

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum für Innere Medizin
- Medizinische Klinik II -
(Hämatologie/Onkologie/Rheumatologie/Infektiologie)

**Die Rolle der Proteintyrosinphosphatase-1B bei der Resistenzentwicklung bcr-abl
positiver Zellen nach Behandlung mit Imatinib**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Sandhya Funk

aus Egelsbach

Frankfurt am Main, 2008

Dekan: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter

Referent: Priv. Doz. Dr. med. OG. Ottmann

Co-Referent: Prof. Dr. med. P. Bader

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen.....	vii
Tabellenverzeichnis	xi
Abbildungsverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Aspekte der chronischen myeloischen Leukämie	1
1.1.1 Das Philadelphia-Chromosom	4
1.1.2 Signaltransduktionswege der BCR-ABL- Tyrosinkinase	7
1.1.3 Therapieoptionen der CML.....	12
1.2 Wirkungsweisen und Indikation von Imatinib.....	16
1.2.1 Wirkung von Imatinib in BCR-ABL-induzierte Signaltransduktionswege.....	18
1.2.2 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Imatinib	19
1.3 Die Proteintyrosinphosphatasen.....	20
1.4 Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B	22
1.4.1 PTP1B und ihr Einfluss auf die Bcr-Abl-Kinase und deren Signalwege.....	24
1.5 Hypothese.....	25
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien	26
2.1.1 Instrumente.....	26
2.1.2 Fertige Kits.....	26
2.1.3 Allgemeine Chemikalien.....	27
2.1.4 Materialien zum Umgang mit Zellkulturen.....	28
2.1.5 Standard Puffer.....	30
2.1.6 Mikrobiologische Materialien	30
2.1.7 Antikörper	31
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen.....	33
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	37
2.2.3 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot.....	58
2.2.4 Nachweis der Differenzierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	62
2.2.5 Nachweis der Differenzierung von Zellen mittels Zytospins	65
2.2.6 Bestimmung der in vitro Phosphataseaktivität.....	66
2.2.7 Statistische Analyse	67
3 Ergebnisse	68
3.1 Vergleich von PTP1B-Mutanten in BCR-ABL positiven Zellen	68
3.1.1 Vergleich der PTP1B-Aktivität zwischen DN, Mock und FL	69
3.1.2 Einfluss der PTP1B auf BCR-ABL induzierte Transduktionswege	70
3.1.3 Wachstums- und Viabilitätsverhalten unter Serumentzug im Vergleich.....	74
3.1.4 Morphologische Unterschiede der DN-Zellen versus FL-/Mock-Zellen.....	76
3.2 Einfluss von PTP1B auf die DN-Mutanten und die aktiven Formen nach Behandlung mit Imatinib	78
3.2.1 Unterschiede des Wachstumsverhalten unter STI571 im Vergleich.....	78
3.2.2 Apoptoseverhalten unter STI571 im Vergleich	81
3.2.3 Apoptoseverhalten nach Gabe eines selektiven PTP1B-Inhibitors.....	84
3.2.4 STI571-induzierte morphologische Unterschiede im Vergleich.....	86
3.2.5 Veränderungen der Phosphotyrosin Proteine unter STI571 im Vergleich.....	89
3.3 Phosphataseaktivität in einer STI571-resistenten SupB15-Sublinie.....	93

4	Diskussion.....	95
4.1	Kein Wachstumsarrest in STI571-behandelten PTP1B-Mangelmutanten.....	96
4.2	Keine STI571-vermittelte Apoptose in PTP1B-Mangelmutanten	96
4.3	Differenzierungsstopp in STI571-behandelten PTP1B-Mangelmutanten	98
4.4	Einfluss der PTP1B auf die BCR-ABL-Signaltransduktion unter STI571- Behandlung.....	100
4.4.1	Persistierendes Wachstumsverhalten durch P-STAT5 bei Mangel an funktionstüchtiger PTP1B unter STI571	100
4.4.2	Keine Reaktivierung der P-ERK nach STI571-Behandlung bei Zellen mit inaktiver PTP1B	102
4.4.3	Die mögliche Rolle der Dok-Proteine und des Grb2 in der PTP1B- Signaltransduktion.....	103
4.5	Schlussfolgerung	105
5	Zusammenfassung.....	107
6	Abstract	109
7	Literaturverzeichnis.....	111
8	Danksagung.....	119
9	Lebenslauf	120
10	Schriftliche Erklärung	122

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb	Abbildung
abl	vom Abelson-Virus stammendes Gen
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARA-C	Cytarabin
Asp	Aspartat
Asn	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr	Breakpoint cluster region
bcr-abl	Fusionsgen nach reziproker Rekombination der langen Arme der Chromosomen 9 und 22
BCR-ABL	Protein, welches dem Translationsprodukt des bcr-abl-Gens entspricht
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
Ccr	complete cytogenetic remission
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CGP57148B	primärer Studienname für STI571
Caspase	cysteiny aspartic acid proteases
cDNA	copy Desoxynucleic Acid
CFU	colony forming unit
cm	Zentimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CRKL	crk like protein
DEAE	Diethylaminoethanol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddNTP	Didesoxy-Nucleosidtriphosphat
DN	dominant-negativ Mutante
D 181Ala	dominant-negative Mutante mit Austausch der 181 Aspartat gegen Alanin
D 221Lys	dominant-negative Mutante mit Austausch der 221 Arginin gegen Lysin
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMHV	bis-(N,N-Dimethylhydroxamido)hydroxovanadat
DNS	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAse	Desoxyribonuklease
DOK	docking protein of tyrosine kinase
ECL	enhanced chemiluminescence
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor

Epo	Erythropoetin
ERK	extracellular signalregulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluorescence in situ Hybridisierung
FITC	Gluoreszeinisothiozyanat
FL	Full length; aktive Form der PTP1B
FSC	forward angle light scatter
G	Guanin
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
Gln	Glutaminsäure
Gly A	Glycophorin A
GST	Glutathion-S-Transferase
GM-CSF	Granulocytes/Macrophages stimulating colony stimulating factor
GRB2	growth factor receptor bound protein 2
GVHD	graft versus host disease
GVL	graft versus leukemia
h	Stunden
HLA	human leukocyte antigen
5-HU	5-Hydroxyurea
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IR	insulin receptor
JNK	c-Jun NH2 terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KMT	Knochenmarktransplantation
KV	KiloVolt
L	Liter
M	Molar
mA	Milli-Ampère
MAPK	mitogen activated protein kinase
Mdr	multi drug resistance
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEK	MAPK/Erk-Kinase
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-Ribonucleic Acid
n	Nano
NK	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
p	Pico
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
p130 ^{cas}	CRK associated substrate
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	platelet derived growth factor

PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming unit
Pgp	Polyglykoprotein
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI-3K	Phosphatidylinositolkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase-Chain-Reaction
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SSC	side angle light scatter
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sek.	Sekunden
SH 1, 2 und 3	Src-Homologiedomäne 1, 2 und 3
Stat	signal transducer and activator of transcription
STI571	signaltransduction inhibitor 571, Imatinib
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thymidin
TEMED	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tm	Schmelztemperatur
Tyr	Tyrosin
tRNA	Translational Ribonucleic Acid
U	Unit
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v	Volumen
W	Watt
Wb	Western Blot
WT	Wildtyp
w	Gewicht
ZZ	Zellzahl

Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren

A Alanin
Y Tyrosin
B Asparagin oder Asparaginsäure
C Cystein
D Asparaginsäure
E Glutaminsäure
F Phenylalanin
G Glycin
H Histidin
I Isoleucin
K Lysin
L Leucin
M Methionin
N Asparagin
P Prolin
Q Glutamin
R Arginin
S Serin
T Threonin
V Valin
Z Glutamin oder Glutaminsäure

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Diagnostische Merkmale in Stadienabhängigkeit [7, 107]	2
Tabelle 2 Klinische Verlaufparameter zur Evaluation einer Wirksamkeit der Therapie [3] .	13
Tabelle 3 Definition Therapieversagen, suboptimales Ansprechen und Warnzeichen nach Behandlung mit Imatinib während der chronischen Phase der CML	14
Tabelle 4 Primäre Antikörper zur Anwendung für Western Blots.....	31
Tabelle 5 Sekundäre Antikörper zur Anwendung von Western Blots	32
Tabelle 6 Pipettierschema zum Auftauen DMSO-haltiger Zellen	36
Tabelle 7 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration.....	39
Tabelle 8 Pipettierschema zur reversen Transkription.....	40
Tabelle 9 Einzelne Komponenten des QIAprep Spin Miniprep Kits.....	42
Tabelle 10 Komponenten des NucleoBond [®] PC 500 Kits	44
Tabelle 11 Reaktionsablauf im Thermocycler bei Verwendung von Taq-/Pfu-Polymerase...	47
Tabelle 12 Trennbereiche für lineare DNA-Fragmente in Agarosegelen	49
Tabelle 13 Zusammensetzung des Lysepuffers.....	58
Tabelle 14 Standardreihe zur Proteinbestimmung	59
Tabelle 15 Phosphataseaktivität verschiedener PTP1B- Mutanten nach Punktmutation [40].	69
Tabelle 16 Wachstumsverhalten unter STI571-Stimulation im Vergleich	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das Philadelphia-Chromosom.....	4
Abbildung 2 Aufbau des ABL-Proteins	5
Abbildung 3 Aufbau des BCR-Proteins	6
Abbildung 4 Die Signaltransduktionswege der Bcr-Abl-Tyrosinkinase.....	11
Abbildung 5 Prinzip der U.S.E. („unique site elimination“) Mutagenese.....	57
Abbildung 6 Aufbau der Zytospin-Apparatur	66
Abbildung 7 Phosphataseaktivität im Vergleich	70
Abbildung 8 Anti-PTP1B im Vergleich	71
Abbildung 9 Anti-P-Tyrosine im Vergleich.....	72
Abbildung 10 Zielproteine der BCR-ABL im Vergleich	73
Abbildung 11 Wachstumsverhalten unter Serumentzug im Vergleich	74
Abbildung 12 Viabilitätsverhalten unter Serumentzug im Vergleich	75
Abbildung 13 CD11b-/GlyA-Expression im Vergleich	76
Abbildung 14 Morphologische Unterschiede zwischen den FL- und den DN-Zellen ...	77
Abbildung 15 Wachstumsverhalten nach STI571-Behandlung im Vergleich	79
Abbildung 16 Apoptoseverhalten im Vergleich.....	82
Abbildung 17 Signaltransduktionsweg der Apoptose	83
Abbildung 18 Durch Western Blot analysiertes Apoptoseverhalten unter STI571.....	84
Abbildung 19 Apoptoseverhalten nach Inhibition der PTP1B unter STI571-Stimulation	85
Abbildung 20 Differenzierungsverhalten unter STI571-Behandlung im Vergleich	86
Abbildung 21 Morphologische Unterschiede nach STI571-Stimulation	88
Abbildung 22 Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine nach STI571-Exposition	90
Abbildung 23 Phosphotyrosin-Proteine nach Inkubation mit und ohne STI571	92
Abbildung 24 SupB15-RT und -WT-Zellen im Vergleich.....	93
Abbildung 25 Phosphataseaktivität der SupB15-WT und der RT-Zellen.....	94

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Aspekte der chronischen myeloischen Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie zählt zu den myeloproliferativen Erkrankungen und umfasst 20% aller Leukämien im Erwachsenenalter. Merkmal dieser Erkrankung ist der Befall von Blut, Knochenmark und anderen Geweben mit neoplastischen Zellen der myeloischen Zellreihe [7, 107]. Pathogenetisch grundlegend für die Leukämie der CML ist das von Nowell und Hungerford 1960 entdeckte Philadelphia-Chromosom [92]. Es findet sich bei nahezu allen Patienten mit CML und kodiert für eine deregulierte Tyrosinkinase, dem Protein BCR-ABL (siehe auch 1.1.1 und 1.1.2). Die Ätiologie ist nur ungenügend geklärt, radioaktive Strahlen werden u.a. als auslösende Faktoren vermutet [7, 107]. Mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt nach 4 Jahren bei einer Inzidenz von ca. 2/100.000 Einwohner in der BRD (schätzungsweise 1692 Fälle/Jahr), Männer scheinen 1,6mal häufiger betroffen zu sein als Frauen. Der Altersgipfel befindet sich zwischen dem 5. und 6. Lebensjahrzehnt [46].

Die Klinik ist gekennzeichnet durch einen triphasischen Verlauf. Die chronische Phase mündet dabei über eine Akzeleration in eine Blastentransformation, welche mit einer sekundären akuten Leukämie vergleichbar ist [7, 107]. Die chronische Phase dauert im Durchschnitt 4 Jahre, der Patient ist häufig oligosymptomatisch. Während dieser Phase kommt es zu einer myeloiden Hyperplasie mit massiver Ausschwemmung ausreifender, funktionstüchtiger granulozytärer Zellen. Im peripheren Blut zeigt sich infolgedessen eine pathologische Linksverschiebung mit Nachweis des gesamten Spektrums der myeloopoetischen Zellreihe. Diese führen über eine Infiltration insbesondere der Leber und Milz zu einer Organomegalie. Die Akzeleration dauert wenige Monate und zeichnet sich durch eine rasche Verdopplungszeit der Leukozytenzahl aus. Die mediane Überlebenszeit des nachfolgenden Blastenschubes beträgt nur wenige Monate und ist prognostisch infolge ihrer Therapierefraktarität schlecht [46]. Während der Blastentransformation kommt es zu einem Differenzierungsstopp mit einer

nachweisbaren Blastenzunahme im peripheren Blut. Zytogenetisch kommt es zu einer DNA-Instabilität mit konsekutiver Entstehung multipler Chromosomenaberrationen (z. B. Trisomie 18, Ras-Mutationen, verändertes Myc-Gen, usw.), welche durch Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege hämatopoetischer Wachstumsfaktoren zu der oben bereits aufgeführten myeloiden Hyperplasie führen [119].

Die nachfolgende Tabelle fasst die jeweiligen Blutbild- bzw. Knochenmarkveränderungen in den entsprechenden Phasen zusammen.

Blutbild-/Knochenmarkveränderungen		
Stadien	Peripheres Blut	Knochenmark
Chronische Phase	Leukozytose Linksverschiebung Blastenanteil < 5% Thrombozytose Verminderte alkalische Leukozytenphosphatase	Gesteigerte Zellularität Myeloid/Erythroid-Ratio 25: 1 (normal 2:1) Gesteigerte Megakaryopoese evtl. . Fibrose
Akzeleration	Blastenanteil 5-20% Basophilenanteil > 20% Thrombozyten < 100.000/ μ l	
Blastenschub	Blasten >20% Hyposegmentierte Neutrophile	Blasten/Promyelozyten im Knochenmark/Blut > 30%

Tabelle 1 Diagnostische Merkmale in Stadienabhängigkeit [7, 107]

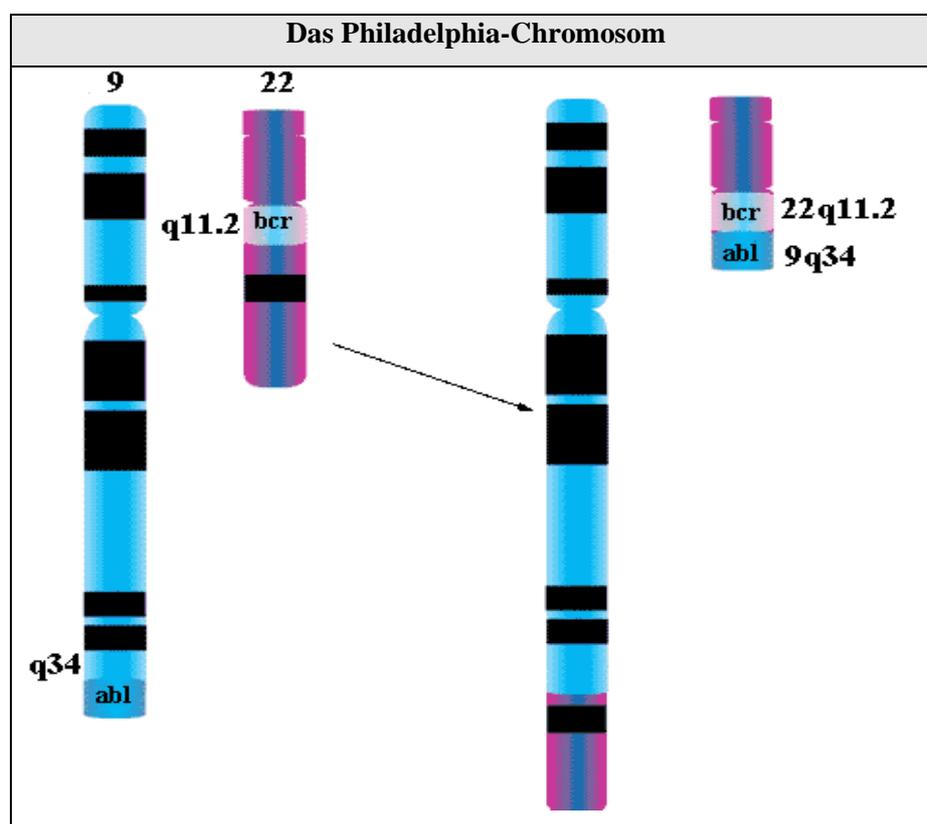
Zur Prognosebeurteilung und damit Festlegung des Therapiekonzeptes eignen sich verschiedene Scores, welche aus multivariaten Analysen hervorgegangen sind. Zu den bekanntesten zählt hierbei der Sokal-Index [114]. Hierfür entscheidende Parameter sind die Anzahl der zirkulierenden Blasten und Thrombozyten, die Milzgröße und das Alter.

Von pathophysiologisch essenzieller Bedeutung und geradezu pathognomonisch für den genetischen Zusammenhang zur Entstehung maligner Erkrankungen ist der

Nachweis des Philadelphia-Chromosoms, ein Genprodukt einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 [92]. Dies entspricht einer Fusion des bcr- Gens, welches auf dem Chromosom 22q11 lokalisiert ist, mit dem abl-Gen des Chromosoms 9q34. Das Ergebnis dieser Translokation kodiert für eine deregulierte Tyrosinkinase, welche die hämatopoetischen Vorläuferzellen maligne transformiert und zum Phänotyp der CML führt. Folgerichtig stellt das Philadelphia-Chromosom eines der wichtigsten Kriterien bei der Diagnosestellung der CML dar [119]. Mittels PCR bzw. Southern Blot und FISH-Analysen erfolgt sein Nachweis und wird oft auch unter einer laufenden Therapie als Verlaufsparemeter genutzt [7]. Auf die Bedeutung des Philadelphia-Chromosoms und dessen Genprodukt wird nun im Folgenden eingegangen.

1.1.1 Das Philadelphia-Chromosom

Wie bereits erwähnt ist das Philadelphia-Chromosom pathognomonisch für die chronisch myeloische Leukämie und stellt eine reziproke Rekombination zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 dar [92]. Resultat ist ein verkürztes Chromosom 22 ($22q^-$, das eigentliche Philadelphia-Chromosom) und ein elongiertes Chromosom 9 ($9q^+$). Das Philadelphia-Chromosom lässt sich in etwa 95% der CML-Patienten, in 15-30% der ALL bei Erwachsenen, in 5% der ALL bei Kindern und selten bei AML- bzw. Plasmozytompatienten nachweisen. Die sogenannte Philadelphia-Chromosom negative CML ist möglicherweise biologisch eine andere Erkrankung (siehe unten) [119].



Aus einer reziproken Translokation geht ein elongiertes Chromosom 9 und ein verkürztes Chromosom 22, das Philadelphia Chromosom hervor. Quelle: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cancer_Research/Key_Resources

Abbildung 1 Das Philadelphia-Chromosom

Das c-abl-Gen

Das c-abl-Gen ist lokalisiert auf Chromosom 9; es stammt vom Abelson-Virus, welches das humane Homolog des viralen Onkogens v-abl beinhaltet und Leukämien in Mäusen induzieren kann [1]. Das Gen enthält zwei alternative Exons 1a und 1b sowie die gemeinsamen Exons 2-11. Zwischen Exon 1a und b liegt ein langes Intron (umfasst 200kb). Im Rahmen des alternativen Splicings können infolgedessen zwei unterschiedlich große Isoformen (Ia und Ib) entstehen, die entweder im Kern (Ia) oder zytoplasmatisch (Ib) lokalisiert sind [123]. Das Genprodukt von c-abl kodiert für eine Non-Rezeptortyrosinkinase, die ubiquitär exprimiert wird (u.a. Milz, Thymus, Testis) und etwa (je nach posttranslationaler Modifikation) 145 kDa groß ist. Das Protein beinhaltet dabei an seinem Amino-Ende eine SRC-Homologiedomäne 3 (SH3), welche für eine Protein-Protein-Interaktion notwendig ist. Flankiert wird diese durch die SH2-Domäne, diese umfasst eine Bindestelle für Phosphotyrosine und vernetzt so verschiedene Proteine. Weiter in Richtung des Carboxyendes befindet sich die eigentliche Tyrosinkinase, der SH1-Domäne entsprechend, die eine zentrale Rolle bei Zielproteinen wie DOK und CRKL spielt. Daneben gibt es weitere funktionelle Einheiten wie z. B. die prolinreichen ABL-Bindestellen ab1-3, welche in der Lage sind SH3-Proteine zu binden [83].

NH2	SH3	SH2	SH1	ab1	ab2	NLS	DNA-Bi.*	ab3	Actin-Bi.*	COOH
*Bindestelle										

Abbildung 2 Aufbau des ABL-Proteins

Die Aktivität der nukleären c-Abl-Kinase ist streng reguliert, so dass selbst eine Überexpression zu keiner malignen Transformation führt [104]. Während der G0-Phase ist das sogenannte Retinoblastom Protein (Rb) an der DNA gebunden, dieses inhibiert die c-Abl-Kinase. Während des Überganges von der G1- in die S-Phase dissoziiert das Retinoblastom-Protein von der c-ABL-Kinase, so dass diese aktiviert wird. Die aktive Tyrosinkinase kann dann die Transkription durch RNA-Phosphorylierung modulieren. Da die c-Abl-Kinase mit verschiedenen nukleären Proteinen reagiert, welche an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, wird eine modulatorische Funktion im Rahmen der Regulation des Zellzyklus angenommen [104].

Die Aufgabe der zytoplasmatischen c-Abl-Kinase ist weitestgehend unklar, zumindest wurde eine Interaktion sowohl mit dem filamentösem als auch dem monomeren Aktin nachgewiesen [78].

Das Bcr-Gen

Das Bcr-Gen (breakpoint cluster region) wurde erstmals im Rahmen der bcr-abl identifiziert und auf dem langen Arm des Chromosoms 22 lokalisiert [49]. Es ist 135 kb groß, umfasst 23 Exons und wird in ein 160 kDa großes Protein übersetzt. In humanen Zellen wurden 83-190 kDa große Proteine nachgewiesen, wobei deren Funktion noch unklar ist. Das Protein beinhaltet am Amino-Ende eine Domäne, welche an einer coiled-coil-Oligomerisierung des Bcr-Proteins beteiligt ist. Daneben befindet sich die Bindestelle für die SH2-Domäne der c-Abl, welche flankiert wird durch die eigentliche Funktionseinheit des Bcr-Proteins, einer einzelnen Serin/Threoninkinase. Eine angrenzende Rho-GEF-Domäne spielt bei der Aktivierung der MAPK (p38) eine Rolle, welche, bis auf wenige Ausnahmen, antiapoptotisch wirken soll. Weitere Domänen sind CaLB und die Rac-GAP, deren Funktionsweise nicht ganz geklärt ist [119]. Von Bedeutung ist noch ein an Position 177 des Exons 23 gelegenes Tyrosin, welches für die Bindung des Adaptormoleküls Grb2 und zur Aktivierung des Ras-Signaltransduktionsweg erforderlich ist [80]. Das Protein ist im Zytoplasma lokalisiert und wird ubiquitär exprimiert. Da sich während der Mitose das Bcr perichromosomal befindet, wird eine Rolle in der Zellzyklusregulation vermutet.

NH2	DD	SH2-Bi.*	Ser/Threo-Kinase	Rho-GEF	CaLb	Rac-GAP	COOH
-----	----	----------	------------------	---------	------	---------	------

*Bindestelle

Abbildung 3 Aufbau des BCR-Proteins

Das bcr-abl-Fusionsgen

Die Translokation kann an verschiedenen Bruchpunkten stattfinden. Die Bruchpunkte des Bcr-Gens werden in drei Regionen, nämlich minor-, major und μ - bcr, unterteilt. Entsprechend ergeben sich bei der Translokation mehrere Formationen des Bcr-abl-Gens [71, 111]. In der Mehrzahl der CML-Patienten lassen sich Fusionen zwischen den

Exons b2 oder b3 im Bereich des Major-Bcr-Gens und den Exon a2 des Abl-Gens nachweisen. Das Produkt beider Möglichkeiten kodiert für ein 210 kDa großes Protein, welches fast alle chronischen myeloischen Leukämien dominiert. Seltener findet sich die Kombination b3a3 bzw. e1a3, dabei kommt es zur Formation einer neuen SH3-Domäne, deren Leukämiepotenzial infolge einer gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität besonders hoch ist. Kodiert wird dabei ein etwa 190kDa großes Protein, und dies ist beinahe ausschließlich mit dem klinischen Bild einer ALL assoziiert [35]. Ein Bruchpunkt im Bereich des minor-Bcr-Gens wird nach Fusion in ein p190-Protein übersetzt und lässt sich häufig bei der ALL, selten auch bei der CML nachweisen. Daneben sind einige Fälle einer neutrophilen CML beschrieben wurden, dessen 230kDa schwere Tyrosinkinase aus einem Bruchpunkt im Bereich des μ -Bcr-Gens (e19=c3) und a2 hervorgegangen ist [125]. Darüber hinaus wurde auch ein e1a2-Hybridgen beschrieben, welches für eine p185-bcr-abl kodiert und vornehmlich in der ALL identifiziert wurde. Die reziproke Translokation eines Abl-Bcr-Gens kommt in 60% der CML vor und in acht von neun ALL-Formen und scheint mit dem Ansprechen auf eine Interferontherapie korreliert zu sein [129].

1.1.2 Signaltransduktionswege der BCR-ABL- Tyrosinkinase

Die deregulierte und hochaktive Tyrosinkinase induziert eine Vielzahl von intrazellulären Signaltransduktionswegen [85]. Konsequenz ist eine Veränderung des biologischen Verhaltens der Zelle, die das klinische Bild der CML prägt. Die durch BCR-ABL induzierte neoplastische Transformation äußert sich in einem veränderten Apoptose- und Differenzierungsverhalten neben einer Störung der Adhäsion [28]. Folge sind im peripheren Blut nachweisbare Vorläuferzellen, die zugleich das Knochenmark überwuchern, destruieren und das klinische Beschwerdebild (Anämie) verursachen. Von bedeutender Rolle sind drei Signaltransduktionswege. Sie werden mithilfe der konstitutiv aktiven BCR-ABL-Kinase durch Phosphorylierung aktiviert. Hierzu zählt die Aktivierung des Ras- [97], der PI-3K- [113] und des STAT5-Signalweges [10, 26, 62, 67, 112]. Dennoch sollte zugleich erwähnt werden, dass weitaus mehr solcher Signalwege vorhanden sind, deren Komplexität durch „Crosstalk“ erheblich gesteigert wird [119].

Die Aktivierung der RAS-Kaskade erfolgt durch die BCR-ABL-Kinase, nach deren Autophosphorylierung an Position Y177 Bindestellen für Adapterproteine wie das GRB2 freigelegt werden [80, 97]. Mutationen der Y177 verhindern eine Bindung des GRB2 an BCR-ABL. Zwar können diese Mutanten nicht mehr Fibroblasten transformieren, doch bleibt die Tumorinduktion durch Transformation der Knochenmarkszellen noch erhalten [97]. Der BCR-ABL-GRB2-Komplex rekrutiert Sos, einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, an die Plasmamembran und aktiviert dann Ras. Dieses zählt zur Familie der GTPasen mit einem Molekulargewicht von 21kDa. Das aktive RAS-Protein induziert die MAPK-Signaltransduktion und führt auf diese Weise zur Transformation der hämatopoetischen Zellen.

Die MAP-Kinase (mitogen activated protein kinase) ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche wichtige intrazelluläre Signalwege, u.a. Transkription, Apoptose und maligne Transformationen, induziert durch die BCR-ABL-Kinase, in die Wege leitet [64]. Zu den drei Hauptgruppen zählt die p38, die extrazelluläre signalregulierende Kinase ERK und die JNK (c-Jun NH2 terminalen Kinasen) [13]. Für die Aktivierung der MAPK sind weitere Kinasen notwendig, zu ihnen zählen u.a. Erythropoetin, GM-CSF, Interleukin 3, auch Interferon alpha spielt hierbei eine wichtige Rolle [98]. Am besten untersucht ist der RAF/MEK/Erk- Signalweg [51]. BCR-ABL-abhängig erfolgt die Aktivierung von RAS, danach die von RAF und in deren Anschluss die der MEK1/2 (ERK-Kinase). Diese führt durch ihre Funktion als „dual specificity kinase“ zur Phosphorylierung des Threonin und Tyrosins der ERK1/2. Endpunkt ist die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Elk-1) [105, 128]. Folge ist ein gesteigertes Wachstum und eine Inhibition der Apoptose. Die ERK soll dabei synergistisch mit Bcl 2 [14], einem antiapoptotischen wirkendem Protein, wirken.

Dem gegenüber steht die p38. Diese kann nicht nur direkt durch die BCR-ABL-Kinase, sondern auch von der Rho-GEF-Domäne des Bcr-Gens aktiviert werden und ihrerseits die Aktivierung von NFκB, welches ebenfalls antiapoptotisch wirkt, herbeiführen [13].

Die üblicherweise durch Stress aktivierte JNK (auch stressaktivierte Proteinkinase, kurz SAPK, genannt) wird analog zur ERK-Signaltransduktion durch BCR-ABL-Kinase

aktiviertes RAS rekrutiert und phosphoryliert im Zellkern den Transkriptionsfaktor c-Jun mit einer der ERK-vergleichbaren Konsequenz, nämlich einer wachstumsfaktorenunabhängigen Zellvermehrung [19, 130].

Auch die Phosphatidylinositolkinase (kurz: PI-3K) wird über Adapterproteine (SHC, dem Protoonkogen c-CBL, c-CRKL und CRKL) von der BCR-ABL-Kinase aktiviert [113, 124, 127]. Folge ist eine Phosphorylierung der Phosphatidylinositol-Lipide, welche nicht nur ein Teil der Membranlipide darstellen, sondern auch in der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Sie führen zu einer Aktivierung der PDK1-Kinase und ihrerseits die der Serin-Threoninkinase c-Akt/Proteinkinase B [124]. Beide Proteine haben sich in der Bcr-Abl induzierten Leukämogenese als notwendig herausgestellt, da sie das Signalprotein Bad regulieren [113]. Bad ist wiederum im unphosphorylierten Zustand an die antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 gebunden. Bei einer c-Akt/PKB induzierten Phosphorylierung von Bad wird diese Bindung inhibiert und Bcl-X_L bzw. Bcl-2 kommen ihrer Wirkung als antiapoptotischen Proteine nach [88].

Der Transkriptionsfaktor STAT5 spielt eine essenzielle Rolle in der malignen Transformation BCR-ABL-positiver Zellen. Dies zeigte die von Hoelbl et. al veröffentlichte Studie, in welcher das absolute Fehlen von STAT5 zu einer Resistenz gegen eine BCR-ABL induzierte Leukämie führt [58]. Man findet in Bcr-Abl exprimierenden Zellen STAT5 vermehrt phosphoryliert als Zeichen ihrer gesteigerten Aktivität. Diese migrieren nach ihrer Aktivierung zum Nukleus und verändern hier die Genexpression zugunsten einer malignen Transformation [44].

Neben diesen für eine neoplastische Transformation essenziellen Signaltransduktionswegen spielen einige durch die aktive BCR-ABL-Kinase konstitutiv phosphorylierten Proteine noch eine bedeutende Rolle. Hierunter zählen das SH2- und SH3-Domäne beinhaltende Adapterprotein CRKL [94, 118], die Ubiquitinligase c-Cbl [2], das Zytoskelett- assoziierte Paxillin [101] und das multidocking Protein p130Cas [102].

P130Cas zusammen mit der CRKL und Paxillin scheinen an der Integrinrezeptorabhängigen Signaltransduktion beteiligt zu sein und ist wahrscheinlich

durch Interaktion mit der Tyrosinkinase BCR-ABL in die Zytoskelettsignaltransduktion und im Adhäsionsverhalten der CML-Zellen involviert [96]. Augenscheinlich ist darüber hinaus ein phosphoryliertes 62kDa großes Protein (dok-1), deren Funktion in der CML noch unklar ist [11].

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass das transformierende Potenzial der BCR-ABL zum einen auf die zytoplasmatische Lokalisation und zum anderen auf eine Dimerisierung mit anschließender Aktivierung der essenziellen SH1-Domäne zurückzuführen ist. Die Folge ist eine Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege [18]. Diese verändern die Zellfunktion und führen zum leukämischen Phänotyp [34]. Das abnorme Wachstumsverhalten ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Proliferation, welche wachstumsfaktorenunabhängig ist. Die Hauptursache für die Zellexpansion ist aber die Inhibition der Apoptose; die BCR-ABL-Kinase führt zu einem prolongierten Zellzyklusarrest in der G2-/M-Phase und macht die Zellen gegen Apoptose resistent [4]. Ein weiterer zum leukämischen Bild beitragender Faktor ist ein Adhäsionsdefekt [30]. Dieser kommt durch eine verminderte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (N-Cam, LFA-3, L-Selektin) sowie durch eine verminderte Adhäsion zum Fibronectin zu Stande und bewirkt den prämaturen Austritt von unreifen Zellen aus dem Knochenmark. Neben einem Adhäsionsdefekt sind die unreifen myeloischen Zellen nicht in der Lage, die Knochenmarkmikroumgebung anzusteuern. Damit sind die CML-Vorläuferzellen im peripheren Blut gewissermaßen gefangen [30, 34].

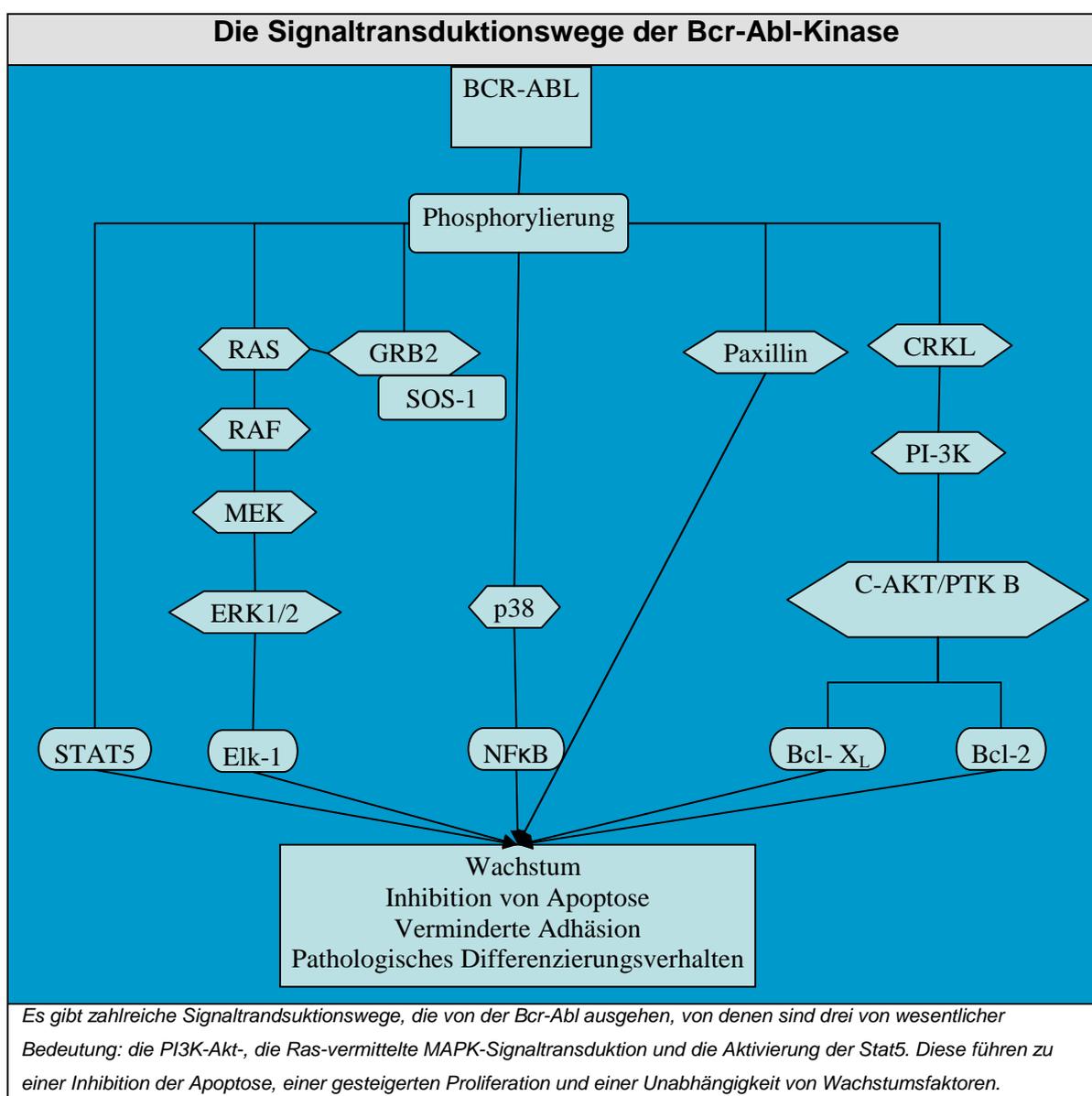


Abbildung 4 Die Signaltransduktionswege der Bcr-Abl-Tyrosinkinase

Genetische Aspekte der CML

Verschiedene Mutationen führen zum Vollbild der Blastenkrise während der CML [7, 28, 30, 34, 96, 107, 119]. Wahrscheinlich kommt es nach der Rekombination zur klonalen Selektion durch Wachstumsvorteile während der chronischen Phase. In der Blastenkrise ereignen sich dann zusätzliche zytogenetische Veränderungen (z. B. Trisomie 8 oder 9, ein weiteres Philadelphia-Chromosom), das Genom wird, verursacht durch ein Missverhältnis zwischen einer Aktivierung von Onkogenen (evi-1, Myc) und

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (p16²⁴⁰, Rb, p53) immer instabiler [7, 28, 30, 34, 96, 107, 119].

