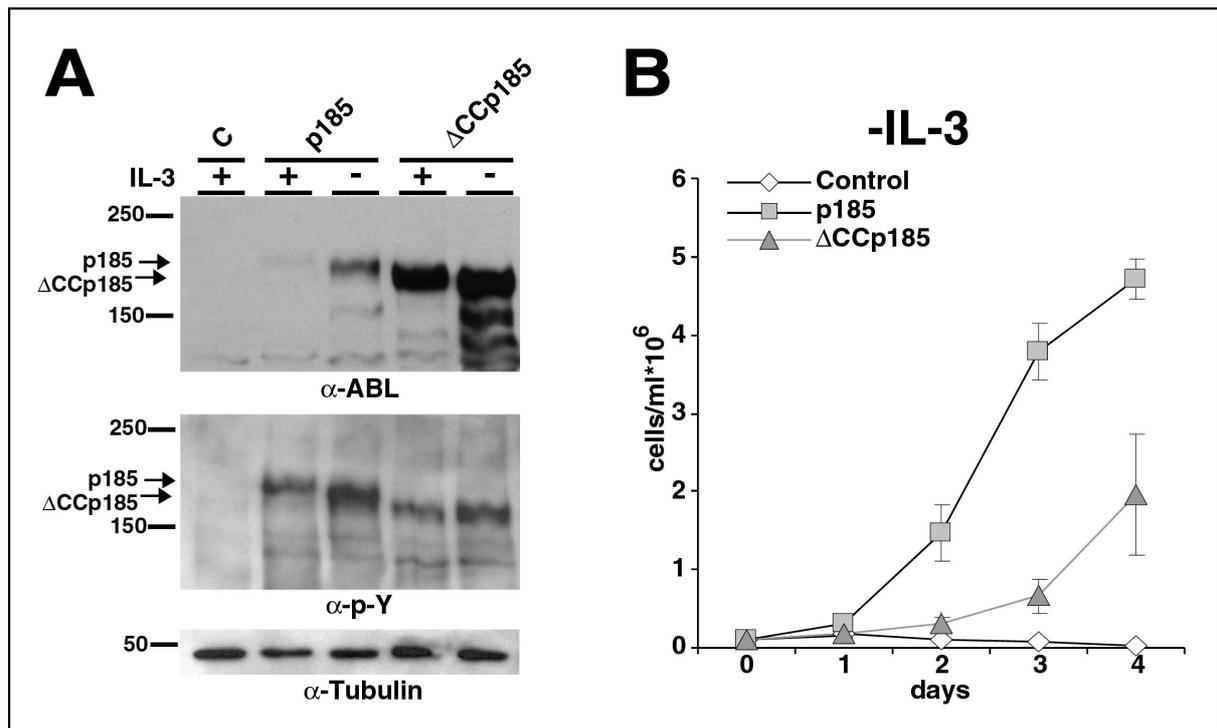


Abbildung 8: Retrovirale Expression von WT p185^(BCR/ABL) und Δ CCp185 in Ba/F3-Zellen und Induktion von faktorunabhängigem Wachstum. **(A)** IL-3 abhängige Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor (control; c) oder wie angegeben mit p185^(BCR/ABL) bzw. Δ CCp185 infiziert. Die Expression der Transgene wurde mittels Western-Blot von Gesamtzelllysaten mit einem α -ABL einem α -p-Y Antikörper überprüft. **(B)** Infizierte Ba/F3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL-3 ausplattiert und die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt (gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten \pm Standardabweichung).

Unter 4.1.1 wurde beschrieben, daß Δ CCp185 HMG-Komplexe bildet - wenn auch mit einem geringeren Molekulargewicht als p185^(BCR/ABL) - und die Sensibilität gegenüber STI571 in Abhängigkeit von der an #ABL fusionierten Oligomerisierungsoberfläche und dem zugehörige Elutionsprofil der HMG-Komplexe variiert. Aus diesen drei Beobachtungen ergibt sich die Frage, welchen Einfluß die Deletion der „coiled-coil“ von BCR/ABL auf dessen Transformationsaktivität und STI571-Sensibilität hat. Daher wurde die Fähigkeit von Δ CCp185 und p185^(BCR/ABL), Ba/F3-Zellen zu faktorunabhängigem Wachstum zu verhelfen, miteinander verglichen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Expression und Phosphorylierung der transduzierten Proteine wurde mittels α -ABL bzw. α -p-Tyr „western blot“ untersucht (Abb 8A). Während Leervektor-infizierte Ba/F3-Zellen erwartungsgemäß nicht ohne IL-3 überlebten, wuchsen Zellen, die mit Δ CCp185 transduziert wurden, im Vergleich zu p185^(BCR-ABL) exprimierenden Ba/F3-Zellen mit einer Verzögerung von etwa 2 Tagen hoch (Abb. 8B). Dabei waren beide Konstrukte vor und nach dem IL-3 Entzug ähnlich stark phosphoryliert (Abb. 8A).

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß die Deletion der „coiled-coil“ von BCR/ABL die Transformierungsaktivität des Onkoproteins in hämopoetischen Zellen erniedrigt.

4.1.6 Faktorunabhängige Ba/F3-Zellen, die Δ CCp185 exprimieren, reagieren gegenüber STI571 sensibler, als $p185^{(BCR/ABL)}$ exprimierende Ba/F3-Zellen

Um zu untersuchen, ob die langsamere Wachstumskinetik der Oligomerisierung-defizienten BCR/ABL-Mutanten als Zeichen für ein geringeres Transformierungspotential interpretiert werden kann, wurden Ba/F3-Zellen mit $p185^{(BCR/ABL)}$ und Δ CCp185 infiziert und nach 7 Tagen Faktorentzug in An- und Abwesenheit von 1 μ M STI571 ausplattiert. Das Wachstum der Zellen wurde 4 Tage mittels Trypanblaufärbung gemessen. Wie in Abbildung 9A dargestellt, zeigen die Zellen ohne STI571 keinen Unterschied in der Proliferation. Ba/F3-Zellen, die einer Konzentration von 1 μ M STI571 ausgesetzt waren zeigten bei Expression von Δ CCp185 eine deutliche Inhibierung des Wachstums verglichen mit $p185^{(BCR/ABL)}$ -exprimierenden Zellen (Abb. 9B).

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß die Deletion der „coiled-coil“ von BCR/ABL die Transformierungsaktivität des Onkoproteins in hämopoetischen Zellen erniedrigt.

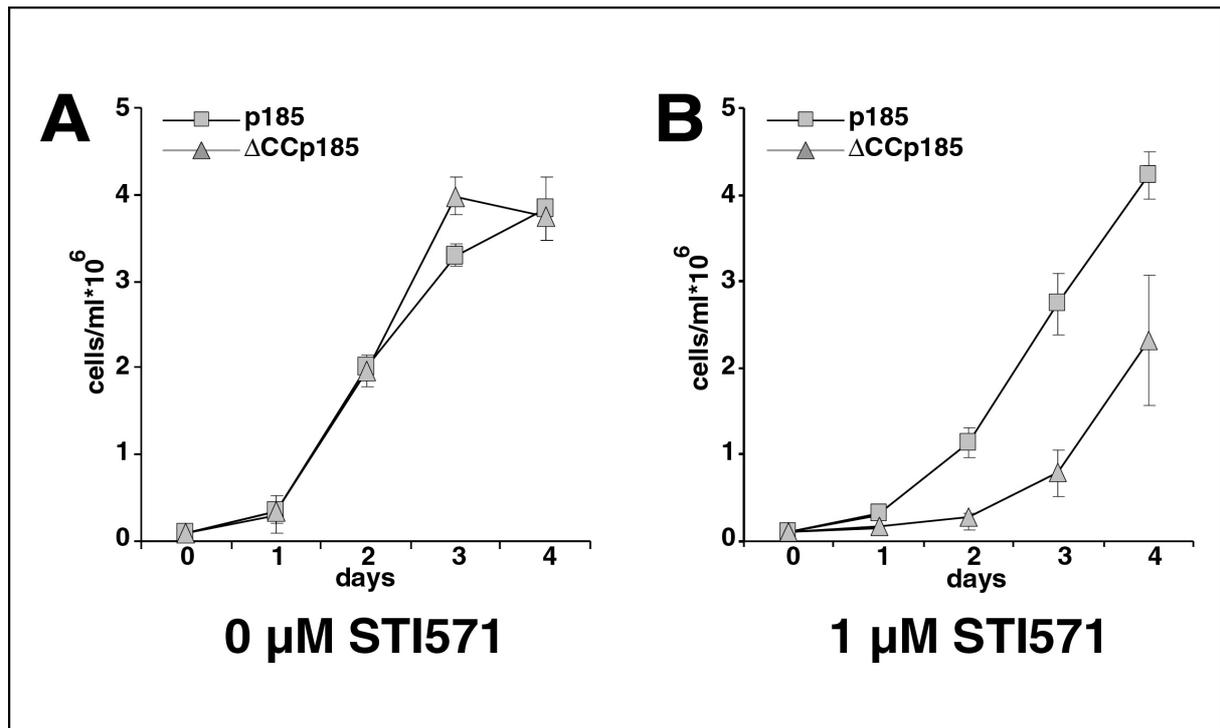


Abbildung 9: Sensibilität des faktorunabhängigen Wachstum von transduzierten Ba/F3-Zellen gegenüber STI571. Nach einer Woche Faktorentzug wurden mit p185^(BCR/ABL) bzw. ΔCCp185 transduzierte Ba/F3-Zellen in IL-3 freiem Medium in einer Zellzahl von 100000 Zellen/ml ausplattiert. STI571 wurde in Konzentrationen von (A) 0 μM oder (B) 1 μM zugesetzt. Die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt (gezeigt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten ± Standardabweichung).

4.1.7 Die isolierte BCR-„coiled-coil“ interagiert in vitro und in vivo mit BCR/ABL

Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von BCR oder den ersten 160 Aminosäuren von BCR die transformierende Aktivität von p210^(BCR/ABL) verhindert (Guo et al., 1998; Lin et al., 2001; Wu et al., 1999). Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Effekte mit einer Inhibierung der Autophosphorylierung durch eine Interferenz mit der Homo-Oligomerisierung von BCR/ABL zusammenhängen. Daher wurde der Fragestellung nachgegangen, ob ein molekulares „targeting“ der „coiled-coil“ von p185^(BCR/ABL) das Transformationspotential dieses Onkoproteins beeinflussen kann. Dazu wurde die p185^(BCR-ABL) mit einem Peptid „angegriffen“, das aus den ersten 63 Aminosäuren von BCR, also einer funktionalen Oligomerisierungsdomäne (McWhirter et al., 1993), besteht und mutmaßlich an BCR/ABL binden kann.

Um die Fähigkeit zu überprüfen, ob die isolierte BCR-„coiled-coil“ (BCC) alleine an p185^(BCR-ABL) binden kann, wurden sogenannte „pull-down“ Experimente durchgeführt. Zellysate von p185^(BCR-ABL) exprimierenden Ba/F3-Zellen wurden mit einem an Sepharose gekoppelten GST-BCC Fusionspeptid inkubiert. Nach intensiven Waschschrinen, wurden die

Proteinkomplexe mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt und im „western blot“ mit einem α -ABL Antikörper analysiert. Wie in Abb. 10A gezeigt, ist GST-BCC in der Lage p185^(BCR-ABL) zu präzipitieren.

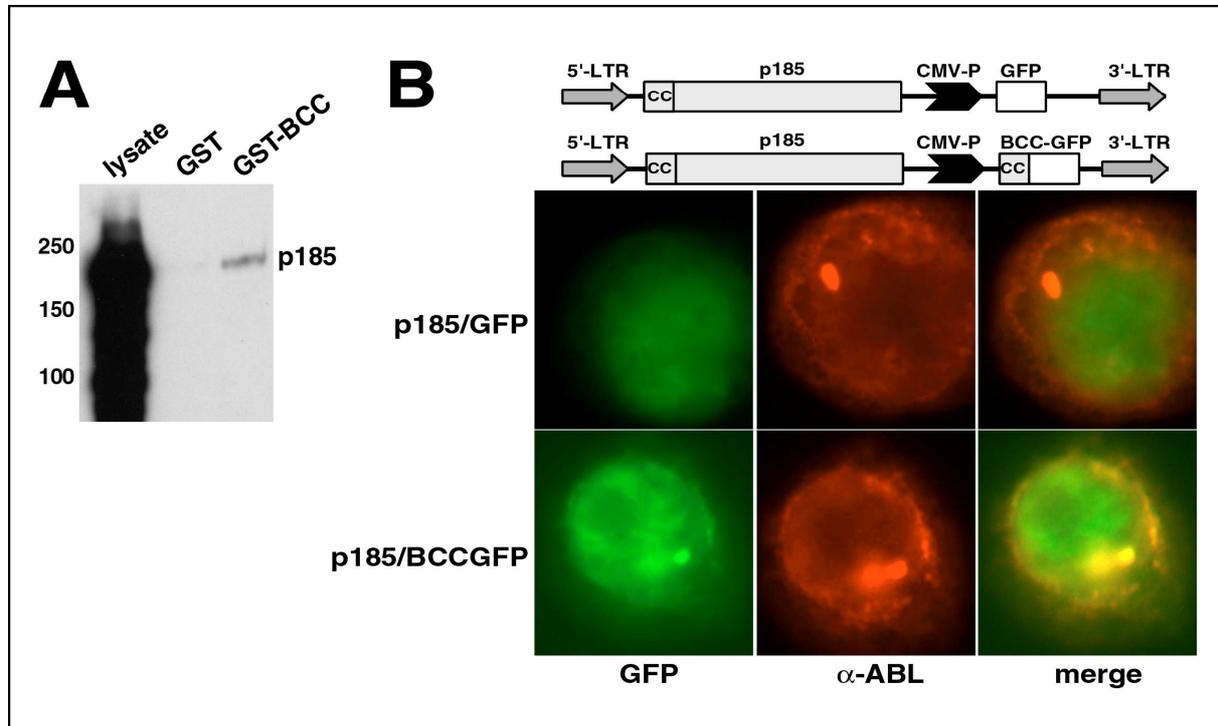


Abbildung 10: *In vitro* und *in vivo* Interaktion der BCR-„coiled-coil“ Domäne (BCC) mit p185^(BCR-ABL). **(A)** *In vitro* „pull-down“ Assay mit Zellysaten von p185^(BCR-ABL)-exprimierenden, IL-3 unabhängigen Ba/F3-Zellen. Lysate mit einer Gesamtproteinmenge von 1 mg wurden mit bakteriell exprimiertem Glutathionsepharose-immobilisiertem GST oder GST-BCC inkubiert. Präzipitiertes p185^(BCR-ABL) wurde mittels Western-Blot mit einem α -ABL Antikörper nachgewiesen. **(B)** *In vivo* Immunofluoreszenzstudie. Ein C-terminales BCC-GFP Fusionsprotein wurde retroviral mit p185^(BCR/ABL) koexprimiert (vgl. Schema des Provirus). Als Kontrolle wurde p185^(BCR-ABL) mit GFP koexprimiert. Die Zellen wurden sie mit einem α -ABL Antikörper (roter Farbkanal) gefärbt. GFP bzw. BCC-GFP wurden im grünen Farbkanal detektiert. Beide Farbkanäle wurden elektronisch überlagert (merge).

Um diese *in vitro* Interaktion zwischen BCC und p185^(BCR-ABL) *in vivo* zu überprüfen, wurden mit p185^(BCR-ABL) und BCC koexprimierenden Zellen Kolokalisationsstudien mittels Immunofluoreszenz durchgeführt. Dazu wurde das BCC-Peptid C-terminal mit GFP fusioniert (BCC-GFP). Ba/F3-Zellen wurden dazu mit dem retroviralen Vektor pIDep185/BCC-GFP transduziert. Dieser bi-cistronische retrovirale Vektor ist von PINcP185 abgeleitet, indem das GFP gegen das BCC-GFP Fusionspeptid ausgetauscht wurde (siehe Abb. 10B). P185^(BCR-ABL) wurde mit einem α -ABL Antikörper über einen Cy3-konjugierten Zweitantikörper (rotes Fluorochrom) und BCC über seine Fusion mit dem GFP (grünes Fluorochrom) detektiert. In Abb.10B ist gezeigt, daß das cytoplasmatische Färbemuster von ABL (BCR/ABL und c-ABL) durch mehrere kleine Aggregate und 1 bis 2 große Herde

charakterisiert ist, die nicht bei WT Ba/F3-Zellen zu sehen sind (eigene, nicht gezeigte Daten). Diese Herde bilden sich in Zellen mit sehr hoher BCR/ABL-Expression. Das grüne Signal des GFP ist diffus und bei einer Überlagerung des grünen und roten Signals ist keine Kolokalisierung zu erkennen. Im Gegensatz dazu ergab die Überlagerung des grünen Signals von BCC-GFP und des roten von BCR/ABL eine nahezu vollständige Kolokalisierung, was beweist, daß BCC-GFP in den zytoplasmatischen Aggregaten von BCR/ABL zu finden ist. Diese Daten zeigen, daß die Aminosäuren 1-63 von BCR mit p185^(BCR-ABL) interagieren können.

4.1.8 Die Expression von BCC reduziert das transformierende Potential von p185^(BCR-ABL)

Die Fähigkeit von BCC-GFP, mit BCR/ABL *in vivo* zu interagieren, führte zu der Frage, ob diese Interaktion in der Lage ist, mit dem Transformationspotential von p185^(BCR-ABL) zu interferieren. Aus diesem Grund wurde GFP alleine oder p185^(BCR-ABL) gemeinsam mit GFP oder BCC-GFP in RAT-1-Zellen exprimiert, wozu die retroviralen Vektoren PINCO, PINCOp185 bzw. pIDep185/BCC-GFP zur Infektion der Zellen benutzt wurden. Die Infektionseffizienz wurde durch die Messung der GFP-Expression im FACS überprüft. 48 Stunden nach der Infektion wurden jeweils 5000 Zellen in 1 ml Methylcellulose ausplattiert und 14 Tage später die Kolonien gezählt. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und die Anzahl der Kolonien wurde mit der Infektionseffizienz normalisiert. Durch die Anwesenheit von BCC-GFP wurde die Zahl der Kolonien um etwa 1 Drittel erniedrigt (Tab. 4).

Transduziertes Konstrukt	Normalisierte Koloniezahl ± Standardabweichung
Kontrolle	0,0 ± 0,0
P185/GFP	159,9 ± 21,9
P185/BCC-GFP	112,2 ± 4,9

Tabelle 4: Koloniebildung p185^(BCR/ABL) und GFP bzw. BCC-GFP koexprimierender RAT-1 Zellen. RAT-1 Zellen wurden mit p185^(BCR/ABL) und GFP bzw. BCC-GFP koexprimierenden Retroviren infiziert. 5000 Zellen wurden in 1 ml Methylzellulose ausplattiert. Die Koloniezahl wurden nach 14 Tagen ermittelt und mit der Infektionseffizienz normalisiert. Das Experiment wurden in Triplikaten durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben.

Der Einfluß der BCC-GFP Expression auf die p185^(BCR/ABL) vermittelte Faktorunabhängigkeit von Ba/F3-Zellen wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Um auszuschließen, daß die biologischen Effekte von BCC-GFP im wesentlichen von dem GFP-Teil des Fusionspeptids

stammen, wurde in die Experimente ebenfalls ein BCC-Peptid mit FLAG-Tag (11 aa) eingeschlossen (BCC-FLAG). Die Expression der Transgene und deren Autophosphorylierung wurde mittels „western blot“ mit α -ABL bzw. α -p-Tyr Antikörpern untersucht (Abb. 11A). Die Ko-Expression von BCC-GFP oder BCC-FLAG verzögerte das Eintreten der $p185^{(BCR-ABL)}$ vermittelten Faktorunabhängigkeit, ohne es vollständig zu verhindern (Abb. 11C). Bemerkenswerterweise konnte die Expression von BCC-GFP die Phosphorylierung von $p185^{(BCR-ABL)}$ stark reduzieren (Abb. 11A). Wie oben gezeigt, reagierten Ba/F3-Zellen die aufgrund der Expression von $\Delta CCp185$ faktorunabhängig wuchsen, empfindlicher auf STI571 als $p185^{(BCR-ABL)}$ -exprimierende Ba/F3-Zellen. Um die Hypothese zu überprüfen, daß die Koexpression von BCC eine ähnliche Wirkung auf BCR/ABL haben könnte, wie die Deletion der „coiled-coil“, wurden $p185^{(BCR-ABL)}$ und BCC-GFP bzw. BCC-FLAG retroviral in Ba/F3-Zellen mit den oben beschriebenen Vektoren koexprimiert. Nachdem die Zellen einem 7 Tage dauernden Faktorentzug unterworfen worden waren, wurden sie in An- und Abwesenheit von 1 μ M STI571 ausplattiert. Anschließend wurde die Proliferation mittels Trypanblaufärbung 4 Tage lang ermittelt. In Gegenwart von 1 μ M STI571 waren nur die $p185^{(BCR-ABL)}$ -exprimierenden Ba/F3-Zellen in der Lage zu wachsen, die GFP koexprimierten. Sowohl die Koexpression von BCC-GFP als auch von BCC-FLAG vermittelte die komplette Inhibierung der $p185^{(BCR/ABL)}$ induzierten Proliferation durch STI571 (Abb. 11D).

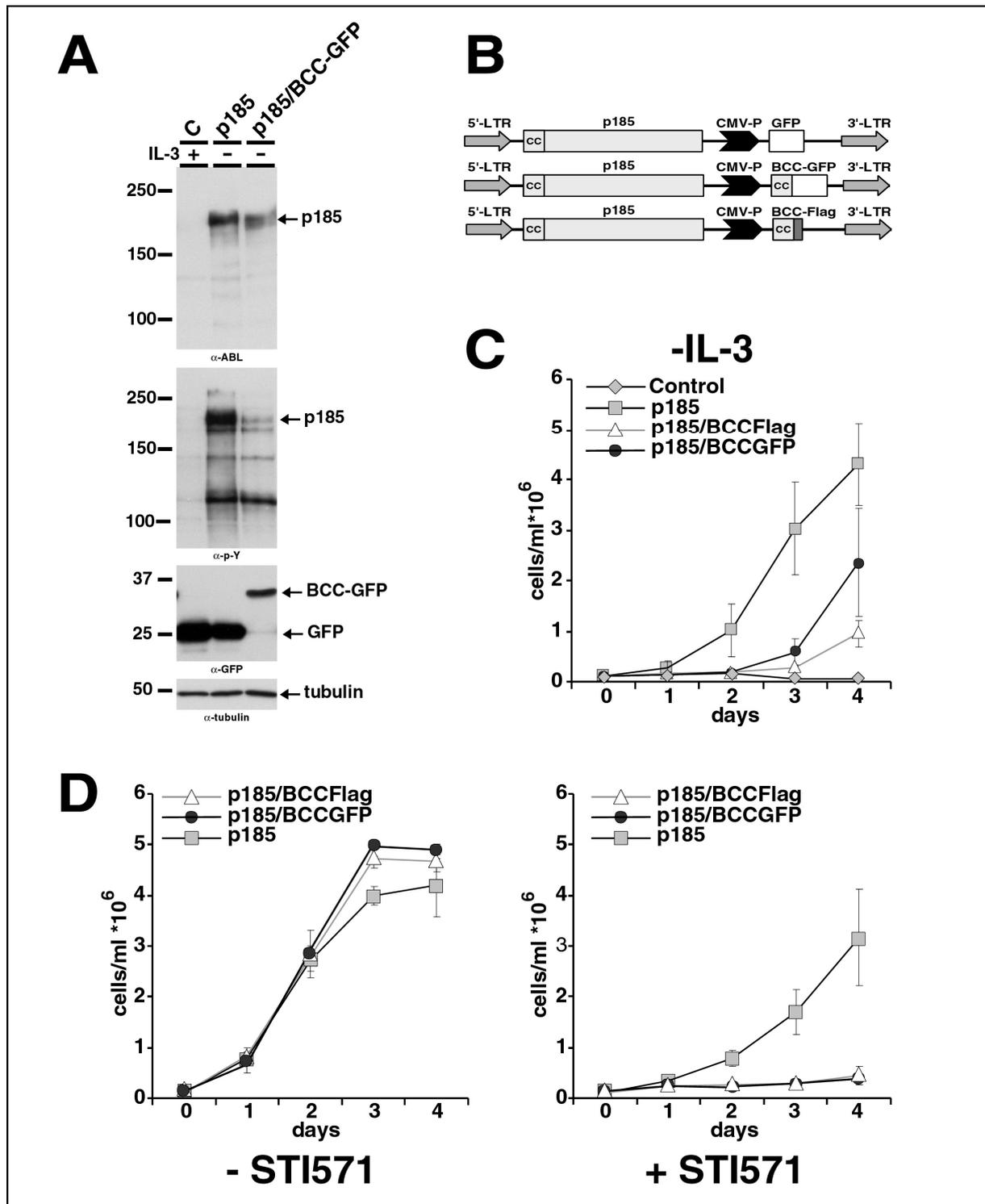


Abbildung 11: Retrovirale Koexpression von BCC und p185^(BCR-ABL) in Ba/F3-Zellen (s. nächste Seite).

(Abbildung 11: vorherige Seite) **(A)** IL-3 abhängige Ba/F3-Zellen wurden mit Leervektor (control; c) oder retroviralen vektoren infiziert, die entweder p185^(BCR-ABL) und GFP oder p185^(BCR-ABL) und BCC-GFP koexprimieren. Gesamtzelllysate wurde mittels Western-Blot mit α -ABL, α -p-Y und α -GFP Antikörpern analysiert. **(B)** Schematische Darstellung des Provirus: die Expression von GFP, BCC-GFP oder BCC-FLAG wurde durch einen CMV-Promotor kontrolliert, die Koexpression von p185^(BCR-ABL) durch das 5'-LTR. **(C)** Infizierte Ba/F3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL-3 ausplattiert und die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt. **(D)** Nach einer Woche Faktorentzug wurden die transduzierten Ba/F3-Zellen in IL-3 freiem Medium in einer Zellzahl von 100000 Zellen/ml ausplattiert. STI571 wurde in Konzentrationen von 0 μ M oder 1 μ M zugesetzt. Die Lebendzellzahl wurde 4 Tage lang durch „dye-exclusion“ Assays bestimmt (in C und D sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten \pm Standardabweichung gezeigt).

