

**III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München**

**Untersuchung von Imatinib-Resistenzmechanismen im  
syngenem Mausmodell der CML sowie  
des Einflusses von Imatinib auf das Engraftment nach  
Stammzelltransplantation syngener Mäuse**

**Josef Höpfl**

III. Medizinische Klinik und Poliklinik  
am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

**Untersuchung von Imatinib-Resistenzmechanismen im  
syngenem Mausmodell der CML sowie  
des Einflusses von Imatinib auf das Engraftment nach  
Stammzelltransplantation syngener Mäuse**

Josef Höpfl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

*Doktors der Medizin*

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

2. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 21.10.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

<b>1.1. Einführung in die Thematik - Aufgabenstellungen</b>	1
<b>1.2. Allgemeine Einführung</b>	2
<b>1.3. Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML)</b>	
1.3.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie	3
1.3.2. Molekulare Pathogenese – Das Fusionsonkoprotein Bcr-Abl	4
1.3.3. Symptomatik, Diagnostik und klinischer Verlauf	8
1.3.4. Therapie und Prognose der CML	11
<b>1.4. Molekulare Therapie mit Imatinib mesilate (Glivec®)</b>	
1.4.1. Identifizierung und Entwicklung dieses Moleküls	12
1.4.2. Molekularer Wirkmechanismus von Imatinib	13
1.4.3. Therapeutischer Einsatz und Nebenwirkungen	15
1.4.4. Klinische Erfolge und Erfahrungen mit Imatinib in der Therapie der CML	15
<b>1.5. Die Akute Lymphatische Leukämie (ALL)</b>	17
<b>1.6. Resistenzen gegenüber Imatinib</b>	
1.6.1. Mechanismen der Resistenzentwicklung	18
1.6.2. Mögliche Strategien zur Vermeidung von Resistenzen	21

## 2. Material

<b>2.1. Standardgeräte</b>	23
<b>2.2. Arbeitsmaterialien</b>	23
<b>2.3. Chemikalien und Biochemikalien</b>	24
<b>2.4. Radiochemikalie</b>	26
<b>2.5. Enzyme und Antikörper</b>	26
<b>2.6. Vektoren und DNA-Konstrukt</b>	27
<b>2.7. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien</b>	27
<b>2.8. Zellkulturlösungen und MZ-Medium für Colony Assay</b>	27
<b>2.9. Mäuse und tierexperimentelle Materialien</b>	28
<b>2.10. Molekulargewichtsmarker für Proteine und Nukleinsäuren</b>	28
<b>2.11. Verwendete molekularbiologische Kitsysteme, Standard-Lösungen und Puffer</b>	28
<b>2.12. EDV</b>	30

### 3. Methoden

#### 3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1. Restriktionsverdau von Plasmiden (dsDNA) .....	31
3.1.2. 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	31
3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen .....	32
3.1.4. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen .....	33
3.1.5. Ligation von DNA .....	33
3.1.6. Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präparation) .....	33
3.1.7. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration .....	34
3.1.8. Extraktion genomischer DNA aus murinen Zellen .....	34
3.1.9. Verdau genomischer DNA und gelelektrophoretische Auftrennung .....	35
3.1.10. Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylon-Membran (Southern-Blot) .....	36
3.1.11. Herstellung einer DNA-Sonde und Markierung mit dem Rediprime <sup>®</sup> System .....	37
3.1.12. Hybridisierung mit radioaktiv ( <sup>32</sup> P) markierten Sonden und Autoradiographie .....	37

#### 3.2. Arbeiten mit Bakterienstämmen

3.2.1. Kulturbedingungen für Bakterien .....	38
3.2.2. Kompetente Bakterien .....	38
3.2.3. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock .....	38
3.2.4. Kultivierung der transformierten Bakterien .....	39

#### 3.3. Arbeiten mit eukaryonten Zelllinien

3.3.1. Kultivierung von Zelllinien .....	39
3.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	40
3.3.3. Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen .....	40
3.3.4. Transiente Transfektion von adhärennten Zellen .....	40
3.3.5. Gewinnung von Retroviren und Infektion von NIH3T3-Zellen .....	42
3.3.6. Durchflußzytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz und des Titers .....	42

#### 3.4. Tiermodell – Arbeiten mit Mäusen und murinen Zellen

3.4.1. Knochenmarkgewinnung aus Spendermäusen .....	44
3.4.2. Kultivierung und Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen .....	44
3.4.3. Retrovirale Infektion der Knochenmarkzellen („Spin-Infektion“) .....	45
3.4.4. Stammzell-Transplantation (SZT) mit nativen oder infizierten KM-Zellen .....	45
3.4.5. Therapie mit Imatinib .....	45
3.4.6. Monitoring der Mäuse (Blutbild, Blutausschick, Fluoreszenzmikroskopie) .....	46
3.4.7. Analyse und Aufarbeitung von Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten .....	47
3.4.8. FACScan-Analyse und Immunphänotypisierung von murinen Zellen .....	47
3.4.9. Gewinnung von nativen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) durch FACSsort .....	48

3.4.10. Methylzellulose-Assay .....	49
-------------------------------------	----

### **3.5. Proteinbiochemische Methoden**

3.5.1. Vorbehandlung und Lyse muriner Zellen .....	49
3.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
3.5.3. Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot) .....	51
3.5.4. Immunchemische Darstellung von transferierten Proteinen .....	51

## **4. Ergebnisse**

<b>4.1. Imatinib hemmt die Proliferation und Differenzierung c-kit<sup>+</sup>, nativer muriner hämatopoetischer Stamm-/Progenitorzellen in vitro .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. Das KM-Engraftment nach syngener SZT bleibt von Imatinib unbeeinflusst</b>	
4.2.1. Die primäre Rekonstitution der Mäuse in vivo wird durch Imatinib nicht verzögert ..	55
4.2.2. Nach sekundärer Tx ist kein Einfluss auf das Langzeit-Engraftment nachweisbar .....	58
4.2.3. FACScan-Analyse des Anteils von HSZ im KM primär transplantierte Mäuse .....	60
<b>4.3. Klonierung des Vektors Mig Bcr-Abl (Mig p185) .....</b>	<b>62</b>
<b>4.4. Retroviraler Transfer des Onkogens p185 Bcr-Abl in murine Knochenmarkzellen</b>	
4.4.1. Allgemeiner Überblick .....	64
4.4.2. Gewinnung von retroviralem Überstand und Bestimmung des Titers .....	65
4.4.3. Retrovirale Infektion von murinen KM-Zellen .....	66
<b>4.5. Entwicklung eines CML-ähnlichen Syndroms nach Tx von Balb/c-Mäusen</b>	
4.5.1. Schema der primären und seriellen Tx mit infizierten KM-Zellen (Mig Bcr-Abl) .....	67
4.5.2. Monitoring und FACScan-Analyse des PB vor Beginn einer Therapie mit Imatinib ..	69
4.5.3. Vergleich der Phänotypen einer CML-Maus und einer gesunden Kontrollmaus .....	69
<b>4.6. Resistenzentwicklung nach initialem Ansprechen auf Imatinib .....</b>	<b>73</b>
<b>4.7. Untersuchung des Ursprungs der Resistenz</b>	
4.7.1. Ist die Ursache intrinsischer Natur oder Folge von Bystander-Effekten? .....	76
4.7.2. Nach sekundärer und tertiärer serieller Tx treten primäre Resistenzen auf .....	76
<b>4.8. Resistente Mäuse rezidivieren häufiger mit akuten lymphatischen Leukämien .....</b>	<b>77</b>
<b>4.9. In vitro (Western-Blot) zeigt sich eine erhaltene Funktionalität und Hemmbarkeit von Bcr-Abl trotz Resistenz der Leukämiezellen in vivo .....</b>	<b>81</b>
<b>4.10. Untersuchung der klonalen Evolution leukämischer Zellen nach serieller Tx .....</b>	<b>83</b>

## **5. Diskussion**

<b>5.1. Der Einfluss einer kontinuierlichen Imatinib-Therapie auf das KM-Engraftment</b>	
--	--

---

<b>im syngenem Maus-Modell– Kombination zweier Therapieoptionen bei CML</b> ....	85
<b>5.2. Etablierung eines retroviralen Maus-Modells für die Ph<sup>+</sup> CML zur Untersuchung der Entwicklung von Resistenzen bei kontinuierlicher Therapie mit Imatinib</b> .....	87
<b>5.3. Identifikation möglicher intrinsischer Ursachen der Resistenzentwicklung</b> .....	92
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	98
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	100
<b>8. Danksagung</b> .....	111
<b>9. Lebenslauf</b> .....	112

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha / anti
$\mu\text{g}$	$10^{-6}$ Gramm
$\mu\text{l}$	$10^{-6}$ Liter
$\mu\text{m}$	$10^{-6}$ Meter
$\mu\text{M}$ (= $\mu\text{mol/l}$ )	$10^{-6}$ Mol / Liter
nM (= $\text{nmol/l}$ )	$10^{-9}$ Mol / Liter
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
ALL	akute lymphatische (lymphoblastische) Leukämie
AP	Akzelerationsphase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BBMM	basal bone marrow medium
BC	Blastenkrise (blast crisis)
Bcr	breakpoint cluster region
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (bovine serum albumine)
C	Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
CFU	colony forming unit
CML	chronisch myeloische Leukämie
CP	chronische Phase
d	Tag
der(9)	derivative chromosome 9 (nach genetischer Alteration)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	et aliter
FACS (-ort / -can)	fluorescence activated cell sorting / scanning
FBS	fötales Rinderserum
FCS	fötales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
5-FU	5-Fluoruracil
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
G-Ü.	Gesamt-Überleben
Gy	Gray (Energiedosis, 1 Gy = 1 J/kg)
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-pirazinethansulfonsäure
HPLC	High-pressure liquid chromatography
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxydase)
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	internal ribosome entry site
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobase(n)
KM	Knochenmark
KMT	KM-Transplantation
log	Logarithmus
LTR	long terminal repeat
MCS	multiple cloning site
min.	Minute(n)
mM	10 <sup>-3</sup> Mol
MNZ	mononukleäre Zellen
MS	Massenspektrometrie
M/V	Masse pro Volumen
MZ	Methylzellulose
nm	10 <sup>-9</sup> Meter (Nanometer)
p	phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	peripheres Blut

---

PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	R-Phycoerythrin
Ph / Ph <sup>1</sup>	Philadelphia-Chromosom
Ph <sup>+</sup>	Philadelphia Chromosom positiv
PLT(s)	Thrombozyten
p.o.	per os
PVDF	Polyvinylidindifluorid
pY	Phosphotyrosin
RBC(s)	Erythrozyten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideway scatter)
STAT	signal transducer and activator of transcription
STI	signal transduction inhibitor
SZT	Stammzell-Transplantation
TAE	Tris-Acetat Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tx	Transplantation
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
WB	Western-Blot
WBC	Leukozyten (white blood count)

## 1. Einleitung

### 1.1. Einführung in die Thematik - Aufgabenstellungen

Das durch die chromosomale t(9;22) Translokation induzierte Bcr-Abl-Fusionsonkogen, welches für eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase kodiert, hat entscheidenden Anteil an der Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie (CML). Mit der Entwicklung von Imatinib, einem selektiven Inhibitor der Abl-Tyrosinkinase, Ende der 90er Jahre wurde erstmals eine gezielte, effektive und nebenwirkungsarme Therapie der CML möglich. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von Imatinib dauerhafte hämatologische und größere zytogenetische Remissionen bei der Mehrzahl der CML-Patienten möglich sind. Im Stadium einer fortgeschrittenen Erkrankung (Akzelerationsphase (AP) bzw. Blastenkrise (BC)) kommt es aber meist schon nach kurzer Zeit zum Rezidiv. Bisher stellt deshalb die allogene Stammzelltransplantation (SZT) weiterhin den einzigen kurativen Therapieansatz für die CML dar. Unklar ist jedoch, ob auch bei CML-Patienten unmittelbar nach bzw. während der Therapie mit Imatinib eine SZT möglich ist, da Imatinib u.a. auch die für die Stammzell-Proliferation wichtige Tyrosinkinase c-kit inhibiert. Bisher wurde die kontinuierliche Imatinib-Therapie zugunsten der Transplantation unterbrochen, weil diese möglicherweise mit dem Engraftment des Knochenmarks interferiert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Imatinib-Behandlung zum Zeitpunkt der Transplantation das Engraftment der Stammzellen im murinen System negativ beeinflusst. Dazu wurden in einem syngenem Mausmodell Stammzelltransplantationen unter kontinuierlicher Therapie mit unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen durchgeführt und eine Reihe hämatologischer Parameter wie Blutbild, Zytomorphologie sowie die immunphänotypische Zusammensetzung des peripheren Blutes untersucht.

Bei kontinuierlicher Imatinib-Therapie kommt es zum Auftreten von Resistenzen. In einem zweiten großen Projekt konnte für die Untersuchung des Ursprungs dieser Resistenzen zunächst ein CML-Mausmodell der Imatinib-Resistenz etabliert werden. Bisher konnten klinische Forschungsarbeiten bereits einige Mechanismen der Resistenzentwicklung aufzeigen, doch ist eine intensive Untersuchung zunächst vor allem im murinen System möglich. Durch serielle Knochenmarktransplantationen konnten wir zeigen, dass die zu beobachtenden Resistenzen im Mausmodell intrinsischer Natur sind. Wahrscheinlich sind sekundäre genetische Alterationen bzw. die Insertionsmutagenese hauptverantwortlich für das Auftreten Imatinib-resistenter Leukämien im syngenem Mausmodell. Auch könnten durch die Entwicklung unseres murinen Modells der Imatinib-Resistenz zukünftig neue therapeutische Strategien, wie z.B. neue Kombinationstherapien, getestet werden. Im Rahmen dieses Projektes wurden aber zunächst folgende Fragestellungen verfolgt:

- Kann im retroviralen Transduktions- und Transplantationsmodell effizient ein CML-ähnliches Syndrom bei Mäusen induziert werden?
- Kann durch die kontinuierliche Therapie mit Imatinib das Auftreten von Resistenzen bei Mäusen mit CML-ähnlichem Syndrom beobachtet werden?
- Schließlich war ein Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe von seriellen Knochenmarktransplantationen Hinweise dafür zu finden, ob für das Auftreten von Resistenzen im Mausmodell intrinsische Ursachen verantwortlich sind oder ob Bystander-Effekte eine große Rolle spielen. Werden nach seriellen Transplantationen primäre Resistenzen bei Mäusen mit CML-ähnlichem Syndrom durch Selektion resistenter Klone gefunden?

## 1.2. Allgemeine Einführung

Fast alle Varianten maligner Erkrankungen stammen von einer einzigen Zelle ab. Dies ist ein wichtiges Kriterium, welches eine Neoplasie von einer Hyperplasie abgrenzt. Maligne Neoplasien entstehen auf Grund einer klonalen, unkontrollierten Proliferation von Zellen, deren Ursache in der unregelmäßigen Expression bestimmter Gene und in der Bildung strukturell veränderter Proteine liegt.

Gene, die normales Zellwachstum regulieren, werden dabei als Protoonkogene bezeichnet. Ihre Aktivierung durch mutagene Ereignisse (z.B. Punktmutationen, Amplifikationen, Translokationen oder Deletionen) verwandelt sie schließlich in Onkogene, welche das Zellwachstum über das physiologische Maß hinaus steigern. Die zweite Hauptgruppe der betroffenen Gene umfasst die Tumorsuppressorgene. Sie hemmen normalerweise das Wachstum von Zellen und ein Funktionsverlust eines oder mehrerer dieser Gene hat hier eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge (Hunter, 1997).

Die Onkogenese von vielen soliden Tumoren setzt die schrittweise Akkumulation von mehreren genetischen Veränderungen voraus. Dabei bringt jeder Schritt, d.h. jede weitere Mutation, einen gewissen Wachstumsvorteil für die entsprechende Zelle bzw. den daraus entstehenden Zellklon (Nowell, 1976). Ein gut erforschter Tumor in diesem Zusammenhang ist das Kolon-Karzinom, bei dem zahlreiche relevante Mutationen im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz identifiziert wurden. Im Gegensatz zu den besprochenen soliden Tumoren konnten bei hämatologischen Neoplasien spezifische Protoonkogene und Tumorsuppressorgene identifiziert werden, welche alleine für die molekulare Pathogenese verantwortlich sind (Boxer, 1994; Popescu et al., 1997; Jackson et al., 1998; Simpson et al., 1998; Vogelstein et al., 1993).

Bcr-Abl ist ursächlich für die chronisch myeloische Leukämie (CML) sowie einen Teil der Fälle von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) verantwortlich. Es ist das am längsten

bekanntes Onkogen, dessen Entstehung auf ein Translokationsereignis zurückgeführt werden kann. Im Rahmen einer reziproken Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  wird hier der c-Abl-Genlokus auf Chromosom 9 mit dem Bcr-Gen auf Chromosom 22 fusioniert, was sich zytogenetisch an der Bildung des sog. Philadelphia-Chromosoms nachweisen lässt (Bartram et al., 1983; Chan et al., 1987; Groffen et al., 1984; Hermans et al., 1987).

### **1.3. Die Chronisch Myeloische Leukämie (CML)**

#### **1.3.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie**

Die Chronisch Myeloische Leukämie ist wahrscheinlich die erste Variante aller Leukämien, welche als eigenständige Entität erkannt wurde. Erstmals wurden im Jahre 1845 zwei Patienten mit Splenomegalie sowie begleitender Leukozytose beschrieben (Bennet, 1845; Virchow, 1845; Geary, 2000). Als erste Patientin mit CML untersuchte Virchow eine 50-jährige Patientin mit Müdigkeit, Nasenbluten sowie einem Anschwellen der Beine und des Abdomens. Die Autopsie vier Monate später zeigte eine deutliche Splenomegalie sowie Gefäße mit „semipurulentem“ Inhalt, weshalb Virchow 1845 den Ausdruck „Weisses Blut“ als Titel für seine Publikation wählte.

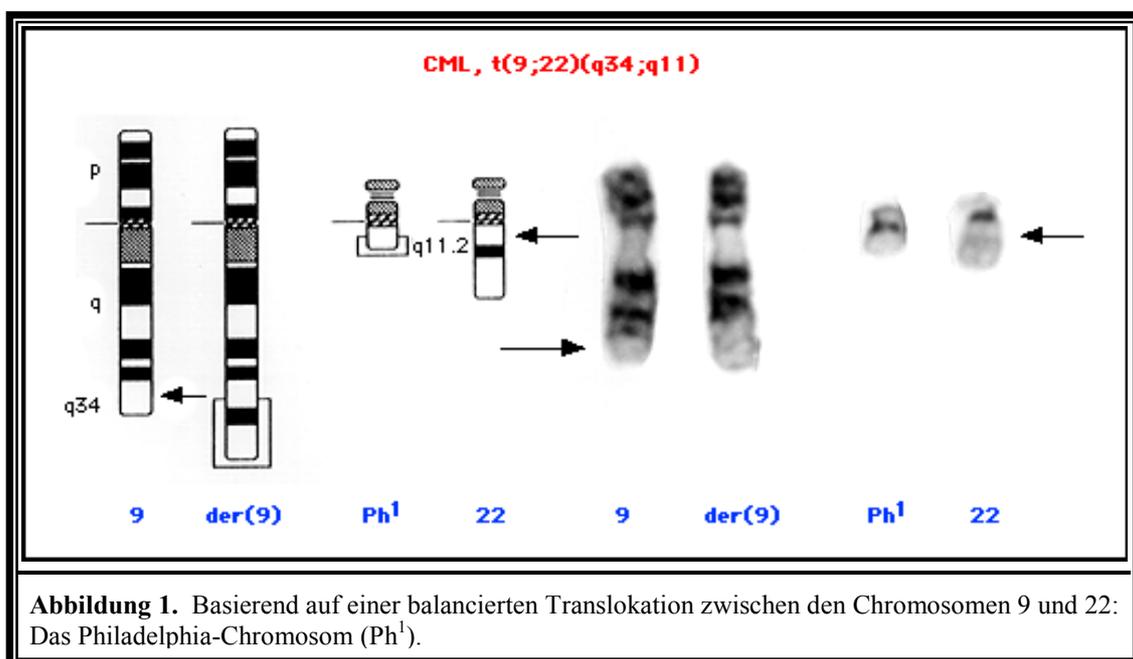
Heute klassifiziert man die CML als chronische myeloproliferative Erkrankung. Wie auch bei der Polycythaemia vera (PV), der Essenziellen Thrombozythämie (ET) und der Osteomyelofibrose (OMF) handelt es sich um eine monoklonale Erkrankung der Hämatopoese, welche in einer Stamm- oder frühen Progenitorzelle entsteht. Charakterisiert ist die CML durch eine überschüssige Produktion einer reifen, myeloischen Zellreihe mit praktisch normaler Differenzierung. Wie alle myeloproliferativen Erkrankungen kann auch die CML in eine akute Leukämie übergehen.

Diagnostisch lässt sich bei der CML in bis zu 95% der Fälle bei der zytogenetischen Untersuchung im Knochenmark das sog. Philadelphia-Chromosom nachweisen, also eine klonale Expansion einer  $Ph^+$ , multipotenten Stammzelle (Kurzrock et al, 1988). Die anderen myeloproliferativen Erkrankungen weisen hingegen kein vergleichbares Charakteristikum auf. Insgesamt ist die CML für etwa 15 - 20% aller Leukämien bei Erwachsenen verantwortlich. Die jährliche Inzidenz liegt bei ein bis zwei neu diagnostizierten Erkrankungen je 100000 Einwohner, wobei das männliche Geschlecht (1,3 versus 1,0) etwas dominiert (Faderl et al., Ann. Intern. Med., 1999).

Ätiologisch könnten hohe Dosen radioaktiver Strahlung als Ursache für das Auftreten einer CML eine Rolle spielen, was bei Überlebenden der Atomanschläge in Japan gezeigt werden konnte. Nach etwa sechs Jahren kam es zu einem signifikanten Anstieg der CML-Inzidenz (Lange et al., 1954).

## 1.3.2. Molekulare Pathogenese – Das Fusionsonkoprotein Bcr-Abl

Die Diagnose einer CML basiert meist auf dem Nachweis des Philadelphia (Ph) - Chromosoms. Dieses Ph-Chromosom wurde erstmals von einer Arbeitsgruppe in Philadelphia als ein abnormes, kurzes Chromosom der G-Gruppe bei der Analyse von Knochenmark bei CML-Patienten entdeckt (Nowell et al., 1960). Es war die erste genetische Veränderung, welche mit einem malignen Tumor assoziiert wurde. 13 Jahre später konnte schließlich gezeigt werden, dass das Ph-Chromosom auf einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 basiert, d.h. als  $t(9;22)(q34.1; q11.21)$  beschrieben werden kann (Rowley, 1973). Das resultierende Chromosom 22 ( $Ph^1$ ) wird signifikant kleiner (Abb. 1).



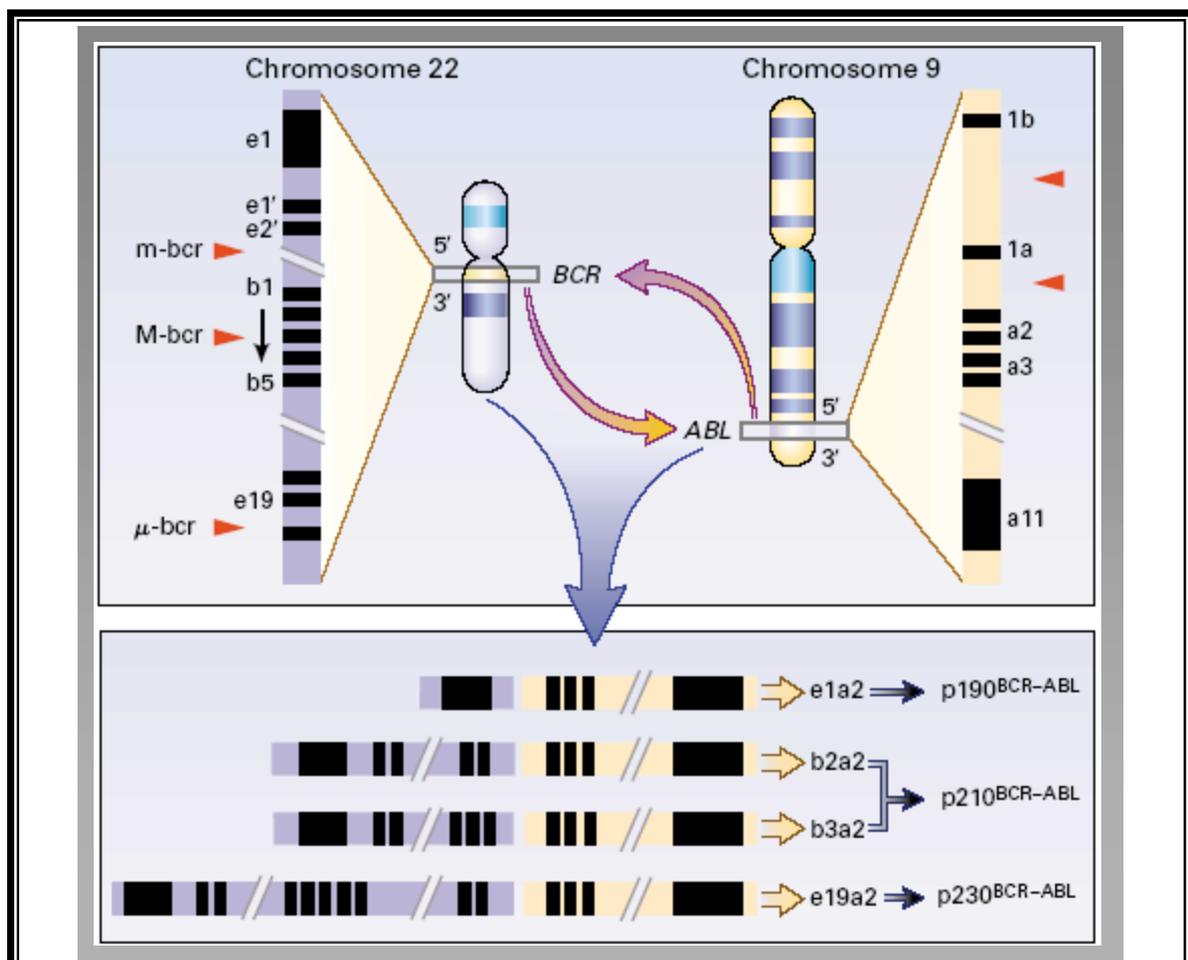
**Abbildung 1.** Basierend auf einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22: Das Philadelphia-Chromosom ( $Ph^1$ ).

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurde der Frage nachgegangen, ob es sich bei der Pathogenese der CML nicht um einen „Multistep“-Mechanismus handelt (Fialkow et al., 1981). Jedoch gibt es bis heute keinerlei Evidenz dafür, dass bei der CML andere genetische Alterationen vor der  $t(9;22)$  Translokation auftreten. Die Generierung des klassischen BCR-ABL-Fusionsgens allein scheint auszureichen, die Expansion des malignen, hämatopoetischen Klons, welche zur CML führt, zu unterhalten. So kann z.B. durch die Transfektion von murinen Stammzellen mit dem BCR-ABL-Gen eine CML-ähnliche Erkrankung induziert werden (Daley et al. 1990; Pear et al., 1998).

Im natürlichen Verlauf der CML kommt es, obwohl dieser erheblich variieren kann, nach etwa drei bis fünf Jahren zur Transformation der Erkrankung in eine rasch progrediente und letal endende myeloische Blastenkrise (Sawyers, 1999). Der Verlauf dieser Blastenkrise gleicht einer akuten Leukämie und führt innerhalb von drei bis sechs Monaten zum Tod. Bis zum Zeitpunkt der Transformation, d.h. während der gesamten chronischen Phase, stellt das

Ph-Chromosom die dominante genetische Abnormalität dar. Im weiteren Verlauf der progredienten Erkrankung kommt es bei 50 bis 80% der Patienten zu weiteren chromosomalen Veränderungen, welche möglicherweise vor einer hämatologischen und klinischen Manifestation der Blastenkrise auftreten.

Durch die t(9;22) (q34.1; q11.21) Translokation, welche bei ca. 95% der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gefunden werden kann, entsteht das Onkogen BCR-ABL, das eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase codiert. Abhängig von der Bruchstelle des BCR-Gens kann das Fusionsgen aber eine unterschiedliche Größe aufweisen (Abb. 2). Dabei enthalten alle BCR-ABL Fusionsgene den gleichen Anteil der ABL-Tyrosinkinase (a2-a11), unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der N-terminalen BCR-Sequenz.



**Abbildung 2.** Die Translokation t(9;22) (q34;q11) bei der CML (nach Faderl et al., 1999).

Beim Ph-Chromosom handelt es sich um ein verkürztes Chromosom 22, welches durch die Translokation des 3' ABL Segmentes auf Chromosom 9 zum 5' BCR-Segment auf Chromosom 22 entsteht. Die Bruchstellen (Pfeilspitzen) des ABL-Gens liegen in den meisten Fällen am 5' Ende von Exon a2. Jedoch konnten zahlreiche Bruchstellen des BCR-Gens auf Chromosom 22 identifiziert werden. Abhängig davon, wo die Bruchstelle auftritt, kommt es zur Fusion unterschiedlich großer BCR-Segmente mit der 3' ABL-Sequenz. Dies kann zum Auftreten einer Fusions-m-RNA (e1a2, b2a2, b3a2 und e19a2) unterschiedlicher Länge führen, welche in chimärische Fusionsproteine (p190 p210 und p230) mit variablem Molekulargewicht und teilweise variabler Funktion translatiert werden. M-bcr, major breakpoint cluster region; m-bcr, minor breakpoint cluster region; μ-bcr, dritte breakpoint region des BCR-Gens, welche sich zwischen Exon e19 und Exon e20 befindet.

Das c-ABL-Gen codiert eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, welche der Familie der Src-Tyrosinkinasen sehr ähnlich ist, und besitzt ein Molekulargewicht von 145 kd ( $p145^{ABL}$ ). Es besteht aus insgesamt 11 Exons mit zwei unterschiedlichen 5' Exons (1a und 1b) und wurde als ein zelluläres Homolog eines Gens des Abelson murine leukemia Virus (A-Mul V) identifiziert (Goff et al., 1980). Dabei handelt es sich um ein transformierendes Retrovirus, welches in Mäusen eine akute B-Zell-Leukämie induzieren kann (Abelson et al., 1970). Nach Aufklärung der Struktur des Ph-Chromosoms (de Klein et al., 1982) sowie der Entdeckung von Bruchstellen in der Nähe des 5'-Endes des c-ABL-Gens (Heisterkamp et al., 1983) war klar, dass die Exons a2-a11 schließlich bei der Translokation t(9;22) in eine Region auf Chromosom 22 transloziert werden, welche als „breakpoint cluster region“ bzw. „BCR“ bezeichnet wurde. Die Charakterisierung dieser Region kam zu dem Ergebnis, dass es sich hier um eine Teilsequenz eines großen protein-codierenden Gens bestehend aus 25 Exons handelt, welches nun als BCR-Gen bezeichnet wird. Die fünf ursprünglich identifizierten Exons (b1-b5) der BCR-Region stellen nun die Exons 12 – 17 (e12-e17) des gesamten BCR-Gens dar.

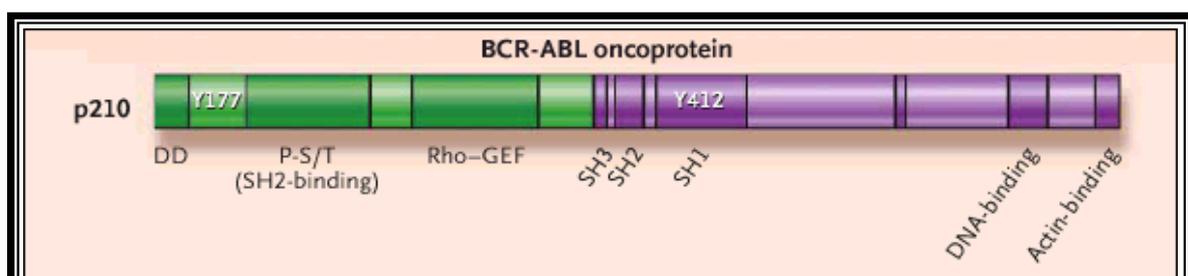
Fast alle Patienten mit einer typischen CML in der chronischen Phase exprimieren ein 210 kd Bcr-Abl-Protein. Die Bruchstelle im BCR-Gen im Rahmen der Translokation tritt dabei in der M-bcr-Region, der major breakpoint cluster region, auf Chromosom 22 zwischen den Exons b2 und b3 oder b3 und b4 auf. So resultiert ein BCR-ABL-Fusionsgen mit einer b2a2 oder b3a2 Translokationsstelle (Abb. 2), welches in eine 8,5 kb m-RNA transkribiert wird. 50% der Erwachsenen und 80% der Kinder mit einer  $Ph^+$  ALL sowie sehr wenige Patienten mit einer CML exprimieren ein 190 kd (185 kd) Bcr-Abl-Onkoprotein. Die Bruchstelle auf Chromosom 22 liegt dann jenseits des 5'-Endes der M-bcr-Region innerhalb eines Segmentes, das als „minor breakpoint cluster region“ (m-bcr) bezeichnet wird. Das Splicing erfolgt am 3'-Ende von Exon e1, so dass eine Bcr-Abl-mRNA entsteht, welche in ein kleineres Bcr-Abl-Fusionsprotein (190 kd) translatiert wird ( $p190^{Bcr-Abl}$ ). Des Weiteren wurde eine dritte Bruchstelle des BCR-Gens jenseits des 3'-Endes der M-Bcr-Region bei mehreren Patienten beschrieben (Pane et al., 1996). Das Abl-Exon 2 fusioniert dabei mit dem Bcr-Exon 19 auf Chromosom 22 (der  $\mu$ -bcr). Das Translationsprodukt mit der Translokationsstelle e19a2 wird schließlich als  $p230^{Bcr-Abl}$  (230 kd) bezeichnet.

Die Tatsache, dass Fusionsproteine unterschiedlicher Größe mit einer unterschiedlichen Prognose korreliert sind, hat zur näheren Untersuchung der biologischen Aktivität dieser Translokationsprodukte im Labor geführt. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass das  $p190^{Bcr-Abl}$ -Protein eine größere Aktivität aufweist und außerdem ein potenteres Onkoprotein darstellt als  $p210^{Bcr-Abl}$  (Lugo et al., 1990; Voncken et al., 1995).

Das Bcr- sowie das c-Abl-Protein alleine besitzen kein intrinsisches onkogenes Potential und können Zellen nicht transformieren. Das Bcr-Abl-Protein hingegen besitzt die Fähigkeit,

Zellen *in vitro* zu transformieren, und stellt somit ein klassisches Onkoprotein dar. Alle Formen von Bcr-Abl können zytokin-abhängige lymphoide und myeloide hämatopoetische Zellen transformieren, was auch im Mausmodell nachgewiesen werden konnte (Daley et al., 1988; Daley et al., 1990; McLaughlin et al., 1987; Young et al., 1988). Als entscheidender Parameter der onkogenen Wirkung von Bcr-Abl und als ursächlicher pathophysiologischer Mechanismus für die Entstehung der CML gilt die erhöhte Aktivität der Abl-Tyrosinkinase (Konopka et al., 1985). Dies wird durch die Therapieerfolge mit Imatinib, das gezielt die Tyrosinkinase von Bcr-Abl inhibiert, eindrucksvoll unter Beweis gestellt (Druker et al., 2001).