Zusätzlich zur Philadelphia-Chromosom positiven CML wurden auch Philadelphia-Chromosom negative CML-Formen beschrieben. Dazu zählen im Wesentlichen drei Gruppen [34, 119]. Die erste umfasst die CML-Variante, die zwar Philadelphia-Chromosom negativ ist, aber durch eine andere Translokation Bcr-Abl exprimiert, ihr klinischer Verlauf unterscheidet sich nicht von der der Ph-positiven CML [34, 119]. Eine weitere Variante ist die CML, welche durch das ETV6-Gen verursacht wird. Die Funktion des Genproduktes ähnelt dabei der von Bcr-Abl. Die letzte CML-Form ist geprägt von einer N-Ras-Mutation und unterstreicht damit die Bedeutung des Ras-Signalweges, sie führt zum klinischen Bild einer juvenilen CML [119].

1.1.3 Therapieoptionen der CML

Primäres Behandlungsziel der CML sollte die Heilung sein, was der Elimination des Philadelphia positiven Zellklons entspricht [7]. Ist dies nicht mehr möglich, gilt es, die durch die Knochenmarkshyperplasie generierten Komplikationen (Splenomegalie, Anämie, etc.) zu mildern und die Progression in Richtung Blastenschub zu verlangsamen. Eine Therapie während der Blastentransformation gestaltet sich sehr schwierig, der Übergang der akzelerierten Phase in eine akute Leukämie wurde bislang als therapierefraktär beschrieben [7]. Einzige kurative Therapie war bisher die allogene Stammzelltransplantation [63]. Weitere Therapieoptionen sind die Interferonbehandlung und Therapien mit Hydroxyurea, Busulfan, Cytarabin, Decitabine und Carboplatin, welche mit der Einführung von Imatinib zunehmend in den Hintergrund geraten [28, 103]. Imatinib (STI571) ist eine Erfolg versprechende orale Chemotherapie, die die CML kausal auf molekularbiologischer Ebene bekämpft (siehe unten), deren kuratives Potenzial jedoch derzeit noch nicht feststeht [9]. Zur Festlegung des Therapiekonzeptes wurden im September 2006 von Baccarani et. al. aktualisierte Therapieempfehlungen veröffentlicht [3]. Hiernach wird die Gabe von Imatinib (400mg/täglich) als Mittel der Wahl in der chronischen Phase der CML empfohlen. Wenngleich eine allogene Stammzelltransplantation bei einem niedrigen Transplantationsrisiko und schlechten

Prognosefaktoren zu diskutieren ist, sollte dennoch eine Initialtherapie mit Imatinib favorisiert werden. Um die Effizienz dieser Behandlung zu evaluieren, gilt es, den Grad und die Dauer der hämatologischen, der zytogenetischen und der molekularbiologischen Remission Verlaufs zu kontrollieren. Zu diesem Zweck gibt es eine Einteilung in partielle und komplette hämatologische/zytogenetische und molekulare Remission (siehe Tabelle 2) [3].

Klinische Verlaufparameter			
Remission	Hämatologisch	Zytogenetisch	Molekular
partiell	>10.000/ μ l Leukozyten	1- 35% geringes Ansprechen: 36-65% minimales Ansprechen: 66-95% kein Ansprechen > 95%	Major Molecular Response: BCR-ABL/ Kontrollgen gemäß IS („international Scale“) $\leq 0,1$
komplett	<10.000/ μ l Leukozyten normaler Hb-Wert < 450.000/ μ l Thrombozyten	0%	0

Anmerkung: die zytogenetische Remission wird prozentual anhand der Philadelphia positiven Metaphasen im Knochenmark bewertet, die molekulare anhand einer Quantifizierung der Bcr-Abl-DNS mittels RT-PCR.

Tabelle 2 Klinische Verlaufparameter zur Evaluation einer Wirksamkeit der Therapie [3]

Ob eine Therapie mit Imatinib effizient ist, erlaubt die Bestimmung dieser Parameter, mit deren Hilfe man ein Therapieversagen, ein suboptimales Ansprechen und gewisse „Warnzeichen“ erkennt, die zu einem schlechten Ansprechen führen könnten (siehe Tabelle 3). Beim Therapieversagen ist die allogene SZT oder eine Dosiserhöhung der Imatinibtherapie auf 600mg bzw. 800mg zu diskutieren. Im Falle eines suboptimalen Ansprechens bzw. bei gegebenen „Warnzeichen“ sollte primär die Imatinibdosis eskaliert werden, bei einer schlechten Prognose und niedrigem Transplantationsrisiko ist die allogene SZT in Erwägung zu ziehen. Bei einer Imatinibintoleranz oder schweren Nebenwirkungen muss die allogene SZT mit einer Kombinationstherapie aus Interferon alpha und „low-dose“ ARA-C gegeneinander abgewogen werden. Während der frühen

Blastenkrise wird zunächst eine Imatinibbehandlung mit dem langfristigen Ziel einer allogenen SZT empfohlen [3].

Definition- Therapieversagen, suboptimales Ansprechen und „Warnzeichen“ nach Behandlung mit Imatinib während der chronischen Phase der CML			
Zeit	Therapieversagen	Suboptimales Ansprechen	„Warnzeichen“
3 Monate nach ED	Keine HR	< als eine CHR	
6 Monate nach ED	< als eine CHR, keine CgR	< als eine PCgR	
12 Monate nach ED	< als eine PCgR	< als eine CCgR	< als MMolR
18 Monate nach ED	< als eine CCgR	< als eine MMolR	
Zu jeder Zeit	Verlust der CHR, Verlust der CCgR, Mutationen	ACA in Ph+-Zellen, Verlust der MMolR, Mutationen	Erhöhung des Transkript-Levels, OCA in Ph-- Chromosomen
<i>CHR komplette hämatologische Remission</i> <i>CgR zytogenetische Remission</i> <i>PCgR partielle zytogenetische Remission</i> <i>ACA andere chromosomale Abnormalität in Ph+-Zellen</i> <i>OCA andere chromosomale Abnormalitäten in Ph--Zellen</i> <i>MMolR =Major molecular response (s. Tabelle 2)</i>			

Tabelle 3 Definition Therapieversagen, suboptimales Ansprechen und Warnzeichen nach Behandlung mit Imatinib während der chronischen Phase der CML

Stellenwert der Chemotherapie in der CML

Hydroxyurea wurde bislang therapieeinleitend eingesetzt, wenngleich eine zytogenetische Remission nur in weniger als 5% erreicht wurde [107]. Eine Blastenkrise konnte nicht verhindert werden. Andere Chemotherapeutika wie Busulfan waren einer Hydroxyureatherapie wegen ernster Nebenwirkungen und einem schlechten Ansprechen unterlegen. Grund hierfür ist u.a. die Tatsache, dass die Stammzelle der CML keinem regelhaften Zellzyklus unterworfen ist, außerdem exprimiert sie das Mdr-1, ein multidrug resistance Gen, dessen Translationsprodukt für Pgp-Protein kodiert und Produkte der Chemotherapie effizient aus der Zelle pumpt [77].

Die Interferon-alpha Therapie bei der CML

Einen effektiveren Therapieansatz stellt die zytoreduktive Behandlung in der chronischen Phase der CML mit Interferon-alpha dar [116]. Die Interferone sind durch ihre antivirale, immunmodulatorische und antiproliferative Wirkung bekannt, wobei der genaue Wirkmechanismus noch ungenügend geklärt ist. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt 57% unter einer Interferontherapie. In 73% kommt es zu einer hämatologischen und in 18% zu einer zytogenetischen Remission. Die Effizienz kann durch eine Kombinationstherapie mit low dose ARA-C gesteigert werden. Allerdings können die Nebenwirkungen wie grippeähnliche oder neuropsychiatrische Symptome nicht selten zu einem Therapieabbruch führen.

Stellenwert der Knochenmarkstransplantation

Die Knochenmarkstransplantation ist der einzige kurative Therapieansatz. Geeignet hierfür ist meistens nur ein kleiner Personenkreis (Alter < 55 Jahre, idealerweise HLA-identischer Familienspender). Es wird zunächst durch eine hochdosierte Chemotherapie und/oder eine Ganzkörperbestrahlung eine Myeloablation zur Eradikation Ph-positiver Klone (Konditionierung) durchgeführt. Hiernach wird das Spenderknochenmark reinfundiert. Während dieser Phase besteht ein substanzielles Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko von 20-30%, insbesondere durch die Graft-versus-host-Reaktion. Als positiver Nebeneffekt zu benennen ist die GVL-Reaktion (graft versus leukemia), die für ein niedriges Rezidivrisiko sorgt.

Weitere denkbare Therapieoptionen, über welche gegenwärtig noch Studien laufen, sind die Ras-Hemmung durch ein Farnesyltransferasehemmer, das Bcr-Abl-Protein als Tumorstoffe und die Möglichkeit einer Induktion des GVL ohne eine GVHD, um nur ein Paar mögliche Therapieaussichten zu nennen [7]. Der Trend geht eindeutig in eine kausale Therapie auf molekularer Ebene und bittet dabei ein enormes Erforschungspotenzial, wie die komplexen Signaltransduktionswege zeigen.

Die insgesamt sehr vielfältigen Therapiemöglichkeiten beziehen sich allerdings nur auf eine Anwendung während der chronischen Phase. In der Blastentransformation selbst gab es bislang nur wenige Behandlungsoptionen.

Je nach Zelllinie entschied man sich für eine entsprechende Chemotherapie. Bei einer lymphoiden Transformation verabreichte man Vincristin und Prednisolon und erhielt Ansprechraten von etwa 50%, allerdings von nur kurzer Dauer. Bei einer myeloiden Transformation wurde eine aggressive Chemotherapie mit Anthrazyklinen durchgeführt. Beide Chemotherapeutika waren letztlich kaum wirksam.

1.2 Wirkungsweisen und Indikation von Imatinib

Imatinib (STI571) ist ein Tyrosinkinaseinhibitor und stellt als „small molecule drug“ eine innovative Therapiemöglichkeit dar, das CML auslösende Protein BCR-ABL zu blockieren, womit es als einer der ersten Signaltransduktionsinhibitoren (kurz STI571) seiner Aufgabe gerecht wird. Als Derivat eines 2-Phenylaminopyrimidins antagonisiert es die Aktivierung einer Phosphotyrosinkinase, in dem es kompetitiv an die ATP-Bindestelle bindet [106]. Infolgedessen kann die Abl-Kinase keine Phosphatgruppen auf Phosphotyrosinreste seiner Substratproteine transferieren, wodurch die Signaltransduktion unterbrochen wird. Imatinib inhibiert auch die normale c-Abl-Funktion, was allerdings wegen der Redundanz der vielfältigen Signalwege klinisch nicht in Erscheinung tritt. Demgegenüber steht das Phänomen der „onkogenen Abhängigkeit“ („oncogene addiction“) der CML, welche auf eine dauerhaft aktive BCR-ABL-Kinase angewiesen ist. Um diese zu überwinden, ist die Therapiestrategie, das einzige Schlüsselprotein der Leukämogenese mittels Imatinib zu blockieren, ein effizientes Mittel [17]. Neben der PDGF-Rezeptorkinase besitzt Imatinib auch eine suppressive Wirkung für c-Kit, eine Tyrosinkinase, die sich u.a. bei gastrointestinalen Stromatumoren überexprimiert nachweisen lässt. Zunächst in Zellkultur-Experimenten und dann an Patientenmaterial (Knochenmark und peripheres Blut) konnte 1996 erstmals gezeigt werden, dass Imatinib das Überleben der Bcr-Abl-positiven, nicht aber das der gesunden Zellen hemmt [12, 24, 27, 66]. Anhand eines Mausmodells wurde zudem nachgewiesen, dass eine Zellexpansion der Ph-positiven Zellklone unter Imatinib vermindert wurde [75]. Auch in der Klinik ist Imatinib mittlerweile fest etabliert und gehört zur first-line Behandlung der CML. Während die bisherigen Therapieoptionen eine Progression oftmals nur verzögert haben, wird die CML unter der Gabe von Imatinib regelrecht aufgehalten. Im Vergleich zwischen Imatinib und

Interferon-alpha bzw. low-dose Cytarabin bei Erstdiagnose einer CML, überzeugte der Signaltransduktionsinhibitor zum einen wegen seiner besseren Verträglichkeit, zum anderen durch seine Wirkung. 2006 wurden 1106 Patienten entweder mit einer konventionellen Chemotherapie behandelt oder mit Imatinib. Nach 12 Monaten kam es in der Imatinibgruppe in 69% bzw. nach 60 Monaten in 87% der Fälle zu einer kompletten zytogenetischen Remission. Darüber hinaus kam es zu einer Verlängerung der progressionsfreien Zeit, die 5-Jahresüberlebensrate betrug 89% [32, 37, 52, 61, 93, 95, 119]. Die Ansprechrate ist besonders günstig im Frühstadium, zugelassen ist Imatinib allerdings auch während der Blasten- und in der akzelerierten Phase. Während der chronischen Phase liegt die Dosierung bei 400mg/täglich, während der Blastentransformation bei 600 bis max. 800mg/täglich. Insgesamt wird die dauerhafte Therapie gut vertragen, Nebenwirkungen sind am häufigsten gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Abdominalschmerzen, Durchfälle, Ulcera), gefolgt von Unterschenkelödeme, Dyspepsie und Hautveränderungen, ernste Nebenwirkungen kommen in weniger als einem Prozent vor [100]. Anwendungsgebiet von Imatinib sind nicht nur alle Formen der BCR-ABL positiven Erkrankungen wie neben der CML auch Philadelphia-positive Unterformen der akuten lymphatischen und myeloischen Leukämien. Es wird u.a. bei der Behandlung des C-Kits (CD117)-positiven gastrointestinalen Stromatumoren angewandt. außerdem ist Imatinib Mittel der Wahl bei der Behandlung der chronischen eosinophilen Leukämie, welche durch FIP1L1-PDGFR-alpha ausgelöst und durch Imatinib inhibiert wird [22]. Daneben wird der Tyrosinkinaseinhibitor in der Therapie vieler PDGFR-Erkrankungen, wie z. B. die der Dermatofibrosarcoma protuberans, aufgrund der antagonisierenden Wirkung an der PDGF-Rezeptorkinase, eingesetzt.

1.2.1 Wirkung von Imatinib in BCR-ABL-induzierte Signaltransduktionswege

Eine maligne Transformation bei der chronischen myeloischen Leukämie wird ausgelöst durch einen Differenzierungsstopp, einer Hemmung der Apoptose, einer vermehrten Zellproliferation und einer gestörten Adhäsion. Sie sind das Ergebnis zahlreicher, redundanter Signalwege, deren Schlüsselprotein die BCR-ABL-Kinase ist.

Zu den Endpunkten dieser Signalwege zählen u.a.:

- die Aktivierung der AKT-Kinase und damit [124]
- Upregulation von Bcl-X_L
- die Aktivierung des p53-abhängigen NFκB [86]
- die mitochondriale Dysfunktion mit konsekutiver Inhibition von Caspase 3 (siehe unten)

Imatinib greift in einige dieser Kaskaden ein:

- es inhibiert die AKT-Kinase, worunter die Phosphorylierung von
- Bcl-X_L , aber auch CIAP 1 (ein weiteres antiapoptotisches Protein) gehemmt wird [37]
- es induziert die Bildung von Hämoglobin, a.e. durch Inhibition der Bcr-Abl, zudem steigt die CD11B-Expression als Zeichen einer myeloiden Differenzierung [37]
- die in der Regel apoptotisch wirkende JNK und p38 werden vermehrt aktiviert [68]

Daneben konnte in einer Studie [37] gezeigt werden, dass ursprünglich gegen Cytarabin und Doxorubicin resistente HI-60/Bcr-Abl und K562 Zellen, durch die Gabe von Imatinib wieder für Chemotherapeutika dieser Art sensibilisiert wurden. Dies hätte zur Folge, dass eine Kombinationstherapie Imatinib mit einem der beiden Chemotherapeutika womöglich einen therapeutischen Ansatz darstellt.

Von weiterer Bedeutung sind die STI571-induzierten Veränderungen des MAPK-Signalweges in K562-Zellen [130]. Nach sechsständiger Stimulation mit Imatinib

kommt es zu einer Downregulation von ERK1/2, nach 24stündiger Stimulation dahingegen steigt die ERK1/2-Expression wieder. Es wird angenommen, dass eine Unterbrechung der BCR-ABL-Signaltransduktion ein Stresstimulus für eine Aktivierung der MEK1/2 und damit die der ERK1/2 ist.

1.2.2 Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Imatinib

Imatinib blockiert effizient bereits bei einer Konzentration von 1 μ mol/l die CML-GM-CFU (Granulozyten/Makrophagen-colony-forming unit) und BFU-E (erythroid burst-forming unit) und verhindert dadurch die Expansion der Ph-positiven Leukämiezellen. Leider gibt es primäre und erworbene Resistenzen [48, 57], deren Ursachenforschung Gegenstand zahlreicher Studien in der Vergangenheit war und auch zukünftig zur Effizienzsteigerung einer STI571-Therapie sein wird.

Als Hauptursache einer Resistenzentwicklung unter einer kontinuierlichen STI571-Behandlung wird bislang eine Reaktivierung der BCR-ABL-Kinase beschrieben. Diese kann Ausdruck einer gesteigerten Genamplifikation und m-RNA-Expression sein [48]. Neben einer vermehrten Bildung kann der Nachweis eines erhöhten Bcr-Abl-Levels auch auf dem Boden eines verminderten Abbaus z. B. als Folge einer erniedrigten Proteaseaktivität entstehen [76, 82].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Bcr-Gen ein negativer Regulator der BCR-ABL ist, demzufolge führt eine reduzierte Bcr-Expression zu einer gesteigerten Bcr-Abl-Aktivität.

Studien von Holyoake et al. zeigten darüber hinaus, dass Imatinib zwar die Proliferation ausreifender Tumorzellen nicht aber die der unreifen Stammzellen unterbindet [54]. Die CD 34-exprimierenden Vorläuferzellen scheinen resistent gegen Imatinib zu sein. Dem zu Grunde liegen deutlich erhöhte Level an Bcr-Abl-Transkripte bzw. -Proteine verglichen mit denen der reiferen CML-Zellen. Neue Tyrosinkinaseinhibitoren wie Dasatinib sollen zytotoxischer als Imatinib wirken und damit auch die Stammzellen erreichen [23].

Eine weitere Ursache einer Resistenzentwicklung ist das Pgp-Protein, welches vom Mdr-1-Gen (multi-drug-resistance-gen) kodiert wird. Das Protein führt zum aktiven Transport des Medikamentes aus der Zelle heraus [82]. Im Rahmen einer Studie konnte

durch die Gabe des Calciumantagonisten Verapamil eine effiziente Blockade erreicht werden, worunter es zu einer verbesserten STI571-Aufnahme in Lama84-Zellen kam.

Wie bereits oben aufgeführt, kommt es während der Blastentransformation zu einer genetischen Instabilität, was wiederum u.a. zu vielfältigen Punktmutationen in Bcr-Abl führen kann. In STI571-resistenten Patienten wurde eine solche gefunden, die in der Tyrosinkinase an der Position 315 ein Isoleucin statt eines Threonins aufwies, wodurch eine Bindung des Imatinibs an der BCR-ABL nicht mehr möglich war [48]. Mittlerweile konnten zahlreiche solcher Punktmutationen in STI571-resistenten Zellen nachgewiesen werden, die eine Bindung verhindern [99, 109, 110]. So erfordert die STI571-Bindung eine Dephosphorylierung des Tyrosins 393, die Mutante Y393F dahingegen kann entsprechend nicht dephosphoryliert werden und Imatinib binden.

Neben den genannten Mechanismen sind auch weitere Mutationen denkbar, die den Bcr-Abl-Signaltransduktionsweg betreffen und diesen entgegen der STI571-Wirkung regulieren. Zu diesem Zweck beschäftigten wir uns mit der Hypothese, ob die Gegenspieler der Tyrosinkinasen, die Tyrosinphosphatasen, womöglich eine Rolle in der Resistenzentwicklung spielen.

1.3 Die Proteintyrosinphosphatasen

Anhand der juvenilen myelomonozytären Leukämie und B-Zell-Neoplasien konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp einer Neoplasie nicht nur durch eine deregulierte Tyrosinkinaseaktivität, sondern auch durch eine Suppression von Tyrosinphosphatasen induziert werden kann [69, 117]. Dadurch kommt den Proteintyrosinphosphatasen eine bedeutende aber noch wenig untersuchte Rolle in der Pathogenese maligner Grunderkrankungen zu. Sie stellen eine strukturell vielfältige Familie dar, umfassen bisweilen 75 Mitglieder und sind in Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und in der Zellzyklusregulation sowie in der zytoskelettalen Funktion involviert [121]. Sie werden ubiquitär exprimiert und kommen in Eu- und Prokaryoten, Viren und Pflanzen vor. Außerdem können unterschiedliche Phosphatasen sowohl die Wirkung der Proteintyrosinkinasen potenzieren als auch antagonisieren. Die PTP-Domäne umfasst 240 Aminosäuren mit einem invarianten Signalmotiv $^I_VHGXAGXXR^S_TG$, welches das Enzym definiert (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure) [121]. Ihre Vielfalt

entsteht durch verschiedene nicht-katalytische Sequenzen, die am C- oder N-terminalen Ende der katalytischen Domäne fusioniert sind und regulatorische Funktion besitzen. Ihnen ist u.a. die Bindung verschiedener Substrate sowie die Steuerung der zytoplasmatischen PTPs zu definierten subzellulären Kompartimenten zuzuschreiben. Eingeteilt werden die Proteintyrosinphosphatasen in rezeptorähnlichen, membranständigen und nicht-transmembranen PTPs [39, 121].

Die rezeptorähnlichen PTPs spielen in der Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Adhäsion eine Rolle. Sie bestehen aus einer Ektodomäne, einer einzelnen transmembranen Domäne und einem intrazellulären Segment mit meistens zwei Phosphatasen. Innerhalb der R_p-PTPs erfolgt eine Einteilung in vier Klassen, die sich aufgrund ihres extrazellulären Bereichs unterscheiden. Sie sollen Teil der Cadherin/Catenin-Komplexbildung sein. Cadherin ist Bestandteil einer adhärenen Junction und ist intrazellulär Catenin-abhängig an Aktin des Zytoskeletts gebunden [39, 121]. PTP-abhängig werden die Adhäsionseigenschaften, vermittelt über den Cadherin-Signalweg, reguliert. Die R_p-PTPs führen dabei zu einer Stabilisierung der Zellstruktur und inhibieren ein weiteres Zellwachstum. Bekanntestes Beispiel der transmembranen PTPs ist die in hämatopoetischen Zellen exprimierende CD45, welches eine entscheidende Rolle in der Antigen induzierten B- und T-Zellrezeptoraktivierung spielt [16, 39, 122].

Zu den nicht-transmembranen PTPs gehören im Wesentlichen die SH2-Domäne beinhaltenden SHP1 und SHP2, die TCPTP und ihr nächster Verwandte die PTP1B. Sie zeichnen sich durch eine katalytische Domäne aus und werden von verschiedenen C- und N-terminalen Motiven flankiert. Während die SHP2 ubiquitär exprimiert wird, findet man die SHP1 vornehmlich in hämatopoetischen Zellen, wo sie die Hämatopoese negativ beeinflusst. So führt sie gebunden am Erythropoetin-Rezeptor zu einer Dephosphorylierung der Januskinase Jak2, einer Tyrosinkinase, deren Hauptaufgabe in der Aktivierung der Stats liegt. Durch ihre Inaktivierung kommt es letztlich zu einer verringerten Proliferation [121].

Auch in der Differenzierung von K562-Zellen unter Butyratstimulation wurde die Rolle der SHP1 [8] beschrieben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass unter einer Stimulation die SHP1-Expression stieg, was die Proliferation und die Adhäsion negativ beeinflusste und es zu einer Differenzierung der Zellen kam. Die Zellen zeigten einen dichten Nukleus, eine vermehrte Vakuolenbildung und führten zur Bildung von

Hämoglobin (was in einer Benzidinfärbung visualisiert wurde). Üblicherweise konnte in der erythroleukämischen Zelllinie K562 ohne Stimulus kein SHP1 nachgewiesen werden, unter Butyratgabe dahingegen stieg die Expression, nicht dagegen die der PTP1B oder SHP2, an [8]. Daher wurde vermutet, dass das Fehlen der SHP1 eine Rolle in der Pathogenese der CML-Blastenkrise spielt, womöglich ist ihre Abwesenheit mit dem undifferenzierten Status der K562 Zellen korreliert. Perrotti et. al. konnten darüber hinaus zeigen, dass die Aktivität des Tumorsuppressors Proteinphosphatase 2A (PP2A) während der Blastenkrise vermindert ist und damit einen entscheidenden Beitrag zur Blastenkrise trägt [89].

1.4 Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B

Prototyp der PTPs und am besten untersucht ist die nicht-transmembrane PTP1B, die ubiquitär exprimiert wird und primär auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums zu finden ist [15, 41]. Sie umfasst 1305 Nukleotide, kodiert für 435 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 49.966 Da [131, 132]. Als einzelne Kopie liegt die PTP1B auf dem langen Arm des Chromosoms 20 (q13.1-q13.2), in deren Umgebung andere wachstumssuppressive Faktoren zu finden sind. Aufgrund dieser Lokalisation wird vermutet, dass diese Proteintyrosinphosphatase als Wachstumssuppressor fungiert, ihre physiologische Funktion ist aber bislang noch unklar [121]. Die PTP1B wurde erstmals aus humaner Plazenta gewonnen und entsprach einem 37kDa großen Protein, während die der NIH 3T3-Zellen 50kDa groß ist [15]. Gründe für den Größenunterschied sind zwar unbekannt, könnten aber auch Folge eines unterschiedlichen posttranslationalen Processings sein [121].

Das C-terminale Ende des Proteins umfasst 35 Reste und trägt eine hydrophobe Sequenz, welche zur Steuerung des Enzyms in Richtung der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums notwendig ist [15, 115, 131, 132]. Daneben befindet sich ein hydrophiles Segment, dessen Aufgabe in einer Serinphosphorylierung besteht. Substraterkennungsmotiv ist die Abfolge (E/D)-pY-pY-(R/K), das Signalmotiv der PTP1B erkennt diese und ist für die Substratbindung erforderlich [15, 131, 132]. Sie liegt in einer Spalte an der Oberfläche des Proteins und wird von Tyrosin 46 und Phenylalanin 182 flankiert. Zentrale Rolle für die enzymatische Reaktion ist das Cystein 215, als Nukleophiles greift es das

Phosphor-Atom des Phosphotyrosinrestes vom Substrat an und führt damit zur Strukturveränderung des Proteins, bei welcher Aspartat 181 zur Protonierung des Phenolsauerstoffs in Erscheinung tritt. Es entsteht eine hydrophobe Tasche, welche das Substrat trägt und durch die Protonierung ein Intermediat bildet, welches durch Hydrolyse das Enzym wieder freisetzt [115, 131, 132]. Durch einen Austausch der Asp181 gegen Alanin entsteht aus dem hochaktiven Enzym eine nahezu funktionslose Substratfalle. Diese Mangelmutante wurde im Rahmen einer Studie von LaMontagne et al. zur Identifikation der Substrate entwickelt, da bislang noch sehr wenig über diese Phosphatase bekannt ist [40, 73, 74]. Aufgrund ihrer noch hohen Affinität zum Zielprotein konkurriert diese mit der endogenen PTP1B und führt zur Akkumulation von P-Tyrosinresten auf Proteinen, welche als Substrat der PTP1B hiernach isoliert und schließlich identifiziert wurden.

Als Substrat eine Schlüsselrolle spielen dabei:

- die p210Bcr-Abl-Kinase, auf deren Interaktion noch gesondert eingegangen wird [42, 74],
- der Epidermal growth factor Rezeptor, einer der bedeutendsten Substrate
- p130^{cas}, welche eine wesentliche Rolle im Integrinsignaltransduktionsweg einnimmt [79],
- der Insulinrezeptor, der erste Rezeptor, anhand dessen die Rolle der PTP1B untersucht wurde [6, 47],
- die Januskinasen JAK2 und TYK2, die wie bereits erwähnt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Stats führen [87],
- ein p120 was am ehesten dem RAS-GAP, also der Ras GTPase aktivierendem Protein entspricht [40],
- p80 und p70 großes Protein unklarer Herkunft [40],
- die p62^{dok} [33],
- v-src, ein 3T3-Zellen transformierendes Onkoprotein.

Es wurde gezeigt, dass PTP1B p130^{cas}, welches eine Rolle in der integrinvermittelten Signaltransduktion spielt, dephosphoryliert und damit eine Aktivierung der MAPK, welche nicht nur wachstumsfaktor- sondern auch integrinabhängig stimuliert werden kann, unterbindet [79]. Dafür ist die prolinreiche Sequenz der PTP1B erforderlich,

welche mit der SH3-Domäne der p130^{cas} interagiert. Folge ist eine veränderte zytoskelettale Architektur, eine gesteigerte Zellmotilität und eine verminderte fokale Adhäsion, zugleich sinkt die MAPK-vermittelte Proliferationsrate. Außerdem konnte in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK in einem Serumentzugsversuch zwar nicht unter einer EGF-Stimulation durch die PTP1B reguliert wurde, aber in einer Fibronectin beinhaltenden Kultur, unter deren Stimulation PTP1B zu einer Deaktivierung der MAPK führte [79]. Dies suggeriert, dass die Regulation einer MAPK-Aktivierung zum einen u.a. PTP1B-abhängig erfolgt, dies scheinbar aber nur vermittelt über den Integrin-Signalweg und nicht über die Wachstumsfaktoren geschieht.

Die Januskinasen Tyk2 und Jak2 sind weitere Substrate der PTP1B, und führen gewöhnlich nach Stimulation durch entweder Interferon alpha oder gamma zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren Stat 3 und 1. Entsprechend findet man diese in der Mangelmutante vermehrt phosphoryliert, wohingegen sie keine direkten Substrate der PTP1B darstellen [87].

1.4.1 PTP1B und ihr Einfluss auf die Bcr-Abl-Kinase und deren Signalwege

Bislang ist die Rolle der PTP1B in der chronischen myeloischen Leukämie wenig erforscht. Die PTP1B-Expression, nicht dahingegen die der TCPTP, ist in Bcr-abl-exprimierenden Zellen eleviert und wird auch in Abhängigkeit der Bcr-Abl-Expression hochreguliert [42]. Als Gegenspieler der Bcr-Abl-Kinase äquilibriert die PTP1B den Phosphotyrosinhaushalt bei einer gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität. Die PTP1B bindet selektiv an die BCR-ABL-Kinase. Durch diese Komplexbildung wird die Bindung des essenziellen Proteins GRB2 verhindert und infolgedessen die RAS-vermittelte Transkription des AP-1/ets reporter unterbrochen [40, 73, 74]. Damit antagonisiert die PTP1B BCR-ABL-vermittelte Transformationen. Wahrscheinlich stellt die Docking site des GRB2, Position Y177, die Bindestelle der PTP1B dar, wobei weitere Phosphotyrosinreste der Bcr-Abl als potenzielle Angriffspunkte denkbar wären (R552L, Y793F, Y283, Y360) [73, 74]. Im Übrigen scheint die v-Abl kein Zielprotein dieser Phosphatase zu sein [40, 73, 74].

Aus dem Vergleich zwischen der Mangelmutante und dem Wildtyp konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die PTP1B die Koloniebildung und damit Wachstum und Proliferation der Tumorzellen verzögert [74]. Daneben führt sie analog zur Gabe von STI571 zu einer erythroiden Differenzierung von K562-Zellen [70, 72].

Alles in allem greift die PTP1B an eine Vielzahl von BCR-ABL-vermittelten Signaleffekten ein.

1.5 Hypothese

Die chronische myeloische Leukämie wird durch Bcr-Abl hervorgerufen, welches als deregulierte Tyrosinkinase zur Tyrosinphosphorylierung vieler Signalproteine führt. Die Gegenspieler dieser Kinasen sind die Tyrosinphosphatasen, wie z. B. die Proteintyrosinphosphatase-1B. Diese ist zur Dephosphorylierung der Bcr-Abl-Kinase notwendig. Da Imatinib nur an der dephosphorylierten Bcr-Abl-Tyrosinkinase bindet, bewirkt eine Suppression der PTP1B-Aktivität eine Resistenz gegenüber Imatinib [70].

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente

Elektroporationsgerät

Gene Pulser System (BioRad, München)

Facs-Analysegeräte und entsprechende Software

FACScan analyzer und CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Gelelektrophorese System

Mini-PROTEN®II system, BioRad (München)

Power Supply EPS 200, Pharmacia Biotech

Mikrotiterplattenleser

Safire Magellan, Tecan (Crailsheim)

Sequenzierautomat

PCR-Maschine

Techne Progene, Labtech International (Burkhardtsdorf)

pH-Meter

Corning 125 (Fisher Scientific, Schwerte)

Protein transfer cell

Trans-Blot® SD Semi-dry Transfercell, BioRad (München)

Sequenziergerät

ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Pekin Elmer Biosystems, Weiterstadt)

Spectrophotometer

Milton Roy Spectronic 1001 plus, Merck Eurolab (Frankfurt)

Zentrifugen

Rotanta 46 RS, Hettich (Tuttlingen)

Mikro 22 R, Hettich (Tuttlingen)

Megafuge 1.OR, Heraeus (Hanau)

2.1.2 Fertige Kits

Phosphatase Assay Kit 1

Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

U.S.E. -Mutagenesis Kit

Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA

Quiaex II

Quiagen, Hilden, Deutschland

Nucleobond PC 500

Machery und Nagel, Düren, Deutschland

QIAquick PCR Purification

Quiagen, Hilden, Deutschland

Dye Terminator Cycle
ready kit

ABI PRISM, Perkin Elmer Biosystems, Sequencing
Weiterstadt, Deutschland

DC Protein Assay

BioRad, USA

Zero Blunt PCR Cloning Kit

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid	(I)
Ammoniumperoxidsulfat	(VII)
Aprotinin	(XI)
BSA	(XI)
DMSO	(VII)
DEPC	(V)
DTT	(VI)
Ethanol, abs.	(II)
Ethidiumbromid	(X)
EDTA	(I)
Formaldehyd 37%	(IX)
Glycerol	(I)
Glycin	(XI)
HEPES	(XI)
HPLC-H ₂ O	(II)
Hydrochloride, 25%	(X)
Isobutanol	(XI)
Isopropanol	(XI)
2- Kaliumchlorid	(VII)
L-Glutamin	(XV)
Malachite Green Solution	(XIII)
Mercaptoethanol	(VII)
Natriumfluorid	(VII)
Natriumchlorid	(XI)
NP-40	(XI)
Protein A Sepharose CL-4B	(XIV)
RNAzol®	(XII)
SDS	(X)
Natriumorthovanadat	(VII)
TEMED	(III)
Tris-Base	(XI)
Triton 100-X	(XI)
Tween-20	(II)

Hersteller

Appli Chem., Darmstadt	(I)
Baker BV, Holland	(II)
BioRad, München	(III)
Fluka, Seelze	(IV)
ICN Biomedical, Ohio, USA	(V)
Life Technologies, Karlsruhe	(VI)
Merck, Darmstadt	(VII)
Novex, Anamed, Offenbach	(VIII)
Riedl-de Heaen, Seelze	(IX)
Roth, Karlsruhe	(X)
Sigma, Steinheim	(XI)
Tel-Test, Friendwood, USA	(XII)
USB, Ohio, USA	(XIII)
Amersham Pharmacia Biotech	(XIV)
Invitrogen, Karsruhe	(XV)

2.1.4 Materialien zum Umgang mit Zellkulturen

Zellkulturflaschen	Nunk, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten	Nunk, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen™ Vials	Nunk, Roskilde, Dänemark
DMEM	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Fetal bovine serum (FCS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Paisley, Schottland
RPMI 1640	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypanblau	Gibco BRL, Paisley, Schottland
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach
Stericup	Milipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730

Zelllinien und Bakterienstämme

K562 Zellen	eine chronische Leukämiezelllinie in der Blastenkrise, DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SupB15 Zellen	p185 Bcr-Abl positive Zellen einer ALL-Zelllinie, DSMZ, Braunschweig, Deutschland
JM 109	E.coli-Stamm der Promega, Mannheim
NM 522 mutS	E.coli-Stamm der Promega, Mannheim

Medium für Bakterien

LB medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt 1.5 % (w/v) NaCl pH 7.0, autoklaviert
SOC	ad 100ml SOB 1 ml 1M MgCl ₂ autoklaviert 1 ml 1M MgSO ₄ autoklaviert 5 ml 0.4M Glucose filtriert
SOB	2 % (w/v) Bactopepton 0.5 % (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt 0.05 % (w/v) NaCl 0.01 % (w/v) KCl autoklaviert

Medien für die verwendeten Zellkulturen

Auftaumedium	FCS 10% in S-MEM (RPMI 1640)
Selektionsmedium	RPMI 1640 10 % FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% Glutamin 1mg/ml Geneticin 20mM HEPES zum Abpuffern
Einfriermedium	50 % (RPMI + 20% DMSO) 50 % (RPMI+ 10% FCS)

2.1.5 Standard Puffer

PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.2, autoklaviert
TAE	40 mM Tris-Azetat, pH8.0 1 mM EDTA pH 7.8 - Azetikazetat autoklaviert
10 X TBS	100 mM Tris HCl, pH8.0 5 M NaCl
TE	10 mM Tris-HCl, pH8.0 1 mM EDTA autoklaviert
Tris-HCl	1 M Tris Base pH entsprechend – HCl-Titration
10 X MOPS	200 mM 3-[N-morpholino] Propanschwefelsäure 50 mM Natriumazetat 10 mM EDTA pH 7.0 – NaOH

2.1.6 Mikrobiologische Materialien

Vektor

pcDNA 3.1 + Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	Life Technologies, Karlsruhe
Pfu-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Reverse Transkriptase Superscript	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwabach/Taunus
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwabach/Taunus
Endonuklease SMA I	New England Biolabs, Schwabach/Taunus
Endonuklease PVU I	New England Biolabs, Schwabach/Taunus
Endonuklease BAMHI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Endonuklease EcoRI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Endonuklease PstI	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Oligonukleotide :

1. 5` ATT GGA TCC TTA ATG GAG ATG GAA AAG GAG TTC GAG 3`
2. 5` ATT GAT ATC TTA CTA TGT GTT GCT GTT GAA CAG GAA 3`
3. 5` GTT GTG GTG CAC TGC AGT GCA GGC ATC GGC 3`
4. 5` GCC GAT GCC TGC ACT GCA GTG CAC CAC AAC 3`
5. 5` TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA 3`
6. 5`CAT TTA GGT GAC ACT ATA 3`
7. 5`CGA GAG ATC TTA CAT TTC CAC 3`
8. 5`CTT ACT TCT GAC AAC GAA AGG AGG ACC GAA GA 3`
9. 5`GGA TAT ACA AGC TCA GTT GAG CTT TTT GCA AAA GC 3`
10. 5`GAT TCA GGG ACT CCA AAT GCA GGC CAT GTG GT 3`
11. 5`CAG ACA GAA GGT TCC AGA CTT GCC GAT GCC TC 3`

1. PTP1B fw (BAM HI)
2. PTP1B rv (ECO RI)
3. PTP1B PSTI fw
4. PTP1B PST I rv
5. pcDNA3 fw (T7-Promoter)
6. pcDNA3 rv (Sp6-Promoter)
7. PTP1Bseq fw (für den Bereich 630-670bp)
8. Selektionsprimer für die PVU I Schnittstelle
9. Selektionsprimer für die SMA I Schnittstelle
10. Target Primer für die 181 Alanin-Mutation (20)
11. Target Primer für die 221 Arginin-Mutation (9)

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper zur Anwendung für Western Blots		
Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-PTP1B	Maus	Oncogene, Seattle, WA, USA
Anti-Phospho-ERK1/2	Hase	Promega, Madison, WI, USA
Anti-Akt	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Phospho-Akt	Hase	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-c-abl	Hase	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Tubulin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-active-caspase	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Phospho-Stat5	Hase	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-Phosphotyrosin	Maus	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Anti-Stat5	Maus	Transduction Lab, Lexington, USA
Anti-cleaved caspase 3	Hase	Cell signaling, Beverly, MA, USA
Anti-PARP	Hase	Roche, Penzberg, Deutschland

Tabelle 4 Primäre Antikörper zur Anwendung für Western Blots

Sekundäre Antikörper zur Anwendung von Western Blots	
Antikörper	Hersteller
Goat-anti-rabbit-IgG	Quiagen, Hilden, Deutschland
Horse-anti-mouse-IgG	Cell signaling, Beverly, MA, USA, HRP-konjugiert
Rabbit-anti-goat-IgG	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA, HRP-konjugiert

Tabelle 5 Sekundäre Antikörper zur Anwendung von Western Blots

Weitere Antikörper zur FACS-Analyse

PE-konjugiertes Anti-Glycophorin A	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Nicht-spezifische Kontroll-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FITC-konjugiertes Anti-CD11b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Sterilisation

Die Sterilisation von hitzestabilen Materialien wie Pipetten und Glasgefäße erfolgte im Heißluftschrank für 6h bei 180°C, während Pufferlösungen und Kunststoffartikel für 20 Minuten bei 121°C und bei 1,1 bar autoklaviert wurden. Thermolabile Substanzen wurden über entsprechende Filter sterilfiltriert.