Zusammengefaßt zeigen diese Daten, daß die Interaktion von BCC die transformierende Aktivität von p185^(BCR-ABL) reduziert und zu einer stärkeren Sensibilität gegenüber STI571 führt.

4.2 Untersuchungen zum Mechanismus der As₂O₃-induzierten Apoptose durch Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte

4.2.1 Die Überexpression von PML erhöht die Sensibilität gegenüber As₂O₃-induzierter Apoptose

In normalen Zellen führt die Behandlung mit As₂O₃ zu einer Modifikation von PML und in APL-Blasten von PML/RAR α (Sternsdorf et al., 1999). PML ist in mehreren Apoptosesignalwegen involviert (Quignon et al., 1998) (Wang et al., 1998). Aus diesem Grund wurde die Rolle von PML in der As₂O₃-induzierten Apoptose untersucht.

Zuerst wurden PML3 überexprimierende U937-Zellen generiert. Dazu wurde der PML3 kodierende offene Leserahmen (ORF) unter der Kontrolle des Zn²⁺-induzierbaren MT-1 Promotors mittels Elektroporation in U937-Zellen transfiziert (siehe 3.15.3). In Abb. 12A ist die Zn²⁺-induzierte Expression von PML3 überexprimierenden Zellen, die in diesen Untersuchungen verwendet wurden, im Vergleich zu PML/RAR α exprimierenden U937-Zellen (Grignani et al., 1993) dargestellt.

Um den Effekt der Überexpression von PML3 auf die Sensibilität der U937 Zellen für As₂O₃-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden diese Zellen nach 12-stündiger Induktion der Transgenexpression mit 100 μ M Zn²⁺ und 2 μ M As₂O₃ behandelt. Als Kontrolle dienten nicht mit Zn²⁺ vorbehandelte und behandelte mock-transfizierte (MT) U937 Zellen. Die Apoptoserate wurde zwischen 72 und 96 Stunden nach As₂O₃ Exposition im FACSscan nach Färbung der Zellen mit 7-AAD ermittelt (siehe 3.18)(Puccetti et al., 2000; Sternsdorf et al., 1999). As₂O₃ induziert Apoptose in PML3- sowie PML/RAR α -exprimierenden U937-Zellen. 80% respektive 95% der Zellen waren davon betroffen. Bei den Kontrollzellen (MT) wurde weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Zn²⁺ eine Zunahme der Apoptoserate festgestellt (Abb. 12B). Eine geringe Steigerung der Apoptoserate durch As₂O₃ in Abwesenheit von Zn²⁺ bei PML/RAR α bzw. PML3 transfizierten Zellen auf 20% bzw. 33% (Abb. 12B) läßt sich am wahrscheinlichsten damit erklären, daß der Zn²⁺-induzierbare MT-Promotor, auch ohne daß Zinkionen vorhanden sind, eine geringe Expression des Transgens zuläßt, welche jedoch nicht im „western blot“ detektiert werden konnte. Man spricht dabei von einer sogenannten „leakage“-Expression (engl. to leake = dt. undicht sein).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine Erhöhung des PML-Expressionsniveaus in U937-Zellen diese gegenüber einer Apoptoseinduktion durch As₂O₃ sensibilisiert.

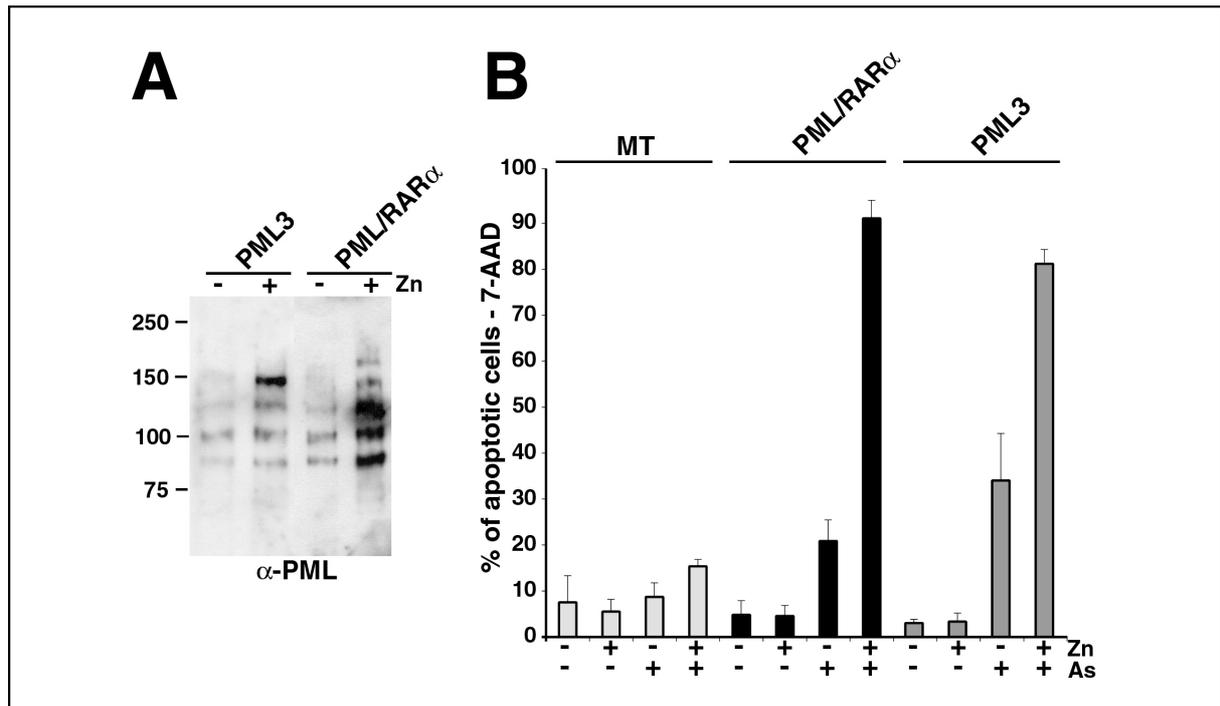


Abbildung 12: Überexpression von PML3 in transfizierten U937 Zellen und Apoptoseinduktion durch As₂O₃. **(A)** Western-Blot Analyse der Zn²⁺-induzierten Expression von PML/RAR α und PML3 in stabil transfizierten U937-Zellen nach Inkubation ohne/mit Zn²⁺ (Zn^{-/+}). **(B)** 7-AAD-Analyse zur Messung der Apoptose von PML/RAR α und PML3-überexprimierenden U937 Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (MT). Die Zellen wurden ohne/mit vorheriger Zn²⁺-induzierter (Zn^{-/+}) Proteinexpression ohne/mit As₂O₃ (As^{-/+}), behandelt.

4.2.2 In prä-B-Lymphoblasten verändert die Expression von BCR/ABL das PML-Immunofärbungsmuster

Es ist bekannt, daß die Expression von BCR/ABL Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch As₂O₃ sensibilisiert (Puccetti et al., 2000). In nicht-transformierten Zellen wird PML durch aktiviertes RAS hochreguliert (Ferbeyre et al., Dev 2000 Aug 15). Da auch BCR/ABL RAS aktiviert (Faderl et al., 1999), wurde der Einfluß von BCR/ABL auf die Expression von PML sowie dessen Bedeutung für den As₂O₃-induzierte Apoptose untersucht.

Zunächst wurde der Einfluß der BCR/ABL-Expression auf PML in Ph⁺ Lymphoblastenzelllinien untersucht. Die PML-Expression der BCR/ABL-exprimierenden Zelllinie BV173 wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie mit der PML-Expression in BCR/ABL-negativen Nalm-6 Zellen verglichen. Beide Zelllinien haben ein vergleichbares Differenzierungsstadium auf prä-B Lymphoblastenniveau. Wie in Abbildung 13A zu sehen ist, kann man bei Nalm-6 hinsichtlich des PML-Färbungsmusters zwei unterschiedliche Zelltypen unterscheiden: Ein Typus mit nur drei bis vier punktförmigen Zellkernaggregaten („nuclear dots“), auch Zellkernkörperchen („nuclear bodies“ – PML-NBs) genannt, wobei einer davon stärker ausgeprägt ist, und ein zweiter Typus mit etwa 10-30

kleineren „nuclear dots“ pro Zelle. Das PML-Färbungsmuster der BCR/ABL-exprimierenden BV173 Zellen ist durch eine erhöhte Anzahl (15-30) der PML-NBs charakterisiert, die in ihrer Mehrheit größer ausfallen als bei den Nalm-6 Zellen (Abb.13A).

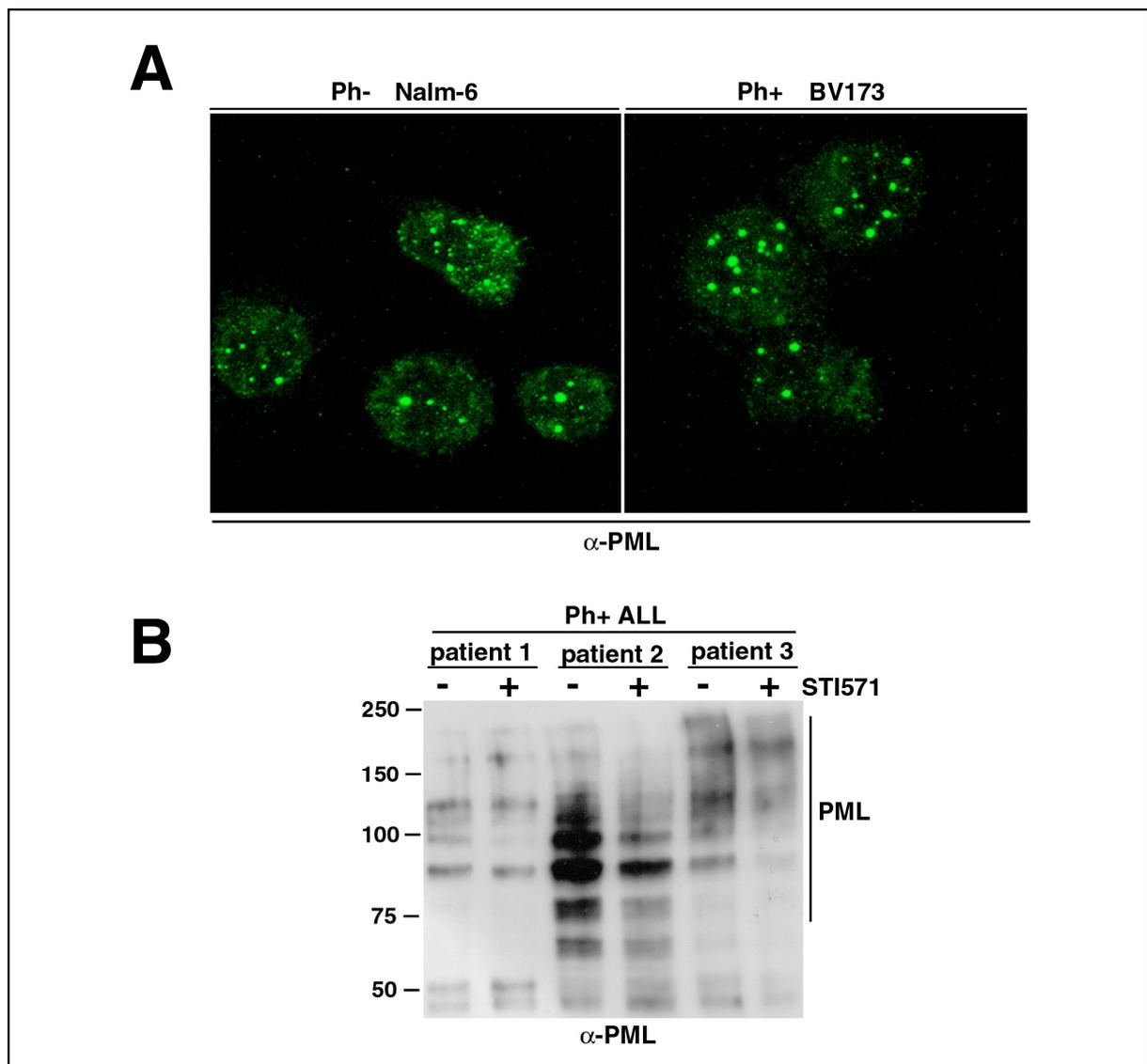


Abbildung 13: Analyse des PML-Immunofärbungsmuster in prä-B-Lymphoblastenzelllinien und Ph+ Patientenzellen. **(A)** Immunofluoreszenzanalyse von PML in Nalm-6 und BV173-Zellen. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen anti-PML Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert. Beide Bilder wurden mit identischen Mikroskop und Lasereinstellungen aufgenommen. Bei der Nachbearbeitung der Bilder im Computer wurden ebenfalls identische Parameter auf beide Bilder angewandt. **(B)** Effekt der BCR/ABL-Kinaseaktivität auf das PML-Expressionsmuster in Ph+ ALL Patientenzellen. Western-Blot Analysen mit Lysaten von Blasten Ph+ ALL Patienten wurden mit einem monoklonalen anti-PML-Antikörper durchgeführt. Patient 1 hatte eine geringe, die Patienten 2 und 3 eine große Anzahl von Blasten im Knochenmark (nicht gezeigte Daten). Die Zellen wurden 24h in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) von 2 µM des ABL-Kinaseinhibitors STI571 kultiviert.

Um diesen Einfluß der BCR/ABL-Expression auf die PML-Expression zu bestätigen, wurden Blasten von drei Patienten mit Ph+ ALL dem ABL-Kinase spezifischen Inhibitor STI571 ausgesetzt. STI571 ist in der Lage, die transformierende Signaltransduktionskaskade von

BCR/ABL, die u.a. die Aktivierung von RAS beinhaltet, zu unterbinden. Patient 1 hatte eine geringe Tumormasse (<10% Blasten im Knochenmark) und wurde daher in diesen Experimenten als Negativkontrolle eingesetzt, während Patient 2 und 3 eine große Tumormasse (zwischen 50 und 70% Blasten im Knochenmark) aufwiesen (eigene nicht gezeigte Daten). Die Inhibierung der BCR/ABL Kinaseaktivität durch STI571 führte in den Patienten 2 und 3, bei denen BCR/ABL-exprimierende Blasten die Mehrzahl der Zellpopulation stellen, zu einer Abnahme der PML-Expression (Abb. 13B).

Zusammengefaßt geben diese Daten einen ersten Hinweis darauf, daß die Anwesenheit von aktivem BCR/ABL das PML-Expressionsniveau sowie die Morphologie der PML-NBs beeinflußt.

4.2.3 Die Expression von BCR/ABL führt zu einer Modifizierung der PML-NB Morphologie

Um zu klären, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von BCR/ABL und der Modifizierung der PML-NBs gibt, wurde der Frage nachgegangen, ob eine ektope Expression von BCR/ABL in U937-Zellen in der Lage ist, die Morphologie der PML-NBs zu verändern. Als Kontrolle diente AML-1/ETO, das Produkt der Translokation t(8;21), von dem bekannt ist, daß es die Morphologie der PML-NBs verändert (McNeil et al., Cell Biochem 2000 Jul 19).

Die PML-NBs von BCR/ABL oder AML-1/ETO exprimierenden U937-Zellen wurden mit denen von MT Kontrollzellen verglichen. Auch diese U937 Zelllinien exprimieren ihre Transgene unter der Kontrolle des Zn^{2+} -induzierbaren MT-1. Im Gegensatz zu Zn^{2+} -behandelten MT Zellen führt die Zn^{2+} -induzierte Expression von BCR/ABL und AML-1/ETO zu einer Zunahme der Anzahl an PML-NBs. Die große Zahl von PML-NBs in den nicht behandelten BCR/ABL-transfizierten Zellen läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf die schon erwähnte "leakage"-Expression des MT-1 Promotors in diesen Zellen zurückführen, die auch in Abwesenheit von Zinkionen eine starke BCR/ABL-Expression zuläßt (Puccetti et al., 2000) (Abb. 14).

Diese Daten zeigen, daß die Expression von Leukämie-assoziierten Translokationsprodukten zu einer Modifizierung von PML-NBs führt.

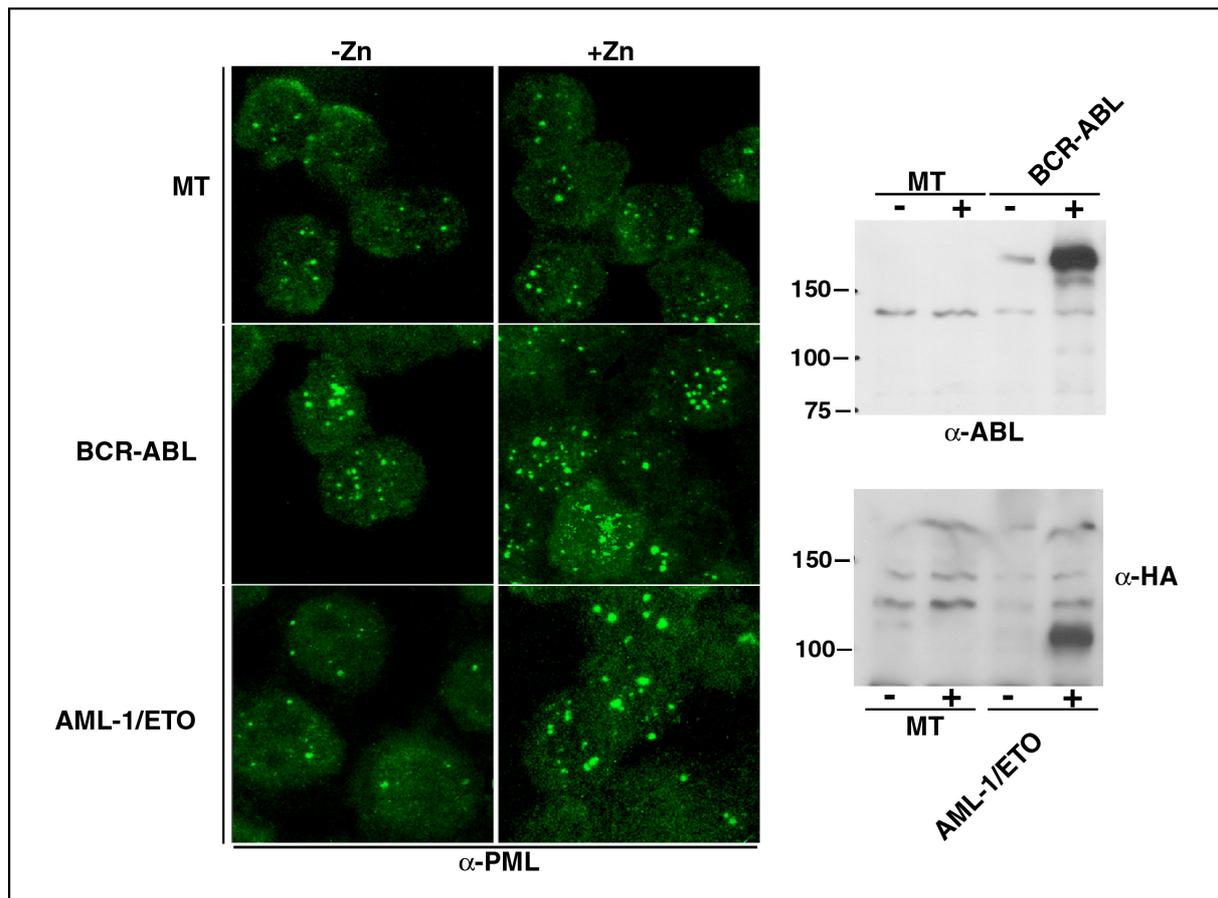


Abbildung 14: Immunofluoreszenzanalysen von PML-NBs in AML-1/ETO oder BCR/ABL exprimierenden U937-Zellen. (Links) Anti-PML Färbungsmuster in U937-Zellen, die mit einem leeren Zn²⁺-induzierbaren MT-Vektor transfiziert wurden (MT) oder entweder BCR/ABL oder HA-markiertes AML-1/ETO Zn²⁺-induzierbar exprimieren. Die Zellen wurden ohne vorherige Behandlung mit Zn²⁺ (-Zn) oder nach Vorinkubation mit Zn²⁺ (+Zn) zur Induktion der Transgenexpression mit einem monoklonalen anti-PML Antikörper gefärbt und mittels konfokaler Laserscannmikroskopie analysiert. Alle Bilder wurden mit identischen Mikroskop- und Lasereinstellungen aufgenommen. Bei der elektronischen Nachbearbeitung der Bilder wurden ebenfalls identische Parameter auf alle Bilder angewandt. (rechts) Western-Blotanalysen der U937-Zellen mit (+) oder ohne (-) Zn²⁺-induzierter Transgenexpression. Die Blots wurden, wie angegeben, mit einem anti-HA (α-HA) oder anti-ABL (α-ABL) Antikörper zur Detektion von HA-markiertem AML-1/ETO bzw. BCR/ABL gefärbt.

4.2.4 Das t(8;21) Translokationsprodukt AML-1/ETO vermittelt wie PML/RARα und BCR/ABL den As₂O₃-induzierten Zelltod

Um die Rolle von PML für die As₂O₃-induzierte Apoptose weiter aufzuklären, wurde der Frage nachgegangen, ob auch das PML-NBs modifizierende Translokationsprodukt AML-1/ETO in der Lage ist, die As₂O₃-induzierte Apoptose zu vermitteln. Dafür wurden Kasumi-1 Zellen, die von einem t(8;21) positiven AML-Patienten abstammen, einer Konzentration von 2 μM As₂O₃ ausgesetzt. Die Kasumi-1 Zellen exprimieren AML-1/ETO. Wie in Abb.15 zu sehen ist, waren diese Zellen, verglichen mit MT Kontrollzellen, sehr sensibel für As₂O₃.

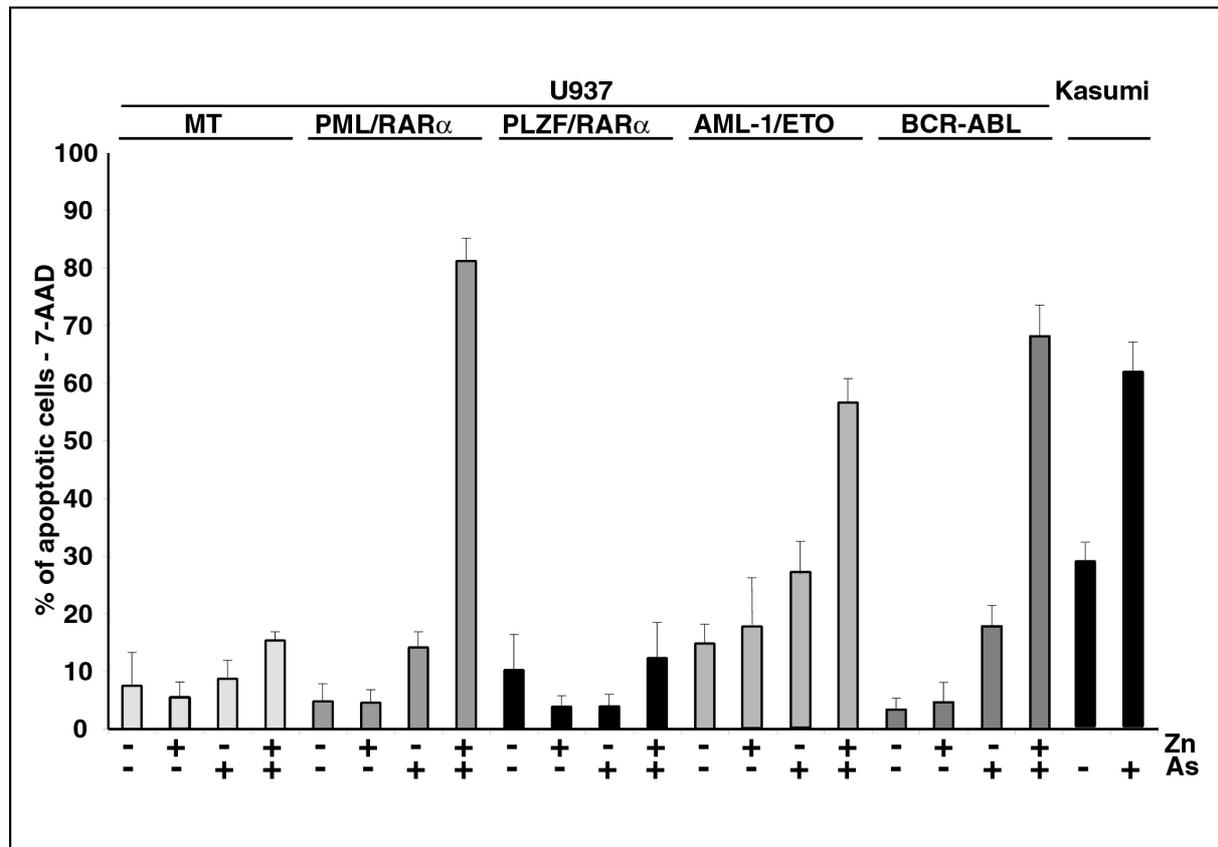


Abbildung 15: As₂O₃-induzierte Apoptose in Zellen, die Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte exprimieren. 7-AAD-Analyse zur Messung der Apoptose von Kasumi-1 Zellen und PML/RAR α , PLZF/RAR α , AML-1/ETO oder BCR/ABL überexprimierenden U937 Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (MT). Die Zellen wurden ohne bzw. mit As₂O₃ (As -/+) ohne oder mit vorheriger Zn²⁺ Induktion (Zn -/+) zur Aktivierung der Proteinexpression behandelt.