Für die hohe Aktivität der Bcr-Abl-Tyrosinkinase ist maßgeblich der Bcr-Anteil verantwortlich. Bcr führt dabei zur Dimerisierung bzw. Tetramerisierung des Onkoproteins, so dass benachbarte Bcr-Abl-Moleküle sich gegenseitig am Tyrosinrest der Aktivierungsschleife, welcher normalerweise durch die SH3-Domäne in einem inaktiven Zustand gehalten wird, phosphorylieren. Diese Transphosphorylierung der Kinasedomänen



**Abbildung 3.** Die t(9;22) Translokation und ein häufiges Produkt bei der CML: Das Bcr-Abl-Onkoprotein p210 (nach Goldman et al., 2003).

Bei der klassischen CML wird BCR-ABL in eine mRNA mit einer e13a2- oder e14a2-Translokationsstelle transkribiert, welche schließlich in das p210<sup>Bcr-Abl</sup>-Onkoprotein translatiert wird. Dieses stellt ein Hybridprotein dar und enthält sowohl funktionelle Domänen des BCR-N-Terminus (Dimerisations- [DD], SRC-homology 2 [SH2]-Bindungs- und die Rho GTP-GDP exchange-factor [GEF]-Domäne) und des ABL- Terminus (nur die SRC-homology Regionen 2,3 und 1 [SH2, SH3 und SH1] und die DNA- sowie Aktin-Bindungsdomäne sind dargestellt). Der Tyrosinrest 177 (Y177) in der BCR-Region sowie der Tyrosinrest 412 (Y412) in der ABL-Region des Fusionsgens spielen als Andockstellen für Adapterproteine und für die Bcr-Abl-Autophosphorylierung eine wichtige Rolle.

bewirkt deren Aktivierung (McWhirter et al., 1993; Smith et al., 2003). Durch die unkontrollierte Tyrosinkinaseaktivität wird schließlich die physiologische Funktion des normalen c-abl-Proteins durch die Interaktion mit einer Vielzahl von Effektorproteinen gestört. So kommt es zu einer Deregulation der Proliferation, zu einer verminderten Adhärenz der Leukämiezellen im KM-Stroma und zu einer reduzierten apoptotischen Antwort auf mutagene Stimuli.

Extensiv wurden die Struktur des Bcr-Abl-Proteins und dessen biochemische Signalwege untersucht (Barnes et al., 2002). So ist z.B. die Tyrosinkinase-Domäne, welche durch die SRC-homology 1 (SH1)-Domäne des Abl-Anteils codiert wird, zweifellos entscheidend für

die onkogene Transformation verantwortlich. Andere wichtige Motive des Abl-Segmentes sind die Protein-Interaktionsstelle SH2 sowie die c-terminale Aktinbindungsdomäne. Das erste Exon des Bcr-Segmentes weist eine Oligomerisationsdomäne in Form des so genannten „Coiled-Coil“-Motivs auf, welches die Dimerisierung von Bcr-Abl-Molekülen vermittelt. Der Tyrosinrest 177 (Y177) ist für die Bindung von Adaptermolekülen, wie z.B. Grb-2, von großer Bedeutung. Grb-2 schließlich koppelt Bcr-Abl über das GDP/GTP-Austauschmolekül SOS (son of sevenless) mit dem Ras-Signalweg (Pendergast et al., 1993). N-terminale Phosphoserin- und Phosphothreoninreste (P-S/T) werden hingegen für die Interaktion mit Proteinen benötigt, die eine SH2-Domäne aufweisen, einschließlich c-Abl selbst (Abb. 3).

Zusätzlich zu den erwähnten Signalwegen von Bcr-Abl sollen nun noch zwei weitere beschrieben werden. Durch die beiden Adaptermoleküle CBL und CRKL wird die Interaktion mit dem second-messenger Molekül Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) vermittelt (Sattler et al., 1996; Skorski et al., 1995). Diese Bindung und Aktivierung von PI3K durch Bcr-Abl führt möglicherweise zur Aktivierung von antiapoptotischen Signalwegen. Für diese Theorie spricht die Beobachtung, dass in Folge der Interaktion von Bcr-Abl mit PI3K das antiapoptotisch wirkende Molekül Akt aktiviert wird (Skorski et al., 1997).

Ein weiterer Signalweg betrifft die JAK-STAT-Signalkaskade, die physiologischerweise durch die Zytokine IL-3 und GM-CSF aktiviert wird. Durch Aktivierung der zytoplasmatischen Kinase JAK werden STAT-Transkriptionsfaktoren konstitutiv phosphoryliert und aktiviert. Dieser Mechanismus wird als eine Ursache für das Wachstumsfaktor-unabhängige Wachstum von CML-Zellen angesehen (Carlesso et al., 1996; Shuai et al., 1996).

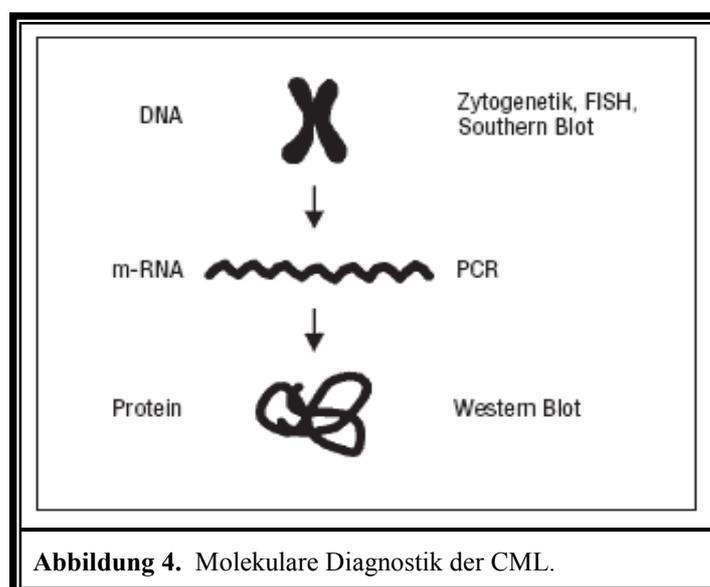
Einer der deutlichsten Unterschiede zwischen dem normalen c-Abl-Protein und Bcr-Abl ist deren abweichende subzelluläre Lokalisation. Bcr-Abl ist ausschließlich im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und besitzt einen antiapoptotischen Effekt. Diese zytoplasmatische Lokalisation scheint eine wichtige Voraussetzung des onkogenen Potentials von Bcr-Abl zu sein. Unter Behandlung mit Imatinib und gleichzeitiger Blockierung des Bcr-Abl-Exportsignals lässt sich ein erhöhter Import von Bcr-Abl in den Zellkern beobachten. Dabei verwandelt sich, sobald Imatinib entfernt ist, das so im Zellkern gefangene Bcr-Abl-Protein von einem antiapoptotischen hin zu einem proapoptotischen Protein und induziert den Zelltod der CML-Zellen. Möglicherweise ermöglicht die pharmakologisch induzierte Translokation in den Zellkern so einen neuen Therapieansatz der CML (Vigneri et al., 2001).

### 1.3.3. Symptomatik, Diagnostik und klinischer Verlauf

Die klinischen Symptome bei Diagnosestellung der CML können stark variieren. Insgesamt sind 20 – 50% der Patienten asymptomatisch und die Erkrankung wird zufällig bei einer Routineuntersuchung entdeckt (Faderl et al., Ann. Intern. Med., 1999; Savage et al., 1997). Generell beginnt die CML schleichend und wird von unspezifischen Symptomen begleitet. Es

kommt zum Auftreten von allgemeinem Krankheitsgefühl, verminderter Leistungsfähigkeit, Gewichtsabnahme, Nachtschweiß, Fieber, Völlegefühl, Blutungsneigung, Knochenschmerzen, Splenomegalie (48 – 76%), Hepatomegalie sowie Infiltration in Haut und Lymphknoten. In etwa 85% der Patienten erfolgt die Diagnose in der chronischen Phase der Erkrankung. Nur 5 – 10% befinden sich in der Akzelerationsphase oder der Blastenkrise. Als typische Laborparameter findet man eine Anämie (45 – 62%), eine Leukozytose mit mehr als 100000 Zellen/ $\mu\text{l}$  (52 – 72%) sowie eine Thrombozytose. Im Differentialblutbild kommt es zum Auftreten von granulopoetischen Zellen aller Reifungsstufen, wobei ein Hiatus leukämicus einen klassischen Befund bei der CML darstellt. Auch die Basophilie, die Eosinophilie, eine Erhöhung der Harnsäure und der LDH sowie eine Erniedrigung der alkalischen Leukozytenphosphatase, was einen funktionellen Granulozytendefekt anzeigt, sind mögliche Befunde.

Im Knochenmarkausstrich ist der Quotient Granulopoese zu Erythropoese massiv zugunsten der Granulopoese verschoben. Man findet ein hyperzelluläres Bild mit vorwiegender Hyperplasie der Granulopoese, aber auch der Thrombopoese. Außerdem kommt es zum Auftreten von Pseudo-Gaucher-Speicherzellen, die durch die hyperaktivierte Granulopoese mit vermehrtem Anfall von unbewältigtem Glukozerebrosid entstehen. Die Anzahl der Promyelozyten und Blasten ist für die Klassifikation der CML von Bedeutung. Weniger als 10% dieser Zellen sprechen für eine chronische Phase, 10 – 20% für eine Akzelerationsphase und mehr als 20% für eine Blastenkrise. Histologisch findet man schließlich auch eine Verdrängung des Fettmarks sowie eine Zunahme der retikulären Fibrosierung und der Vaskularität (Lundberg et al., 2000). Beide, die verstärkte Vaskularisierung, welche vermutlich auf Grund der Produktion von VEGF durch CML-Zellen auftritt, sowie die KM-Fibrose, scheinen in Folge einer Therapie mit Imatinib jedoch rückbildungsfähig zu sein (Bueso-Ramos et al., 2004; Kvasnicka et al., 2004).



Die molekulare Diagnostik stellt eine weitere Säule der CML-Diagnostik dar. Der Nachweis des Ph-Chromosoms, d.h. von BCR-ABL, kann dabei auf DNA-Ebene (Zytogenetik, FISH, Southern-Blot), auf m-RNA-Ebene (RT-PCR) und auf Proteinebene (Western-Blot) erfolgen (Peschel et al., 2003; Abb. 4).

Für die Routinediagnostik hat nach wie vor die Zytogenetik die größte Bedeutung und gilt als „Goldstandard“ sowohl für die Diagnostik als auch für die Verlaufsbeobachtung bei der CML. Diese Technik besitzt ein Sensitivitäts-Limit mit einer Detektionsschwelle von ungefähr 5% Ph<sup>+</sup> Zellen und kann somit zu falsch negativen Ergebnissen führen. Insgesamt sind knapp 10% der CML-Patienten zytogenetisch negativ, weshalb hier alternative molekulare Methoden zum Nachweis des BCR-ABL verwendet werden. An vielen hämatologischen Zentren gehört die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zu den Standarduntersuchungsverfahren. Mit ihr können auch atypische Genumlagerungen nachgewiesen werden, welche durch die PCR nicht erfasst werden. Die RT-PCR besitzt jedoch eine deutlich höhere Sensitivität, ist günstig und wenig arbeitsintensiv. Bei weniger als 5% der CML-Patienten kann aber mit keiner Methode ein Abl-Rearrangement nachgewiesen werden. Diese haben eine deutlich schlechtere Prognose als BCR-ABL-positive Patienten.

Klinisch verläuft die Erkrankung in drei Phasen: der so genannten chronischen Phase, die durchschnittlich drei bis fünf Jahre andauert, es aber auch zu Verläufen von nur zehn Monaten oder über zehn Jahre kommen kann, der daran anschließenden Akzelerationsphase mit schlechtem Ansprechen auf die bisher durchgeführte konventionelle Therapie und schließlich dem Blastenschub (myeloisch oder lymphatisch) mit einem sehr kurzen Überleben von zumeist wenigen Monaten.

- **Chronische Phase (CP):** Initiale Phase; meist unspezifische Symptome vorhanden mit z.T. exzessiver Leukozytose und Splenomegalie; B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß); Nachweis des Ph-Chromosoms bzw. der BCR-ABL Translokation in > 95% der Patienten; charakteristische BB-Veränderungen, die mit Thrombosen oder Leukostasesymptomen, aber auch mit Blutungsneigung einhergehen können.
- **Akzelerationsphase (AP):** Auftreten von Allgemeinsymptomen wie Knochenschmerzen, Gewichtsabnahme und plötzlichen Fieberschüben; Dauer etwa drei bis sechs Monate vor dem Einsatz von Imatinib; steigende Leukozytenzahlen bei adäquater Therapie; Thrombopenie (<100000/ $\mu$ l) oder weiterer Hb-Abfall (<9g/dl); zunehmende Splenomegalie; Anstieg der Blasten/Promyelozyten auf > 10% im PB oder KM; Anstieg der Basophilen oder Eosinophilen auf > 20% im PB; Chromosomenzusatzaberrationen als Zeichen einer klonalen Evolution.
- **Blastenkrise (BC):** Terminale Erkrankungsphase mit zunehmender Therapieresistenz und klinischem Bild ähnlich einer akuten Leukämie; Auftreten von Zeichen der

ausgeprägten KM-Insuffizienz bei stark erhöhten Leukozytenzahlen; zwei Drittel der Patienten erleiden einen myeloischen Blastenschub, ca. ein Drittel einen lymphatischen; wichtig ist der Ausschluss einer Meningeosis leukämica; die mittlere Überlebensdauer liegt auch nach Einführung von Imatinib nur bei etwa zehn Monaten; Vermehrung unreifer Vorstufen auf  $> 30\%$  im PB oder  $> 50\%$  im KM; zusätzliche klonale Veränderungen in der Zytogenetik.

#### 1.3.4. Therapie und Prognose der CML

Neben der Reduktion der Leukozytose ist eine weitgehende oder vollständige Unterdrückung des BCR-ABL-positiven Klons und damit die Verhinderung einer Progression in die Blastenkrise wichtigstes Therapieziel. Beim therapeutischen Ansprechen wird zwischen einer hämatologischen (komplett oder partiell) und einer zytogenetischen Remission (major, minor oder minimal) unterschieden, wobei nur letztere mit einer signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit verbunden ist.

Die Therapieprinzipien befinden sich seit einigen Jahren in einem grundlegenden Wandel. Bis vor wenigen Jahren galt die Therapie mit Interferon- $\alpha$ , alleine oder in Kombination mit AraC (Cytarabin), als Goldstandard in der chronischen Phase der CML.

Junge Patienten, denen HLA-kompatibles KM zur Verfügung steht, werden einer allogenen KM- bzw. Stammzelltransplantation unterzogen. Diese ist zwar auf Grund der immunologischen Hauptkomplikationen – der akuten und chronischen Graft-versus-Host-Erkrankung sowie den opportunistischen Infektionen - mit einer hohen therapiebegleitenden Mortalität behaftet (20 - 40%), stellt aber die einzig kurative Therapieform dar. Die allogene KMT stellt mit etwa 50% langfristigem leukämiefreiem Überleben somit auch heute noch die Behandlungsmethode mit der höchsten Heilungsaussicht dar (Gale et al., 1998). Das Risiko einer allogenen KMT hängt aber nicht nur vom Ausmaß der GvH-Erkrankung – und damit von der Histokompatibilität des Spenders -, sondern auch vom Alter des Patienten und dem Krankheitsstadium der CML ab (Gratwohl et al., 1998). So können junge Patienten mit neu diagnostizierter CML in der chronischen Phase und einem HLA-identischen Geschwister wegen guter Langzeitüberlebensraten nach Möglichkeit im ersten Jahr nach der Diagnosestellung am erfolgreichsten therapiert werden.

Mit Hilfe der medikamentösen Therapie soll eine hämatologische und zytogenetische Remission erreicht werden, welche mit einer besseren Überlebenszeit korreliert. Als chemotherapeutische Medikamente werden dabei Hydroxyurea, eine bereits 1972 etablierte Substanz, und Busulfan am häufigsten eingesetzt. Bis zu 90% der Patienten erreichen mit dieser Therapie eine hämatologische Remission, doch ist die Behandlung nicht kurativ, d.h. es werden keine dauerhaften Remissionen erreicht, sie verlängert nicht das Gesamtüberleben und führt nur selten zu einer zytogenetischen Remission. Die Therapie mit Hydroxyurea ist zur

initialen Zytoreduktion sehr gut geeignet und kann auch in Kombination mit Interferon- $\alpha$  zur Therapieeinleitung eingesetzt werden. Busulfan hingegen wird wegen der Gefahr der irreversiblen Zytopenien sowie der Lungenfibrosen nur noch als Reservemedikament verwendet.

Die Behandlung mit Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) wird seit 1981 eingesetzt, wobei zunächst partiell gereinigtes Interferon- $\alpha$  verwendet wurde. Erst seit 1986 therapiert man mit rekombinantem Interferon- $\alpha$ 2a (Intron A) und Interferon- $\alpha$ 2b (Talpac et al., 1986). Die Indikation zur Interferon-Behandlung ist bei allen Patienten gegeben, die nicht innerhalb der nächsten Monate bzw. im ersten Jahr nach Diagnosestellung allogent transplantiert werden sollen. Die meisten Patienten mit einer IFN- 2a-Monotherapie erreichen hämatologische Remissionen. Komplette zytogenetische Remissionen werden allerdings nur bei einer Minderheit von Patienten, bei 13 – 27%, gesehen, welche dann auch ein verlängertes Gesamtüberleben zu haben scheinen (Talpac et al., 1991). Das 10-Jahresüberleben dieser Patienten liegt bei 72 – 78% (Kantarjian, O'Brien et al., 2003). Die Kombination von Interferon- $\alpha$  mit Cytarabin (AraC) führt schließlich zu einem schnelleren zytogenetischen Ansprechen sowie einem höheren Prozentsatz an zytogenetischen Remissionen. Der Einfluss auf das Gesamtüberleben ist aber noch nicht abschließend geklärt. Die Rate an zytogenetischen Remissionen liegt im Vergleich zur alleinigen Interferon-Therapie um ca. 10% höher (Guilot et al., 1997). Seit 2001 zur Therapie der CML zugelassen ist Imatinib (Glivec<sup>®</sup>), ein selektiver Tyrosinkinaseinhibitor, der die Bcr-Abl-Kinase-Aktivität hemmt (Kap. 1.3.). In einer randomisierten, multizentrischen Phase III-Vergleichsstudie mit Interferon- $\alpha$  plus Cytarabin erwies sich Imatinib als signifikant überlegen in Bezug auf alle Studienendpunkte (O'Brien et al., 2003). Die Dauer des Ansprechens auf Imatinib bleibt allerdings noch ungewiss.

Neben zahlreichen weiteren Substanzen, wie Homoharringtonin, Herbimycin A, Cladribin, Decitabin, Isotretinoin, Adaphostin und Geldanamycin werden aktuell insbesondere Farnesyltransferaseinhibitoren untersucht (Cortes, Albitar et al., 2003). In vitro-Ergebnisse zeigen deren Wirksamkeit selbst in Imatinib-refraktären Zellen. Verträglichkeit und Wirksamkeit wurden in ersten klinischen Studien belegt und Folgestudien sind unterwegs.

## **1.4. Molekulare Therapie mit Imatinib mesilate (Glivec<sup>®</sup>)**

### **1.4.1. Identifizierung und Entwicklung dieses Moleküls**

Proteinkinasen umfassen eine große Familie homologer Proteine, welche in zwei Gruppen eingeteilt werden können: Serin/Threonin-Proteinkinasen und Tyrosin-Proteinkinasen. Proteinkinasen stellen eine Komponente von Signaltransduktionswegen dar, weshalb die Entwicklung selektiver Inhibitoren jene Krankheiten modulieren bzw. aufhalten könnte, die

eine genetische Alteration dieser Signalwege aufweisen. Auf Grund der bekannten Deregulation bei humanen Malignomen, gehörten Bcr-Abl, EGFR, HER2 und Proteinkinase C (PKC) zu den ersten Proteinkinasen, welche als Zielmoleküle für die Entwicklung von selektiven Inhibitoren in Frage kamen (Druker et al., 2000).

Insbesondere Bcr-Abl schien ein ideales und attraktives Target zu sein, da es bei der Mehrzahl der CML-Patienten exprimiert wird (Kurzrock et al., 1988). Gleichzeitig ist die Aktivität der Tyrosinkinase eine essentielle Voraussetzung für die transformierende Eigenschaft von Bcr-Abl (Lugo et al., 1990).

Im Rahmen des Screening mit großen Bibliotheken (Buchdunger et al., 1995; Buchdunger et al., 1996) fanden sich unter den am stärksten wirksamen Molekülen ausnahmslos duale Inhibitoren der Abl- sowie PDGFR-Kinase. Als führendes Molekül für die präklinische Untersuchung trat schließlich Imatinib (STI-571, CGP 57148B) in den Vordergrund. Es stellte sich als potenter und relativ selektiver Inhibitor aller Abl-Tyrosinkinasen, einschließlich p210- und p190, heraus. Als einzige weitere Tyrosinkinase neben dem PDGFR, für welchen Imatinib ursprünglich ja entwickelt wurde, inhibiert Imatinib auch c-kit, den SCF-Rezeptor (Buchdunger et al., 2000; Heinrich et al., 2000). Andere Tyrosinkinasen wie EGFR, FLT1 oder FLT3 werden hingegen nicht beeinflusst.

In zahlreichen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Imatinib in der Lage ist, die Proliferation Bcr-Abl-exprimierender Zellen in vitro und in vivo erfolgreich zu supprimieren. Das Wachstum normaler Kolonien wurde dabei aber nur minimal inhibiert (Druker et al., 1996). Weil diese Ergebnisse auch in weiteren Studien bestätigt werden konnten, stand das Tor für klinische Studien schließlich weit offen.

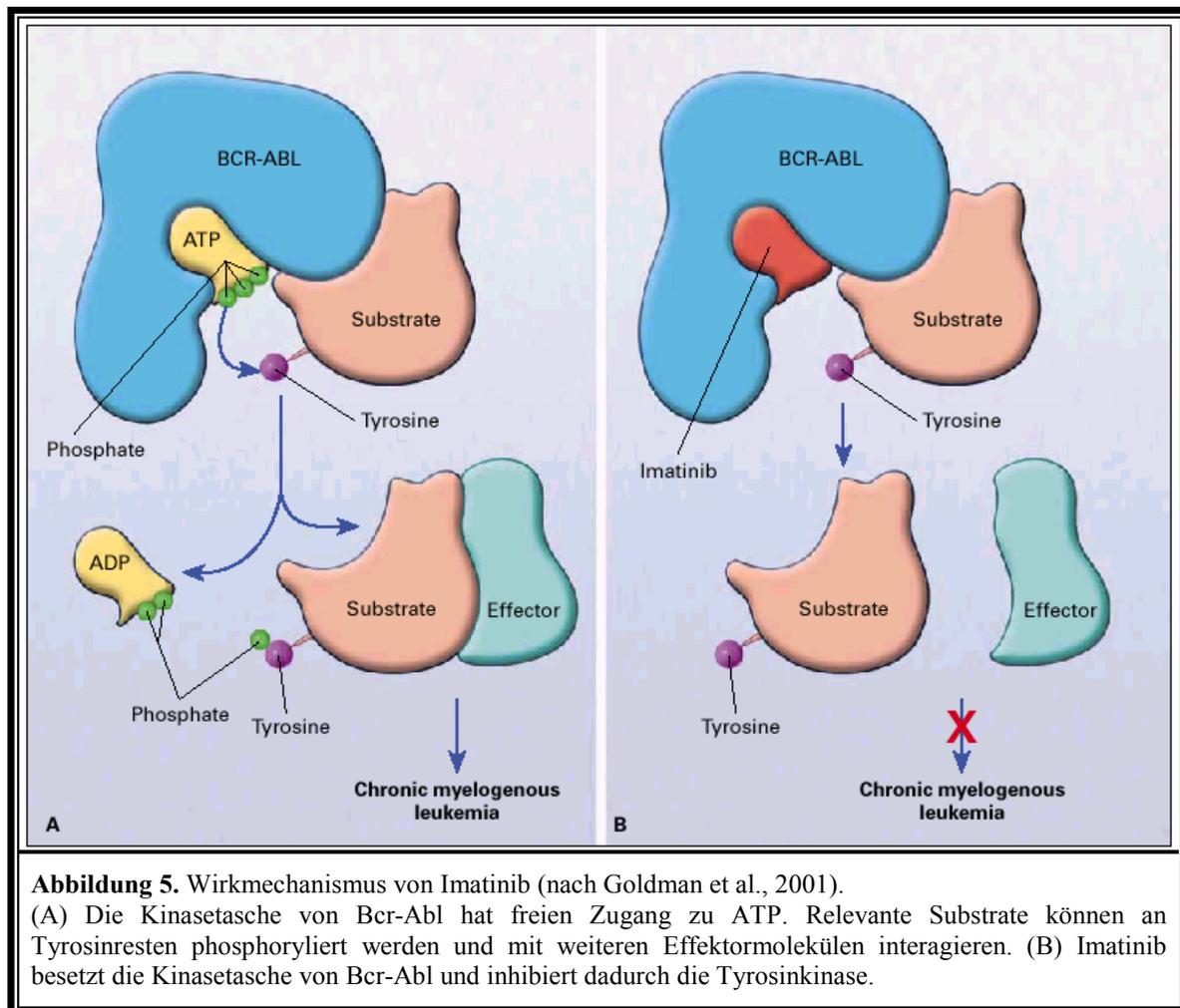
#### 1.4.2. Molekularer Wirkmechanismus von Imatinib

Die erhöhte katalytische Aktivität der Kinasedomäne ist absolut notwendig für das transformierende Potential des Bcr-Abl-Fusionsproteins und die Fähigkeit, eine maligne Erkrankung zu induzieren. Mit der Gruppe der 2-Phenylaminopyrimidine und insbesondere von Imatinib wurden Inhibitoren der Bcr-Abl-Tyrosinkinase gefunden, welche eine erstaunlich hohe Affinität und Spezifität für Bcr-Abl bzw. c-Abl besitzen.

Um die Frage zu klären, wie Imatinib diese hohe Spezifität erreicht, konnte zunächst die Kristallstruktur einer an die katalytische Domäne von c-Abl gebundenen Variante von Imatinib demonstriert werden (Schindler et al., 2000). Dabei konnte anhand der Elektronendichteverteilung gezeigt werden, dass Imatinib die Stelle besetzt, wo normalerweise die Adenin-Base des ATP gebunden wird (Abb. 5).

Wie andere Proteinkinaseinhibitoren bindet also auch Imatinib an der hochkonservierten Nukleotid-Bindungstasche der katalytischen Domäne. Günstig für einen spezifischen Inhibitor erweisen sich dabei die Tatsachen, dass in der Umgebung der ATP-Bindungsstelle kaum

genetische Variationen auftreten (Mohammadi et al., 1997) und dass zwischen der aktiven und inaktiven Form der Kinasen Unterschiede in der Konformation bestehen (Wang et al., 1998). Bei den meisten Kinasen wird die katalytische Aktivität durch einen phosphorylierungs-abhängigen Übergang zwischen diesen beiden Konformationen reguliert, wofür die so genannte Aktivierungsschleife verantwortlich ist.



Imatinib erreicht nun eine hohe Spezifität insbesondere dadurch, dass es die spezielle inaktive Konformation der Aktivierungsschleife bei c-Abl erkennt und in der Lage ist, diese zu stabilisieren. Tyr<sup>393</sup> in der Aktivierungsschleife von c-Abl stellt die Hauptphosphorylierungsstelle dar. Diese Position war bei der kristallisierten Form von c-Abl in den genannten Studien aber nicht phosphoryliert (Schindler et al., 2000). Man nimmt deshalb an, dass sich die Aktivierungsschleife nach Bindung von Imatinib an der ATP-Bindungsstelle in einer auto-inhibitorischen Konformation befindet, u.a. weil Imatinib nicht direkt mit der Aktivierungsschleife interagiert (Schindler et al., 2000). Dieser Mechanismus wird, auch wenn noch zahlreiche weitere Kräfte bei der Interaktion von Imatinib und c-Abl eine Rolle spielen, als zentrale Ursache für die Hemmung von c-Abl bzw. der konstitutiven katalytischen Aktivität der Tyrosinkinase Bcr-Abl angesehen.

### 1.4.3. Therapeutischer Einsatz und Nebenwirkungen

Nach Durchführung bereits abgeschlossener Studien wurde Imatinib für mehrere Indikationen zugelassen. Bei der chronisch myeloischen Leukämie gehören dazu die CML in der Blastenkrise, die CML in der Akzelerationsphase, die CML in der chronischen Phase nach dem Versagen einer Interferon-Therapie sowie die neu diagnostizierte  $\text{Ph}^+$  CML, für die eine KM-Transplantation als Erstbehandlungsmöglichkeit nicht in Betracht gezogen wird. Desweiteren wurde im Mai 2002 Imatinib zur Behandlung  $\text{c-kit}^+$ , nicht resezierbarer oder metastasierter maligner gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) bei Erwachsenen zugelassen.

Die initiale Dosierung von Imatinib orientiert sich primär am Stadium der Erkrankung. Bei Patienten in der chronischen Phase der CML beginnt man die Therapie mit 400 mg/d, während Patienten in der Akzelerationsphase oder der Blastenkrise mit 600 mg/d gestartet werden. Dosierungen von weniger als 300 mg/Tag werden als subtherapeutisch betrachtet und sollten nur in Ausnahmefällen eingesetzt werden (Deininger et al., 2003). Die empfohlene Dosierung von Imatinib bei GIST-Patienten beträgt 400 mg/d für eine Therapiedauer, welche sich bis zur Progression der Erkrankung erstreckt.

Zu den häufigsten Nebenwirkungen bei chronischer Einnahme von Imatinib gehören neben der Übelkeit (68%) und dem Erbrechen (54%) vor allem die Entwicklung von Ödemen in Form von Pleuraergüssen, Aszites oder Lungenödem (68%), die Diarrhoe (49%), die Hämorrhagie (48%), das Auftreten von Muskelkrämpfen (46%) sowie Arzneimittellexantheme (39%) (Brouard et al., 2001; Guilhot F., 2004). Die Entwicklung einer Gynäkomastie wurde bei sieben von 38 CML-Patienten berichtet und war mit verminderten freien Testosteron-Spiegeln assoziiert (Gambacorti-Passerini et al., 2003).

Bedrohliche und schwere Nebenwirkungen treten deutlich seltener auf. Dazu gehören die Hepatotoxizität, die Neutropenie, die Anämie sowie die Thrombozytopenie. Sie erfordern alle eine Dosisreduktion, eine Unterbrechung der Behandlung bzw. einen definitiven Therapieabbruch (Deininger et al., 2003).

### 1.4.4. Klinische Erfolge und Erfahrungen mit Imatinib in der Therapie der CML

Die Wirksamkeit von Imatinib basiert auf hämatologischen und zytogenetischen Gesamtansprechraten. Insgesamt liegen aber keine kontrollierten Studien vor, die einen klinischen Vorteil oder ein verlängertes Überleben belegen.

Eine große offene, multizentrische, internationale, randomisierte Phase-III-Studie wurde bei Patienten mit neu diagnostizierter  $\text{Ph}^+$  CML durchgeführt. Für Patienten mit  $\text{Ph}^+$  CML in der BC, der AP sowie in der CP, bei denen eine vorangegangene IFN-Therapie versagte, liegen dagegen aktuell nur nicht kontrollierte, internationale, offene klinische Phase-II-Studien vor.

Die große Phase-III-Studie (IRIS, International Randomized study of Interferon and STI571) mit insgesamt 1106 Patienten (Alter 18 – 70 Jahre) mit neu diagnostizierter Ph<sup>+</sup> CML in der chronischen Phase verglich die Behandlung von Imatinib allein mit der Kombination aus Interferon-alpha (IFN) plus Cytarabin (Ara-C) (O'Brien et al., 2003).

Hinsichtlich des hämatologischen und zytogenetischen Ansprechens, der Medikamententoleranz und der Wahrscheinlichkeit einer Progression war Imatinib der Kombinationstherapie aus IFN und Ara-C signifikant überlegen. Z.B. lag nach 18 Monaten die Rate eines progressionsfreien Verlaufs ohne Übergang in die Akzelerationsphase oder Blastenkrise bei 96,7% im Imatinib- und bei 91,5% im IFN/Ara-C-Arm ( $p < 0,001$ ). Der geschätzte Anteil von progressionsfreiem Überlebenden nach 18 Monaten betrug hingegen 92,1 versus 73,5% ( $p < 0,001$ ). Die Rate eines größeren zytogenetischen Ansprechens lag nach 18 Monaten bei 87,1% im Imatinib-Arm versus 34,7% im IFN/Ara-C-Arm, wobei bezüglich einer kompletten zytogenetischen Remission (0% Ph<sup>+</sup> Metaphasen) eine Rate von 76,2% versus 14,5% beobachtet wurde ( $p < 0,001$ ). Die Medikamenten-Intoleranz lag bei  $< 1\%$  im Imatinib-Arm, während insgesamt etwa 25% der Patienten im IFN/Ara-C-Arm ihre Behandlung nicht toleriert haben. Insgesamt muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich hier immer noch um vorläufige Daten handelt und die Dauer des Ansprechens auf Imatinib noch ungewiss bleibt. Das Gesamtüberleben aller Patienten der IRIS-Studie unterscheidet sich in beiden Behandlungsarmen nach 18 Monaten zumindest noch nicht signifikant (97,2 versus 95,1%).

Für Patienten in der chronischen Phase, bei denen eine vorangegangene Interferon-Therapie versagte, liegen Ergebnisse aus einer Phase-I- sowie einer Phase-II-Studie vor. Die initiale Phase-I-Studie zeigte ein komplettes hämatologisches Ansprechen bei 53 von 54 Patienten, welche mindestens vier Wochen mit 300 mg/d Imatinib behandelt wurden (Druker, Talpaz et al., 2001). Anschließend wurde eine klinische, multizentrische, nicht kontrollierte Phase-II-Studie mit 532 CML-Patienten in der späten chronischen Phase durchgeführt. Die Patienten waren vorher im Median über 14 Monate mit einer IFN-Therapie von  $\geq 25 \times 10^6$  IU/Woche behandelt worden und befanden sich alle in einem medianen Zeitabstand von 32 Wochen nach Diagnosestellung (Kantarjian et al., 2002). 18 Monate nach Beginn der Imatinib-Therapie mit 400 mg/d konnte eine größere zytogenetische Remission bei 60% der Patienten berichtet werden, welche bei 41% der Patienten vollständig war. Eine komplette hämatologische Remission wurde nach 18 Monaten bei 93% der Patienten erreicht.