Herstellung gebrauchsfertiger Zellkulturmedien

Da ausschließlich mit entarteten Lymphozyten (der Zelllinie K 562, siehe unten) gearbeitet wurde, bot sich erfahrungsgemäß die Anwendung einer Mischung aus 85% RPMI 1640 Mediumlösung und 10% Fetalen Kälber Serum unter Zusatz von 1% sterilen L-Glutamin, 1% Penicillin+ Streptomycin sowie 20mM Hepes Puffer an.

Durch Zugabe eines weiteren Antibiotikums, 1mg/ml Geneticin (die Stammlösung enthielt 50mg/ml Geneticin in H₂O), wurde zudem die Selektion von transfizierten Zellen sichergestellt. Das Medium wurde anschließend mit Membranfilter der Porengröße 0,22µm (Milipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730) sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in sterilen Plastik-Zellkulturflaschen unter Verwendung des oben erwähnten Selektionsmediums im Verhältnis 5×10^5 /ml Medium im Brutschrank bei 37°C, 100% Feuchte und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde dabei alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

Zellzahl und Viabilitätskontrolle

Zelldichtebestimmung

Das Prinzip der Zellzahlbestimmung beruht auf den Zusammenhang:

$$ZZ = K \times V \quad \text{mit } ZZ = \text{Zellzahl}$$

$$K = \text{Konzentration}$$

$$V = \text{Volumen der Suspension}$$

Die Konzentration wurde mit Hilfe von Hämocytometern (Neubauer Zählkammern) bestimmt. Die Zählkammern bestehen aus neun Quadranten, von denen vier ausgezählt wurden.

Jeder Quadrant umfasst ein Volumen von 0,1µl.

Für die Konzentration ergibt sich:

$K = ZZ_{4\text{Quadranten}} \times F / 0,4 \mu\text{l}$ mit $K =$ Konzentration

$ZZ_{4\text{Quadranten}} =$ Zellzahl (lebend) der 4 Quadranten

$F =$ Verdünnungsfaktor

Im praktischen Umgang bedeutet dies, dass zunächst das Gesamtvolumen der Zellsuspension in ml gemessen wurde. Dann wurden 10 μl dergleichen mit Trypanblau (siehe unten) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette oder einer 20 μl Mikro-Pipette wurde die verdünnte Suspension in die Neubauer-Kammer gefüllt. Dies erfolgte durch Ansetzen der Pipette an der Kante des Deckgläschens; unter Kapillarkräften wurde eine definierte Menge schließlich angesogen. Die Kammer konnte auf diese Weise unter das Mikroskop gelegt und bei einer 25fachen Vergrößerung ausgezählt werden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der oben erwähnten Formel ließ sich die Gesamtzellzahl der in der Kulturflasche befindlichen Zellen wie folgt berechnen:

$ZZ = (ZZ_{4\text{Quadranten}} \times 2 / 0,4 \times 10^{-3}) \times V \times \text{ml/ml}$ mit $ZZ =$ Gesamtzahl der Zellen in Suspension

$ZZ_{4\text{Quadranten}} =$ ZZ der vier Quadranten

$V =$ Gesamtvolumen der Suspension

Oder vereinfacht:

$ZZ = ZZ_{4\text{Quadranten}} \times 5 \times 10^3 \times V$

Vitalitätsfärbung

Mit Hilfe von Trypanblau lässt sich die Lebensfähigkeit der Zellen testen.

Trypanblau zeichnet sich dadurch aus, dass es bei lebenden Zellen nicht in der Lage ist ins Zellinnere zu penetrieren. Demgemäß bleiben lebende Zellen ungefärbt, tote Zellen werden blau.

Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit der Trypanblaulösung verdünnt, gründlich durchmischt und nach 2-5 Minuten gemäß den oben erwähnten Instruktionen in der Neubauer-Zählkammer aufgetragen und mikroskopiert. Gleichzeitig war zu beachten, dass ein zu langes Warten aufgrund der zytotoxischen Wirkung der Trypanblaulösung das Ergebnis verfälscht.

Die Viabilität ergibt sich dann aus:

$$\text{Viabilität in Prozent} = \left[\frac{\text{ungefärbte (viable) Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \right] \times 100$$

Kryokonservierung

Einfrieren und Lagerung von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden zunächst $1-2 \times 10^7$ Zellen isoliert und in 1ml 50% (RPMI + 20% DMSO) + 50% (RPMI + 20% FCS) aufgenommen.

Dimethylsulfoxid (kurz DMSO) diente dabei zum Gefrierschutz, das die Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen verhindern soll, gleichzeitig aber auch zytotoxisch wirkt. Daher war beim Auftauen auf ein zügiges Vorgehen zu achten.

Das Einfriermedium und die darin suspendierten Zellen wurden in 1,8ml-Einfrierröhrchen (Cryotubes vials, Nunc) pipettiert und zunächst in Isopropanolbehälter bei -80°C über Nacht eingefroren. Danach konnten die Zellen in Stickstoffbehälter bei -196°C überführt werden.

Auftauen von Zellen

Zellen, die mit DMSO tiefgefroren wurden, mussten zügig (siehe oben) aber schonend mit Auftaumedium nach dem unten angeführten Schema aufgetaut werden.

Dabei war zu beachten, dass sofort nach dem Entnehmen der Zellen aus dem Stickstoffbehälter, die Zellen im Wasserbad bei 37°C solange gehalten wurden bis das letzte Eisklumpchen verschwunden war.

Erst dann konnte das Kryoröhrchen unter der Sterilbank geöffnet und unter Zugabe von 10% FCS-haltigen RPMI 1640-Medium (=Auftaumedium) nach einem minutengenauen Schema in einem 15ml- Röhrchen überführt werden.

Minutengenaues Auftauschema	
Minuten	Medium/ 1ml Zellen
0	0,1 ml
1	0,12ml
2	0,15 ml
3	0,19 ml
4	0,26 ml
5	0,36 ml
6	0,52 ml
7	0,86 ml
8	1,69 ml
9	4,75 ml

Tabelle 6 Pipettierschema zum Auftauen DMSO-haltiger Zellen

Die aufgetauten Zellen wurden dann bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, in einem adäquaten Medium resuspendiert und in 50 ml Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert.

Charakterisierung des Zellwachstums und der Viabilität der geführten Zelllinie

Zur Charakterisierung des Zellwachstums dienten über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen erstellte Wachstumskurven und Viabilitätskurven.

Dabei wurden als erstes 5×10^5 der in Kultur befindlichen Zellen isoliert, in 2 ml eines 1% FCS-haltigen Mediums (geneticin frei) resuspendiert und in 12er well plates (Fa. Costa) überführt.

Als günstig erwies sich dabei die Anfertigung von Triplikaten.

An jedem zweiten bis dritten Tag wurden die wells auf Zelldichte und Viabilität überprüft und in Form eines Graphen mit Zellzahl bzw. Viabilität als Ordinate gegen die Zeit (angegeben in Tage) als Abszisse dargestellt.

Transfektion mittels Elektroporation

Ziel der Elektroporation ist, dass die Zellmembran durch Spannungspulse für die zu transfizierende DNA permeabel gemacht wird. Dies erreicht man nach Polarisierung der Zellmembran durch Anlegen einer Spannung, bei welcher zugleich 20-50% der Zellen abgetötet werden. Durch die Polarisierung kommt es zu einer lokalen Zerstörung der Zellmembran mit einer initialen Ausbildung von hydrophoben Poren, welche sich hiernach für eine kurze Lebensdauer von wenigen Minuten in hydrophile Poren umwandeln. Dann kann das Plasmid in die Zelle migrieren, ohne dass sie in die Wirt-DNA eingebaut wird.

Hierfür werden zunächst die Zellen mit PBS gewaschen und bei 1200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. 10^7 Zellen werden in 0,2 ml RPMI-Medium zusammen mit 50µg Plasmid-DNA in ein geeignetes Gefäß gegeben und zunächst auf Eis gelagert (5 Minuten). Für die Elektroporation ist ein Widerstand von 100 Ω bei einer Spannung von 210 V notwendig. Der Vorgang dauert etwa 50-55 Sekunden, die transfizierten Zellen werden dann erneut kühlgelagert (15 Minuten auf Eis) und anschließend in 10ml Medium bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Isolierung der Gesamt-mRNA eukaryontischer Zellen

Verwendete Puffer und Chemikalien:

- Extraktionspuffer (RNAzol™ B (Tel-Test, Texas, USA):
- 4 M Guanidinthiocyanat
- 25 mM Natriumcitrat, pH 7.0
- 0,5% (w/v) Sarkosyl
- 0,1M beta-Mercaptoethanol
- 0,2 M Natriumazetat, pH 4.0
- Phenol

Aufgrund ihrer Struktur, insbesondere wegen der zusätzlichen 2'-Hydroxylgruppe im Ribosering, ist RNA anfällig für einen exo- bzw. endonukleolytischen Abbau. Um daher die ubiquitär vorhandene RNase-Aktivität zu minimieren, wurde im besonderen Maße auf einen sterilen Umgang mit RNA geachtet. So wurden Glas- und Metallgeräte für 4h bei 200°C trockener Hitze sterilisiert, weniger hitzebeständige Kunststoffmaterialien wurden autoklaviert.

Zudem diente Diethylpyrocarbonat (DEPC), als potenter RNase-Inhibitor [38], zur Herstellung RNasefreier Lösungen.

Zunächst wurden zur m-RNA-Isolierung 10^8 Zellen in 20 ml eines Extraktionspuffers, das RNAzolTM B (Tel-Test, Texas, USA), aufgenommen. Dieses beinhaltet Guanidinthiocyanat, welches sich durch seinen chaotropen Charakter auszeichnet und aufgrund dessen zum einen zur Denaturierung von Proteinen und zum anderen zur Inaktivierung der RNase beiträgt. Die anschließende CHCl_3 / Phenol-Extraktion diente zur Separation der restlichen Proteine vom Isolat. Dabei reichert sich die m-RNA in der wässrigen und Proteine in der Interphase an. Die eigentliche RNA-Isolierung konnte dann durch Fällung mit Isopropanol erfolgen.

Durchführung:

Nach der Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammern wurden 10^8 Zellen isoliert und zweimalig mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde im Anschluss der Waschschrte entfernt und das Zellpellet in 20 ml RNAzolTM B resuspendiert und gut gevortext. Anschließend wurde 1/10 (v/v) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1[v:v]) hinzugefügt, lange gevortext und 15 min bei 12000 x g kalt zentrifugiert. Die in der oberen wässrigen Phase befindliche RNA konnte dann ohne Mitnahme der proteinhaltigen Interphase in neue sterile Eppendorff-Cups überführt werden. Die Fällung erfolgte unter Zugabe der äquivalenten Menge an Isopropanol für 1 h auf Eis. Als Fällhilfe eignete sich 1µl Glycogen pro Eppendorff-Cup. Nach 30minütiger Zentrifugation (13000 x g) bei 4°C konnte die RNA konzentriert und im Anschluss mit 75% (v/v) Ethanol (mit DEPC-Wasser hergestellt) gewaschen werden. Zum Schluss wurde das Pellet durch Invertieren der Eppendorff-Cups luftgetrocknet, in DEPC-Wasser aufgelöst und nach einer Konzentrationsbestimmung der RNA bei -80°C aufbewahrt.

Quantitative Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration

Größere DNA-/RNA- Mengen können spektralphotometrisch in ihrem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm erfasst werden. Durch Bestimmung der Extinktion bzw. der optischen Dichte (OD) lassen sich die Konzentrationen der Nukleinsäuren durch folgende Beziehung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmen.

Quantitative Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration	
DNA-Struktur	Konzentration der Nukleinsäuren bei $OD_{260}=1$
doppelsträngige DNA	50 μ g/ml
einzelsträngige DNA	30 μ g/ml
einzelsträngige RNA	40 μ g/ml

Tabelle 7 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration

Die Proben werden zur Messung adäquat verdünnt (meist 1:500[v:v]). Die Extinktion wird dann nach entsprechender Eichung des UV/Vis- Spektrophotometers in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260nm und 280 nm gemessen. Mit Hilfe der zusätzlichen Bestimmung der OD_{280} ist es möglich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren zu treffen. Die $OD_{260/280}$ - Ratio sollte zu diesem Zweck zwischen 1,8 und 2 liegen. Ein zu kleiner Wert spricht für eine Kontamination mit Proteinen, größere Werte sprechen für eine hohe Reinheit.

Umschreiben in c-DNA

Da für molekularbiologische Anwendungen wie die PCR (Polymerasekettenreaktion) nur DNA als Template anwendbar ist, muss die ohnehin anfällige RNA mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, in c-DNA transkribiert werden. Zur Anwendung kommt dabei die aus Moloney-Maus-Leukämie-Virus gewonnene MMLV-RT, die ein Temperaturoptimum bei 37°C und ein pH-Optimum von 8,3 hat [108]. Um die Transkription in Gang zu setzen, pipettiert man in einem RNasefreien Röhrchen 3-5 μ g RNA gelöst in 10 μ l DEPC-Wasser und fügt 1 μ l 2.5 pmol Primer (Hexamere) hinzu, so dass ein Gesamtvolumen von 11 μ l entsteht. Der Mix wird für 2-5 Minuten bei 70°C erhitzt und sofort im Anschluss auf Eis gestellt. Für die weitere Synthese werden die folgenden Komponenten gemäß Tabelle 8 ergänzt (ad 20 μ l) und für 1h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird dann durch 10minütiges Erhitzen bei 70°C terminiert.

Pipettierschema zur reversen Transkription laut Herstellerangaben	
Komponenten	Volumen
dNTP	1µl
5 x RT-Puffer	4µl
0,1M DTT	2µl
RNase-Inhibitor (RNAguard® 25U/µl)	1µl
Reverse Transkriptase (Superscript® 200U/µl)	1µl
<i>5 x RT-Puffer : 250mM tris-HCL (pH 8.3), 375 mM KCl, 15mM MgCl₂ und 0,1 M DTT</i>	

Tabelle 8 Pipettierschema zur reversen Transkription

DNA-Fällung

Um spezielle Proteinverunreinigung aus Nukleinsäurelösung zu entfernen, hat sich die Anwendung eines Phenol/Chloroform-Gemisches angeboten. Phenol dissoziiert Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten, wobei sich die denaturierten Proteine in der wässrigen Phase anreichern. Damit diese nicht in die DNA-Phase übergehen, muss vor Gebrauch das Phenol mit Tris-HCl auf pH 8.0 äquilibriert werden. Das Chloroform ist ein Gemisch aus 24 Teilen Chloroform und 1 Teil Amylalkohol, welches ein Aufschäumen und die Ausbildung einer intensiven Interphase vermeidet. Die DNA-Proben werden mit dem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v:v:v) versetzt und für 3 Minuten bei 1600 x g zentrifugiert. Es entstehen zwei Phasen, bei der die obere DNA-haltig ist. An der Phasengrenze sammeln sich die denaturierten Proteine als weiße Bande an. Die wässrige Phase wird überführt, nochmals 1:1 mit Phenol und Chloroform aufgeschüttelt und zentrifugiert, um noch vorhandene Proteinverunreinigungen zu eliminieren. Um das restliche Phenol zu extrahieren, wird die DNA-haltige Phase abschließend nur noch mit Chloroform behandelt und bei 1000 x g für 5 Minuten (RT) zentrifugiert. Die DNA wird mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumazetat-Lösung, pH 5.5 und 2 Volumen 70% (v/v) Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Durch 15minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 12000 x g wird das Präzipitat konzentriert und mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Abschließend wird das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 10 mM TE-Puffer aufgelöst.

Spaltung von DNA mithilfe von Restriktionsendonukleasen

Eine analytische Spaltung von (Plasmid-) DNA wurde unter Verwendung mitgelieferter Puffersysteme nach entsprechenden Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Je nach Beschaffenheit der DNA und der Anzahl der Schnittstellen wurden 1-5 Units Restriktionsendonukleasen pro Mikrogramm DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Definitionsgemäß handelt es sich bei einer Unit (Enzymeinheit) um die Menge an Endonukleasen, die innerhalb einer Stunde 1 µg DNA spaltet. Der Verdau konnte durch 20minütiges Erhitzen bei 68°C beendet werden. Die Elektrophorese der Reaktionsprodukte in Agarosegel bewies schließlich den Erfolg der Spaltung.

Elution von DNA aus Agarosegelen

Eine Eigenschaft der DNA ist es, in hoher Salzkonzentration an Glasmilchpartikeln (silica-gel based beads) zu binden [53]. Diese Tatsache macht man sich zur DNA-Isolation aus Agarosegelen zu Nutze. Fertige Kits, wie in diesem Falle Qiaex II (Qiagen, Hilden) erleichtern dabei die Handhabung. Prinzip dieses Kits ist es, die ethidiumbromidgefärbte Bande aus dem Agarosegel zu isolieren, die Agarose mithilfe chaotroper Salze zu lösen und die DNA an die silica beads zu binden. Durch Waschschrte werden die restliche Agarose sowie weitere Verunreinigungen entfernt. Die DNA kann dann durch Puffer mit niedriger Salzkonzentration bzw. durch steriles Wasser eluiert werden. Neben der Salzkonzentration spielt ein optimaler pH-Wert eine wichtige Rolle. So ist die DNA-Bindung bei einem pH von 7.5 am günstigsten. Der Puffer QX 1 von Qiagen beinhaltet einen pH-Indikator, bei welchem bei Übersteigen der Puffer-Kapazität die Farbe (von gelb nach orange/violett) umschlägt. Durch Zugabe von 3M Natriumazetat, pH 5 kann dieser wieder optimiert werden.

Durchführung

Die DNA-Bande wird aus dem Agarosegel geschnitten und gewogen.

Anschließend wird 300µl Puffer QX1 pro 100 mg Gel hinzugefügt. Die Silikapartikeln in der QiaexII-Suspension (30 µl) werden durch Vortexen resuspendiert und zu den Agaroseblöcken gegeben. Es folgt eine Inkubation von 10 Minuten bei 50 °C, bei dem alle 2 Minuten die Suspension gevortext wird. Durch Zentrifugation (12000 x g, sec bei RT) kann der agarose-/proteinhaltige Überstand verworfen und die DNA-haltige Silikamatrix mit Puffer QX1 zweimalig gewaschen werden. Dem mitgelieferten Puffer PE wird vor der 1. Nutzung 70% Ethanol zugegeben, welcher beim letzten Waschschrte dazu beiträgt, die Reste von Puffer QX1 zu entfernen. Das Pellet wird im Anschluss des letzten Waschvorgangs

luftgetrocknet. Die DNA wird schließlich durch die Zugabe von entweder TE (10mM TrisCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0) bzw. Wasser eluiert. Durch Zentrifugieren (12000 x g, 30 sec, RT) kann nun der eluathaltige Überstand in ein steriles Eppendorffgefäß überführt werden.

Plasmidisolierung

Präparative Plasmidisolierung kleiner DNA-Mengen

Einzelne Komponenten des QIAprep Spin Miniprep Kits		
Puffer	Komponenten	Konzentration
P1 (Resuspensionspuffer)	Tris-HCl pH 8.0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
P2 (Lysepuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1%
N3 (Neutralisierungspuffer)	KAc pH 5.5	3 M
PE (Waschpuffer)	Tris-HCl pH 8.5	10 mM
	EDTA	1 mM
<i>Dem Waschpuffer PE wird vor der ersten Benutzung 96% Ethanol hinzugegeben</i>		

Tabelle 9 Einzelne Komponenten des QIAprep Spin Miniprep Kits

Kleine Mengen an Plasmid-DNA werden mithilfe des Miniprep Kits von Qiagen (Hilden) isoliert. Die präparative Isolierung besteht aus den drei folgenden Reaktionsschritten:

1. Alkalische Lyse der Bakterien
2. Adsorption der Plasmid-DNA an der Silika-Matrix im Hochsalzpuffer
3. Waschen und Elution der Plasmid-DNA in Niedrigsalzpuffer

Die Benutzung von Phenol und ein anschließendes Präzipitieren mit Ethanol werden dabei überflüssig. Die alkalische Lyse der Bakterien mit NaOH/SDS bewirkt, dass die Proteine und die lineare chromosomale DNA irreversibel denaturieren [5], während RNA durch die RNase verdaut wird. Durch Zugabe von saurem Kaliumazetat kommt es aufgrund der hohen Salzkonzentration zur Präzipitation der Zelltrümmer, des SDS und der unwiderruflich denaturierten Nukleinsäuren. Gleichzeitig wird das Lysat neutralisiert und die kurze Plasmid-DNA renaturiert in diesem Milieu. Im weiteren Verlauf kann die Plasmid-DNA an die

Silikamembran der Qiagen-Säulen gebunden werden. An der Oberfläche dieser Glasmilchpartikel haften positiv geladene DEAE-Gruppen (Diethylaminoethanol), welche mit den negativen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates im Hochsalzmilieu wechselwirken. Verunreinigungen werden durch Waschpuffer aus der Säule ausgewaschen. Fügt man zum Schluss Puffer mit niedriger Salzkonzentration auf die Mitte der Membran, kommt es zur Elution reiner Plasmid-DNA.

Durchführung:

Für die Lyse werden 3 ml LB-mediumhaltige Kultur mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und für 8-12h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Um eine Selektion antibiotikaresistenter Bakterien zu gewährleisten, setzt man dem LB-Medium vor Gebrauch 0,1 mg/ml Ampicillin hinzu. Die Bakterien werden dann bei 4000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und in 250 µl Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Durch weitere Zugabe von 250 µl P2 (Lysepuffer) und durch mehrfaches Invertieren der Reaktionsgefäße werden die Zellen vollständig lysiert. Zelltrümmer und andere Kontaminationen können im Anschluss mithilfe der Gabe von 350µl Neutralisierungspuffer N3 präzipitiert und durch 10minütige Zentrifugation bei 12000 x g als Pellet konzentriert werden. Der plasmidhaltige Überstand wird auf die QIAprep spin Säulen überführt und für 30 Sekunden zentrifugiert.

Damit die Plasmid-DNA nicht durch Nukleaseaktivität verdaut wird, gibt man auf die Säule 0,75 ml des Waschpuffers PE hinzu, zentrifugiert für 30 Sekunden, verwirft den Durchfluss und zentrifugiert erneut um die Reste des Waschpuffers zu entfernen. Die Säulen werden über neue sterile Reaktionsgefäße platziert, in denen die reine Plasmid-DNA nach Zugabe von 100 µl des Elutionspuffers (TE) und 60sekündiger Zentrifugation bei 12000 x g aufgefangen wird. Bei einer großen Anzahl von Proben empfiehlt es sich aufgrund der erleichterten Handhabung, dass vacuum manifold der Firma Qiagen (Hilden) zu verwenden.

Präparative Plasmidisolierung großer DNA-Mengen

Einzelne Komponenten des NucleoBond® PC 500Kits		
Puffer	Komponenten	Konzentration
S1	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A pH 8.0	100 µg/ml
S2	NaOH	200 mM
	SDS	1%
S3	KAc pH 5.1	2.8 M
N2	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	900 mM
	Triton X-100 mit H ₃ PO ₄ auf pH 6.3 eingestellt	0,15 %
N3	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCL mit H ₃ PO ₄ auf pH 6.3 eingestellt	1.15 M
N5	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCL mit H ₃ PO ₄ auf pH 6.3 eingestellt	1 M

Tabelle 10 Komponenten des NucleoBond® PC 500 Kits

Zur Plasmidisolierung großer DNA-Mengen (100-500 µg) hat sich das NucleoBond® PC 500 Kit der Firma Machery und Nagel (Düren) bewährt, welches sich durch eine qualitativ hochwertige Ausbeute an Plasmid-DNA auszeichnet. Die Präparation wird dabei durch eine modifizierte alkalische Lyse eingeleitet und durch Zugabe von Kaliumazetat neutralisiert (vergleichbar mit der „Minipräparation, siehe oben). Das Lysat wird nachfolgend filtriert und auf zuvor äquilibrierte Anionenaustausch-Säulen gegeben.

Diese beinhalten - neben einer Silikamatrix - funktionell wirksame Methylethylamine, welche durch ihre (positive) Ladung zu einer festen Bindung mit den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates beitragen. Voraussetzung dafür ist ein Milieu mit niedriger Salzkonzentration.

Die Plasmid-DNA verbleibt somit in der Säule, während Verunreinigungen wie Proteine, Kohlenhydrate oder andere Zelltrümmer diese passieren. Durch Erhöhung der Salzkonzentration kann die Plasmid-DNA eluiert und durch Isopropanol präzipitiert werden. Nach Reinigen des Pellets mit Ethanol wird die DNA in 50 mM TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Durchführung:

Vorbereitung der Bakterien

Laut Hersteller wird zur Kultivierung der Bakterien LB (Luria-Bertani) Medium empfohlen. Zu diesem Zweck werden 200 ml LB-Medium, welches zusätzlich 0,1 mg/ml Ampicillin beinhaltet, mit einer Einzelkolonie aus einer in der späten log-Phase befindlichen Vorkultur inokuliert. Die Kultur wird bei 37°C für 12-16h bei 225rpm im Schüttler inkubiert. Für die weitere Aufbereitung wird die LB-Kultur bei 4500 x g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Lyse der Zelle

Das Zellpellet wird in 12 ml des Puffers S1 resuspendiert.

Die anschließende Zugabe von 12 ml der alkalischen Lösung S2 führt nach 2-3minütiger Inkubation bei RT zur vollständigen Lyse. Zu beachten ist, dass aufgrund der Scherkräfte die Suspension nicht gevortext werden darf. Empfohlen wird anstelle dessen das vorsichtige Invertieren der Reaktionsgefäße. Zur Neutralisation des Lysats einerseits und der Präzipitation denaturierter chromosomaler DNA sowie weitere nicht verwendbare Bestandteile andererseits fügt man 12 ml eiskaltes S3 hinzu, invertiert 6-8mal und inkubiert das Reaktionsgemisch für 5 Minuten auf Eis. Im weiteren Verlauf kann die Plasmid-DNA durch die Benutzung eines Filters nahezu komplett von Zelltrümmern und dem SDS separiert werden.

Binden der DNA an der Anionenaustausch-Säule

Die Anionenaustausch-Säule wird vor Gebrauch mit 6 ml N2 äquilibriert und anschließend mit dem Filtrat beladen. Es folgen zwei Waschschrte mit je 16 ml N3.

Elution und Präzipitation der Plasmid-DNA

Durch Zugabe von 15 ml der salzreichen Lösung N5 kann das DNA-haltige Eluat in einem neuen sterilen Röhrchen aufgefangen und mit 11 ml Isopropanol durch 30minütige Zentrifugation (15000 x g) bei 4°C präzipitiert werden.

Waschen und Trocknen des DNA-Pellets

Das Pellet wird abschließend in 5 ml 70% Ethanol resuspendiert und bei 15000 x g für 10 Minuten gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wird in 300 µl TE-Puffer aufgelöst, photometrisch quantifiziert und bei -20°C aufbewahrt.

Klonierung***Polymerasekettenreaktion (PCR)***

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) ermöglicht definierte Nukleotidsequenzen nach dem Vorbild der semikonservativen Replikation enzymatisch zu vervielfältigen. Ausgehend von einem Startermolekül, den sogenannten Primern (synthetische Oligonukleotide), wird komplementär zu einer einzelnen DNA-Matrize (Template-DNA) mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und der Zugabe von Nukleotiden ein neuer Strang synthetisiert. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte erreicht man eine exponentielle Amplifikation der Matrize.

Der Reaktionsablauf lässt sich in drei Schritten zusammenfassen:

1. Thermische Denaturierung zu Einzelsträngen

Hierbei wird der DNA-Doppelstrang bei 95°C in zwei einzelsträngige Template-DNA-Moleküle aufgeschmolzen.

2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge (Annealing)

Durch Abkühlen auf eine für die Primer adäquate Annealing-Temperatur lagern sich zum Start der Polymerisation die Primer komplementär an die zu amplifizierende DNA-Sequenz an. Zur Bestimmung der Annealing-Temperatur orientiert man sich an die Schmelztemperatur, bei der 50% der betrachteten DNA-Moleküle denaturiert sind. Die Schmelztemperatur T_m eines Primers der Größe bis zu 25 bp kann anhand der Zusammensetzung aus GC- und AT-Paaren wie folgt berechnet werden.

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2^{\circ}\text{C} \times (n\text{A} + n\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (n\text{G} + n\text{C})$$

n = Anzahl der Basen Adenin, Thymin, Guanidin, Cytosin

Um zu gewährleisten, dass die Primer an ihre vollständig komplementäre Sequenz binden, wird normalerweise die Annealing-Temperatur 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt.

3. Polymerisation des komplementären Stranges mithilfe der DNA-Polymerase (Extension)

Nach Primerhybridisierung synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Zweitstrang. Folge ist die Amplifikation des Sequenzabschnitts, welches von den beiden Primern flankiert wird. Gewöhnlich wird die hitzestabile Taq-Polymerase verwendet; ihr Temperaturoptimum liegt bei etwa 72°C. Nachteil der Taq-Polymerase ist die fehlende 3'5'-Exonuclease-Aktivität. Zu Klonierungszwecken, bei der ein PCR-Produkt mit niedriger Fehlerrate erforderlich ist, eignet sich deshalb eher die Pfu-Polymerase. Diese weist eine Proofreading-(3'5'-Exonuclease-)Aktivität auf: Falsch eingebaute Desoxynukleotide werden erkannt und entfernt. Die Pfu-Polymerase besitzt im Übrigen das gleiche Temperaturoptimum wie die Taq-Polymerase. Die PCR-Reaktion wird in Thermocyclern durchgeführt. Diese bestehen aus einem Reaktionsraum, dessen Temperatur durch manuelle Programmierung automatisch entsprechend des Reaktionsschrittes gesteuert werden kann. Ein solches Programm kann man der folgenden Tabelle entnehmen.

Allgemeiner Reaktionsablauf im PCR-Thermocycler (bei Verwendung von Taq-/Pfu-Polymerase)			
Schritt	Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initiale Denaturierung	96	5
2	Denaturierung	96	1
3	Primer-Hybridisierung	$T_m - 5$	1.30
4	Elongation	72	1.30
2-4	Wiederholung der Schritte 2-4; Anzahl der Zyklen zwischen 25-35		
5	Abschließende Elongation	72	10
6	Schutz vor Degradation	4	∞

Tabelle 11 Reaktionsablauf im Thermocycler bei Verwendung von Taq-/Pfu-Polymerase

Durchführung

Je nach Polymerase werden zwei verschiedene Reaktionsansätze vorbereitet:

Reaktionsansatz für Taq-Polymerase:

5	µl	10 X PCR Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)
2	µl	50 mM MgCl ₂
2	µl	Template-DNA
1	µl	sense-primer (10 pmol)
1	µl	antisense-primer (10 pmol)
1	µl	dNTP Mix (10 mM von je ATP, GTP, CTP and TTP)
0.5	µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
37	µl	HPLC-H ₂ O

Reaktionsansatz für Pfu-Polymerase:

10	µl	10 X PCR Puffer (200 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM KCl)
1	µl	50 mM MgCl ₂

Die Komponenten des Reaktionsansatzes werden zusammen in ein 0,5 ml großes Reaktionsgefäß gegeben und kurz zentrifugiert.

Bevor die Proben in den Thermocycler überführt werden, überschichtet man das Reaktionsgemisch mit 2 Tropfen Mineralöl.

Das Programm des Thermocyclers wird gemäß des in der Tabelle 11 aufgeführten Schemas unter Berücksichtigung der jeweiligen Primer-Eigenschaften gestartet.

Nach Beendigung des Programms wird das Produkt gelelektrophoretisch analysiert.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung linearer DNA-Fragmente für präparative oder analytische Zwecke hat sich das Agarosegelsystem als Standardmethode bewährt. Durch Veränderung der Agarose-Konzentration kann dabei der Trennbereich der DNA-Fragmente von 0,1 bis 60 kb variiert werden (siehe Tabelle 12). Die Wahl der Agarose-Konzentration richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäure. Das Polysaccharid wird zu diesem Zweck in einem adäquaten Verhältnis mit 1 x TAE-Puffer verdünnt und in einem Mikrowellengerät aufgeköcht bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nachdem die Lösung auf 50°C heruntergekühlt ist, wird dieser 1 µg/ml Ethidiumbromid supplementiert. In einer Gelkammer wird eine Taschenschablone eingesetzt während eventuelle Undichtigkeiten

mit einem Klebeband entfernt werden. Die noch warme Agaroselösung kann nun entsprechend dem Volumen der Kammer luftblasenfrei hineingegossen werden und sollte bei Raumtemperatur nach 30-60 Minuten erstarren. Die Proben werden mit 1/6 ihres Volumens mit Probenauftragspuffer (Gibco BRL, Paisley, Schottland) versetzt und in die durch die Schablone geformten Taschen gegeben. In der äußeren und in der mittleren Tasche wird zur Größenbestimmung und zur Zuordnung der DNA-Fragmente ein Größenstandard mitgeführt. Die Gelelektrophorese läuft in einer mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Kammer bei 3-5 V/cm. Unter diesen Bedingungen sind die Phosphatgruppen der DNA ionisiert, so dass sie sich je Molekülgröße im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode unterschiedlich schnell fortbewegen. Aufgrund der interkalierenden Eigenschaft des Ethidiumbromids können die DNA-Fragmente unter UV-Licht bei 302 nm visualisiert und fotografisch dokumentiert werden.

Der Vergleich mit dem Standardmarker lässt dann eine Größenzuordnung zu.

Trennbereiche für lineare DNA-Fragmente	
Agarose-Konzentration in % (w/v)	Kettenlänge in kbp
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Tabelle 12 Trennbereiche für lineare DNA-Fragmente in Agarosegelen

PCR-Aufreinigung

Bevor das PCR-Produkt für weitere molekularbiologische Methoden, wie z. B. Klonierungsreaktionen, nested PCR oder Sequenzierung, eingesetzt werden kann, ist es empfehlenswert die ds-DNA zunächst aufzureinigen. Hierfür hat sich das QIAquick PCR Purification Kit[®] von Qiagen (Hilden) bewährt. Prinzip des Kits beruht auf eine Silikamatrix, welche salz- und pH- abhängig die DNA in einer Säule bindet (siehe oben). Kontaminationen

werden mit einer mitgelieferten Pufferlösung aus der Säule gewaschen und als Durchfluss verworfen. Die gereinigte DNA wird mit Wasser bzw. einer hypotonen Lösung eluiert.

Durchführung:

Zunächst wird 500 µl der Pufferlösung PB1 zum PCR-Produkt gegeben.

Durch Zugabe des Reaktionsgemisches auf die mitgelieferte QIAquick spin Säule und Zentrifugation für 30- 60 Sekunden wird die DNA an den Glasmilchpartikeln in einem geeigneten Milieu gebunden. In einem zusätzlichen Waschschrift mit Puffer PE (0,75 ml) sollen übriggebliebene Verunreinigungen eliminiert werden. Die Säule wird für die Elution über ein neues Reaktionsgefäß platziert. Zuletzt fügt man in der Mitte der QIAquick Membran 30 µl des Elutionspuffers hinzu, inkubiert für 1 Minute und zentrifugiert bei maximaler Geschwindigkeit. Die aufgereinigte DNA ist somit für weitere molekularbiologische Einsatzmöglichkeiten verwendbar.

Ligation

Verwendete Chemikalien/ Puffer

T4- DNS-Ligase

10 x Ligationspuffer: 250 mM Tris-HCl pH7.6
50 mM MgCl₂
50 mM DTT
5 mM ATP

Um eine (Passagier-)DNA in einem linearisierten Vektor zu inserieren, wird mithilfe einer Ligase die 3'-Hydroxylgruppe mit der 5'-Phosphatgruppe der endständigen Nukleotide verestert. Dabei wird das durch Restriktionsenzym vorbehandelte Plasmid (25ng) mit einem 10fachen molaren Überschuss an Insert in einem Reaktionsansatz zusammen mit 1µl Ligase 4 U/µl (gewöhnlich T4 DNA Ligase) und 1 µl 10x Ligationspuffer (ATPhaltig) in einem Endvolumen von 10 µl gemischt und für 1h bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz kann anschließend für die Transformation in kompetente Zellen eingesetzt werden.

Herstellung kompetenter Zellen

Verwendete Medien/Puffer

LB-Medium 1% (w/v) Bacto-Trypton
 (autoklaviert) 0,5% (w/v) Hefeextrakt
 1,5% (w/v) NaCl eingestellt auf pH 7.0

TFP I 100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 10 mM CaCl₂
 30 mM Kaliumazetat
 15 % (w/v) Glycerin
 Acetic acid pH 5.8

TFP II 10 mM MOPS (pH 6.8)
 10 mM RbCl
 15 mM CaCl₂
 15 % (w/v) Glycerin
 Acetic acid pH 5.8

Zellen, die während der Zellteilung in der Lage sind externe DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, bezeichnet man als „kompetent“. Zur Herstellung kompetenter Zellen hat sich die CaCl₂ – Methode bewährt [55]. Eine einzelne Kolonie des E.coli-Stammes JM 109 wird von einer Agar-Platte isoliert und in 10 ml eines LB-Mediums inokuliert. Eine 50 ml Kulturflasche eignet sich hierbei aufgrund der ausreichenden Luftzufuhr als Reaktionsgefäß. Nach Inkubation über Nacht wird 1 ml der Übernacht-Kultur in 100 ml LB-Medium einer 1000 ml Kulturflasche gegeben und für 4-6h im Schüttler kultiviert. Ist eine OD₅₅₀ =0,5 erreicht, werden die Zellen zunächst für 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei 4000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird durch Invertieren der Reaktionsgefäße getrocknet, anschließend in 40 ml eiskaltes TFP I durch Vortexen resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Zellen werden erneut bei 3000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 4 ml eiskaltes TFP II resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen dieser Suspension sind nun kompetent und können in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80°C im Stickstoffbehälter aufbewahrt werden.