Um die Rolle von unbekanntem Faktoren der Kasumi-1 Zelllinie, wie Differenzierungsstadium oder zusätzliche genetische Aberrationen, bei der As₂O₃ Sensibilität auszuschließen, wurde die Wirkung von As₂O₃ auf AML-1/ETO-exprimierende U937-Zellen analysiert. Als Positivkontrolle für den apoptoseinduzierenden Effekt von As₂O₃ wurden U937-Zellen benutzt, die PML/RAR α oder BCR/ABL exprimieren. Als Negativkontrollen dienten PLZF/RAR α - exprimierende oder MT-Zellen, wie bereits beschrieben (Puccetti et al., 2000; Sternsdorf et al., 1999). Alle genannten Zelllinien exprimieren die Transgene unter der Kontrolle des Zn²⁺-induzierbaren MT-1 Promotors. Die Apoptose wurde wie bei den vorangegangenen Experimenten gemessen (s.o.). AML-1/ETO-exprimierende U937-Zellen zeigten eine Apoptoserate von etwa 65%, was mit derjenigen in BCR/ABL oder PML/RAR α exprimierenden Zellen vergleichbar ist (Abb. 15). Die leichte Induktion der Apoptose durch As₂O₃ in Abwesenheit von Zn²⁺-induzierter Proteinexpression in BCR/ABL und AML-1/ETO exprimierenden Zellen ist sehr wahrscheinlich mit der "leakage"-Expression des MT-1 Promotors zu erklären.

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß AML-1/ETO ähnlich wie PML/RAR α oder BCR/ABL in der Lage ist, die As₂O₃-induzierte Apoptose zu vermitteln.

4.2.5 Die Expression sowohl von BCR/ABL als auch von AML-1/ETO führt zur Aktivierung von endogenem RAS in U937-Zellen und die Expression von konstitutiv aktiviertem RAS führt zu einer Sensibilisierung von U937-Zellen gegenüber der As₂O₃-induzierten Apoptose

BCR/ABL aktiviert den RAS-Signalweg (Faderl et al., 1999). Da aktiviertes RAS in der Lage ist, die Expression von PML zu induzieren, wurde der Frage nachgegangen, ob die Aktivierung von RAS für die As₂O₃-induzierte Apoptose von Bedeutung ist. Um die gemeinsamen Signalwege aufzuklären, mittels derer BCR/ABL und AML-1/ETO die PML-Expression modifizieren, wurde die Stärke der RAS-Aktivierung in U937-Zellen, die diese Translokationsprodukte exprimieren, mit der mock-transfizierten Zellen verglichen. Die RAS-Aktivierung wurde mittels eines auf Raf-1 RBD basierenden "pull-down" Assays untersucht. Wie in Abb. 16A gezeigt ist, führte die Expression von BCR/ABL und AML-1/ETO im Gegensatz zur Expression von PML/RAR α zu einer starken Zunahme von aktiviertem RAS in den Zellen.

Um den Effekt der RAS-Aktivierung auf die As₂O₃-Sensibilität von U937-Zellen genauer aufklären zu können, wurde die As₂O₃-Sensibilität von U937-Zellen untersucht, die eine konstitutiv aktivierte RAS Mutante (RAS^{V12}) exprimieren. Dafür wurden U937-Zellen mit einer RAS^{V12}-codierenden ORF transfiziert, bei der die Proteinexpression unter der Kontrolle des Zn²⁺-induzierbaren MT-1 Promotors steht. Unter G418 Selektion wurden Zellpopulationen generiert, die RAS^{V12} in unterschiedlicher Stärke exprimieren. Diese sogenannten „bulk“-Populationen („bulks“) wurden anschließend zu Klonen vereinzelt, deren Transgenexpression wie oben beschrieben überprüft wurde. In Abb.16B sind die Expressionsniveaus zweier Klone und zweier „bulks“ gezeigt. Nur 10-30% der Zellen dieser „bulks“ exprimieren RAS^{V12}, wie eine spätere Analyse durch limitierende Verdünnung ergab (eigene, nicht gezeigte Daten). In Klon 1 ist die "leakage"-Expression des MT-1 Promotors sehr groß, und vergleichbar mit der, die bei BCR/ABL-exprimierenden U937-Zellen festgestellt wurde (eigene, nicht gezeigte Daten). Wie in Abb. 16C gezeigt, korreliert die Sensibilität von RAS^{V12}-exprimierenden U937-Zellen gegenüber der As₂O₃-induzierten Apoptose mit dem RAS^{V12}-Expressionsniveau in den Zellklonen bzw. „bulks“.

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß aktiviertes RAS U937-Zellen für eine Apoptoseinduktion durch As_2O_3 sensibilisiert und daß RAS nur in U937-Zellen aktiviert ist, die BCR/ABL oder AML-1/ETO, nicht aber PML/RAR α exprimieren.

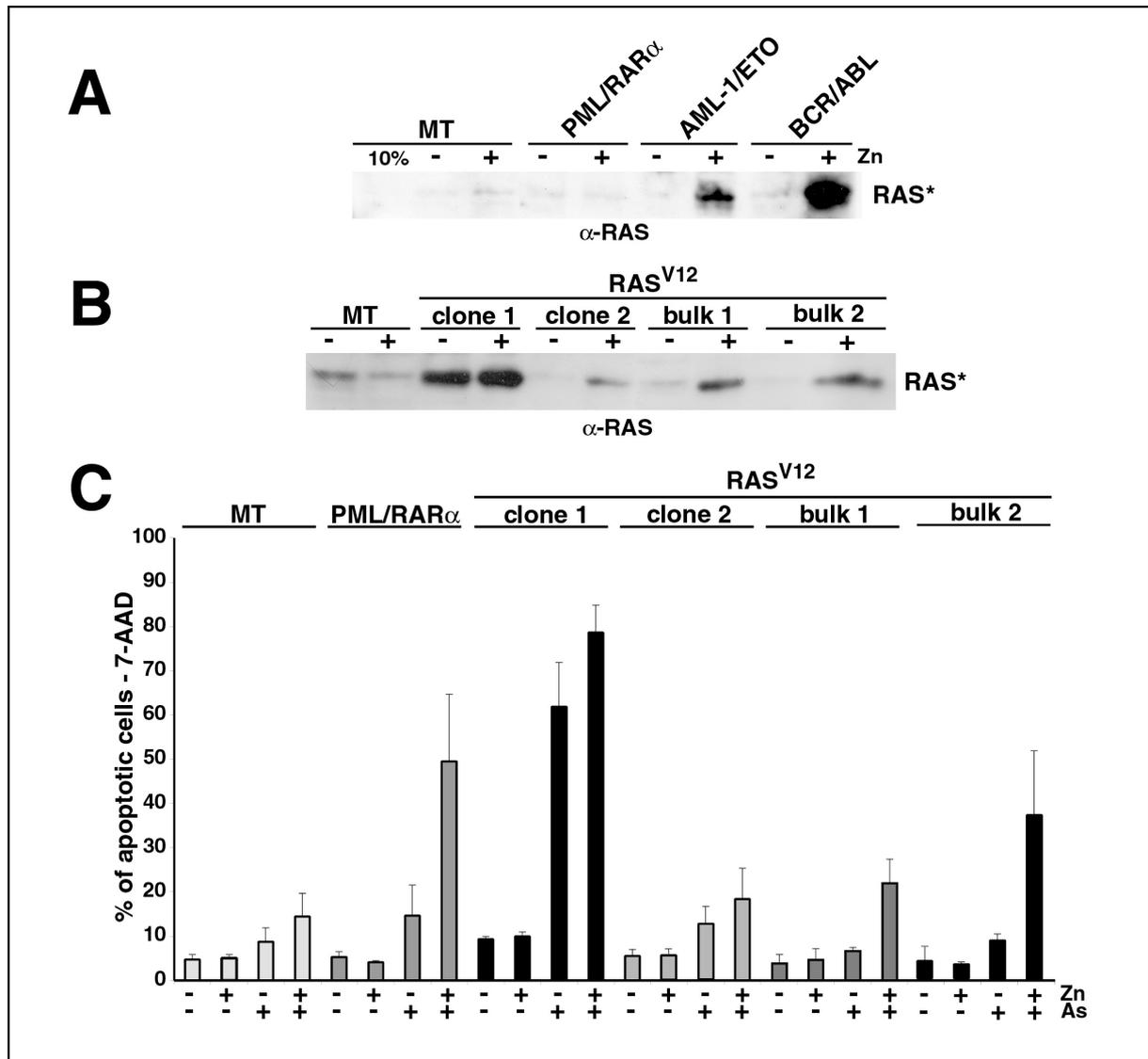


Abbildung 16: RAS-Aktivierung und As_2O_3 -induzierte Apoptose. **(A)** Stärke der RAS-Aktivierung in U937-Zellen, die Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte Zn^{2+} -induzierbar exprimieren. Aktiviertes RAS wurde aus Lysaten von U937-Zellen mit Hilfe eines RAF-RBD-GST-Fusionsproteins, das an Glutathionsepharose gekoppelt wurde, präzipitiert. Die Zellen wurden ohne oder mit Zn^{2+} vorbehandelt (Zn -/+), um die Expression der Transgene PML/RAR α , AML-1/ETO oder BCR/ABL zu induzieren (MT = Leervektor-transfizierte Kontrollzellen). Mit den Präzipitaten wurden Western-Blot Analysen mit einem α -RAS Antikörper durchgeführt. **(B)** Stärke der RAS-Aktivierung in RAS^{V12} -exprimierenden U937-Zellen. Western-Blot Analyse von U937-Zellen ohne bzw. mit Zn^{2+} -induzierter -Expression (Zn -/+). RAS^{V12} wurde wie unter (A) beschrieben aus Zellysaten präzipitiert. Zwei Klone und zwei "bulks" wurden bei diesen Analysen eingesetzt. **(C)** 7-AAD-Analyse zur Messung der Apoptose von RAS^{V12} überexprimierenden U937 Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (MT) und PML/RAR α -exprimierenden U937-Zellen. Die Zellen wurden ohne bzw. mit As_2O_3 (As -/+) ohne oder mit vorherige Zn^{2+} Induktion (Zn -/+) zur Aktivierung der Proteinexpression behandelt.

4.2.6 Die As_2O_3 -induzierte Apoptose kann unabhängig von p53 erfolgen

Die meisten Chemotherapeutika, wie Anthrazykline, z.B. Doxorubicin, die zur Behandlung von Leukämien eingesetzt werden, führen zur Aktivierung von p53. Im durch aktivierte RAS induzierten Seneszenzprozess im primären Fibroblasten reguliert PML die p53-Aktivität (Fogal et al., 2000) (Pearson et al., 2000).

Um die Rolle von p53 bei der As_2O_3 -induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden die As_2O_3 -sensiblen Ph⁺ Zelllinien, TOM-1, SupB15, BV173 und K562-Zellen (Puccetti et al., 2000) auf die Hochregulierung der p53-Expression durch Doxorubicin (Doxo) hin untersucht. Wie in Abb. 17A gezeigt, wird nach einer Behandlung dieser Zellen mit Doxorubicin ein p53 Protein normaler Größe exprimiert, mit Ausnahme der Zelllinien K562 und U937, bei denen kein p53 Protein detektiert werden konnte. Interessanterweise exprimieren U937-Zellen, die As_2O_3 -sensibel gemacht werden können, indem man sie PML/RAR α , BCR/ABL oder AML-1/ETO exprimieren läßt, kein p53.

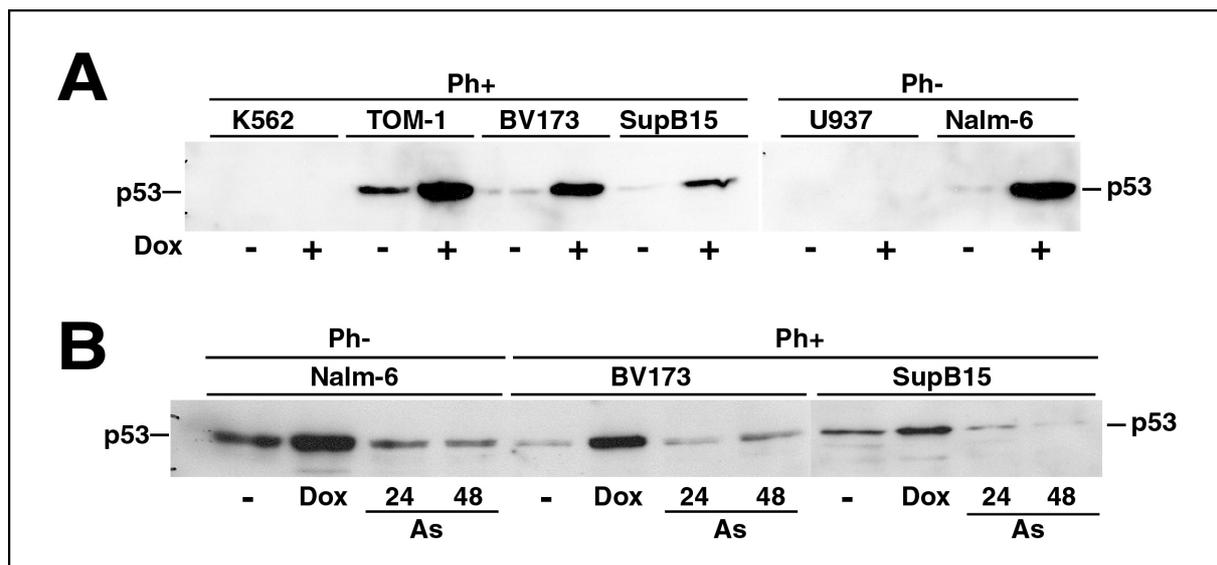


Abbildung 17: P53 und As_2O_3 -induzierte Apoptose. **(A)** Western-Blot Analyse der p53 Expression und ihrer Induktion durch Doxorubicin (Dox) von BCR/ABL-exprimierenden (Ph⁺), As_2O_3 -sensiblen und BCR/ABL-negativen (Ph⁻), As_2O_3 -resistenten Zellen. TOM-1, BV173, SupB15 und Nalm-6 sind lymphoblastische Zelllinien, K562 und U937 sind myeloische Zelllinien. Mit Gesamtzellsaten dieser Zellen wurden Western-Blot Analysen mit einem α -p53 Antikörper durchgeführt. **(B)** Wirkung von 24h und 48h As_2O_3 Exposition auf die p53 Expression in As_2O_3 -sensiblen (BV173, SupB15) und As_2O_3 -resistenten Zellen (Nalm-6) (α -p53 Western-Blot).

Um zu bestätigen, daß die As_2O_3 -induzierte Apoptose in einer p53-unabhängigen Weise erfolgen kann, wurde der Effekt von As_2O_3 auf das p53-Expressionsniveau in den As_2O_3 -sensiblen Zellen BV173 und SupB15 mit dem in As_2O_3 -resistenten Nalm-6 Zellen verglichen. Als Positivkontrolle wurde die Doxorubicin-induzierte Hochregulierung von p53

herangezogen. Wie in Abb. 17B dargestellt ist, induziert As_2O_3 , im Gegensatz zu Doxorubicin, selbst nach 48h Inkubationszeit keine verstärkte Expression von p53, unabhängig davon, ob die Zellen auf As_2O_3 sensibel reagieren oder nicht.

Insgesamt läßt sich also feststellen, daß die As_2O_3 -induzierte Apoptose unabhängig von einer Hochregulierung von funktionalem p53-Proteins erfolgen kann.

4.2.7 Im Gegensatz zu PLZF/RAR α erhöht die Expression von BCR/ABL und AML-1/ETO die Sensibilität gegenüber INF α -induziertem Zelltod

Die Tatsache, daß die Modifizierung der PML-NBs durch die Expression von AML-1/ETO und BCR/ABL Zellen für die As_2O_3 -induzierte Apoptose sensibilisiert, deutet darauf hin, daß auch andere Substanzen, die PML-Expression und die PML-NBs beeinflussen, in der Lage sind Apoptose zu induzieren. Sowohl INF α als auch INF γ aktivieren den PML-Promotor und führen zur Modifizierung der PML-NBs (Stadler et al., 1995). INF α ist ein hocheffizientes Therapeutikum für die CML. Bei Patienten in der chronischen Phase der CML kann INF α eine komplette zytogenetische Remission herbeiführen. Die Mechanismen, wodurch INF α die Zahl der CML-Blasten reduzieren kann ist größtenteils unbekannt (Faderl et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob die Expression von Leukämie-assoziierten Translokationsprodukten in der Lage ist, die Sensibilität von U937-Zellen gegenüber INF α zu erhöhen wurde die Aktivität von INF α mit der von As_2O_3 verglichen. Dazu wurden Kontrollzellen (MT), PLZF/RAR α , AML-1/ETO und BCR/ABL transfizierte U937-Zellen mit 10 und 100 IU/ml INF α oder 2 μM As_2O_3 . Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Zn^{2+} wurde dabei die Expression des jeweiligen Transgens induziert. Wie Abb. 18 dargestellt ist, führten weder 10 noch 100 IU/ml INF α zu einer signifikanten Induktion von Apoptose in den Kontrollzellen. PLZF/RAR α -exprimierende U937-Zellen scheinen vor einer Apoptose-induzierenden Wirkung von INF α geschützt zu sein, wohingegen die Expression von AML-1/ETO und BCR/ABL die Zellen gegenüber der INF α -Behandlung sensibel macht. Diese Zellen erreichen durch Inkubation mit INF α vergleichbare Apoptoseraten wie durch eine Inkubation mit As_2O_3 . Diese Effekte waren bereits bei 10 IU/ml INF α ausgeprägt. Mit INF γ wurden vergleichbare Effekte erzielt (eigene nicht gezeigte Daten).

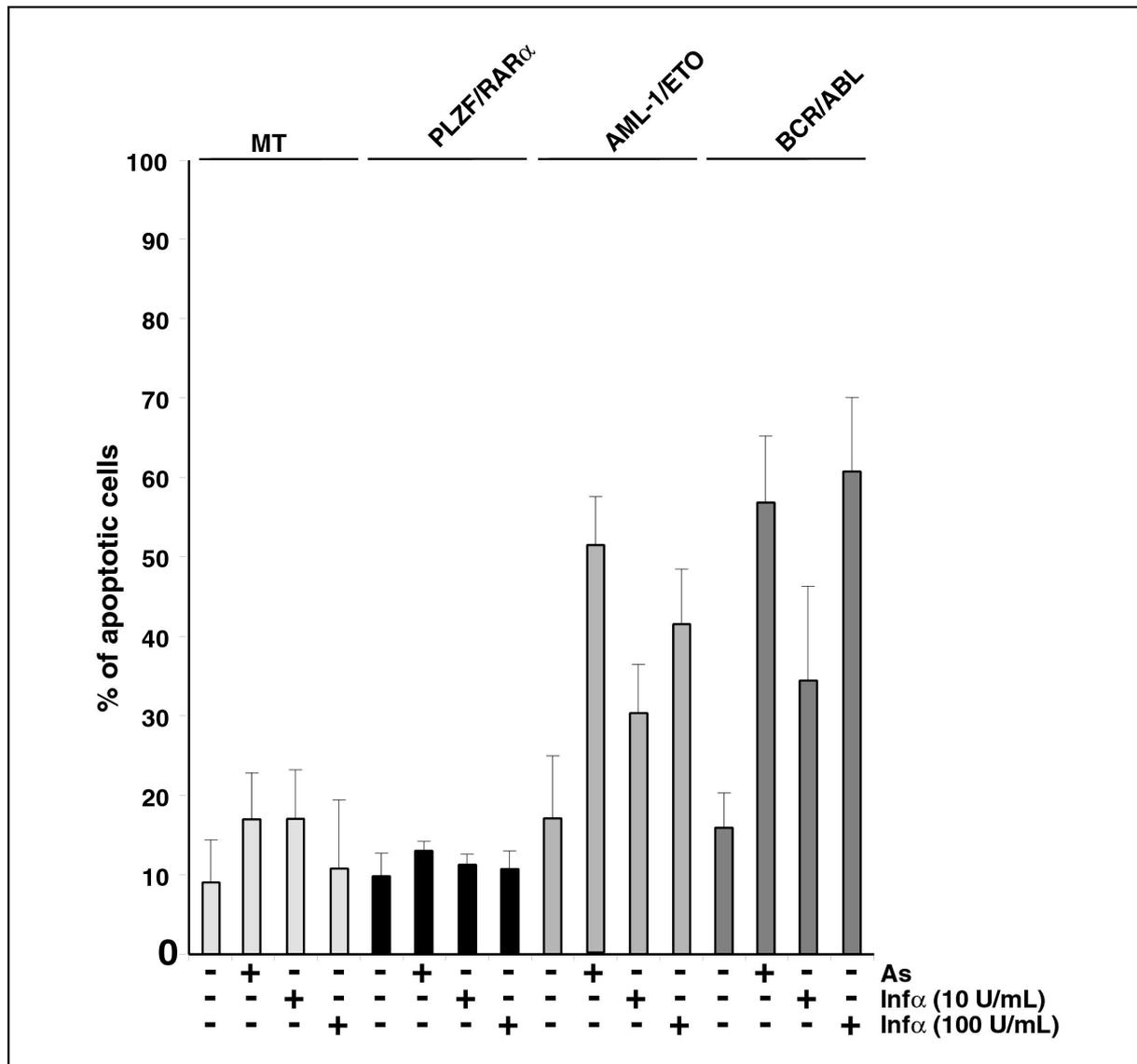


Abbildung 18: INF α -induzierte Apoptose in Zellen, die Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte exprimieren. 7-AAD-Analyse zur Messung der Apoptose von PLZF/RAR α , AML-1/ETO oder BCR/ABL überexprimierenden U937 Zellen im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (MT). Die Zellen wurden mit As₂O₃ (As+) oder 10 bzw. 100 IU/mL IFN α behandelt, nachdem mit einer Vorbehandlung mit Zn²⁺ die Proteinexpression induziert wurde.

Zusammengefaßt weisen diese Daten daraufhin, daß die Effekte von INF α durch die selben Translokationsprodukte vermittelt bzw. blockiert werden, die auch die Wirkung von As₂O₃ positiv bzw. negativ beeinflussen. Die INF α -induzierte Apoptose erfolgt möglicherweise unter Vermittlung von Signalkaskaden, die durch BCR/ABL oder AML-1/ETO induziert werden.

4.2.8 Die retrovirale Expression von p185^(BCR/ABL) in murinen Sca-1 positiven Knochenmarkszellen führt nach Transplantation in sublethal bestrahlten Mäusen zu einer CML-ähnlichen Krankheit

Es ist möglich, mittels retroviraler Transduktion von Mausknochenmarkstammzellen und deren anschließende Transplantation in Empfängermäuse eine BCR/ABL-positive Leukämie zu induzieren. Im Zeitraum von etwa 4 Wochen entwickelt sich ein lethales CML-ähnliches myeloproliferatives Syndrom (Li et al., 1999).

Um die Wirkung von As₂O₃ als mögliches Tumorzell-spezifisches Therapeutikum für die CML in vivo testen zu können, wurde zunächst ein Mausmodell für die BCR/ABL positive Leukämie aufgebaut.

Der Ablauf der experimentellen Arbeiten ist in Abb. 19 skizziert: aus dem Knochenmark der Tibiae und Femure weiblicher C57BL/6N-Mäuse wurden Sca-1 exprimierende Zellen immunomagnetisch aufgereinigt und 24 h *in vitro* mit einer definierten Mischung von Wachstumsfaktoren (IL-3; Il-6 und SCF) vorstimuliert. Parallel dazu wurde die Verpackungszelllinie Phoenix mit retroviralen Vektoren transfiziert, die von PINCO (Grignani et al., 1998) abgeleitet wurden, und der virushaltige Kulturüberstand geerntet. Die Sca-1 positiven Knochenmarkszellen werden mit diesem Virusüberstand infiziert und in sublethal bestrahlte Empfängertiere injiziert.

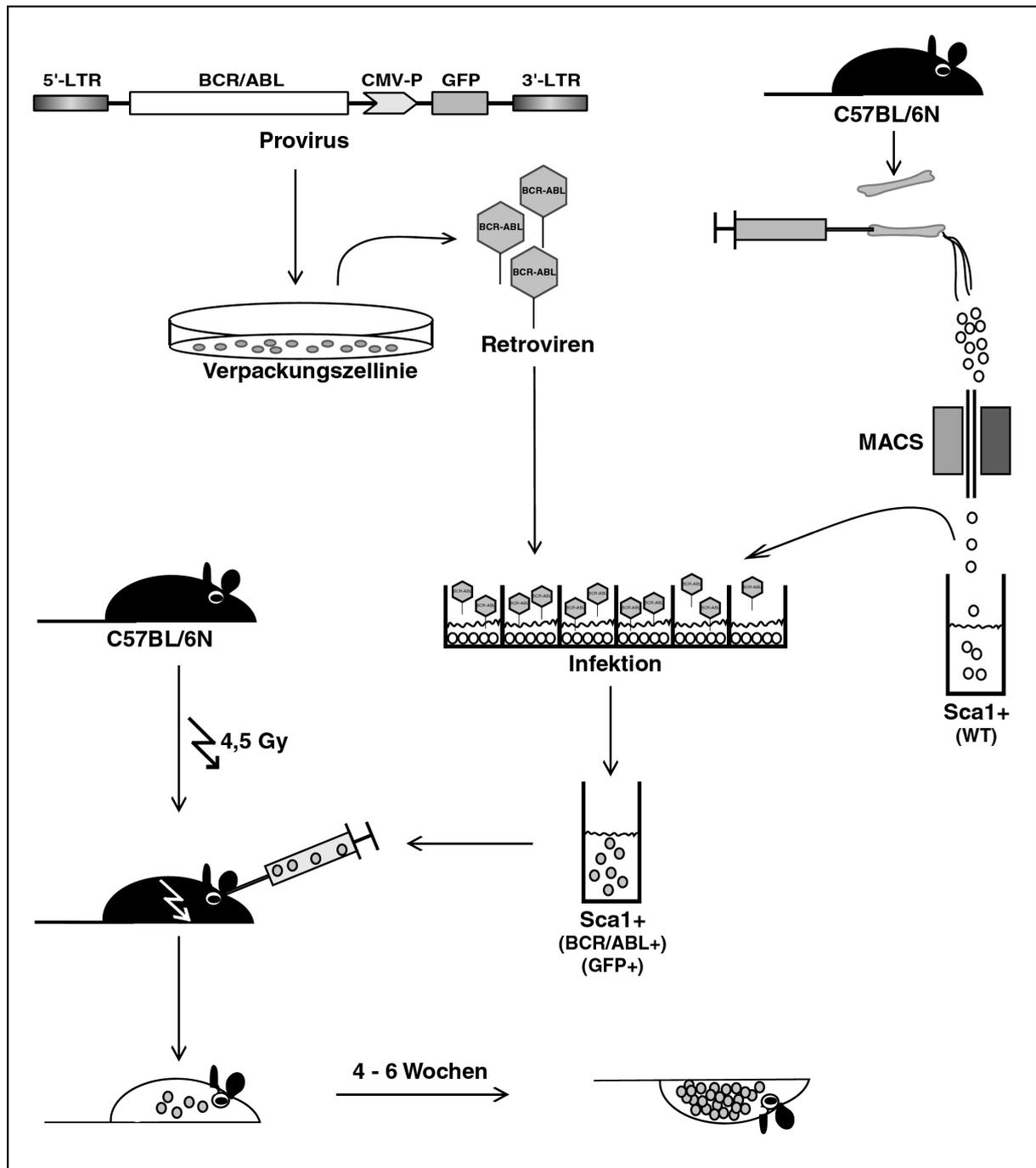


Abbildung 19: Mausmodell für die CML. Aus Tibiae und Femure weiblicher C57BL/6N-Mäuse wurden Sca-1 exprimierende Zellen immunomagnetisch aufgereinigt. Parallel dazu wurde die Verpackungszelllinie Phoenix mit BCR/ABL und GFP kodierenden retroviralen Vektoren transfiziert. Der virushaltige Kulturüberstand wurde geerntet und zur Infektion der Sca-1 positiven Knochenmarkszellen verwendet. Die infizierten Sca-1 positiven Zellen wurden in sublethal bestrahlte Empfängertiere injiziert. 4-6 Wochen später starben die Tiere an einer BCR/ABL-positiven CML-ähnlichen Leukämie.