Schließlich wurden Studien mit höheren Dosen Imatinib durchgeführt. Z.B. konnte bei Patienten in der chronischen Phase, bei denen eine vorangegangene Interferon-Therapie versagte, mit einer Dosis von zweimal 400 mg/d eine komplette zytogenetische Ansprechrate von 89% erreicht werden (Cortes, Giles et al., 2003). Außerdem wurde hier eine komplette molekulare Remissionsrate (CMR) von 41% berichtet, was bei einer Gabe von einmal 400

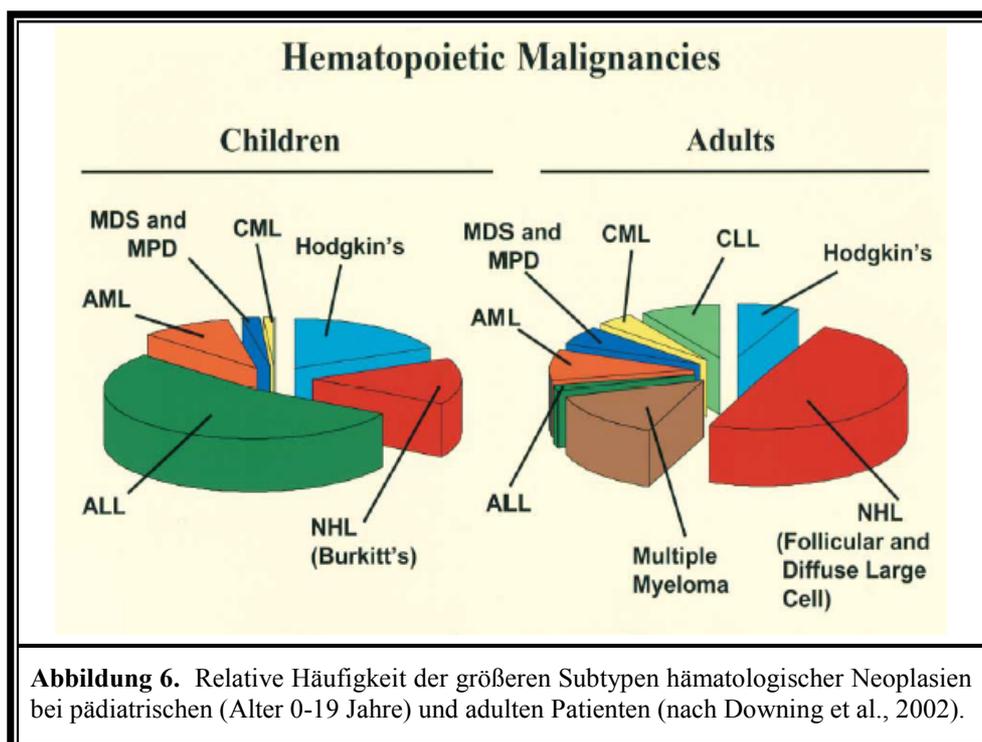
mg/d (Standarddosierung) nur sehr selten möglich ist. In einer weiteren Studie bei Patienten mit neu diagnostizierter CML lag nach täglicher Gabe von 800 mg Imatinib die komplette zytogenetische Remissionsrate bei 90% und die CMR bei 28% (Kantarjian et al., 2004).

Nicht kontrollierte Imatinib-Phase-II-Studien bei Patienten in der Akzelerationsphase bzw. der Blastenkrise erbrachten erwartungsgemäß deutlich schlechtere Ergebnisse, doch lag die Rate kompletter zytogenetischer Remissionen noch bei 24% (AP) bzw. 8,6% (BC) (Talpez et al., 2002; Druker, Sawyers et al., 2001).

### 1.5. Die Akute Lymphatische Leukämie (ALL)

Auch bei der ALL handelt es sich um eine maligne klonale Neoplasie der hämatopoetischen Zellen. Sie ist mit etwa 50% die häufigste hämatopoetische maligne Erkrankung bei Kindern (Abb. 6). Bei ca. 80% der akuten Leukämien im Kindesalter handelt es sich um eine ALL, während im Erwachsenenalter mit ebenfalls 80% die AML dominiert. Die jährliche Inzidenz zeigt eine bimodale Verteilung und liegt bei etwa 4-5 Fällen je 100000 Kinder im Alter von 2-4 Jahren. Diese Zahl nimmt mit zunehmendem Alter ab, zeigt aber einen zweiten, kleineren Peak bei Patienten mit mehr als 50 Jahren (Cortes et al., 1995).

Die ALL ist eine maligne, klonale Erkrankung des Knochenmarks. Frühe lymphatische Vorläuferzellen (Lymphoblasten) proliferieren, sind in ihrer Differenzierung behindert und ersetzen durch klonale Expansion normale hämatopoetische Zellen des KM. Die diffuse, autonome Proliferation eines malignen Klons führt so zur Ausschwemmung unreifer Blasten.



Die molekulare Analyse der häufigen genetischen Alterationen in leukämischen Zellen hat wesentlich zum Verständnis der Pathogenese und Prognose der ALL beigetragen. Die Häufigkeit der einzelnen genetischen Subtypen unterscheidet sich bei Kindern und Erwachsenen teilweise deutlich. Trotzdem sind die Mechanismen der ALL-Induktion vergleichbar (Pui et al., 2004). Es treten eine veränderte Expression von Protoonkogenen, chromosomale Translokationen sowie Hyperdiploidie auf, welche mehr als 50 Chromosomen umfassen kann.

Auch bei der ALL findet man die Bcr-Abl-Translokation. Im Kindesalter tritt diese genetische Alteration nur in etwa 3% der Fälle auf, während etwa 25% der Erwachsenen mit dieser Erkrankung das Philadelphia-Chromosom aufweisen. Interessanterweise wird dabei aber vorwiegend nicht das bei der CML dominierende Onkoprotein p210 Bcr-Abl exprimiert. 50% der adulten Patienten und 80% der Kinder mit einer Ph<sup>+</sup> akuten lymphatischen Leukämien weisen das Fusionsgen p190 Bcr Abl auf (Quackenbush et al., 2000).

Der therapeutische Erfolg in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie wurde seit den 60iger Jahren stetig verbessert. Das 5-Jahresüberleben im Kindesalter liegt inzwischen bei knapp 80%, bei Erwachsenen hingegen bei nur 40%. Versuche, diese Erfolgsrate mit Hilfe der hämatopoetischen Stammzelltransplantation weiter zu verbessern, hat zu einem verlängertem Überleben bei einigen, jedoch nicht allen Subtypen der ALL geführt (Arico et al., 2000; Pui et al., 2002). Man muss deshalb annehmen, dass aktuell die Intensivierung der bestehenden Behandlung eher zu einer Erhöhung der Therapie-assoziierten Mortalität sowie des Risikos von lebensbedrohlichen Spätfolgen (sekundäre Tumore) führt. Die Hoffnung auf eine Verbesserung der Therapie beruht somit vor allem auf einem besseren Verständnis der Pathogenese der ALL und der Basis der Resistenzentwicklung gegenüber aktuell eingesetzten Chemotherapeutika (Pui et al., 2004).

## **1.6. Resistenzen gegenüber Imatinib**

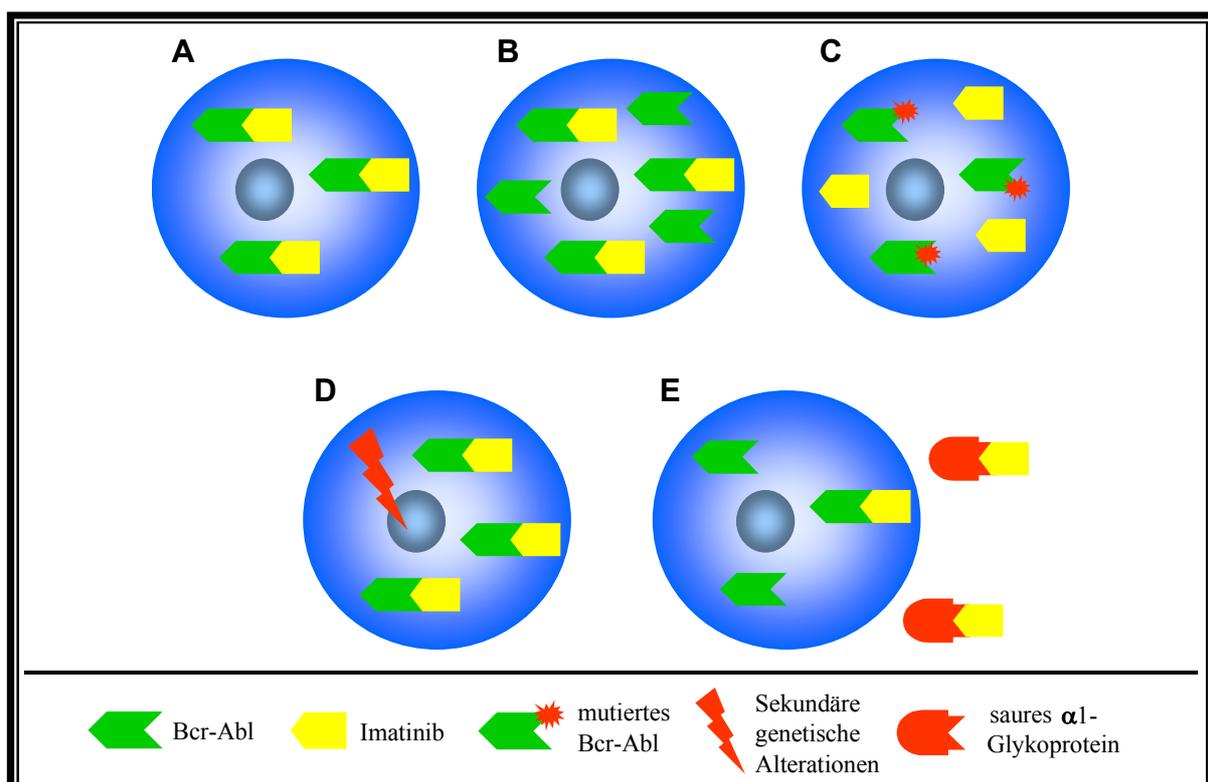
### **1.6.1. Mechanismen der Resistenzentwicklung**

Fast alle CML-Patienten in der chronischen Phase sprechen bei einer Therapie mit Imatinib über einen längeren Zeitraum an. Bei Patienten in der Blastenkrise oder mit Ph<sup>+</sup> ALL hingegen werden nur Remissionen von sehr kurzer Dauer erreicht.

Es kommt also zum Auftreten von Resistenzen, welche dem Zeitpunkt des Auftretens entsprechend in zwei Kategorien eingeteilt werden können. Unter primärer (intrinsischer) Resistenz versteht man die fehlende therapeutische Effizienz von Beginn der Imatinib-Therapie an. Sekundäre (erworbene) Resistenz beschreibt hingegen das Auftreten eines Wirkverlustes im Laufe der Therapie im Anschluss an ein initiales Ansprechen auf Imatinib.

Bezüglich klinischer Kriterien sowie Laborkriterien sollten weiterhin hämatologische, zytogenetische und molekulare Resistenzen unterschieden werden (Hochhaus et al., 2004). So kann z.B. von einer molekularen Resistenz gesprochen werden, sobald kein komplettes molekulares Ansprechen erreicht wird. Qualitativ versteht man darunter, dass mit Hilfe der PCR keine Bcr-Abl-RNA-Transkripte detektiert werden können. Unter einem molekularen Rezidiv bei Patienten mit initial komplettem Ansprechen versteht man schließlich einen Anstieg der Bcr-Abl-Transkripte um den Faktor  $\geq 1$  log.

Bei Patienten in der chronischen Phase zeigt Imatinib eine hohe Aktivität, weil der maligne Klon von Bcr-Abl abhängig ist. In fortgeschrittenen Stadien der CML bzw. bei der Ph<sup>+</sup> ALL führen aber die hohe Zahl proliferierender Tumorzellen sowie die genomische Instabilität möglicherweise zu einem besonders hohen Risiko bezüglich des Auftretens sekundärer genetischer Alterationen (Salloukh et al., 2000). So werden die Klone, welche eine genetische Alteration und somit eine Resistenz erworben haben, durch Imatinib selektioniert. In den letzten vier Jahren haben nun intensive Forschungsbemühungen mehrere Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib auf molekularer Ebene hervorgebracht (Abb. 7).



**Abbildung 7.** Imatinib-Resistenzmechanismen (nach von Bubnoff et al., 2003).

(A) ausreichende Mengen Imatinib stehen für die Inhibition aller Bcr-Abl-Moleküle zur Verfügung. (B) Überexpression von Bcr-Abl bei Anwesenheit von Imatinib. Somit bleibt ein gewisses Maß des onkogenen Signals erhalten, welches für das Überleben der malignen Zellen ausreicht. (C) Spezifische Mutationen der Abl-Kinasedomäne verhindern die Bindung von Imatinib, erlauben allerdings weiterhin die Bindung von ATP. Die Bcr-Abl-Kinase bleibt somit aktiv. (D) Sekundäre genetische Alterationen, welche einen Beitrag zum Bcr-Abl-unabhängigen Wachstum des malignen Klon leisten, können auf Grund genetischer Instabilität entstehen. (E) Erhöhte Level des sauren α1-Glykoproteins verringern die Menge an ungebundenem Imatinib, welches in geringerem Maß für die Inhibition von Bcr-Abl zur Verfügung steht.

Ist ein resistenter Klon von Bcr-Abl abhängig, muss das Onkoprotein weiterhin unter Anwesenheit von Imatinib aktiv sein. Dies kann durch eine Zunahme des Bcr-Abl-Proteins (Überexpression des RNA-Transkriptes), durch genomische Amplifikation oder durch Mutation von Sequenzen, welche für die Bindung von Imatinib entscheidend sind, geschehen. Nicht immer müssen diese sekundären Ereignisse Bcr-Abl direkt beeinflussen und können somit unabhängig dessen onkogenes Potential bestimmen. So können z.B. neben einer möglichen Hochregulation bestimmter Plasmaproteine, wie z.B. des sauren  $\alpha$ 1-Glykoproteins, vor allem sekundäre genetische Alterationen für die Aggressivität und Resistenz des malignen Klons verantwortlich gemacht werden.

Erste Untersuchungen der Resistenzmechanismen wurden *in vitro* durchgeführt. Dabei konnte zunächst beobachtet werden, dass mit Bcr-Abl transformierte Zelllinien nach längerer Kulturzeit mit suboptimalen Konzentrationen gegenüber Imatinib resistent wurden. Es zeigte sich bei resistenten Linien der LAMA84-, Ba/f3.p210- oder K562-Zellen eine Amplifikation des Bcr-Abl-Gens und eine Überexpression des Bcr-Abl-Proteins (Mahon et al., 2000; Weisberg et al., 2000). Imatinib-Resistenzen waren in diesen Zelllinien allerdings inkomplett und sowohl die Bcr-Abl-Überexpression als auch die Amplifikation des BCR-ABL Gens waren nach Beendigung der Imatinib-Behandlung reversibel. Die Entstehung und Selektion von mutanten BCR-ABL-Formen benötigt wahrscheinlich *in vivo*-Bedingungen und tritt deshalb möglicherweise *in vitro* nicht in einer Zelllinie auf, die nur einem einzigen leukämischen Klon entspricht (von Bubnoff et al., 2003).

Schon bald wurden die Resistenzmechanismen auch bei mit Imatinib behandelten Patienten untersucht, um einige Fragen *in vivo* zu klären (Gorre et al., 2001). Z.B. war bei resistenten CML-Patienten in der Blastenkrise oder bei Patienten mit Ph<sup>+</sup> ALL die Bcr-Abl-Kinase weiterhin aktiv, was dafür spricht, dass die maligne Erkrankung v.a. von Bcr-Abl abhängig ist (Gorre et al., 2001). *Ex vivo* zeigte sich bei den Zellen dieser Patienten eine verminderte Sensitivität gegenüber Imatinib. Daraus lässt sich ableiten, dass die Resistenz in diesen Fällen ein zellintrinsisches Phänomen darstellte. Bei drei von elf Patienten wurde schließlich eine BCR-ABL-Amplifikation gefunden, welche bei einem Patienten nach Beendigung der Therapie wieder verschwand. Neun Patienten wurden hinsichtlich des Auftretens von BCR-ABL-Punktmutationen gescreent. Interessanterweise konnte bei sechs Patienten ein Nukleotidaustausch von C zu T an der Position 1091 gefunden werden. So entsteht an dieser Stelle eine Veränderung der Aminosäuresequenz, welche für die Imatinib-Bindung entscheidend ist (T315I) (Schindler et al., 2000). Im Anschluss daran wurde eine große Zahl weiterer Punktmutationen des BCR-ABL-Gens bei einer ähnlichen Patientenpopulation beschrieben (Hochhaus et al., 2002; Roumiantsev et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach einer Transduktion hämatopoetischer Zelllinien mit unterschiedlichen mutanten BCR-ABL Formen tatsächlich Resistenzen gegenüber

Imatinib auftreten (von Bubnoff et al., 2002). Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die genomische Instabilität, welche sowohl auf zytogenetischer als auch auf der Ebene einzelner Nukleotide auftritt, als eine Ursache der Entstehung genomischer Amplifikation, einzelner Punktmutationen sowie weiterer sekundärer genetischer Alterationen betrachtet werden muss. All diese Veränderungen leisten ihren Beitrag zur klonalen Evolution der Leukämie, die bei 19/36 Imatinib-resistenten Patienten beobachtet werden konnte (Hochhaus et al., 2002). Es scheint nun auch offensichtlich, dass Mutationen die Hauptursache für die Entwicklung von Resistenzen bei Patienten mit Rezidiven darstellen, welche zuvor auf Imatinib hämatologisch ansprachen. Im Gegensatz dazu konnten diese Mutation bei Patienten, bei denen Imatinib keinen therapeutischen Erfolg zeigte, deutlich seltener nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass andere Mechanismen wie z.B. genomische bzw. transkriptionelle Amplifikationen oder sekundäre genetische Alterationen hier im Vordergrund stehen (Gorre et al., 2001; Hochhaus et al., 2002). Bei primär resistenten Patienten scheinen somit im Vergleich zu sekundär resistenten Patienten andere Mechanismen zu dominieren.

Diskutiert wird auch die Rolle des sauren  $\alpha$ 1-Glykoproteins (AGP) als Mechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib. Wie auch Albumin ist AGP in der Lage, Imatinib zu binden (Capdeville et al., 2002). Es ist vorstellbar, dass bei erhöhten AGP-Plasmakonzentrationen die intrazellulär zur Verfügung stehende Menge an Imatinib reduziert ist und es so zur Selektion eines partiell resistenten Klons und zur klonalen Evolution kommen kann (Gambacorti-Passerini et al., 2000). Insgesamt bleibt die Rolle des sauren  $\alpha$ 1-Glykoproteins aber weiterhin umstritten und der Beweis, dass es sich hierbei um einen relevanten Mechanismus der Resistenzentwicklung handelt, muss erst angetreten werden.

### 1.6.2. Mögliche Strategien zur Vermeidung von Resistenzen

Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Imatinib stellt eine neue therapeutische Herausforderung dar. Auf Grund der Tatsache, dass BCR-ABL bei vielen resistenten Patienten weiterhin aktiv ist, bleibt aber das chimäre Onkoprotein ein vielversprechendes Angriffsziel. Auch wenige Jahre nach Einführung der ersten Antibiotika konnten Resistenzen bei Bakterien beobachtet werden und es fand eine Selektion bakterieller Mutanten statt. Ein ähnliches Phänomen wurde nun nach kurzzeitiger Behandlung  $\text{Ph}^+$  Leukämien mit Imatinib aufgedeckt. Die daraus abzuleitenden Schlussfolgerungen sollten deshalb ähnlich sein.

Eine erste Möglichkeit, die Entwicklung von Resistenzen zu vermeiden, ist die optimale Dosierung von Imatinib zum Zeitpunkt der Diagnose, weil so die Zahl leukämischer Zellen maximal depletiert wird. Es konnte gezeigt werden (O'Brien et al., 2003; Kantarjian et al., 2002), dass eine frühzeitige Diagnose und Therapie die Chancen vermindern, dass die mit der CML einhergehende genetische Instabilität mit zur Entwicklung von Resistenzen beiträgt.

Auch eine Dosiserhöhung scheint nach neueren Studien einen positiven Effekt auf die

Ansprechraten resistenter CML-Patienten zu haben. So wurden z.B. bei 54 resistenten CML-Patienten in der CP im Falle einer hämatologischen Resistenz sekundäre komplette hämatologische Ansprechraten von 65% erreicht. Die Patienten wurden initial alle mit 300 oder 400 mg/d Imatinib bei einer Option auf eine Erhöhung der Dosis auf 600 bzw. 800 mg/d behandelt. Bei zytogenetisch resistenten Patienten kam es nach Erhöhung der Dosis in 56% der Fälle zur kompletten zytogenetischen Remission (Kantarjian, Talpaz et al., 2003). Gerade weil Mutationen der BCR-ABL-Kinasedomäne den häufigsten Mechanismus der Resistenzentwicklung darstellen und die verschiedenen mutanten Formen gegenüber Imatinib unterschiedlich sensitiv sind, ist ein Versuch einer Dosiserhöhung hier durchaus gerechtfertigt.

Eine dritte Strategie zur Vermeidung von Resistenzen ist die Unterbrechung bzw. das Absetzen der Imatinib-Behandlung (Müller et al., 2002). Der mutierte Klon wird auf Grund des Selektionsvorteils eines Wildtyp-Klons zurückgedrängt, was eventuell ein Wiederansprechen der Erkrankung auf Imatinib nach einem therapiefreien Intervall ermöglicht.

Ein vielversprechender Ansatz ist schließlich die Kombinationstherapie mit konventionellen antileukämischen Medikamenten. Zunächst wurden *in vitro* additive und synergistische Effekte einer Imatinib-Therapie in Kombination mit anderen antileukämischen Medikamenten gezeigt (Thiesing et al., 2000; La Rosée et al., 2002). Aktuell laufen einige Studien wie z.B. die IV. CML-Studie der deutschen CML Studiengruppe bzw. das „STI571 Prospective International Randomized Trial – SPIRIT“. Diese sollen direkt eine Imatinib-Monotherapie mit Imatinib plus Ara-C und Imatinib plus IFN als initiale Therapie bei Tausenden, randomisierten, neu diagnostizierten Ph<sup>+</sup> CML-Patienten vergleichen (Berger et al., 2004). Interessant ist auch der Ansatz einer sekundären Kombinationstherapie nach Versagen einer Imatinib-Monotherapie. Dabei wurden z.B. erst vor kurzem neue Ergebnisse der Kombination einer Imatinib-Behandlung und einer Vakzinierung mit einem Bcr-Abl-Fusionspeptid zur Stimulation T-Zell-medierter Immunantworten veröffentlicht (Cathcart et al., 2004; Bocchia et al., 2005). Vielversprechend scheint auch der Ansatz einer Kombination von Imatinib mit einem Farnesyltransferaseinhibitor (FTI), welcher Downstream-Moleküle von Bcr-Abl blockiert. Der FTI SCH66336 inhibiert *in vitro* nicht nur die Proliferation Imatinib-resistenter Zellen oder die Kolonienbildung von mononukleären Zellen Imatinib-resistenter Patienten mit einer BCR-ABL-Amplifikation, sondern resultiert in Kombination mit Imatinib auch in einer gesteigerten Apoptoserate bei Imatinib-sensitiven Zellen (Hoover et al., 2002).

So werden nun verschiedene Kombinationstherapien wie auch neue Kinaseinhibitoren der zweiten Generation, wie z.B. BMS-354825, ein vielversprechender ABL-Kinaseinhibitor mit weniger stringenten Anforderungen an die dreidimensionale Struktur, in naher Zukunft in klinischen Studien untersucht (Shah et al., 2004). Man erhofft sich dadurch eine Verbesserung der Effizienz bestehender Therapieoptionen sowie die Vermeidung der Entwicklung von Resistenzen durch eine frühzeitige Eradikation Ph<sup>+</sup>-Zellen.

## 2. Material

### 2.1. Standardgeräte

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
Automativ Speed Vac AES 100	Savant Instruments Inc., NY, USA
Caesium 137 - Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler GmbH, Braunschweig
CO <sub>2</sub> -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen
Durchflußzytometer (FACScan-Gerät)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Entwickler Hyperprocessor	Amersham Biosciences, Braunschweig
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co GmbH, Hamburg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Megafuge 1,0R	Heraeus Instruments, Darmstadt
Multi Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
PH-Meter	Beckman, Fullerton, USA
Photosystem Eagleye™	Stratagene, Heidelberg
Rotations-Inkubator	GFL, Burgwedel
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank (Hera safe)	Heraeus, Darmstadt
Stratalinker® UV-Crosslinker	Stratagene, Heidelberg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zell-Sorter (MoFlo cytometer)	Cytomation, CO, USA

### 2.2. Arbeitsmaterialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Braunschweig

Monoject <sup>®</sup> - Spritzen	Sherwood-Davis & Geck, Adliswil, Schweiz
Monoject <sup>®</sup> - Stumpfe Kanüle	Sherwood-Davis & Geck, Adliswil, Schweiz
Kulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	TPP, Trasadingen, Schweiz
Rundbodenröhrchen (5 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Spritzenfilter (Ø 0,22 µm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spritzenfilter (Ø 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
3 M-Filterpapier	Whatman, Nidderau
Nylon-Membran (GeneScreenPlus <sup>®</sup> )	MEN <sup>TM</sup> Life Science Products, Boston, USA
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning, New York, USA
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten-Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht
BioMax MS Film	Kodak, Rochester, New York
Sephadex-G50-Säulen	Amersham Biosciences, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmal-Skalpelle	Feather, Köln
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
Vacucap <sup>®</sup> 90 Filter Unit (0,2 µm, steril)	Gelman Sciences, Roßdorf
Zellkulturschalen (60 mm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (35 mm <sup>2</sup> )	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Testplatten (Mikrotiterplatten)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe (40 µm, 70 µm, 100 µm)	Becton-Dickinson, Heidelberg

### 2.3. Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/bis-Acrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Fluka Chemie, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad iniectabilia, steril	DeltaSelect GmbH, Pfullingen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe

---

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Chloroquin (2000x)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DTT	Promega, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 µg/µl)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
5-Fluoruracil (Ribofluor)	Ribosepharm GmbH, München
Glucose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Fluka Chemie, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
m-IL 3 (Interleukin 3)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
h-IL 6 (Interleukin 6)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Imatinib (STI571, Glivec®)	Novartis, Basel, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Lipofectamine <sup>TM</sup> 2000 (1 mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (100 mM)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Na-Acetat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka Chemie, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Opti-Mem I (Serum-reduziertes Medium)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS, 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polybren (4 µg/µl)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salmon-Sperm-DNA	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt

m-SCF (Stammzellfaktor)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
SDS	Fluka Chemie, Deisenhofen
SuperSignal <sup>®</sup> Chemoluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Fluka Chemie, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka Chemie, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka Chemie, Deisenhofen

#### 2.4. Radiochemikalie

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP (10 mCi/ml)	Amersham Biosciences, Braunschweig
--	------------------------------------

#### 2.5. Enzyme und Antikörper

##### Enzyme:

Alkalische Phosphatase (CIAP), 20-30 U/ $\mu$ l	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Pronase E	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme:	
Eco RI, 100 U/ $\mu$ l	New England Biolabs, Schwalbach
Bam HI, 10 U/ $\mu$ l	Roche, Mannheim
Bgl II, 10 U/ $\mu$ l	Roche, Mannheim
Xho I, 10 U/ $\mu$ l	Roche, Mannheim
Nco I, 10 U/ $\mu$ l	New England Biolabs, Schwalbach
Sal I, 10 U/ $\mu$ l	Boehringer, Mannheim

##### Antikörper:

Anti Abl, 8E9, monoklonal, Maus IgG	Pharmingen, San Diego, USA
Anti Phospho-Tyrosin, 4G10, monoklonal, Maus IgG	Upstate Biotechnology, NY, USA
Anti Stat5 A/B, polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Anti Phospho-Stat5 A/B, monoklonal, Maus IgG	Tom Wheeler (Hamilton, New Zealand)
Anti Maus IgG, HRP konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti Kaninchen IgG, HRP konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig

Die zur Markierung der Zellen für die FACScan-Analyse und den FACSort verwendeten monoklonalen Antikörper waren PE- (c-kit (CD117), Thy1.2 (CD90), B220, CD11b, GR 1, Ter-119) bzw. FITC-markiert (Sca1 (Ly-6A/E)) und wurden von der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen.

## 2.6. Vektoren und DNA-Konstrukt

### Vektoren:

Name	Resistenzen	Firma
MSCV MigR1	Ampicillin	Pearl WS / Miller JP, Philadelphia, USA
pcDNA 3.1 / Zeo	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Leek, Niederlande

### DNA Konstrukt:

Bcr-Abl (p185) in pcDNA 3.1 / Zeo	Dr. J. Y. J. Wang, UC San Diego, USA
-----------------------------------	--------------------------------------

## 2.7. Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

### Bakterienstämme:

Escherichia Coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
---	----------------------------

### Eukaryontische Zelllinien:

NIH3T3	murine Fibroblasten-Zelllinie
Phoenix E (abgeleitet von 293T-Zellen)	humane, embryonale Nierenkarzinomzelllinie, Verpackungszelllinie für die Produktion von Retroviren (Garry Nolan, Stanford, USA)

## 2.8. Zellkulturlösungen und MZ-Medium für Colony Assay

### MZ-Medium für Colony Assay:

MethoCult <sup>TM</sup> GF M3434	StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
[Komp.: MZ in Iscove's MDM, FBS, BSA, Pankreatisches Rinder-Insulin, Humanes Transferrin, 2-Mercaptoethanol, L-Glutamin, rm IL-3, rh IL-6, rm SCF, rh Erythropoietin]	

### Zellkulturlösungen:

DMEM, Zellmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS	Serva Feinbiochemika, Heidelberg

IMDM (Iscove's Mod. Dulbecco's Medium)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640, Zellmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.9. Mäuse und tierexperimentelle Materialien

### Mäuse:

Balb/C-Mäuse	Harlan, Indianapolis, USA
--------------	---------------------------

### Tierexperimentelle Materialien:

Animal Bedding – Fibre	Altromin GmbH u. Co. KG, Lage-Lippe
Global Rodent Breeding (bestrahlt, 25 kGy)	Harlan Teklad, Blackthorn, England
Infrarotlampe	Royal Philips Electronics, Hamburg
Injektionskanüle (Microlance™, steril)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Käfigsystem	Thoren, PA, USA
Kapillaren (20 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger (ISO Norm 8037/I)	Roth, Karlsruhe
S-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (1 ml, mit Nadel)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Spritzen (5 ml, ohne Nadel)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Venenverweilkanülen (1 ml)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Vet abc Blood Counter	Scil, Viernheim
Zellkulturschalen (10 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

## 2.10. Molekulargewichtsmarker für Proteine und Nukleinsäuren

1 kbp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

## 2.11. Verwendete molekularbiologische Kitsysteme, Standard-Lösungen und Puffer

### Molekularbiologische Kitsysteme:

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
Rediprime® DNA Labeling Kit	Amersham Biosciences, Braunschweig

Standard-Lösungen und Puffer:

ACK-Reagenz	150 mM NH <sub>4</sub> Cl 1 mM KHCO <sub>3</sub> 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 7,3
Amidoschwarz-Entfärbelösung	Essigsäure 10% Methanol 10%
BBMM (basal bone marrow medium)	325 ml IMDM; 150 ml FCS 25 ml BSA; 5 ml L-Glutamin 500 µl 2-Mercaptoethanol 2,5 ml Penicillin/Streptomycin
Blocking-Puffer	PBS mit 0,1% Tween 5% BSA oder 10% Trockenmilchpulver
DNA-Probenpuffer (10-fach)	50% (M/V) Glycerin 0,05% (M/V) Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer	PBS; 1% BSA
HBS (2-fach)	50 mM HEPES 12 mM Glucose 280 mM NaCl; 10 mM KCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Hybridisierlösung	50 g Natrium-Dextransulfat 50 ml 10% SDS 10 mg/ml Salmon-Sperm-DNA 29 g NaCl in 423 ml A.d.
Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig)	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl in A.d., pH 7.0
Luria-Bertani (LB) Medium (fest)	1,5% Bactoagar in LB-Medium (flüssig)
Lysis-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 130 mM NaCl, 5 mM EDTA 0,5% Triton X-100 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7 1 mM Natriumorthovanadate 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 mM PMSF, 1x Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d.

PBS-Tween-Puffer	PBS; 0,1% Tween
Prästimulationsmedium	BBMM 10 ng/ml m-IL 3; 12 ng/ml h-IL 6 50 ng/ml m-SCF
Pronase E-Ansatz	10 mg/ml Pronase E in A.d. 10 mM Tris 10 mM NaCl
Proteinase K-Ansatz	10 mg/ml Proteinase K in A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach)	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Gelelektrophoresepuffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,25 mM Glycin 0,5% (M/V) SDS
SDS-Probenpuffer (2-fach)	200 mM DTT; 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 3 M NaCl; 20% Glycin 1 M Tris/HCl, pH 6,8
20 x SSC (Standard Saline Citrat)	0,3 M Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen 0,4 M Tris
TAE-Puffer (10-fach)	1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA
TNE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Transferpuffer	25 mM Tris/HCl 0,25 mM Glycin; 0,05% SDS 20% (V/V) Methanol
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach)	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS

### 2.12. EDV

GraphPadPrism	Graph Pad Software, Boston, USA
Procite 5.0	ISI ResearchSoft, Berkeley, USA
WinMDI 2.8	Joseph Trotter, TSRI Flow Cytometry, USA

### 3. Methoden

#### 3.1. Arbeiten mit Nukleinsäuren

##### 3.1.1. Restriktionsverdau von Plasmiden (dsDNA)

Spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA (z.B. Plasmiden) können durch Restriktionsendonukleasen erkannt und geschnitten werden (Sambrook et al., 1989). Dabei entstehen je nach Enzym entweder komplementäre, überhängende Enden (sticky ends) oder stumpfe Enden (blunt ends). Um die DNA in definierte Fragmente zu zerlegen bzw. die Plasmid-DNA an einer bestimmten Stelle zu öffnen, wird sie mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den zugehörigen Restriktionspuffern inkubiert.

<b>Restriktionsansatz: (meist 37°C, 1-4 h)</b>	x µg	DNA
	3x U	Restriktionsendonuklease
	2 µl	entsprechender Puffer
	y µl	H <sub>2</sub> O
	-----	
Gesamt: 20 µl		

Die Inkubation erfolgt je nach Enzym (Angaben des Herstellers) zwischen 1 – 4 h meist bei 37°C. Anschließend wird die enzymatische Reaktion durch Denaturierung des Enzyms beendet, indem der Reaktionsansatz für 10 min. bei 65°C erhitzt wird. Nun kann die Auftrennung und Analyse der „verdauten“ DNA im Agarosegel erfolgen.