Transformation in kompetente Zellen

Kompetente Zellen der E.coli-Charge JM 109 werden bis zum Verschwinden der letzten Eisklumpchen auf Eis aufgetaut. Damit die Bakterien die zu transformierende DNA absorbieren, fügt man auf 100 µl der Zellen 100-200 ng Plasmid-DNA hinzu und inkubiert diesen Ansatz für 30 Minuten bei 0°C. Danach werden die Zellen bei 42°C für 90 Sekunden im Wasserbad hitzebehandelt und im Anschluss unverzüglich auf Eis für 2 Minuten gekühlt. Durch die Zugabe von 800 µl SOC-Medium können sich die Zellen im Schüttler bei 220rpm für 40 Minuten bei 37°C wieder erholen. Zwischen 20 und 500 µl der Bakteriensuspension werden nachfolgend auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C kultiviert. Nach 12-16 Stunden lassen sich gewöhnlich einzelne Kolonien abgrenzen. Als Selektions-Marker eignen sich Antibiotikaresistenzgene, die vom transformierten Plasmid exprimiert werden (Ausnahme: Insertionsinaktivierung durch Fremdgen). Rekombinante und damit plasmidhaltige Klone wachsen im selektiven Medium, während Bakterien, die keine Fremd-DNA aufgenommen haben, unter Antibiotika-Einfluss absterben.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA führten wir nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. durch. Hierbei werden Oligonukleotide, die Sequenzierprimer, an die zu analysierende DNA hybridisiert. Die weitere DNA-Synthese erfolgt durch die Zugabe von allen vier dNTPs und zusätzlich durch die Gabe von 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphat (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) katalysiert durch eine für die Sequenzierung optimierte DNA-Polymerase. Es finden demnach in einem Reaktionsansatz sowohl der Einbau von dNTPs als auch von ddNTP statt. Dabei führt letzteres zum Kettenabbruch. Hieraus resultiert ein Reaktionsansatz mit einer Mischung DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese können durch fluorophormarkierten ddNTPs in speziellen Sequenzierautomaten detektiert werden. Wir verwendeten ein Sequenzierkit von ABI PRISM® (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt)). Hiernach werden zu 0,5µg DNA und 15 ng Primer 1µl Big Dye Ready Reaction Mix (AmpliTaQ® DNA Polymerase FS, dNTPmix, fluorescein-labeled ddNTPs) sowie 3 µl Sequencing Puffer (200 mM Tris-HCl pH:9,0, 5 mM MgCl₂) auf insgesamt 10 µl gegeben. Die anschließende PCR-Reaktion bestand aus 25 Zyklen. Dabei wurde die DNA für 10 Sekunden bei 96°C denaturiert, die Primerhybridisierung erfolgte bei 50°C für 5 Sekunden, die Elongation bei 60°C für 4 Minuten. Die nachfolgende Auswertung der Nukleotid-Syntheseprodukte fand am Sequenzierautomat von ABI PRISM 310 Genetic Analyser statt.

Gerichtete Mutagenese („site-directed mutagenesis“)

Das Prinzip der gerichteten Mutagenese beruht auf die Einführung zweier Oligonukleotid-vermittelten Mutationen ins Plasmid [133]. Entscheidend ist dabei die Anwendung von zwei mutagenen Primern, die als Matritze für die In-vitro-Neusynthese der gewünschten Plasmid-DNA dienen. Ein Primer fungiert dabei als sogenannter „target primer“; dieser enthält die geplante Mutation. Ein zweiter Primer, der Selektionsprimer, zerstört in seiner Sequenz eine unikale, non-essenzielle Restriktionsschnittstelle ganz im Sinne der von Deng und Nickoloff etablierten Methode der „Unique site elimination“ [29]. Das PCR-Produkt wird im weiteren Verlauf mit dem Restriktionsenzym behandelt, dessen Schnittstelle in den mutierten Plasmiden entfernt wurde. Folge ist die Linearisierung der Wild-Typ Plasmide während die mutierten Plasmide zirkulär bleiben. Da linearisierte DNA deutlich weniger effizient in Bakterien transformiert werden können, sammeln sich die Mutanten an. Um dennoch zu sichern, dass nur mutierte Plasmide transformiert werden, unterzieht man den Plasmiden nach Isolierung eine erneute Spaltung mit der Restriktionsendonuklease. Die selektierten Plasmide werden abschließend in die gewünschten kompetenten Zellen transformiert und können durch Sequenzierung analysiert werden. Abbildung 5 stellt eine schematische Vereinfachung der gerichteten Mutagenese dar.

Durchführung

Es wurde mit dem U.S.E-Mutagenese-Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech gearbeitet.

1. Wahl der Primer

Als unikale Restriktionsschnittstelle der pcDNA 3 wurden die der Endonuklease SMA I sowie der PVU I gewählt. Die dazugehörigen Primersequenzen werden derart konzipiert, dass ein „mismatch“ zur korrespondierenden Schnittstelle entsteht. Daraus resultieren mutierte Plasmide, bei denen die SMA I bzw. PVU I-Schnittstelle fehlt. Bei der Wahl der Target Primern ist das Ziel, die Aminosäure 181 Aspartat gegen Alanin (DN-181Ala) auszutauschen. Konsequenz ist die Bildung einer dominant negativer Variante der PTP1B [40]. Zu diesem Zweck wurde das Triplet GAC (541-543 der PTP1B-Sequenz) durch GCA für die 181-Alanin-Mutation ersetzt. Diese Kombinationen wird bei der Wahl der Primer berücksichtigt, so dass folgende Primersequenzen für die Mutagenese zum Einsatz kommen:

Selektionsprimer für die PVU I Schnittstelle:

5`CTT ACT TCT GAC AAC GAA AGG AGG ACC GAA GA 3`

Selektionsprimer für die SMA I Schnittstelle:

5`GGA TAT ACA AGC TCA GTT GAG CTT TTT GCA AAA GC 3`

Target Primer für die 181 Alanin-Mutationen (Klon der DN-181Ala):

5`GAT TCA GGG ACT CCA AAT GCA GGC CAT GTG GT 3`

2. Phosphorylierung der Primer

Damit die Primer am 3'-Ende der neu synthetisierten DNA ligiert werden können, müssen diese zuvor an ihrem 5'-Ende phosphoryliert werden.

Primer	25-300 pmol
10 x One-Phor-All-Buffer Plus	3 µl
10 mM ATP	3 µl
T ₄ -Polynukleotid Kinase (5-10 U)	2 µl
ddH ₂ O	ad 30 µl

Der Reaktionsansatz wird kurz zentrifugiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Erhitzen bei 65°C für 10 Minuten beendet die Reaktion.

3. Modifizierte PCR-Reaktion

Zunächst wird das doppelsträngige Plasmid hitzedenaturiert und die zwei mutagenen Primer hybridisieren gleichzeitig am gleichen Strang der zirkulären und nunmehr einzelsträngigen DNA. Durch Zugabe von Nukleotiden und der T₄-DNA-Polymerase wird die Neusynthese des komplementären Stranges initiiert. Entscheidend ist dabei die fehlende Proofreading-Aktivität der T₄-DNA-Polymerase. Damit sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass die mutierten Primer erkannt und „korrigiert“ werden.

Plasmid-DNA	0,025 pmol
Selektionsprimer	1,25 pmol
Target Primer	1,25 pmol
10x One-Phor-All-Buffer Plus	2 µl
ddH ₂ O	ad 20µl

Die genannten Komponenten werden in einem Reaktionsmix gemeinsam mit den zuvor kinasierten Primern zusammengefügt, für 5 Minuten bei 100°C erst inkubiert und

unverzüglich im Anschluss für weitere 5 Minuten auf Eis gekühlt. Zur Vervollständigung der Primerhybridisierung erfolgt eine weitere halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach fügt man jedem Ansatz 7 µl des Nukleotidmixes (2,86 mM von je dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 3 µl des mitgelieferten Enzymmixes (T4 DNA Ligase, 1000 U/ml, T4 DNA Polymerase, 1000 U/ml) hinzu, mischt diese kurz und inkubiert für eine Stunde bei 37°C. Die Reaktion wird durch 15minütiges Erhitzen bei 85°C gestoppt und sofort auf Eis gekühlt.

4. Spaltung mit der Restriktionsendonuklease

Plasmid-DNA	30 µl
10 x One-Phor-All-Buffer Plus	10 µl _{bei PVU I} / 5µl _{bei SMA I}
PVU I / SMA I (10 U)	2µl _{bei PVU I} / 2µl _{bei SMA I}
dd H ₂ O	ad 50 µl

Zur Selektion durch Restriktionsanalyse wird die nicht-mutierte Plasmid-DNA mithilfe der Endonukleasen (SMA I/ PVU I) für 2 Stunden bei 37°C im Reaktionsansatz aus den genannten Komponenten gespalten und anschließend auf Eis gekühlt. Die mutierten Plasmide bleiben zirkulär und können transformiert werden.

5. Erste Transformation in kompetente NM522 mutS -Zellen

Die NM 522 mutS-Zellen sind ein reparaturdefekter, mutierter E.coli-Stamm, welcher im lyophilisierten Zustand mitgeliefert wird. Daher müssen die Zellen zur Herstellung ihrer Kompetenz zunächst rekonstituiert werden. Dies erfolgt durch Zugabe von 5 ml Miller LB-Medium (2 g Bakto-Trypton, 1 g NaCl und 2 g Bakto-Hefeextrakt in 200 ml destilliertem Wasser; autoklaviert) pro Portion. Dem Medium wird zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien 15 µg/ml Tetrazyklin hinzugegeben. Die Kultur wird für 12h bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. In einer ausreichend großen Kulturflasche (500ml) werden 1 ml der Übernachtskultur in 100 ml antibiotikumhaltigen Miller-LB-Medium überführt und bis zur OD₆₀₀=0.25-0.5 bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend kühlt man die Zellen für 15 Minuten auf Eis und sammelt sie durch 15minütige Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C. Der Überstand wird verworfen, die Kultur in 1/3 des ursprünglichen Volumens vorsichtig in Competency Buffer I (20 ml 1m KCl, 1,2 ml 5 M Kaliumacetat, 12 ml 1M CaCl₂, 30 ml Glycerol, 100 ml destilliertes Wasser) resuspendiert. Nachdem die Zellen für eine Stunde auf Eis gelagert wurden, konzentriert man diese durch Zentrifugation bei 2500 x

g und 4°C für 15 Minuten, verwirft so viel vom Überstand wie möglich und resuspendiert das Pellet in 1/25 des ursprünglichen Volumens Competency Buffer II (4 ml 0,5 M MOPS, 2 ml 1 M KCl, 15 ml 1 M CaCl₂, 30 ml Glycerol und 100 ml destilliertes Wasser). Die Zellen werden erneut auf Eis für 15 Minuten gekühlt und erhalten so ihre Kompetenz. Für die Transformation fügt man zu 200 µl der kompetenten E.coli Zellen 30 µl der verdauten Plasmid-DNA hinzu und lagert den Reaktionsansatz für 30 Minuten auf Eis. Dann erfolgt die Hitzebehandlung bei 42°C für 45 Sekunden, wonach die Zellen unverzüglich auf Eis für 2 Minuten gekühlt werden. Zu den nun transformierten Zellen gibt man 1 ml SOC-Medium und inkubiert für 2 Stunden bei 37°C im Schüttler bei 180 rpm. Für die Übernachtskultur werden abschließend weitere 3 ml SOC-Medium sowie 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt und bei 37°C im Schüttler (250 rpm) inkubiert.

6. Erneute Spaltung mit SMA I/PVU I und Transformation in JM 109 Zellen

Um die Mutagenese Effizienz zu maximieren, werden die Plasmide der Übernachtskultur erneut gespalten. Zu diesem Zweck erfolgt zunächst eine Plasmidisolierung.

Dem schließt sich die zweite Runde der Restriktionsanalyse mit 50-250 ng Plasmid-DNA nach dem oben genannten Schema an. Die verdaute DNA (10 µl) wird abschließend in JM 109 Zellen transformiert und kann durch Sequenzierung analysiert werden.

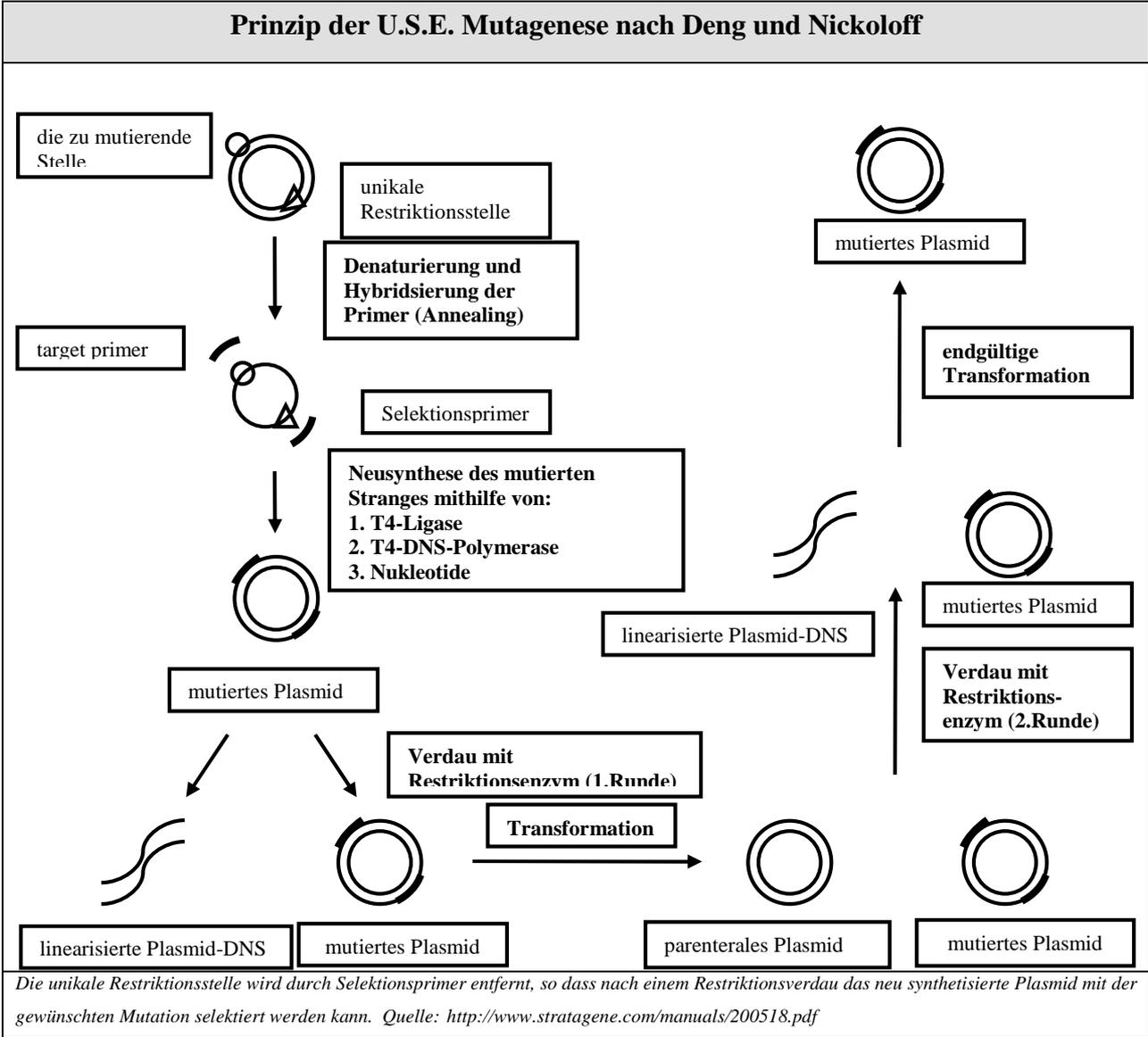


Abbildung 5 Prinzip der U.S.E. („unique site elimination“) Mutagenese

2.2.3 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Lyse der Zellen

Zur Herstellung von Lysaten werden 5×10^6 Zellen der jeweiligen Kultur mit eiskaltem PBS bei je $500 \times g$ für 10 Minuten zweimalig gewaschen, in 1 ml Eppendorffröhrchen überführt und in 100 μ l eines Lysepuffers (Zusammensetzung wie folgt angegeben) resuspendiert.

Um die Aktivität der Proteinasen im Lysat zu unterbinden, fügt man kurz vor Gebrauch des Lysepuffers Proteinase-Inhibitoren (1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF), 100 U Aprotinin, 2 mM Natriumorthovanadat (Na_3VO_4), 5 mM Leupeptin) pro 1 ml frisch hinzu.

Alle 5 Minuten werden die Röhrchen für insgesamt 30 Minuten gründlich gevortext. Dabei ist darauf zu achten, dass stets auf Eis gearbeitet wird. Bei $14.000 \times g$ (für 10 Minuten bei 4°C) wird dann der feste Zellkernüberstand vom Lysat getrennt. Die im Überstand befindlichen Lysate werden in neue sterile Gefäße vorsichtig ohne Mitnahme des Pellets abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

Lysepuffer	
Komponenten	Konzentration
Tris-HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	137 mM
Glycerol	10% (v/v)
NP40	1% (w/v)
EDTA	10 mM
NaF	100 mM
ddH ₂ O	Ad 100 ml
<i>Die Proteinase-Inhibitoren wurden erst vor Gebrauch des Lysepuffers hinzugefügt</i>	

Tabelle 13 Zusammensetzung des Lysepuffers

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinextrakte erfolgte nach der Methode von Lowry [81] mithilfe eines Protein Assays der Firma BioRad (DC Protein Assay). Die Reaktion beruht auf einer Reduktion von Folin-Reagenz im alkalischen Medium mittels Kupferartrat. Dazu bilden Proteine, insbesondere über ihre Tyrosin- und Tryptophanreste, Komplexe mit

Cu^{2+} -Ionen im Sinne einer Biuret-Reaktion. Diese Protein-Kupfer-Komplexe reduzieren das Folin-Reagenz, wobei die charakteristische blaue Färbung bei einem Absorptionsmaximum von 750 nm entsteht.

Für die Proteinbestimmung ist es erforderlich, dass eine Standardkurve mit Immunglobulinen (hier IgG) bekannter Konzentrationen erstellt wird. Auf diese Weise lassen sich - nach Messung der Extinktionen - Rückschlüsse auf unbekannte Proteinmengen schließen.

Es wird daher gemäß Tabelle 14 folgende Standardreihe erstellt. Diese wird für 15 Minuten bei RT inkubiert und dann photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=750$ nm ausgewertet.

Standardreihe zur Proteinbestimmung						
Komponente	Leerwert	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,6 mg/ml	0,8 mg/ml	Lysat
Ig G in μl	-	20	40	60	80	10
H ₂ O in μl	100	80	60	40	20	90
Lösung AS in ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lösung B in ml	4	4	4	4	4	4

Tabelle 14 Standardreihe zur Proteinbestimmung

Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Fertigung der Apparatur

Nach Reinigung von zwei Glasplatten unterschiedlicher Höhe (aber gleicher Breite) werden diese durch Spacer (Magnetstreifen) auseinandergehalten und an einer speziellen Halterung fixiert. Diese Vorrichtung, die noch Elektroden vorweist, wird dann nach dem die Gele gegossen und die Lysate aufgetragen wurden in einem Bassin eingesetzt und mit Running-Buffer aufgefüllt.

Gele gießen

Zu unterscheiden sind Trenngel und Sammelgel. Mit Hilfe eines Kammes werden Slots im Sammelgel gebildet, in deren Taschen dann das mit Sample Buffer 1:1 verdünnte Lysat aufgetragen wird. Durch die Elektrophorese werden die Proteine im Trenngel nach ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt nachdem sie mit Hilfe von SDS polarisiert wurden.

Zunächst wird das Trenngel folgendermassen gegossen:

Für 10% Gel:

H ₂ O	4,18 ml
4 x Tris Cl/SDS pH 8,8	2,5 ml
Acrylamid-Mischung 30%	3,3 ml
Temed	6,675 µl
Ammoniumperoxidsulfat 10%	66,5 µl

Das Gel wird zügig in den Glasplattenspalt gegossen und mit Isobutanol geglättet. Erst wenn das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel angesetzt:

H ₂ O	7,125 ml
4 x Tris Cl/SDS pH 6,8	3,125 ml
Acrylamid-Mischung 30%	1,635 ml
Temed	12,5 µl
Ammoniumperoxidsulfat 10%	125 µl

Nachdem das Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen wurde, wird der Kamm unter Vermeidung von Luftbläschen eingesetzt. Dieser wird nach dem Trocknen des Gels wieder entfernt.

Auftragen der Lysate

Die Lysate werden mit Sample Buffer 1:1 verdünnt; es werden 35 µg Protein eingesetzt.

Auch hier ist das Arbeiten auf Eis zu beachten. Abschließend werden die verdünnten Lysate zusammen mit einem Ladder (hier: See blue plus 2) vollständig in die zuvor mit Filterpapierstreifen getrockneten Slots aufgetragen. Das Gel läuft dann die erste halbe Stunde bei 100 V, die Elektrophorese kann anschließend durch Erhöhung der Spannung auf 200 V beschleunigt werden.

Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrocellulose (Blotten)

Im Rahmen des Semitrockenverfahrens werden mehrere Filterpapiere sowie eine Nitrocellulose-Membran der Größe 7,5 x 8,5 cm² angefertigt. Diese werden dann sinngemäß auf dem "Blotter" luftblasenfrei gestapelt, nachdem sie mit Transferpuffer befeuchtet wurden. Dann wird das Gel aus seiner Halterung gelöst und auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Es folgen abschließend weitere Filterpapiere. Mit einem Wassermann-Röhrchen werden eventuell vorhandene Luftblasen aus dem "Sandwich" entfernt. Geblottet wird bei 200 mA für eine halbe Stunde.

Zur Überprüfung ob die Lanes des Gels regelrecht mit der gleichen Proteinmenge beladen wurden, wird nach dem Blotten die Membran in Ponceau Färbelösung 5-10 Minuten inkubiert und anschließend mit TBST-Puffer "entfärbt". Die Membran lässt sich dann zwischen zwei Overheadprojektorfolien photokopieren.

Zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindestellen, werden die Blots in 5% Milch/TBST über Nacht bei 4°C blockiert.

Inkubation mit dem Erstantikörpern (Detektionsantikörpern) und Zweitantikörpern

Die Nachweisreaktion von Proteinen erfolgt jeweils gemäß den Anweisungen der Hersteller. Im Regelfall wird die Nitrocellulose für 1-2h bei RT auf einem Schüttler mit dem Erstantikörper, der zuvor mit TBST (0,05% Tween 20 in TBS) laut Protokoll verdünnt wird, inkubiert. Richtet sich der Antikörper gegen PTP1B oder Phosphotyrosin-Reste, wird dieser mit 5% Trockenmilch in TBST verdünnt. Zur Visualisierung des so entstandenen Immunkomplexes, wird im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper ein Zweitantikörper auf die Membran gegeben. Dieser richtet sich gegen die F_c-Region des ersten Antikörpers und ist an einer Peroxidase konjugiert, mit deren Hilfe nach Substratgabe (=ECL-Lösung) ein lichtemittierendes Produkt (Chemilumineszenz) entsteht.

Auf diese Weise kann das Protein (gekoppelt an Erst- und Zweitantikörper) durch Exposition mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Im Übrigen handelt es sich bei den Zweitantikörperkonjugaten meist um Antikörper, die sich gegen die F_c-Region von Hasen (rabbit), Ziegen (goat) oder Mäusen (mouse) richten.

Sinngemäß wird nach Inkubation mit dem Primärantikörper die Membran erst dreimal mit TBST gewaschen und anschließend mit der adäquaten Zweitantikörperlösung (verdünnt mit TBST) bei RT für eine weitere Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wird die Membran 5mal je 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Detektion

Zur Detektion wird in der Dunkelkammer die Membran in einem 1:1 Gemisch aus einer Luminol-Lösung und einer H₂O₂-Lösung für 1 Minute geschwenkt.

Nach einer weiteren Minute wird die Membran auf einem Filterpapier abgetropft und mit Klarsichtfolie luftblasenfrei abgedeckt.

Danach werden Röntgenfilme mit unterschiedlichen Expositionzeiten (1 Sekunde bis 20 Minuten) mit Hilfe des Blots belichtet.

Bei schwacher Lumineszenz werden Blot und Film in einer Filmkassette aufbewahrt und zu gegebener Zeit entsprechend entwickelt.

Entfernen von alten Detektionsantikörpern

Zum Entfernen von Antikörpern, die zur Detektion von bestimmten Proteinen notwendig waren, wird 2-Mercaptoethanol-Puffer, das zuvor für eine halbe Stunde bei 50°C erwärmt wurde auf die Blots gegeben und für eine weitere halbe Stunde inkubiert.

Anschließend werden die Blots 5 x 5 Minuten mit TBST gewaschen.

2.2.4 Nachweis der Differenzierung von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht eine genaue Charakterisierung von Zellen, da mit ihrer Hilfe eine Reihe von „Kenngrößen“ gemessen werden können.

So fällt ins Aufgabenfeld der Durchflusszytometrie u.a.:

- Messung der Größe, des Volumens, der Struktur und der Granulierung von Zellen
- Bestimmung der Zellvitalität
- Charakterisierung von Enzymkinetik
- Quantitative DNA-Messungen lebender Zellen
- Oberflächentypisierung

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen einer Suspension von einer Stahlkapillare so angesaugt werden, dass sie - eingebettet in einer Trägerflüssigkeit - in einem laminaren Axialstrom einzeln hintereinander fließen und auf diese Weise einer Messkammer zugeführt werden. Dabei können pro Sekunde bis zu mehrere Tausend Zellen die

Messkammer passieren. Im Bereich der Messkammer ist ein Argonlaser, welcher Licht der Wellenlänge 488 nm emittiert. Sein Laserstrahl fokussiert die Mitte des Flusskanals und trifft dabei die vorbeifließenden Zellen, die ihrerseits das Licht wiederum entweder kleinwinkelig (3-10°) oder großwinkelig (90°) ablenken. Diese Qualität der Streuung wird von einem Lichtdetektor interpretiert und kann an einem dem Zytometer angeschlossenen PC ausgewertet werden. So charakterisiert die kleinwinkelige Lichtstreuung (Vorwärtslicht, Forward angle light scatter, FSC) die Größe, während die seltenere großwinkelige Ablenkung (Seitwärtslicht, Side angle light scatter, SSC) für den Grad der Granulierung der Zellen spricht. Zur Oberflächentypisierung werden Fluorochrome (fluoreszierende Verbindungen) eingesetzt, die durch den Argonlaser angeregt werden und infolgedessen Licht in einem für die Verbindung typischen Emissionsspektrum aussendet.

Dieses wird ebenfalls über ein optisches System und anschließend am Computer visualisiert.

Die Fluorochrome werden an Antikörper gekoppelt und ermöglichen auf diese Weise eine Typisierung der Oberfläche der Zelle. Verwendet man nun zwei verschiedene Fluorochrome, die sich in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden, lassen sich folglich zwei unterschiedliche Oberflächenmarker nachweisen, wodurch die Zelle beschrieben werden kann. Eingesetzt wurden in dieser Arbeit die Fluorochrome Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und R-Phycoerythrin (PE) (denkbar wären drei verschiedene Fluorochrome in einem System).

Beide Verbindungen unterscheiden sich zwar im Wesentlichen von ihren Emissionsspektren, aber in einem kleinen Bereich gibt es Überlappung, die im Sinne eine „Fluoreszenz-kompensation“ eliminiert werden. Bei Zellen mit schwacher Fluoreszenzintensität lässt sich oftmals nicht eindeutig zuordnen, ob die Zelle positiv hinsichtlich des Antigens ist oder nicht. Zu diesem Zweck wird mit Hilfe einer Isotypen-Kontrolle ein „Cut-off“ Punkt gesetzt.

Das bedeutet, dass die gleichen Zellen mit einem FITC- und einem PE-konjugierten Antikörper (der gleichen Immunoglobulinklasse wie zur eigentlichen Markierung) inkubiert werden, dessen Antigen nicht auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Diese Negativkontrollen lassen sich dann von den positiven Zellen im Dot plot abgrenzen. Bei der Auswertung des Dot plots können darüber hinaus unspezifische Bindungen und tote Zellen durch „Gaten“ der Zellen eliminiert werden. Dabei werden aus der Gesamtzahl der erfassten Zellen selektiv die (lebenden) Zellen mit spezifischer Bindung mittels eines „Gates“ extrahiert.

*Durchführung*Waschpuffer

PBS	500 ml
FCS	5 ml
Natriumazid	0,5 g

Fixierlösung

PBS	500 ml
Formaldehyd 37%	14,5 ml

10^5 - 10^6 Zellen pro Ansatz wurden zunächst in Polystyrol-Röhrchen pipettiert und bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abdekantiert. Anschließend wurde zum Pellet die verschieden konjugierten Antikörper pipettiert, die Zellen wurden gevortext und schließlich bei 4°C für eine halbe Stunde inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, bei dem die Markierungsansätze mit Waschpuffer aufgefüllt und erneut bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde jeweils abdekantiert. Zur Fixierung der Zellen wurden die Zellen in 200 μ l Fixierlösung resuspendiert und bis zur computergestützten Messung bei 4°C aufbewahrt. Die Ansätze konnten bis zu zwei Wochen auf diese Weise konserviert werden.

Zeitkinetik-Versuch

Im Rahmen der Zeitkinetikversuche sollen verschiedene Zelldifferenzierungseffekte nach Stimulation mit STI571 sowie bei fehlender Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels der FACS-Untersuchungen erfasst werden. Um eine Zelldifferenzierung nachzuweisen, werden zwei Oberflächenmarker benutzt, von denen wie bereits oben erwähnt einer FITC- und ein weiterer PE-konjugiert ist. In dieser Arbeit soll auf die unterschiedliche Expression von dem PE-konjugierten CD11b, ein Oberflächenmarker der vornehmlich auf Monozyten und Leukozyten zu finden ist und dem auf hauptsächlich Erythrozyten exprimierten FITC-konjugierten Glycophorin A eingegangen werden. Die weitere Vorgehensweise bestand darin für die oben genannten zwei Bedingungen, zwei verschiedene Medien anzusetzen: Zu diesem Zweck fügte man dem ersten Medium 1 μ Mol STI571 und dem zweiten Medium keine weiteren Stimulanzen hinzu. Anschließend wurden die zuvor mit RPMI gewaschenen Zellen in das jeweilige Medium resuspendiert und in well-plates überführt. Diese wurden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt und zum Zeitpunkt 0, an Tag 2

und an Tag 5 ausgewertet. Um reproduzierbare Werte zu erhalten, wurde stets mit Replikaten gearbeitet.

Dosiskinetikversuch

Der Dosiskinetikversuch dient der Quantifizierung derjenigen Dosis, die zu einer messbaren Zelldifferenzierung der verschiedenen Klone führt; von besonderem Interesse ist hierbei die erythroide Differenzierung unter STI571. Aus diesem Grund wurden für sechs Bedingungen sechs verschiedene Medien unterschiedlicher STI571-Konzentrationen (0, 0,025 μmol , 0,1 μmol , 0,25 μmol , 1 μmol STI571) angesetzt. Die Zellen der verschiedenen Klone wurden erst in RPMI 1640 für fünf Minuten bei 1000 x g gewaschen, anschließend im jeweiligem Medium in einer Zelldichte von 10^5 Zellen pro 1 ml resuspendiert und in well plates überführt. Ausgewertet wurde an Tag 0, Tag 2 und Tag 5.

2.2.5 Nachweis der Differenzierung von Zellen mittels Zytospins

Die Aufbereitung der Zellen mit der Zytospintechnik ermöglicht eine Darstellung der Zellen in Dünnschnittpräparate, die sich panoptisch mithilfe der Pappenheimfärbung charakterisieren lassen. Das Prinzip dabei beruht auf geringe Zentrifugalkräfte, welche die Zellen auf einen definierten Bereich der Objektträger sedimentieren ohne die Zellmorphologie zu verändern. Zu diesem Zweck wurden Objektträger (siehe Abbildung 6; a), Filterkarte (b) zusammen mit der Probenkammer (c) in ein dafür vorgesehenen Halterungsclip (Shandon Cytoclip; d) eingesetzt. Die Probenkammern wurden mit 100 μl einer zuvor pelletierten und in RPMI resuspendierten Zellsuspension gefüllt und anschließend in einer Zytozentrifuge gegeben. Die Zellen wurden dann bei 300 rpm für 3 Minuten auf die Objektträger zentrifugiert. Die Restflüssigkeit der Suspension konnte dabei effektiv durch die Filterkarte absorbiert werden. Idealerweise eignete sich zur Herstellung der Zytospinpräparate eine Zellzahl von $0,5-1 \times 10^5$ Zellen. Diese konnten zur lichtmikroskopischen Darstellung im Anschluss durch eine Pappenheimfärbung weiter aufbereitet werden.

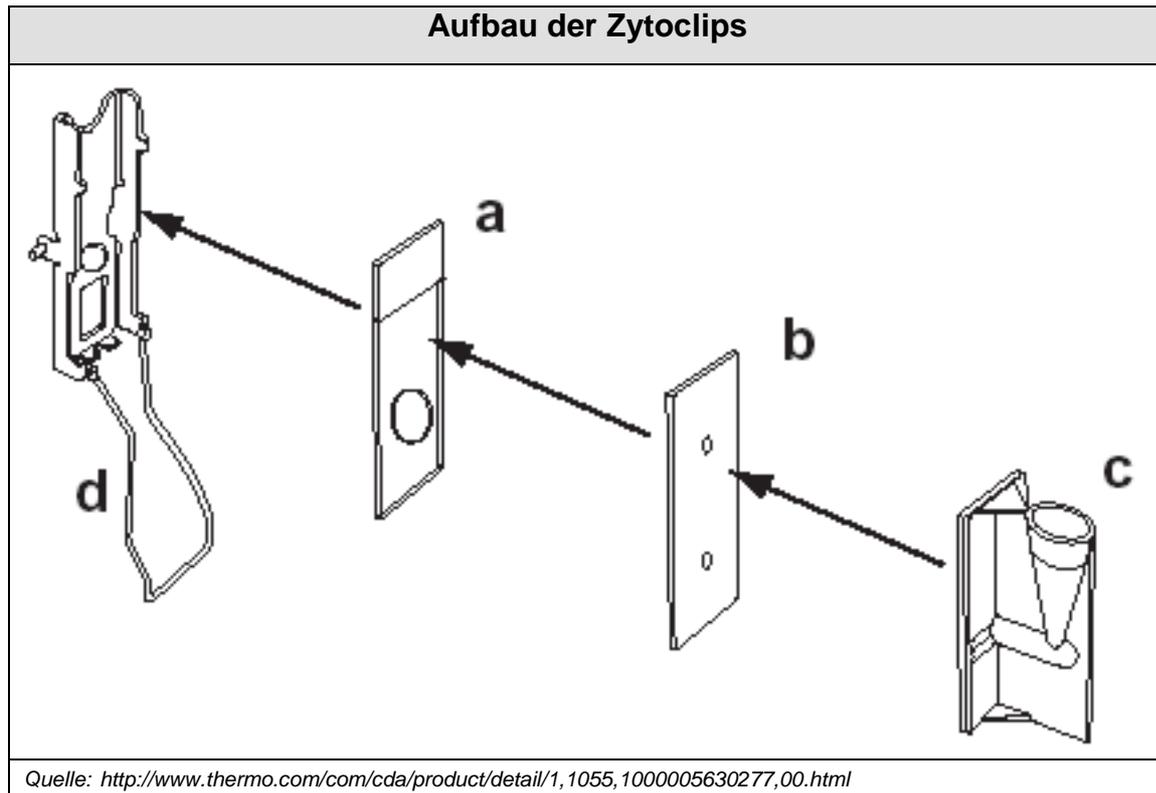


Abbildung 6 Aufbau der Zytospin-Apparatur

2.2.6 Bestimmung der *in vitro* Phosphataseaktivität

Um die Aktivität der PTP1B in den in dieser Arbeit verwandten Zellen nachweisen zu können, bot sich die Anwendung eines Phosphatase-Assays an. Zu diesem Zweck wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte den jeweiligen Lysaten Phosphopeptide sowie ein bei Dephosphorylierung signalgebender Farbstoff, das Malachitgrün, hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte an einem Mikrotiterplattenleser, welcher die Absorbanz bei 660 nm maß. Die Ergebnisse wurden dann mit einer vorher angefertigten Standardkurve verglichen. Diese ermöglichte dabei über die Bestimmung der nach Dephosphorylierung noch übriggebliebenen Phosphatresten eine Aussage über die Phosphatase-Aktivität zu treffen. Demzufolge bedeutete ein erhöhter Anteil an Phosphaten eine hohe Phosphatase-Aktivität. Die Versuchsdurchführung beruhte zunächst auf einer Isolierung der PTP1B über eine Immunopräzipitation unter Zugabe von Proteinsepharose A CL4B, welche in der Lage ist IgG verschiedener Spezies zu binden. Zu diesem Zweck wurden 100 µg Protein mit 3 µl anti-PTP1B in 100 µl IP-Puffer bei 4°C für zwei Stunden in einem Rotor bei mittlerer Geschwindigkeit inkubiert. Parallel dazu wurde gemäß den Instruktionen des Herstellers eine 50% Suspension der Proteinsepharose A CL4b mit IP-Puffer hergestellt. 30 µl der Suspension, die reichhaltig an IgG bindenden Beads ist, wurden zu den Immunkomplexen

gegeben, wonach eine weitere Inkubation von einer Stunde bei 4°C folgte. Danach wurden die Beads fünfmal mit 10 mM TrisCl pH 7,4 + 100 µmol DTT gewaschen. Das weitere Verfahren erfolgte nach Angaben des Herstellers des Malachit-Grün- Assay-Kits, bei den 25 µl der an den Beads konjugierten Immunpräzipitate mit 100 µM Phosphopeptiden für 30 Minuten bei RT inkubiert wurden; anschließend wurde die Reaktion unter Zugabe von 100 µl Malachit Grün Lösung terminiert und nach 15 Minuten mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesers bei einer Absorbanz von 660 nm ausgewertet und mit einer Standardkurve verglichen. Um eine erfolgreiche Immunopräzipitation nachweisen zu können, wurden 5 µl der Beads mit 5 µl der SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 Minuten aufgearbeitet und dann mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter untersucht.