4.2.8.1 Überprüfung des Anwachsens des Transplantats

Um zu überprüfen, ob die transduzierten und transplantierten Sca-1 positiven Zellen in den sublethal bestrahlten Empfängertieren in der Lage sind, in hämopoetische Organe einzuwandern und anzuwachsen („homing“) und nachfolgend alle hämopoetischen Zelltypen

zu bilden, wurde ein retroviraler Vektor (Pallino) eingesetzt, der GFP unter der Kontrolle des 5'LTRs exprimiert. 20 Tage nach der Transplantation wurden Knochenmark- und Milzzellen isoliert. Die GFP-Expression in den einzelnen Zelltypen wurde mit der GFP-Expression der gesamten Zellpopulation normalisiert. In Abb. 20 ist gezeigt, daß GFP in den myeloischen Linien (Gr-1, Mac-1) sowie in den T-Zellmarker exprimierenden Zellen (CD3e) im Knochenmark im selben Umfang exprimiert wird wie im Gesamtknochenmark. B-Lymphozyten (CD45R/B220) exprimierten etwa doppelt so stark GFP und erythroide Zellen (Ter-119) nur etwa halb so stark. In der Milz exprimieren alle Zelltypen mit Ausnahme der T-Lymphozyten überdurchschnittlich stark GFP (1,5 bis 2 mal stärker bzw. nur 0,75 mal so stark). Da die Färbung der Zellen mit diesen 5 Markern nicht alle Zellen erfaßte und zudem einzelne Zellen mehr als einen Marker exprimieren, war der Durchschnitt der GFP-Expression der Zelllinien nicht gleich der GFP-Expression der Gesamtpopulation.

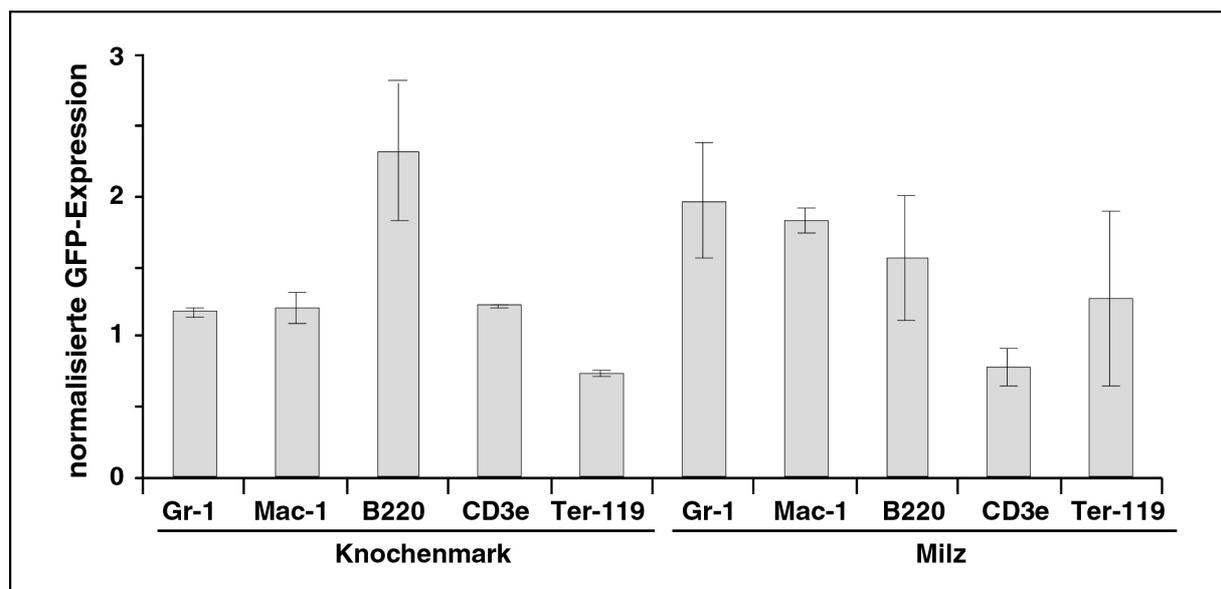


Abbildung 20: Transgenexpression in hämopoetischen Zellen transplantiertter Mäuse. Infizierte GFP-exprimierende Sca-1 positive Zellen wurden in drei sublethal bestrahlte Mäuse transplantiert. 20 Tage später wurde die GFP-Expression von Knochenmark- und Milzzellen im FACS gemessen. Die Zellen beider Organe wurden mit den angegebenen „lineage“-spezifischen PE-markierten Antikörpern gefärbt (Gr-1 & Mac-1: myeloische Marker; B220: B-Lymphozytenmarker; CD3e: T-Lymphozytenmarker; Ter-119: erythroider Marker). Die GFP-Expression der Marker-positiven Zellen wurde mit der GFP-Expression der Gesamtzellpopulation normalisiert. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die transplantierten Sca-1 positiven Zellen in diesem Transduktions-/Transplantationsmodell in alle hämopoetischen Zellpopulationen differenzieren können.

4.2.8.2 Induktion einer BCR/ABL positiven Leukämie in Mäusen

Zur Induktion einer BCR/ABL-positiven Leukämie in den Mäusen wurden Sca-1 positive Knochenmarkszellen mit einem p185^(BCR/ABL)-codierenden retroviralen Vektor (PINCOp185) infiziert und in sublethal bestrahlte Empfängertiere injiziert. Das sich innerhalb von 4 bis 6 Wochen entwickelnde Krankheitsbild ist wie folgt charakterisiert: Das Gewicht der Milz vergrößert sich um den Faktor 6 bis 10 (Abb. 21A), die Farbe ändert sich von tiefrot zu hellrosa, was sehr wahrscheinlich an der ausgeprägte Hypergranulozytose liegt (Abb 21A & 21B). Das morphologische Bild (Pappenheim-Färbung) von Milz und Knochenmark verändert sich drastisch (Abb. 21B zeigt einen beispielhaften Ausschnitt). Die Milz enthält bei gesunden Tieren neben einigen Granulozyten vorwiegend Lymphozyten. Die Myelopoese und Erythropoese ist intakt. Bei kranken Tieren wird das Verhältnis zwischen myeloischen Zellen und Lymphozyten zugunsten der myeloischen Zellen umgekehrt. Die Myelopoese ist sehr ausgeprägt und zeigt reife sowie unreife, blastäre Zellen. Gesundes Knochenmark zeigt eine gut ausreifende Myelo- und Erythropoese, wohingegen in kranken Tieren eine verminderte Erythropoese durch eine insgesamt unreife Myelopoese verdrängt wird, die aber noch in der Lage ist, auszureifen. Diese Veränderung zeigt sich bereits bei der Betrachtung der Knochen mit bloßem Auge. Das rot durchscheinende Knochenmark bei gesunden Tieren wird gänzlich weiß (eigene, nicht gezeigte Daten). Insgesamt ähnelten das morphologische und physiologische Bild einer CML des Menschen.

In Lysaten von Knochenmark- und Milzzellen kranker Tiere konnte mittels „western blot“ Analysen in beiden Organen eine gleichstarke Expression von p185^(BCR/ABL) festgestellt werden (Abb 21C). Die FACS-Analyse zweier myeloischer und eines B-lymphatischen Oberflächenmarker (Gr-1 und Mac-1 bzw. CD45R/B220) bestätigte das morphologische Bild (Abb 21D): während in gesundem Knochenmark myeloische wie B-lymphatische Marker etwa gleich stark exprimiert (je 40-50%) wurden, erhöhte sich in kranken Tieren die Expression der myeloischen Marker Gr-1 und Mac-1 (80%) starkt zu ungunsten des B-lymphatischen Markers CD45R/B220 (30-40%). Die große Mehrheit der gesunden Milzzellen exprimiert CD45R/B220 (80%), was dem morphologischen Normalbefund der Lymphozytose in der Maus entspricht. Gr-1 und Mac-1 sind nur mit je 20% bzw. 30% vorhanden. In kranken Tieren erhöhte sich die Expression von Gr-1 und Mac-1 auf durchschnittlich 70%, während die Expression von CD45R/B220 im Gegenzug auf etwa 40% zurückging.

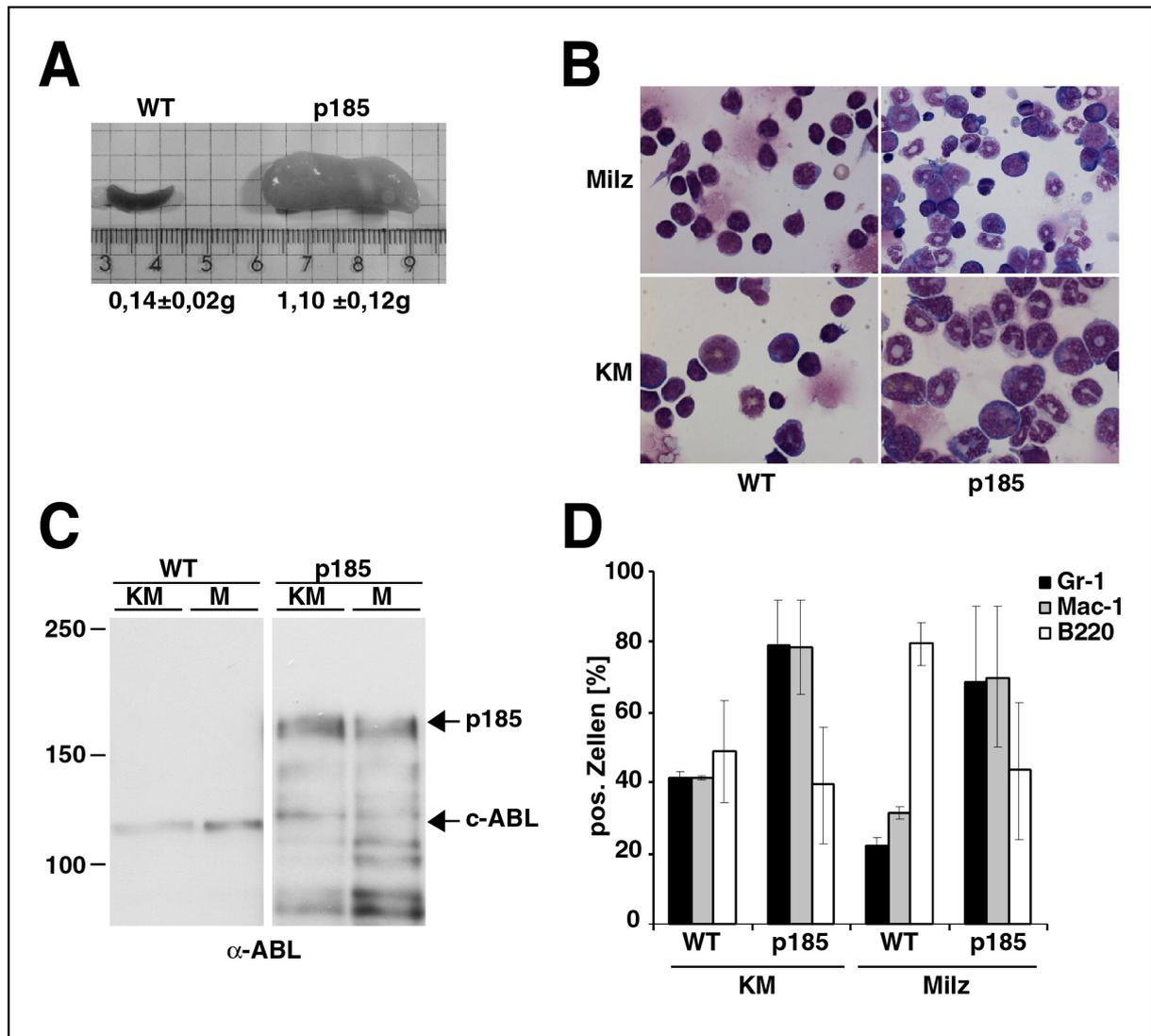


Abbildung 21: Phänotyp des BCR/ABL positiven, CML-ähnlichen myeloproliferativen Syndroms in Mäusen. BCR/ABL-exprimierende Sca-1 positive Zellen wurden in 3 sublethal bestrahlte Mäuse transplantiert. Bei ersten Krankheitszeichen wurden die Tiere analysiert. **(A)** Größe und Gewicht der Milz kranker Mäuse (p185) im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrollmäusen (WT). **(B)** Morphologische Untersuchung von Knochenmark- (KM) und Milzzellen einer kranken (p185^(BCR/ABL)) Mäusen und einer Kontrollmaus (WT). **(C)** α-ABL Western-Blot Analyse der Transgenexpression in Knochenmark (KM) und Milz (M) kranker Mäuse. **(D)** FACS-Analyse der Gr-1, Mac-1 und B220-Expression in Knochenmark (KM) und Milz kranker Mäuse (p185) im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrollmäusen (WT).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Aufreinigung des Spenderknochenmarks auf Sca-1 exprimierende Zellen in diesem Transduktions-/Transplantationsmodell zu einem CML-ähnlichen myeloproliferativem Syndrom führt, wie für die Transplantation von 5-FU vorbehandeltem Knochenmark beschrieben (Li et al., 1999).

4.2.9 Bei großer Tumormasse führt As₂O₃ im retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell zu einer Erniedrigung der BCR/ABL Expression, ohne die Leukämieentwicklung signifikant zu verzögern

Um die therapeutische Relevanz der Apoptose-Induktion durch As₂O₃ für die Behandlung der Ph⁺ Leukämien zu bestätigen, und um die Tumorzell-Spezifität von As₂O₃ zu bestätigen, wurde in dem oben beschriebenen Transduktions-/Transplantationsmodell der BCR/ABL-postiven Leukämie die Wirkung von As₂O₃ in vivo untersucht.

Dazu wurden in einem ersten Versuch 14 sublethal bestrahlte Mäuse mit p185^(BCR/ABL) transduzierten Sca-1 positiven Zellen aus Spenderknochenmark transplantiert. Jedes Tier erhielt 50000 zu 70% transduzierte Zellen. 12 Tage nach der Transplantation wurden 10 Tiere bis zu deren jeweiligem Tod täglich mit 50 µg As₂O₃ intraperitoneal injiziert. Diese Dosis As₂O₃ und der 24-stündige Applikationsabstand wurde zuvor für die Behandlung PML/RAR α transgener Mäuse beschrieben (Rego et al., 2000). Tierversuche zum Studium der Wirkung von STI571 in einem Transduktions-/Transplantationsmodell ergaben, daß eine Behandlung mit STI571 2 Tage oder 12 Tage post Transplantation gleichermaßen wirksam waren (Wolff und Ilaria, 2001), daher wurde für die hier vorgestellten Arbeiten auf einen Therapiebeginn 2 Tage nach der Transplantation verzichtet. Wie in Abb. 22A dargestellt ist, wurden die nicht behandelten Tiere innerhalb von 36 Tagen klinisch auffällig. Bei ersten klinischen Anzeichen wurden die Tiere geopfert und analysiert. Von den behandelten Tieren lebten nach 36 Tagen noch 50%. Am Tag 40 wurden diese Tiere ohne äußere Symptome geopfert und analysiert. Wie in Tabelle 5 gezeigt, entwickelten sowohl die unbehandelten als auch die behandelten Tiere eine stark vergrößerte Milz. Das Durchschnittsgewicht der Milz der behandelten Tieren ist rund 0,2 g geringer als das durchschnittliche Milzgewicht der unbehandelten Tiere.

Mäuse	Milzgewicht [g]
WT	0,14 ± 0,02
P185, As ₂ O ₃ behandelt	0,69 ± 0,07
P185, unbehandelt	0,90 ± 0,08

Tabelle 5: Gewicht der Milz kranker Mäuse nach Transplantation einer großen Tumormasse (p185) mit und ohne Behandlung mit As₂O₃ im Vergleich zu nicht transplantierten (WT) Mäuse. 14 sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 50000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkzellen transplantiert. 12 Tage nach der Transplantation wurden 10 Tiere mit täglich 50 µg As₂O₃ behandelt, 4 Tiere wurden nicht behandelt. Kranke Tiere wurden getötet und das Gewicht der Milz bestimmt.

Die Expression von p185^(BCR/ABL) wurde in der Milz mittels „western blot“ Analysen untersucht. Wie in Abb 22B zu sehen ist, konnte in allen behandelten Tieren ein geringeres

Expressionniveau des transduzierten BCR/ABL festgestellt werden, wohingegen ein solch geringes Expressionsniveau nur in einem von drei unbehandelten Tieren gemessen wurde (vom 4. Tier stand kein Lysat zur Verfügung).

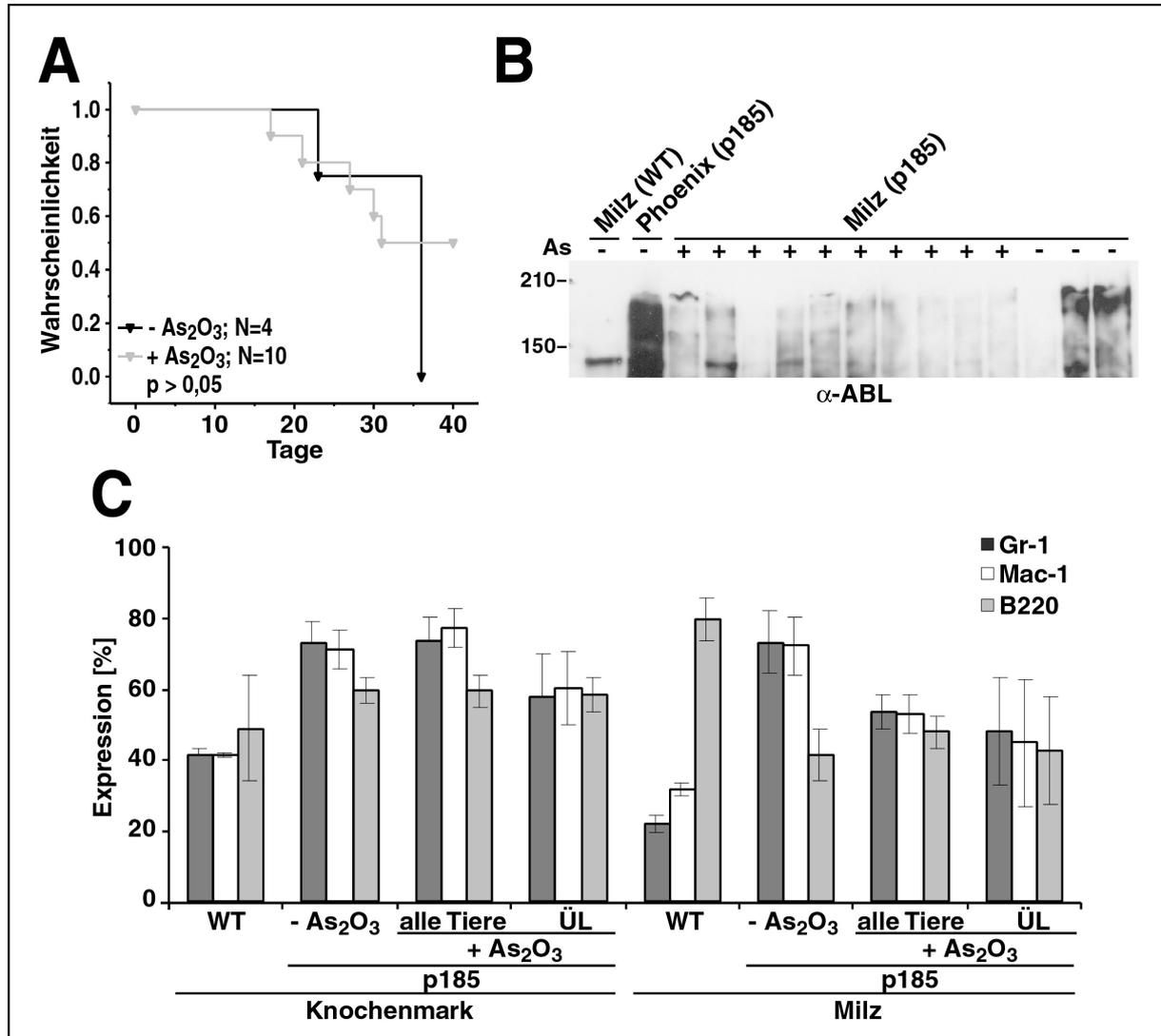


Abbildung 22: Effekt von As₂O₃ auf die Entwicklung eines BCR/ABL-positiven CML-ähnlichen myeloproliferativen Syndroms in Mäusen nach Transplantation einer großen Tumormasse. 14 sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 50000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkszellen transplantiert. 12 Tage nach der Transplantation wurden 10 Tiere mit täglich 50 µg As₂O₃ behandelt, 4 Tiere wurden nicht behandelt. **(A)** Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer unbehandelter (-As₂O₃) und behandelter (+As₂O₃) Mäuse. **(B)** α-ABL Western-Blot Analyse der Transgenexpression in der Milz unbehandelter und behandelter (As -/+) kranker Mäuse im Vergleich zu nicht transplantierten Mäusen (WT). Als Positivkontrolle wurde ein Lysat der transfizierten Verpackungszelllinie (Phoenix p185) mit aufgetragen. **(C)** FACS-Analyse der Gr-1, Mac-1 und B220 Expression in Knochenmark und Milz kranker Mäuse (p185). Die Markerexpression unbehandelter Mäuse (-As₂O₃) wurde mit der aller behandelten Tiere (+As₂O₃), sowie mit der Markerexpression der überlebenden behandelten Tiere (ÜL) verglichen (WT= nicht transplantierte Kontrollmäuse).

Wie in Abb. 22C dargestellt, zeigten im Knochenmark sowohl unbehandelte wie behandelte Tiere eine Erhöhung der Marker Gr-1 und Mac-1, die vergleichbar zu den in den

Vorversuchen festgestellten Werten war (Abb. 22D). CD45R/B220 war nicht signifikant erhöht. Bei Betrachtung der gesamten Gruppe unbehandelter und behandelter Tiere konnte kein Expressionsunterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist die mittlere Expression myeloischer Marker Gr-1 und Mac-1 der bis Tag 41 überlebenden Tiere im Vergleich zu den anderen Tieren um 15-20% reduziert. Das Expressionsniveau der erwähnten Marker in der Milz zeigte bei den unbehandelten Tieren eine ähnliche Erhöhung der Expression von Gr-1 und Mac-1 zu Lasten der Expression von CD45R/B220, wie zuvor beobachtet (Abb 22D). Die Expression der myeloischen Marker Gr-1 und Mac-1 war in den As₂O₃-behandelten Tieren hingegen deutlich niedriger, sowohl im Durchschnitt aller behandelten als auch nur der letzten 5 analysierten Tiere.

Insgesamt läßt sich feststellen, daß die Behandlung von Mäusen mit As₂O₃, die mit BCR/ABL-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden, auf das Überleben der Tiere keinen signifikanten Einfluß hat. As₂O₃ ist zwar nicht in der Lage, die Entstehung einer ausgeprägten Splenomegalie zu verhindern, aber das Gewicht der Milz und das Expressionsniveau von BCR/ABL ist im Vergleich zu unbehandelten Tieren geringer. In der Milz, aber nur zum Teil im Knochenmark wird die Expression der myeloischen Oberflächenmarker durch As₂O₃ verringert.

4.2.10 Effekte von As₂O₃ auf die Entwicklung einer CML-ähnlichen Leukämie im retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell bei geringer Tumormasse

Da As₂O₃, wie oben beschriebenen, die Entstehung einer CML-ähnlichen Erkrankung zwar beeinflussen, aber nicht verhindern konnte, wurde das Experiment unter leicht veränderten Bedingungen wiederholt. Die Zahl der transplantierten transduzierten Sca-1 positiven Zellen wurde auf 5000 reduziert (geringe Tumormasse). Die Behandlung mit As₂O₃ wurde am Tag 10 nach der Transplantation begonnen (zwei Tage früher), wodurch die Tumormasse der Tiere ebenfalls geringer war. Ab Tag 21 wurden von den Tieren regelmäßig die Leukozytenzahl ermittelt und ein Blutbild erstellt. Da im ersten Versuch 50% der Tiere mit As₂O₃-Behandlung bis zum Versuchsende überlebten, wurde im zweiten Versuch ebenfalls ein 50%iges Überleben angenommen und 16 Tiere (8 behandelt; 8 unbehandelt) eingesetzt. Die Zahl von 2 mal 8 Tieren würde bei bei 50% Überleben statistisch signifikante Werte liefern. Im Verlauf des Experiments mussten aus der unbehandelten Gruppe zwei Tiere eliminiert werden (1 Tier zeigte Anzeichen eines ZNS-Befalls; 1 Tier entwickelte ein großes

Geschwulst auf der Stirn). Diese Tiere wurden bei der Versuchsauswertung nicht berücksichtigt.