##### 3.1.2. 5'-Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Wird beim Restriktionsverdau der Plasmid-DNA nur ein einziges Restriktionsenzym eingesetzt, so liegen immer, auch nach Auftrennung im Agarosegel, linearisierte Vektoren mit identischen Restriktionserkennungssequenzen am 5'- und am 3'-Ende vor, welche von Ligasen bevorzugt ligiert werden. Die Dephosphorylierung verhindert eine Religation des Klonierungsvektors, erhöht damit die Insertionsrate von Fremd-DNA und verbessert so den Ligationserfolg (Sambrook et al., 1989).

Mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (CIAP, Invitrogen) können freie 5'-Phosphatgruppen der DNA hydrolytisch abgespalten werden. Die Dephosphorylierung kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden, indem nach Angaben des Herstellers der Ansatz mit 10-fach Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2 – 5 U Phosphatase versetzt

wird. Das Enzym kann anschließend durch Inkubation bei 65°C für 10 min. inaktiviert werden.

### 3.1.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

*TAE-Puffer (10-fach): 0,4 M Tris; 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA*

*DNA-Probenpuffer (Ladepuffer): 50% (M/V) Glycerin; 0,05% (M/V) Bromphenolblau; 0,5 M EDTA*

Die Standardmethode zum Auftrennen und Aufreinigen von DNA-Fragmenten zwischen 100 und 20 000 bp Größe ist die Agarosegelelektrophorese. Die Auftrennung beruht dabei auf der Wanderungseigenschaft der auf Grund zahlreicher Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Moleküle in einem Feld konstanter, elektrischer Spannung. Die DNA-Fragmente wandern somit zur Anode, wobei die Geschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung, aber umgekehrt proportional dem log<sub>10</sub> des Molekulargewichts ist (Sambrook et al., 1989).

Agarosegele werden dabei aus TAE-Puffer und Agarose, einem aus Algen gewonnenen neutralen Polysaccharid, hergestellt. Die Agarosematrix bewirkt, dass kleinere Fragmente leichter und schneller wandern als größere. Abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente verwendet man dabei unterschiedlich konzentrierte Agarosegele (0,8 – 3 % (M/V) Agarose).

Agarose Gel (M/V)	DNA-Trennbereich
< 1,0 %	500 - 20 000 bp
1,0 - 2,0 %	200 - 5 000 bp
> 2,0 %	100 - 2 000 bp

Für die Herstellung des Gels wird die Agarose mit TAE-Puffer solange aufgeköcht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlung wird die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Der Farbstoff Ethidiumbromid, der sich in die Doppelhelix der DNA einlagert (Interkalation), ermöglicht die Visualisierung der DNA durch Fluoreszenz nach UV-Bestrahlung ( $\lambda \sim 300$  nm), wobei nach längerer Illumination auch Veränderungen der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen ausgelöst werden können.

Nach vollständiger Polymerisation des Gels (ca. 1 h) kann die Auftrennung der DNA-Proben, die mit DNA-Probenpuffer versetzt aufgetragen werden, in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer durch Anlegen einer Spannung von 20 – 120 V durchgeführt werden. Die Abschätzung der Fragmentlänge und damit die Analyse des Gels kann dabei durch Auftragung von DNA-Molekulargewichtsmarkern ermöglicht werden.

### 3.1.4. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA durch die Agarosegelelektrophorese können die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Einmalskalpell unter UV-Beleuchtung aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Dabei wird eine UV-Quelle mit niedriger Bestrahlungsstärke verwendet, um DNA-Schäden zu vermeiden. Anschließend erfolgt die Extraktion der DNA aus der Agarose unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen laut Herstellerangaben. Im letzten Schritt erfolgt die Elution vom Säulenmaterial mit 20 µl EB-Puffer. Anschließend kann die DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.1.5. Ligation von DNA

Die Herstellung eines rekombinanten Vektors erfolgt durch Verknüpfung einer linearisierten Vektor-DNA mit dem zu klonierenden DNA-Fragment (Insert) (Sambrook et al., 1989). Katalysiert wird diese ATP-abhängige Reaktion durch die T4-DNA-Ligase, welche 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphat-Enden verknüpft. Das molare Verhältnis von Vektor-DNA und dem zu klonierenden Insert sollte dabei idealerweise bei 1 : 3 liegen, wobei man die Mengen der DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese abschätzen kann.

<b>Ligationsansatz: (RT, 5 - 20 min)</b>	x µg	Vektor-DNA
	3x µg	DNA-Fragment (Insert)
	2 µl	Puffer 2
	10 µl	Puffer 1
	1 µl	T4-DNA-Ligase
-----		
	Gesamt: 20 µl	

Für die Ligation wurde ein „Rapid DNA Ligation Kit“ der Firma Roche verwendet und dabei nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Fragment mit gleicher Menge an linearisierter Vektor-DNA. Unmittelbar nach der Ligation können kompetente Bakterien transformiert (Kap. 3.2.3.) oder der Ligationsansatz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.1.6. Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi-Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus kultivierten transformierten E. coli Bakterien erfolgt unter Verwendung kommerziell vertriebener Kits der Firma Qiagen. Je nach Fragestellung

und geplantem Experiment kann DNA in unterschiedlichen Mengen isoliert werden. Bei rein analytischen Fragestellungen, wie z.B. der Analyse neu klonierter Vektoren, werden nur kleine DNA-Mengen mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ isoliert. Größere Mengen, wie sie z.B. für die Transfektion von Zellen benötigt werden, reinigt man dagegen mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ auf.

Aus einer Bakterienkultur (Kap. 3.2.4.) in 5 ml LB-Medium, die 12 – 18 h schüttelnd bei 37°C inkubiert wurde, können durch „Mini-Präparation“ bis zu 20 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Mit der Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 13000 rpm als ersten Schritt wird die Präparation nach Herstellerangaben durchgeführt und abschließend die Plasmid-DNA mit Elutionspuffer oder H<sub>2</sub>O eluiert.

Bis zu 500 µg Plasmid-DNA kann man gewinnen, wenn man den Bakterienklon nach Vorkultur (1 – 4 h) in eine größere Kultur (200 ml) überimpft. Hier kann nach 12 – 18 h die Suspension zunächst bei 6000 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert und das Pellet nach Herstellerangaben (Maxi-Präparation) aufgearbeitet werden. Nach Elution, Präzipitation, Zentrifugation und Resuspension kann die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt werden (Kap. 3.1.7.).

### 3.1.7. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen kann photometrisch durch Messung der Extinktion (E) bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten erfolgen (Sambrook et al., 1989). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in wässriger Lösung liegt bei 260 nm, während das von Proteinen bei 280 nm liegt. So können durch zweimalige Absorptionsmessung Rückschlüsse sowohl bezüglich der Konzentration als auch der Reinheit der Nukleinsäurelösungen gezogen werden. Bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter und einer Wellenlänge von 260 nm ist die Extinktion gleich eins, wenn dsDNA eine Konzentration von 50 µg/ml und einzelsträngige RNA eine Konzentration von 40 µg/ml aufweist.

Als Reinheitskriterium diene der Quotient  $\Delta E_{260} : \Delta E_{280}$ . Je größer dabei der Quotient aus spezifischem Signal ( $\Delta E_{260}$ ) zu unspezifischem Signal ( $\Delta E_{280}$ ) ist, desto reiner und damit qualitativ hochwertiger ist die Nukleinsäureprobe. Bei einem Wert zwischen 1,7 und 2,0 kann man von einer reinen Nukleinsäure-Präparation sprechen. Ein Quotient kleiner als 1,7 deutet auf einen erhöhten Proteingehalt hin, während Werte  $\geq 2,0$  auf Verunreinigungen (z.B. Pufferlösungen) schließen lassen

### 3.1.8. Extraktion genomischer DNA aus murinen Zellen

*TNE-Puffer: 10 mM Tris pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA*

*Pronase E-Ansatz: 10 mg/ml Pronase E in 10 mM Tris und 10 mM NaCl (1 h bei 37°C Selbstverdau)*

*Proteinase K-Ansatz: 10 mg/ml in A.d.*

*Verdauungsansatz: 1 ml TNE-Puffer; 10 µl Proteinase K-Ansatz; 25 µl Pronase E-Ansatz; 100 µl SDS 10%*

Eine einfache und effiziente Methode für die Extraktion genomischer DNA und damit die Lyse von Zellen ist der enzymatische Verdau mit Proteinase K. Etwa  $10 - 20 \times 10^6$  Zellen, die in 20 – 50 µl PBS gut resuspendiert werden, können durch Zugabe von 500 µl Verdauungsansatz aufgespalten und proteolytisch abgebaut werden. Dieser Ansatz wird zunächst 2 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 56°C schüttelnd inkubiert, wobei Proteinase K ihr Aktivitätsoptimum zwischen 55 und 65°C aufweist. Weil Proteinase K außerdem 0,5 – 1,0 % SDS benötigt, um optimale Aktivität zu zeigen, wird dem Ansatz auch SDS beigemischt. Außerdem soll erwähnt werden, dass, obwohl EDTA auf Grund von Komplexbildung in der Lage ist, Enzyme zu hemmen, der TNE-Puffer auch 1 mM EDTA enthält, weil gerade Proteinase K durch EDTA nicht beeinträchtigt wird.

Am nächsten Tag erfolgt schließlich die Extraktion der Proteine aus der Nukleinsäurepräparation mit Phenol. Phenol ist ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner, kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten eingehen und dissoziiert so Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten. Bei dieser Standardmethode wird die Lösung mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) gemischt und anschließend etwa 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wird daraufhin abgenommen und weiterverarbeitet, indem die gereinigte DNA-Lösung mit Ethanol präzipitiert wird.

Zunächst wird dafür die Konzentration der Kationen in der DNA-Lösung durch Zugabe von 10% (V/V) 3 M Na-Acetat (pH 5,2) auf 0,3 M eingestellt, wodurch selektiv die Löslichkeit der DNA verändert und damit die Effizienz der Fällung erhöht wird. Anschließend erfolgt die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 2 Volumina -20°C kaltem Ethanol (100%) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wird die Probe etwa 10 min. bei 13000 rpm pelletiert, mit eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen und nochmals 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer resuspendiert.

### 3.1.9. Verdau genomischer DNA und gelelektrophoretische Auftrennung

Die extrahierte, genomische DNA hohen Molekulargewichts kann nun mit Restriktionsenzymen verdaut werden. In dieser Arbeit wurde dazu das Enzym Eco RI in hochkonzentrierter Form (100 U/µl) eingesetzt. Je Ansatz sollte, will man die DNA durch Southern-Hybridisierung analysieren, etwa 10 – 50 µg DNA mit 5 U Enzym pro µg DNA geschnitten werden. Man sollte dabei immer auf gute, aber vorsichtige Durchmischung der DNA-Restriktionslösung achten, weil bei genomischer DNA hohen Molekulargewichts leicht

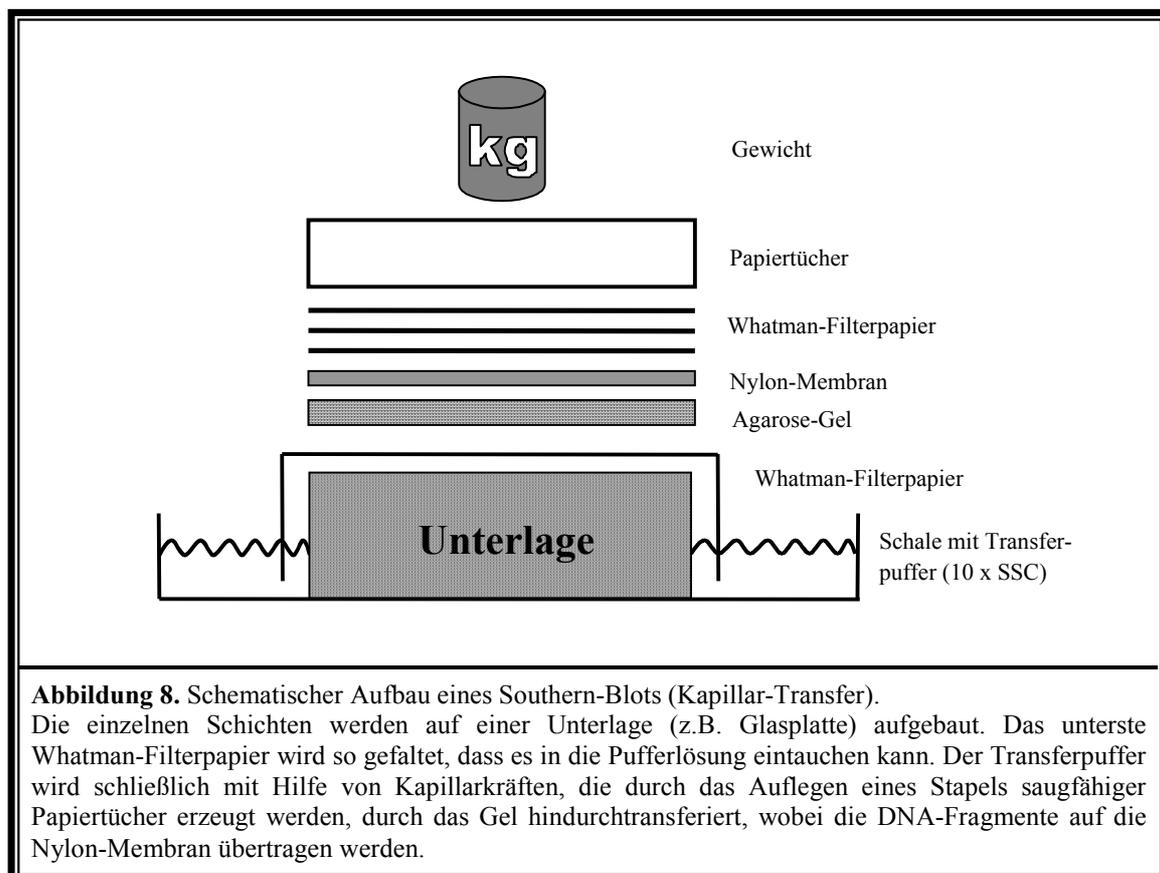
Klumpen und damit auch lokale Konzentrationsunterschiede im Ansatz entstehen können. Das Enzym Eco RI wurde in diesem Fall gewählt, weil es genau einmal das verwendete Plasmid MigR1 zwischen den Sequenzen 5'-LTR und 3'-LTR in der MCS schneidet (Abb. 18). Weiterhin weist genomische DNA zufällig verteilte Schnittstellen für Eco RI auf. Daher entstehen nach dem Restriktionsverdau genomischer DNA Fragmente, die Teile der proviralen Sequenz und, je nach Integrationsort des Provirus, unterschiedlich lange Bereiche genomischer DNA-Sequenzen enthalten.

Nach dem Restriktionsverdau kann schließlich die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente (Kap. 3.1.3.) erfolgen. Man verwendet dabei für die Separation von Fragmenten genomischer DNA ein 0,8%-iges Agarosegel.

### 3.1.10. Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylon-Membran (Southern-Blot)

*Transferpuffer (10 x SSC): 1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat/HCl pH 7,0*

Der DNA-Transfer erfolgte nach einer von E. Southern entwickelten Methode (Southern, 1975). Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wird das Gel



zunächst genau zugeschnitten und daraufhin bei RT 15 min. in einer 0,25 M HCl-Lösung, anschließend 30 min. in einer 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH-Lösung (Denaturierung) und

schließlich 15 min. in 1,5 M NaCl / 0,25 M NaOH inkubiert. Zuletzt muss das Gel in einer Lösung mit 1 M Tris (pH 7,4) und 1,5 M NaCl bei RT neutralisiert werden. Während dieser Inkubationszeit wird die Vorrichtung für den Kapillar-Transfer vorbereitet. Dabei wird eine Schale mit Transferpuffer gefüllt und alle weiteren Materialien werden sobald verfügbar, wie in Abb. 8 dargestellt, aufgebaut.

Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente dauert nun der Transfer etwa 8 – 20 h. Nach erfolgreichem Blotting inkubiert man die Nylon-Membran noch 10 min. bei RT in 6 x SSC, um Agarose-Verunreinigungen zu entfernen. Abschließend lässt man die Membran 30 min. bei RT trocknen und fixiert die DNA durch UV-Bestrahlung ( $\lambda \sim 254$  nm).

### 3.1.11. Herstellung einer DNA-Sonde und Markierung mit dem Rediprime<sup>®</sup> System

Der Nachweis bzw. die Darstellung bestimmter DNA-Fragmente kann nun durch DNA-Hybridisierung erfolgen. In dieser Arbeit wurde dafür eine EGFP-DNA-Sonde mit einer Länge von 801 bp hergestellt, indem durch Restriktionsverdau (Kap. 3.1.1.) mit den Enzymen Nco I und Sal I (Abb. 18) die EGFP-Sequenz aus dem Vektor MigR1 herausgeschnitten wurde. Nach der Gelelektrophorese und der DNA-Extraktion (Kap. 3.1.4.) kann nun die doppelsträngige DNA der EGFP-Sonde mit <sup>32</sup>P markiert werden. Dazu wurde das „Rediprime<sup>®</sup> DNA Labeling Kit“ der Firma Amersham Biosciences verwendet. Die Markierung erfolgte nach dem Protokoll der Firma und damit einer von Feinberg und Vogelstein 1983 entwickelten Methode durch „Random-Priming“ mit Hexanukleotiden (Feinberg et al, 1983). Anschließend wurden die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide über eine Sephadex-G50-Säule gelelektrophoretisch abgetrennt.

### 3.1.12. Hybridisierung mit radioaktiv (<sup>32</sup>P) markierten Sonden und Autoradiographie

*Hybridisierlösung: 50 g Natrium-Dextransulfat; 50 ml 10% SDS; 10 mg/ml Salmon-Sperm-DNA; 29 g NaCl in 423 ml A.d.  
1 x SSC-Puffer: 150 mM NaCl; 1,5 mM Natriumcitrat/HCl pH 7,0*

Zur Hybridisierung, d.h. der Bindung der Sonde an die zu analysierenden DNA-Fragmente, wird die Nylon-Membran mit Hybridisierlösung 1 h vorinkubiert. Anschließend wird die radioaktiv markierte EGFP-Sonde (Kap. 3.1.11.) durch Erhitzen auf 100°C für 5 min. denaturiert und schließlich in einer Konzentration von 2 nM hinzugegeben und über Nacht bei 55°C im Rotationsinkubator hybridisiert. Nach Entfernung der radioaktiven Lösung wird die Membran zunächst zweimal in 2 x SSC-Puffer / 1.0% SDS bei RT für 5 min., dann zweimal in 1 x SSC-Puffer / 1.0% SDS bei 55°C für 15 min. und schließlich einmal bei RT für 5 min. in 1 x SSC-Puffer gewaschen. Letztendlich wickelt man die radioaktive Nylon-Membran in Saran-Folie und entwickelt das Ergebnis durch Autoradiographie, wobei BioMax MS Röntgenfilme der Firma Kodak verwendet wurden. Alternativ kann man die Membran auch

auf einem PhosphorImager exponieren.

## 3.2. Arbeiten mit Bakterienstämmen

### 3.2.1. Kulturbedingungen für Bakterien

*LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert, pH 7.0*

*LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert*

Bakterien werden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft oder auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin, 100 µg/ml) ausgestrichen und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Herstellung der Agarplatten wird autoklaviertes LB-Medium mit 1,5% Bactoagar versetzt, autoklaviert und nach Abkühlung mit Selektionsantibiotikum gemischt. Anschließend werden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen (~ 20 ml pro Platte).

### 3.2.2. Kompetente Bakterien

Die meisten Bakterienarten, darunter Escherichia Coli, nehmen (Plasmid-)DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um diese Bakterienstämme wirksam zu transformieren, muss man die Zellen einer chemischen und physikalischen Behandlung unterziehen, welche ihre Bereitschaft erhöht, DNA aufzunehmen. Gewöhnlicherweise werden hierfür Lösungen von 50 mM Cäsiumchlorid oder andere Salze, die z.B. zweiwertige Calciumionen enthalten, verwendet. Bakterien, welche derart behandelt wurden, werden als chemokompetent bezeichnet. Der Mechanismus für diese gesteigerte Bereitschaft zur Aufnahme von Fremd-DNA ist aber bis heute nicht genau bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits kompetente Bakterienstämme der Firma Invitrogen (Gibco/BRL) verwendet.

### 3.2.3. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Bei dieser Art von Transformation wird die (Plasmid-)DNA durch kurzzeitige Hitzeschockbehandlung in kompetente Bakterienzellen eingebracht.

Dabei werden 50 µl eines kompetenten Bakterienstammes (Escherichia Coli DH5α), der sehr empfindlich gegenüber mechanischer Beanspruchung und Wärme ist, auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz (Kap. 3.1.5.) oder mit 1µl Plasmid-DNA gemischt und für 20-30 min. auf Eis inkubiert. Man nimmt an, dass sich in dieser Zeit ein Ionen-DNA-Präzipitat auf den Bakterien bildet. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 37°C für 42 Sekunden, wobei in dieser Zeit die DNA aufgenommen werden soll. Danach wird die Bakterienkultur für 2 min. auf Eis inkubiert, bevor jeweils etwa 900 µl LB-Medium zugesetzt werden. Dieser Ansatz wird schließlich 1 h schüttelnd (225 rpm) bei 37°C inkubiert. Nach dieser

Inkubationsphase werden die Bakterien bei 3000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Man resuspendiert das Pellet in der Restflüssigkeit, streicht diese auf LB-Agarplatten (mit 100 µl/ml Ampicillin) aus und bebrütet die Platten für 12 – 16 h bei 37°C. Idealerweise erhält man so eine Vielzahl nicht-konfluierender Einzelkolonien, d.h. Bakterienklone, die das DNA-Plasmid, welches z.B. das Resistenzgen  $\beta$ -Lactamase codiert (MigR1), aufgenommen haben und die auf dem Plasmid liegenden Gene exprimieren. Entscheidend für das Wachstum der Bakterien, die normalerweise sensitiv gegenüber Ampicillin sind, auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ist dabei allein die Expression der  $\beta$ -Lactamase, die für die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Antibiotika wie Ampicillin verantwortlich ist.

#### 3.2.4. Kultivierung der transformierten Bakterien

Zur Anreicherung der durch die Transformation entstandenen Einzelkolonien werden diese in LB-Medium kultiviert. Dafür wird zunächst ein Bakterienklon von einer Agarplatte in 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) mittels einer Impföse überimpft und bei 37°C unter guter Belüftung (Schüttler, 225 rpm) bebrütet. Aus dieser Vorkultur, die normalerweise am nächsten Morgen eine kräftige Trübung erkennen lassen sollte, kann man nun auch größere Kulturen animpfen oder direkt die Plasmid-DNA, wie in Kap. 3.1.6. beschrieben, isolieren.

### 3.3. Arbeiten mit eukaryonten Zelllinien

#### 3.3.1. Kultivierung von Zelllinien

*DMEM-Kulturmedium: DMEM; 2 mM Glutamin; 1% antibiotische Lösung; 10% FCS*

Adhärente Zellen (Phoenix E, NIH3T3) werden in DMEM-Kulturmedium im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Kulturmedium wurde bei 4°C gelagert und zur Zellkultur in einem Schüttelwasserbad auf 37°C erwärmt.

Haben die Zellen eine gewisse Dichte erreicht, kann man sie mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco, Eggenstein) durch enzymatischen Abbau vom Boden der Zellkulturflaschen ablösen. Dazu saugt man zunächst das Kulturmedium ab, wäscht die Zellen mit warmem, sterilem PBS und versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen der Trypsin-Lösung. Nach einer 1–3 minütigen Inkubationszeit bei 37°C lösen sich die Zellen ab. Es muss darauf geachtet werden, die Inkubationszeit nicht zu überschreiten, da sonst die Zellmembran angedaut wird, was sich in fehlender Adhärenz und Absterben der Zellen widerspiegeln kann. Daraufhin werden die Zellen mit Medium abgespült und ca. 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach der anschließenden Resuspension in frischem Kulturmedium kann man die Zellen nun „splitten“, d.h. auf mehrere Zellkulturflaschen verteilen (Verdünnung ca. 1:3 – 1:10), oder als

Vorbereitung zur Transfektion die Zellen auf kleine, runde 60 mm Kulturschalen ausplattieren.

### 3.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

*Einfriermedium(2x): 80% FCS; 20% DMSO*

Zum Einfrieren von Zellen müssen diese, wie oben beschrieben, zunächst abgelöst, gezählt, zentrifugiert und in neuem Kulturmedium bis zu einer Dichte von etwa  $5 \times 10^6$  /ml aufgenommen werden. Jeweils ein Milliliter dieser Zellsuspension wird in ein Einfrierröhrchen pipettiert, anschließend mit einem Milliliter Einfriermedium gemischt und sofort bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Für eine längere Lagerung können die Zellen nach ca. 12 h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen werden die aus dem Stickstofftank entnommenen Einfrierröhrchen bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad erwärmt und die Zellen baldmöglichst in frischem Kulturmedium aufgenommen. Unmittelbar anschließend erfolgt zur Entfernung des DMSO ein Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 7 min.). Das Zellpellet wird in neuem Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 3.3.3. Bestimmung von Anzahl und Vitalität der Zellen

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer (Reichert, New York, USA). Dazu mischt man ein Aliquot der Zellsuspension mit einer 0,5%-igen Trypanblaulösung im Verhältnis 1:2. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen sowie Zelltrümmer an, so dass diese von intakten, vitalen Zellen unterschieden werden können. Anschließend zählt man die Zellen im Mikroskop im vorgegebenen Raster der Neubauer-Kammer. Die Zellen aller vier vorgegebenen Quadranten werden ausgezählt. Die Zellkonzentration wird dabei ermittelt, indem man die durchschnittliche Anzahl an vitalen Zellen pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor  $10^4$  multipliziert.

### 3.3.4. Transiente Transfektion von adhärennten Zellen

*HBS(2x): 50 mM HEPES; 12 mM Glucose; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$*

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Plasmid-DNA transient, d.h. vorübergehend, in eukaryontische Zellen einzuschleusen, wie z.B. die Elektroporation, die Mikroinjektion, die Lipofektion oder die auf Calcium-Phosphat-Komplexen basierende Transfektion. Dabei haben sich die Lipofektion sowie die transiente Transfektion mit Calcium-Phosphat-Komplexen als sehr effiziente und einfache Methoden bei der Transfektion von adhärennten Zellen erwiesen.

Bei der Transfektion einer Retrovirus-Produktionszelllinie, wie z.B. Phoenix E, kann man nun bei Verwendung eines geeigneten Plasmids diese Methode dazu einsetzen, hohe Titer an retroviralen Vektoren im Überstand zu generieren, mit deren Hilfe es möglich ist, ein oder mehrere Gene in Zellen zu transduzieren, die nicht einfach zu transfizieren sind.

Am Vorabend der Transfektion werden zunächst die zu transfizierenden Zellen (Phoenix E) in beschichteten 60 mm Kulturschalen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 60% – 70% aufweisen. Etwa  $1,8 \times 10^6$  Zellen werden ca. 15 h vor der geplanten Transfektion je Kulturschale ausplattiert und im Brutschrank inkubiert.

#### *Transfektion mit $\text{CaPO}_4$ -Komplexen:*

Am nächsten Tag wechselt man zunächst das Kulturmedium der Zellen. Auf die zu 60% - 70% konfluenten Phoenix E-Zellen wird nun jeweils 4 ml Kulturmedium gegeben, das Chloroquin ( $25\mu\text{M}$ ) enthält, um den liposomalen Abbau der DNA zu hemmen und den retroviralen Titer zu erhöhen. Außerdem wird der Transfektions-Cocktail vorbereitet, indem man 6 – 15  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in sterile 5 ml Rundbodenröhrchen pipettiert und diese mit sterilem Wasser auf 438  $\mu\text{l}$  auffüllt. Daraufhin werden 62  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  zugegeben und der Inhalt gut gemischt. Nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  2x HBS und einer effizienten Durchmischung durch Aufsprudeln des Gemisches (10 – 20 s) wird der gesamte Cocktail auf einer 60 mm Kulturschale mit Phoenix E-Zellen in Chloroquin-Medium durch Betropfen gleichmäßig verteilt und das Gemisch anschließend im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach maximal 12 h sollte schließlich das Medium entnommen und durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt werden. Wiederum nach etwa 12 h muss dieser Vorgang wiederholt werden, bevor daraufhin zwischen 24 und 48 h nach der Transfektion der retrovirale Überstand gesammelt wird.

#### *Liposomale Transfektion (Lipofektion):*

Auch die Lipofektion hat sich als sehr effiziente Methode bewährt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle werden hier mit positiv geladenen Lipidmolekülen inkubiert und von diesen umschlossen. Die Aufnahme der DNA in das Zytoplasma erfolgt dabei durch die Anziehung überschüssiger positiver liposomaler Ladungen und die Verschmelzung der DNA-Lipid-Komplexe mit der lipophilen Zellmembran.

Hier beginnt man ab einer Konfluenz von ca. 80% damit, den Transfektionsansatz vorzubereiten. Für jede zu transfizierende 60 mm Kulturschale werden in zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße jeweils 500  $\mu\text{l}$  Serum-reduziertes Medium (Opti-Mem) pipettiert. Ein Ansatz wird anschließend mit ca. 20  $\mu\text{l}$  Lipofectamine versetzt, während man in den zweiten etwa 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gibt. Beide Ansätze werden gut gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. Daraufhin werden beide Ansätze miteinander vermischt und weitere 20 min. bei RT inkubiert.

Währenddessen wird das Kulturmedium der Zellen gewechselt. Man gibt 4 ml frisches DMEM-Kulturmedium auf die Phoenix E-Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit tropft man den gesamten Transfektionsansatz auf die Zellen und bebrütet das Gemisch bei 37°C. Erst nach etwa 24 h wird schließlich erstmals das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt und damit begonnen, retroviralen Überstand zu sammeln.

### 3.3.5. Gewinnung von Retroviren und Infektion von NIH3T3-Zellen

Höchste retrovirale Titer werden gewonnen, wenn man die Überstände ab der 24. Stunde bis zur 48. Stunde sammelt. Wie bereits beschrieben, wechselt man das Medium spätestens 24 h nach der Transfektion, wobei man höhere relative retrovirale Titer erzielt, wenn man statt 4 ml nur 3 ml frisches Kulturmedium einsetzt. Etwa 36 h nach der Transfektion wird erstmals retroviraler Überstand vorsichtig abgenommen und auf Eis oder bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Gleichzeitig wird neues Medium (3 ml) vorsichtig auf die Zellen pipettiert. 12 h später, d.h. 48 h nach der Transfektion, kann man zum zweiten Mal Virus-Überstand abnehmen und ebenso auf Eis oder bei 4°C lagern. Die transfizierten Phoenix E-Zellen werden anschließend mit PBS vom Boden der 60 mm Kulturschalen abgewaschen und mittels FACScan-Analyse auf ihre Transfektionseffizienz hin untersucht (Kap. 3.3.6.).

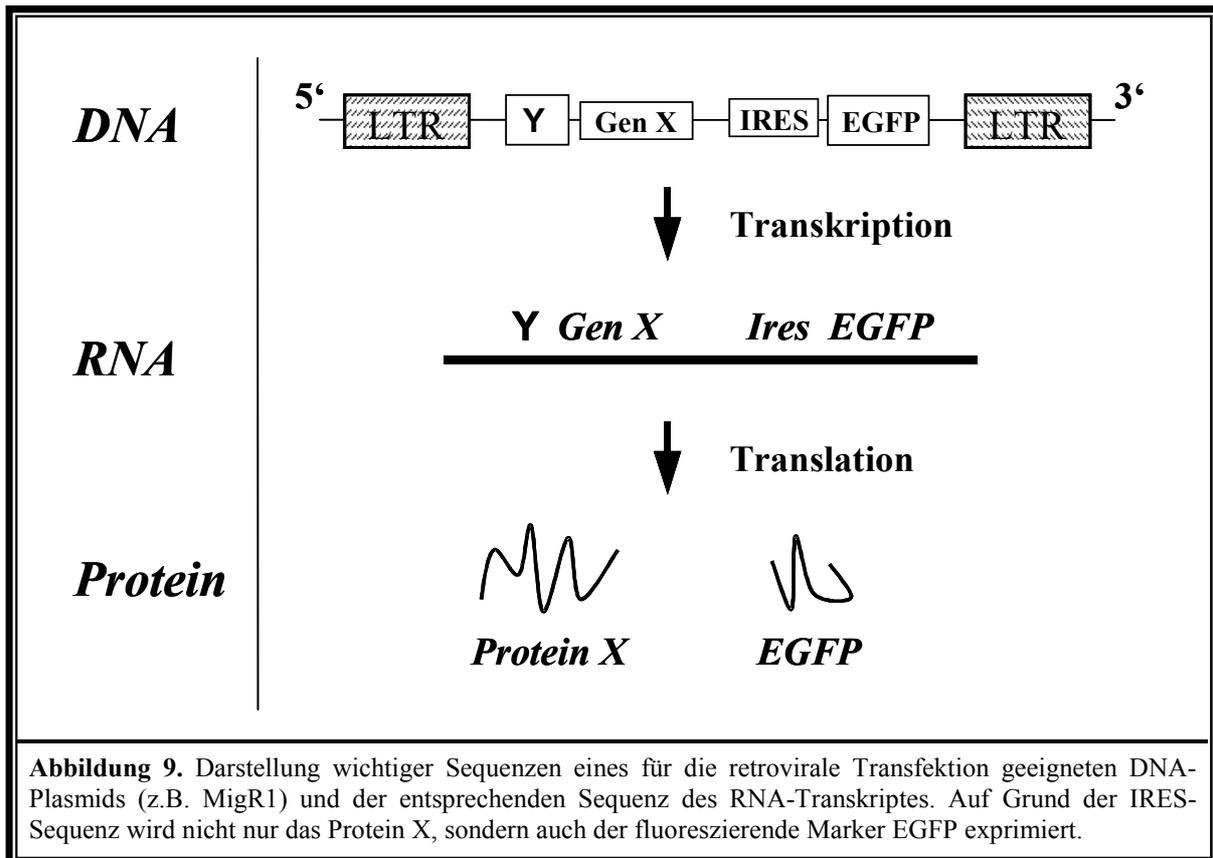
Bevor man nun den retroviralen Überstand für die Infektion von murinen Knochenmarkzellen verwendet (Kap. 3.4.3.), kann man eine Titerbestimmung mit Hilfe einer standardisierten Infektion von NIH3T3-Zellen durchführen. Erfolgt dies nicht innerhalb von ca. 7 d, sollte der Überstand primär aliquotiert, auf Trockeneis gefroren und in einen -80°C-Kühlschrank überführt werden.

Die Infektion der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 wird in 6-Schalen-Mikrotiterplatten durchgeführt. Am Vorabend werden ca.  $2,5 \times 10^4$  Zellen in jede Schale ausplattiert und dieser Ansatz etwa 12 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Titerbestimmung erfolgt in einer Verdünnungsreihe. Virus-Überstand, der zunächst filtriert wird ( $\emptyset$  45  $\mu$ m Filter), wird in 5 ml Rundbodenröhrchen in drei verschiedenen Konzentrationen angesetzt. Dabei gibt man zu jeweils 2 ml Kulturmedium und 16  $\mu$ g Polybren 200  $\mu$ l (1:10), 20  $\mu$ l (1:100) oder 4  $\mu$ l Virus-Überstand (1:500). Die Mischung wird schließlich auf die zu infizierenden NIH3T3-Zellen gegeben, wobei das alte Medium zuvor vorsichtig abgesaugt werden muss. Nach etwa 2 – 3 d kann der Titer mittels FACScan-Analyse bestimmt werden.