IP-Puffer:

5 ml Lyse- Puffer (mitNP 40)

50 µl Na₂VO₃

10 µl Leupeptin

25 µl Aprotinin

5 µl Pepstatin

2.2.7 Statistische Analyse

Für eine statistische Analyse wurden das arithmetische Mittel und deren Standardabweichungen (\pm SD) angegeben. Die Signifikanz der Messwerte wurde über einen zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Eine signifikante Veränderung wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) angenommen. Alle Versuche wurden mindestens zwei Mal durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von PTP1B-Mutanten in BCR-ABL positiven Zellen

Die Proteintyrosinphosphatase PTP1B inhibiert BCR-ABL-vermittelte Transformationen *in vitro* und *in vivo* und wirkt somit als endogener Inhibitor einer BCR-ABL-induzierten Leukämie [74]. Gleichzeitig gilt STI571 als potenter und selektiver synthetischer ABL-Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher vornehmlich die dephosphorylierte und damit inaktive BCR-ABL Tyrosinkinase bindet. Infolgedessen wird die Signaltransduktionskaskade, ausgehend von dem Onkoprotein BCR-ABL, unterbunden wie auch die Proliferation und der Tumorprogress von BCR-ABL-transformierten Zellen. Einige CML-Zelllinien scheinen auf STI571 resistent zu sein. Aufgrund dessen untersuchten wir, ob eine veränderte PTP1B-Aktivität womöglich zu einer Resistenzentwicklung gegen STI571 beiträgt. Eine dominant-negative Mutante, die mithilfe eines Mutagenese-Kits von Amersham Biotech hergestellt wurde, sowie die aktive Form der PTP1B wurden zu diesem Zweck in Expressions-Plasmide kloniert. Diese Plasmide wurden mittels Elektroporation in BCR-ABL-positive K562-Zellen, die von einem Patienten mit CML-Blastenkrise (Erythroblastenleukämie) stammt, transfiziert. Als Kontrolle dienten zudem Plasmide ohne Insert, die im folgendem als Mock bezeichnet werden. Bei der dominant-negativen Mutante handelt es sich um eine Substrat-Falle, die Substrate zwar bindet, aber keine katalytische Funktion besitzt [40, 74]. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation bei der 181 Aspartat gegen Alanin (DN-181Ala) ausgetauscht wurde. Flint et. al zeigten auf diese Weise, dass verschiedene Punktmutationen zu unterschiedlichen Phosphataseaktivitäten führen können (siehe Tabelle 15). Demgegenüber steht die aktive Form der PTP1B exprimierenden Zellen, die mit FL (full length) im Folgenden abgekürzt werden. Die Zellen wurden in RPMI1640 und FCS-, Glutamin-, Hepespuffer- und Antibiotika-Zusätze bei 37°C im Brutschrank bei 100 % Feuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Die erfolgreiche Klonierung und Transfektion konnte mittels PCR und anschließender Sequenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit ist es nun möglich, Unterschiede zwischen der dominant-negativen Mutante und der aktiven Form z.B. hinsichtlich molekulargenetischer oder morphologischer Effekte zu untersuchen.

Katalytische Aktivitäten verschiedener PTP1B-Mutanten nach Flint et al.			
Enzyme	V _{max} , nmol/min/mg	K _m , nM	K _{cat} , min ⁻¹
Wildtyp	60 200	102	2244
Tyr-46 à Ser	4 120	1700	154
Asp-181 à Ala	0,61	<126	0,023
à Glu	97	10	3,6
Cys-215 à Ser	Keine erfassbare Aktivität		
Arg-221 à Lys	11	80	0,41
à Met	3,3	1060	0,12

Die Phosphataseaktivität wurde anhand eines Phosphotyrosinsubstrats gemessen, die verschiedenen kinetischen Parameter wurden anschließend von angeglichenen nicht-lineären Kurven abgelesen [40].

Tabelle 15 Phosphataseaktivität verschiedener PTP1B- Mutanten nach Punktmutation [40]

3.1.1 Vergleich der PTP1B-Aktivität zwischen DN, Mock und FL

Um die PTP1B-Aktivität in den verschiedenen Klonen messen zu können, bestimmten wir mithilfe eines Assays den Anteil von anorganischem Phosphat eines Donors, der bei Dephosphorylierung einen signalgebenden Farbstoff emittierte und dessen Absorbanz mittels eines Mikrotiterlesers bei 660nm messbar war. Eine erhöhte Absorbanz repräsentiert einen hohen Anteil des anorganischen Phosphats, welches wiederum einer erhöhten PTP1B-Aktivität entspricht. Abbildung 7 zeigt die unterschiedlichen Phosphataseaktivitäten der Klone im Vergleich. Während die Mock und die nativen K562-Zellen bei Reaktionsende deutlich größere Mengen an Phosphatresten als Zeichen einer erhöhten PTP1B-Aktivität zeigen, erreicht die FL im Vergleich zu den Mutanten bis zu 13mal größere Mengen an anorganischem Phosphat. Die D181A-Mutanten scheinen erwartungsgemäß weniger PTP1B-Aktivität zu exprimieren, welche anhand des vergleichsweise niedrigen Anteils an anorganischem Phosphat deutlich wird.

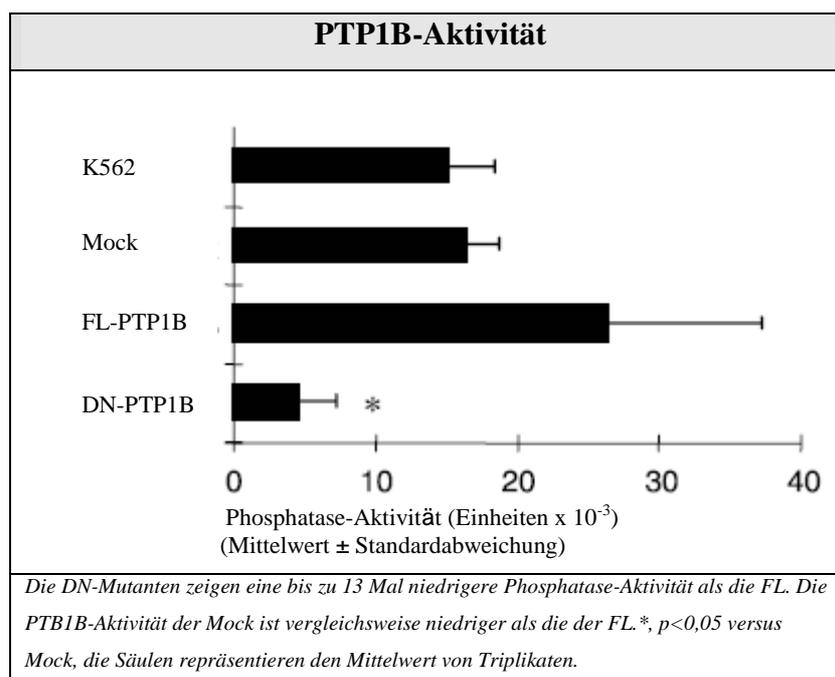


Abbildung 7 Phosphataseaktivität im Vergleich

3.1.2 Einfluss der PTP1B auf BCR-ABL induzierte Transduktionswege

Anders als beim Nachweis der PTP1B-Aktivität waren quantitative Unterschiede in der Western Blot-Analyse zwischen der FL und der DN nicht so gravierend. Die quantitative Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch Densitometrie. Als Referenz diente Tubulin, welches von allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird. Hiernach ist die Expression der PTP1B 1,6mal größer in DN-K562 Zellen als in FL-K562 Zellen, wohingegen nur ein halb so viel der PTP1B in der Mock im Vergleich zur FL (siehe Abbildung 8) exprimiert wird. Die Diskrepanz zwischen der PTP1B-Aktivität und der divergierenden Expression der Klone Mock, FL und DN verdeutlicht, dass die unterschiedliche Expressionsstärke der PTP1B in den verschiedenen Klonen nicht zwangsläufig eine unterschiedliche Phosphataseaktivität bewirkt.

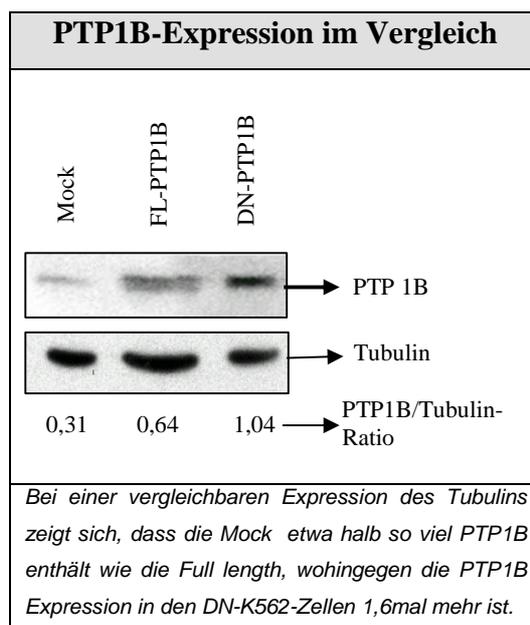


Abbildung 8 Anti-PTP1B im Vergleich

Ein Phosphotyrosinblot spiegelte die PTP1B-Aktivität wider. Demnach war der Anteil an phosphorylierten Proteinen in der Mutante deutlich höher als bei der Mock bzw. der FL. Auffällig waren insbesondere zwei prominente Banden, welche am ehesten der phosphorylierten BCR-ABL (210kDa) bzw. der phosphorylierten c-ABL (148 kDa) zugeordnet werden kann. Während der Anteil dieser phosphorylierten Proteine in der FL und der Mock deutlich vermindert ist, zeigt die Mutante erhöhte Tyrosinphosphorylierungen der BCR-ABL und c-ABL in den DN-Zellen (Abbildung 9).

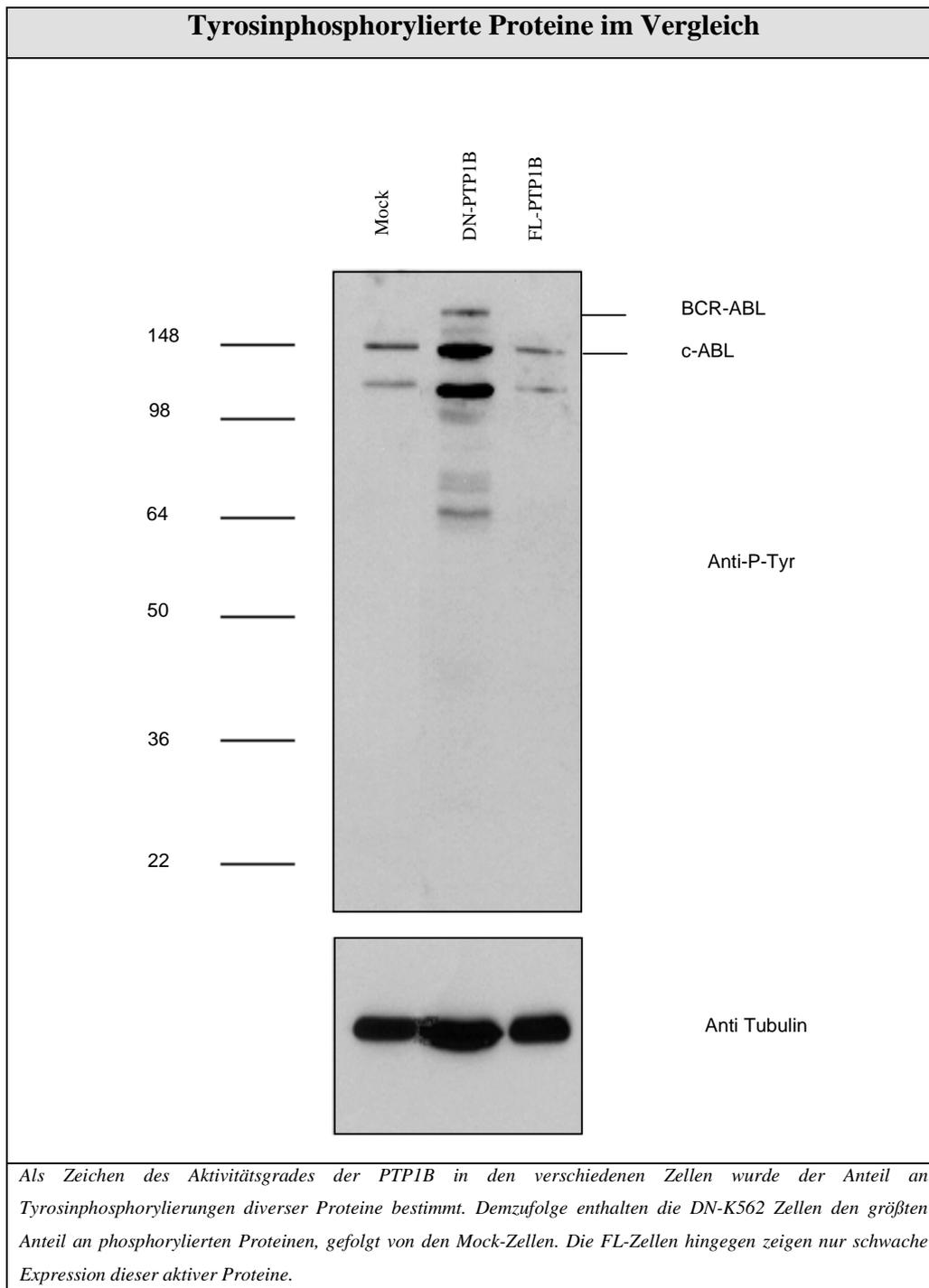


Abbildung 9 Anti-P-Tyrosine im Vergleich

Als unmittelbare Zielproteine der BCR-ABL und damit Mediatoren der BCR-ABL vermittelten Transformation untersuchten wir außerdem die aktiven Formen der STAT5 (signal transducer and activator of transcription) und ERK1/2 (Abbildung 10). In den DN-Zellen ist hiernach der phosphorylierte Anteil der genannten Proteine deutlich erhöht, wohingegen die Mock- und FL-Zellen kaum aktives ERK1/2 bzw. STAT5 exprimieren. Die

Expression der Proteine STAT5 und ERK1/2 ist in den Mock-, FL- und DN-Zellen vergleichbar (STAT5-Expression in nativen K562-Zellen nicht dargestellt).

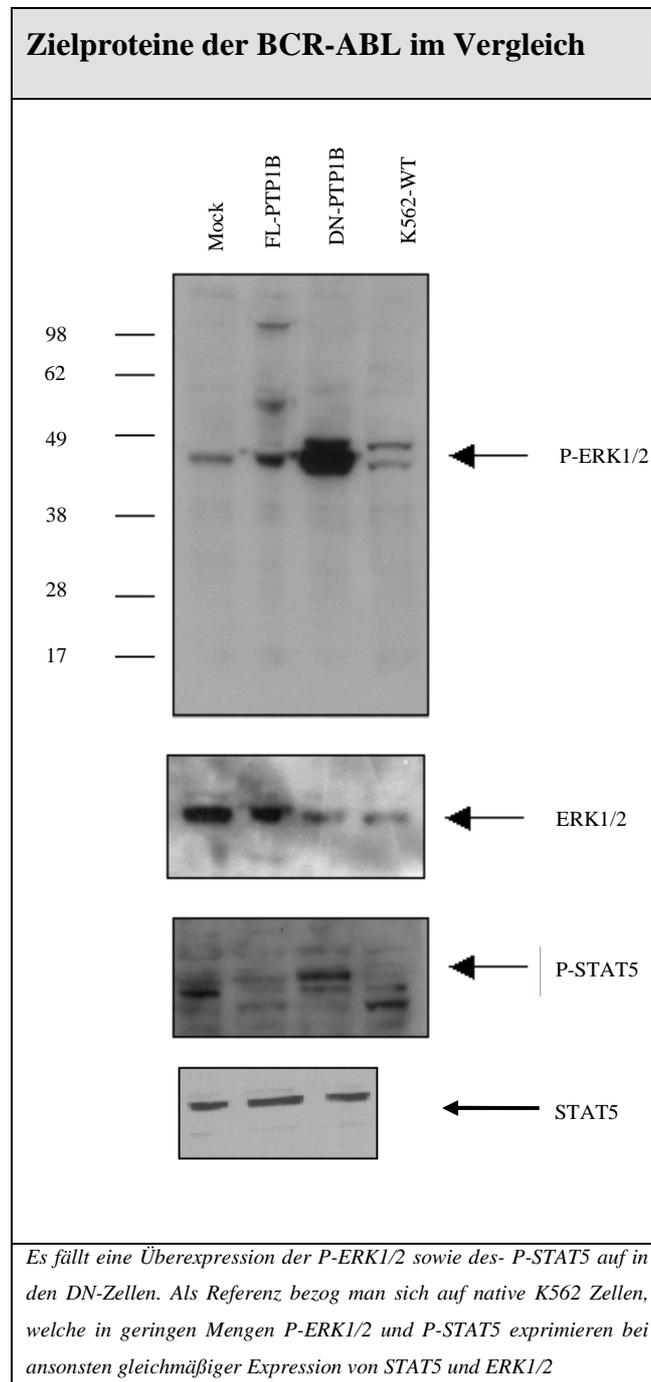


Abbildung 10 Zielproteine der BCR-ABL im Vergleich

3.1.3 Wachstums- und Viabilitätsverhalten unter Serumentzug im Vergleich

Ein Merkmal BCR-ABL positiver Zelllinien ist es unter serumarmen Bedingungen wachsen zu können. Daher wurde das Wachstumsverhalten der FL- und Mock-Zellen mit dem der DN-Zellen in einem serumärmeren Medium verglichen. In einem Zeitintervall von 20 Tagen erfolgte durch Trypanblaufärbung die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Wachstums- /Viabilitätsverhalten der Zellen in einem Medium mit 10 %-haltigen Serum (Daten nicht gezeigt), während die Mock- und die FL-Zellen in einem serumärmeren Medium (1 % FCS) einen Wachstumsvorteil gegenüber den DN-Zellen bieten (siehe Abbildung 11).

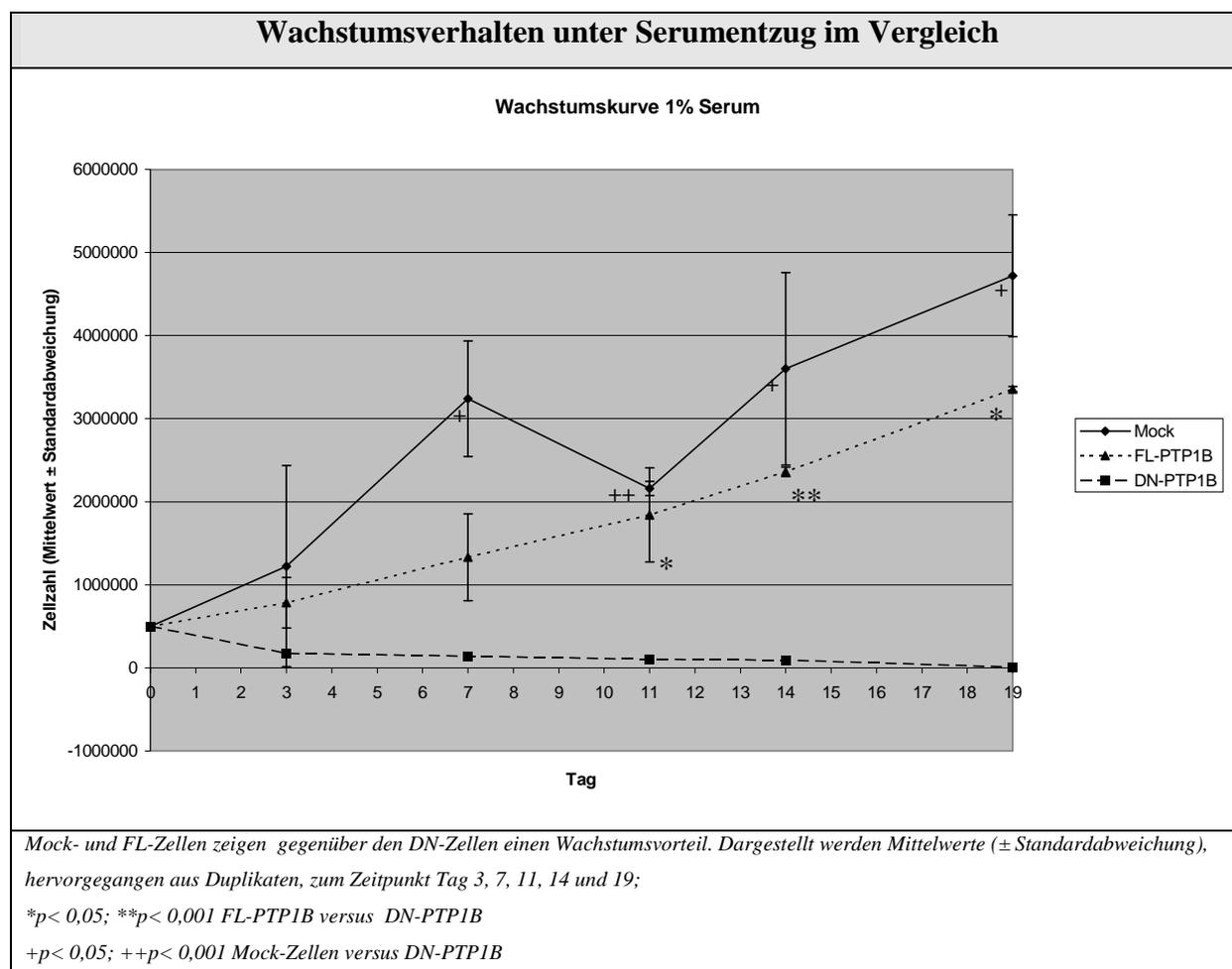


Abbildung 11 Wachstumsverhalten unter Serumentzug im Vergleich

Entsprechendes gilt auch für die Viabilität. Hiernach ist die Anzahl der überlebenden DN-Zellen im Vergleich zu den FL- und den Mock-Zellen deutlich erniedrigt (siehe Abbildung 12). Auffällig ist darüber hinaus, dass die Mock-Zellen den FL-Zellen, was das Wachstum und die Viabilität angeht, überlegen zu sein scheinen.

Keins der Zelllinien wuchs in Medium mit 0,1 % FCS.

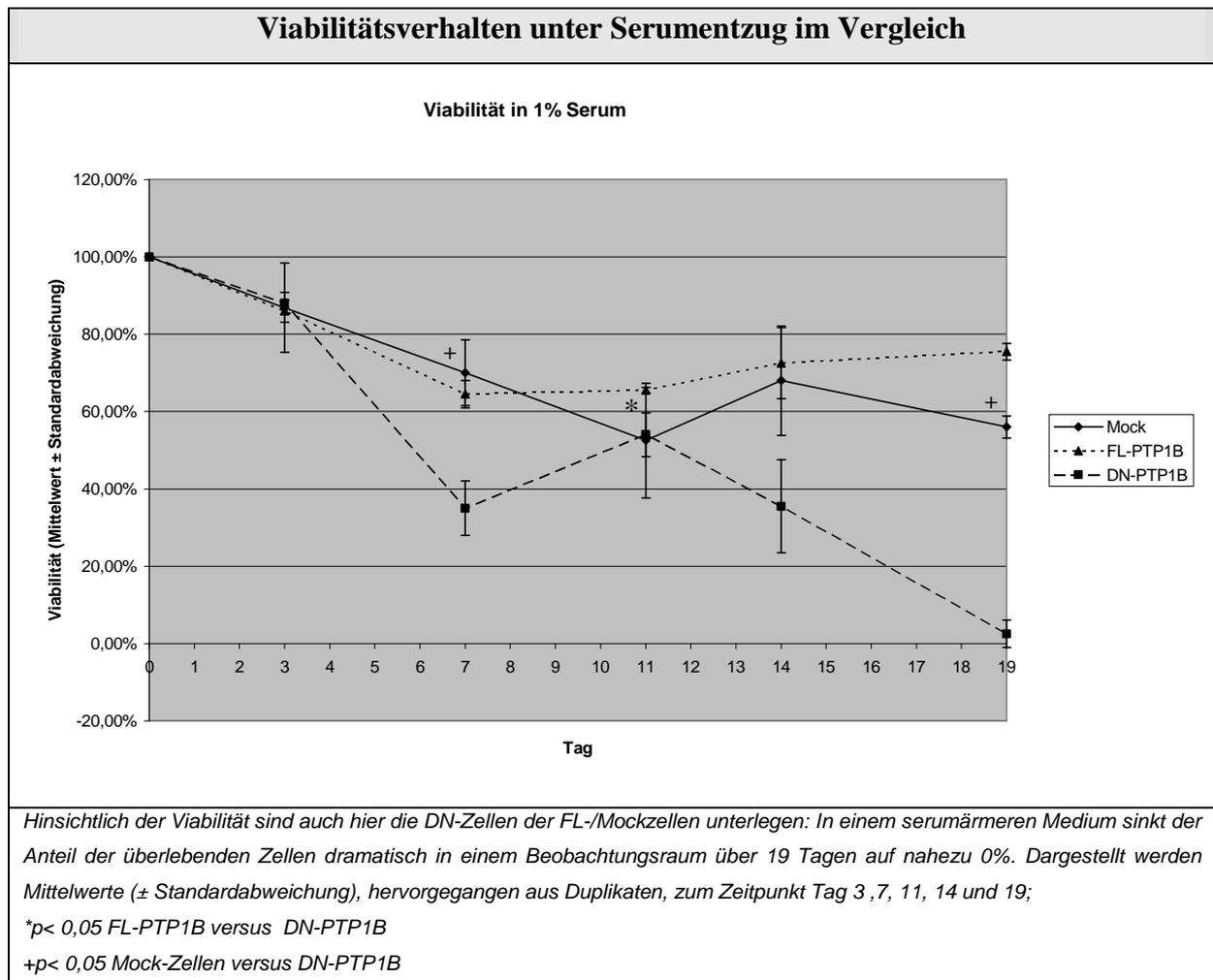


Abbildung 12 Viabilitätsverhalten unter Serumentzug im Vergleich

3.1.4 Morphologische Unterschiede der DN-Zellen versus FL-/Mock-Zellen

Als nächstes untersuchten wir das unterschiedliche Differenzierungsverhalten der generierten Zelllinien. Anhand von FACS-Analysen wurden die Oberflächenmarker CD11b und Glycophorin A bestimmt. Das Glycophorin A wird gewöhnlich von Erythrozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert. außerdem lassen sich diese bei erythrozytären wie auch bei einigen megakaryoblastischen Leukämien nachweisen. CD11b-exprimierende Zellen finden sich dahingegen eher auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten und einer Untergruppe von NK-Zellen. Die FACS-Analyse der transfizierten Zellen ergaben bezüglich der Glycophorin-A-Expression der FL/Mock-Zellen vs. DN-Zellen keine kohärenten Ergebnisse. Der Anteil der CD11b-Expression hingegen ist bei den Zellen mit dem katalytisch inaktivem PTP1B aber auch die der Mock-Zellen signifikant höher als die der FL-Zellen mit $p < 0,001$ (siehe Abbildung 13).

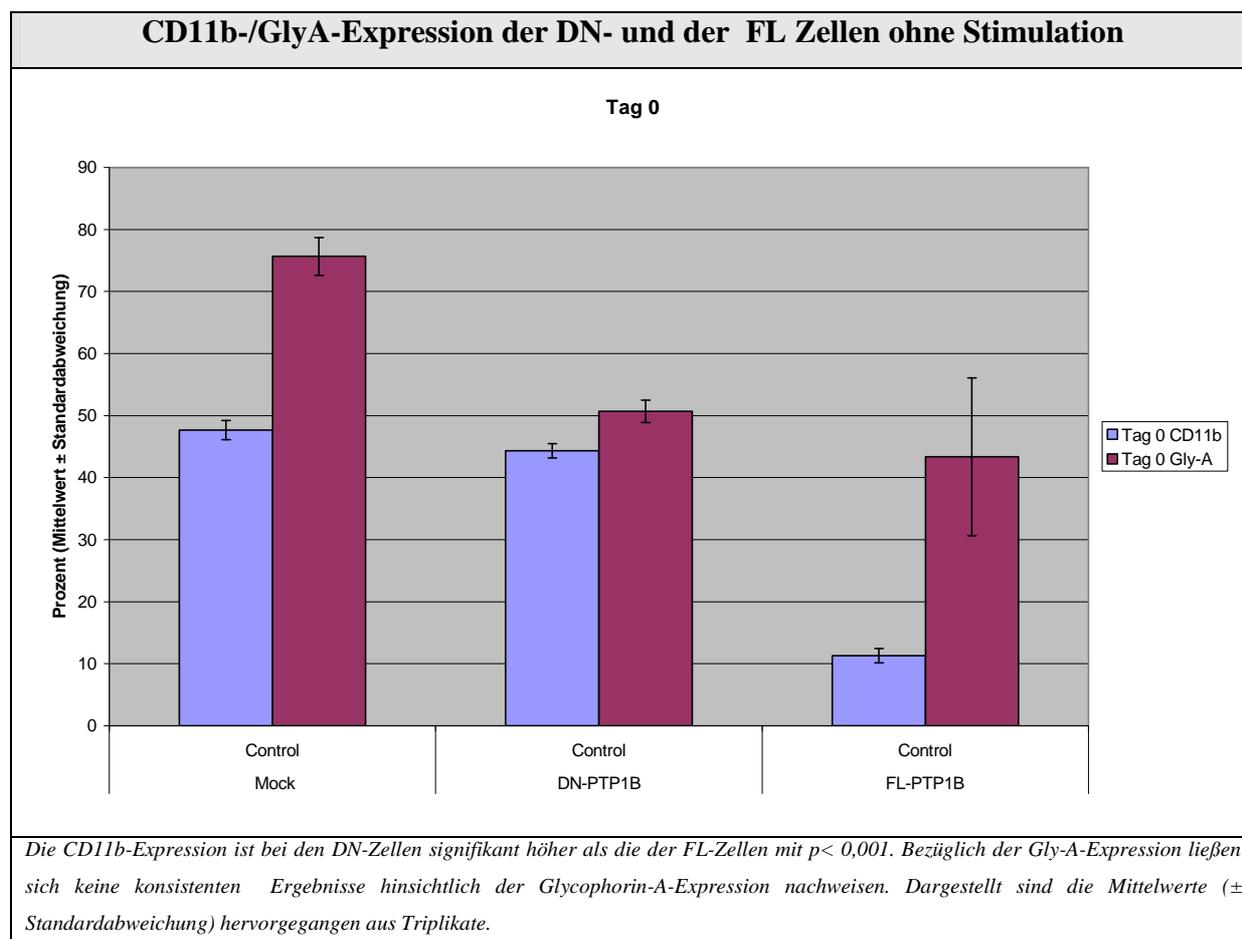


Abbildung 13 CD11b-/GlyA-Expression im Vergleich

Nach Aufbereitung der Zellen durch Zytopspintechnik und nachfolgender Pappenheimfärbung ließen sich, ergänzend zur FACS-Analyse, morphologische Unterschiede mikroskopisch darstellen. Vereinzelt Zellen der Mangelmutante erinnern hiernach aufgrund ihrer Größe an Monozyten. Die Aufbereitung der FL-Zellen dahingegen lassen verschiedene Zellen der myeloischen Reihe erkennen, insbesondere fallen viele unreife bzw. undifferenzierte Zellen auf. Morphologisch ähneln die Mock-Zellen den FL-Zellen, wenngleich sie differenzierter wirken. Es lassen sich als Zeichen hierfür mehrere Vakuolen mit rotem Material (Hämoglobin?) nachweisen.

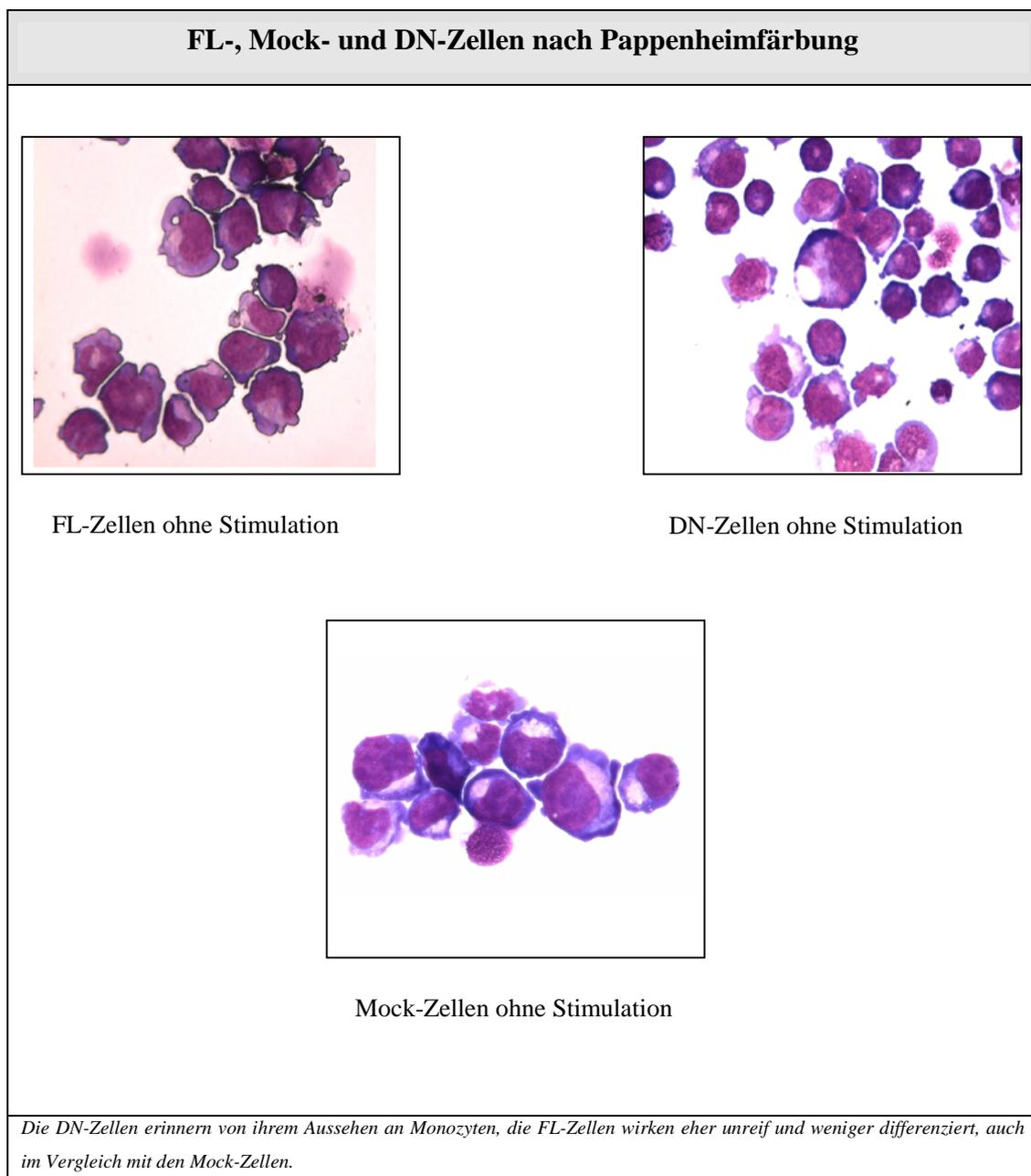


Abbildung 14 Morphologische Unterschiede zwischen den FL- und den DN-Zellen

3.2 Einfluss von PTP1B auf die DN-Mutanten und die aktiven Formen nach Behandlung mit Imatinib

Um den Einfluss der PTP1B auf die Effekte unter STI571 nachweisen zu können, untersuchten wir die oben genannten Eigenschaften, in denen sich die PTP1B-überexprimierenden Zellen von denen der Mangelmutante unterscheiden, und zwar nach Gabe von STI571.

3.2.1 Unterschiede des Wachstumsverhalten unter STI571 im Vergleich

Wir bestimmten zunächst die Zellzahlen der verschiedenen Klone nach viertägiger Behandlung der Zellen mit und ohne STI571 (siehe Abbildung 15). Eine Bestimmung der Zellzahl nach Trypanblaufärbung zeigte eine 50%ige Reduktion der Zellzahl unter 0,025 μM STI571 bei den FL- und Mockzellen. Während die Mock-Zellen in ihrem Verhalten den FL-Zellen ähnelten, blieben die DN-Zellen dahingegen nahezu unbeeinflusst von STI571. Hiernach kommt es zu einer Zellzahlreduktion von weniger als 25%. Die Abbildung 15 zeigt den bereits erwähnten Wachstumsvorteil der FL- und der Mockzellen gegenüber den DN-Zellen in einem 1% Serum, was eine verminderte Sensitivität der DN-Zellen gegenüber Imatinib vermuten lässt.