4.2.10.1 As₂O₃ stört das Engraftment des Transplantats nicht

Die Behandlung von APL-Patienten mit As₂O₃ führt nicht zur Knochenmarkaplasie, wie bei den konventionellen Therapien mit Chemotherapeutika, was als Tumorzell-spezifische Wirkung auf t(15;17) positive Blasten interpretiert wird (Shen et al., 1997). Außerdem führt die Behandlung mit As₂O₃ nicht zur Verringerung der Kolonien-Bildung von CD34⁺ humanen Knochenmarkzellen (Puccetti et al., 2000). Im Transduktions-/Transplantationsmodell sollte daher As₂O₃ das Anwachsen des Transplantats nicht stören und auch nicht deregulierend in die Differenzierungsprozesse der Hämoopoese eingreifen.

Daher wurde der Effekt von As₂O₃ auf das Blutbild der transplantierten Tiere vor Entwicklung der Leukämie untersucht, und mit dem der unbehandelten Tiere verglichen. Zur Messung des Effekts von As₂O₃ auf die Zusammensetzung des peripheren Bluts wurde am Tag 21 und am Tag 28 nach der Transplantation (das entspricht 11 bzw. 18 Tagen Behandlung mit As₂O₃) von den behandelten wie auch den unbehandelten Tieren ein Blutbild erstellt. Wie in Abb. 23A dargestellt ist, hat As₂O₃ auf die prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts keinen Einfluß. Außer der prozentualen Zusammensetzung des Blutes wurden auch die absoluten Zellzahlen der Leukozyten („white blood count“; WBC), der Erythrozyten und der Thrombozyten sowie der Hämoglobingehalt erfasst (Abb. 23B). Die hier untersuchten Normaltiere zeigten mit einem WBC von 16 Zellen/nl einen Wert im Normalbereich (Tabelle 6). Erythrozyten waren mit 14 Zellen/pl vertreten und der Hämoglobingehalt lag bei etwa 21 g/dl. Beide Werte waren mit Blick auf die Normalwerte etwas zu hoch. Der Thrombozytenanteil von durchschnittlich 1000/nl (=1/pl) wiederum entsprach den Normalwerten. Am Tag 21 nach der Transplantation zeigten die unbehandelten Tiere mit einem WBC von 10 Zellen/nl leicht erniedrigte Werte, die behandelten Tiere hingegen deutlich niedrigere Leukozytenzahlen von 6 Zellen/nl. Beide Werte lagen im physiologischen Normalbereich. Eine Woche später (Tag 28) glichen sich die WBC-Werte der unbehandelten wie der behandelten Tiere nahezu aus und näherten sich den Werten der Kontrolltiere an. Die Anzahl der Erythrozyten und der Hämoglobingehalt lag an beiden Messtagen bei behandelten wie unbehandelten Tieren zwar etwas niedriger als bei den Kontrolltieren, allerdings konnte kein Einfluß von As₂O₃ festgestellt werden. Auch die Thrombozytenzahlen waren an Tag 21 mit und ohne As₂O₃-Behandlung vergleichbar mit den

Werten der Kontrolltiere. Am Tag 28 stiegen die Werte in beiden Fällen etwas an und lagen mit 1500 bis 2000 Zellen/nl deutlich über den Normalwerten.

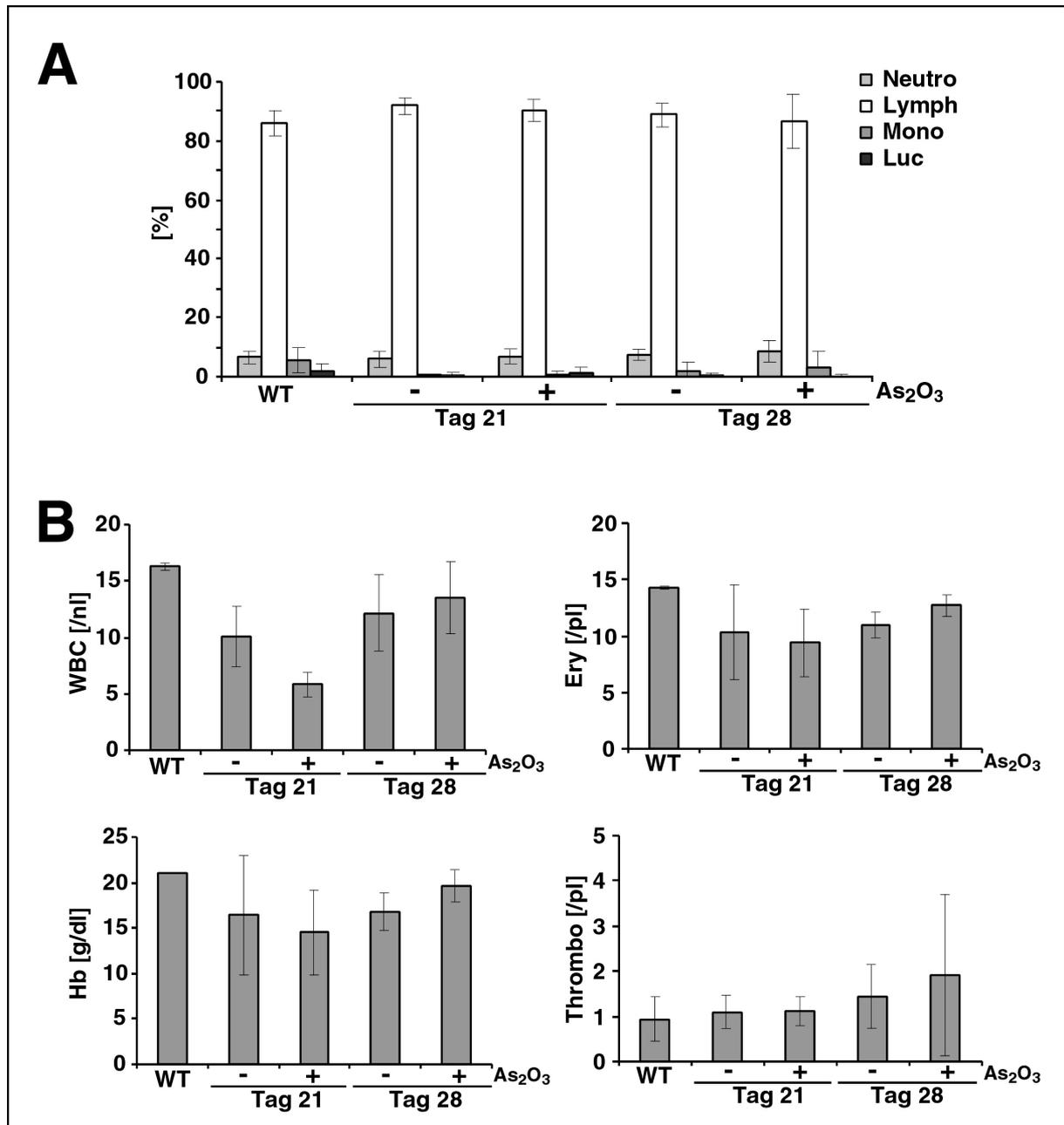


Abbildung 23. Effekte von As₂O₃ auf das Engraftment transplantiertter Knochenmarkzellen. 14 sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkzellen transplantiert. 10 Tage nach der Transplantation wurden 8 Tiere mit täglich 50 µg As₂O₃ behandelt, 6 Tiere wurden nicht behandelt. 21 und 28 Tage nach der Transplantation wurden Blutbilder erstellt (**A**) Prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes behandelter und nicht behandelter Mäuse (As₂O₃ -/+) am Tag 21 und 28 im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrolltieren (Neutro: Neutrophile; Lymph: Lymphozyten; Mono: Monozyten; Luc: nicht identifizierbare Zelltypen). (**B**) Leukozytenzahl („white blood count“; WBC), Erythrozytenzahl (Ery), Hämoglobingehalt (Hb) und Thrombozytenzahl im peripheren Blut behandelter und nicht behandelter Mäuse (As₂O₃ -/+) am Tag 21 und 28 im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrolltieren.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass As_2O_3 lediglich die Gesamtleukozytenzahl vorübergehend erniedrigt, ohne das hämapoetische Gleichgewicht zu stören. Insbesondere führt die Behandlung mit As_2O_3 in BCR/ABL transduzierten Mäusen weder zu einer Anämie noch zu einer Thrombozytopenie.

Leukozyten (WBC) [/nl]	5,4-16
Erythrozyten (Ery) [/pl]	6,7-9,99
Hämoglobin (Hb) [g/dl]	10,2-16,2
Thrombozyten [/nl]	600-1200
Neutrophile [%]	8-43%
Lymphozyten [%]	55-95%
Monozyten [%]	0,0-8%

Tabelle 6: Normalbefund des peripheren Bluts von Mäusen ((Fox, 2002))

4.2.10.2 As_2O_3 führt zum Überleben von 25% der Tiere

3 von 6 Tieren starben innerhalb von 33 Tagen und weitere 2 bis zum Tag 42. Lediglich ein Tier verstarb erst am 92. Tag nach der Transplantation (Abb. 24 und Tabelle 7). Von den behandelten Tieren starben 3 von 8 Tieren innerhalb von 33 Tagen. An den Tagen 46, 71 und 104 starben sukzessive weitere Tiere. Zwei Tiere überlebten ohne äußerlich feststellbare Krankheitszeichen bis zum Tag 150. Diese 25%-ige Überlebensrate entsprach nicht der aufgrund des ersten Versuchs angenommenen Rate von 50%. Daher sind die unterschiedlichen Kurvenverläufe der Kaplan-Meyer-Kurve für die unbehandelte und behandelte Gruppe statistisch nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$). Da auch ein weiteres Überleben der restlichen zwei Tiere die statistische Signifikanz des Versuches nicht verändert hätte, wurde der Versuch nach 150 Tagen beendet. Beide Tiere zeigten keinen Gewichtsverlust, waren aktiv und die allgemeine Physiologie der Tiere war unauffällig. Beide Tiere zeigten dennoch eine sehr ausgeprägte Splenomegalie mit einem Milzgewicht von 1 g (Tabelle 7).

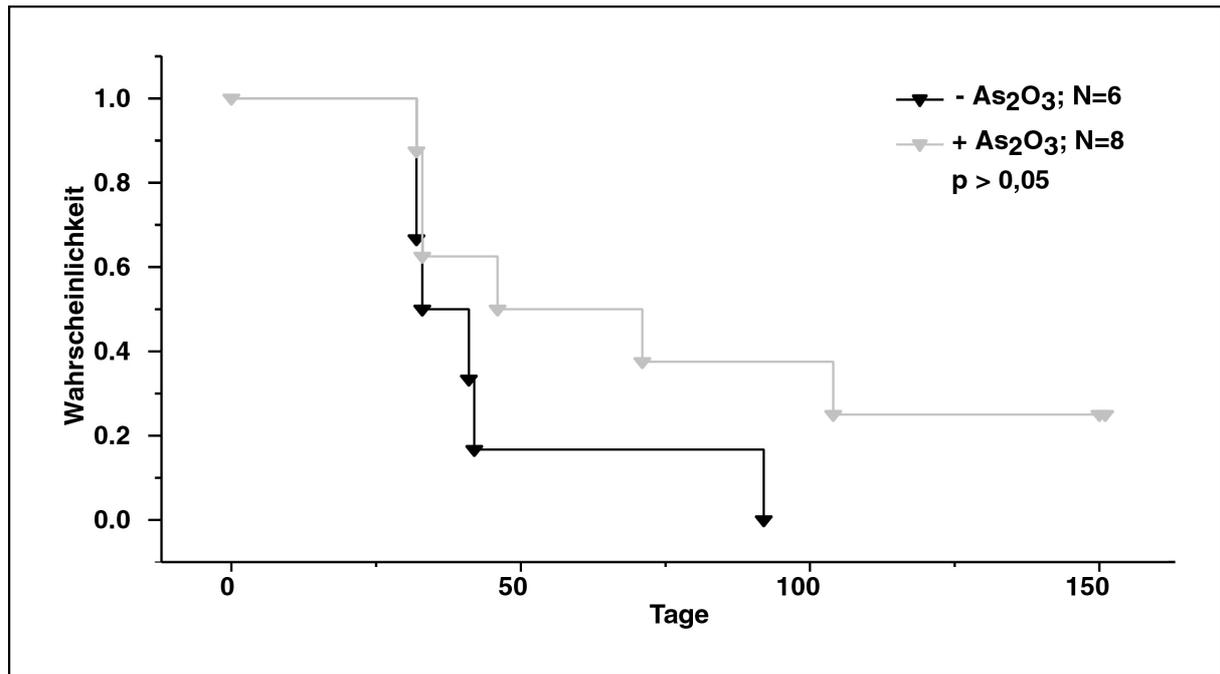


Abbildung 24: Einfluß von As₂O₃ auf das Überleben von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse. 14 sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkzellen transplantiert. 10 Tage nach der Transplantation wurden 8 Tiere mit täglich 50 µg As₂O₃ behandelt, 6 Tiere wurden nicht behandelt. Die Abbildung zeigt die Kaplan-Meier-Analyse der Überlebensdauer unbehandelter (-As₂O₃) und behandelter (+As₂O₃) Mäuse.

Daher kann man zusammenfassend feststellen, dass eine Transplantation von nur 5000 Sca-1 positiven Zellen pro Tier ausreicht, um in 100% der Tieren eine BCR/ABL induzierte myeloproliferative Krankheit hervorzurufen. As₂O₃ vermag wie im ersten Versuch nicht, die maligne veränderten Zellen in den Tieren vollständig abzutöten. Dennoch verhalf As₂O₃ 25% der Tiere zu einem äußerlich symptomfreien Überleben trotz vollausgeprägter Splenomegalie.

4.2.10.3 As₂O₃ führt in zwei von acht Tieren zu deutlichen Veränderungen des Blutbildes CML-kranker Mäuse

Wie oben beschrieben, führte die Gabe von As₂O₃ in den ersten 28 Tagen nicht zu signifikanten Veränderungen des Blutbildes im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren. Lediglich der WBC war vorübergehend niedriger. In Abb. 25A und 25B ist der weitere Verlauf der WBC-Werte für die einzelnen Tiere dargestellt. Die Tiere sind in zwei Gruppen unterteilt: Tiere mit frühem Krankheitsbeginn (Abb. 25A) und Tiere mit spätem Krankheitsbeginn (Abb. 25B).

Auf die Gruppe der früh erkrankten Tiere hatte die Behandlung mit As₂O₃-keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf und auf den Verlauf des Blutbildes. Jeweils ein unbehandeltes und ein behandeltes Tier verstarb mit Leukozytenzahlen von mehr als 120/nl. Die anderen früh

erkrankten Tiere starben, unabhängig davon, ob sie As_2O_3 erhielten oder nicht, mit WBC zwischen 33/nl und 51/nl (Abb. 25A). In der Gruppe der spät erkrankten Tiere lagen die WBCs zum Zeitpunkt des Todes zwischen 20/nl und 40/nl, unabhängig davon, ob sie As_2O_3 erhielten oder nicht (Abb. 25B).

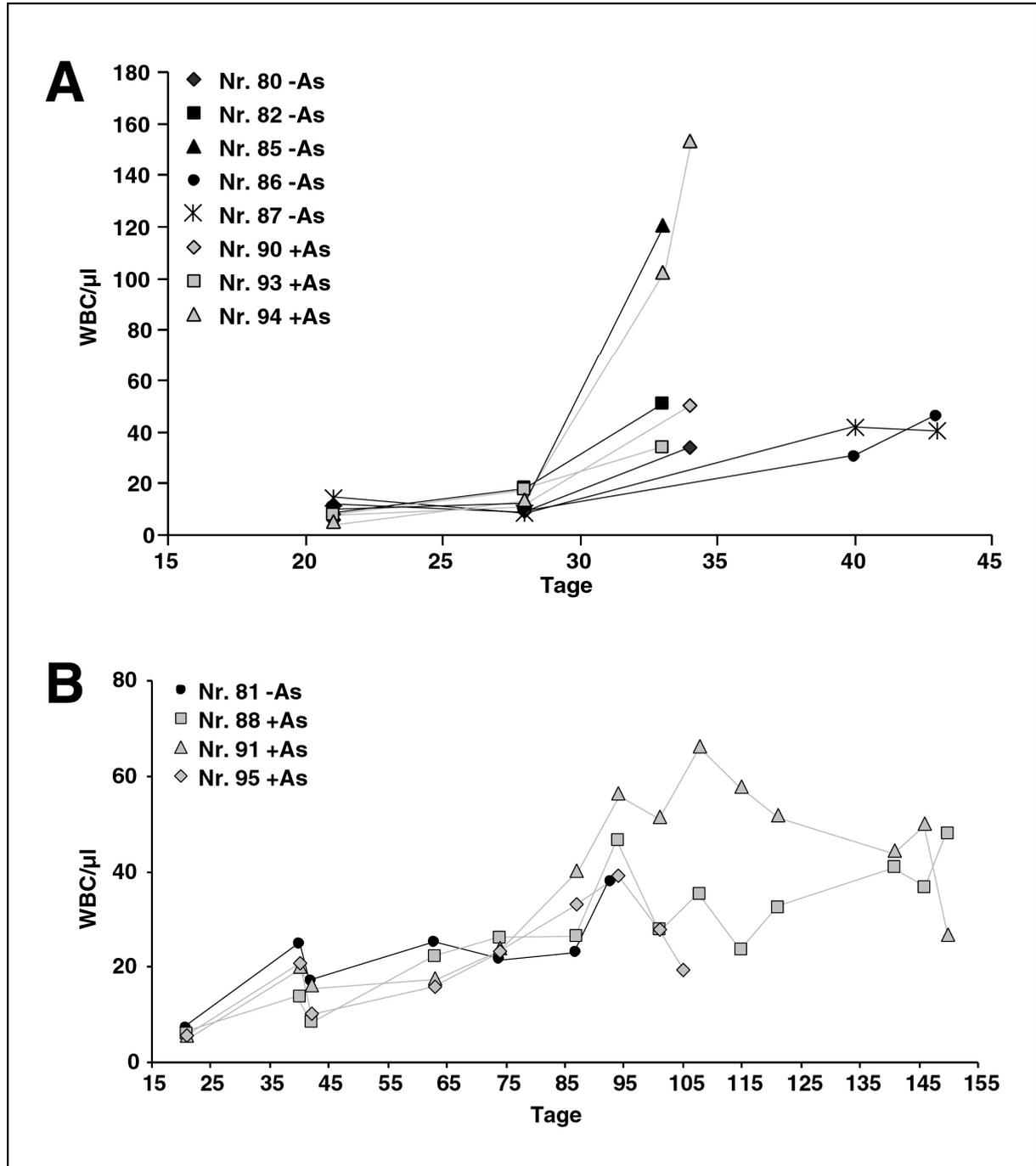


Abbildung 25: Effekt von As_2O_3 auf die Leukozytenzahl von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse. Sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkszellen transplantiert und ab Tag 10 mit täglich $50 \mu\text{g}$ As_2O_3 (+As) behandelt oder nicht behandelt (-As). Die Leukozytenzahl (WBC) im peripheren Blut wurde ab Tag 21 wiederholt bestimmt. Die Tiere wurden mittels Ohrmarken nummeriert (Nr. 80 – 95). **(A)** Verlauf der WBC behandelter und unbehandelter Tiere, die vor Tag 45 krank wurden. **(B)** Verlauf der WBC behandelter und unbehandelter Tiere, die nach Tag 45 krank wurden.

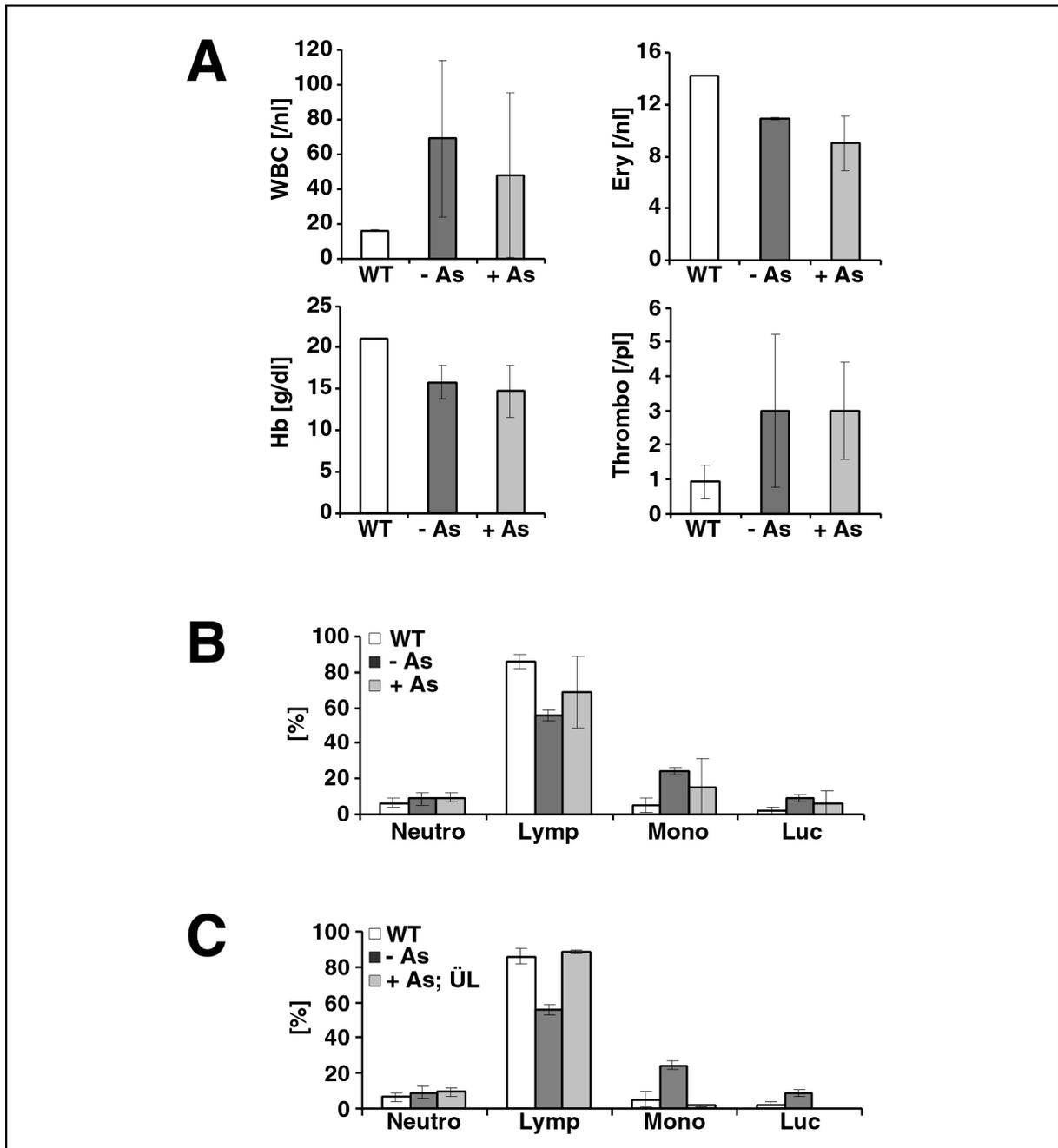


Abbildung 26: Einfluß von As_2O_3 auf das Blutbild kranker Mäuse nach Transplantation einer geringen Tumormasse. Sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkzellen transplantiert und ab Tag 10 mit täglich $50 \mu g$ As_2O_3 (+As) behandelt oder nicht behandelt (-As). **(A)** Mittlere Leukozytenzahl (WBC), mittlere Erythrozytenzahl (Ery), mittlerer Hämoglobingehalt (Hb) und mittlere Thrombozytenzahl des peripheren Blut aller behandelten und aller nicht behandelten Mäuse im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrolltieren (WT). **(B)** Mittlere prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts aller behandelten und nicht behandelten Mäuse im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrolltieren. **(C)** Mittlere prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts aller nicht behandelten Mäuse und der Langzeitüberlebenden (ÜL) im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrolltieren (Neutro: Neutrophile; Lymp: Lymphozyten; Mono: Monozyten; Luc: nicht identifizierbare Zelltypen).

In Abb. 26A sind die Mittelwerte der WBCs zum Zeitpunkt des Todes dargestellt. Sowohl die unbehandelten wie die behandelten Tiere verstarben mit stark erhöhten WBCs im Vergleich zu den Kontrolltieren. Da die Standardabweichungen in beiden Gruppen sehr groß ist

unterscheiden sich die WBC-Werte insgesamt nicht signifikant. Ebenfalls in Abb. 26A sind die Anzahl der Erythrozyten, des Hämoglobingehalts und die Anzahl der Thrombozyten zum Zeitpunkt des Todes dargestellt. Die kranken Tiere wiesen leicht niedrigere Erythrozytenzahlen und einen etwas niedrigeren Hämoglobingehalt auf, als die Kontrolltiere, es gab jedoch keinen Unterschied zwischen der unbehandelten und behandelten Gruppe. Die kranken Tiere wiesen ebenfalls, unabhängig von As_2O_3 , zum Zeitpunkt des Todes eine durchschnittlich 3-fach erhöhte Thrombozytenzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Die prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts der kranken Tiere ist in Abb. 26B dargestellt. Die unbehandelten Tiere wiesen einen deutlich niedrigeren Lymphozytenanteil bei gleichzeitig erhöhtem Anteil von Monozyten und Luc-Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Das Blut der behandelten Tiere war im Vergleich zu den Kontrolltieren aus weniger Lymphozyten und mehr Monozyten und Luc-Zellen zusammengesetzt. Die Durchschnittswerte lagen, bezogen auf die gesamte Gruppe der behandelten Tiere, zwar näher an denen der Kontrolltiere als die Werte der unbehandelten Gruppe. Die großen Standardabweichungen lassen diese Abweichungen aber nicht als signifikanten Effekt von As_2O_3 erscheinen. Betrachtet man hingegen nur die Blutbilder der beiden langzeitüberlebenden Tiere (Nr. 88 und Nr. 91), so sieht man eine sehr deutliche Veränderung des Blutbildes dieser an Splenomegalie leidenden Tiere durch die Behandlung mit As_2O_3 . Die Tiere Nr. 88 und 91 wiesen am Tag 150 zwar erhöhte WBCs auf, die prozentuale zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts entsprach jedoch Normalwerten (Abb. 25B und Abb. 26C).