### 3.3.6. Durchflußzytometrische Bestimmung der Transfektionseffizienz und des Titers

Die Effizienz der Transfektion der Phoenix E-Zellen kann mit Hilfe des Fluorescence Activated Cell Scanner (FACScan) bestimmt werden. Hilfreich dabei ist die EGFP-Sequenz, eine Sequenz für ein grün-fluoreszierendes Protein, die, zusammen mit dem internen

Translationssignal IRES, mit in die Plasmid-DNA (z.B. MigR1-Vektor) am 3'-Ende der Klonierungsstellen integriert ist (Abb. 18). Nach Klonierung der gewünschten DNA (Gen X, z.B. p185) in eine der Klonierungsstellen sowie nach erfolgreicher Transfektion bzw. Infektion beginnt zunächst die Transkription am 5'-LTR, das die Promotorfunktion übernimmt, und endet am 3'-LTR. Dabei entsteht eine mRNA, welche nicht nur aus der Verpackungssequenz Y und der gewünschten Gensequenz (Gen X) besteht, sondern auch aus der IRES- und der EGFP-Sequenz (Abb. 9).



Auf Grund des internen Translationssignals IRES, das die Anlagerung des Ribosoms sowie der Translationsfaktoren vermittelt, erfolgt nun parallel zur Translation der gewünschten RNA und damit der Produktion des gewünschten Proteins (Protein X) auch die Translation der EGFP-Sequenz. Damit exprimieren alle erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen das grün fluoreszierende Protein EGFP und können so im Durchflußzytometer detektiert werden. Der Anteil an EGFP-positiven Zellen wird dabei in Form von Punktdiagrammen oder Histogrammen dargestellt.

Während die Transfektionseffizienz nun direkt ablesbar ist, muss für die Bestimmung des Titors für jede Verdünnungsstufe zunächst einzeln der Titer berechnet werden. Dazu nimmt man eine Zahl von  $5 \times 10^4$  zu infizierenden NIH3T3-Zellen an (12 h nach dem Ausplattieren verdoppelt) und multipliziert diese mit dem Verdünnungsfaktor (10, 100 bzw. 500) und dem

Anteil der EGFP-positiven Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Abschließend bestimmt man den Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

### 3.4. Tiermodell – Arbeiten mit Mäusen und murinen Zellen

Alle Eingriffe wurden im Rahmen eines von der Regierung Oberbayerns und des lokalen Tierschutzbeauftragten genehmigten Versuchsantrags durchgeführt. Alle Tiere wurden in spezifisch pathogen freier Umgebung in einem Umluft-Käfigsystem der Firma Thoren gehalten und bekamen Futter und Trinkwasser ad lib. Bei den ersten Anzeichen einer Erkrankung oder von Schmerzen (eingeschränkte Bewegung, Nahrungsverweigerung etc.) wurden die Tiere schmerzfrei getötet.

#### 3.4.1. Knochenmarkgewinnung aus Spendermäusen

*BBMM (basal bone marrow medium): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA; 5 ml L-Glutamin; 500 µl 2-Mercaptoethanol; 2,5 ml Penicillin/Streptomycin (steril filtrieren)*

Zunächst werden zur Gewinnung von Knochenmark (KM) männlichen Balb/C-Mäusen 3 mg 5-Fluoruracil (5-FU) i.v. in eine Schwanzvene gespritzt, um den relativen Anteil muriner Stammzellen im KM zu erhöhen. Erst 5 d später gewinnt man die KM-Zellen, indem man die Mäuse zunächst durch Narkose und Genickbruch oder CO<sub>2</sub>-Insufflation tötet und post mortem Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entfernt und in Hanks' balanced salt solution (HBSS) inkubiert. Mit Hilfe einer dünnen Nadel sowie einer 5 ml Spritze wird das Knochenmark anschließend aus den Knochen mit BBMM (Kap. 3.4.2.) herausgespült. Die Knochenmarkzellen werden daraufhin 6 min. bei 900 rpm zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die murinen KM-Zellen können nun zunächst kultiviert und anschließend retroviral infiziert werden (Kap. 3.4.3.), sie können direkt eingesetzt werden, um letal bestrahlte Mäuse zu rekonstituieren (Kap. 3.4.4.) oder man kann sie nach Stammzellseparation (FACSORT) im Methylzellulose-Assay untersuchen (Kap. 3.4.10.). Abhängig von ihrer Verwendung werden sie nach dem Zentrifugationsschritt in BBMM oder HBSS resuspendiert.

#### 3.4.2. Kultivierung und Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen

*Prästimulationsmedium: BBMM; 10 ng/ml m-IL 3; 12 ng/ml h-IL 6; 50 ng/ml m-SCF*

Beabsichtigt man frisch gewonnene KM-Zellen für die retrovirale Infektion zu verwenden, werden diese in Prästimulationsmedium im Brutschrank bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> etwa 24 h inkubiert. Dadurch kann die Effizienz des Gentransfers optimiert werden, was mit einem erhöhten Anteil hämatopoetischer Zellen in S-Phase einhergeht.

### 3.4.3. Retrovirale Infektion der Knochenmarkzellen („Spin-Infektion“)

Retroviraler Überstand wurde durch Transfektion von Phoenix E-Zellen hergestellt (Kap. 3.3.4.), um Knochenmarkzellen bzw. hämatopoetische Stammzellen infizieren und dabei bestimmte Gene transferieren zu können. Verschiedene Methoden stehen hierfür zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit die „Spin-Infektion“ durchgeführt wurde. Zunächst werden die KM-Zellen nach der Prästimulation zentrifugiert, in frischem BBMM resuspendiert und gezählt. Anschließend pipettiert man jeweils etwa  $0,5 - 2 \times 10^6$  KM-Zellen in 1 ml Medium in 5 ml Rundbodenröhrchen und mischt diesen Ansatz mit 1,5 ml retroviralem Überstand, 25 ng m-IL 3, 30 ng h-IL 6, 125 ng m-SCF und 10 µg Polybren. Den gesamten Infektionsansatz gibt man schließlich in eine Schale einer 12-Schalen-Mikrotiterplatte und zentrifugiert bei 2000 rpm und 32°C für 90 min. Nach Ablauf der Zentrifugation wird die Mikrotiterplatte weitere 10,5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bevor die Zellen aber für die KM-Transplantation eingesetzt werden, wiederholt man diesen Zentrifugationsschritt im Abstand von je 12 h dreimal, wobei jeweils alle Medien erneuert werden. Das bedeutet, man nimmt nach 10,5 h Inkubation fast den gesamten Überstand ab und zentrifugiert diesen bei 900 rpm für etwa 5 min. Gleichzeitig bereitet man den Infektionsansatz mit 1 ml BBMM, 1,5 ml retroviralem Überstand, 10 µg Polybren sowie allen genannten Wachstumsfaktoren vor. Das Pellet wird anschließend mit diesem Ansatz resuspendiert, diese Mischung erneut in die entsprechende Schale der Mikrotiterplatte gegeben und so der nächste Zentrifugationsschritt gestartet. Nach der letzten Inkubationsphase spült man alle Zellen mit dem Medium vom Boden der Schale ab, zentrifugiert bei 900 rpm und resuspendiert die infizierten KM-Zellen in HBSS.

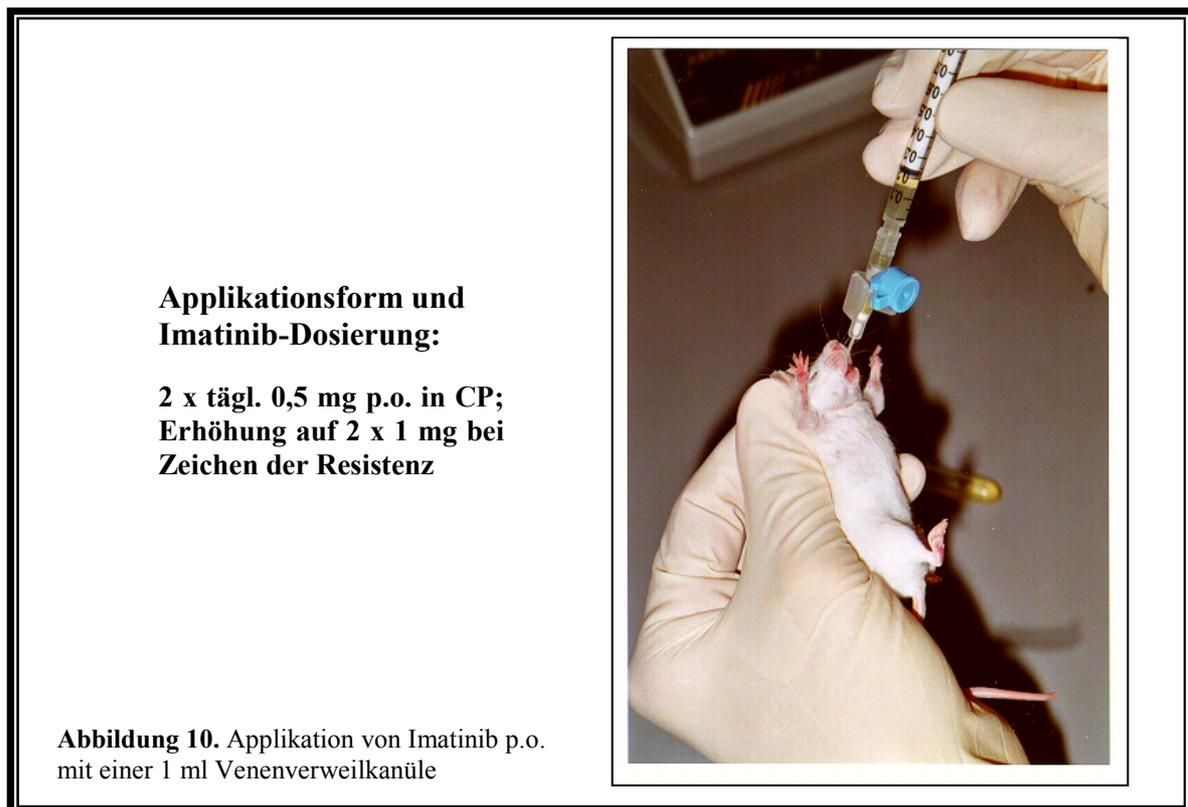
### 3.4.4. Stammzell-Transplantation (SZT) mit nativen oder infizierten KM-Zellen

Retroviral infizierte Knochenmarkzellen können nun gleichermaßen wie native KM-Zellen Mäusen transplantiert werden. Man verwendet dazu in HBSS suspendierte Zellen, wobei jeweils maximal 200 µl Volumen intravenös mit einer 1 ml Spritze injiziert werden können. Sehr hilfreich vor der Injektion in eine Schwanzvene ist das Aufwärmen der Tiere mit einer Infrarotlampe, weil so die Venen deutlicher sichtbar werden. Empfänger-Mäuse in dieser Arbeit waren 6 – 20 Wochen alte, weibliche Balb/C-Mäuse, welche vor der SZT letal mit 800 rad Gesamtdosis mit einer Cs137-Strahlenquelle bestrahlt wurden. Die Dosis kann in einer Bestrahlungssitzung bzw. sequentiell in zwei Sitzungen verabreicht werden.

### 3.4.5. Therapie mit Imatinib

Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Imatinib mesilate, urspr. STI571) wurde von der Firma Novartis Pharma AG (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Für den Einsatz bei in vitro

Experimenten (Kap. 3.4.10. und 3.5.1) wurden Imatinib-Stammlösungen in A.d. mit einer Konzentration von 10 mM vorbereitet. Die Ansätze für die Imatinib-Applikation bei Mäusen wurden hingegen zweimal täglich mit einer Konzentration von 5 mg/ml hergestellt, was bei einer Dosis von 2 x 0,5 mg/d einer Gabe von jeweils 100 µl entspricht. Verabreicht wurde dieses Volumen per os mit einer 1 ml Venenverweilkanüle, wobei man den dünnen Plastikschlauch jeweils vorsichtig in den Ösophagus der Mäuse gleiten lässt (Abb. 10).



#### 3.4.6. Monitoring der Mäuse (Blutbild, Blutausstrich, Fluoreszenzmikroskopie)

Ein mögliches Ansprechen der Mäuse auf eine Therapie mit Imatinib bzw. eine erfolgreiche Rekonstitution letal bestrahlter Mäuse mit nativen KM-Zellen kann jeweils durch engmaschiges Monitoring kontrolliert werden. Zum Teil wurde zumindest jeden zweiten Tag ein Blutbild erstellt, indem mit Hilfe einer dünnen Nadel sowie einer Kapillare der Maus etwa 20 µl venöses Blut aus einer Schwanzvene entnommen und dieses in das Analysegerät, den „Blood Counter“, gegeben wurde. Außerdem konnten, indem durch Einsatz eines Skalpells den Mäusen deutlich mehr Blut entnommen wurde, murine Zellen auch durch FACScan-Analyse untersucht werden (Kap. 3.4.8.).

Ein Tropfen Blut konnte dabei jeweils auch verwendet werden, um einen Blutausstrich anzufertigen, der schließlich im hämatologischen Labor mit Giemsa gefärbt wurde. Durch Lichtmikroskopie wurden die Ausstriche, welche in unregelmäßigen Abständen in Abhängig-

keit vom Befinden der Mäuse erstellt wurden, schließlich analysiert.

Gerade nach Tx von Mäusen mit KM-Zellen, die in der Lage sind, EGFP zu exprimieren, war es möglich, Blutaussstriche auch im Fluoreszenzmikroskop zu analysieren. So konnte man den Anteil der grün-fluoreszierenden, d.h. der malignen, transformierten Zellen, im peripheren Blut abschätzen.

#### 3.4.7. Analyse und Aufarbeitung von Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten

*ACK-Reagenz: 150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,3*

*FACS-Puffer: PBS; 1% BSA*

Nach der Opferung der Mäuse, die infolge einer resistenten Leukämie oder zunehmender Symptomatik nötig wurde, war eine intensive Aufarbeitung und Analyse von Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten möglich. Nach Öffnung von Abdomen und Thorax wird den Mäusen zunächst das kardiale Blut entnommen und in Monovetten gesammelt. Anschließend erfolgt die Splenektomie, die Entfernung möglicher vergrößerter Lymphknoten sowie von Femur und Tibia der rechten und linken Seite. Dabei werden alle Gewebe und Organe zunächst in HBSS aufbewahrt.

Daraufhin beginnt man mit der Erythrozyten-Lyse des frisch gewonnenen Blutes. 1 ml Blut wird mit 5 ml ACK-Reagenz etwa 15 min. bei RT inkubiert und anschließend bei 800 rpm 8 – 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Schritt können die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit Antikörpern inkubiert werden (Kap. 3.4.8.). Die Milz sowie möglicherweise vergrößerte Lymphknoten werden mit einem Skalpell stark verkleinert, durch ein Zellsieb gerieben und nach der folgenden Filtration (Ø 70-100 µm) bei 900 rpm 5 min. zentrifugiert. Anschließend kann das sich nun in Einzelzellsuspension befindliche Gewebe weiterverarbeitet bzw. analysiert werden.

Die KM-Zellen werden wie in Kap. 3.4.1. beschrieben gewonnen und schließlich ebenso entweder durchflußzytometrisch untersucht oder vital für spätere Untersuchungen (z.B. serielle Transplantation) bzw. als Zellpellet für DNA-, RNA-, oder Protein-Extraktionen weggefroren.

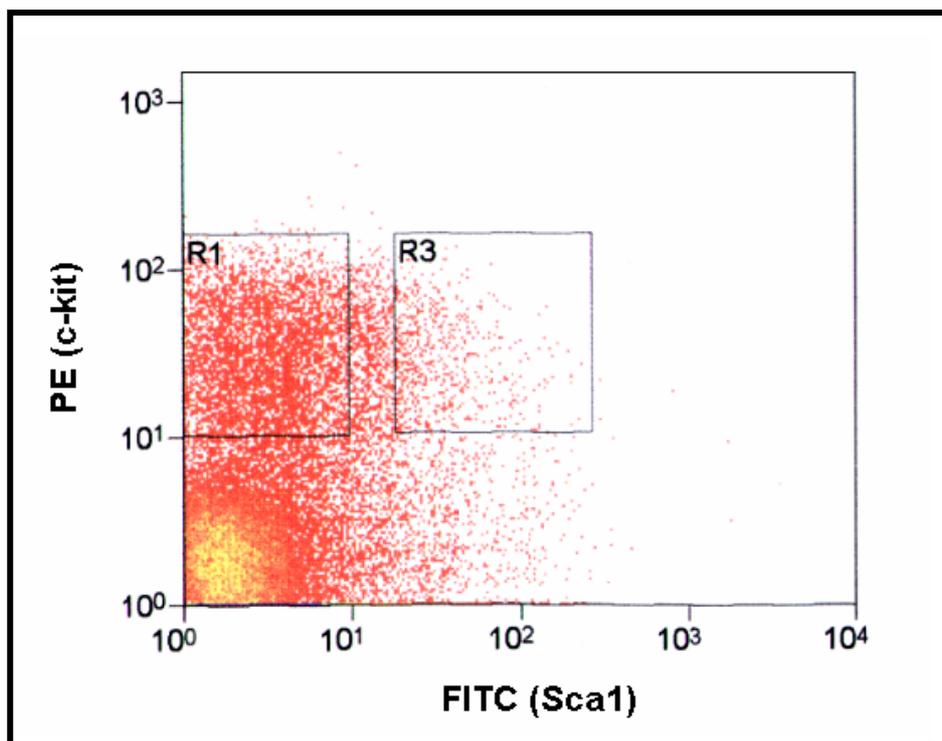
#### 3.4.8. FACScan-Analyse und Immunphänotypisierung von murinen Zellen

Zur immunphänotypischen Charakterisierung werden die murinen Zellen (Blut-, LK-, Milz- und KM-Zellen) mit Hilfe des „Fluorescence Activated Cell Scanners“ (FACScan) der Firma Beckman Coulter analysiert. Hierbei werden zunächst zellspezifische Oberflächenantigene durch einen mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. R-Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein Isothiocyanat (FITC)) gekoppelten Antikörper markiert. Durch geeignete Druck-

und Strömungsbedingungen wird eine „perlenschnurartig“ geordnete Wanderung der Zellen durch die Messeinheit bewirkt. Es wird jede einzelne Zelle durch einen Laserstrahl erfaßt und die Fluoreszenz des zellgekoppelten Farbstoffes sowie andere bestimmte Streulichtphänomene (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC)) werden detektiert, mit deren Hilfe Aussagen über physikalische Eigenschaften der Zelle (Größe der Zelle (FSC) bzw. Granularität (SSC)) getroffen werden können, und die Signale über EDV ausgewertet. Durch Markierung mit mehreren Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern können auch Subpopulationen gemessen werden.

Zur Phänotypisierung werden die gewonnenen Zellen (Kap. 3.4.7.) nach einem Zentrifugationsschritt zunächst in FACS-Puffer bei einer Konzentration von  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen/ml suspendiert. Die Antikörper-Ansätze werden anschließend 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt. Nun pipettiert man zunächst etwa 5 µl Fc-Block (1:10) in ca. 300 µl Zellsuspension, wobei unspezifische Bindungen abgedeckt werden, und daraufhin auch 5 µl des CyChrome<sup>TM</sup>-markierten CD45 (1:10) sowie jeweils 5 µl (1:10) eines der spezifischen, PE- oder (und) FITC-gekoppelten Antikörper. Diesen Ansatz lässt man schüttelnd im Dunkeln bei 4°C etwa 30 – 45 min. inkubieren. Schließlich werden die Ansätze zentrifugiert (900 rpm, 6 min.) und dreimal mit etwa 500 µl FACS-Puffer gewaschen, bevor die Zellen im FACScanner analysiert werden können.

#### 3.4.9. Gewinnung von nativen hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) durch FACSORT



Für die Untersuchung des Effektes von Imatinib auf HSZ in vitro im Methylzellulose-Assay wurden murine KM-Zellen durchflußzytometrisch gesortet (MoFlo cytometer, Cytomation, CO, USA).

Zur Markierung von  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen wurden hier der FITC-konjugierte Sca1- (Ly-6A/E) und der PE-konjugierte c-kit-Antikörper (CD117) eingesetzt, wobei wie in Kap. 3.4.8. beschrieben vorgegangen wurde. Beim FACSsort wurden die Fenster („Gates“) wie oben gezeigt gesetzt und die entsprechenden Sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> (R3) bzw. Sca1<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Zellen (R1) in getrennten Röhren gesammelt und unmittelbar anschließend in FCS-haltigem Medium inkubiert.

#### 3.4.10. Methylzellulose-Assay

Die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup> bzw. Sca1<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Zellen in Abhängigkeit von Imatinib in vitro kann im Methylzellulose-Assay, einem Colony Assay für HSZ, untersucht werden. Dabei wurden die Zellen mit 1,2 ml Methylzellulose-Medium (MethoCult<sup>TM</sup> GF M3434, StemCell Technologies) gemischt (400 Zellen je 35 mm<sup>2</sup>-Zellkulturschale und 1,2 ml Medium), mit unterschiedlichen Mengen an Imatinib versetzt und dieser in die Kulturschalen überführte Ansatz schließlich bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach neuntägiger Kultivierung wurden in dieser Arbeit unter Berücksichtigung von Standardkriterien die Kolonien (CFUs) mit Hilfe eines Mikroskopes morphologisch beurteilt und gezählt. Dabei wurden Kolonien mit weniger als 8 Zellen nicht berücksichtigt.

### 3.5. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.5.1. Vorbehandlung und Lyse muriner Zellen

*RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640; 10% FCS; 2mM Glutamin; 1% antibiotische Lösung*

*SDS-Probenpuffer(2x): 200 mM DTT; 1 M Tris/HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin*

*Lysis-Puffer: siehe Kap. 2.11.*

Zunächst werden viabel mit Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefrorene Mauszellen (Blut-, KM- oder Milzzellen) aufgetaut (Kap. 3.3.2.), in frischem RPMI-Kulturmedium resuspendiert und deren Anzahl bestimmt (Kap. 3.3.3.). Bei Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Imatinib werden je 4 Mio. Zellen mit 3 ml Medium sowie der entsprechenden Menge an Imatinib in 60 mm Kulturschalen etwa 2 h inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt (900 rpm, 6 min., RT) werden die Pellets kurz schockgefroren, in jeweils 200 µl Lysis-Puffer resuspendiert und 20 min. auf Eis inkubiert. Nun wird wiederum zentrifugiert (14000 rpm, 20 min., 4°C), der Überstand schließlich in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge 2 x SDS-

Probenpuffer versetzt. Daraufhin kocht man die Mischung zur Denaturierung der Proteine im Thermoblock etwa 10 min. auf (95 - 99°C). Nach dem folgenden Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 2min., RT) kann man nun die Proben (jew. ~ 30 µl) auf SDS-Polyacrylamidgele auftragen.

### 3.5.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

*SDS-Gelelektrophoresepuffer: 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,25 mM Glycin; 0,5% (M/V) SDS*

*Sammelgel: 5% Polyacrylamid; 0,125 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,03% APS; 0,1% TEMED*

*Trenngel: 7% - 12% Polyacrylamid; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS ; 0,03% APS; 0,1% TEMED*

Die SDS-PAGE ist das gebräuchlichste Verfahren zur Auftrennung eines Proteingemisches. In der Regel hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen im elektrischen Feld von ihrer Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung ab. Bei der SDS-PAGE kann man durch den Zusatz von SDS, einem starken Detergens, das komplexierte Proteine trennt und denaturiert, erreichen, dass für die Wanderung der Proteine nur noch deren molekulare Masse ausschlaggebend ist. Die SDS-Moleküle lagern sich gleichmäßig an die denaturierten Proteine an und verleihen ihnen somit eine stark negative Ladung.

Schließlich kann man noch durch Variation der Polyacrylamidkonzentration des Trenngels den Auftrennungsbereich der Proteine bestimmen. Höher konzentrierte Gele trennen dabei besser kleinere und niedriger konzentrierte eher größere Proteine auf. Generell sind die Gele im oberen Bereich (Sammelgel), der die Geltaschen enthält, niedriger konzentriert, was eine Verschmälerung der Proteinbanden ermöglicht. Die eigentliche Auftrennung erfolgt in einem größeren, höher konzentrierten Gelbereich (Trenngel).

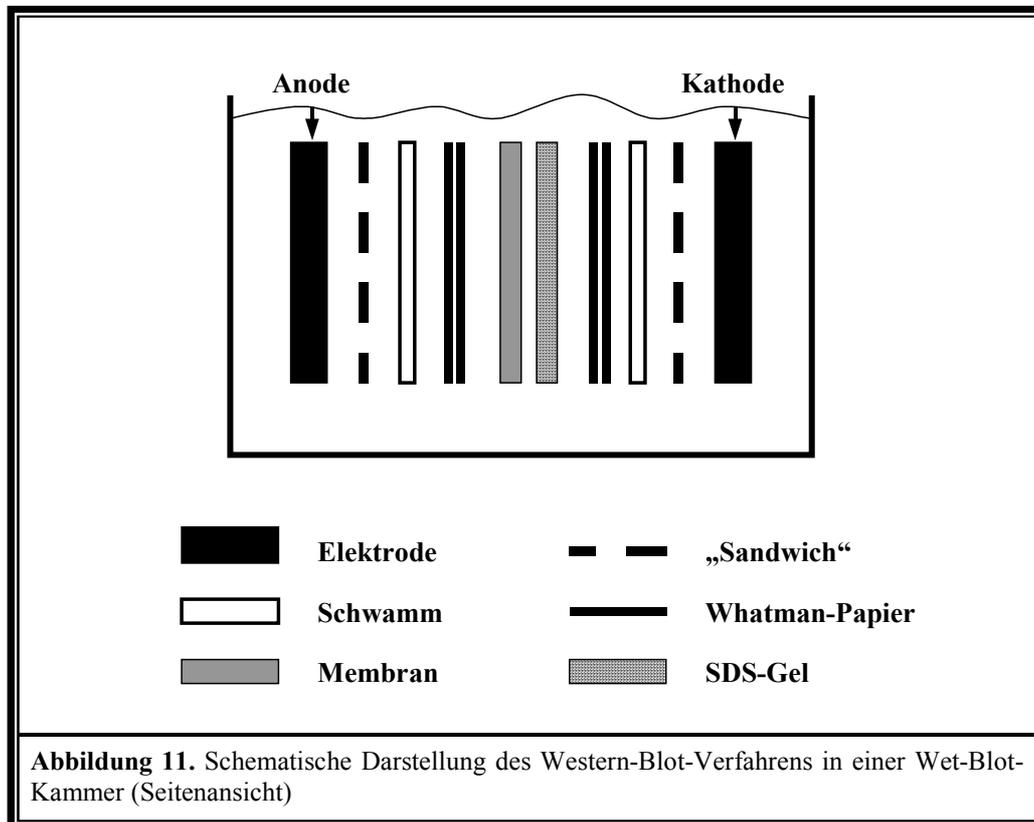
Als Gelkammer werden zwei saubere Glasplatten verwendet, die mit einem Dichtungsgummiband zusammengesetzt werden (Biometra, Göttingen). Bei der Herstellung des Polyacrylamidgels wird zunächst das Trenngel (ca. 12 ml) luftblasenfrei in die Gelvorrichtung pipettiert und mit etwa 500 µl Methanol überschichtet, um bei der Polymerisation eine glatte Gelkante zu erreichen. Sobald das Gel fest ist, kann man den Alkohol abgießen bzw. absaugen, das Sammelgel auf das Trenngel gießen (ca. 4 ml) und den Kamm einsetzen, der für die Aussparungen im polymerisierten Gel (Geltaschen) sorgt. Nun wird das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingespannt, mit SDS-Gelelektrophoresepuffer überschichtet und schließlich mit den denaturierten Proteinproben (Kap. 3.5.1.) sowie einem Protein-Längenmarker beladen. Durch Anlegen einer Spannung (25 – 120 Volt) können die Proteine daraufhin aufgetrennt werden.

Nach dem Lauf können die Gele je nach Bedarf auf eine PVDF-Membran geblottet (Western-Blot), mit einem Proteinfarbstoff (Coomassie) angefärbt oder aber sofort auf ein Filterpapier gelegt und im Geltrockner 2 h bei 80°C getrocknet werden.

### 3.5.3. Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

*Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl; 0,25 mM Glycin; 0,05% SDS; 20% (V/V) Methanol*

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden werden mittels einer Wet-Blot-Kammer der Firma Hoefer auf eine PVDF-Membran übertragen (wet-blotting).



Dabei wird die Transfermembran zunächst auf die passende Größe zurechtgeschnitten und kurz in Methanol eingetaucht. Das SDS-Gel wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale möglichst luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen jeweils zwei Lagen Wasman-Papier und Schwämmchen in ein „Plastik-Sandwich“ eingespannt (Abb. 11). Das „Sandwich“ wird anschließend zwischen die Elektroden-Platten der mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer gehängt und der Transfer bei 1000 mA unter ständiger Kühlung ( $\sim 10^{\circ}\text{C}$ ) gestartet. Die Transferdauer wird abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins gewählt (hier etwa 2,5 h).

### 3.5.4. Immunchemische Darstellung von transferierten Proteinen

*Blocking-Puffer: PBS mit 10% Trockenmilchpulver; 0,1% Tween / PBS mit 5% BSA; 0,1% Tween*

*PBS-Tween-Puffer: PBS; 0,1% Tween*

*Amidoschwarz-Entfärbelösung: Essigsäure 10%; Methanol 10%*

Mit dieser Technik können auf eine Membran transferierte Proteine durch Antigen-spezifische Antikörper in einem komplexen Proteingemisch nachgewiesen werden.

Unmittelbar nach dem Transfer wäscht man die Membran kurz in PBS-Tween-Puffer und inkubiert sie anschließend 30 min. bei 37°C in Blocking-Puffer. Dadurch werden, um störende Hintergrundfärbung zu vermeiden, unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran gesättigt. Bei Einsatz eines Antikörpers gegen phosphorylierte Proteine wird, da viele Milchproteine stark phosphoryliert sind, dieser in 5%-iger BSA-Blocking-Puffer-Lösung (statt Milchpulver-Blocking-Puffer) angesetzt und die Membran entsprechend in BSA-Blocking-Puffer inkubiert. Schliesslich wird die Membran mit dem spezifischen Primär-Antikörper inkubiert, der zuvor in entsprechendem Blocking-Puffer verdünnt wurde, wobei für jeden Antikörper die Verdünnung gesondert bestimmt wird. Die Inkubation des Primär-Antikörpers mit der PVDF-Membran erfolgt schüttelnd für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Daraufhin wird die Membran nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween-Puffer (jew. ca. 10 min.) mit einem zweiten Antikörper inkubiert (0,5 h, RT), der im Verhältnis 1 : 5000 in Blocking-Puffer verdünnt ist. Dieser Ak ist mit HRP konjugiert und gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primär-Ak gerichtet. Anschließend wird erneut dreimal je 10 min. mit PBS-Tween-Puffer und zuletzt einmal kurz mit PBS ohne Tween gewaschen, bevor die Membran zur Detektion der Proteine mit einer Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert wird. Dabei werden die Substrate durch die HRP an den Stellen umgesetzt, wo Primär- und Sekundär-Ak spezifisch binden. Schließlich erfolgt die Dokumentation des erzeugten Signals auf einem Hyperfilm (Amersham, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

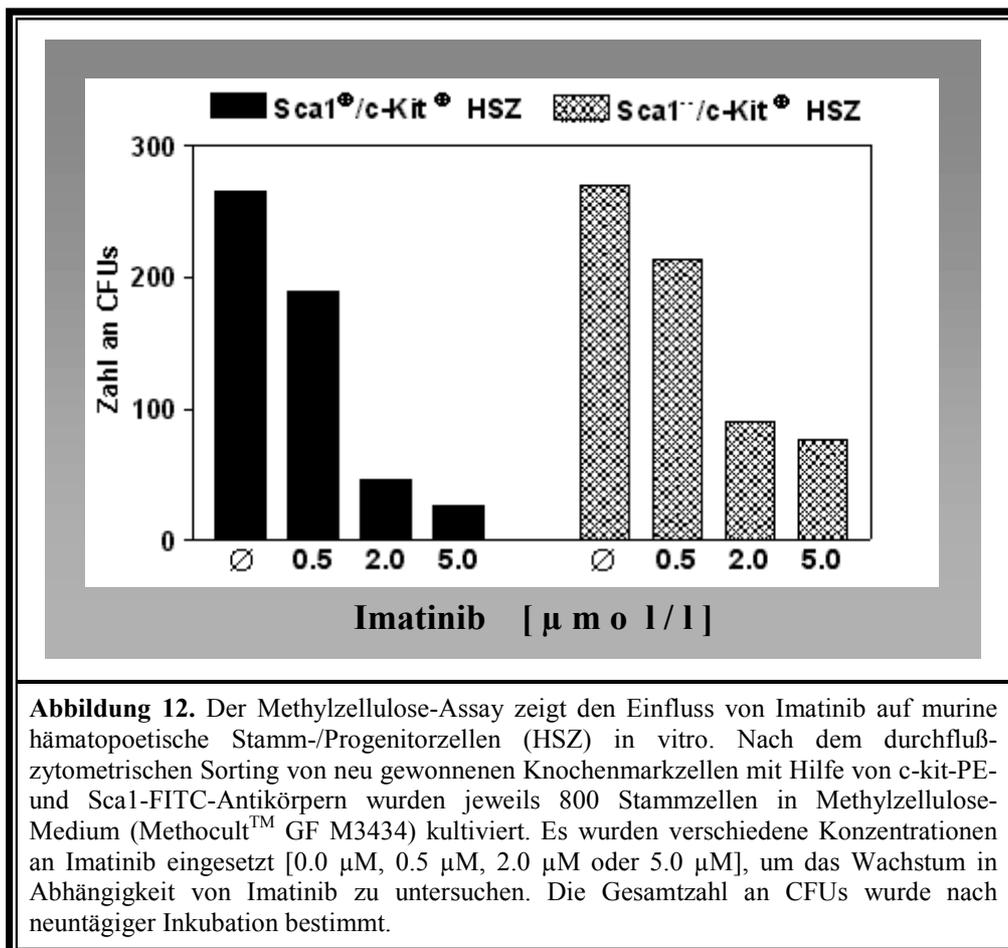
Um weitere Proteine auf einer bereits mit Antikörpern markierten Membran zu detektieren, kann die Membran „gestrippt“ werden. Dabei lässt sich die Bindung des Primär-Ak an ein spezifisches Protein z.B. durch zweimalige Inkubation mit Amidoschwarz-Entfärbelösung (7 min., RT) aufheben. Anschließend wird die Membran mehrmals mit A. d. und mit PBS abge-spült. So kann die Membran erneut geblockt und mit einem neuen Ak inkubiert werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Imatinib hemmt die Proliferation und Differenzierung c-kit<sup>+</sup>, nativer muriner hämatopoetischer Stamm-/Progenitorzellen in vitro

Ein erstes Projekt im Rahmen dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer kontinuierlichen Imatinib-Therapie auf das KM-Engraftment nach SZT im syngenem Maus-Modell.