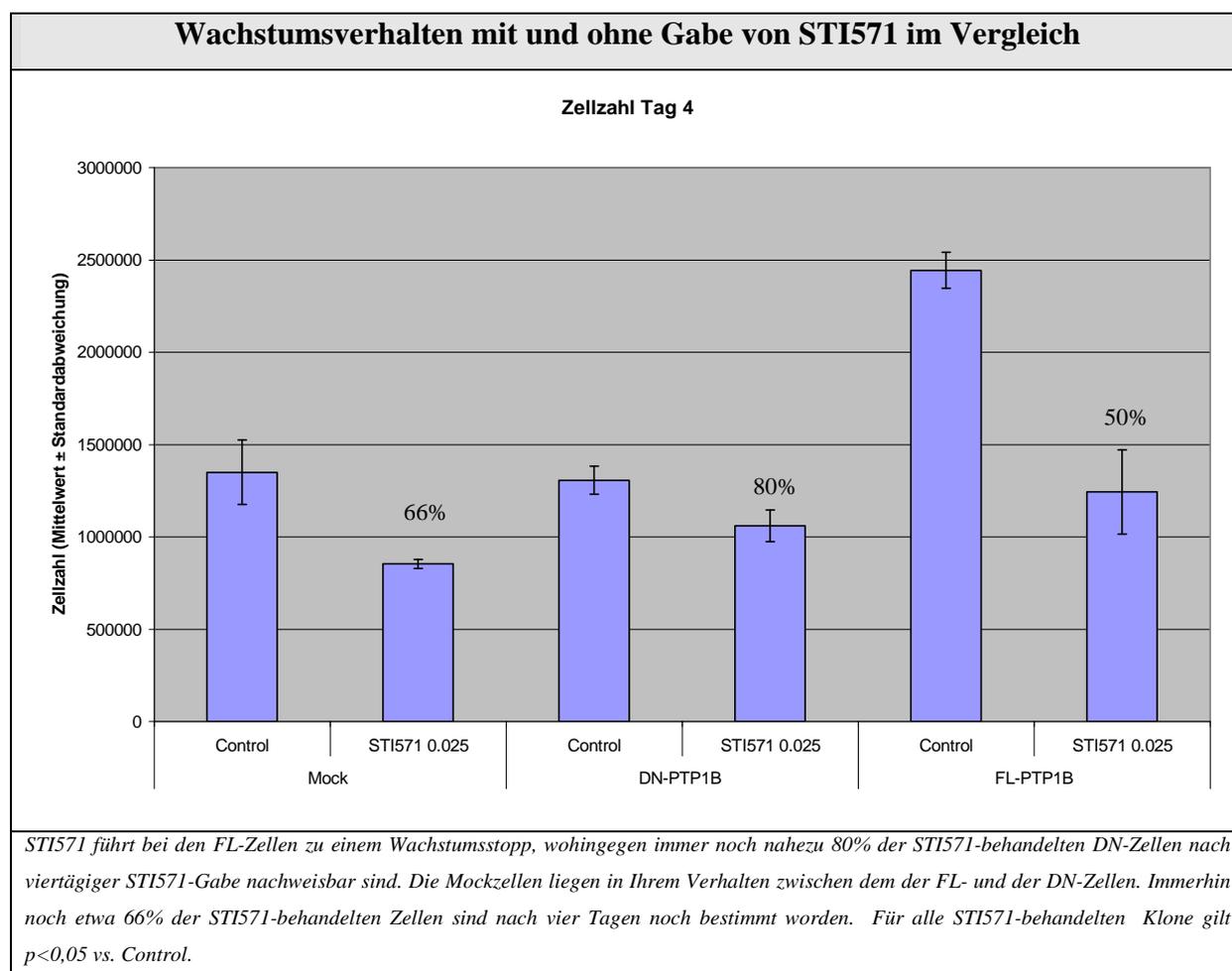


Abbildung 15 Wachstumsverhalten nach STI571-Behandlung im Vergleich

Aufgrund dieser Ergebnisse interessierten wir uns für das Zellzyklusverhalten und untersuchten durch eine FACS-Analyse nach Propidiumiodid-Färbung. Mithilfe dieses Verfahrens war es möglich, den Zellzyklus der entsprechenden Zellklone zu analysieren. Wir behandelten die transfizierten Zellen mit 0,25 μM oder 0,5 μM STI571 und verglichen die Resultate mit einer Kontrollgruppe der jeweiligen Klone ohne STI571-Zusatz. Nach 48 Stunden erfolgte eine Bestimmung des DNA-Gehalts, durch die nachfolgende FACS-Analyse erfolgte eine Zuordnung zu der entsprechenden Zellzyklusphase. Hiernach zeigt sich, dass der Anteil der DN-Zellen in der S-Phase nach mehrtägiger Behandlung mit STI571 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur wenig verändert, wohingegen der Anteil der FL- bzw. Mockzellen in diesen Phasen deutlich rückläufig ist (siehe Tabelle 16). Es zeigt sich außerdem, dass STI571 in allen Klonen zu einer Reduktion der behandelten Zellen in der S-/G2-/M-Phase führt. Auch scheint dieser Vorgang dosisabhängig zu sein (siehe Tabelle 16). Gleichzeitig fällt auf, dass die Mangelmutanten auf eine STI571-bedingte Reduktion der Zellen in der Synthese- bzw. Wachstumsphase nach 48-stündiger Behandlung mit 0,5 μM STI571 signifikant unempfindlicher reagieren als die Mock-/FL-Zellen. So lassen sich

immerhin noch $9,9 \pm 0,8\%$ der DN-Zellen nach $0,5 \mu\text{M}$ STI571 und 48 Stunden in der G₂/M-Phase nachweisen, wohingegen nur noch $3,4 \pm 0,8\%$ der Mock- und $3,1 \pm 1,0\%$ der FL-Zellen in der Vergleichsgruppe nachweisbar sind.

Wachstumsverhalten mit und ohne Gabe von STI571 im Vergleich				
(% von allen Zellen)				
Zelllinie	STI571-Behandlung nach 48h	Sub-G1	G1-Phase	S/G2/M-Phase
Mock	Keine Stimulation	4.4±2.6	39.0±1,8	45±7,5
	0,25µM	30.9± 3.3	36.1± 3.0	30±1,7
	0,5 µM	36.9± 2.0	37.1± 2.1	18±1,7*
FL	keine Stimulation	6.0± 2.1	40.5±3.5	48±5,5
	0,25µM	33.6± 4.0	32.1±2.3	27±2
	0,5 µM	38.6±3.8	32.5±2.9	23±2 [§]
DN	keine Stimulation	8.0±3.0	42.4±5.7	42±4,3
	0,25µM	18.8±3.9	40.0±3.6	35±2
	0,5 µM	25.2±3.9	33.5±2.7	34±1,5

*Während nach Stimulation der Mock-Zellen nur noch 40% der Zellen und ca. 50% der FL-Zellen nachweisbar sind, lässt sich kaum ein Effekt bei den STI571-behandelten DN-Zellen feststellen. Weniger als 20% der DN-Zellen sind dabei durch die STI571-Behandlung betroffen; [§]p= 0,002 vs. DN, *p <0,0003 vs. DN*

Tabelle 16 Wachstumsverhalten unter STI571-Stimulation im Vergleich

3.2.2 Apoptoseverhalten unter STI571 im Vergleich

Durch Messung des DNA-Gehalts mittels FACS-Analyse nach Propidiumiodidfärbung (siehe oben) kann auch eine Aussage über den Grad der Apoptose getroffen werden, denn durch Permeabilisierung mittels Alkoholfixation im Rahmen der Waschschriffe wird auch die bei Apoptose entstehende degradierte DNA extrahiert. Der übriggebliebene DNA-Gehalt der Zellen kann dann in einem Histogramm als sogenannter Sub-G₁-Peak nach Färbung dargestellt werden und repräsentiert auf diese Weise die Apoptose der Zelle. Wir analysierten infolgedessen, ob eine STI571-Behandlung nach den unter 4.2.1. genannten Kriterien zu einer signifikanten Veränderung in den Mock-/FL- bzw. den DN-Zellen führt. STI571 führte bei allen behandelten Klonen zu einer (dosisabhängigen) Steigerung der Population in der apoptotischen sub-G₁-Phase (siehe Tabelle 16). Die Mangelmutanten scheinen dahingegen wenig empfänglich dafür zu sein. So finden sich nach 48-stündiger Behandlung mit 0,5 µM STI571 nur ein sub-G₁-Anteil von $25,2 \pm 3,9\%$. Im Vergleich dazu ist der Anteil der FL-/Mockzellen unter diesen Bedingungen erheblich höher (Mock $36,9 \pm 2,0\%$, FL $38,6 \pm 3,8\%$). Eine ergänzende Apoptose-Bestimmung von Annexin V mittels FACS-Analyse bestätigte dieses Verhalten. Annexin V bindet Ca²⁺-abhängig an Phosphatidylserine, welche im Rahmen der Apoptose auf der Plasmamembran exprimiert werden. Auf diese Weise unterscheidet das Abwehrsystem apoptotische Zellen von Entzündungszellen und unterbindet bei Apoptose die Einleitung einer inflammatorischen Reaktion mit nachfolgender Nekrosebildung. Die Zellen wurden mit bzw. ohne 0,25 µM, 0,5 µM oder 1 µM STI571 für 48 Stunden behandelt und anschließend durch Nachweis von Annexin V mittels FACS analysiert. Durch Zugabe von STI571 kommt es dosisabhängig zu einer Steigerung Annexin V positiver Zellen der FL- sowie der Mock-Klone (siehe Abbildung 16). Es fällt weiterhin auf, dass die FL-Zellen empfindlicher auf eine STI571-induzierten Apoptose reagieren als die Mockzellen, insbesondere was höhere STI571-Konzentrationen betrifft. Im Vergleich hierzu, sind deutlicher weniger Annexin V positive DN-Zellen (auch bei höheren STI571-Konzentrationen) nachweisbar.

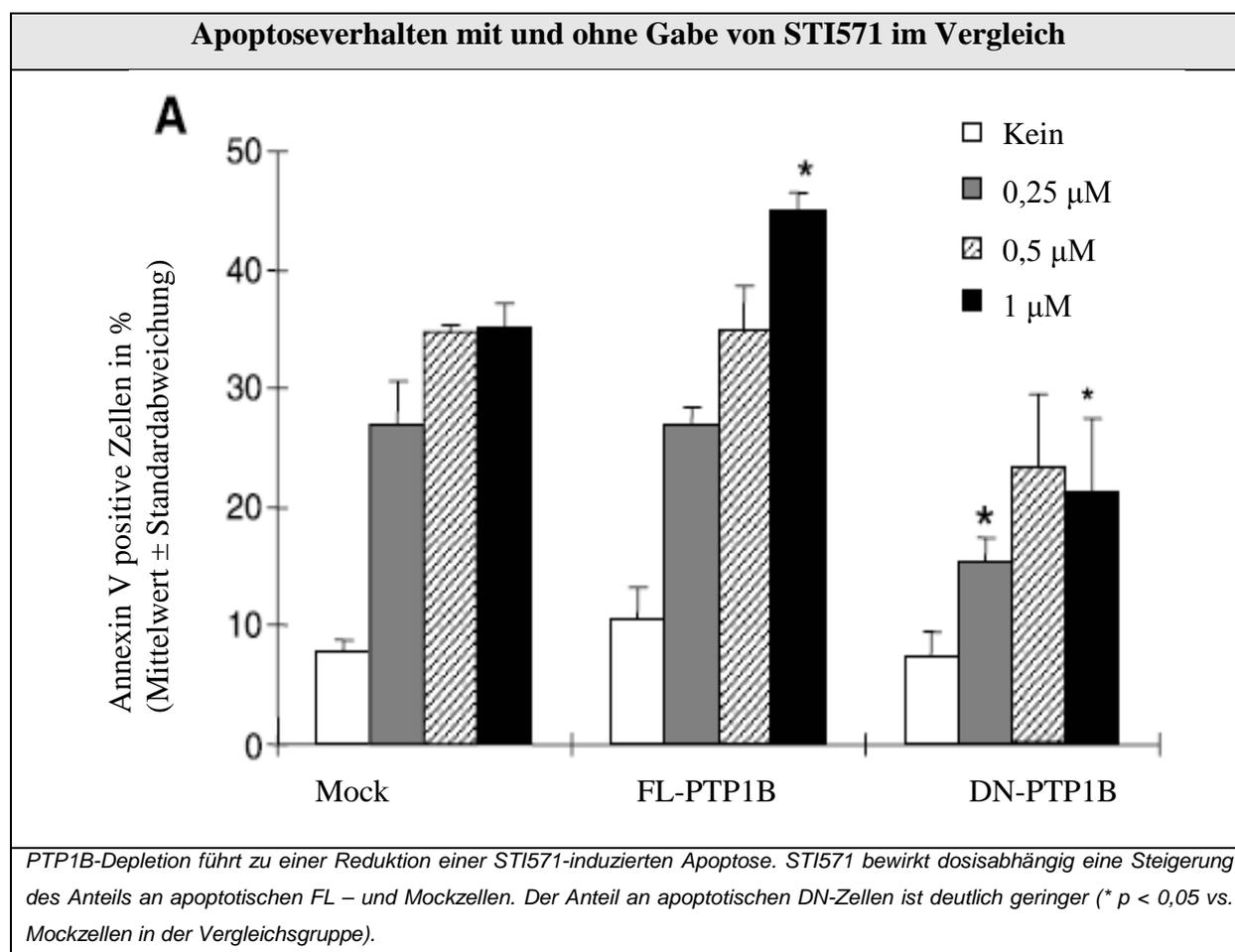


Abbildung 16 Apoptoseverhalten im Vergleich

Um den Mechanismus der STI571-induzierten und PTP1B-vermittelten Apoptose zu beleuchten, untersuchten wir mittels Western Blot Analyse Proteine, welche unmittelbar an der Apoptose beteiligt sind. So führt die Spaltung der Caspase 8 u.a. zur Aktivierung der Caspase 3, welches als einer der Schlüsselproteine zur Induktion der Apoptose gilt. Dabei wird Caspase 3 (Cysteinyl aspartic acid proteases) durch proteolytische Spaltung aktiviert und führt seinerseits zur Spaltung weiterer „Down-stream“- targets wie zum Beispiel das PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase). Dieses Protein, dass ursprünglich in DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist, erkennt nach Aktivierung durch Proteolyse in ein 89 kDa bzw. 24 kDa großes Protein apoptotische DNA und bindet daran (siehe Abbildung 17). Auf diese Weise werden apoptotische Zellen gekennzeichnet.

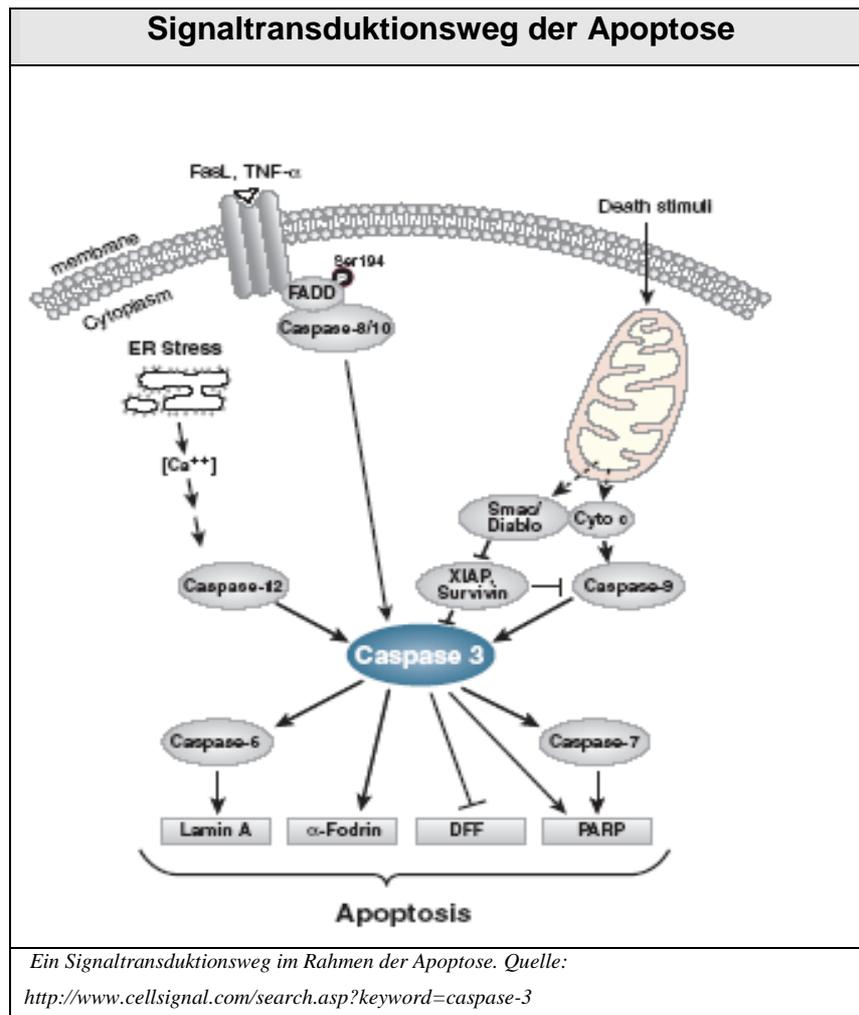


Abbildung 17 Signaltransduktionsweg der Apoptose

Wir untersuchten aus diesem Grund die drei Schlüsselproteine Caspase 3/8 und PARP bzw. deren Spaltprodukte. Die Ergebnisse bestätigten unsere bisherigen Beobachtungen bezüglich des Apoptoseverhaltens. Innerhalb von 24 Stunden führt 0,5 μ M STI571 zur einer Aktivierung sowohl von Caspase 3 als auch Caspase 8 in den Mock- und den FL-Zellen. Eine Spaltung dieser Proteine ließ sich unter den gleichen Bedingungen dahingegen nicht in den DN-Zellen nachweisen. Ähnliche Resultate liefert die Western Blot Analyse des Proteins PARP. Bei fehlender Stimulation lassen sich in allen Klonen das inaktive PARP (115 kDa) nachweisen. Die Gabe von STI571 führt im Vergleich hierzu zum Nachweis der 89 kDa großen Spaltprodukte in den Mock- und den FL-Zellen. außerdem zeigt sich eine Dosisabhängigkeit. Hiernach kommt es unter 0,5 μ M STI571 zu einer Mehranreicherungen der Spaltprodukte als unter 0,25 μ M STI571. Darüber hinaus konnte erneut gezeigt werden, dass die DN-Zellen trotz STI571-Einfluss inaktives PARP exprimieren bei vergleichsweise niedriger Expression der Spaltprodukte.

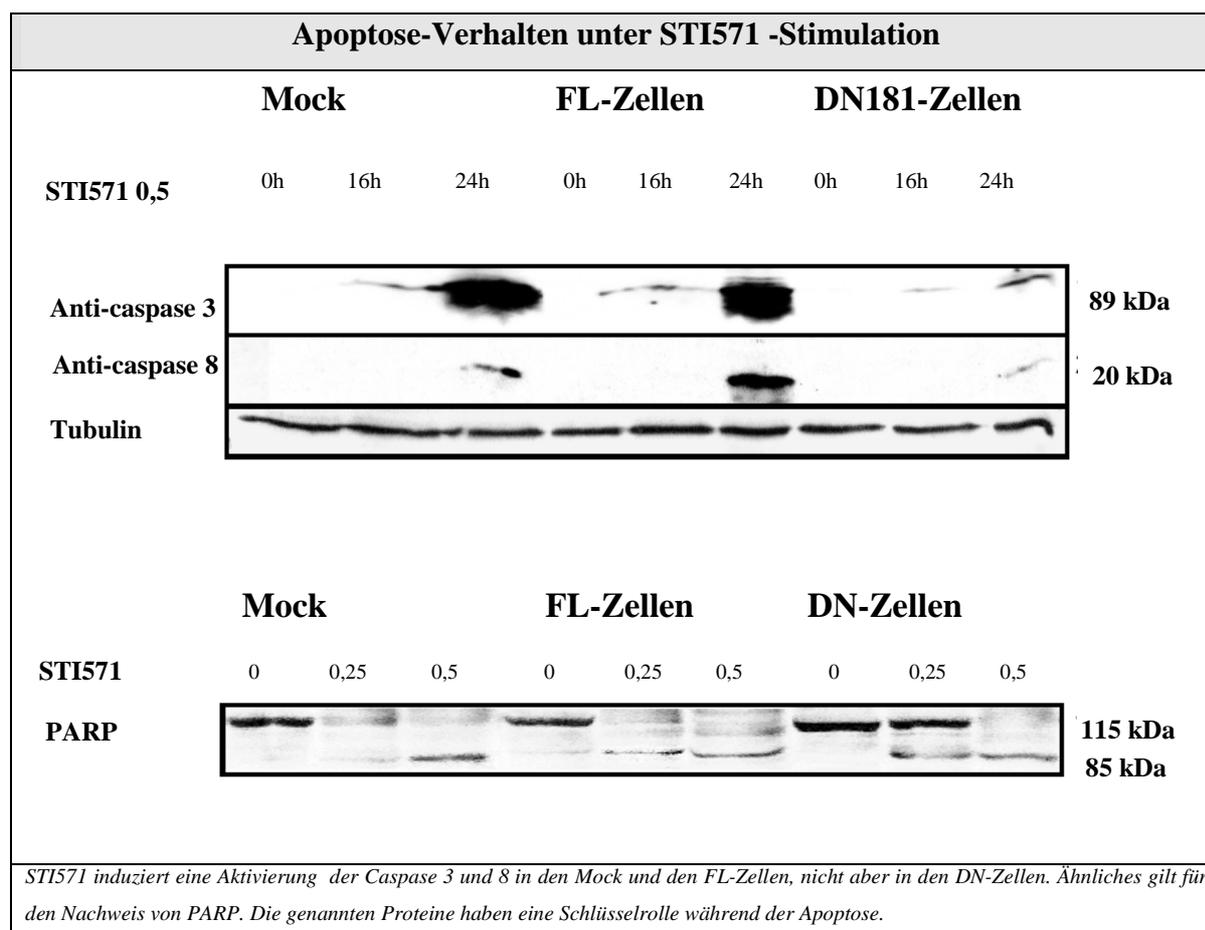


Abbildung 18 Durch Western Blot analysiertes Apoptoseverhalten unter STI571

3.2.3 Apoptoseverhalten nach Gabe eines selektiven PTP1B-Inhibitors

Um zeigen zu können, dass eine Inhibition der STI571-induzierten Apoptose abhängig von der Protein-Tyrosin-Phosphatase ist, inkubierten wir native K562-Zellen mit unterschiedlichen Dosen von DHMV (bis-(N,N-Dimethylhydroxamido)hydroxovanadat), einem pharmakologischen Inhibitor der PTP1B. Anschließend bestimmten wir FACS-analytisch den Anteil an AnnexinV-positiven Zellen. Vorab fällt auf, dass DHMV eine Apoptose in den K562-Zellen dosisabhängig induziert. Es kommt zu einem Anstieg der Annexin V positiven Zellen. Die Zugabe von Imatinib bewirkt dahingegen eine signifikante Reduktion der Annexin-positiven Zellen. Die initial eingeleitete Apoptose infolge der PTP1B-Blockade scheint durch die Gabe von STI571 nun antagonisiert zu werden. Es lassen sich (dosisabhängig) fast 20% weniger Annexin positive Zellen nachweisen (Abbildung 19).

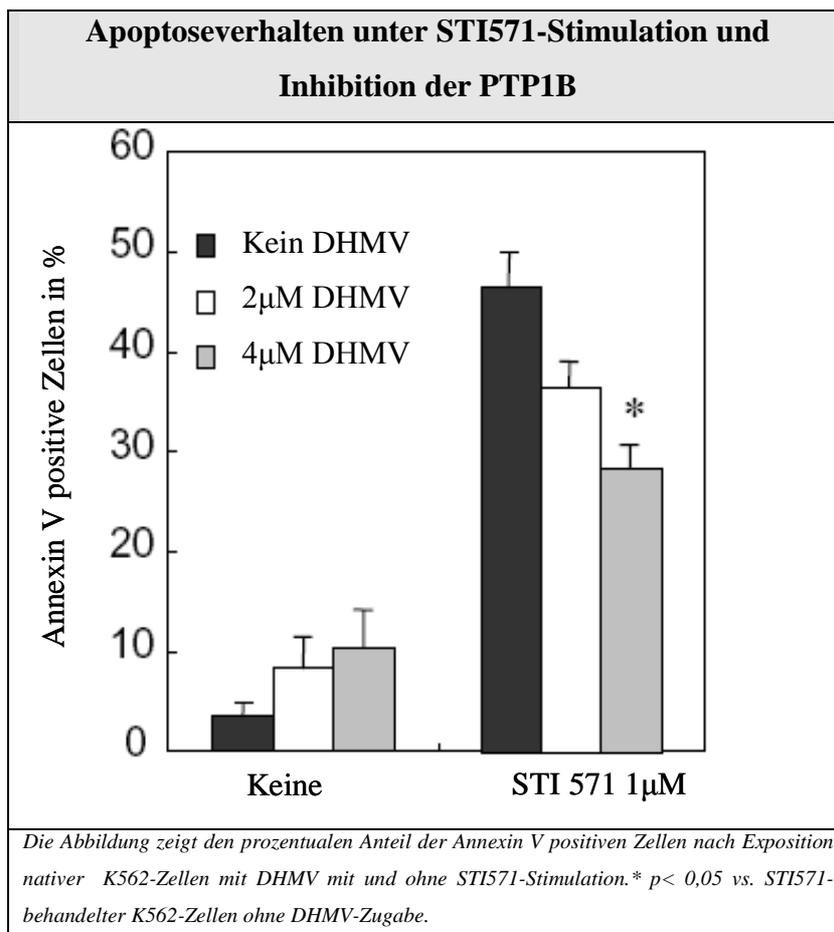


Abbildung 19 Apoptoseverhalten nach Inhibition der PTP1B unter STI571-Stimulation

3.2.4 STI571-induzierte morphologische Unterschiede im Vergleich

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass PTP1B Einfluss auf STI571-vermittelte Zellprozesse wie Wachstum und Apoptose hat.

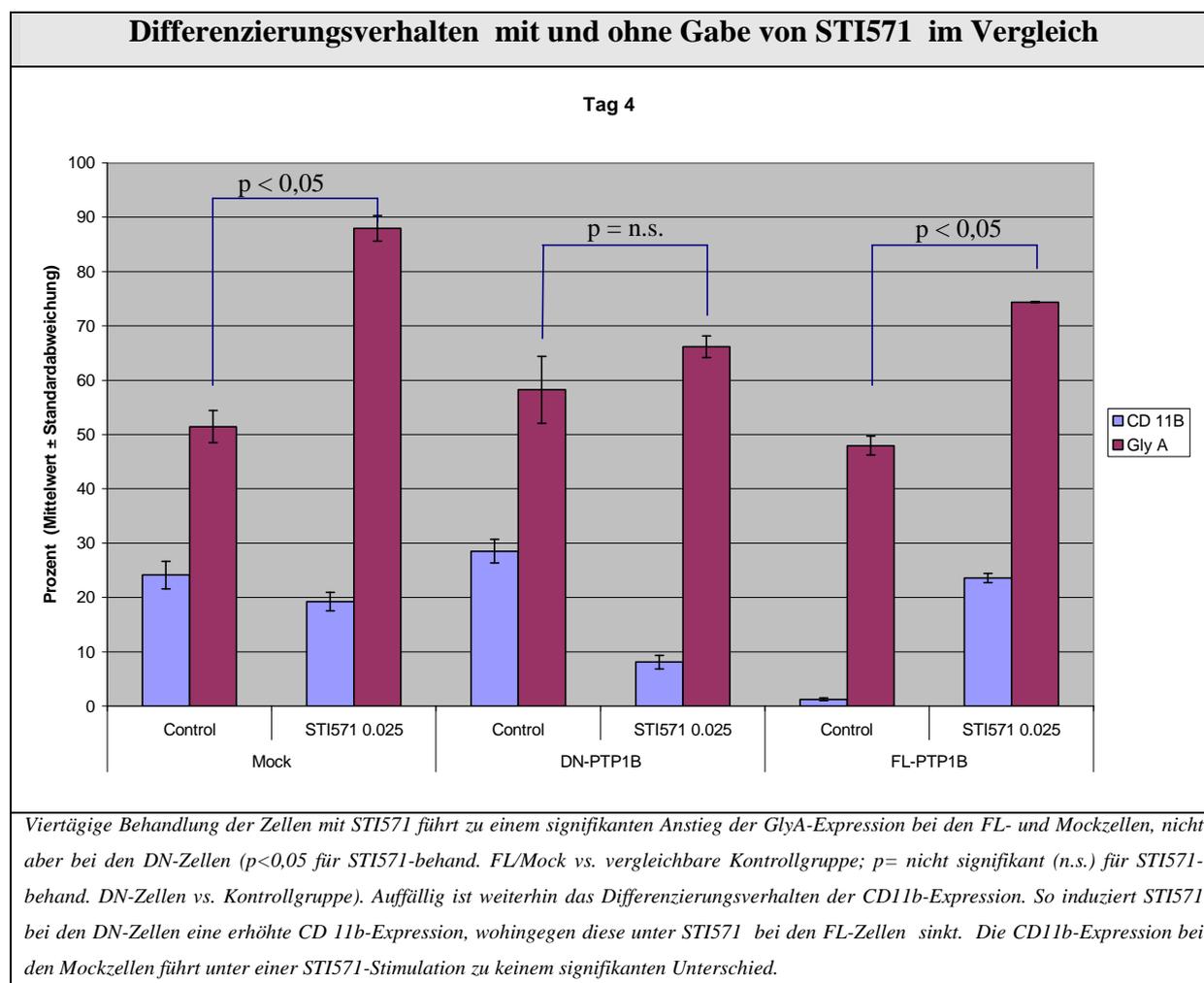


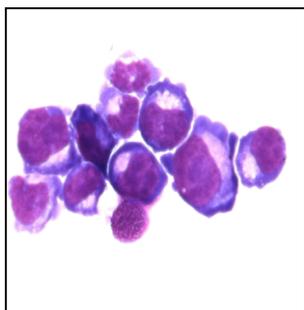
Abbildung 20 Differenzierungsverhalten unter STI571-Behandlung im Vergleich

Wir untersuchten zunächst das unterschiedliche Differenzierungsverhalten mit und ohne STI571-Gabe mittels FACS-Analyse und der CD11b- und Glycophorin A-Expression (siehe Abbildung 20). Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen der Kontrollgruppe ohne Stimulation und nach viertägiger Behandlung der Zellen mit $0,025 \mu\text{M}$ STI571 sowohl bei den Mock- und den FL-Zellen in der Glycophorin A-Expression. Demnach scheint es STI571-induziert zu einer PTP1B-vermittelten erythroiden Differenzierung zu kommen, wohingegen die DN-Zellen unter STI571-Zusatz unbeeinflusst bleiben. Es zeigt sich in der Vergleichsgruppe keinen signifikanten Unterschied. Die CD11b-Expression fällt dahingegen signifikant nach STI571-Stimulation in den DN-Zellen. Im Vergleich hierzu kommt es zu

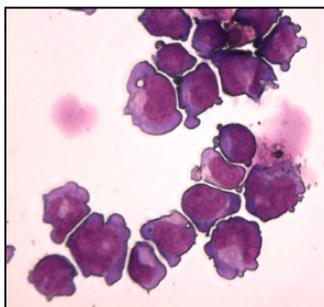
einem erheblichen Anstieg der CD 11b-Expression unter STI571 bei den FL-Zellen. Keinen signifikanten Unterschied zeigt sich in den Mockzellen. Offensichtlich stimuliert STI571 PTP1B-abhängig sowohl eine monozytäre als auch eine erythroide Differenzierung.

Die morphologische Analyse der stimulierten FL- aber auch der Mock-Zellen mittels Zytopspin zeigten als Zeichen einer Differenzierung multiple Vakuolen. Diese scheinen u.a. eine rötliche Substanz zu beinhalten, so dass eine erythroide Differenzierung denkbar wäre. Eine eindeutige Differenzierung einer bestimmten Zellreihe lässt sich allerdings nicht erkennen. Die DN-Zellen sehen trotz STI571 -Zugabe kaum verändert aus. Auch zeigen sich deutlich weniger Vakuolen als bei den FL-Zellen, ansonsten wirken die Zellen nach wie vor unreif bzw. wenig differenziert mit Nachweis von Vorläuferzellen (siehe Abbildung 21).

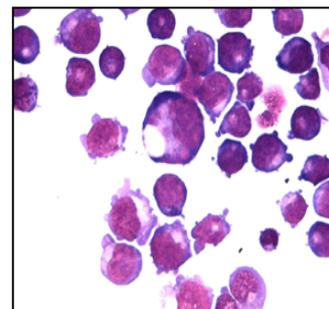
Morphologische Unterschiede nach STI571- Stimulation



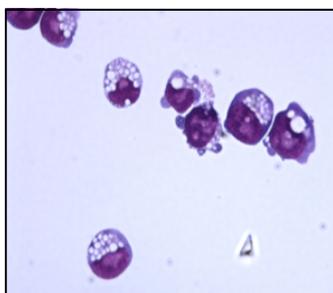
Mock ohne Stimulation



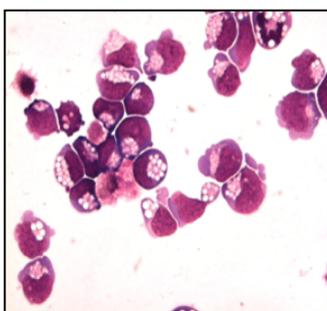
FL-PTP1B ohne Stimulation



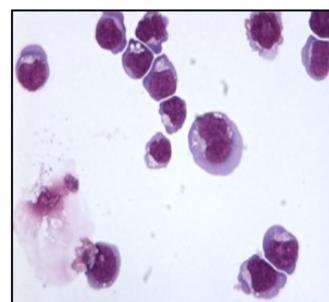
DN-PTP1B ohne Stimulation



Mock unter STI571 Stimulation



FL-PTP1B unter STI 571 Stimulation

DN-PTP1B unter STI571
Stimulation

Die FL-Zellen erscheinen unter 0,025 μ M STI571-Stimulation zu differenzieren, es lassen sich multiple Vakuolen als Zeichen hierfür nachweisen. Manche scheinen ein rötliches Material (Hämoglobin?) zu beinhalten. Insgesamt wirken die Zellen reifer. Die DN-Zellen scheinen wesentlich weniger von einer Differenzierung betroffen zu sein und wirken nach wie vor unreif. Die Mock-Zellen verhalten sich ähnlich den FL-Zellen, sie scheinen unter einer STI571-Stimulation zu differenzieren.

Abbildung 21 Morphologische Unterschiede nach STI571-Stimulation

3.2.5 Veränderungen der Phosphotyrosin Proteine unter STI571 im Vergleich

Nachfolgend untersuchten wir, ob eine Depletion der Phosphatase Aktivität auf BCR-ABL-vermittelte Signaltransduktionswege nach STI571-Behandlung Einfluss nimmt. Im Wesentlichen wurden hier drei zentrale Signaltransduktionswege untersucht: Die der MAPK, PI3K/AKT und der JAK/STAT5. Von diesen drei Regulationsmechanismen der BCR-ABL untersuchten wir die Expression der phosphorylierten Proteine ERK 1 und 2 (44 und 42 kDa), STAT5a/b (95kDa) und AKT1 (60kDa) und die BCR-ABL (p210) nach viertägiger Stimulation mit STI571 in den FL- und den DN-Zellen. Nach vier Tagen STI571 - Stimulation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Expression des STAT5 in den DN-Zellen; auch schien der Anteil an P-STAT5 vom STI571 unbeeinflusst zu sein. In den FL-Zellen bewirkt das STI571 dahingegen eine Reduktion der Phosphorylierung und der Expression des STAT5. Die Tubulin und die c-ABL Expression sind in allen Zellen unverändert. Auffällig im Phosphotyrosinblot ist der Nachweis eines etwa 62kDa und eines ca. 50 kDa großen Proteins in den STI571-stimulierten DN-Zellen. Diese konnten weder in den FL-Zellen noch in den unbehandelten DN-Zellen nachgewiesen werden. Unter der Vorstellung es könne sich um die in der ERK-Aktivierung beteiligten dok-Proteine (siehe unten) handeln, führten wir wiederholt Immunpräzipitationen durch. Hiermit ließ sich allerdings das 62kDa große Protein nicht nachweisen, so dass es noch weiterer Untersuchungen zur Klärung dieser Proteine bedarf.

Hinsichtlich der P-ERK1/2- Expression zeigten sich deutliche Unterschiede in den Mock, FL- und DN-Zellen vor und nach Stimulation mit Imatinib. Die Expression ist dabei dosisabhängig und von der Dauer der STI571-Stimulation abhängig.

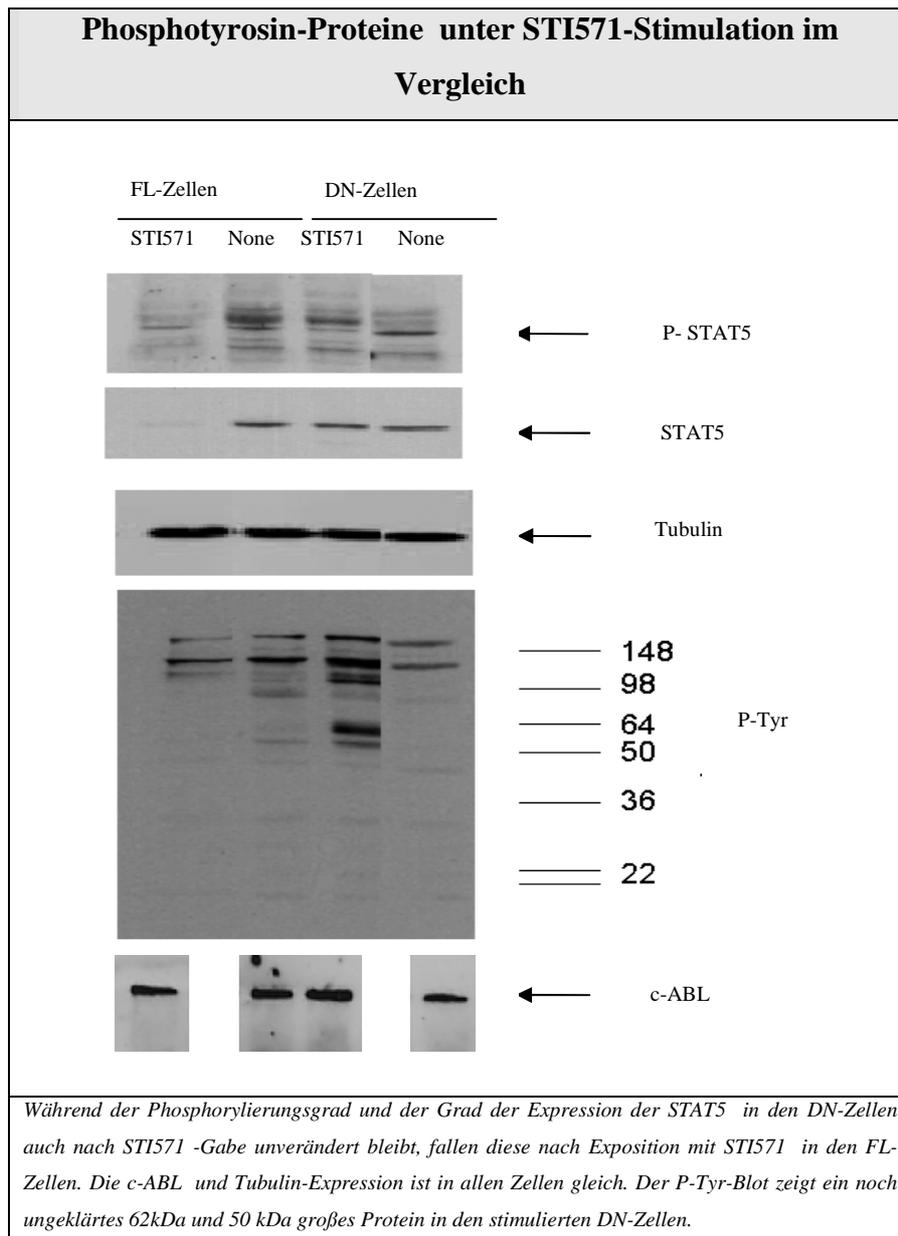


Abbildung 22 Phosphorylierungsgrad verschiedener Proteine nach STI571-Exposition

Wir untersuchten zum Zeitpunkt 0, 2, 4 und 8h nach STI571-Exposition den Phosphorylierungsgrad in den Mock-, DN- und den FL-Zellen. Das Ausmaß der Phosphorylierung der MAPK ist dosisabhängig. Es zeigen sich darüber hinaus zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Beobachtungen. Hiernach führt STI571 in allen transfizierten Zellen zu einer Reduktion des Phosphorylierungsgrades nach 2h. Nach vier Stunden dagegen kommt es zu einem erneuten Anstieg der P-ERK1/2 in den Mock- und noch wesentlich dramatischer in den FL-Zellen. Eine Reaktivierung der P-ERK1/2 lässt sich nicht in den DN-Zellen nachweisen. Die Reaktivierung scheint nicht dauerhaft zu sein, nach 48 Stunden fällt der Grad der ERK-Phosphorylierung in den Mock- und den FL-Zellen wieder. Die Gesamt-Expression des ERK1/2 bleibt in allen Zellen gleich (Abbildung 23).