Zusammengefaßt ergeben diese Daten, daß As_2O_3 behandelte Tiere dieselben krankheitsbedingten Veränderungen des Blutbildes aufwiesen, wie die nicht behandelten Tiere, wenn sie recht schnell an der Krankheit verstarben. Bei langem Überleben unter dem Einfluß von As_2O_3 normalisierte sich das Blutbild hingegen.

4.2.10.4 As_2O_3 kann die Splenomegalie nicht reduzieren

Das Gewicht der Milz der kranken Tiere zum Zeitpunkt des Todes ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Sowohl mit als auch ohne Behandlung der Tiere mit As_2O_3 schwankte das Gewicht der Milz zwischen etwa 0,4g und mehr als 0,9g. Die Milz bei beiden überlebenden, behandelten Tieren war stark vergrößert (0,97 bzw. 1,02 g).

As_2O_3 ist nicht in der Lage, das Gewicht der Milz signifikant zu verringern. Auch auf die Expression myeloischer bzw. lymphatischer Oberflächenmarker übt As_2O_3 keinen signifikanten Einfluß aus.

Tiere	As ₂ O ₃	Überlebenszeit [d]	Milzgewicht [g]
WT	–	---	0,14 ± 0,02
Nr. 80	–	33	0,49
Nr. 81	–	92	0,4
Nr. 82	–	32	0,8
Nr. 85	–	32	0,92
Nr. 86	–	42	0,8
Nr. 87	–	41	0,9
Unbehandelte Gruppe	–	32 – 92	0,63 ± 0,06
Nr. 88	+	150	0,97
Nr. 89	+	46	0,45
Nr. 90	+	33	0,84
Nr. 91	+	150	1,02
Nr. 92	+	71	0,58
Nr.93	+	32	0,75
Nr. 94	+	33	0,77
Nr. 95	+	105	0,38
Behandelte Gruppe	+	32 – 150	0,72 ± 0,08

Tabelle 7: Überlebensdauer und Gewicht der Milz nach Transplantation einer geringen Tumormasse. Sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkzellen transplantiert und ab Tag 10 mit täglich 50 µg As₂O₃ behandelt oder nicht behandelt (As₂O₃ –/+). Das Gewicht der Milz wurde zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation der Leukämie (Überlebenszeit) bestimmt. Die Tiere wurden mittels Ohrmarken nummeriert (Nr. 80 – 95). Die Tabelle faßt die individuellen Werte der Tiere sowie Mittelwerte der behandelten und unbehandelten Gruppe zusammen.

4.2.10.5 As₂O₃ führt bei langem Überleben zu einer geringeren Expression myeloischer Oberflächenmarker in der Milz und im Knochenmark

Von allen Tieren wurden in Knochenmark und Milz die Expression der myeloischen Oberflächenmarker Gr-1 und Mac-1 sowie des B-lymphatischen Markers CD45R/B220 durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in Abb. 27A dargestellt, wiesen unbehandelte wie behandelte Tiere sowohl im Knochenmark als auch in der Milz den CML-typischen Anstieg myeloischer Zellen auf. Die Durchschnittswerte aller Tiere der beiden Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

In Abb. 27B ist die Expression dieser Marker in den beiden langzeitüberlebenden Tieren (Nr. 88 & 91) und zwei ausgewählten früh verstorbenen Tieren der behandelten Gruppe (Nr. 93 & 94) gezeigt. Im Knochenmark zeigten beide früh gestorbenen Tiere eine höhere Expression von Gr-1 (ca. 80%) und Mac-1 (ca. 95%) als die beiden langzeitüberlebenden Tiere (ca. 50-60% Gr-1 bzw. 60-80% Mac-1). Außer bei Tier Nr. 88 (45%) ist die Expression von CD45R/B220 der anderen drei Tiere deutlich niedriger (etwa 20%) als bei den Kontrolltieren. In Abbildung 27C wurden die beiden behandelten langzeitüberlebenden mit drei früh verstorbenen Tieren der unbehandelten Gruppe (Nr. 85, 86 & 87) verglichen. Im Knochenmark zeigen die unbehandelten Tiere mit rund 80% Gr-1 und 90-95% Mac-1 Expression bei gleichzeitig 20-30% Expression von CD45R/B220 dieselben Werte wie die behandelten, früh gestorbenen Tiere (Abb. 27B). Im Gegensatz dazu ist die Expression der myeloischen Oberflächenmarker bei diesen unbehandelten Tieren höher als bei den behandelten Langzeitüberlebenden.

In der Milz waren bei den behandelten, früh erkrankten Tiere Nr. 93 und 94 die myeloischen Marker Gr-1 mit etwa 60-65% und Mac-1 mit 65% bzw 85% exprimiert. Die langzeitüberlebenden Tiere Nr. 88 und 91 exprimierten Gr-1 mit 50% bzw 40% und Mac-1 zu 55% bzw. 45%. Das heißt, daß der im Knochenmark beobachtete Rückgang der Expression myeloischer Marker um etwa 30% in der Milz mit 20% etwas niedriger ausfiel. Die Expression von CD45R/B220 in der Milz lag bei allen Tieren zwischen 20 und 35%, ein Effekt von As_2O_3 war hier nicht zu erkennen. Beim Vergleich der beiden langzeitüberlebenden mit den unbehandelten, früh verstorbenen Tieren (Abb. 27C) fällt zunächst die wiederum recht einheitlich verteilte Expression von CD45R/B220 auf (15-35%), die unabhängig von der Gabe von As_2O_3 war. Die unbehandelten Tiere 85 und 87 exprimierten die myeloischen Marker Gr-1 (75-80%) und Mac-1 (ca. 85%) zu etwa 20-25% stärker als Nr.86 (55% bzw 60%). Dieses Tier unterschied sich in der Expression der myeloischen Oberflächenmarker nicht deutlich von den As_2O_3 -behandelten Tieren 87 und 91 (s.o.), wohingegen Nr. 85 und 87 vergleichbar dem oben beschriebenen Trend (Abb. 27B) die myeloischen Marker deutlich stärker exprimierten, als die langzeitüberlebenden.

Zusammengefaßt weisen die hier gezeigten Daten darauf hin, daß As_2O_3 nur bei Tieren, deren Überleben durch die Behandlung länger war, in der Lage war, die Expression der myeloischen Differenzierungsmarkern zu reduzieren.

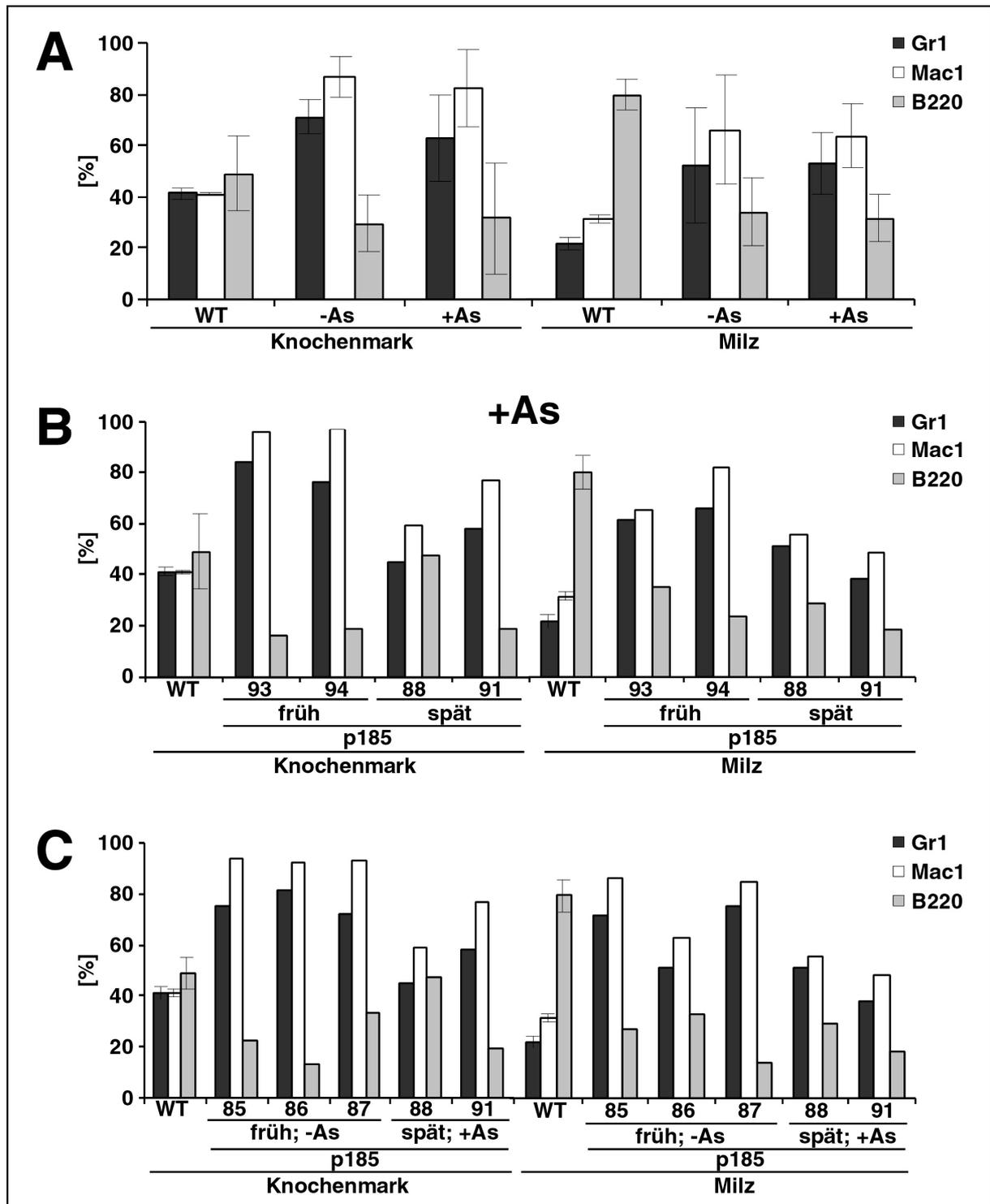


Abbildung 27: Effekt von As_2O_3 auf die Expression myeloischer und lymphatischer Marker von Milz- und Knochenmarkzellen von Mäusen nach Transplantation einer geringen BCR/ABL-positiven Tumormasse. Sublethal bestrahlte Mäuse wurden mit je 5000 BCR/ABL-exprimierenden Sca-1 positiven Knochenmarkszellen transplantiert und ab Tag 10 mit täglich 50 μg As_2O_3 behandelt (+As) oder nicht behandelt (-As). FACS-Analyse der Gr-1, Mac-1 und B220 Expression in Knochenmark und Milz kranker Mäuse (p185) (WT= nicht transplantierte Kontrollmäuse). (A) Vergleich der Markerexpression aller unbehandelten und aller behandelten Tiere. (B) Vergleich der Markerexpression zweier früh erkrankter (früh; Nr. 93 & 94) und zweier spät erkrankter (spät; Nr. 88 & 91) As_2O_3 behandelten Tiere. (C) Vergleich der Markerexpression von drei früh erkrankten, unbehandelten Tieren (früh; -As; Nr. 85, 86 & 87) und von zwei spät erkrankten, As_2O_3 behandelten Tieren (spät; +As; Nr. 88 & 91).

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zur Rolle der N-terminalen „coiled-coil“-Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL für die Sensibilität gegenüber STI571.

Abnormale Oligomerisierung der Fusionsproteine im Vergleich zu ihren physiologischen Gegenstücken ist unerlässlich für die Determinierung des durch Leukämie-assoziierten Translokationsprodukte induzierten malignen Phänotyps. Einerseits führt aberrante Oligomerisierung zur dauerhaften Aktivierung von Kinasen, wie ABL, PDGFR u.a., die unter physiologischen Bedingungen fein reguliert sind (Golub et al., 1996) (McWhirter et al., 1993). Andererseits trägt Oligomerisierung dazu bei, Transkriptionsaktivatoren in Transkriptionsrepressoren zu verwandeln, wie im Falle der AML-assoziierten Translokationsprodukte AML-1/ETO, PML/RAR α oder PLZF/RAR α (Minucci et al., 2000) (Lin und Evans, 2000). Am Beispiel des durch PML/RAR α induzierten leukämischen Phänotyps wurde gezeigt, daß der Differenzierungsblock und die Sensibilität gegenüber all-trans Retinsäure (t-RA) strikt von der Anwesenheit der „coiled-coil“-Oligomerisierungsoberfläche im PML-Anteil des Fusionsproteins abhängen (Grignani et al., 1999; Grignani et al., 1996), (Minucci et al., 2000) (Lin und Evans, 2000). Mit Hilfe der „coiled-coil“ bildet PML/RAR α HMG-Komplexe (Grignani et al., 1999). Die Bildung der HMG-Komplexe führt zur aberranten Rekrutierung von Histondeacetylase-Aktivität (HDAC-Aktivität) an den RAR α -Anteil des Fusionsproteins, wodurch PML/RAR α , wie allgemein angenommen wird, die Transkription von t-RA Zielgenen reprimiert und die Differenzierung der hämopoetischen Zellen blockiert wird. Das Ablösen der HDAC-Aktivität von dem Fusionsprotein durch pharmakologische Dosen von t-RA erlaubt wieder die Transkription der Zielgene (zur Übersicht siehe (Melnick und Licht, 1999)).

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten weisen daraufhin, daß es einen Zusammenhang gibt zwischen der Fähigkeit von X-ABL Konstrukten, HMG-Komplexe einer bestimmten Größe zu bilden, und dem durch die aktivierte ABL-Kinase induzierten Phänotyp gibt. Die X-ABL Konstrukte lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste bildet HMG-Komplexe mit einem hohen Molekulargewicht, wie HLH-ABL und PCC-ABL, und die zweite bildet HMG-Komplexe von vergleichsweise niedrigem Molekulargewicht, wie BCC-ABL, POZ-ABL und Δ CCp185. Die Komplexe, die von HLH-ABL und PCC-ABL gebildet wurden, waren sogar noch größer als die von p185^(BCR-ABL) gebildeten. Bemerkenswerterweise konnte auch die p185^(BCR-ABL)-Mutante, bei der die Oligomerisierungsoberfläche deletiert wurde, noch HMG-Komplexe bilden, wenn auch sehr viel weniger effizient als p185^(BCR-ABL). Man kann darüber

spekulieren, ob die Komplexbildung durch Phosphotyrosin-unabhängige Bindung der BCR-„SH2-binding“ Domäne an die SH-2 Domäne von ABL (Muller et al., 1992; Pendergast et al., 1991) bedingt ist. Dies könnte der Grund sein, weshalb die Deletion der „coiled-coil“ nicht signifikant mit der Autophosphorylierung von p185^(BCR-ABL) interferiert, was im übrigen mit bereits publizierten Daten im Einklang steht (He et al., 2002; Tauchi et al., 1998; Zhang et al., 2001). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß gezeigt werden konnte, daß eine TEL/ABL-Mutante, der die HLH-Oligomerisierungsdomäne fehlt, nicht autophosphoryliert und deshalb auch nicht in der Lage ist, Faktor-Unabhängigkeit von hämopoetischen Zellen oder Transformation von Fibroblasten zu vermitteln (Golub et al., 1996).

Mit dem benutzten experimentellen System war es nicht möglich zu bestimmen, wie viele Monomere von p185^(BCR-ABL) oder den X-ABL Konstrukten in den HMG-Komplexen vorhanden waren, da auch endogenes ABL nicht in den Eluatfraktionen enthalten war, die dem theoretischen Molekulargewicht des c-ABL Monomers (145 kDa) entsprochen hätten, sondern in denjenigen, die einem Molekulargewicht von mehr als 500 kDa entsprachen. Das könnte an der Bindung von Adaptormolekülen liegen oder daran, daß c-ABL selbst in der Lage ist, zu oligomerisieren. Immerhin zeigen die hier dargestellten Daten, daß p185^(BCR-ABL) HMG-Komplexe bildet, die zwischen 670 und 1400 kDa eluieren, was publizierte Daten über p210^(BCR/ABL) bestätigt (Pendergast et al., 1989).

Die Sensibilität gegenüber STI571 ließ ebenfalls eine Klassifizierung der X-ABL Konstrukte in zwei Gruppen zu: die eine war hochempfindlich, die andere nur gering empfindlich gegenüber STI571. Die Gruppe, die auf STI571 nur wenig sensibel reagierte, entsprach der Gruppe, die große HMG-Komplexe bildete und umgekehrt. Die gering sensible Gruppe verhielt sich ähnlich wie p185^(BCR-ABL), und die hoch sensible Gruppe zeigte eine STI571-Sensibilität wie Δ CCp185. Interessanterweise führte nicht das von BCR/ABL abgeleitete BCC-ABL, sondern das von TEL/ABL abgeleitete HLH-ABL zur Bildung der größten HMG-Komplexe und zur größten Resistenz gegenüber STI571. Andererseits war die STI571-Sensibilität nicht anhand des Phosphorylierungsniveau der X-ABL Konstrukte vorhersagbar.

Außerdem weisen diese Daten eindeutig darauf hin, daß die Aktivierung von ABL, erkennbar anhand der Autophosphorylierung, ausreicht, um hämopoetische Zellen zu transformieren, aber nicht um klassische Transformationskriterien zu erfüllen, wie Fokusbildung oder Verankerung-Unabhängigkeit von Fibroblasten. Unabhängig von der Fähigkeit, HMG-Komplexe zu bilden, oder autophosphoryliert zu sein, war keines der X-ABL Konstrukte in der Lage, RAT-1-Zellen zu transformieren, was Daten über BCC-ABL bestätigt (McWhirter et al., 1993). Das Transformationspotential von BCC-ABL im hämopoetischen System ist

dadurch bewiesen, daß es ähnlich wie Δ CCp210 in der Lage ist, eine maligne T-Zellerkrankung in Mäusen hervorzurufen (He et al., 2002; Zhang et al., 2001).

Als Konsequenz aus der Beobachtung, daß eine Manipulation der Fähigkeit von BCR/ABL zu oligomerisieren, mit seinem Transformationspotential und seiner STI571-Sensibilität interferiert, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Oligomerisierungsoberfläche von BCR/ABL als molekulares „target“ zu verwenden. Dazu wurde ein Peptid, das exakt die „coiled-coil“ Domäne, die alleine eine funktionstüchtige Oligomerisierungsoberfläche darstellt (McWhirter et al., 1993), kloniert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese isolierte BCR-„coiled-coil“ in der Lage ist, *in vitro* und *in vivo* mit p185^(BCR-ABL) zu interagieren.

Diese Interaktion ist nicht in der Lage, das Transformationspotential von p185^(BCR-ABL) so zu beeinflussen, daß es dem einer Δ CCp185-Mutante entspricht. Δ CCp185 ist in seinen transformierenden Eigenschaften auf hämopoetische Zellen limitiert. Δ CCp185-exprimierende Fibroblasten bleiben Verankerung-abhängig, wohingegen die Expression von BCC in p185^(BCR-ABL)-exprimierenden RAT-1 Zellen die Bildung von Verankerung-unabhängig wachsenden Kolonien zwar signifikant reduzieren, aber nicht verhindern kann. Betrachtet man hingegen die Faktorabhängigkeit von Ba/F3-Zellen, so verhalten sich p185^(BCR-ABL)-exprimierende Ba/F3-Zellen in Gegenwart von BCC ähnlich wie Δ CCp185-exprimierende Zellen. Allerdings ist die Sensibilität von p185^(BCR-ABL)-exprimierende Ba/F3-Zellen gegenüber STI571 durch die Anwesenheit von BCC stark erhöht. Außerdem scheint die Koexpression von BCC das Autophosphorylierungsniveau von BCR/ABL sowie das gesamte Phosphorylierungsniveau in den transformierten Zellen zu erniedrigen, was einen signifikanten Unterschied zu Δ CCp185 darstellt. Man könnte spekulieren, daß die Bindung von BCC an p185^(BCR-ABL) effizienter mit der Fähigkeit, HMG-Komplexe zu bilden interferiert, und damit mit der Autophosphorylierung, als die Deletion der „coiled-coil“.

Zusammengefaßt weisen die in dieser Arbeit vorgelegten Daten darauf hin, daß ein „targeting“ der BCR/ABL Oligomerisierungsoberfläche nicht ausreicht, um die transformierenden Eigenschaften von BCR/ABL zu überwinden. Eventuell kann die Kinetik, mit der sich der transformierte Phänotyp etabliert, verlangsamt werden, ohne die Transformation letztlich zu verhindern. Andererseits kann ein „targeting“ der „coiled-coil“-Domäne sehr wohl die Sensibilität BCR/ABL transformierter Zellen gegenüber molekularen Wirkstoffen wie STI571 erhöhen. Das ist von großer Wichtigkeit angesichts der Häufigkeit, mit der sich vor allem in Ph⁺ ALL-Patienten eine Resistenz gegenüber STI571 zu entwickeln vermag (Hofmann et al., 2002; Ottmann und Hoelzer, 2002). Das „targeting“ der

Oligomerisierungsoberfläche von ABL-Fusionsproteinen ist ein möglicher therapeutischer Ansatz, um die Wirkung tumorzellspezifischer Wirkstoffe bei der Behandlung von Leukämien, die durch ABL-Fusionproteine hervorgerufen werden, zu verstärken. Das „targeting“ der Oligomerisierungsdomäne könnte nicht nur mit STI571 kombiniert werden, sondern auch mit anderen Wirkstoffen, die BCR/ABL induzierte Signalkaskaden beeinflussen, wie SRC-Inhibitoren oder Farnesyltransferasen.

5.2 Untersuchungen zum Mechanismus der As₂O₃-induzierten Apoptose durch Leukämie-assoziierte Translokationsprodukte

Vorarbeiten haben ergeben, daß As₂O₃ möglicherweise eine weitere Tumorzell-spezifische Substanz zur Behandlung der Ph⁺ Leukämie sein könnte (Perkins et al., 2000 Feb 1) (Puccetti et al., 2000). As₂O₃ ist eine bereits seit mehr als hundert Jahren zur Therapie der CML eingesetzte Substanz, die Apoptose in BCR/ABL exprimierenden Zellen induziert. Die Renaissance des As₂O₃ als Leukämietherapeutikum basiert auf der exzellenten Wirksamkeit dieser Substanz als Monotherapie in Patienten mit t(15;17)(PML/RAR α) positiver akuter Promyelozytenleukämie (APL). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß Faktoren, die in der Lage sind, die Expression von PML zu modifizieren, verantwortlich sein könnten für eine erhöhte Sensibilität gegenüber der Apoptose-induktion durch As₂O₃. Diese Modifizierung von PML kann qualitativer oder quantitativer Natur sein.

Eine qualitative Modifikation ist im Fall des t(15;17) Translokationsprodukts PML/RAR α gegeben: PML/RAR α enthält ein C-terminal trunkiertes PML, das seine physiologisch angestammte Lokalisation im Zellkern im Rahmen der Bildung des Fusionsproteins verliert. Die ektopische Expression von PML/RAR α sensibilisiert Zellen gegenüber As₂O₃ (Gianni et al., 1998; Sternsdorf et al., 1999). Diese Funktion von PML/RAR α ist unabhängig davon, ob der RAR α Anteil des Fusionsproteins in einem funktionalen Zustand vorliegt oder nicht. Hingegen ist der RAR α -Anteil von PML/RAR α für die anderen Eigenschaften des APL-Phänotyps, wie der Differenzierungsblock und die Antwort auf t-RA, unerlässlich (Sternsdorf et al., 1999). Die entscheidende Rolle des PML-Anteils von PML/RAR α für die As₂O₃ Antwort wird auch dadurch bewiesen, daß das andere APL-spezifische, mit der t(11;17) zusammenhängende Translokationsprodukt PLZF/RAR α , welches einen identischen RAR α Anteil wie PML/RAR α besitzt, nicht in der Lage ist, die As₂O₃-induzierte Apoptose zu vermitteln. (Sternsdorf et al., 1999).

Eine quantitative Modifizierung von PML ist ebenfalls in der Lage, die Empfindlichkeit gegenüber der As_2O_3 -induzierten Apoptose zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von PML die Antwort auf As_2O_3 in normalerweise As_2O_3 -resistenten Zellen drastisch zu verstärken vermag. Daß die Expression von PML durch die Expression von BCR/ABL ebenfalls quantitativ modifiziert wird, konnte dadurch gezeigt werden, daß eine Inaktivierung der BCR/ABL-Kinase von Ph⁺ ALL-Blasten durch Behandlung mit STI571 zu einer Reduktion der PML-Expression führt. Außerdem verfügt die BCR/ABL exprimierende lymphatische Zelllinie BV173 über ein anderes PML-Immunofärbungsmuster wie die BCR/ABL-negativen Nalm-6 Zellen, was durch eine Erhöhung der Anzahl und der Größe der PML-NBs charakterisiert ist. Zudem führt eine ektope Expression von BCR/ABL in U937-Zellen zu einer Erhöhung von Anzahl und Größe der PML-NBs, verglichen mit Kontrollzellen. Ein vergleichbarer Effekt wird durch AML-1/ETO erzeugt, was bekanntermaßen die PML-NBs modifiziert (McNeil et al., Cell Biochem 2000 Jul 19).