Imatinib ist in der Lage, neben c-Abl und Bcr-Abl auch die Tyrosinkinase c-kit und PDGFR zu inhibieren. Weil außerdem bereits erste Hinweise auf einen Effekt von Imatinib auf die normale Hämatopoese in vitro vorliegen (Druker et al., 1996; Holtz et al., 2002), sollte diese Inhibition von Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen zunächst im Methylzellulose-Assay näher quantifiziert werden (Abb. 12).

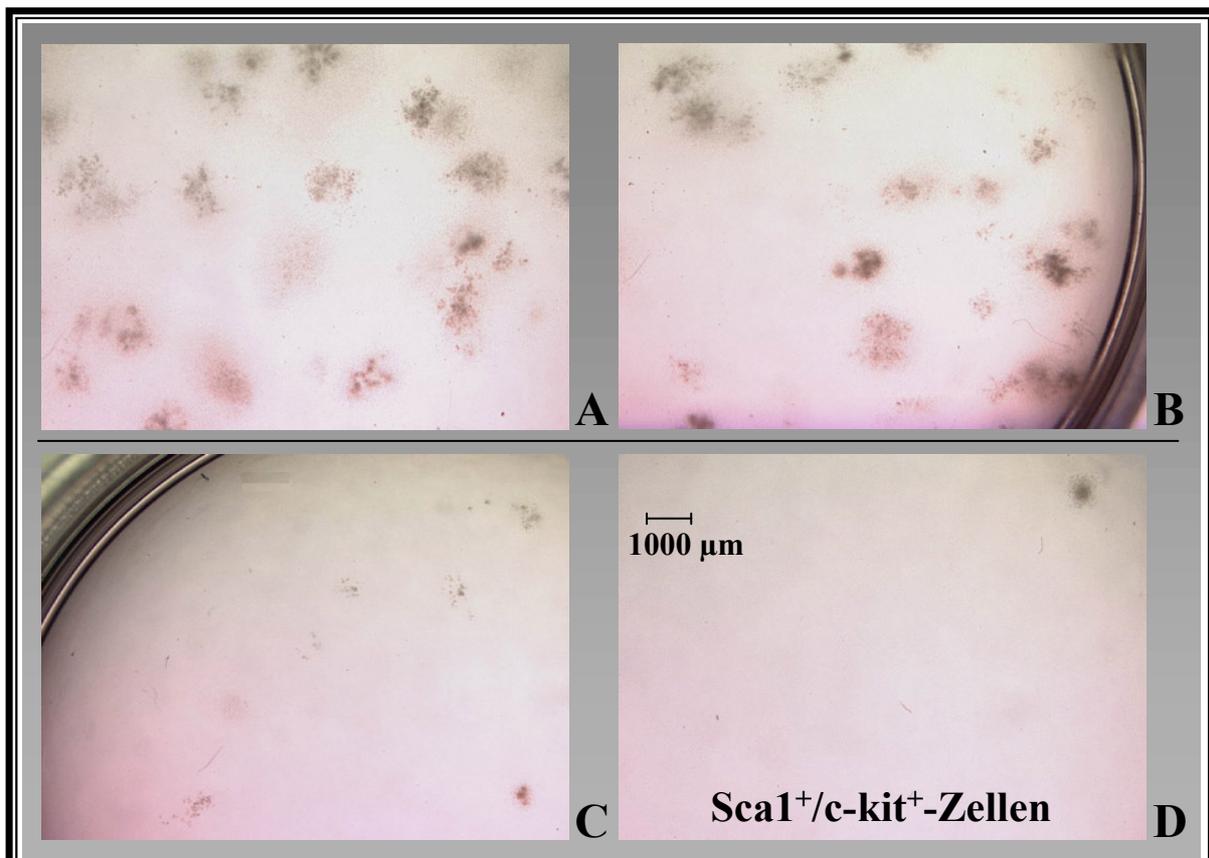


Dafür wurden zwei unterschiedliche c-kit<sup>+</sup> Populationen hämatopoetischer Progenitorzellen mit kolonienbildenden Eigenschaften (Spangrude et al., 1988; Li et al., 1995) durchflußzytometrisch gesortet (FACSORT). Wie in Kap. 3.4.9. beschrieben, wurden mit Hilfe des FITC-konjugierten Sca1- (Ly-6A/E) und des PE-konjugierten c-kit-Antikörpers die entsprechenden

$Sca1^+/c-kit^+$  bzw.  $Sca1^-/c-kit^+$ -Zellen gewonnen.

Das Wachstum beider Populationen, sowohl der potenteren, primitiveren  $Sca1^+/c-kit^+$ , als auch der  $Sca1^-/c-kit^+$ -Progenitorzellen, wird, wie in Abb. 12 gezeigt, durch Imatinib in vitro deutlich gehemmt. Die Bildung von CFUs wurde dabei 9 Tage nach Inkubation von  $2 \times 400$  Zellen in jeweils 1,2 ml MZ-Medium mit unterschiedlichen Mengen an Imatinib bei  $37^\circ\text{C}$  mit Hilfe eines Mikroskops morphologisch quantifiziert (Kap. 3.4.10.). Bereits bei einer geringen Imatinib-Konzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  zeigte sich eine Reduktion der Zahl kolonienbildender Einheiten auf 79,3 bzw. 71,2%. Die Erhöhung der Imatinib-Konzentration auf 2,0 bzw.  $5,0 \mu\text{M}$  hatte eine deutliche Verstärkung des inhibitorischen Effektes zur Folge. Im Vergleich zur Kolonienzahl bei Abwesenheit von Imatinib (270 bzw. 264) konnte bei einer Konzentration von  $5,0 \mu\text{M}$  eine Verringerung auf 28,1% ( $Sca1^-/c-kit^+$ -Kolonien) bzw. 9,5% ( $Sca1^+/c-kit^+$ -Kolonien) bestimmt werden.

Das Wachstum beider  $c-kit^+$ , nativer muriner Zellpopulationen in vitro durch Imatinib wird also deutlich inhibiert. Es bleibt aber festzustellen, dass insgesamt die Proliferation der differenzierteren  $Sca1^-/c-kit^+$ -Zellen etwas weniger beeinflusst wird, diese also weniger sensibel gegenüber Imatinib sind.



**Abbildung 13.** Exemplarische Darstellung mikroskopischer Aufnahmen der Kulturschalen 9 Tage nach Inkubation von je 400  $Sca1^+/c-kit^+$ -Zellen in 1,2 ml MZ-Medium bei Zugabe unterschiedlicher Imatinib-Mengen. (A) CFUs bei  $0,0 \mu\text{M}$  Imatinib (B) Mäßige Reduktion der Zahl kolonienbildender Einheiten bei  $0,5 \mu\text{M}$  Imatinib (C) Deutliche Hemmung der Proliferation bei einer Imatinib-Konzentration von  $2,0 \mu\text{M}$  (D) Bei einer Konzentration von  $5,0 \mu\text{M}$  Imatinib können nur noch vereinzelt CFUs detektiert werden.

Exemplarisch sind in Abb. 13 mikroskopische Aufnahmen der MZ-Zellkulturschalen bei sehr schwacher Vergrößerung (10x) dargestellt. Ein Vergleich der Aufnahmen der MZ-Kulturen bei unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen soll einen Überblick über den deutlichen Effekt von Imatinib auf die Proliferation der gesorteten Stamm-/Progenitorzellen bieten. Sowohl die Größe als auch die Zahl von CFUs wird in Abhängigkeit von der Imatinib-Konzentration vermindert.

Genauer lassen sich die CFUs bei 30 bis 120-facher Vergrößerung beurteilen (Abb. 14). Ohne eine Zugabe von Imatinib wachsen sowohl  $Sca1^+/c-kit^-$ , als auch  $Sca1^-/c-kit^+$ -Progenitorzellen in MZ-Medium zu großen multilinearen Kolonien (CFU-GEMM) heran. Eine unterschiedliche Größe bzw. das Auftreten anderer Zelllinien ist beim Vergleich von Proliferation und Differenzierung der  $Sca1^+/c-kit^-$  (linke Spalte) und der  $Sca1^-/c-kit^+$ -Zellen (rechte Spalte) nicht zu erkennen.

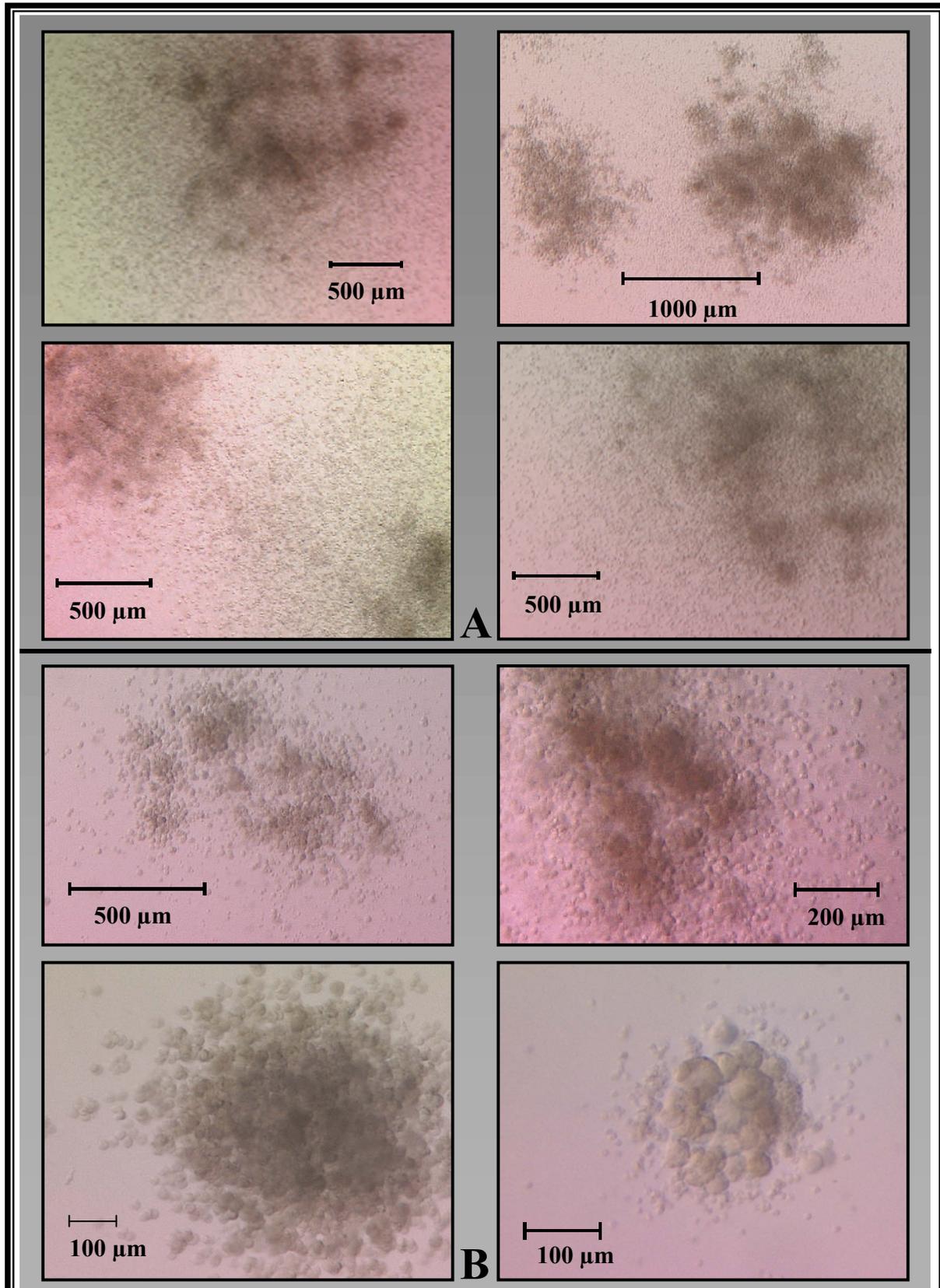
Werden die Zellen aber mit 5,0  $\mu$ M Imatinib in Methylzellulose-Medium inkubiert, bleiben die CFUs deutlich in ihrem Wachstum verzögert. Des Weiteren geht zum Teil die Multilinearität der Kolonien verloren. Es kommt zum Auftreten kleiner CFU-GMs, d.h. Kolonien mit rein leukozytärem Charakter (z.B. Monozyten oder Mastzellen), sowie Kolonien mit einem hohen Anteil an Megakaryozyten. Sehr schwer erkennbar sind hier so genannte BFU-E, weil diese im verwendeten MZ-Medium M3434 nicht die typische braune Farbe entwickeln.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Hemmung der Proliferation und Differenzierung muriner hämatopoetischer Stamm-/Progenitorzellen durch Imatinib *in vitro* relativ stark ausgeprägt ist. Somit kann der in älteren Publikationen beschriebene antiproliferative Effekt bestätigt werden. Bei genauer Betrachtung war der Einfluss von Imatinib bei Verwendung  $c-kit^+$ -Zellen sogar deutlich größer.

## **4.2. Das KM-Engraftment nach syngener SZT bleibt von Imatinib unbeeinflusst**

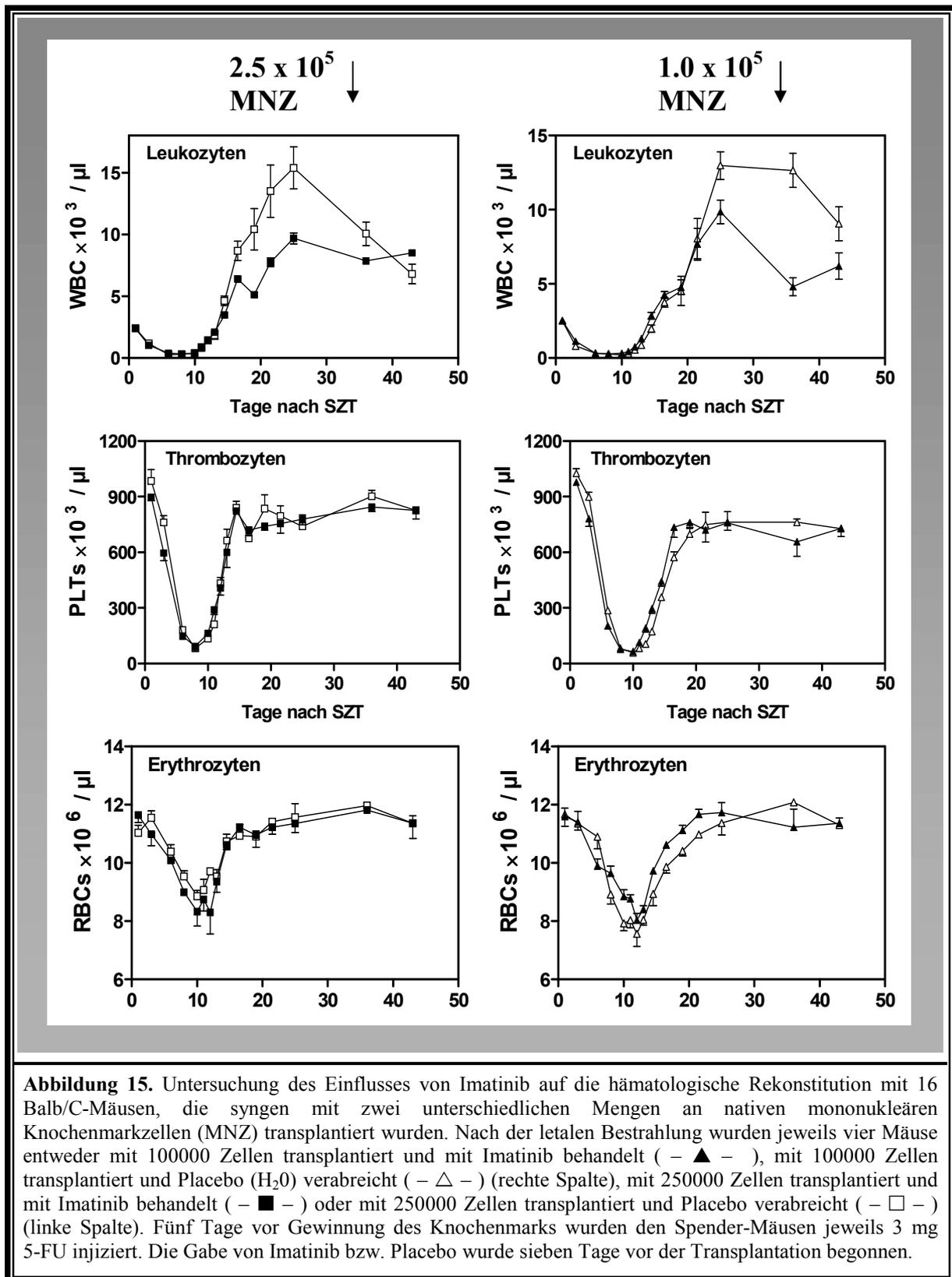
### **4.2.1. Die primäre Rekonstitution der Mäuse *in vivo* wird durch Imatinib nicht verzögert**

Ob die inhibitorischen Effekte von Imatinib auf hämatopoetische Stamm-/Progenitorzellen *in vitro* auch *in vivo* relevant sind, sollte in den nachfolgenden Untersuchungen gezeigt werden. Nach der Gewinnung von Knochenmarkzellen aus männlichen Spendermäusen (Kap. 3.4.1.), die mit 5-FU behandelt wurden, konnten 16 letal bestrahlte (800 rad), weibliche Empfängeräuse (16-20 Wochen alt) entweder mit  $1 \times 10^5$  oder mit  $2,5 \times 10^5$  mononukleären KM-Zellen syngen transplantiert werden. 7 Tage vor Tx war bereits damit begonnen worden, jeweils 8 Empfängeräusen zweimal täglich 0,5 mg Imatinib (50 mg/kg/d) oder 0,1 ml Placebo zu applizieren. Somit sollten spätestens am Tag der Tx therapeutische Plasmaspiegel



**Abbildung 14.** Mikroskopische Darstellung einzelner CFUs bei stärkerer Vergrößerung (30x – 120x). In der linken Spalte ist das Wachstum Sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Zellen dargestellt, während rechts Sca1<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Zellen in MZ-Medium inkubiert wurden. (A) Ohne eine Zugabe von Imatinib entstehen große CFU-GEMMs. (B) Bei Zugabe von 5,0 μM Imatinib bleiben die Kolonien deutlich kleiner. Neben CFU-GEMMs kommt es hier auch zum Auftreten von CFU-GMs sowie von Kolonien mit megakaryozytärem Charakter (re. unten).

vorliegen. Im Vergleich zu den klinisch üblichen Dosierungen von 300 – 1000 mg/d (3-15 mg/kg/d) wurde auf Grund erster pharmakokinetischer Studien mit Bcr-Abl-positiven Mäusen (Druker et al., 1996; le Coutre et al., 1999) eine relativ hohe Dosis gewählt. Auch aus unseren Erfahrungen bei der Untersuchung von Resistenzmechanismen im retroviralen Transduktions-



und Transplantationsmodell konnten wir schließlich ableiten, dass durch die Gabe von 2 x 0,5 mg/d therapeutische Plasmaspiegel erreicht werden können. Vor wenigen Monaten wurden nun erste Ergebnisse von HPLC/MS-Untersuchungen nach Gabe von 150 mg/kg/d Imatinib publiziert. Es konnten dabei sogar Plasmaspiegel von 11,8  $\mu$ M gemessen werden (Wolff et al., 2003). Imatinib wurde außerdem zweimal täglich verabreicht, weil die Halbwertszeit in Mäusen im Vergleich zu Menschen kürzer ist (Gambacorti-Passerini et al., 2000).

Die Ergebnisse in Abb. 15 zeigen interessanterweise keine Verzögerung der hämatologischen Rekonstitution bei Gabe von therapeutischen Imatinib-Dosen. Ebenso wie bei allen Kontrollmäusen kam es bei einer Gabe von 1 mg/d Imatinib bereits nach wenigen Tagen zur primären Kurzzeit-Rekonstitution. Das Blutbild normalisierte sich fast vollständig nach 14 – 16 Tagen. Allein die Leukozytenzahl erreichte erst nach 16 – 18 Tagen physiologische Werte. Festzustellen ist auch, dass es bei der Rekonstitution der Leukozyten zu einer mäßigen Hyperregeneration innerhalb der Placebo-Gruppe kam. Möglicherweise konnte hier Imatinib einen gewissen inhibitorischen Effekt ausüben.

Der Verlauf der hämatologischen Regeneration kann auch bereits Hinweise auf die Langzeit-Rekonstitution geben. Die kontinuierliche Analyse der Blutbilder zeigt, dass bei allen Mäusen bis 43 Tage nach Tx kein Abfall der Zellzahlen in allen Zelllinien auftrat.

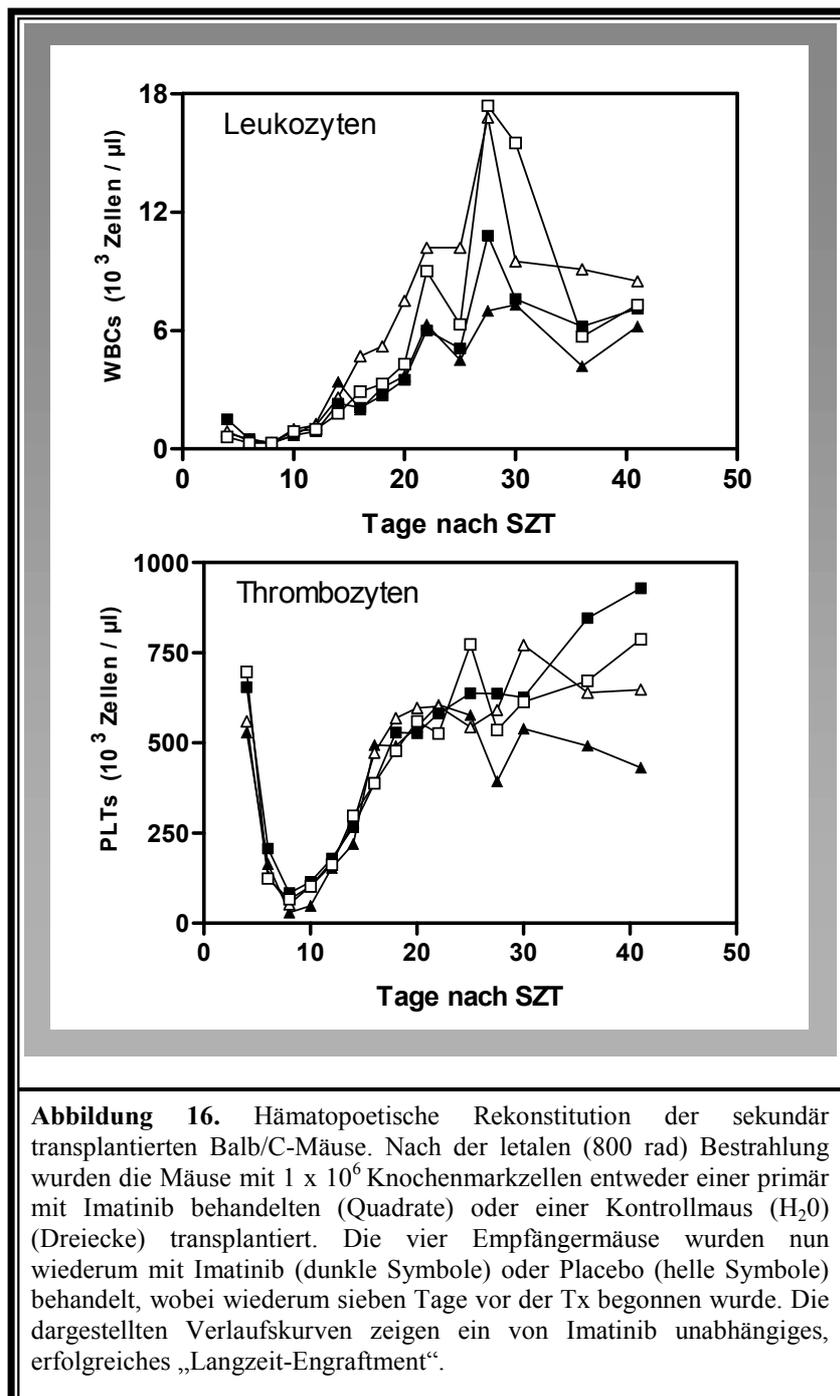
Als letzten wichtigen Befund kann man aus der Regenerationskinetik ablesen, dass die Zeit bis zur vollständigen Rekonstitution in Übereinstimmung mit älteren Studien (Weissman, 2000) vor allem von der Anzahl der transplantierten mononukleären Zellen abhängt. Durchschnittlich kam es nach Tx von nur 1 x 10<sup>5</sup> MNZ zu einer Verzögerung der Rekonstitution von etwa zwei Tagen (Abb. 15, vgl. linke und rechte Spalte).

#### 4.2.2. Nach sekundärer Tx ist kein Einfluss auf das Langzeit-Engraftment nachweisbar

Um die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen ersten Hinweise auf ein ausreichendes Langzeit-Engraftment näher zu untersuchen, wurden mononukleäre KM-Zellen sowohl einer primären, mit Imatinib behandelten Maus, als auch einer Kontrollmaus sekundär transplantiert. So konnte eine erfolgreiche Langzeit-Rekonstitution und damit das Vorliegen einer ausreichenden Zahl so genannter Langzeit-HSZs (LZ-HSZs), welche kontinuierlich Kurzzeit-HSZs hervorbringen, der primär transplantierten Mäuse bewiesen werden. Außerdem konnten kumulative Effekte einer Imatinib-Behandlung auf das Überleben hämatopoetischer Stammzellen untersucht werden. Wiederum wurde nämlich jeweils eine von zwei sekundär transplantierten Mäusen mit Imatinib behandelt, während die Zweite jeweils nur Placebo (100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) erhielt.

Für die Rekonstitution der insgesamt vier weiblichen, letal bestrahlten, syngenen Empfängermäuse wurden hier etwa 1 x 10<sup>6</sup> mononukleäre KM-Zellen der nicht mit 5-FU behandelten primär transplantierten Mäuse eingesetzt. Es waren mehr Zellen nötig, weil der

relative Anteil der HSZ ohne zytostatische Vorbehandlung natürlich deutlich niedriger liegt.



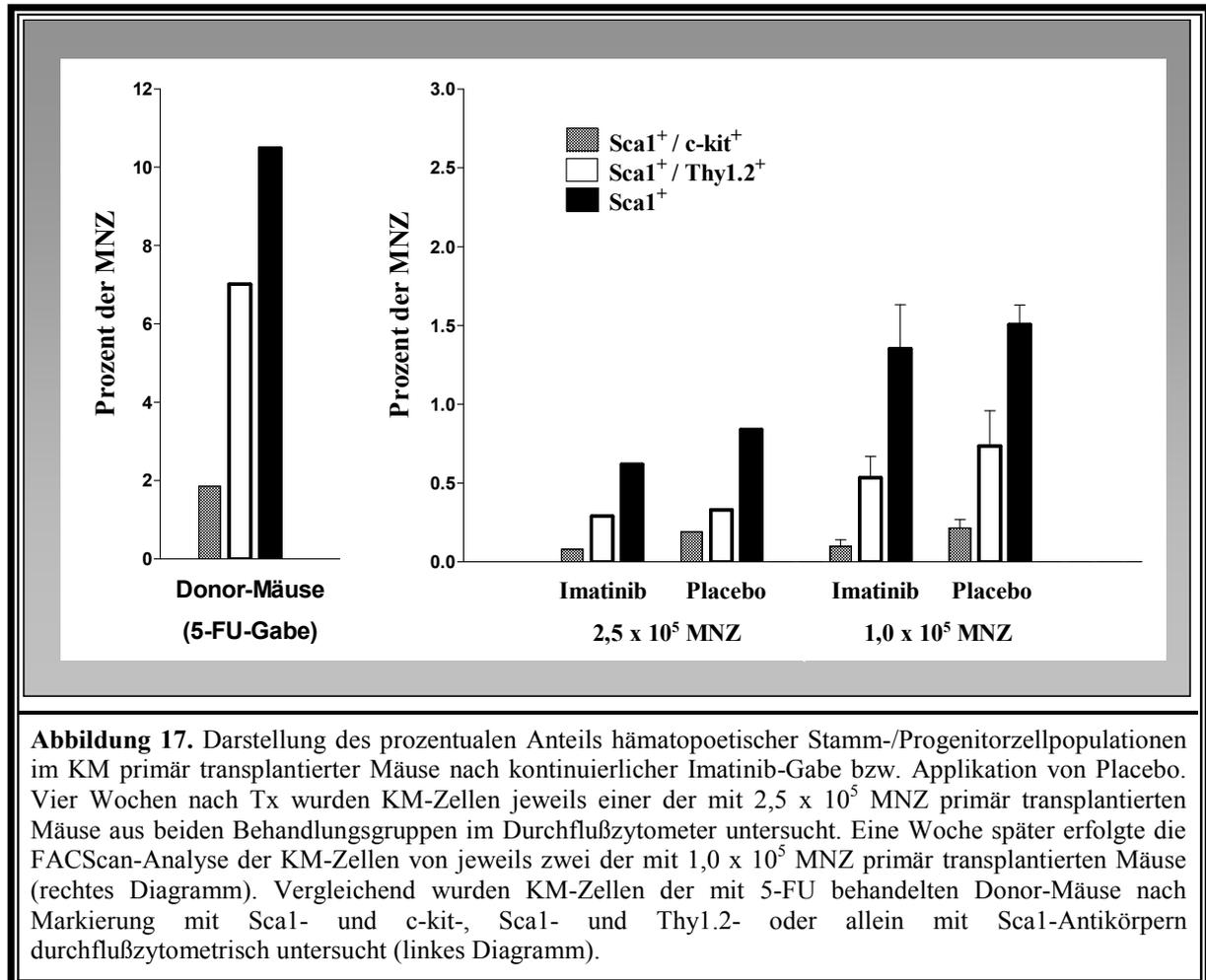
Wiederum zeigt sich keine Verzögerung der hämatologischen Rekonstitution der vier sekundär transplantierten Balb/C-Mäuse. Unabhängig von einer Imatinib-Behandlung der primär transplantierten Mäuse kommt es fast zum identischen Zeitpunkt nach Tx zur Regeneration aller hämatopoetischer Zelllinien (Abb. 16). Der Verlauf der Erythrozyten-Regeneration folgt, obwohl hier nicht dargestellt, einer ähnlichen Kinetik. Außerdem kommt es auch hier zu keinem sekundären Abfall der Zellzahlen. Alle Mäuse zeigen ein erfolgreiches LZ-Engraftment und leben länger als 150 Tage.

Insgesamt kann man so auf das Vorliegen einer ähnlichen Zahl hämato-

poetischer Stammzellen der primär transplantierten Mäuse 43 Tage nach Tx schließen. Nur bei Tx einer unterschiedlichen Menge an HSZ wäre hier als Hinweis auf ein unvollständiges LZ-Engraftment der primär transplantierten Mäuse eine verzögerte Rekonstitution zu erwarten gewesen. Auch kumulativ, d.h. nach Imatinib-Behandlung sowohl der primär als auch der sekundär transplantierten Maus (—■—), zeigt sich kein inhibitorischer Effekt auf das KM-Engraftment und die Langzeit-Rekonstitution in vivo.

## 4.2.3. FACScan-Analyse des Anteils von HSZ im KM primär transplantiert Mäuse

Schließlich konnte der Anteil hämatopoetischer Stamm-/Progenitorzellen und damit der Einfluss einer kontinuierlichen Imatinib-Therapie auf das Engraftment und die Proliferation dieser Zellen durchflußzytometrisch quantifiziert werden (Abb. 17).



Zunächst wurde der prozentuale Anteil Sca1- und c-kit-, Sca1- und Thy1.2- sowie allein Sca1-exprimierender KM-Zellen der mit 5-FU behandelten Donor-Mäuse durch FACScan-Analyse bestimmt (Kap. 3.4.8.). Vier bzw. fünf Wochen nach Tx wurde diese Untersuchung schließlich auch bei insgesamt sechs primär transplantiert Mäusen durchgeführt. So konnte durch den Vergleich der relativen Anteile hämatopoetischer Stammzellen von jeweils insgesamt drei Mäusen der Imatinib-Behandlungsgruppe sowie der Placebo-Gruppe eine Aussage über einen möglichen Einfluss einer kontinuierlichen Imatinib-Gabe auf die Anzahl hämatopoetischer Stammzellen gemacht werden. Gleichzeitig wurde damit ein erfolgreiches LZ-Engraftment bestätigt.