Im Vergleich dazu nimmt der Phosphorylierungsgrad der BCR-ABL in den Mock- und den FL-Zellen innerhalb von 8h STI571-Stimulation ab, während dieser in den DN-Zellen nahezu unbeeinflusst bleibt. außerdem konnte erneut gezeigt werden, dass der Anteil des phosphorylierten BCR-ABLs in den unbehandelten DN-Zellen höher als in den FL-Zellen ist (Abbildung 23).

Bei gleich bleibender STAT5-Expression in allen Zellen deutet sich eine STI571-bedingte Reduktion des phosphorylierten Anteils an STAT5 in den FL-Zellen nach 8h an (siehe Abbildung 23). Scheinbar ist ein signifikanter Unterschied erst nach mehrtägiger Exposition darstellbar (siehe Abbildung 22). Eindeutig ist im Vergleich hierzu der deutlich gesteigerte Phosphorylierungsgrad in den unbehandelten DN-Zellen, welcher nach STI571-Zugabe innerhalb von 8h gleich bleibt. Die Mock-Zellen ähneln ihrem Verhalten diesmal eher den DN-Zellen, der Grad an „aktivem“ STAT5 ist bereits in den unbehandelten Zellen erhöht und verändert sich auch nach Exposition nicht (Abbildung 23).

Der Anteil an AKT steigt in den Mock- und den FL-Zellen nach Inkubation der Zellen mit STI571 innerhalb von 8h, kaum dagegen in den DN-Zellen. Allerdings fällt auf, dass die AKT-Expression in den DN-Zellen höher ist als in den FL- oder den Mockzellen. Gleiches gilt für den Grad der Phosphorylierung. Dieser ist in den FL- und den Mockzellen vergleichsweise niedriger als in den DN-Zellen, steigt aber nach STI571-Stimulation, während dieser in den DN-Zellen nahezu unverändert bleibt (Abbildung 23).

Weiterhin auffällig war ein ca. 50 kDa großes, noch unbekanntes Protein, dessen Expression durch STI571-Zugabe sowohl in den Mock- als auch in den FL-Zellen aufgehoben war, nicht aber in den DN-Zellen. Daneben zeigt sich ausschließlich in den stimulierten DN-Zellen ein Tyrosin-phosphoryliertes 62kDa großes Protein, dessen Identität noch unklar ist (Abbildung 23).

Alles in allem zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Überexpression der Mangelmutante den Grad der Phosphorylierung von Proteinen nach Inkubation mit STI571 verändert.

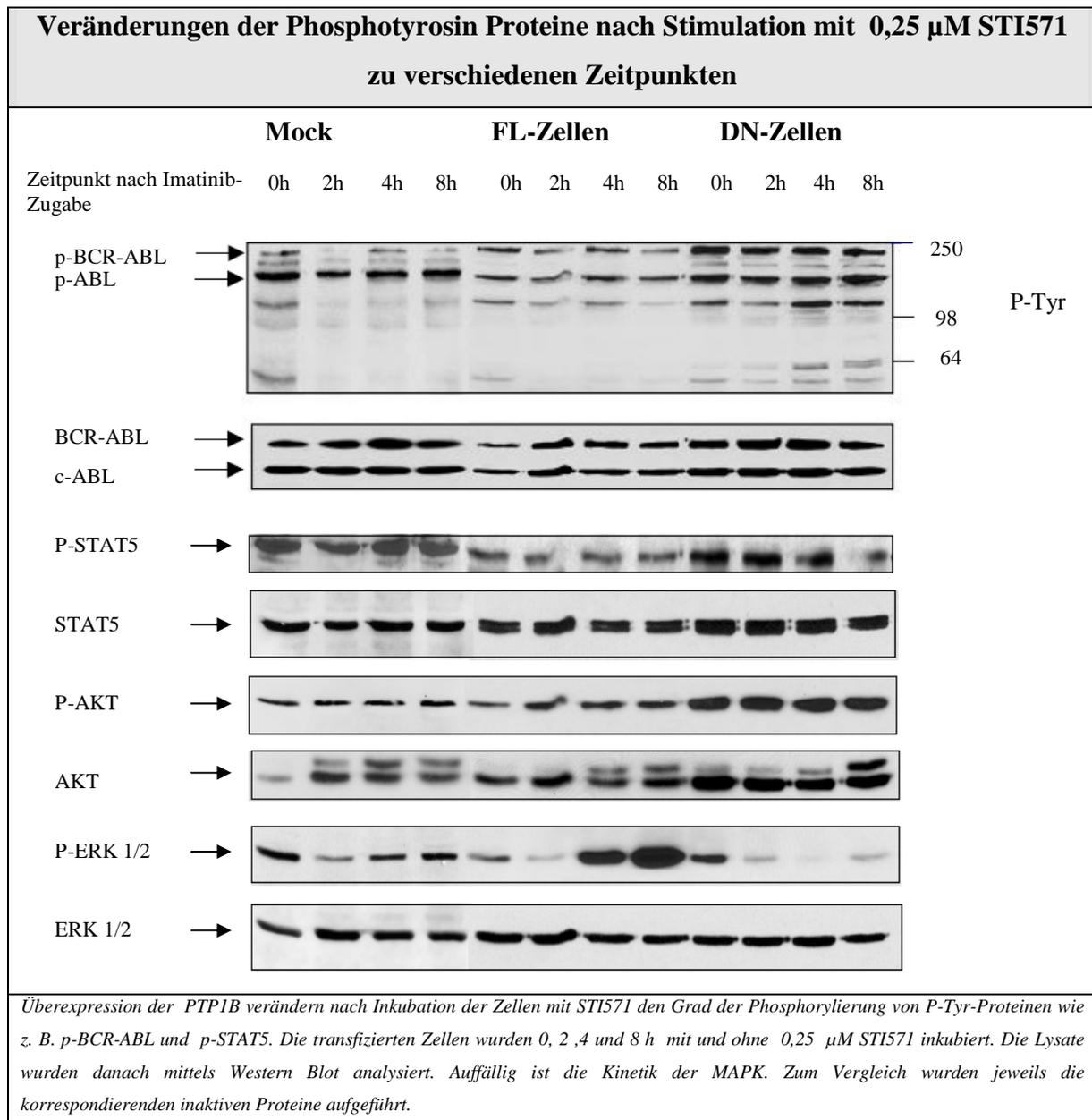


Abbildung 23 Phosphotyrosin-Proteine nach Inkubation mit und ohne STI571

3.3 Phosphataseaktivität in einer STI571-resistenten SupB15-Sublinie

Für den Nachweis einer Verbindung zwischen attenuierter PTP1B-Aktivität und STI571-Resistenz untersuchten wir SupB15-Zellen. Diese stammen von einer Philadelphia-Chromosom-positiven ALL Zelllinie ab und exprimieren p185 BCR-ABL. Wir kultivierten die Zellen in einem STI571-haltigen Medium für über sechs Monate. Dabei wurde die STI571-Konzentration konsekutiv gesteigert. Nachfolgend wurden die Zellen in einem Medium von 1 μM STI571 aufbewahrt. Auf diese Weise gewannen wir eine gegen STI571 resistente Zelllinie, die als SupB15-RT bezeichnet wird. Ziel war es nun zum einen die P-Tyr-Proteine in den SupB15-RT mit den nativen SupB15-(WT)-Zellen zu vergleichen und schließlich deren PTP1B-Aktivität zu untersuchen.

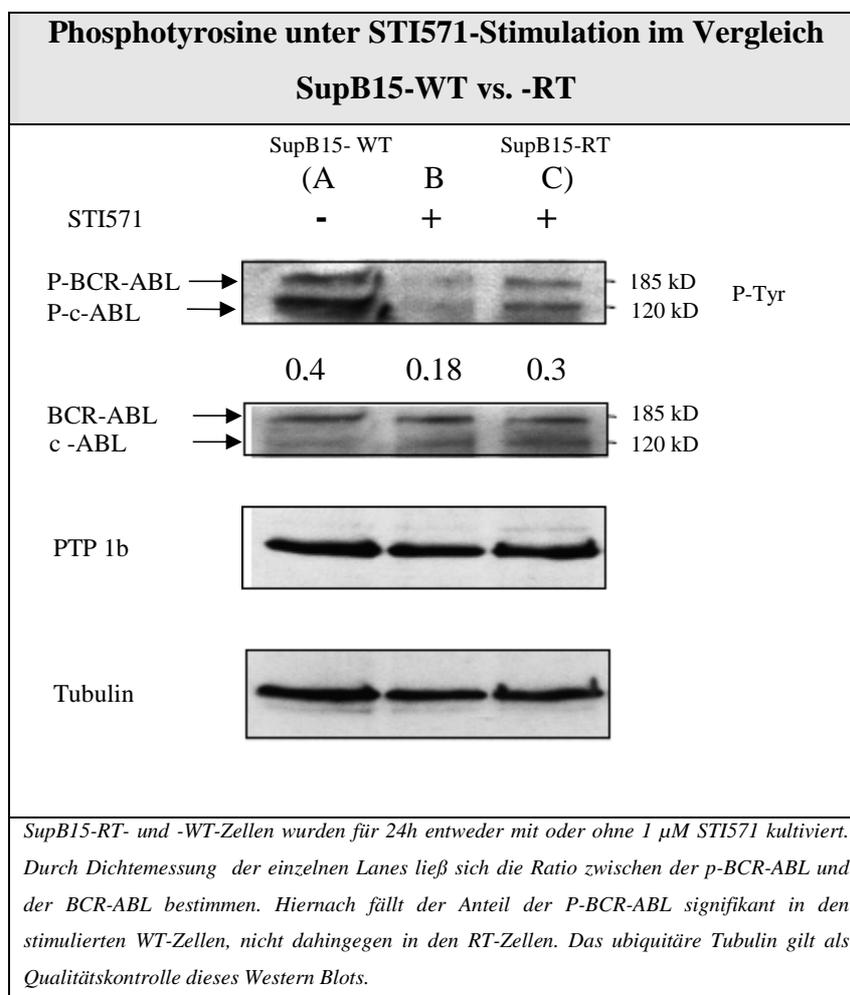


Abbildung 24 SupB15-RT und -WT-Zellen im Vergleich

Es zeigt sich, dass eine Stimulation der SupB15-WT-Zellen mit 1 μ M STI571 zu einem drastischen Abfall der Phosphorylierung von BCR-ABL führt. Dahingegen wurde (nach Bestimmung der Ratio) ein signifikant höherer Phosphorylierungsgrad der BCR-ABL in den SupB15-RT-Zellen beobachtet. Keine Unterschiede zeigten sich in der PTP1B-Expression der SupB15-RT bzw. -WT-Zellen. Auch scheint die PTP1B-Expression unabhängig von einer STI571-Stimulation zu sein.

Zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität der beiden Zelllinien untersuchten wir zum einen die Gesamt-Tyrosin-Phosphatase-Aktivität und verglichen diese mit der der spezifischen Proteintyrosinphosphatase PTP1B. Die Gesamtaktivität der Tyrosinphosphatase wurde anhand der Zell-Lysate gemessen und war sowohl in den RT- als auch in den WT-Zellen gleich. Zur Bestimmung der PTP1B-Aktivität wurden die Proteine der Zell-Lysate immunopräzipitiert und an 50% Protein A Agarose gebunden. Durch Messung des dephosphorylierten Anteils eines synthetischen tyrosinphosphorylierten Peptids konnten Rückschlüsse auf den Aktivitätsgrad der PTP1B geschlossen werden. Die PTP1B-Aktivität ist demnach in den RT-Zellen signifikant niedriger als in den WT-Zellen ($64,3 \pm 5,4\%$; $n=3$; $p<0,05$). Diese Ergebnisse untermauern, dass eine attenuierte PTP1B-Aktivität bzw. ein verstärkter Phosphorylierungsgrad der BCR-ABL mit einer STI571-Resistenz in p185 BCR-ABL positiven SupB15-Zellen assoziiert ist.

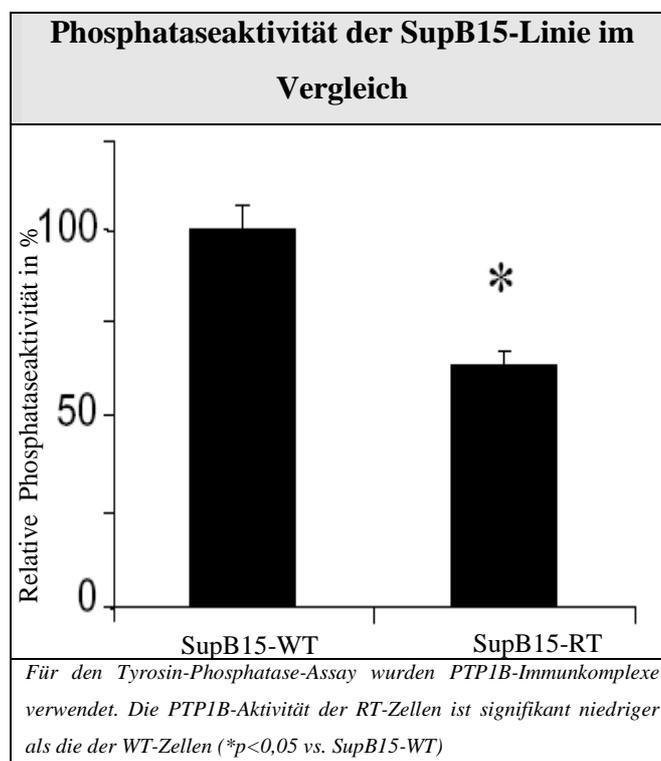


Abbildung 25 Phosphataseaktivität der SupB15-WT und der RT-Zellen

4 Diskussion

Die Transformation durch das bcr-abl-Onkogen ist abhängig von der Tyrosinkinaseaktivität, die zu einer abnormalen Phosphorylierung einer Vielzahl von zellulären Proteinen, wie z. B. die ERK1/2, P-STAT5 und AKT führt. Imatinib bindet kompetitiv an der ATP-Bindestelle und hemmt so die ABL-Kinase [106]. In der Regel wirkt dieses Medikament hochgradig effizient, um so ernst zu nehmender ist das Vorkommen von primären und sekundären Resistenzen.

Es ist bekannt, dass BCR-ABL die PTP1B-Expression erhöht [73, 74].

Es wurde vermutet, dass PTP1B womöglich BCR-ABL-induzierte Transformationen antagonisiert und damit als ein wichtiger physiologischer Gegenspieler fungiert. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch PTP1B Bestandteil eines Resistenzmechanismus sein könnte. Tatsächlich sind Tyrosinphosphatasen wie bereits erwähnt fester Bestandteil in der Pathogenese verschiedener solider Tumoren und Leukämien [69, 117].

Dass eine Dysfunktion des Dephosphorylierungsmechanismus eine Ursache für eine Resistenz gegen STI571 sein kann, beweist die Tatsache, dass die BCR-ABL-Mutante Y393F nicht mehr dephosphoryliert werden kann und damit eine Bindung des Imatinibs an die ABL-Kinase verhindert wird [84]. Hinzu kommt, dass Resistenzmechanismen beschrieben wurden, die mit einer erhöhten BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität einhergehen, ohne dass die Genexpression betroffen ist [126].

Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass die resistent gewordene p185 BCR-ABL-exprimierende ALL-Zelllinie SupB15-RT signifikant weniger PTP1B-Aktivität als die STI571-sensible parentale Zelllinie besitzt, was u.a. zu einem erhöhten Phosphorylierungsgrad der BCR-ABL führt. Außerdem ließ sich auch in den PTP1B-depletierten DN-Zellen eine vermehrte Phosphorylierung der BCR-ABL trotz Gabe von Imatinib nachweisen.

Um den molekularbiologischen Mechanismus zu analysieren, ob die Überexpression einer dominant-negativen PTP1B bcr-abl-positive Zellen resistent gegenüber Imatinib macht, beschäftigten wir uns mit dem den Phänotyp der CML bestimmenden Veränderungen des Wachstums- und Proliferations-, aber auch Apoptose- und Differenzierungsverhalten.

4.1 Kein Wachstumsarrest in STI571-behandelten PTP1B-Mangelmutanten

Im Vergleich mit der Mangelmutante zeigt sich, dass unter Serumentzug eine PTP1B-Überexpression zu einem Wachstums- und damit Überlebensvorteil führt, was eine wachstumsregulatorische Funktion der PTP1B nahe legt, wenngleich dieser Phosphatase bisweilen eher eine wachstumssuppressive Funktion zugeordnet wurde [120, 121]. Allerdings postuliert Dubé et al. auch ein positiven Einfluss der PTP1B auf die RAS-Kaskade, was über eine Aktivierung der ERK auch den Wachstumsvorteil erklären könnte [33]. Unter einer Stimulation mit STI571 kommt es in den PTP1B-(über-)exprimierenden Zellen erwartungsgemäß zu einem Wachstums- und Proliferationsstopp [27], nicht dahingegen in der Mangelmutante.

Das Fehlen einer aktiven PTP1B könnte beispielsweise dazu führen, dass BCR-ABL nicht dephosphoryliert und damit unzugänglich für das Imatinib wird. Fest steht, dass ein Mangel an aktiver PTP1B einen STI571-induzierten Wachstumsstopp umgehen kann. Potenzielle Mediatoren sind hierbei die STAT5 und die Erk1/2 sowie AKT, auf welche noch im Folgenden eingegangen wird.

4.2 Keine STI571-vermittelte Apoptose in PTP1B-Mangelmutanten

Analog zum veränderten Wachstumsverhalten konnte ähnliches auch für das Apoptoseverhalten gezeigt werden. Der Anteil an Zellen in der proapoptotischen sub-G1-Phase blieb in der Mangelmutante unter STI571-Stimulation nahezu unbeeinflusst im Gegensatz zu den PTP1B-exprimierenden Zellen, bei denen eine starke Zunahme der apoptotischen Zellen unter Imatinib zu verzeichnen war. Hinzu kommt, dass eine Blockade der PTP1B mit dem pharmakologischen Inhibitor DMHV zu einer gesteigerten Annexin V-Expression als Ausdruck einer eingeleiteten Apoptose führt (siehe Abbildung 19). Dies untermauert die Annahme, dass PTP1B wachstumsregulatorisch wirksam ist und deckt sich mit unseren Beobachtungen dass die überexprimierenden PTP1B-Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Mangelmutanten besitzen (siehe Abbildung 15). Eine zusätzliche Gabe von STI571 dahingegen antagonisiert geradezu diesen Effekt. Es kommt zu einem Rückgang der Apoptose, und zwar umso erheblicher je intensiver die PTP1B-Blockade ist. Dies entspricht einem Rückgang der Annexin V-positiven Zellen unter Dosissteigerung vom DHMV. Zugleich bedeutet dies, dass Zellen mit inaktiven PTP1B nicht nur gegen

Apoptose resistent sind, sondern es Imatinib-vermittelt zu einem Überlebensvorteil dieser Zellen kommt.

Um den Pathomechanismus einer Resistenz gegen Apoptose zu verstehen, untersuchten wir zum einen die an der Apoptose beteiligten c-AKT und deren Zielproteine Caspase 8 und 3 sowie PARP. Die AKT-Kinase ist eine Serin-Threonin-Kinase, stellt ein wichtiges Substrat der PI-3K dar und gilt als Mediator für das Überleben der Zelle. Sie führt zur Phosphorylierung und damit Inhibition des proapoptischen Bad-Proteins und aktiviert die antiapoptischen Bcl-X_L und Bcl-2 [113]. Die AKT-Kinase zusammen mit der PI-3K stellen einen essenziellen Bestandteil der Leukämogenese dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der PI-3K durch Wortmannin wie auch eine AKT-Mangelmutante in Mäusen eine Leukämie verhindern. Daneben soll sie im Caspase-Signaltransduktionsweg involviert sein [25]. Die Caspase 9 bildet zusammen mit Cytochrom c und Apaf-1 das sogenannte Apoptosom, AKT soll die proteolytisch wirkende Caspase 9 durch Phosphorylierung inaktivieren und somit die nachfolgende Kaskade einer Spaltung vielfältiger Caspasen unterbinden. Folge ist eine antiapoptische Wirkung.

Wir konnten zeigen, dass in den Zellen mit inaktiver PTP1B AKT hochreguliert wird. Es zeigt sich eine Überexpression sowohl der aktiven als auch der inaktiven Kinase, was den Wachstumsvorteil der Mangelmutanten unter einer STI571-Behandlung erklären könnte. Analog zur AKT-Erhöhung sind die PARP und ihre Spaltprodukte sowie Caspase 3 und 8 nach STI571-Gabe in den DN-Zellen erniedrigt, wohingegen dieselbigen dosisabhängig in den FL-Zellen ansteigen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass ursächlich für eine Resistenz gegen Apoptose bei einem PTP1B-Mangel anscheinend eine Hochregulierung der AKT-Kinase ist, die unter STI571 auch nicht wieder fällt sondern möglicherweise im Rahmen einer Gegenregulation ansteigt. Ob dies nun ein Feedbackmechanismus direkt zwischen PTP1B und AKT ist oder doch AKT auf eine gesteigerte BCR-ABL-Aktivität zurückzuführen ist, bleibt unklar. Eine Interaktion zwischen PTP1B und AKT wurde jedoch bereits in der Regulierung der Aktivität des Insulinrezeptors beschrieben [36, 43, 90]. Dabei wurde gezeigt, dass es bei einem PTP1B-Mangel insulinabhängig zur Autophosphorylierung des Insulinrezeptors mit nachfolgender Phosphorylierung von „Downstream“-Proteinen wie der PI-3K und AKT kommt. Dies soll Bestandteil in der Pathogenese der Insulinresistenz eines Diabetes mellitus Typ II sein.

4.3 Differenzierungsstopp in STI571-behandelten PTP1B-Mangelmutanten

Dass Imatinib zu einer multilineären Differenzierung besonders in K562-Zellen führt, ist bekannt und kann anhand einer erhöhten Glycophorin A, CD11b und CD13- Expression nachgewiesen werden, wenngleich der molekularbiologische Mechanismus noch unklar ist [37, 72]. Es wird vermutet, dass die Differenzierung auf eine STI571-vermittelte Phosphorylierung der p38-MAPK und einer Dephosphorylierung der ERK1/2 zurückzuführen ist [68]. In Hepatozyten von Mäusen konnte darüber hinaus eine Interaktion zwischen der PTP1B und p38 gezeigt werden [50]: Ein PTP1B-Mangel soll hierbei zu einer reduzierten Aktivierung der p38-MAPK und damit verminderten Erythropoese führen.

LaMontagne et al. zeigten, dass PTP1B analog zu Imatinib zu einer erythroiden Differenzierung beiträgt [74]. Cohen et al. wiesen darüber hinaus nach [20], dass PTP1B an der Dephosphorylierung des für die Bildung von Erythrozytenvorläuferzellen notwendige Epo-Rezeptors beteiligt ist. Nach Bindung des Liganden wird die zytoplasmatische Jak2-Kinase rekrutiert, was zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung des Epo-Rezeptors führt. PTP1B gilt hierbei als Gegenspieler. So wird nachvollziehbar, dass es in den DN-Zellen zu einer Akkumulation von Jak2-vermittelten phosphoryliertem Erythropoetin-Rezeptor kommt. Damit ist anzunehmen, dass mit dem Epo-Rezeptor aber auch der Jak2, zwei wesentliche Substrate der Phosphatase in dem Prozess einer Differenzierung beteiligt sind.

Bezüglich der Gly-A-Expression erhielten wir inkohärente Ergebnisse (siehe Abbildung 13 und 20). Es zeigte sich kein eindeutiger Unterschied in der Gly-A-Expression zwischen den PTP1B-überexprimierenden und den mangelmutierten Zellen trotz mehrfacher Versuchsdurchführungen. Dies kann Ausdruck der Redundanz verschiedener Differenzierungswege sein. So ist vorstellbar, dass die Inhibition aktiver PTP1B zu einer reduzierten Aktivierung der p38-Kinase und verminderten Dephosphorylierung der ERK führt und somit eine erythroide Differenzierung verhindert, ebenso ist es denkbar, dass es infolge eines PTP1B-Mangels über eine verminderte Inaktivierung des Epo-Rezeptors und der Jak2 zu einer gesteigerten Erythropoese kommt. Die Tatsache, dass in den DN-Zellen die Gly-A-Expression vergleichsweise zwar nicht signifikant, aber dennoch erhöht war, verleitet zur Annahme, dass womöglich der Jak2-Signalweg eher für PTP1B von Bedeutung ist.

Einen signifikanten Unterschied zeigte sich erst nach Stimulation mit STI571. Hierunter kam es zu einem erheblichen Anstieg der GlyA-Expression in den FL-Zellen im Gegensatz zu den Zellen mit katalytisch inaktiver PTP1B (siehe Abbildung 20). Man könnte vermuten, dass in den PTP1B-überexprimierenden Zellen, PTP1B und Imatinib synergistisch wirken, womöglich über eine gemeinsame Aktivierung der p38-Kinase/ Deaktivierung der ERK. In den DN-Zellen dahingegen kann es durch eine gesteigerte Jak2/Epo-vermittelte Erythropoese infolge eines Mangels an funktionstüchtiger PTP1B kommen, so dass eine weitere STI571-vermittelte erythroide Differenzierung nicht von weiterer Relevanz zu sein scheint. Dies könnte die fast unveränderte GlyA-Expression in den PTP1B-Mangelmütanten erklären. Um diese Hypothese allerdings zu belegen, wäre ein Vergleich der p38-Kinase- bzw. des Epo-Rezeptors Expression in beiden Zellen notwendig.

Offensichtlich erfüllt PTP1B in der erythroiden Differenzierung zwei gegensätzliche Rollen, so dass es zur Klärung der Funktionsweise weitere Untersuchungen bedarf. Zu vermuten bleibt, dass PTP1B-mangelmütante Zellen von einer STI571-induzierten Differenzierung nahezu unbeeinflusst bleiben, vielleicht infolge einer ohnehin gesteigerten Erythropoese. Diese wird vermutlich durch Jak2 und den Erythropoetin-Rezeptor vermittelt, welche scheinbar für die PTP1B-Signaltransduktion wichtiger ist als die p38-induzierte Differenzierung.

Von stärkerer Aussagekraft war dahingegen die CD11b-Expression, welche deutlich höher in den Mangelmutanten war als in den PTP1B-überexprimierenden Zellen. Mikroskopisch imponierten die DN-Zellen differenzierter und erinnerten an Monozyten, wohingegen die FL-Zellen eher unreif wirkten. Anscheinend ist PTP1B an der Regulation einer myeloiden Differenzierung beteiligt. Erst kürzlich bestätigten Heinonen KM et al. [56] unsere Beobachtungen, dass ein PTP1B-Mangel am ehesten durch eine vermehrte Phosphorylierung des CSF-1 (colony stimulating factor) zu einer gesteigerten monozytären Koloniebildung führt. Umgekehrt könnte man hieraus schlussfolgern, dass eine PTP1B-Überexpression eine verminderte monozytäre Differenzierung induziert. Dies würde sich mit unseren Ergebnissen decken (siehe Abbildung 20 und 13): Die PTP1B-überexprimierenden Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte CD11b-Expression aus.

Da Imatinib bekanntermaßen eine Granulozyten-/Makrophagen-Koloniebildung supprimiert [27], wird auch verständlich, dass die CD11b-Expression in den PTP1B-Mangelmutanten unter einer STI571-Stimulation fällt (siehe Abbildung 20). Der Grund für eine STI571-

induzierte CD11b-Expression bei den PTP1B-überexprimierenden Zellen bleibt unklar und verlangt nach weiteren Untersuchungen über Mechanismen zur STI571-bedingten myeloiden Differenzierung.

Schlussfolgernd führt ein Mangel an aktiver PTP1B zu einer monozytären Differenzierung, was durch eine Behandlung mit Imatinib antagonisiert wird. Umgekehrt hebt die Gabe desselbigen eine PTP1B-bedingte Suppression der myeloiden Differenzierung wieder auf. Damit führt STI571 zu einem Differenzierungsstopp in den PTP1B-Mangelmutanten.

4.4 Einfluss der PTP1B auf die BCR-ABL-Signaltransduktion unter STI571-Behandlung

Wir konnten zeigen, dass die aktive PTP1B das Wachstums- und Apoptose- wie auch das Differenzierungsverhalten derart beeinflusst, dass ein Mangel ihrerseits zu einer STI571-Resistenz führt. Um zu klären, welche Proteine der BCR-ABL-Signaltransduktion an dem Resistenzmechanismus beteiligt ist, konzentrierten wir uns auf die BCR-ABL-Expression und deren Zielproteine unter STI571-Stimulation. Von besonderer Bedeutung sind damit die Grb2- vermittelte RAS-Kaskade, welche zuletzt die Aktivierung der MAPK bewirkt, die PI-3K-Signaltransduktion, bei welcher neben der AKT-Kinase die p62^{Dok} womöglich eine entscheidende Rolle spielt sowie die scheinbar direkte Wirkung der BCR-ABL auf die Transkriptionsfaktoren STAT5 a und b.

4.4.1 Persistierendes Wachstumsverhalten durch P-STAT5 bei Mangel an funktionstüchtiger PTP1B unter STI571

So konnten Donato et al. beobachten, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktor STAT5 für die BCR-ABL-vermittelten Transformationen notwendig ist [31]. Auch in anderen Studien zeigte sich, dass insbesondere diese onkogene Tyrosinkinase eine Überexpression des STATs 5 sowie eine gesteigerte Phosphorylierung bewirkt [112]. Hierdurch kommt es zu einer Dimerisierung zweier STAT-Moleküle, die in den Nukleus transloziert werden, wo diese an DNA-Sequenzen (z. B. Beta-Casein-Promotor, Cis, etc.) binden und u.a. zu einer Hochregulierung des proapoptotischen Bcl-X_L führen. Folge ist eine Resistenz gegen Apoptose und eine Induktion von Wachstum [26]. Neben einer direkten Aktivierung durch BCR-ABL, treibt auch einer der wichtigsten Substrate der PTP1B, die Januskinase Jak2, die

Phosphorylierung von STAT5 an, wobei dessen Hemmung keine wesentlichen Veränderungen des Wachstums- bzw. Apoptoseverhaltens herbeiführt [67].

Die physiologische Rolle der STAT5, von denen zwei bekannt sind (STAT5a und b) ist noch nicht vollständig geklärt. Man weiß aber, dass sie in Abhängigkeit verschiedener Zytokine (Erythropoetin, Interleukin 3, GM-CSF) die Genexpression induziert [44]. Eine aberrierende Aktivierung der STAT5 ist in hämatopoetischen Zellen mit einer zellulären Transformation korreliert. Eine Hemmung der STAT5 führt zu einem verzögerten Wachstum von K562-Zellen [60].

Unsere Ergebnisse zeigten, dass der Anteil an aktivem STAT5 in den PTP1B-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen mit inaktivem PTP1B vermindert (siehe Abbildung 10 und 23) ist. Nach viertägiger Inkubation mit Imatinib ist der Grad der Phosphorylierung in den inaktiven PTP1B-Zellen unverändert, wohingegen dieser in den PTP1B-überexprimierenden Zellen fällt (siehe Abbildung 22). Keinen Unterschied in der Expression des phosphorylierten STAT5 zeigt sich dahingegen nach acht Stunden Inkubation mit Imatinib weder in den FL- noch in den DN-Zellen (siehe Abbildung 23). Inaktives STAT5 wird in allen Zellen gleichermaßen exprimiert (siehe Abbildung 10, 22 und 23). Wir konnten damit zeigen, dass eine verminderte PTP1B-Aktivität in die STAT5-Signaltransduktion nach einer Behandlung mit Imatinib eingreift. Imatinib führt dabei nicht zu einer Reduktion des aktiven STAT5 in diesen Zellen, was unsere Hypothese der Resistenzentwicklung zu untermauern scheint. Noch zu diskutieren bleibt, warum dieser Effekt erst nach vier Tagen und nicht schon nach acht Stunden in den PTP1B-aktiven Zellen nachweisbar ist.

Die Reduktion der aktiven STAT5-Expression in den FL-Zellen kann Ausdruck der gesteigerten Dephosphorylierung der BCR-ABL, der Jak2 und vielleicht auch der P-STAT5 selbst sein, welche bekanntermaßen durch Imatinib [31] wieder herunterreguliert wird. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass die Überexpression der STAT5 entscheidend mitverantwortlich ist für das persistierende Wachstums- und reduzierte Apoptoseverhalten. Offensichtlich kann Imatinib in den Zellen mit attenuierter PTP1B-Aktivität STAT5 nicht supprimieren, vermutlich als Folge einer mangelnden Dephosphorylierung der BCR-ABL-Kinase. Unter dieser Hypothese wird auch das STAT5-Verhalten in den Mockzellen nachvollziehbar. Ihre PTP1B-Aktivität liegt zwischen der FL- und der DN-Zellen und führt damit nur zu einer mäßigen Dephosphorylierung des P-STAT5. Gleichzeitig könnte man aus dieser Beobachtung schließen, dass die hochaktive BCR-ABL effizient zu einer gesteigerten STAT5-Expression führt. Zugleich sollte aber auch kritisch erwähnt werden, dass in einem

Fall der Anteil der tyrosinphosphorylierten STAT5 in den FL-Zellen im Vergleich mit dem der DN-Zellen höher war (siehe Abbildung 22). Dies könnte ebenfalls Folge der BCR-ABL-Tyrosinkinase sein, andere Ursachen lassen sich aber nicht ausschließen.

4.4.2 Keine Reaktivierung der P-ERK nach STI571-Behandlung bei Zellen mit inaktiver PTP1B

Neben einer Wachstumsinduktion über STAT5 ist auch die überwiegend RAS-vermittelte Aktivierung der ERK 1/2 in den BCR-ABL-induzierten Transformationen implementiert und führt zur Proliferation, zum Zellüberleben und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen. Von besonderer Bedeutung scheint aber das Zellüberleben zu sein. So konnte eine Inhibition der ERK und nicht eine Aktivierung der JNK bzw. p38 Apoptose in K562-Zellen induzieren [64]. Imatinib führt zu fluktuierenden Veränderungen der ERK-Phosphorylierung [19, 59], dies scheint vom Zeitpunkt der Analyse und der Dosis abhängig zu sein. So kommt es nach Exposition der BCR-ABL mit STI571 zunächst zu einer Downregulation und zu einem späteren Zeitpunkt zu einem erneuten Anstieg der MAPK-Expression (auch nach 16h) [91]. Diese Reaktivierung könnte für einen zytoprotektiven Effekt sprechen, welcher infolge der Unterbrechung der BCR-ABL-Signaltransduktion in Form eines Stress-Stimulus zu einer Aktivierung der MEK 1/2 und infolgedessen auch die der ERK 1/2 führt. Belegt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die Gabe eines MEK-Inhibitors die STI571-vermittelte Reaktivierung verhindert. Das bedeutet, dass Imatinib und der MEK-Inhibitor synergistisch in BCR-ABL exprimierenden Zellen wirken und hierdurch die Apoptose über eine Regulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren essenziell steuern. Man muss aber an dieser Stelle noch hinzufügen, dass eine Reaktivierung nur in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren stattfindet. Es konnte belegt werden, dass bei Abwesenheit desselbigen ein erneuter Anstieg der P-ERK ausbleibt.

In unseren Untersuchungen beobachteten wir, dass bei einer relativ gleichmäßigen ERK 1/2-Expression, der tyrosinphosphorylierte Anteil in den PTP1B-Mangelzellen aber auch in den Mockzellen höher war als in den FL-Zellen. Unseren Vermutungen entsprechend, könnte man hieraus interpretieren, dass der gesteigerte Anteil der aktiven ERK 1/2 auf ein Ungleichgewicht zwischen der hochaktiven Tyrosinkinase und der kaum wirksamen PTP1B zurückzuführen ist.

Außerdem konnten wir zeigen, dass es zu einer Aktivierung der P-ERK nach einer transienten Dephosphorylierung in PTP1B-(über)-exprimierenden Zellen kommt, allerdings ohne Korrelation zum Zellwachstum. In den Mangelmutanten dahingegen kam es zu keiner Reaktivierung unter STI571-Exposition. Während in den PTP1B-überexprimierenden Zellen sowohl eine Phosphatase- als auch eine STI571-bedingte Dephosphorylierung scheinbar einen Reiz imitiert, die MAPK BCR-ABL-vermittelt hochzuregulieren, könnte man spekulieren, dass eine reduzierte Wirksamkeit des Imatinibs eine Zytoprotektion gar nicht erst erforderlich macht in den PTP1B-depletierten Zellen. Vielleicht greift STI571 nicht so relevant in die BCR-ABL-Signaltransduktion ein, dass hieraus eine ERK-Aktivierung notwendig wird.

Alternativ liegt die Vermutung nahe, dass in den DN-Zellen Wachstumsfaktoren fehlen. Dies würde voraussetzen, dass die PTP1B Wachstumsfaktoren positiv beeinflusst. Unsere Beobachtung, dass die PTP1B-Überexpression zu einem Wachstumsvorteil führt, könnte hierfür ein Indiz sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtungen von Dubé et al. [33], welche feststellten, dass es in PTP1B-defizitären Zellen entgegen den bisherigen Erwartungen von LaMontagne et al. [73] zu keiner PDGF stimulierten ERK1/2-Aktivierung kommt. Vielleicht ist es also ein Mangel an PDGF in den DN-Zellen, welche eine Reaktivierung der MAPK verhindert.

4.4.3 Die mögliche Rolle der Dok-Proteine und des Grb2 in der PTP1B-Signaltransduktion

Auffällig in unseren Untersuchungen war die Expression eines 50 und eines 62kDa großen Proteins, die sich nur in den STI571-stimulierten PTP1B-inaktivierten Zellen nachweisen ließ.

Es könnte sich hierbei um das p56dok (Dok-R) und die p62dok (Dok-1) handeln. Die dok-Proteine gehören zu den intrazellulären Signalproteinen, die als „docking“ Stationen verschiedene Rezeptortyrosinkinasen wie BCR-ABL binden. Dabei sind sie u.a. an der RAS - Signaltransduktion beteiligt [11], über deren Wirkmechanismen es kontroverse Beobachtungen gibt [21, 65]. Dok-1 soll dabei die RAS-/MAPK-Kaskade herunterregulieren. Zugleich wurde beobachtet, dass eine BCR-ABL-vermittelte Tyrosinphosphorylierung zu einer Inaktivierung von Dok-1 führt. Folge ist eine gesteigerte RAS-Signaltransduktion. Nähere molekularbiologische Mechanismen sind kaum untersucht, so dass diese Annahmen nicht eindeutig verifiziert sind und letztlich durch weitere Studien besser analysiert werden

müssen. Unter der Vorstellung es könne sich um p62^{dok} handeln, führten wir mehrfach Immunpräzipitationen durch, bei welchem sich das Protein nicht eindeutig nachweisen ließ.