Der Einfluß von aktivierten RAS auf die Expression von PML könnte eine Verbindung darstellen zwischen der As_2O_3 -Empfindlichkeit von BCR/ABL-positiven CML-Blasten auf der einen Seite, und PML/RAR α -positiven APL-Blasten auf der anderen Seite. PML/RAR α sensibilisiert die Zellen gegenüber As_2O_3 , weil es eine Mutante von PML darstellt, während BCR/ABL wahrscheinlich PML durch die konstitutive Aktivierung des RAS-Signalweges hochreguliert. Es ist bekannt, daß einer der Signalwege, durch den BCR/ABL Zellen transformiert, die Aktivierung von RAS ist. Wie hier gezeigt werden konnte, aktiviert BCR/ABL auch in U937-Zellen RAS. Überraschenderweise kann auch die Expression der Transkriptionsfaktors AML-1/ETO RAS in U937-Zellen aktivieren. Die Bedeutung der RAS-Aktivierung für die As_2O_3 -induzierte Apoptose wurde dadurch gezeigt, daß die Expression der onkogenen RAS-Variante RAS^{V12} U937-Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch As_2O_3 sensibilisiert.

Übereinstimmend mit publizierten Daten kann As_2O_3 seine Funktion auch ohne die Expression von funktionalem p53 ausüben (Chen et al., 2001; Chen et al., 2001). So sind K562-Zellen, die als As_2O_3 empfindlich beschrieben wurden (Perkins et al., 2000 Feb 1), p53 negativ. Außerdem exprimieren U937-Zellen, die durch eine Transfektion mit PML/RAR α , BCR/ABL oder AML-1/ETO As_2O_3 -sensibel gemacht werden können, kein funktionales p53. Zudem führt die Behandlung von p53 positiven Zellen mit As_2O_3 im Gegensatz zu der mit Doxorubicin zu keiner Hochregulierung von p53. Eine Beteiligung von p53 bei der As_2O_3 -induzierten Apoptose kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden: zum einen wegen der

Rolle von PML und zum anderen wegen der Unterschiede in der Kinetik, mit der As_2O_3 in p53-negativen, BCR/ABL-positiven U937 und p53 positiven, BCR/ABL-positiven TOM-1, BV173 oder SupB15-Zellen die Apoptose induziert. P53-positive Zellen sterben innerhalb von 24-36h, während BCR/ABL oder AML-1/ETO-exprimierende U937-Zellen erst nach 72-96h sterben. Ob diese Unterschiede auf eine An- oder Abwesenheit von p53 zurückgeführt werden können, das lediglich durch Phosphorylierung oder Acetylierung modifiziert wurde, muß noch geklärt werden.

Ausgehend von den in dieser Arbeit vorgelegten Daten kann man die Hypothese aufstellen, daß die durch As_2O_3 induzierte Apoptose eventuell die Summe zweier PML-modifizierender Ereignisse darstellt. Die Exposition von Zellen zu As_2O_3 führt zu einer spezifischen SUMOylierung von sowohl PML als auch PML/RAR α , ohne die SUMOylierung anderer Proteine, wie zum Beispiel die der Kernporenkomponente Ran-GAP, zu beeinflussen (Muller et al., 1998; Sternsdorf et al., 1999). Angesichts der Tatsache, daß die SUMOylierung von PML in jeder Zelle stattfindet, die As_2O_3 ausgesetzt ist, unabhängig davon, ob diese Zellen auch in Apoptose gehen, kann angenommen werden, daß die SUMOylierung nur dann eine Rolle für die As_2O_3 -induzierte Apoptose spielt, wenn zugleich noch eine weitere Modifizierung von PML stattfindet. Im Falle von PML/RAR α -positiven Zellen ist dies eine qualitative Veränderung, nämlich eine Mutation von PML, und im Falle von RAS^{V12}- oder BCR/ABL-exprimierenden Zellen scheint es eine quantitative Veränderung - eine Hochregulierung von endogenem PML - zu sein. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, daß eine Behandlung von Zellen mit IFN α , das PML durch eine Aktivierung des PML-Promotors hochreguliert (Chelbi-Alix et al., 1995; Stadler et al., 1995), keine Apoptose induziert. Wird jedoch die PML-Expression durch IFN α in Zellen hochreguliert, in denen die PML-Expression bereits durch die Expression von BCR/ABL oder AML-1/ETO verändert wurde, so führt das zu einer hohen Apoptoserate durch IFN α . Diese Beobachtungen werden durch die *in vivo* Effekte von IFN α auf CML-Blasten und Ph⁺ ALL-Blasten gestützt, bei denen gezeigt wurde, daß sie auf IFN α ansprechen. Nicht ohne Grund ist IFN α seit mehr als 20 Jahren Bestandteil der Standardtherapie von CML-Patienten in der chronischen Phase. Seine Effizienz wurde auch für die Behandlung von Patienten, die an einer BCR/ABL-positiven ALL leiden nachgewiesen (Visani et al., 2000). Als ein weiteres Faktum, das diese Hypothese unterstützt, kann die Infektion durch Viren, wie HSV-1, HBV oder HCV, angesehen werden. Diese Viren modifizieren PML-NBs und PML selbst, und die damit verbundenen Krankheiten können oftmals mit IFN α therapiert werden (Lee et al., 1999; Villa et al., 2001). Dieser Aspekt wurde

bei HTLV-induzierte Leukämien untersucht, die sowohl gegenüber einer Behandlung mit $\text{IFN}\alpha$ als auch As_2O_3 sensibel sind (El-Sabban et al., 2000; Mahieux et al., 2001). Einen weiteren Hinweis liefern vorläufige Daten, die einen synergistischen Effekt von $\text{IFN}\alpha$ und As_2O_3 auf das Koloniebildungspotential von mononukleären Zellen aus 6 chronischer-Phase CML-Patienten aufzeigen (Miller et al., 2002).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten können eine erste Antwort auf die Frage geben, weshalb zwei völlig unterschiedliche Krankheiten wie CML und APL in tumorzellspezifischer Weise auf dasselbe Apoptose-induzierende Agens ansprechen. Außerdem erlauben die vorgelegten Ergebnisse, andere Tumorerkrankungen, die zu einer Aktivierung von RAS führen, als potentiell mit As_2O_3 oder $\text{IFN}\alpha$ therapierbare Krankheiten zu identifizieren.

Diese Hypothese sollte durch ein Tierexperiment mit Mäusen, die BCR/ABL transduziertes Spenderknochenmark erhielten, überprüft werden. Dazu wurden aus dem isolierten Gesamtknochenmark der Spendertieren die Sca-1 exprimierenden Zellen aufgereinigt. Der Phänotyp der erkrankte Tieren wies alle zuvor beschriebenen Merkmale auf (Hepatosplenomegalie, Hypergranulozytose in Milz und Knochenmark, überbordende Myelopoiese, hoher WBC)(Li et al., 1999). Dadurch konnte gezeigt werden, daß Sca-1 positive Zellen des Knochenmarks geeignete Zielzellen für die BCR/ABL induzierte Ausbildung eines myeloproliferativen Syndroms sind.

In einem ersten Therapieversuch mit As_2O_3 , bei dem eine große Anzahl transduzierter, $\text{p185}^{\text{(BCR/ABL)}}$ exprimierende Spenderzellen verwendet wurde, unterschied sich der Verlauf der unbehandelten und behandelten Tiere bis zum Abbruch des Versuchs am Tag 41 nicht signifikant. Zwar lebten beim Abbruch des Versuchs noch 50% der behandelten Tiere, die jedoch eine ausgeprägte Splenomegalie zeigten. Im zweiten Versuch, der mit niedriger Tumorbeladung durchgeführt wurde, ist der Verlauf der Überlebenskurve ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen unbehandelten und behandelten Tieren. Dennoch überlebten zwei der 8 behandelten Tiere bis zum Ende des Versuchs am Tag 150 ohne äußere Krankheitszeichen. Da die Krankheitsinzidenz bei 100% lag, ist dies sehr wahrscheinlich auf Einfluß von As_2O_3 zurückzuführen. Zum Erreichen einer statistischen Signifikanz müssen weitere Experimente, ausgehend von der 25 %igen Überlebensrate, mit einer größeren Anzahl von Tieren bestätigt werden.

Bei beiden in dieser Arbeit vorgelegten Tierversuchen war As_2O_3 nicht in der Lage, die Entstehung einer stark vergrößerten Milz zu unterdrücken. Selbst die Milz der beiden am längsten überlebenden Tieren war extrem vergrößert. Der im ersten Versuch festgestellte

geringe Gewichtsunterschied der Milz der behandelten bzw. unbehandelten Gruppe konnte im zweiten Experiment nicht bestätigt werden. Im ersten Versuchs konnte in Expressionsanalysen mittels Western-Blot ein geringeres Expressionsniveau des transduzierten p185^(BCR/ABL) auf Proteinebene bei Behandlung mit As₂O₃ festgestellt werden. Ob diese Herabregulierung der Expression auf eine As₂O₃-vermittelte verminderte Transkription oder eine erhöhte Degradation von BCR/ABL zurückzuführen war, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt.

Im ersten Versuch wurde in der Milz der behandelten Tiere eine geringere mittlere Expression myeloischer Differenzierungsmarker im Vergleich zu den unbehandelten Tieren festgestellt. Diese weniger stark ausgeprägte Myelopoese war sowohl im Mittel aller behandelten Tiere, als auch im Mittel der überlebenden 5 Tiere feststellbar. Im Knochenmark konnte dieser Effekt nur im Mittel der überlebenden 5 Tiere gemessen werden. Im zweiten Versuch konnte beim Vergleich aller unbehandelten mit allen behandelten Tiere weder im Knochenmark noch in der Milz eine Reduzierung myeloischer Differenzierungsmarker festgestellt werden. Der Vergleich der der beiden lange Zeit überlebenden Tieren mit den Tieren, die früh moribund wurden, ergab eine deutliche Abnahme der myeloischen Marker sowohl in der Milz als auch im Knochenmark. Daraus konnte man schließen, daß As₂O₃ einen reduzierenden Effekt auf die myeloische Ausreifung der Zellen, insbesondere in der Milz bei lang überlebenden Tieren ausübt. Daher kann angenommen werden, daß dieser Effekt auch im ersten Versuch nicht auf das vorzeitige Töten der letzten 5 Tiere, sondern auf As₂O₃ zurückzuführen war. Da die Ausprägung der Splenomegalie von As₂O₃ nicht beeinflusst wurde, deutet die Abnahme der myeloischen Marker an, daß sich die Hämoopoese möglicherweise in eine andere Richtung verschoben hatte, was aber nicht für die B-Lymphozytenlinie anhand der unveränderten Expression von CD45R/B220 nachgewiesen werden konnte. Ein insgesamt unreiferer Differenzierungsstatus wäre auch möglich, konnte aber in der vorliegenden Arbeit nicht abgeklärt werden.

Die Analyse der Blutbilder ergab keinen Effekt von As₂O₃ auf WBC, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl und Hämoglobingehalt. Allerdings wiesen die Blutbilder der beiden langzeitüberlebenden, mit Ausnahme der erhöhten WBCs, keine weiteren Veränderungen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Trotz extremer Splenomegalie und deutlich erhöhter Expression myeloischer Marker in Milz und Knochenmark konnte Arsenit die Verteilung der Leukzytentypen im Sinne der physiologischen Lymphozytose der Maus aufrechterhalten. Möglicherweise war dieser Effekt für das äußerlich symptomfreie Überleben dieser Tiere verantwortlich.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten zeigen, daß die Etablierung einer balancierten Hämopoese in den bestrahlten Tieren nach der Transplantation durch As_2O_3 nicht gestört wurde: Die Tiere wurden weder anämisch noch thrombozytopen, und die prozentuale Verteilung der Zelltypen war normal. Die tägliche Applikation von As_2O_3 hatte lediglich eine vorübergehende Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut zur Folge, die aber nicht unter Normalwerte fiel. Diese Ergebnisse stützen bereits publizierte Daten an APL-Patienten unter Behandlung mit Arsen (Shen et al., 1997). Daher kann man annehmen, daß eine Anwendung von As_2O_3 zur Behandlung der CML was die Nebenwirkungen betrifft ähnlich verträglich sein dürfte, wie bei der Behandlung der APL.

Insgesamt bleibt jedoch festzuhalten das As_2O_3 die Entwicklung einer CML-ähnlichen Krankheit in den Mäusen nicht statistisch signifikant zu verhindern vermag. Die Wirksamkeit von Arsen trioxid in CML-kranken Mäusen ist in Anbetracht der guten Ergebnisse, die aus alten Patientenstudien vorliegen (Forkner und Scott, 1931; Schulten, 1953) enttäuschend. Möglicherweise unterstützten diese Ergebnisse aber den in Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus der As_2O_3 induzierten Apoptose, wonach diese von qualitativ oder quantitativ modifizierter PML-Expression vermittelt wird. Es ist denkbar, daß die murine PML Variante(n) nicht in der Lage sind, die As_2O_3 -induzierte Apoptose effizient zu vermitteln. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß in Mausmodellen die Behandlung von durch humanes PML/RAR α induzierten Leukämien erfolgreich war (Wang et al., 1998). Einen Hinweis auf eine unterschiedliche Rolle von PML in humanen und murinen BCR/ABL positiven Leukämien könnten Untersuchungen zur Wirksamkeit von INF α auf Mäuse mit BCR/ABL-positiver Leukämie geben. Sollte auch hier der Effekt von INF α in der Maus schwächer sein als im Menschen, wäre das ein erster Hinweis auf mögliche Unterschiede in der Regulierung von PML und damit auf die Antwort sowohl auf As_2O_3 als auch auf INF α .

Aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse in humanen Zellkulturen erscheint As_2O_3 als vielversprechendes Therapeutikum für Ph⁺ Leukämien. Die Untersuchungen in den Mäusen weisen allerdings darauf hin, daß eine Monotherapie mit As_2O_3 wahrscheinlich nicht ausreichend wäre.

6 Zusammenfassung

Das Philadelphia-Chromosom (Ph) ist das zytogenetische Korrelat der 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 STI571 steht seit wenigen Jahren ein tumorzellspezifischer 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 STI571-resistenter Zellen jedoch zu einem frühen Therapie-refraktären Rezidiv der Krankheit.

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

Als erstes wurde die Möglichkeit untersucht, über eine Hemmung der Oligomerisierung das Transformationspotential von BCR/ABL negativ zu beeinflussen. Die Oligomerisierung spielt für die Aktivierung von BCR/ABL eine grundlegende Rolle und wird durch die N-terminale BCR-„coiled-coil“ Region vermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die „coiled-coil“ Domäne als Zielstruktur für einen molekularen Therapieansatz eignet.

Der Zusammenhang zwischen Oligomerisierung, d.h. der Fähigkeit Hochmolekulargewichtskomplexe (HMG-Komplexe) zu bilden, und Transformationspotential von BCR/ABL wurde mit Hilfe verschiedener Fusionskonstrukte untersucht, bei denen die Oligomerisierungsdomänen von Proteinen, die in Leukämie-assoziierten Fusionsproteinen involviert sind (BCR, PML, PLZF oder TEL) mit dem ABL-Teil von BCR/ABL fusioniert wurden (X-ABL).

Es konnte gezeigt werden, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Oligomerisierung der verschiedenen X-ABL Konstrukte bzw. BCR/ABL und ihres Transformationspotentials besteht. X-ABL Konstrukte, die schwere HMG-Komplexe bilden, zeigen ein hohes Transformationspotential, während X-ABL Konstrukte, die leichte HMG-Komplexe bilden, in

ihrem Transformationspotential abgeschwächt sind. Das spiegelt sich auch im Grad der Kinase-Aktivität der jeweiligen X-ABL Konstrukte und somit auch in deren unterschiedlicher Sensibilität gegenüber STI571 wider. Ba/F3-Zellen, die X-ABL Konstrukte exprimieren, die schwere HMG-Komplexe bilden, reagieren auf STI571 mit geringerer Sensibilität, als solche, die X-ABL Konstrukte exprimieren, die leichte HMG-Komplexe bilden. Außerdem wurde gezeigt, daß die gezielte Inhibierung der Oligomerisierung mit Hilfe der isolierten BCR-„coiled-coil“ Domäne, die mit BCR/ABL interagiert, das Transformationspotential von BCR/ABL massiv erniedrigt und gleichzeitig die Sensibilität BCR/ABL-transformierter Ba/F3 Zellen gegenüber STI571 stark erhöht.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Oligomerisierungsdomäne von BCR/ABL ein therapeutischer Angriffspunkt für die Behandlung Ph⁺ Leukämien darstellt, insbesondere in Hinsicht einer Erhöhung der Effektivität anderer „molekularer Therapeutika“ wie STI571.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Tumorzell-spezifische Mechanismus der As₂O₃-induzierten Apoptose bei Ph⁺ Zellen untersucht.

Seit den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts wird As₂O₃ erfolgreich bei der Behandlung von Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) eingesetzt, die durch die t(15;17) und dem dazugehörigen Translokationsprodukt PML/RAR α charakterisiert ist. Das Ansprechen von APL-Patienten auf As₂O₃ wird genetisch durch die t(15;17) und damit der Expression von PML/RAR α determiniert. Tatsächlich ist die Wirkung von As₂O₃ bei APL-Patienten Tumorzell-spezifisch: Es werden nur die Zellen durch As₂O₃ in Apoptose getrieben, die PML/RAR α exprimieren. Deshalb wird die gesunde Hämopoese nicht getroffen, und den Patienten bleibt die sonst für die Chemotherapie typische Aplasie-Phase erspart.

Aus Arbeiten um 1931 ist bekannt, daß As₂O₃ wirksam für die Behandlung der CML ist. Später konnte gezeigt werden, daß das Ansprechen von BCR/ABL-positiven Zellen auf As₂O₃ genetisch die Expression von BCR/ABL determiniert wird.

Kürzlich wurde gezeigt, daß aktiviertes RAS die Expression von endogenem PML hochreguliert. Ein Hauptsignalweg, über den BCR/ABL Zellen transformiert, führt zur konstitutiven Aktivierung von RAS. Bei der APL ist PML im Rahmen der t(15;17) durch die Fusion mit RAR α modifiziert. Die Behandlung mit As₂O₃ führt außerdem zur Modifikation von PML durch den „small ubiquitin like modifier“ (SUMO-1).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob sich die Gemeinsamkeiten zwischen Ph⁺ CML und ALL-Blasten und den t(15;17) positiven APL-Blasten in Hinsicht auf die Sensibilität für die As₂O₃-induzierte Apoptose auf die direkte oder indirekte Modifikation von PML durch die jeweiligen Translokationsprodukte zurückführen lassen. Daher wurde in

dieser Arbeit aufgeklärt, ob BCR/ABL durch Aktivierung des RAS-Signalweges die PML-Expression modifiziert und die As₂O₃-induzierte Apoptose Ph⁺ Zellen somit durch PML vermittelt wird.

Es konnte gezeigt werden, daß die quantitative Modifikation von PML durch seine Überexpression in U937-Zellen diese für die Apoptoseinduktion durch As₂O₃ sensibilisiert und daß die Expression von BCR/ABL in ABL-Kinase abhängiger Weise die Expression von PML beeinflusst. Eine konstitutiv aktive RAS Mutante (RAS^{V12}) hat einen ähnlichen Effekt auf die Expression von PML und auf die Sensibilität für die As₂O₃-induzierte Apoptose wie BCR/ABL.

Damit konnte PML als molekulare Ursache für die Sensibilität von Zellen für die As₂O₃-induzierte Apoptose identifiziert werden. Bei Translokationsprodukten, in die PML nicht direkt involviert ist, scheint die Aktivierung von RAS die Verbindung zu PML herzustellen.

An einem Mausmodell der BCR/ABL positiven Leukämie wurde die Wirkung von As₂O₃ auf die normale Hämopoese sowie auf die BCR/ABL-positive Leukämie überprüft. Anhand von regelmäßigen Blutbildern konnte gezeigt werden, daß As₂O₃ die normale Hämopoese nicht signifikant stört. Am Modell mit einer hohen Tumorbelastung konnte gezeigt werden, daß As₂O₃ zu einer Erniedrigung der BCR/ABL Expression in der Milz führt, ohne die Leukämie-Entwicklung signifikant zu verzögern. Bei niedriger Tumorbelastung führt die Behandlung mit As₂O₃ bei 25% der Tiere zu einer signifikanten Verbesserung des Blutbildes der leukämischen Mäuse, gepaart mit längerem Überleben im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Dabei ist As₂O₃ nur in der Lage, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen, ohne ihn jedoch zum Stillstand zu bringen.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß As₂O₃ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Tumorzell-spezifische Wirkung hat. Dabei muß es mit anderen Substanzen wie STI571 kombiniert werden, da es als Monotherapie nicht in der Lage ist, die Entwicklung einer BCR/ABL-positiven Leukämie zu verhindern.

Sowohl das therapeutische Angreifen an der Oligomerisierungsoberfläche von BCR/ABL als auch das Ausnützen der Modifikation von PML durch BCR/ABL eröffnen neue Möglichkeiten zur Behandlung von Ph⁺ Leukämien. Dies ist von besonderer Bedeutung angesichts der hohen Frequenz, mit der diese Leukämien Resistenz sowohl gegen konventionelle Chemotherapeutika als auch gegen molekulare Wirkstoffe entwickeln.

7 Literatur

- A** **Andreasson, P., B. Johansson, M. Carlsson, I. Jarlsfelt, T. Fioretos, F. Mitelman, and M. Hoglund**, *BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997. **20**(3): p. 299-304.
- B** **Begemann, M.**, *Praktische Hämatologie. Diagnose, Therapie, Methodik*. 11. Auflage ed. 1998, Stuttgart: Thieme Verlag.
- Bennett, J.M., D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H.R. Gralnick, and C. Sultan**, *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. *Br J Haematol*, 1982. **51**(2): p. 189-99.
- 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.
- Buchdunger, E., J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, B.J. Druker, and N.B. Lydon**, *Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative*. *Cancer Res*, 1996. **56**(1): p. 100-4.
- 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.
- Carroll, M., S. Ohno-Jones, S. Tamura, E. Buchdunger, J. Zimmermann, N.B. Lydon, D.G. Gilliland, and B.J. Druker**, *CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins*. *Blood*, 1997. **90**(12): p. 4947-52.
- Chelbi-Alix, M.K., L. Pelicano, F. Quignon, M.H. Koken, L. Venturini, M. Stadler, J. Pavlovic, L. Degos, and H. de The**, *Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells*. *Leukemia*, 1995. **9**(12): p. 2027-33.

- Chen, F., Y. Lu, Z. Zhang, V. Vallyathan, M. Ding, V. Castranova, and X. Shi,** *Opposite effect of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase on p53-independent GADD45 induction by arsenite.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11414-9.
- Chen, F., Z. Zhang, S.S. Leonard, and X. Shi,** *Contrasting roles of NF-kappaB and JNK in arsenite-induced p53-independent expression of GADD45alpha.* Oncogene, 2001. **20**(27): p. 3585-9.
- Chen, G.Q., J. Zhu, X.G. Shi, J.H. Ni, H.J. Zhong, G.Y. Si, X.L. Jin, W. Tang, X.S. Li, S.M. Xong, Z.X. Shen, G.L. Sun, J. Ma, P. Zhang, T.D. Zhang, C. Gazin, T. Naoe, S.J. Chen, Z.Y. Wang, and Z. Chen,** *In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins.* Blood, 1996. **88**(3): p. 1052-61.
- Chen, S.J., A. Zelent, J.H. Tong, H.Q. Yu, Z.Y. Wang, J. Derre, R. Berger, S. Waxman, and Z. Chen,** *Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia.* J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2260-7.
- Cross, N.C. and A. Reiter,** *Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases.* Leukemia, 2002. **16**(7): p. 1207-12. 2: Baxter EJ, et al. The t(4;22)(q12;q11) in atypi...[PMID:12023981]Related Articles, Links.
- D Daley, G.Q., R.A. Van Etten, P.K. Jackson, A. Bernards, and D. Baltimore,** *Nonmyristoylated Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(4): p. 1864-71.
- Degos, L.,** *All trans retinoic acid as a targeting drug for differentiation therapy in acute promyelocytic leukemia.* Cancer Treat Res, 1993. **64**: p. 1-13.
- Degos, L., H. Dombret, C. Chomienne, M.T. Daniel, J.M. Miclea, C. Chastang, S. Castaigne, and P. Fenaux,** *All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia [see comments].* Blood, 1995. **85**(10): p. 2643-53.
- 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.

- 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 El-Sabban, M.E., R. Nasr, G. Dbaibo, O. Hermine, N. Abboushi, F. Quignon, J.C. Ameisen, F. Bex, H. de The, and A. Bazarbachi**, *Arsenic-interferon-alpha-triggered apoptosis in HTLV-I transformed cells is associated with tax down-regulation and reversal of NF-kappa B activation*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2849-55.
- 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.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S.W. Lowe**, *PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence*. Genes, Dev 2000 Aug 15. **14**(16): p. 2015-27.
- Ferrara, F.F., F. Fazi, A. Bianchini, F. Padula, V. Gelmetti, S. Minucci, M. Mancini, P.G. Pelicci, F. Lo Coco, and C. Nervi**, *Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 2-7.
- Fogal, V., M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P.P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider, and G. Del Sal**, *Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform*. Embo J, 2000. **19**(22): p. 6185-95.
- Forkner, C. and T. Scott**, *Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia*. JAMA, 1931. **97**:3-5.
- Fox, J.G., Lynn C., Franklin ML. and Quimby FW.**, *Laboratory Animal Medicine*. 2 nd. ed. 2002, San Diego: Elsevier Science.
- Freund, M.**, *Thiemes Innere Medizin, Kapitel Hämatologie*. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- G 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.