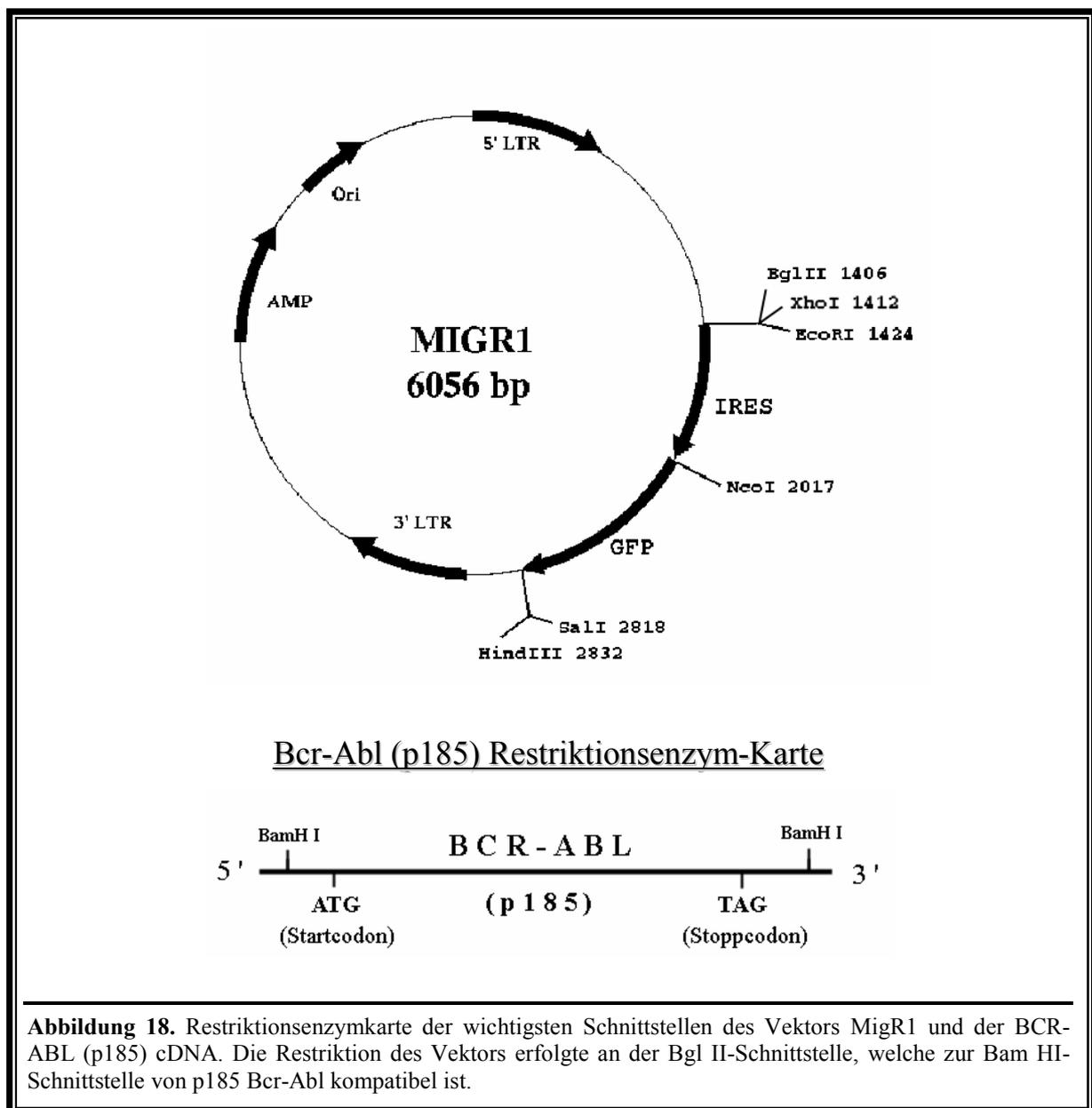
Fünf Tage nach der Gabe von 3 mg 5-FU lag der prozentuale Anteil Sca1<sup>+</sup>-Zellen der männlichen Donor-Mäuse bei 10,49%. Bei 7,02% der MNZ handelte es sich um Sca1<sup>+</sup>/Thy1.2<sup>+</sup>-

Zellen, während nur 1,86% die Antigene Sca1 und c-kit exprimierten. Ohne zytostatische Vorbehandlung sowie bereits vier bzw. fünf Wochen nach der syngenen SZT lagen diese Zahlen deutlich niedriger. Die Untersuchung jeweils einer der mit  $2,5 \times 10^5$  MNZ primär transplantierten Mäuse aus beiden Behandlungsgruppen vier Wochen nach Tx ergab einen prozentualen Anteil Sca1<sup>+</sup>-Zellen von 0,62% (Imatinib-Gruppe) bzw. 0,84% (Placebo-Gruppe). Eine Woche später wurden KM-Zellen von jeweils zwei der mit  $1,0 \times 10^5$  MNZ transplantierten Mäuse durchflußzytometrisch untersucht, wobei der Anteil Sca1<sup>+</sup>-Zellen hier bereits etwas höher bei 1,08 (Imatinib) bzw. 1,38% (Placebo) lag. Der insgesamt höhere Anteil hämatopoetischer Stammzellen dieser mit nur  $1,0 \times 10^5$  MNZ transplantierten Mäuse muss auf den späteren Untersuchungszeitpunkt sowie auf Variationen der Untersuchungsbedingungen zurückgeführt werden. Der prozentuale Anteil der beiden anderen Stammzellpopulationen lag entsprechend niedriger (Abb. 17).

Insgesamt bleibt nach diesen Untersuchungen festzustellen, dass eine kontinuierliche Gabe von Imatinib möglicherweise einen minimalen Einfluss auf das LZ-Engraftment und damit die Proliferation der Stammzellen in vivo ausübt. In der FACScan-Analyse zeigen alle drei mit Imatinib behandelten Mäuse eine nicht signifikante Reduktion des relativen Anteils aller Stammzellpopulationen. Diese wirkt sich aber nicht negativ auf die Rekonstitution und das Engraftment nach SZT aus.

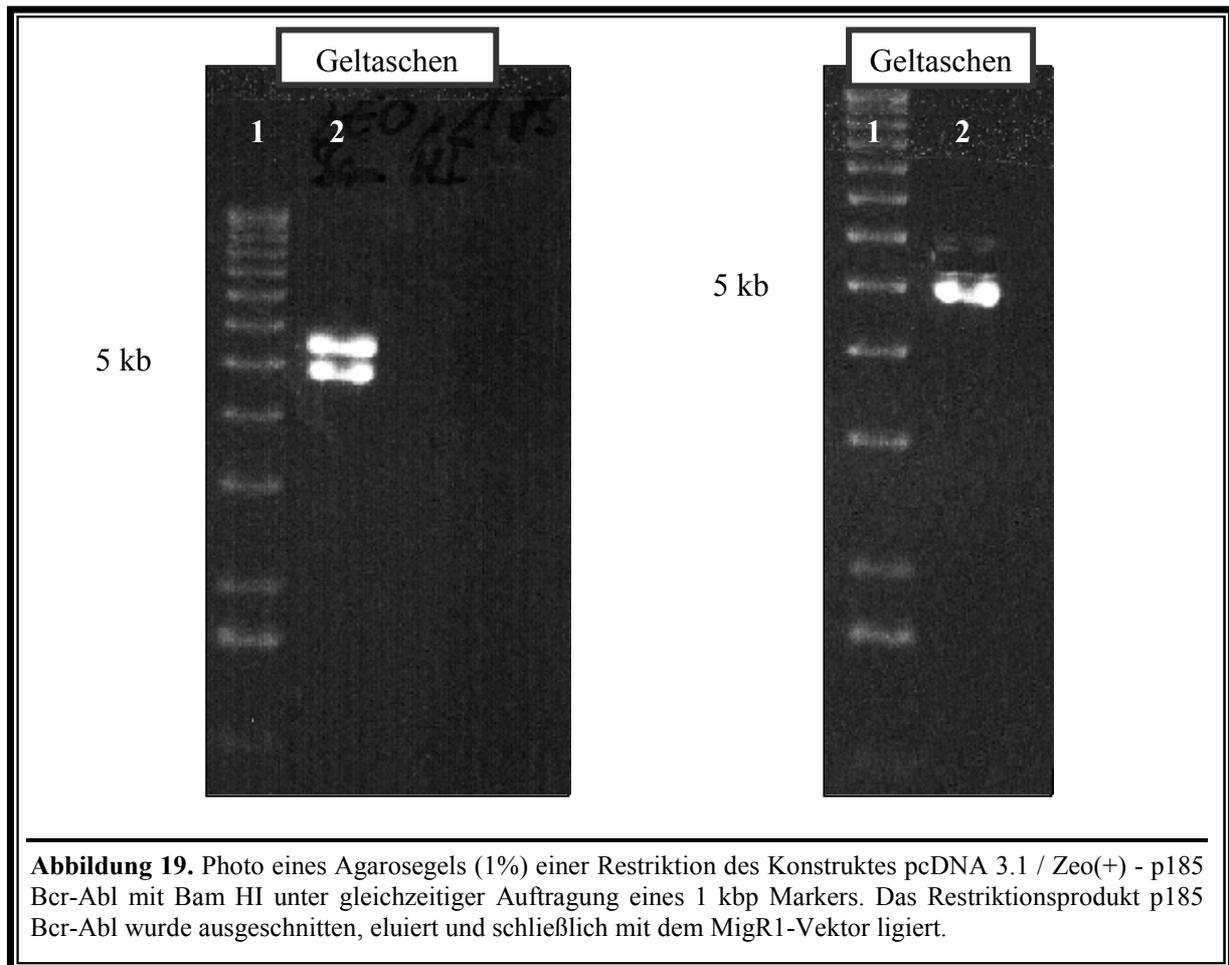
### 4.3. Klonierung des Vektors Mig Bcr-Abl (Mig p185)

Für die Etablierung eines CML-Maus-Modells musste zunächst die Gensequenz von p185 Bcr-Abl in einen retroviralen Vektor umkloniert werden, der u.a. auch die Verpackungssequenz Y kodiert. Der Vektor MigR1 enthält auch eine IRES- sowie eine EGFP-Sequenz. Somit ist eine Detektion aller erfolgreich transfizierten bzw. infizierten Zellen im Durchflußzytometer oder im Fluoreszenzmikroskop möglich (Pear et al., 1998). Die “internal ribosome entry site” (IRES) vermittelt dabei als internes Translationssignal die Anlagerung des Ribosoms sowie bestimmter Translationsfaktoren und damit die Translation der Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP).



Die Klonierung der Gensequenz von p185 Bcr-Abl in die MCS des Vektors MigR1 erfolgte

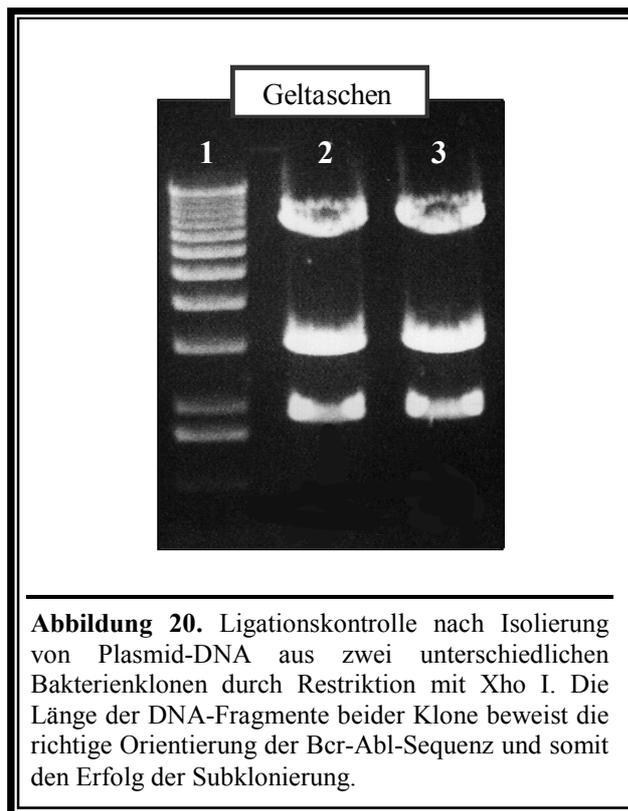
mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bam HI und Bgl II, welche zueinander kompatibel sind. Zunächst musste aber die Sequenz p185 Bcr-Abl durch Restriktionsverdau des Konstruktes pcDNA 3.1 / Zeo(+) - p185 Bcr-Abl (10730 bp) gewonnen werden. Dabei wurde das Konstrukt, das jeweils eine Bam HI-Schnittstelle am 3'- und am 5'-Ende der Bcr-Abl-Sequenz kodiert (Abb. 18), mit dem Restriktionsenzym Bam HI geschnitten und anschließend die 5715 bp große cDNA mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese isoliert (Abb. 19).



**Abbildung 19.** Photo eines Agarosegels (1%) einer Restriktion des Konstruktes pcDNA 3.1 / Zeo(+) - p185 Bcr-Abl mit Bam HI unter gleichzeitiger Auftragung eines 1 kbp Markers. Das Restriktionsprodukt p185 Bcr-Abl wurde ausgeschnitten, eluiert und schließlich mit dem MigR1-Vektor ligiert.

Gleichzeitig konnte der Vektor MigR1 mit Hilfe des Enzyms Bgl II geschnitten und damit linearisiert sowie am 5'-Ende dephosphoryliert werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Klonierungsvektors wurde damit deutlich reduziert (Kap. 3.1.2.). Die Fertigstellung des rekombinanten Vektors MigR1 Bcr-Abl (Mig p185) erfolgte schließlich durch Ligation der linearisierten Vektor-DNA mit dem p185 Bcr-Abl-Fragment, das in die Bgl II-Schnittstelle inkloniert wurde (Kap. 3.1.5.).

Die erfolgreiche Subklonierung und die richtige Orientierung der Bcr-Abl-Sequenz innerhalb des Vektors musste aber durch erneute Restriktion überprüft werden. Dazu waren mehrere Schritte nötig: eine Hitzeschock-Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz, das



**Abbildung 20.** Ligationskontrolle nach Isolierung von Plasmid-DNA aus zwei unterschiedlichen Bakterienklonen durch Restriktion mit Xho I. Die Länge der DNA-Fragmente beider Klone beweist die richtige Orientierung der Bcr-Abl-Sequenz und somit den Erfolg der Subklonierung.

Ausstreichen der Lösung auf LB-Agarplatten, die Kultivierung einzelner Bakterienklone so wie die Isolierung der Plasmid-DNA (Mini-Präparation, Kap. 3.1.6.). Eingesetzt wurde dabei das Restriktionsenzym Xho I, das einmal in der MCS des Vektors MigR1 (Abb. 18) sowie zweimal in der p185 Bcr-Abl-Sequenz (BP 770 und 3760) schneidet. Nur bei korrekter Orientierung der Bcr-Abl-Sequenz entstehen DNA-Fragmente mit einer Länge von 6820, 2990 und 1961 bp (Abb. 20).

Weil dieses Konstrukt Mig p185 nun für die retrovirale Transfektion und den Transfer des Gens Bcr-Abl geeignet war, wurden nach einem Retransformations-

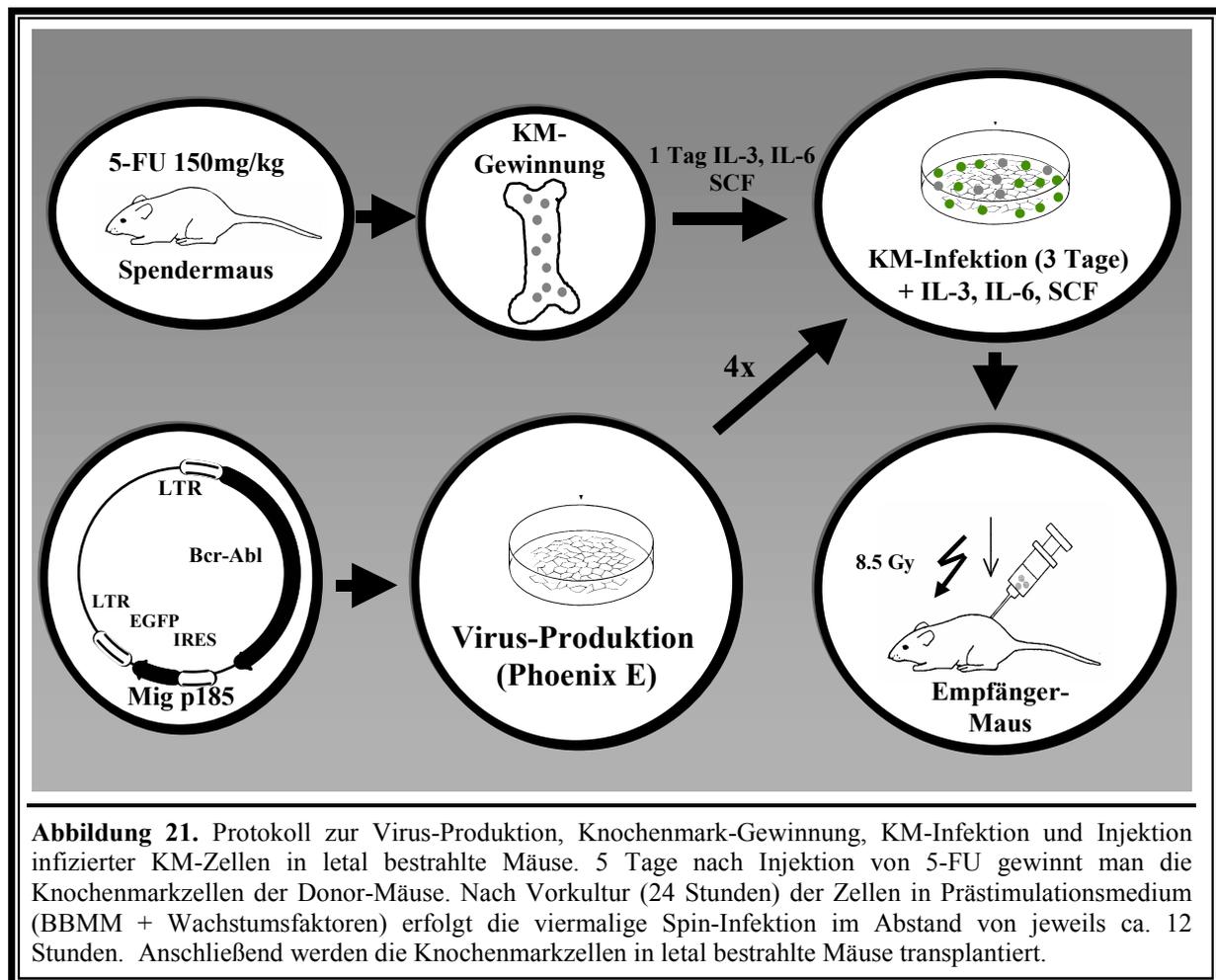
schritt und längerer Bakterienkultur durch Maxi-Präparation größere Mengen der Plasmid-DNA Mig Bcr-Abl isoliert sowie anschließend die Nukleinsäurekonzentration photometrisch bestimmt.

#### 4.4. Retroviraler Transfer des Onkogens p185 Bcr-Abl in murine Knochenmarkzellen

##### 4.4.1. Allgemeiner Überblick

Der retrovirale Gentransfer in murine Knochenmarkzellen besteht aus mehreren Schritten, die in Abb. 21 dargestellt sind. Zunächst musste nach der Klonierung des retroviralen Vektors Mig Bcr-Abl eine effiziente transiente Transfektion der Virusproduktionszelllinie Phoenix E erfolgen. Dies war die entscheidende Voraussetzung für die Produktion hoher Titer retroviraler Vektoren im Überstand (Kap. 3.3.4.). Verschiedene Methoden stehen für die Transfektion der adhären 293-Zelllinie Phoenix E zur Auswahl. Dabei haben sich die auf Calcium-Phosphat-Komplexen beruhende Methode sowie die Lipofektion gegenüber der Elektroporation und der Mikroinjektion hier als überlegen erwiesen.

Parallel zur Produktion des retroviralen Überstandes wurden frische Knochenmarkzellen aus Spendermäusen gewonnen. Diesen Mäusen wurden 5 Tage zuvor 3 mg 5-Fluoruracil verabreicht, um den relativen Anteil muriner Stamm- und Progenitorzellen zu erhöhen und diese zur Proliferation zu bringen (Kap. 3.4.1.). Nach 24 Stunden Prästimulationskultur wur-

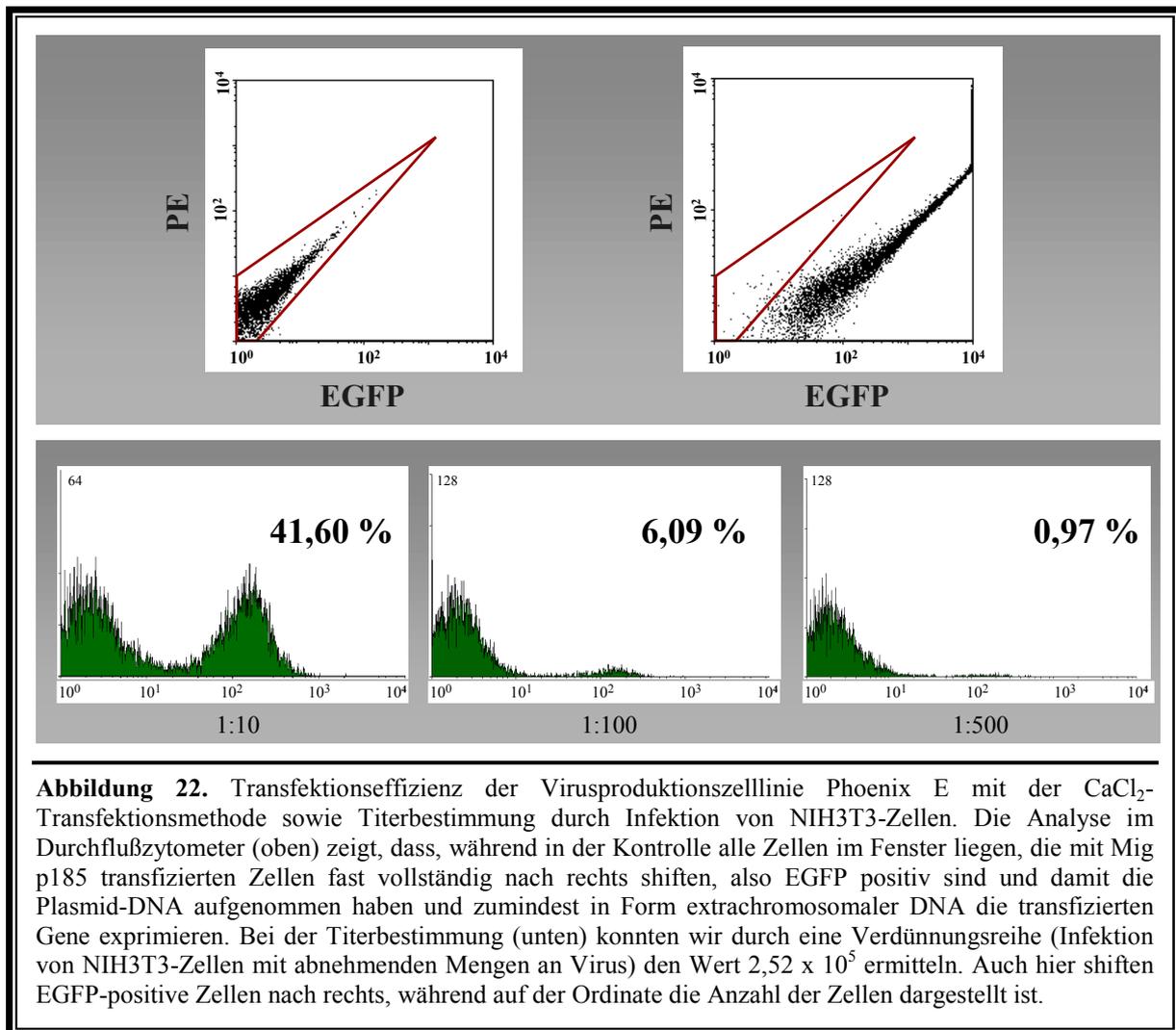


den die so gewonnenen Zellen retroviral infiziert und das Gen p185 Bcr-Abl in murine KM-Zellen transferiert. Die Infektion der Zellen erfolgte in dieser Arbeit nach dem Protokoll der „Spin-Infektion“ (Kap. 3.4.3.). Nach Bestrahlung der Empfängermause (800 rad) konnten die infizierten, EGFP-positiven KM-Zellen schließlich intravenös transplantiert werden.

#### 4.4.2. Gewinnung von retroviralem Überstand und Bestimmung des Titors

Die Effizienz der transienten Transfektion der Virus-Produktionszelllinie Phoenix E konnte nach Gewinnung des retroviralen Überstandes bestimmt werden. Dabei sollte der Anteil EGFP-positiver, erfolgreich transfizierter Zellen bei der durchflußzytometrischen Analyse unabhängig von der verwendeten Transfektionsmethode deutlich größer als 50% sein. Wünschenswert sind Werte zwischen 85% und 100%, welche insbesondere durch liposomale Transfektion häufig erzielt wurden. Aber auch mit der  $\text{CaCl}_2$ -Methode war eine sehr gute Effizienz möglich, was in Abbildung 22 (oben) veranschaulicht ist. Deutlich mehr als 95% der Zellen werden auf Grund der Expression des grün-fluoreszierenden Proteins nach rechts verschoben.

Eine gute Transfektionseffizienz ist die Voraussetzung für hohe retrovirale Titer im Über-

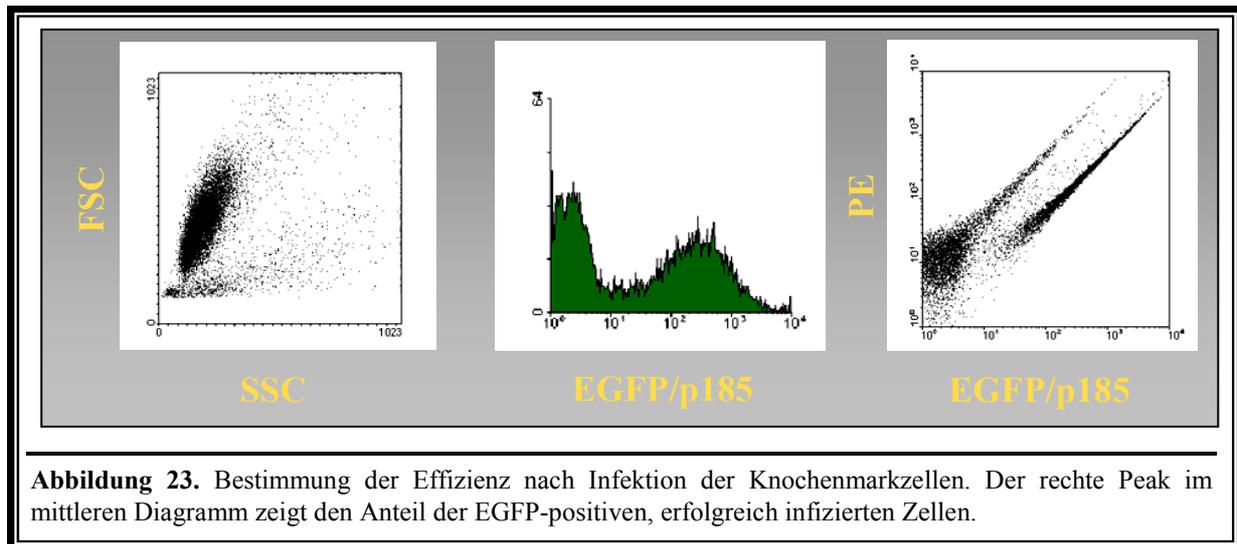


stand. Man bestimmt die Quantität der Produktion von Retroviren, d.h. den retroviralen Titer, mit Hilfe der standardisierten Infektion von NIH3T3-Zellen. In Form einer Verdünnungsreihe wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen mit unterschiedlichen Mengen Virus-Überstand inkubiert (Kap. 3.3.5.). Der Anteil der erfolgreich infizierten NIH3T3-Zellen konnte schließlich FACS-analytisch bestimmt (Abb. 22, unten) und so der Titer berechnet werden (Kap. 3.3.6.). Weil dieser Titer ( $2,52 \times 10^5$ ) den aus Vorversuchen empirisch ermittelten Schwellenwert  $1 \times 10^5$  deutlich überschritt, wurde nun der retrovirale Überstand für die Infektion frischer muriner KM-Zellen eingesetzt.

#### 4.4.3. Retrovirale Infektion von murinen KM-Zellen

In dieser Arbeit wurde die einfachere Methode der „Spin-Infektion“ gewählt. Bei der Infektion von murinen Zellen durch Co-Kultivierung sind ähnlich gute Ergebnisse zu erzielen, jedoch ist die Methode aufwendiger und die Kontaminationsrate mit Producer-Zellen hoch. Wie in Kapitel 3.4.3. beschrieben, wurden die KM-Zellen viermal mit frischem retroviralem

Überstand versetzt und anschließend jeweils bei 2000 rpm 90 min. zentrifugiert. Nach Abschluss der Zyklen konnte durch FACScan-Analyse der prozentuale Anteil an EGFP-positiven und damit erfolgreich infizierten murinen KM-Zellen ermittelt werden. Abb. 23 zeigt das Ergebnis einer sehr erfolgreichen Infektion. 39% aller Zellen exprimieren EGFP



und somit auch p185 Bcr-Abl. Mit Hilfe dieser Ph<sup>+</sup>, transformierten KM-Zellen war es nun möglich, nach Transplantation von Empfängermäusen ein CML-ähnliches Syndrom zu induzieren.

#### 4.5. Entwicklung eines CML ähnlichen Syndroms nach Tx von Balb/c-Mäusen

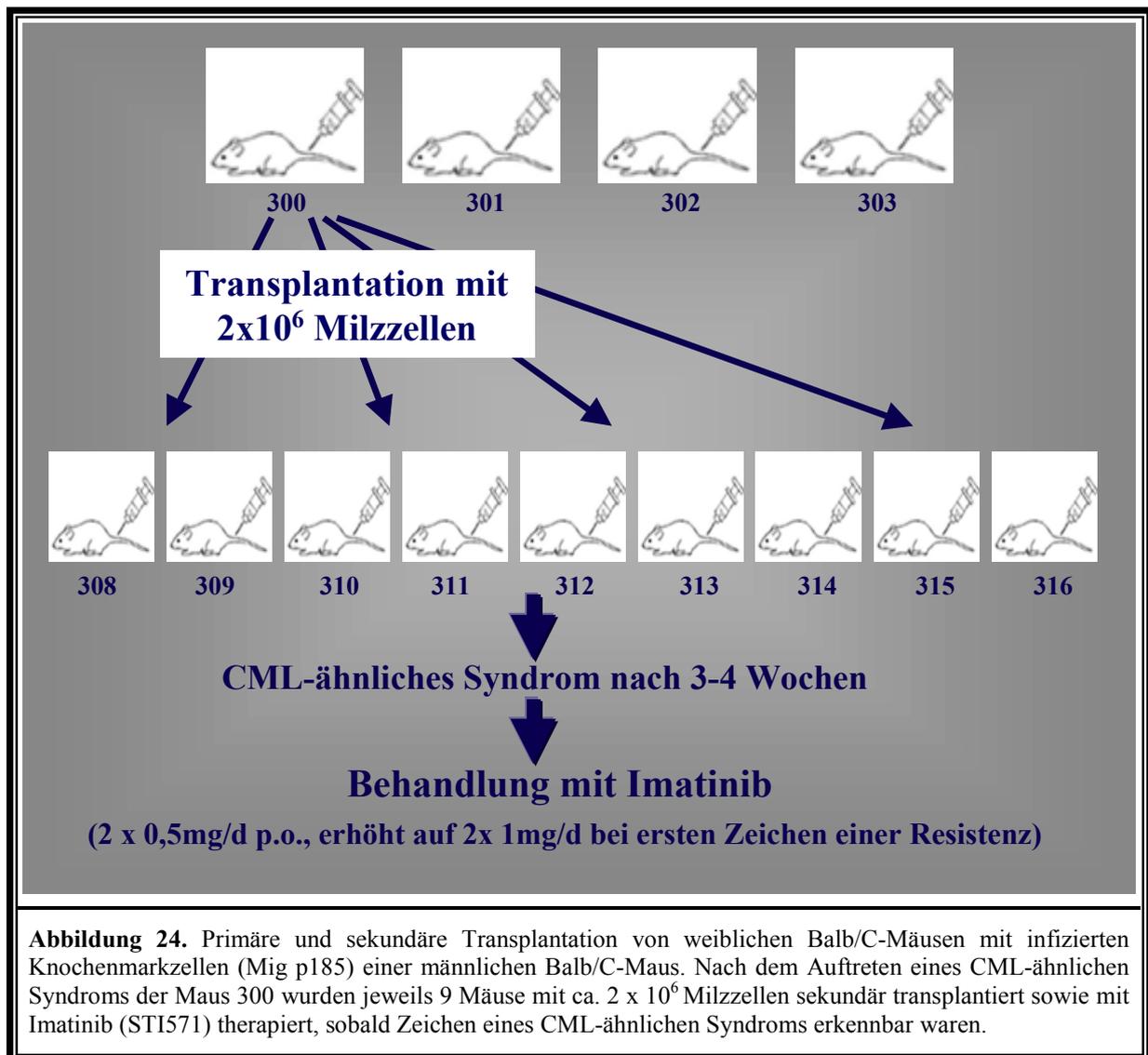
##### 4.5.1. Schema der primären und seriellen Tx mit infizierten KM-Zellen (Mig Bcr-Abl)

Initial wurden vier weibliche Balb/C-Mäuse (300 – 303) mit etwa  $4,0 \times 10^5$  EGFP-positiven, frisch infizierten KM-Zellen transplantiert. Bei 39% erfolgreich infizierten Zellen entspricht dies der intravenösen Injektion von ca.  $1 \times 10^6$  KM-Zellen in eine Schwanzvene. Zuvor waren die Empfängermäuse mit einer Dosis von 800 rad bestrahlt und schließlich im Infrarotlicht aufgewärmt worden, was die Injektion deutlich vereinfachte.

Unter intensivem Monitoring konnte etwa 2 Wochen nach der Transplantation p185 Bcr-Abl-positiver KM-Zellen die Entwicklung eines CML-ähnlichen Syndroms diagnostiziert werden (Kap. 3.4.6.). Meist war auch die rasche Vergrößerung der Milz hinweisend auf das Vorliegen eines induzierten chronisch myeloischen Syndroms, was auch bei CML-Patienten das häufigste Symptom bei der körperlichen Untersuchung darstellt (Sawyers, 1999).

Nachdem diese Induktion eines CML-ähnlichen Syndroms im Maus-Modell mit Hilfe des retroviralen Transfers des Gens p185 Bcr-Abl gelungen war und sich diese Methodik damit als erfolgreich erwiesen hatte, konnte eine primär transplantierte Maus seriell transplantiert

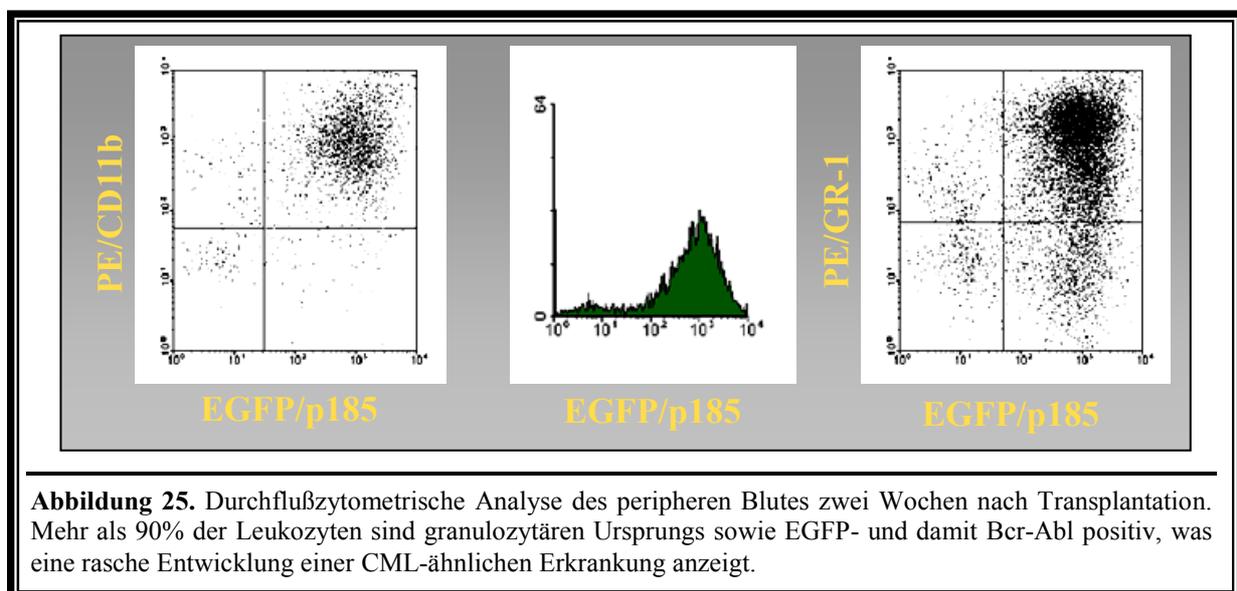
werden (Abb. 24). Wie in Kapitel 3.4.7. beschrieben, wurde die Milz einer Maus mit CML-ähnlichem Syndrom zunächst bis zur Zellsuspension verkleinert. Abschließend wurden jeweils etwa  $2 \times 10^6$  Milzzellen in 200  $\mu$ l HBSS-Medium aufgenommen und daraufhin 9 Mäuse seriell transplantiert. Diese Zahl gleichzeitig seriell transplanteder Mäuse war notwendig, um eine statistische Aussagekraft bei der Untersuchung einer Resistenzentwicklung gegen Imatinib zu erzielen.