Das 50 kDa große Protein in den mangelmutierten und STI571-stimulierten Zellen könnte Grb2 (growth factor binding protein 2) sein. Es gilt als essenzieller Vermittler zwischen der BCR-ABL und der RAS-Kaskade, dominant negative Grb2-Mutanten führen zur Rückbildung eines leukämischen Phänotyps [45] und wie Kenneth et al. zeigten, antagonisiert PTP1B die BCR-ABL-induzierten Transformationen [73, 74] mittels Hemmung einer Bindung des Grb2 an der BCR-ABL. Ob dies eine Rolle in einer möglichen PTP1B-abhängigen Resistenzentwicklung gegen Imatinib spielt, muss durch weitere analytische Untersuchungen geklärt werden.

4.5 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es heraus zu finden, ob eine Inhibition der PTP1B-Aktivität als mögliche Ursache eines Resistenzmechanismus in der Behandlung mit dem ansonsten hochpotenten Imatinib in Frage kommt. Um dies zu beantworten, untersuchten wir Faktoren, die den Phänotyp der chronisch myeloischen Leukämie ausmachen, also dem Differenzierungs-, dem Wachstums- und dem Apoptoseverhalten, daneben konzentrierten wir uns auf mögliche Angriffspunkte der PTP1B in die BCR-ABL-Signaltransduktion. Von Bedeutung hierfür war die RAS-vermittelte MAPK-Kaskade, die primär das Wachstums- und sekundär das Differenzierungsverhalten prägt, die PI-3K-Signaltransduktion, welche zur AKT-Aktivierung führt und eine Apoptose unterbindet sowie von BCR-ABL konstitutiv phosphorylierte Proteine, wie STAT5 und p62^{dok}.

Wir konnten zeigen, dass eine verminderte PTP1B-Aktivität unter einer STI571-Stimulation zu einem anhaltenden Wachstum der Zellen führte, die gegen Apoptose resistent waren. Auf molekularbiologischer Ebene war dies gleichbedeutend mit einer AKT- und P-STAT-5-Hochregulierung. Die Apoptose(spalt-)Produkte PARP und Caspase 8 sowie 3 waren entsprechend erniedrigt.

Bezüglich des Differenzierungsverhaltens beobachteten wir ein monozytäres Aussehen der PTP1B-inaktivierten Zellen, welches durch Imatinib gewissermaßen wieder antagonisiert wird. Imatinib führte dabei zu einer Reduktion der CD11b-Expression in den Mangelmutanten.

Auf die Erythropoese wirkt PTP1B uneinheitlich. Feststeht, dass eine Inhibition der PTP1B-Aktivität der Imatinib-vermittelten Glycophorin A-Expression entgegenwirkt. Damit scheint PTP1B in der Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt zu sein.

Dass eine Exposition der bcr-abl-positiven Zellen mit STI571 nach einer vorübergehenden Herunterregulierung zu einem erneuten signifikanten Anstieg einer ERK-Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt führt, ist bekannt [24, 130]. Diese Beobachtung konnten wir sowohl in den Mock- als auch in den PTP1B-überexprimierenden, nicht aber in den DN-Zellen, bestätigen. Eine verminderte PTP1B-Aktivität führt offensichtlich zu einer STI571-induzierten Veränderung in der BCR-ABL-vermittelten Signaltransduktion.

Abschließend konnten wir zeigen, dass in einer resistenten p185^{bcr-abl}-positiven Zelllinie eine verminderte PTP1B-Aktivität vorliegt.

Zu klären bleibt die Rolle der Dok-1, womöglich ist das, das Protein, welches Imatinib vermittelt nur in den Mangelmutanten exprimiert wird. Aber es sind hierfür weitere Belege notwendig, die vor allem dann die Bedeutung dieses Proteins im Zusammenhang mit einer möglichen Resistenzentwicklung untersuchen.

Alles in allem verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass eine verminderte PTP1B-Funktion begleitet wird durch eine Aktivierung der BCR-ABL-Kinase. Folge ist eine Resistenz gegen einen STI571-induzierten Wachstumsarrest, Apoptose und Differenzierung BCR-ABL-exprimierender Zellen.

5 Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie ist eine myeloproliferative Erkrankung mit Entartung einer hämatopoetischen Stammzelle. Sie ist gekennzeichnet durch einen stadienhaften Verlauf, welcher unweigerlich in der häufig letal endenden Blastenkrise mündet. Die bisherigen Therapieansätze (medikamentös, Knochenmarktransplantation) waren oftmals nicht von dauerhaften Erfolg und nur in der chronischen Phase anwendbar, so dass insbesondere die Blastenkrise weiterhin ein klinisches Problem darstellt.

Mit der Einführung des Signaltransduktionshemmers Imatinib wurde die Behandlung der CML revolutioniert. Pathogenetisch grundlegend ist das Philadelphia-Chromosom, ein Produkt einer reziproken Translokation, welches für eine deregulierte Tyrosinkinase kodiert. Die hierfür verantwortliche BCR-ABL-Tyrosinkinase kann durch Imatinib inhibiert werden und wirkt bis auf Ausnahmen dem effizient entgegen. Tatsächlich werden auch primäre und erworbene Resistenzen in einer Behandlung mit Imatinib beschrieben. Es ist von immenser Bedeutung zur Optimierung der Therapie Ursachen hierfür zu finden.

Die Tatsache, dass eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung Basis verschiedener maligner Erkrankungen ist, führte uns zur Annahme, dass dieses Dysäquilibrium nicht nur Folge einer hochaktiven Tyrosinkinase, sondern auch die einer funktionsschwachen Tyrosinphosphatase sein kann.

Wir untersuchten den Prototyp der Proteintyrosinphosphatasen PTP1B mit der Fragestellung, ob eine Inhibition derselbigen Ursache einer STI571-Resistenz sein könnte. Zu diesem Zweck konstruierten wir nach dem Vorbild von Flint et al. [40] eine Substratfalle, die einerseits hochspezifisch PTP1B-Substrat bindet, aber keine katalytische Aktivität besitzt. Über eine gerichtete Mutagenese wurde eine dominant negative PTP1B gebildet, in einen Plasmid kloniert und über elektroporetische Transfektion in K562-Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden verglichen mit den FL-Zellen, die das Ergebnis einer Klonierung der aktiven PTP1B in einen Vektor darstellen, und der Mockzellen, welche aus der Transfektion eines „leeren“ Vektors hervorgingen. Mittels Western Blot, FACS-Analysen und mikroskopischen Untersuchungen sowie Zellzählungen verglichen wir diese Zellen vor und nach Stimulation mit Imatinib und konzentrierten uns auf die CML-bestimmenden Veränderungen bezüglich des Wachstums-, Apoptose- und Differenzierungsverhalten. Wir stellten fest, dass ein initialer Wachstumsvorteil der PTP1B-überexprimierenden Zellen unter Behandlung mit Imatinib nachließ und zeigten FACS-analytisch den Nachweis einer gesteigerten Annexin V-Expression und im Rahmen eines Western Blots eine gesteigerte Caspase 3, 8 und PARP-

Expression als Ausdruck einer STI571-induzierten Apoptose. In den PTP1B-mangelmutierten Zellen blieb unter STI571-Behandlung dieser Effekt aus, woraus wir schlussfolgerten, dass Zellen mit verminderter PTP1B-Aktivität gegen einen STI571-induzierten Wachstumsarrest und Apoptose resistent sind.

Was das Differenzierungsverhalten der PTP1B inaktivierten Zellen angeht, zeigte sich nach Aufbereitung der Zellen mit Zytospin ein monozytäres Aussehen mit einer deutlich gesteigerten CD11b-Expression, die durch eine Behandlung mit Imatinib wieder herunterreguliert wurde. Was die Erythropoese anging, gelang es dem Signaltransduktionshemmer, welcher eine erythroide Differenzierung initiieren soll, nicht die Erythropoese anzutreiben. Gründe hierfür können in der PTP1B liegen, der sowohl eine Induktion als auch eine Hemmung einer erythroiden Differenzierung nachgesagt wird. Zusammengefasst wirkt Imatinib einer monozytären Differenzierung in den PTP1B-inaktivierten Zellen entgegen und führt scheinbar zu einem erythroiden Differenzierungsstopp.

Die fehlende Reaktivierung der ERK 1/2, welche sonst unter einer STI571-Stimulation als Folge eines BCR-ABL-induzierten Gegenmechanismus zu sehen ist, bleibt ebenfalls in den Mangelmutanten aus und belegt damit unsere Hypothese. Hinzu kommt die Tatsache, dass in einer resistent gewordenen ALL-Zelllinie eine erniedrigte PTP1B-Aktivität nachgewiesen wurde. Alles in allem führt ein Mangel an aktiver PTP1B zu einer Resistenz gegen Imatinib, in dem es gegen einen STI571-induzierten Wachstumsstopp, einer Apoptose und einer erythroiden Differenzierung ankämpft. Um die klinische Relevanz hierfür festzustellen, ist es notwendig anhand von STI571-resistentem Primärmaterial ein PTP1B-Mangel bzw. Defekt z. B. mittels eines Genarrays nachzuweisen. Dem sollte die Überlegung folgen, ob eine Reaktivierung der PTP1B ein Ansatz darstellt dem Resistenzmechanismus auszuweichen, um damit zu einer Effizienzsteigerung einer Therapie mit Imatinib zu führen.

6 Abstract

Chronic myeloid leukaemia is a clonal myeloproliferative disease originating in a haematopoietic stem cell. It is characterized by a disease progress from an oligosymptomatic chronic phase via acceleration towards the often lethally ending blast crisis. Previous treatment were often not from durable success and were only efficient when being progressed while chronic phase. In addition, the blastic phase still displays a clinical challenge. With the introduction of the signal transduction inhibitor imatinib the treatment of the CML was revolutionized. A reciprocal translocation 9; 22 gives rise to the Philadelphia chromosome which occurs in nearly all patients and causes the chronic myeloid leukaemia. It encodes for a deregulated tyrosine kinase exerting its transforming potential by several distinct signal pathways. These bcr-abl mediated transformations can efficiently be inhibited by imatinib. However in a subset of patients are both primary and acquired resistance described. Thus, it is essential to find causes for mechanisms of resistance in order to optimize a treatment with imatinib. An increased tyrosine phosphorylation is found in a wide range of cancers and cannot only be the result of a highly active tyrosine kinase, but also the one of a functionally weak tyrosine phosphatase. We therefore investigated whether antagonizing of PTP1B activity could cause STI571 resistance in bcr-abl positive K562 cells. For this purpose we designed after the model of Flint et al. [40] a substrate trapping mutant, which binds specifically PTP1B-substrates without exerting any catalytic activity. By means of a site-directed mutagenesis, we generated one dominant negative form of PTP1B, transfected it via a plasmid in K562-cells. We compromised these cells with K562 cells that were either transfected with an empty vector or a wild-type PTP1B. By the aid of Western Blot, Facs analyses and microscopic investigations as well as cell counting we compared these cells before and after stimulation with imatinib and concentrated on changes concerning growth, apoptosis and differentiation. We observed that after treatment with imatinib an initial growth advantage of the PTP1B-overexpressing cells diminished proved by increased Annexin V, Caspase 3, 8 and PARP Expression as an evidence for a STI571 induced apoptosis. In contrast, cells with an attenuated PTP1B activity lacked this effect after STI571 treatment. Thus, we concluded that a depletion of active PTP1B confers resistance to an STI571 induced growth and apoptosis.

Concerning the differentiation potential of the PTP1B deficient cells, we observed a clearly increased CD11b-expression, which causes a monocytic appearance that can be antagonized by a treatment with imatinib. While imatinib is known to induce an erythroid differentiation,

it was unable to initiate erythropoiesis in absence of a PTP1B-activity. Reasons for this can lay in PTP1B, which is after-said both an inducer and an inhibitor of an erythroid differentiation. Altogether, we suggest that imatinib counteract a monocytic differentiation in PTP1B-inactive cells and inhibits apparently a further erythroid differentiation. The lack of an ERK 1/2 reactivation, which is usually induced after a STI571 stimulation due to a negative feedback mechanism, is observed in the mutants and thereby emphasize our hypothesis. We could prove a decreased PTP1B-activity in a resistant ALL-cell-line. Taken together a depleted PTP1B- activity leads to a resistance against imatinib by counteracting against an STI571 induced growth arrest, an apoptosis and an erythroid differentiation. In order to determine the clinical relevance for this, further investigations for example by means of gene arrays in primary material are necessary to quantify a PTP1B- defect or a deprivation. After this, it should be considered whether a reactivation of the PTP1B represents an option to evade the resistance mechanism, in order to lead thereby to an increased efficiency of a therapy with imatinib.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abelson, HT, Rabstein, LS:** *Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice.* In: *Cancer Res*, 1970. 30(8): S. 2213-2222.
2. **Andoniou, CE, Thien, CB, Langdon, WY:** *Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene.* In: *Embo J*, 1994. 13(19): S. 4515-4523.
3. **Baccarani, M, Saglio, G, Goldman, J, et al.:** *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.* In: *Blood*, 2006. 108(6): S. 1809-1820.
4. **Bedi, A, Zehnbaue, BA, Barber, JP, et al.:** *Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia.* In: *Blood*, 1994. 83(8): S. 2038-2044.
5. **Birnboim, HC, and Doly, J.,** *A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA., S. 1513-1522.* *Nucl. Acids Res.* 7. 1979.
6. **Boute, N, Boubekeur, S, Lacasa, D, et al.:** *Dynamics of the interaction between the insulin receptor and protein tyrosine-phosphatase 1B in living cells.* In: *EMBO Rep*, 2003. 4(3): S. 313-319.
7. **Braunwald E., FAS,** *Harrisons Innere Medizin 1, S. 785-789.* 2002.
8. **Bruecher-Encke, B, Griffin, JD, Neel, BG, et al.:** *Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation.* In: *Leukemia*, 2001. 15(9): S. 1424-1432.
9. **Capdeville, R, Buchdunger, E, Zimmermann, J, et al.:** *Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug.* In: *Nat Rev Drug Discov*, 2002. 1(7): S. 493-502.
10. **Carlesso, N, Frank, DA, Griffin, JD:** *Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl.* In: *J Exp Med*, 1996. 183(3): S. 811-820.
11. **Carpino, N, Wisniewski, D, Strife, A, et al.:** *p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells.* In: *Cell*, 1997. 88(2): S. 197-204.
12. **Carroll, M, Ohno-Jones, S, Tamura, S, et al.:** *CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins.* In: *Blood*, 1997. 90(12): S. 4947-4952.
13. **Chang, L, Karin, M:** *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* In: *Nature*, 2001. 410(6824): S. 37-40.
14. **Chao, DT, Korsmeyer, SJ:** *BCL-2 family: regulators of cell death.* In: *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: S. 395-419.
15. **Charbonneau, H, Tonks, NK, Kumar, S, et al.:** *Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(14): S. 5252-5256.
16. **Charbonneau, H, Tonks, NK, Walsh, KA, et al.:** *The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(19): S. 7182-7186.
17. **Chen, R, Gandhi, V, Plunkett, W:** *A sequential blockade strategy for the design of combination therapies to overcome oncogene addiction in chronic myelogenous leukemia.* In: *Cancer Res*, 2006. 66(22): S. 10959-10966.
18. **Chopra, R, Pu, QQ, Elefanty, AG:** *Biology of BCR-ABL.* In: *Blood Rev*, 1999. 13(4): S. 211-229.

19. **Chu, S, Holtz, M, Gupta, M, et al.:** *BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34+ cells.* In: Blood, 2004. 103(8): S. 3167-3174.
20. **Cohen, J, Oren-Young, L, Klingmuller, U, et al.:** *Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of erythropoietin receptor signalling.* In: Biochem J, 2004. 377(Pt 2): S. 517-524.
21. **Cong, F, Yuan, B, Goff, SP:** *Characterization of a novel member of the DOK family that binds and modulates Abl signaling.* In: Mol Cell Biol, 1999. 19(12): S. 8314-8325.
22. **Cools, J, DeAngelo, DJ, Gotlib, J, et al.:** *A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome.* In: N Engl J Med, 2003. 348(13): S. 1201-1214.
23. **Copland, M, Hamilton, A, Elrick, LJ, et al.:** *Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction.* In: Blood, 2006. 107(11): S. 4532-4539.
24. **Dan, S, Naito, M, Tsuruo, T:** *Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR - ABL tyrosine kinase, CGP 57148.* In: Cell Death Differ, 1998. 5(8): S. 710-715.
25. **Datta, SR, Brunet, A, Greenberg, ME:** *Cellular survival: a play in three Acts.* In: Genes Dev, 1999. 13(22): S. 2905-2927.
26. **de Groot, RP, Raaijmakers, JA, Lammers, JW, et al.:** *STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells.* In: Blood, 1999. 94(3): S. 1108-1112.
27. **Deininger, MW, Goldman, JM, Lydon, N, et al.:** *The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells.* In: Blood, 1997. 90(9): S. 3691-3698.
28. **Deininger, MW, Goldman, JM, Melo, JV:** *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* In: Blood, 2000. 96(10): S. 3343-3356.
29. **Deng, WP, Nickoloff, JA:** *Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site.* In: Anal Biochem, 1992. 200(1): S. 81-88.
30. **Di Bacco, A, Keeshan, K, McKenna, SL, et al.:** *Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis.* In: Oncologist, 2000. 5(5): S. 405-415.
31. **Donato, NJ, Wu, JY, Zhang, L, et al.:** *Down-regulation of interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta-chain in BCR-ABL(+) human leukemic cells: association with loss of cytokine-mediated Stat-5 activation and protection from apoptosis after BCR-ABL inhibition.* In: Blood, 2001. 97(9): S. 2846-2853.
32. **Druker, BJ, Guilhot, F, O'Brien, SG, et al.:** *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.* In: N Engl J Med, 2006. 355(23): S. 2408-2417.
33. **Dube, N, Cheng, A, Tremblay, ML:** *The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling.* In: Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(7): S. 1834-1839.
34. **Faderl, S, Talpaz, M, Estrov, Z, et al.:** *The biology of chronic myeloid leukemia.* In: N Engl J Med, 1999. 341(3): S. 164-172.
35. **Fainstein, E, Marcelle, C, Rosner, A, et al.:** *A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukaemia.* In: Nature, 1987. 330(6146): S. 386-388.
36. **Fang, CX, Doser, TA, Yang, X, et al.:** *Metallothionein antagonizes aging-induced cardiac contractile dysfunction: role of PTP1B, insulin receptor tyrosine phosphorylation and Akt.* In: Aging Cell, 2006. 5(2): S. 177-185.

37. **Fang, G, Kim, CN, Perkins, CL, et al.:** *CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs.* In: Blood, 2000. 96(6): S. 2246-2253.
38. **Fedorcsak, I, Ehrenberg, L.:** *Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases.* In: Acta Chem.Scand., 1966. 20: S. 107-112.
39. **Fischer, EH, Charbonneau, H, Tonks, NK:** *Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes.* In: Science, 1991. 253(5018): S. 401-406.
40. **Flint, AJ, Tiganis, T, Barford, D, et al.:** *Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases.* In: Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(5): S. 1680-1685.
41. **Frangioni, JV, Beahm, PH, Shifrin, V, et al.:** *The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence.* In: Cell, 1992. 68(3): S. 545-560.
42. **Fukada, T, Tonks, NK:** *The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abl oncoprotein-tyrosine kinase.* In: J Biol Chem, 2001. 276(27): S. 25512-25519.
43. **Galic, S, Hauser, C, Kahn, BB, et al.:** *Coordinated regulation of insulin signaling by the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP.* In: Mol Cell Biol, 2005. 25(2): S. 819-829.
44. **Garcia, R, Jove, R:** *Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling.* In: J Biomed Sci, 1998. 5(2): S. 79-85.
45. **Gishizky, ML, Cortez, D, Pendergast, AM:** *Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation.* In: Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(24): S. 10889-10893.
46. Goekbuget, N, www.kompetenznetz-leukaemie.de. 2005.
47. **Goldstein, BJ, Bittner-Kowalczyk, A, White, MF, et al.:** *Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the Grb2 adaptor protein.* In: J Biol Chem, 2000. 275(6): S. 4283-4289.
48. **Gorre, ME, Mohammed, M, Ellwood, K, et al.:** *Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification.* In: Science, 2001. 293(5531): S. 876-880.
49. **Groffen, J, Stephenson, JR, Heisterkamp, N, et al.:** *Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.* In: Cell, 1984. 36(1): S. 93-99.
50. **Gum, RJ, Gaede, LL, Heindel, MA, et al.:** *Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice.* In: Mol Endocrinol, 2003. 17(6): S. 1131-1143.
51. **Hagemann, C, Rapp, UR:** *Isotype-specific functions of Raf kinases.* In: Exp Cell Res, 1999. 253(1): S. 34-46.
52. **Hahn, EA, Glendenning, GA, Sorensen, MV, et al.:** *Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study.* In: J Clin Oncol, 2003. 21(11): S. 2138-2146.
53. **Hamaguchi, K:** *The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix.* In: J. Am. Chem. Soc., 1962. 84: S. 1329-1337.
54. **Hamilton, A, Elrick, L, Myssina, S, et al.:** *BCR-ABL activity and its response to drugs can be determined in CD34+ CML stem cells by CrkL phosphorylation status using flow cytometry.* In: Leukemia, 2006. 20(6): S. 1035-1039.

55. **Hanahan, D:** *Studies on transformation of E. coli with plasmids.* In: J. Mol. Biol., 1983. 166: S. 557-580.
56. **Heinonen, KM, Dube, N, Bourdeau, A, et al.:** *Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates macrophage development through CSF-1 signaling.* In: Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(8): S. 2776-2781.
57. **Hingorani, SR, Tuveson, DA:** *Targeting oncogene dependence and resistance.* In: Cancer Cell, 2003. 3(5): S. 414-417.
58. **Hoelbl, A, Kovacic, B, Kerenyi, MA, et al.:** *Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation.* In: Blood, 2006. 107(12): S. 4898-4906.
59. **Holtz, MS, Bhatia, R:** *Effect of imatinib mesylate on chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitor cells.* In: Leuk Lymphoma, 2004. 45(2): S. 237-245.
60. **Huang, M, Dorsey, JF, Epling-Burnette, PK, et al.:** *Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells.* In: Oncogene, 2002. 21(57): S. 8804-8816.
61. **Hughes, TP, Kaeda, J, Branford, S, et al.:** *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* In: N Engl J Med, 2003. 349(15): S. 1423-1432.
62. **Ilaria, RL, Jr., Van Etten, RA:** *P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members.* In: J Biol Chem, 1996. 271(49): S. 31704-31710.
63. **Jones, RJ, Bedi, A:** *Biology of chronic myeloid leukemia and its relevance to autologous bone marrow transplantation.* In: Curr Opin Oncol, 1994. 6(2): S. 122-126.
64. **Kang, CD, Yoo, SD, Hwang, BW, et al.:** *The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells.* In: Leuk Res, 2000. 24(6): S. 527-534.
65. **Kashige, N, Carpino, N, Kobayashi, R:** *Tyrosine phosphorylation of p62dok by p210bcr-abl inhibits RasGAP activity.* In: Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(5): S. 2093-2098.
66. **Kasper, B, Fruehauf, S, Schiedlmeier, B, et al.:** *Favorable therapeutic index of a p210(BCR-ABL)-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors.* In: Cancer Chemother Pharmacol, 1999. 44(5): S. 433-438.
67. **Kindler, T, Breitenbuecher, F, Kasper, S, et al.:** *In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C.* In: Leukemia, 2003. 17(6): S. 999-1009.
68. **Kohmura, K, Miyakawa, Y, Kawai, Y, et al.:** *Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells.* In: J Cell Physiol, 2004. 198(3): S. 370-376.
69. **Koyama, M, Oka, T, Ouchida, M, et al.:** *Activated proliferation of B-cell lymphomas/leukemias with the SHP1 gene silencing by aberrant CpG methylation.* In: Lab Invest, 2003. 83(12): S. 1849-1858.
70. **Koyama, N, Koschmieder, S, Tyagi, S, et al.:** *Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL-positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571.* In: Clin Cancer Res, 2006. 12(7 Pt 1): S. 2025-2031.
71. **Kurzrock, R, Gutterman, JU, Talpaz, M:** *The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias.* In: N Engl J Med, 1988. 319(15): S. 990-998.
72. **Kuzelova, K, Grebenova, D, Marinov, I, et al.:** *Fast apoptosis and erythroid differentiation induced by imatinib mesylate in JURL-MK1 cells.* In: J Cell Biochem, 2005. 95(2): S. 268-280.

73. **LaMontagne, KR, Jr., Flint, AJ, Franza, BR, Jr., et al.:** *Protein tyrosine phosphatase 1B antagonizes signalling by oncoprotein tyrosine kinase p210 bcr-abl in vivo.* In: *Mol Cell Biol*, 1998. 18(5): S. 2965-2975.
74. **LaMontagne, KR, Jr., Hannon, G, Tonks, NK:** *Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(24): S. 14094-14099.
75. **le Coutre, P, Mologni, L, Cleris, L, et al.:** *In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor.* In: *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(2): S. 163-168.
76. **le Coutre, P, Tassi, E, Varella-Garcia, M, et al.:** *Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification.* In: *Blood*, 2000. 95(5): S. 1758-1766.
77. **Leith, CP, Kopecky, KJ, Chen, IM, et al.:** *Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study.* In: *Blood*, 1999. 94(3): S. 1086-1099.
78. **Lewis, JM, Baskaran, R, Taagepera, S, et al.:** *Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(26): S. 15174-15179.
79. **Liu, F, Sells, MA, Chernoff, J:** *Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates integrin signaling.* In: *Curr Biol*, 1998. 8(3): S. 173-176.
80. **Lowenstein, EJ, Daly, RJ, Batzer, AG, et al.:** *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling.* In: *Cell*, 1992. 70(3): S. 431-442.
81. **Lowry, OH, Rosebrough, NJ:** *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* In: *J Biol Chem*, 1951. 193(1): S. 265-275.
82. **Mahon, FX, Deininger, MW, Schultheis, B, et al.:** *Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance.* In: *Blood*, 2000. 96(3): S. 1070-1079.
83. **Mayer, BJ, Baltimore, D:** *Signalling through SH2 and SH3 domains.* In: *Trends Cell Biol*, 1993. 3(1): S. 8-13.
84. **Miething, C, Mugler, C, Grundler, R, et al.:** *Phosphorylation of tyrosine 393 in the kinase domain of Bcr-Abl influences the sensitivity towards imatinib in vivo.* In: *Leukemia*, 2003. 17(9): S. 1695-1699.
85. **Muller, AJ, Young, JC, Pendergast, AM, et al.:** *BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias.* In: *Mol Cell Biol*, 1991. 11(4): S. 1785-1792.
86. **Munzert, G, Kirchner, D, Ottmann, O, et al.:** *Constitutive NF-kappaB/Rel activation in philadelphia chromosome positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia (ALL).* In: *Leuk Lymphoma*, 2004. 45(6): S. 1181-1184.
87. **Myers, MP, Andersen, JN, Cheng, A, et al.:** *TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B.* In: *J Biol Chem*, 2001. 276(51): S. 47771-47774.
88. **Neshat, MS, Raitano, AB, Wang, HG, et al.:** *The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf.* In: *Mol Cell Biol*, 2000. 20(4): S. 1179-1186.
89. **Neviani, P, Santhanam, R, Trotta, R, et al.:** *The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein.* In: *Cancer Cell*, 2005. 8(5): S. 355-368.
90. **Nieto-Vazquez, I, Fernandez-Veledo, S, de Alvaro, C, et al.:** *Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection*

- against tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. In: *Diabetes*, 2007. 56(2): S. 404-413.
91. **Nimmanapalli, R, O'Bryan, E, Huang, M, et al.:** *Molecular characterization and sensitivity of STI-571 (imatinib mesylate, Gleevec)-resistant, Bcr-Abl-positive, human acute leukemia cells to SRC kinase inhibitor PD180970 and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin.* In: *Cancer Res*, 2002. 62(20): S. 5761-5769.
92. **Nowell, PC, Hungerford, DA:** *Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes.* In: *J Natl Cancer Inst*, 1960. 25: S. 85-109.
93. **O'Brien, SG, Guilhot, F, Larson, RA, et al.:** *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* In: *N Engl J Med*, 2003. 348(11): S. 994-1004.
94. **Oda, T, Heaney, C, Hagopian, JR, et al.:** *Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia.* In: *J Biol Chem*, 1994. 269(37): S. 22925-22928.
95. **O'Dwyer, ME, Mauro, MJ, Druker, BJ:** *STI571 as a targeted therapy for CML.* In: *Cancer Invest*, 2003. 21(3): S. 429-438.
96. **Pasternak, G, Hochhaus, A, Schultheis, B, et al.:** *Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects.* In: *J Cancer Res Clin Oncol*, 1998. 124(12): S. 643-660.
97. **Pendergast, AM, Quilliam, LA, Cripe, LD, et al.:** *BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein.* In: *Cell*, 1993. 75(1): S. 175-185.
98. **Platanias, LC:** *Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies.* In: *Blood*, 2003. 101(12): S. 4667-4679.
99. **Roumiantsev, S, Shah, NP, Gorre, ME, et al.:** *Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop.* In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(16): S. 10700-10705.
100. **Roy, L, Guilhot, J, Krahnke, T, et al.:** *Survival advantage from Imatinib compared to the combination Interferon- α plus Cytarabine in chronic phase CML: historical comparison between two phase III trials.* In: *Blood*, 2006.
101. **Salgia, R, Li, JL, Lo, SH, et al.:** *Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL.* In: *J Biol Chem*, 1995. 270(10): S. 5039-5047.
102. **Salgia, R, Pisick, E, Sattler, M, et al.:** *p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene.* In: *J Biol Chem*, 1996. 271(41): S. 25198-25203.
103. **Sawyers, CL:** *Chronic myeloid leukemia.* In: *N Engl J Med*, 1999. 340(17): S. 1330-1340.
104. **Sawyers, CL, McLaughlin, J, Goga, A, et al.:** *The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth.* In: *Cell*, 1994. 77(1): S. 121-131.
105. **Schaeffer, HJ, Weber, MJ:** *Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.* In: *Mol Cell Biol*, 1999. 19(4): S. 2435-2444.
106. **Schindler, T, Bornmann, W, Pellicena, P, et al.:** *Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase.* In: *Science*, 2000. 289(5486): S. 1938-1942.
107. **Schmoll, H-J, K., H, K., P,** *Kompendium Internistische Onkologie 2, S. 71-99.*
108. **Schrimpf, G,** *Gentechnische Methoden- Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, S. 2002.*
109. **Shah, NP, Nicoll, JM, Nagar, B, et al.:** *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.* In: *Cancer Cell*, 2002. 2(2): S. 117-125.

110. **Shah, NP, Sawyers, CL:** *Recent success with the tyrosine kinase inhibitor STI-571-- lessons for targeted therapy of cancer.* In: *Curr Opin Investig Drugs*, 2001. 2(3): S. 422-423.
111. **Shtivelman, E, Lifshitz, B, Gale, RP, et al.:** *Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia.* In: *Nature*, 1985. 315(6020): S. 550-554.
112. **Sillaber, C, Gesbert, F, Frank, DA, et al.:** *STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells.* In: *Blood*, 2000. 95(6): S. 2118-2125.
113. **Skorski, T, Bellacosa, A, Nieborowska-Skorska, M, et al.:** *Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway.* In: *Embo J*, 1997. 16(20): S. 6151-6161.
114. **Sokal, JE, Cox, EB, Baccarani, M, et al.:** *Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia.* In: *Blood*, 1984. 63(4): S. 789-799.
115. **Stuckey, JA, Schubert, HL, Fauman, EB, et al.:** *Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate.* In: *Nature*, 1994. 370(6490): S. 571-575.
116. **Talpaz, M, Kantarjian, HM, McCredie, K, et al.:** *Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia.* In: *N Engl J Med*, 1986. 314(17): S. 1065-1069.
117. **Tartaglia, M, Niemeyer, CM, Fragale, A, et al.:** *Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia.* In: *Nat Genet*, 2003. 34(2): S. 148-150.
118. **ten Hoeve, J, Kaartinen, V, Fioretos, T, et al.:** *Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein.* In: *Cancer Res*, 1994. 54(10): S. 2563-2567.
119. **Thijssen, S, Schuurhuis, G, van Oostveen, J, et al.:** *Chronic myeloid leukemia from basics to bedside.* In: *Leukemia*, 1999. 13(11): S. 1646-1674.
120. **Tonks, NK, Neel, BG:** *Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases.* In: *Curr Opin Cell Biol*, 2001. 13(2): S. 182-195.
121. **Tonks, NK, Neel, BG:** *From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases.* In: *Cell*, 1996. 87(3): S. 365-368.
122. **Trowbridge, IS, Thomas, ML:** *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development.* In: *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: S. 85-116.
123. **Van Etten, RA, Jackson, P, Baltimore, D:** *The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization.* In: *Cell*, 1989. 58(4): S. 669-678.
124. **Vanhaesebroeck, B, Leeyers, SJ, Panayotou, G, et al.:** *Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers.* In: *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(7): S. 267-272.
125. **Wada, H, Mizutani, S, Nishimura, J, et al.:** *Establishment and molecular characterization of a novel leukemic cell line with Philadelphia chromosome expressing p230 BCR/ABL fusion protein.* In: *Cancer Res*, 1995. 55(14): S. 3192-3196.
126. **Weisberg, E, Griffin, JD:** *Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines.* In: *Blood*, 2000. 95(11): S. 3498-3505.
127. **Whitman, M, Downes, CP, Keeler, M, et al.:** *Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate.* In: *Nature*, 1988. 332(6165): S. 644-646.
128. **Widmann, C, Gibson, S, Jarpe, MB, et al.:** *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human.* In: *Physiol Rev*, 1999. 79(1): S. 143-180.

-
129. **Yin, JL, Williams, BG, Arthur, CK, et al.:** *Interferon response in chronic myeloid leukaemia correlates with ABL/BCR expression: a preliminary study.* In: Br J Haematol, 1995. 89(3): S. 539-545.
 130. **Yu, C, Krystal, G, Varticovski, L, et al.:** *Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells.* In: Cancer Res, 2002. 62(1): S. 188-199.
 131. **Zhang, ZY, Dixon, JE:** *Protein tyrosine phosphatases: mechanism of catalysis and substrate specificity.* In: Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1994. 68: S. 1-36.
 132. **Zhang, ZY, Maclean, D, McNamara, DJ, et al.:** *Protein tyrosine phosphatase substrate specificity: size and phosphotyrosine positioning requirements in peptide substrates.* In: Biochemistry, 1994. 33(8): S. 2285-2290.
 133. **Zoller, MJ, Smith, M.:** *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: An efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA.* In: Nucl.Acids.Res., 1982. 10: S. 6487-6500.

8 Danksagung

Meinen Dank möchte ich all denen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. OG. Ottmann möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Nicht nur für eine hervorragende Betreuung sondern auch für die jederzeit gewährte Hilfe danke ich Herrn Dr. med. S. Koschmieder. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit sowie die offene Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Frau Dr. N. Koyama danke ich für die wertvolle Mithilfe.

Gleichfalls danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des hämatologischen Labors des Universitätsklinikum Frankfurt/Main für die Hilfe bei den Versuchen, besonderen Dank gebührt dabei Frau Heike Nürnberger, Frau Manuela Kampfmann und Frau Sandra Wagner, die einen sehr grossen Beitrag zum Gelingen des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit geleistet haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinem Ehemann danke ich dafür, dass er mein Ehemann ist. Ausserdem danke ich ihn für die liebevolle und geduldige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit und dafür, dass er es stets zu wissen wusste mich hierfür zu motivieren.

Ganz besonderen Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder ohne deren Hilfe und liebevolle Unterstützung sowie deren Glauben in meine Fähigkeiten dies alles gar nicht erst möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname	Funk, geb. Tyagi, Sandhya
Geburtsdatum	27. Mai 1978
Geburtsort	Langen (Hessen)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	indisch

SCHULE

1988 – 1997	Dreieich-Gymnasium, Langen Abschluss Abitur
-------------	--

STUDIUM UND FAMULATUREN

04/1998	Studium der Medizin an der Freien Universität Berlin
04/1999- 05/2004	Studium der Medizin an der Johann-Wolfgang- Goethe Universität Frankfurt am Main
03/99 – 08/99	Krankenpflegepraktikum in der Inneren Medizin (Klinikum Darmstadt)
04/2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
10/2000	Famulatur: Innere Medizin (Kreisklinik Langen)
04/2001	1. Staatsexamen
10/2001	Famulatur: Intensivmedizin (Nepean Hospital Intensive Care; Sydney/Australien)
09/2002	Famulatur : Operative Gynäkologie und Geburtshilfe (Klinikum Darmstadt)
10/2002	Famulatur: Gynäkologie und Geburtshilfe (Praxis in Mühlheim)
04/2003	2.Staatsexamen
04/2003	Praktisches Jahr im Klinikum Offenbach (Wahlfach: Gynäkologie)
05/2004	Ärztliche Prüfung

Seit 07/2004

Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II bei Herrn Prof. Dr. med. H. Dancygier

VERÖFFENTLICHUNGEN

Koyama N., Koschmieder S., Tyagi S., Nürnberger H., Wagner S., Böcker U., Hoelzer D., Ottmann O., Kalina U.: "Differential effects of histone deacetylase inhibitors on interleukin-18 gene expression in myeloid cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002 Apr. 12; 292(4):937-43

Koyama N, Koschmieder S, Tyagi S., Portero-Robles I, Chromic J., Myloch S., Nürnberger H., Rossmann T., Hofmann WK., Hoelzer D., Ottmann OG.: "Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL-positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571". In: Clin Cancer Res, 2006. 12(7 Pt 1): S. 2025-2031.

WEITERE TÄTIGKEITEN MIT MEDIZINISCHEM HINTERGRUND

Seit 1997

Studienassistentin von Klinische-Phase III-Studien in einer gynäkologischen Praxis (Mühlheim)

AUSLANDSAUFENTHALTE

05/1993

Sprachreise im Rahmen eines Schüleraustauschs nach Romorantin (Frankreich)

08/1995

Intensiv-Sprachkurs Cambridge (Groß-Britannien)

08/1996

Intensiv-Sprachkurs Cambridge (Groß-Britannien)

10/2000

4-wöchige Auslandsfamulatur im Nepean Hospital (Intensive Care Unit); Sydney/Australien

SPRACH- UND EDV-KENNTNISSE

Englisch

sehr gut

Französisch

Schulkenntnisse

EDV-Kenntnisse

sicherer Umgang mit MS Windows, MS Office, digitaler Bildbearbeitung, Maschinenschreiben

Frankfurt am Main, 2008

Sandhya Funk

10 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Die Rolle der Proteintyrosinphosphatase-1B bei der Resistenzentwicklung bcr-abl positiver Zellen nach Behandlung mit Imatinib“

im Zentrum für Innere Medizin (Hämatologie/Onkologie/Rheumatologie/Infektiologie) unter Betreuung und Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. OG. Ottmann mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. S. Koschmieder 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 Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Koyama N. et al.: “Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL- positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571“. In Clinical Cancer Research. 2006. 12 (7Pt 1): S.2025-2031.

Frankfurt am Main, 2008

Sandhya Funk