- 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.
- Gianni, M., M.H. Koken, M.K. Chelbi-Alix, G. Benoit, M. Lanotte, Z. Chen, and H. de The**, *Combined arsenic and retinoic acid treatment enhances differentiation and apoptosis in arsenic-resistant NB4 cells*. *Blood*, 1998. **91**(11): p. 4300-10.
- Golub, T.R., A. Goga, G.F. Barker, D.E. Afar, J. McLaughlin, S.K. Bohlander, J.D. Rowley, O.N. Witte, and D.G. Gilliland**, *Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(8): p. 4107-16.
- Grignani, F., P.F. Ferrucci, U. Testa, G. Talamo, M. Fagioli, M. Alcalay, A. Mencarelli, C. Peschle, I. Nicoletti, and et al.**, *The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells*. *Cell*, 1993. **74**(3): p. 423-31.
- Grignani, F., V. Gelmetti, M. Fanelli, D. Rogaia, S. De Matteis, F.F. Ferrara, D. Bonci, C. Nervi, and P.G. Pelicci**, *Formation of PML/RAR alpha high molecular weight nuclear complexes through the PML coiled-coil region is essential for the PML/RAR alpha-mediated retinoic acid response*. *Oncogene*, 1999. **18**(46): p. 6313-21.
- Grignani, F., T. Kinsella, A. Mencarelli, M. Valtieri, D. Riganelli, L. Lanfrancone, 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.
- Grignani, F., U. Testa, D. Rogaia, P.F. Ferrucci, P. Samoggia, A. Pinto, D. Aldinucci, V. Gelmetti, M. Fagioli, M. Alcalay, J. Seeler, I. Nicoletti, C. Peschle, and P.G. Pelicci**, *Effects on differentiation by the promyelocytic leukemia PML/RARalpha protein depend on the fusion of the PML protein dimerization and RARalpha DNA binding domains*. *Embo J*, 1996. **15**(18): p. 4949-58.
- 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** **Hallmann, L.**, *Klinische Chemie und Mikrobiologie: ausgewählte Untersuchungsmethoden für das medizinisch-technische Laboratorium.* 11. Auflage ed. 1980, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- He, Y., J.A. Wertheim, L. Xu, J.P. Miller, F.G. Karnell, J.K. Choi, R. Ren, and W.S. Pear**, *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**(8): p. 2957-68.
- Hoelzer, D. and G. Seipelt**, *Leukämitherapie.* 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.
- Huang, M.E., Y.C. Ye, S.R. Chen, J.R. Chai, J.X. Lu, L. Zhao, L.J. Gu, and Z.Y. Wang**, *Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.* *Blood*, 1988. **72**(2): p. 567-72.
- 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** **Jensen, K., C. Shiels, and P.S. Freemont**, *PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif.* *Oncogene*, 2001. **20**(49): p. 7223-33.
- Jousset, C., C. Carron, A. Boureux, C.T. Quang, C. Oury, I. Dusanter-Fourt, M. Charon, J. Levin, O. Bernard, and J. Ghysdael**, *A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein.* *Embo J*, 1997. **16**(1): p. 69-82.
- K** **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.
- Koletzko, B.**, von *Harnack Kinderheilkunde*. 1999, Heidelberg: Springer-Verlag.
- 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, R.K., J.P. Cai, V. Deyev, P.S. Gill, L. Cabral, C. Wood, R.P. Agarwal, W. Xia, L.H. Boise, E. Podack, and W.J. Harrington, Jr.**, *Azidothymidine and interferon-alpha induce apoptosis in herpesvirus-associated lymphomas*. Cancer Res, 1999. **59**(21): p. 5514-20.
- 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.
- Lin, R.J. and R.M. Evans**, *Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 821-30.
- Lissauer**, *Zwei Fälle von Leucaemie*. Berliner klinische Wochenschrift, 1865. **2:403-404**.

- Look, A.T.**, *Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias*. Science, 1997. **278**(5340): p. 1059-64.
- 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 Mahieux, R., C. Pise-Masison, A. Gessain, J.N. Brady, R. Olivier, E. Perret, T. Misteli, and C. Nicot**, *Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1- and type 2-infected cells by a caspase-3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3762-9.
- 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.
- Maru, Y. and O.N. Witte**, *The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon*. Cell, 1991. **67**(3): p. 459-68.
- McNeil, S., A. Javed, K.S. Harrington, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. van Wijnen, and G.S. Stein**, *Leukemia-associated AML1/ETO (8;21) chromosomal translocation protein increases the cellular representation of PML bodies*. J, Cell Biochem 2000 Jul 19. **79**(1): p. 103-12.
- McWhirter, J.R., D.L. Galasso, and J.Y. Wang**, *A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7587-95.
- McWhirter, J.R. and J.Y. Wang**, *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias*. Embo J, 1993. **12**(4): p. 1533-46.
- Melnick, A. and J.D. Licht**, *Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3167-215.
- Miller, W.H., Jr., H.M. Schipper, J.S. Lee, J. Singer, and S. Waxman**, *Mechanisms of action of arsenic trioxide*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 3893-903.
- Minucci, S., M. Maccarana, M. Cioce, P. De Luca, V. Gelmetti, S. Segalla, L. Di Croce, S. Giavara, C. Matteucci, A. Gobbi, A. Bianchini, E. Colombo, I. Schiavoni, G. Badaracco, X. Hu, M.A. Lazar, N. Landsberger, C. Nervi, and P.G.**

- Pelicci**, *Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation*. Mol Cell, 2000. **5**(5): p. 811-20.
- Mitelman, F., G. Manolov, Y. Manolova, R. Billstrom, S. Heim, U. Kristoffersson, N. Mandahl, M.T. Ferro, and C. San Roman**, *High resolution chromosome analysis of constitutional and acquired t(15;17) maps c-erbA to subband 17q11.2*. Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi, 1986. **49**(4): p. 894-9.
- 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.
- Muller, S., M.J. Matunis, and A. Dejean**, *Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus*. Embo J, 1998. **17**(1): p. 61-70.
- O** **Oda, T., C. Heaney, J.R. Hagopian, K. Okuda, J.D. Griffin, and B.J. Druker**, *Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 22925-8.
- Okuda, K., E. Weisberg, D.G. Gilliland, and J.D. Griffin**, *ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571*. Blood, 2001. **97**(8): p. 2440-8.
- Ottmann, O.**, *Tyrosine-Kinase Inhibitors: From Bench to Bedside*. The Hematology Journal, 2000. **1**(Supplement 1 June): p. Abstract 209.
- 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** **Papadopoulos, P., S.A. Ridge, C.A. Boucher, C. Stocking, and L.M. Wiedemann**, *The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL*. Cancer Res, 1995. **55**(1): p. 34-8.
- Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P.P. Pandolfi, and P.G. Pelicci**, *PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras*. Nature, 2000. **406**(6792): p. 207-10.
- Pendergast, A.M., R. Clark, E.S. Kawasaki, F.P. McCormick, and O.N. Witte**, *Baculovirus expression of functional P210 BCR-ABL oncogene product*. Oncogene, 1989. **4**(6): p. 759-66.
- 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.
- Pendergast, A.M., L.A. Quilliam, L.D. Cripe, C.H. Bassing, Z. Dai, N. Li, A. Batzer, K.M. Rabun, C.J. Der, J. Schlessinger, and et al.,** *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein.* Cell, 1993. 75(1): p. 175-85.
- Perkins, C., C.N. Kim, G. Fang, and K.N. Bhalla,** *Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L).* Blood, 2000 Feb 1. 95(3): p. 1014-22.
- 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.
- Puccetti, E., B. Sennewald, F. Fosca-Ferrara, S. Boehrer, A. Bianchini, D. Hoelzer, O.G. Ottmann, C. Nervi, and M. Ruthardt,** *Down-stream regions of the POZ-domain influence the interaction of the t(11;17)-associated PLZF/RARalpha fusion protein with the histone-deacetylase recruiting co-repressor complex.* Hematol J, 2001. 2(6): p. 385-92.
- 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** **Quignon, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J.C. Ameisen, and H. de The,** *PML induces a novel caspase-independent death process [see comments].* Nat Genet, 1998. 20(3): p. 259-65.
- 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.
- Rego, E.M., L.Z. He, R.P. Warrell, Jr., Z.G. Wang, and P.P. Pandolfi,** *Retinoic acid (RA) and As2O3 treatment in transgenic models of acute promyelocytic leukemia (APL) unravel the distinct nature of the leukemogenic process induced by the PML-RARalpha and PLZF-RARalpha oncoproteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(18): p. 10173-8.

- 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.
- Ruthardt, M., A. Orleth, L. Tomassoni, E. Puccetti, D. Riganeli, M. Alcalay, R. Mannucci, I. Nicoletti, F. Grignani, M. Fagioli, and P.G. Pelicci**, *The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies*. Oncogene, 1998. **16**(15): p. 1945-53.
- Ruthardt, M., U. Testa, C. Nervi, P.F. Ferrucci, F. Grignani, E. Puccetti, C. Peschle, and P.G. Pelicci**, *Opposite effects of the acute promyelocytic leukemia PML-retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and PLZF-RAR alpha fusion proteins on retinoic acid signalling*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4859-69.
- S** **Sambrook, J. and D.W. Russel**, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sattler, M., R. Salgia, K. Okuda, N. Uemura, M.A. Durstin, E. Pisick, G. Xu, J.L. Li, K.V. Prasad, and J.D. Griffin**, *The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway*. Oncogene, 1996. **12**(4): p. 839-46.
- Schmid, I., C.H. Uittenbogaart, B. Keld, and J.V. Giorgi**, *A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **170**(2): p. 145-57.
- Schulten, H.**, *Lehrbuch der klinischen Hämatologie*. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1953.
- Schwaller, J., J. Frantsve, J. Aster, I.R. Williams, M.H. Tomasson, T.S. Ross, P. Peeters, L. Van Rompaey, R.A. Van Etten, R. Ilaria, Jr., P. Marynen, and D.G. Gilliland**, *Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes*. Embo J, 1998. **17**(18): p. 5321-33. 4: Lacronique V, et al. A TEL-JAK2 fusion protein wit...[PMID:9360930]Related Articles, Links.
- Sears, D.A.**, *History of the treatment of chronic myelocytic leukemia*. Am J Med Sci, 1988. **296**(2): p. 85-6.
- Secker-Walker, L.M., H.G. Prentice, J. Durrant, S. Richards, E. Hall, and G. Harrison**, *Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute*

- lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party [see comments]. Br J Haematol, 1997. 96(3): p. 611-3.*
- Seipelt, G. and D. Hoelzer**, *[Current aspects of therapy in chronic and acute leukemias]. Cancer Lett, 1995. 93(2): p. 193-200.*
- 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.*
- Shen, Z.X., G.Q. Chen, J.H. Ni, X.S. Li, S.M. Xiong, Q.Y. Qiu, J. Zhu, W. Tang, G.L. Sun, K.Q. Yang, Y. Chen, L. Zhou, Z.W. Fang, Y.T. Wang, J. Ma, P. Zhang, T.D. Zhang, S.J. Chen, Z. Chen, and Z.Y. Wang**, *Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. Blood, 1997. 89(9): p. 3354-60.*
- Smith, K.M. and R.A. Van Etten**, *Activation of c-Abl kinase activity and transformation by a chemical inducer of dimerization. J Biol Chem, 2001. 276(26): p. 24372-9.*
- Soignet, S.L., P. Maslak, Z.G. Wang, S. Jhanwar, E. Calleja, L.J. Dardashti, D. Corso, A. DeBlasio, J. Gabrilove, D.A. Scheinberg, P.P. Pandolfi, and R.P. Warrell, Jr.**, *Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide [see comments]. N Engl J Med, 1998. 339(19): p. 1341-8.*
- Stadler, M., M.K. Chelbi-Alix, M.H. Koken, L. Venturini, C. Lee, A. Saib, F. Quignon, L. Pelicano, M.C. Guillemin, C. Schindler, and et al.**, *Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. Oncogene, 1995. 11(12): p. 2565-73.*
- Sternsdorf, T., E. Puccetti, K. Jensen, D. Hoelzer, H. Will, O.G. Ottmann, and M. Ruthardt**, *PIC-1/SUMO-1-modified PML-retinoic acid receptor alpha mediates arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia. Mol Cell Biol, 1999. 19(7): p. 5170-8.*
- 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.*

- 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.
- Tauchi, T., S. Okabe, K. Miyazawa, and K. Ohyashiki**, *The tetramerization domain-independent Ras activation by BCR-ABL oncoprotein in hematopoietic cells*. Int J Oncol, 1998. **12**(6): p. 1269-76.
- V** **Valentiner, W.**, *Ein symptomatisch ausgezeichneter Fall von Leucaemie*. Berliner klinische Wochenschrift, 1865. **2**:320-321.
- 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.
- Van Etten, R.A., P.K. Jackson, D. Baltimore, M.C. Sanders, P.T. Matsudaira, and P.A. Janmey**, *The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity*. J Cell Biol, 1994. **124**(3): p. 325-40.
- Van Limbergen, H., H.B. Beverloo, E. van Drunen, A. Janssens, K. Hahlen, B. Poppe, N. Van Roy, P. Marynen, A. De Paepe, R. Slater, and F. Speleman**, *Molecular cytogenetic and clinical findings in ETV6/ABL1-positive leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **30**(3): p. 274-82.
- Villa, E., A. Grottola, P. Buttafoco, A. Colantoni, A. Bagni, I. Ferretti, C. Cremonini, H. Bertani, and F. Manenti**, *High doses of alpha-interferon are required in chronic hepatitis due to coinfection with hepatitis B virus and hepatitis C virus: long term results of a prospective randomized trial*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(10): p. 2973-7.
- Visani, G., G. Martinelli, P. Piccaluga, P. Tosi, M. Amabile, R. Pastano, M. Cavo, A. Isidori, and S. Tura**, *Alpha-interferon improves survival and remission duration in P-190BCR-ABL positive adult acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2000. **14**(1): p. 22-7.
- W** **Wadkins, R.M. and T.M. Jovin**, *Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA*. Biochemistry, 1991. **30**(39): p. 9469-78.
- Wang, Z.G., D. Ruggero, S. Ronchetti, S. Zhong, M. Gaboli, R. Rivi, and P.P. Pandolfi**, *PML is essential for multiple apoptotic pathways [see comments]*. Nat Genet, 1998. **20**(3): p. 266-72.

- Warrell, R.P., Jr., S.R. Frankel, W.H. Miller, Jr., D.A. Scheinberg, L.M. Itri, W.N. Hittelman, R. Vyas, M. Andreeff, A. Tafuri, A. Jakubowski, and et al.**, *Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid)*. N Engl J Med, 1991. **324**(20): p. 1385-93.
- 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.
- 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, 1996. **15**(7): p. 1583-95.
- 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.
- Wolff, N.C. and R.L. Ilaria, Jr.**, *Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myelogenous leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2808-16. 4: Roumiantsev S, et al. The src homology 2 domain of ...[PMID:11133737]Related Articles, Links.
- Wu, Y., G. Ma, D. Lu, F. Lin, H.J. Xu, J. Liu, and R.B. Arlinghaus**, *Bcr: a negative regulator of the Bcr-Abl oncoprotein*. Oncogene, 1999. **18**(31): p. 4416-24.
- Z Zhang, W., K. Ohnishi, K. Shigeno, S. Fujisawa, K. Naito, S. Nakamura, K. Takeshita, A. Takeshita, and R. Ohno**, *The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms*. Leukemia, 1998. **12**(9): p. 1383-91.
- Zhang, X., R. Subrahmanyam, R. Wong, A.W. Gross, and R. Ren**, *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**(3): p. 840-53.

Abkürzungen:

A	A	Ampère
	Abb.	Abbildung
	ABL	Abelson murine leukemia virus homology gene
	ALL	akute lymphatische Leukämie
	AML	akute myeloische Leukämie
	APL	akute Promyelozytenleukämie
	ARG	ABL related gene
	AS	Aminosäure
	As ₂ O ₃	Arsentrioxyd; Arsenit
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BCL-X	B-cell lymphoma gene X
	BCL-2	B-cell lymphoma gene 2
	BCC	BCR-coiled-coil Domäne
	BCR	breakpoint cluster region
	BFU	burst forming units
	bp	Basenpaare
	BrdU	Bromodeoxyuridine-Triphosphat (Br-dUTP)
	BSA	Bovine Serum Albumin
C	CD	Cluster of differentiation
	CDC2	cell division cycle 2
	CDK	cyclin-dependent kinase
	cDNA	copy DNA
	CFU	colony forming units
	CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
	CLL	chronisch lymphatische Leukämie
	cm	Zentimeter
	CML	chronisch myeloische Leukämie
	CSF	colony stimulating factors
	CTP	Cytidintriphosphat

D	d	Tag
	ddH ₂ O	deionisiertes destilliertes Wasser
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DTT	Dithiothreitol (Threo-1,4-Dimercapto-2,3-Butandiol)
E	E. coli	Escherichia coli
	EBV	Epstein-Barr-Virus
	ECL	enhanced chemiluminescence
	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
F	FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
	FACS	fluorescence activated cell sorting
	FAK	focal adhesion kinase
	FCS	fetal calf serum
	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Gal	Galactose
	GAP	GTP-ase activating protein
	G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
	GFP	Green fluorescent protein
	GEF	Guanin-nucleotid exchange factor
	GRB-2	growth factor receptor-bound protein 2
	GST	Glutathion-S-Transferase
	GTP	Guanosintriphosphat
	G418	Geneticin
Gy	Gray	
H	h	Stunde
	Hb	Hämoglobin
	HDAC	Histondeacetylase

	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
	HLH	Helix-loop-helix
	HMG	Hochmolekulargewicht
	HPLC	High performance liquid phase chromatography
I	IFN- α	Interferon
	IgG	Immunglobulin G
	IL-3	Interleukin-3
	IL-6	Interleukin-6
	IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
	IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
J	JAK-STAT	Janus kinase-signal transducers and activators of transcription
K	kb	Kilobasen
	kDa	Kilodalton
	KMT	Knochenmarktransplantation
L	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	M	Molarität
	M-BCR	Major Breakpoint von BCR
	m-BCR	Minor Breakpoint von BCR
	μ -BCR	dritter Breakpoint downstream von M-BCR
	μ F	Mikrofarad
	μ g	Mikrogramm
	MeV	Megaelektronenvolt
	MG	Molekulargewicht
	min	Minute
	ml	Milliliter
	μ l	Microliter
	μ M	micromolar
	MT-1	Metallothioninpromotor 1

N	NB	Nuclear body
	Neo	Neomycin-Resistenz
	NES	Nuclear export signal
	ng	Nanogramm
	NLS	Nuclear localisation signal
	nm	Nanometer
	nl	Nanoliter
O	OD	optische Dichte
	ORF	Open reading frame
P	Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
	PBS	phosphate-buffered saline
	PBSCT	peripheral blood stem cells transplantation
	PCC	PML-coiled-coil Domäne
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	PDGFβR	Platelet derived growth factor beta receptor
	PEG	Polyethylenglycol
	pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
	Ph ⁺	Philadelphia-Chromosom-positiv
	Ph ⁻	Philadelphia-Chromosom-negativ
	PI	Propidiumjodid
	PML	promyelocytic leukemia gene
	PMNC	periphere mononukleäre Zellen
	pmol	Picomol
	PLZF	Promyelocytic leukemia zincfinger gene
	POZ	Pockenvirus und Zinkfinger Domäne
	PY	Phosphotyrosin
	p185 ^(BCR-ABL)	185 kDa großes Fusionsprotein der t(9;22)
	p210 ^(BCR-ABL)	210 kDa großes Fusionsprotein der t(9;22)
R	RARα	retinoic acid receptor alpha
	RNA	Ribonukleinsäure

	rpm	Umdrehungen pro Minute
	RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
	RT	Reverse Transkriptase
S	Sca-1	Stem cell antigene 1
	SCF	Stem cell factor
	SDS	sodium dodecyl sulphate
	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
	sec	Sekunde
	SHC	SRC homology and collagen homology gene
	SOS	son of sevenless
	SUMO-1	Small ubiquitin like modifier-1
T	TBS	tris-buffered saline
	TBST	tris-buffered saline + Tween 20
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
	TGF β	tumor growth factor beta
	t-RA	all-trans Retinsäure
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan
	TTP	Thymidintriphosphat
	t(9;22)	Translokation von Chromosom 9 und 22
U	U	Unit
	UV	Ultraviolett
V	V	Volt
	v/v	volume per volume
W	w/v	weight per volume
	WBC	White blood cell count
	WT	Wildtyp
Z	ZK	Zellkultur
	ZNS	Zentrales Nervensystem

5	5-FU	5-Fluorouracil
7	7-AAD	7-Aminoactinomycin D

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Beißert, Tim Olav
Geburtsdatum	26. November 1970
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Wohnsitz	Kubigweg 9, 64380 Roßdorf

Ausbildung

1977-1981	Grundschule in Rheinfelden-Herten
1981-1991	Gymnasium Rheinfelden; Abschluß Abitur, Notendurchschnitt 1,7
1988-1989	Einjähriger Schüleraustausch mit Fecamp (F) nach der 11. Klasse
1992-1998	Studium der Biologie an der TU-Darmstadt mit Abschluß Diplom. Note: 1
1995-1996	Auslandsstudium an der Universität Bordeaux I (F)

Forschungsaktivitäten

Januar - Juli 1999	Diplomarbeit bei Prof. Dr. K. Nixdorff: „Untersuchungen zur Zytokinproduktion bei Lipopolysaccharid-stimulierten RAW-Makrophagen“
Seit September 1999	Doktorarbeit in der Med Klinik III/Abtlg. Hämatologie (Leiter Prof Dr. med. D. Hoelzer) der J. W. Goethe Universität Frankfurt bei Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz: "Molekulares Targeting des BCR/ABL-Translokationsprodukts als Therapieansatz für Philadelphia-Chromosom positive Leukämien "

Publikationen

Originalarbeiten

Schilling D., **Beissert T.**, Fenton MJ., and Nixdorff K. (2001). Negative regulation of IL-1beta production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS; Cytokine; 16(2):51-61

Puccetti E., Obradovic D., **Beissert T.**, Bianchini A., Washburn B., Chiaradonna F., Boehrer S., Hoelzer D., Ottmann OG., Pelicci PG., Nervi C., and Ruthardt M. (2002). AML-associated translocation products block vitamin D₃-induced differentiation by sequestering the Vitamin D₃-receptor; Cancer Res 62(23):7050-8

Beissert T.^{*)}, Puccetti E.^{*)}, Hoelzer D., Ottmann OG., Pelicci PG., Nervi C., and Ruthardt M. (2003). Leukemia-Associated Translocation Products Able to Activate RAS Modify PML and Render Cells Sensitive to Arsenic-Induced Apoptosis. Oncogene 22, 6900–6908

^{*)} Beide Autoren sind Erstautoren

Beissert T., Puccetti E., Bianchini A., Gueller S., Boehrer S., Hoelzer D., Ottmann OG., Nervi C., and Ruthardt M. (2003). Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface decreases the transformation potential of BCR/ABL and increases its sensitivity to STI571. Blood 102:2985-2993

Zheng X., **Beissert T.**, Kukoc-Zivojnov N., Puccetti E., Altschmied J., Strolz C., Boehrer S., Gul H., Schneider O., Ottmann OG, Hoelzer D.; Henschler R., and Ruthardt M. (2004). γ -catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. Blood First Edition Paper, prepublished online January 22, 2004.

Abstracts

Beissert T., Puccetti E., Gueller S., and Ruthardt M. (2000) Conference on Oncogenes And Growth Control; May 2000; EMBL Heidelberg

Beissert T., Puccetti E., Gueller S., Hoelzer D., Ottmann OG, and Ruthardt M. (2000) The Hematology Journal, Vol. 1, Suppl. 1, Abstract 274, EHA Birmingham

Beissert T., Hansen, M., Puccetti E., Hoelzer D., Ottmann OG, and Ruthardt M. (2000) Blood 90 Suppl. 1 Abstract 401

Beissert T., Puccetti E., Hoelzer D.; Ottman OG., and Ruthardt M. (2001) The Hematology Journal, Vol 1, Suppl. 1, Abstract 48; EHA Frankfurt

Puccetti E., **Beissert T.**, Sternsdorf T., Hoelzer D.; Ottmann OG., Will H., and Ruthardt M. (2001) The Hematology Journal, Vol 1, Suppl. 1, Abstract 364, EHA Frankfurt

Beissert T., Puccetti E., Hoelzer D., Ottmann OG, and Ruthardt M. (2001) Blood 98 Suppl. 1 Abstract 413

Puccetti E., Obradovic D., **Beissert T.**, Sennewald B., Hoelzer D., Ottmann OG, and Ruthardt, M. (2001) Blood 98 Suppl. 1, Abstract 415

Beissert T., Hoelzer D., Ottmann OG., and Ruthardt M. (2002) The Hematology Journal, Vol. 3, Supl. 1, EHA Florence

Beissert T., Bianchini A., Nervi C., Hoelzer D., Ottmann OG., and Ruthardt M. (2002) Blood Vol. 100, No 11, Abstract 2298

Gueller S., **Beissert T.**, Komor M., Schneider O., Henschler R., Hoelzer D., Ottmann OG., Hofmann WK, and Ruthardt M. (2002) Blood Vol. 100, No 11, Abstract 1211

Zheng X., Puccetti E., **Beissert T.**, Müller-Tidow C., Hoelzer D., Ottmann OG., Serve H., and Ruthardt M. (2002) Blood Vol. 100, No 11, Abstract 4334

Beissert T., Hoelzer D., Ottmann OG., and Ruthardt M. (2003) Proceedings of the AACR, Volume 44, Abstract 660.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Biologie zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Molekulares Targeting des BCR/ABL-Translokationsprodukts als Therapieansatz für Philadelphia-Chromosom positive Leukämien“

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik III, Abteilung Hämatologie des Universitätsklinikums Frankfurt bei Prof. Dr. Dieter Hoelzer und unter Leitung von Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz mit Unterstützung von Dr. habil. Martin Ruthardt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Biologischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit befindet sich bei den Publikationsorganen Oncogene und Blood im Druck.

Frankfurt, den 19.03.2004

Dipl. Biol. Tim Beißert