Die Therapie mit 2 x 0,5 mg Imatinib täglich wurde nach dem Auftreten erster Symptome eines CML-ähnlichen Syndroms, d.h. etwa  $26 \pm 8$  d nach der Transplantation, begonnen. Obwohl initial alle Mäuse ein hämatologisches Ansprechen zeigten, traten Zeichen der Resistenz mit unterschiedlicher Latenzzeit auf. Die Dosis wurde dann auf 2 x 1,0 mg/d erhöht.

#### 4.5.2. Monitoring und FACScan-Analyse des PB vor Beginn einer Therapie mit Imatinib

Unmittelbar nach der Transplantation, also vor Entwicklung eines CML-ähnlichen Syndroms, wurde begonnen, etwa dreimal wöchentlich ein Blutbild sowie in unregelmäßigen Abständen Blutausstriche anzufertigen. Diese konnten u.a. auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden (Kap. 4.3.3. und 4.4.). Das wichtigste diagnostische Kriterium war aber schließlich die FACScan-Analyse des peripheren Blutes (Abb. 25). Die Zellen wurden dabei mit zellspezifischen, Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend im Durchflußzytometer detektiert. Das hier dargestellte Histogramm (Mitte) sowie die beiden Dot-Plot-Diagramme zeigen, dass mehr als 90% der Zellen des peripheren Blutes von Maus 300 EGFP-positiv waren, d.h. mehr als 90% das Onkogen p185 Bcr-Abl exprimierten, und gleichzeitig auf ihrer Oberfläche granulozytäre Antigene aufwiesen.

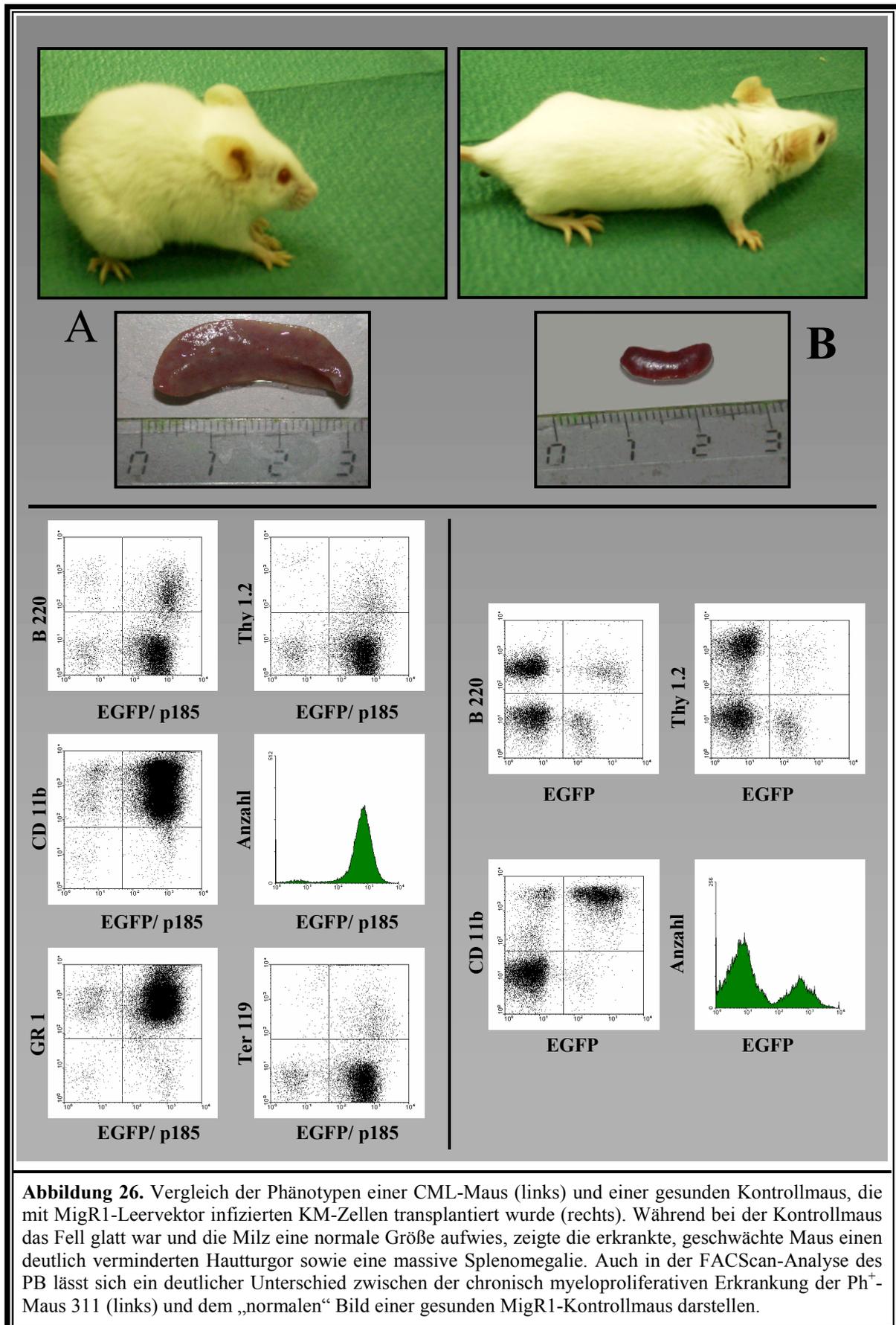


Während das Antigen CD11b primär in Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert wird, korreliert die Expression des Antigens GR 1 (Ly-6G) direkt mit der Granulozyten-Differenzierung und -Reifung. Im peripheren Blut erkennt der Antikörper gegen GR 1 spezifisch EGFP-positive, Bcr-Abl-exprimierende neutrophile Granulozyten. Diese Zellen waren hingegen gleichzeitig negativ für B220 (B-Lymphozyten), Thy1.2 (T-Lymphozyten) und c-kit (Mastzellen und unreife hämatopoetische Vorläuferzellen). Das Profil im FACScan weist also deutlich auf das Vorliegen eines CML-ähnlichen Syndroms hin.

#### 4.5.3. Vergleich der Phänotypen einer CML-Maus und einer gesunden Kontrollmaus

Zum Ausschluss von methodischen Ursachen der Entwicklung einer malignen myeloischen Erkrankung sowie zum Vergleich des Phänotyps einer CML-Maus mit einer Kontrollgruppe,

wurden drei Mäuse mit KM-Zellen transplantiert, welche mit dem Konstrukt MigR1-Leervek-



tor-IRES-EGFP infiziert wurden. Die Kontrollmäuse überlebten auch ohne Therapie mit Imatinib mindestens ein halbes Jahr.

Phänotypisch unterschieden sich eine an einem CML-ähnlichen Syndrom erkrankte Maus und eine gesunde Kontrollmaus insbesondere in ihrer Mobilität, ihrer Körperhaltung, dem Aussehen ihres Felles, sowie der Größe ihrer Milz. Außerdem zeigten erkrankte Mäuse insbesondere im Endstadium eine deutlich erhöhte Respirationsrate, was im Rahmen dieser Arbeit nicht quantifiziert, aber bereits in älteren Publikationen beschrieben wurde (Wolff et al., 2001). Dieses Symptom ließ auf pulmonale Einblutungen infolge massiver granulöser Infiltration schließen, was in den meisten Fällen die wahrscheinliche, autopsisch nachweisbare Todesursache war.

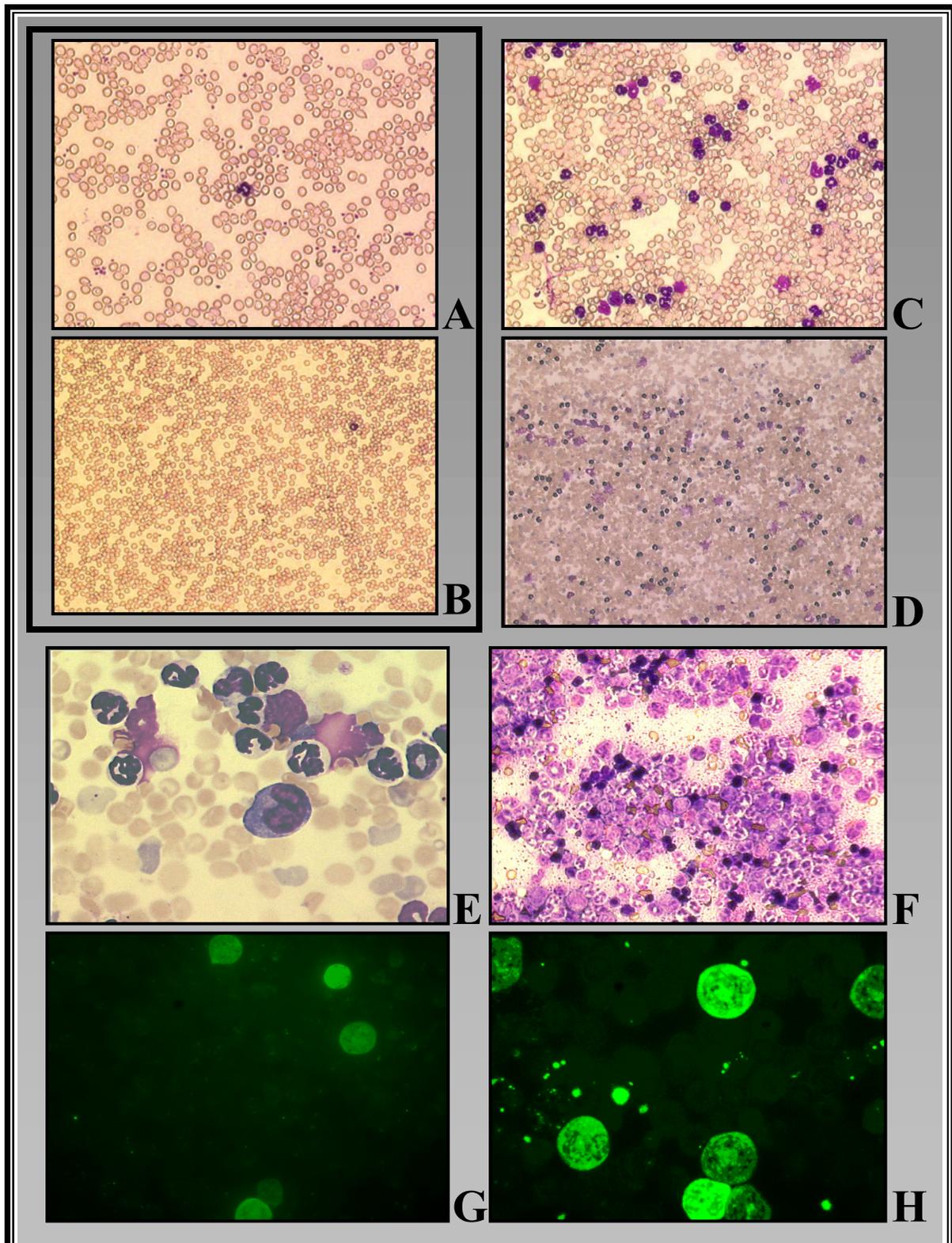
Mäuse mit einer CML-ähnlichen Erkrankung waren in ihrer Mobilität deutlich eingeschränkt. Oftmals war es ihnen insbesondere im Endstadium nicht mehr möglich, die Anstrengungen der Nahrungsaufnahme zu bewältigen. Auch die Einnahme einer gekrümmten Körperhaltung wies immer auf die Progression der malignen Erkrankung hin (Abb. 26, oben links). Ein relativ frühes Symptom waren schließlich die Veränderungen ihres Felles, was auf einen deutlich verminderten Hautturgor zurückzuführen war. Bereits zu Beginn der Entwicklung des CML-ähnlichen Syndroms veränderte sich die Struktur, wobei das Fell vor allem an Glätte verlor. Bei der Untersuchung zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe auch eine massive Splenomegalie. Dabei ließ sich bei der Autopsie eine Masse von bis zu 1,2 g ermitteln, während die Masse einer Kontroll-Milz bei etwa 100 – 200 mg lag.

Insbesondere durch FACScan-Analyse ließ sich das Vorliegen einer malignen hämatopoetischen Erkrankung beweisen. Der Vergleich von durchflußzytometrischen Ergebnissen einer CML-Maus und einer Kontrollmaus zeigt vor allem, dass transformierende EGFP-positive Zellen, welche das Onkogen Bcr-Abl exprimieren, einen Selektionsvorteil gegenüber nicht infizierten Zellen besitzen, während der prozentuale Anteil an mit Leervektor infizierten EGFP-positiven Zellen im peripheren Blut transplantierte Kontroll-Mäuse stabil bleibt. Nach etwa 80 Tagen lag dieser bei 27% (Abb. 26).

Unabhängig von der EGFP-Expression trugen 35 – 45% der mononukleären Zellen der gesunden Maus die Antigene B220 bzw. Thy1.2. Das Antigen B220 wird vor allem in B-Lymphozyten exprimiert, während der Oberflächenmarker Thy1.2 auf hämatopoetischen Stammzellen und vielen peripheren T-Lymphozyten zu finden ist. Der relativ hohe Anteil an EGFP-positiven, CD11b-exprimierenden Zellen ist möglicherweise auf die Infektionsbedingungen zurückzuführen. Die KM-Zellen wurden während der Infektion mit Wachstumsfaktoren (z.B. SCF, IL-3) behandelt, welche die Zellen insbesondere in die myeloide Reihe ausdifferenzieren lassen.

Die durchflußzytometrische Analyse der CML-Maus 311 zeigte dagegen ein pathologisches Profil. EGFP-positive Zellen bildeten mit 97% die absolute Mehrheit der mononukleären

Zellen des PB. Dabei lag der Anteil EGFP-positiver neutrophiler Granulozyten bei über 95%,



**Abbildung 27.** (A) (B) Physiologische, normale Blutausstriche einer gesunden Kontrollmaus (C) (D) Ausstriche der CML-Maus 311 60 Tage nach Tx. (E) Blutaussstrich einer primär transplantierten CML-Maus bei stärkerer Vergrößerung. Auch hier zeigt sich eine deutliche relative Zunahme der Zahl granulozytärer Zellen (F) Darstellung eines KM-Ausstriches der CML-Maus 400 bei ca. 10-facher Vergrößerung (G) Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Blutaussstriches der primär transplantierten CML-Maus 300 (H) Blutaussstrich der CML-Maus 311 bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung

was den Selektionsvorteil dieser Zellpopulation zeigt. Deutlich vermindert war hingegen der Anteil B220 und Thy1.2 positiver Zellen (<10%). Der Antikörper gegen Ter119 markiert erythrozytäre Zellen, welche nach ihrer Lyse (Kap. 3.4.7.) kaum nachweisbar waren.

Auch Blut- und Knochenmarkausstriche können wichtige Hinweise auf das Vorliegen einer chronisch myeloischen Erkrankung liefern und somit helfen, den Phänotyp einer CML-Maus von einer Kontrollmaus zu unterscheiden. In Abbildung 27 (A – E) sind 5 Blutausstriche abgebildet, wobei die Ausstriche C, D und E die pathologischen Verhältnisse einer an einem CML-ähnlichen Syndrom erkrankten Maus zeigen. Im Vergleich zu den Blutausstrichen einer gesunden Kontrollmaus (A, B) ist der relative Anteil neutrophiler Granulozyten bzw. mononukleärer Zellen deutlich erhöht. Weiterhin ist hier eine größere Zahl so genannter Gumprecht'scher Kernschatten, d.h. zerquetschter Zellen, erkennbar. In Ausstrich E ist außerdem als Zeichen der pathologischen Linksverschiebung mit Auftreten unreifer granulozytopoetischer Formen ein Promyelozyt dargestellt, der in das PB ausgeschwemmt wurde.

In Abbildung 27 ist ein pathologischer KM-Ausstrich (F) einer Maus gezeigt, die an einer Imatinib-resistenten CML verstarb. Man erkennt ein hyperzelluläres Knochenmark mit gesteigerter Granulopoese und Verdrängung von Fettzellen.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie war es schließlich möglich, auf einfachem Wege den relativen Anteil EGFP-positiver Zellen im Blut- oder KM-Ausstrich zu bestimmen. In Abbildung 27 sieht man zwei fluoreszenzmikroskopische Bilder verschiedener Mäuse mit CML-ähnlicher Erkrankung, wobei jeweils die Zahl grün-fluoreszierender, leukozytärer Zellen im gezeigten Ausschnitt deutlich erhöht ist.

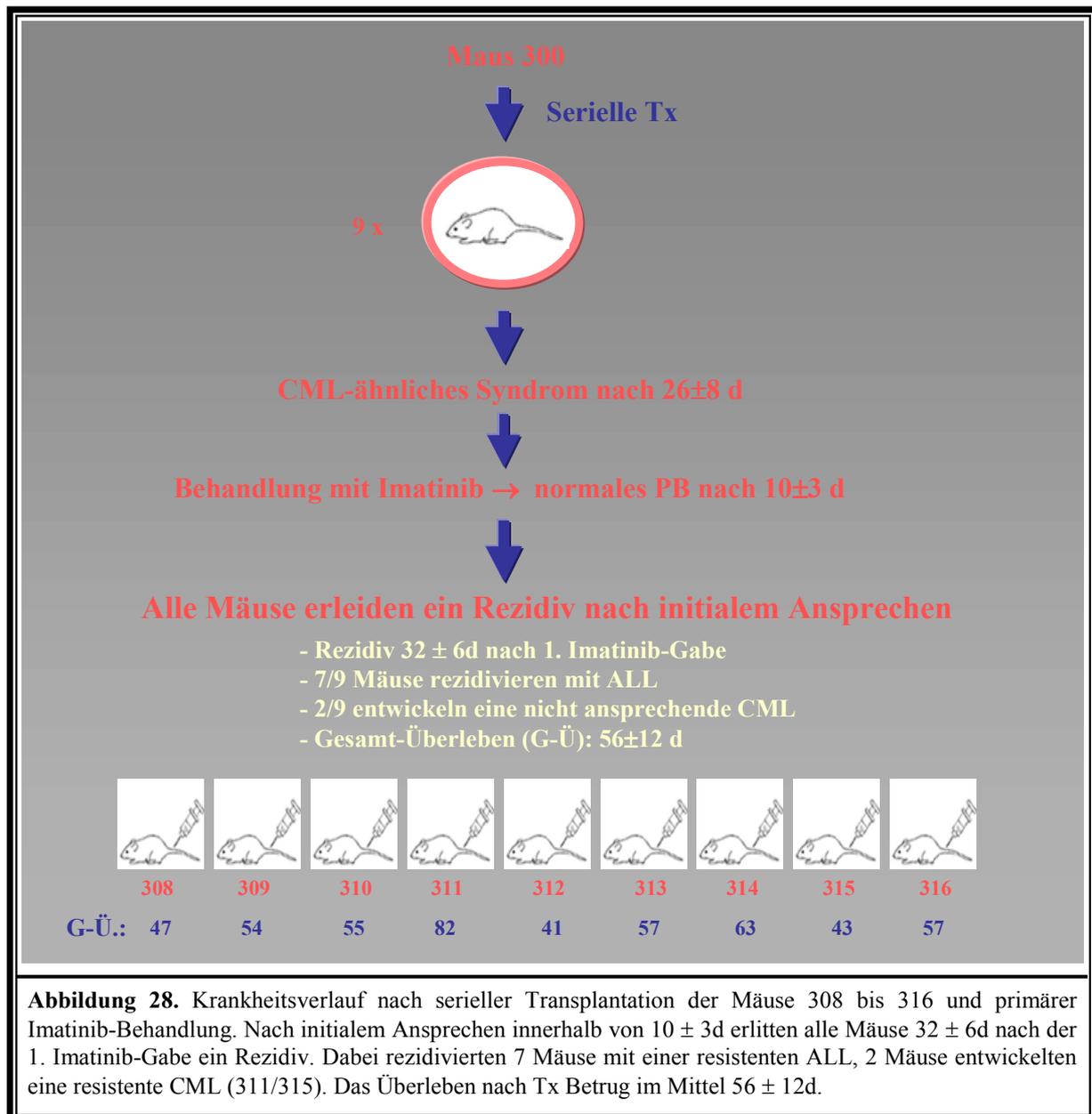
#### **4.6. Resistenzentwicklung nach initialem Ansprechen auf Imatinib**

Bei allen neun seriell transplantierten Mäusen (Kap. 4.5.1.) konnten  $26 \pm 8$  Tage nach der Tx zunächst ähnliche pathologische Befunde erhoben und damit die Entwicklung einer CML-ähnlichen Erkrankung diagnostiziert werden. Zur gleichen Zeit wurde mit der Imatinib-Therapie begonnen, wobei den Mäusen zweimal täglich 0,5 mg per os mit Hilfe einer Venenverweilkanüle appliziert wurden, was sehr gut toleriert wurde (Kap. 3.4.5.). Die Wahl der Dosis basierte vor allem auf ersten pharmakokinetischen Studien mit Bcr-Abl-positiven Mäusen (Druker et al., 1996; le Coutre et al., 1999).

Bereits  $10 \pm 3$  Tage nach Beginn der Imatinib-Behandlung normalisierte sich das Blutbild (hämatologische Remission), wobei sich die Mäuse auch klinisch verbesserten und ihr Phänotyp sich dem einer gesunden Maus wieder annäherte.

Trotz kontinuierlicher Therapie mit Imatinib kam es  $32 \pm 6$  Tage nach dem initialen An-

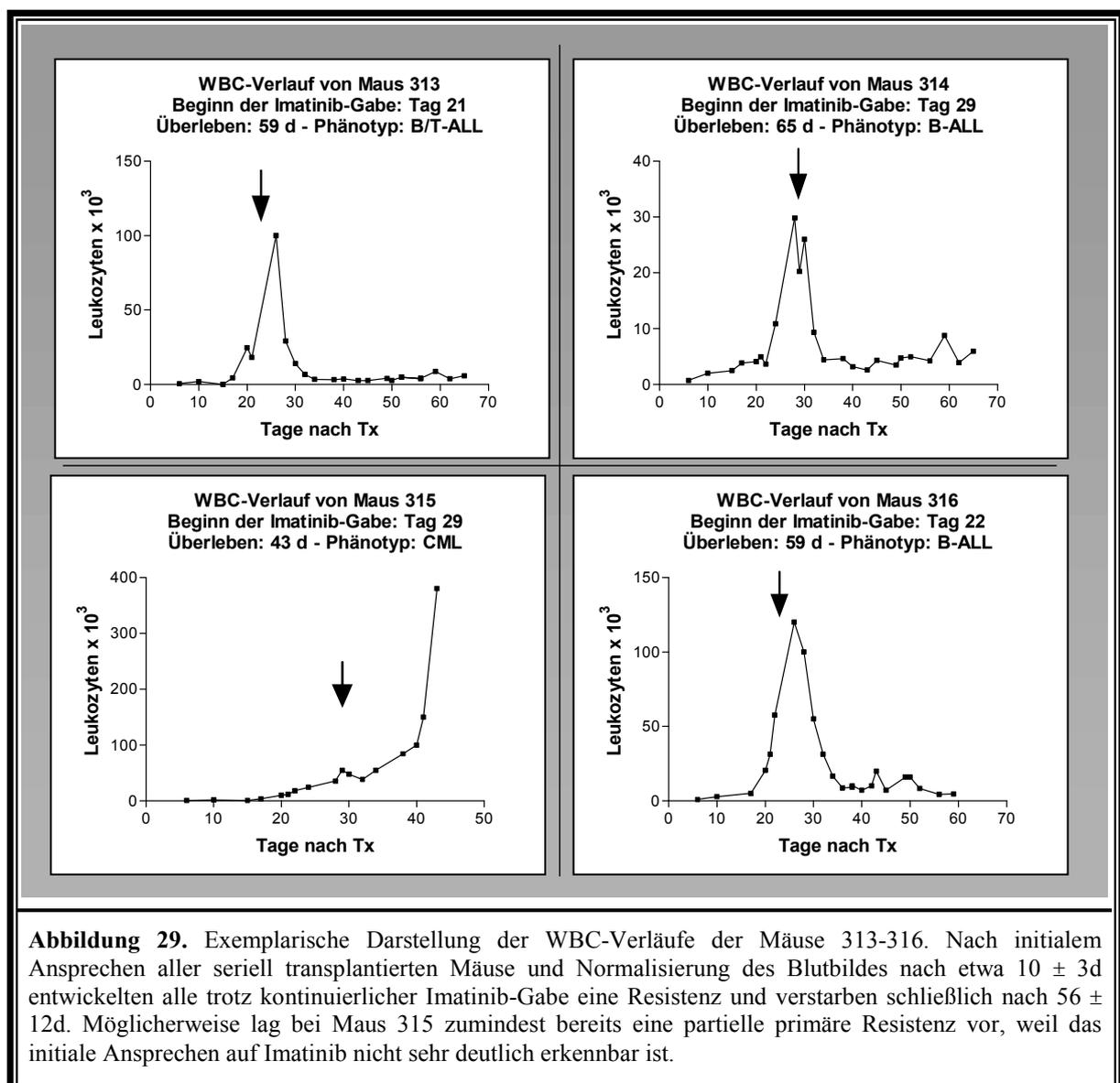
sprechen wieder zu einer klinischen Verschlechterung. Erkennbar war die Entwicklung eines Rezidivs aber nur in wenigen Fällen an der Erhöhung der Leukozytenzahl. Sieben der seriell transplantierten Mäuse rezidierten mit einer Imatinib-resistenten ALL, was sich initial meist nicht im Blutbild darstellte. Eine Progression der malignen Erkrankung konnte zunächst auf Grund klinischer Parameter beobachtet werden (Kap. 4.5.3.). Hinzu kam bei der Entwicklung von Resistenzen auch das Auftreten von Paresen der unteren Extremitäten.



Resistenzmechanismen mit erhaltener Abhängigkeit des dominanten Klons von der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase Bcr-Abl aber geringerem Ansprechen auf die initial therapeutische Imatinib-Dosis (Amplifikationen, partiell resistente Mutationen, erhöhte Expression des sauren  $\alpha_1$ -Glycoproteins) sind bekannt. Deshalb bestand die Möglichkeit,

durch Erhöhung der Dosis auf  $2 \times 1,0$  mg/d eine erneute Remission zu erreichen bzw. eine Progression der malignen Erkrankung hinauszuzögern. Dies war aber letztendlich nur in seltenen Fällen kurzfristig möglich. Insgesamt verstarben alle seriell transplantierten Mäuse nach  $56 \pm 12$  Tagen an einer progredienten resistenten leukämischen Neoplasie. Das Gesamt-Überleben jeder einzelnen Maus ist in Abbildung 28 dargestellt.

Durch kontinuierliches Monitoring des peripheren Blutbildes war es möglich, anhand der Leukozyten-Verläufe auch das hämatologische Ansprechen der Mäuse zu zeigen. Exemplarisch sind in Abbildung 29 die WBC-Verläufe der Mäuse 313 – 316 dargestellt. Auch im murinen System ist es möglich, mit Hilfe des Inhibitors der ATP-Bindungsdomäne des Onkoproteins Bcr-Abl, zumindest transiente hämatologische Remissionen zu erzielen.



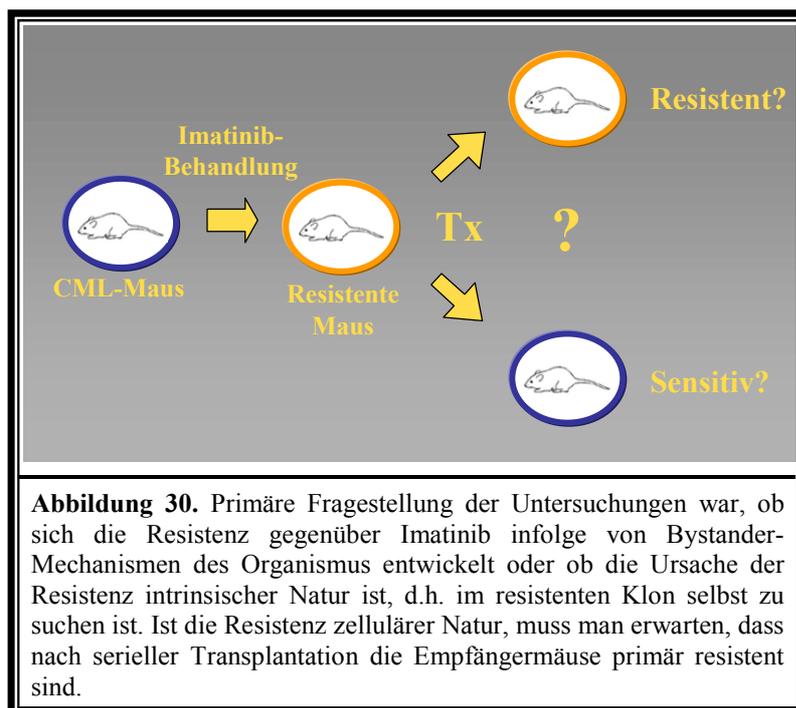
Von sehr kurzer Dauer war das partielle hämatologische Ansprechen der Maus 315. Nach dem 28 Tage nach Tx diagnostizierten Anstieg der Leukozytenzahl auf 75000 konnte durch

sofortigen Therapiebeginn nur eine Reduktion des WBC um 30000 Zellen, d.h. keine hämatologische Remission, erreicht werden. Bereits 32 Tage nach Tx kam es zum Wiederanstieg der Leukozytenzahl und so zur raschen Entwicklung einer resistenten CML-ähnlichen Erkrankung. Möglicherweise kam es hier zur Selektion eines sehr früh entstandenen resistenten Klons oder der raschen Entwicklung anderer Mechanismen. Das Vorliegen einer primären partiellen Resistenz durch Transplantation eines resistenten Klons von Maus 300 sowie ein zu später Therapiebeginn bei Vorliegen einer zu großen Tumorlast sind dabei nicht auszuschließen. In Kapitel 5.2. und Kapitel 5.3. soll diese Thematik eingehender diskutiert werden.

#### 4.7. Untersuchung des Ursprungs der Resistenz

##### 4.7.1. Ist die Ursache intrinsischer Natur oder Folge von Bystander-Effekten?

Nach der Etablierung des retroviralen CML-Transplantationsmodells für die Untersuchung einer Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib im murinen System war die zentrale

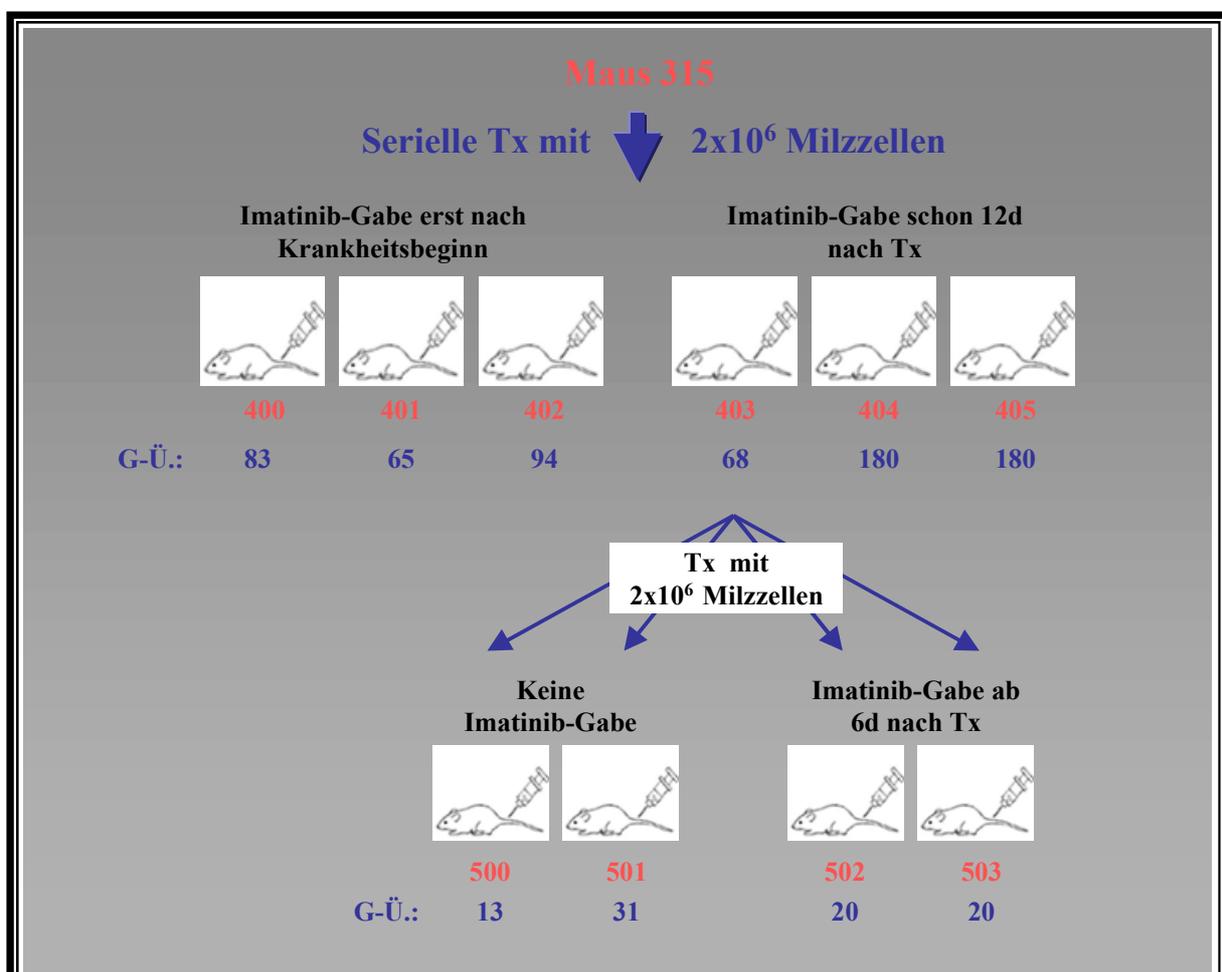


Fragestellung, welche Ursache der raschen Entwicklung von Resistenzen zugrunde liegt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dabei anhand serieller Transplantationen zunächst gezeigt werden, ob die Ursache zellintrinsischer Natur oder eher eine Folge von Bystander-Effekten, wie z.B. der Hochregulierung Imatinib-bindender Proteine, ist. Die Frage, ob Bystander-Mechanismen eine Rolle spielen, konnte mit Hilfe weiterer serieller Transplantationen einer Imatinib-resistenten CML- bzw. Ph<sup>+</sup> ALL-Maus geklärt werden (Abb. 30).

##### 4.7.2. Nach sekundärer und tertiärer serieller Tx treten primäre Resistenzen auf

Zunächst wurden sechs weitere Mäuse (400 – 405) mit jeweils  $2 \times 10^6$  Milzzellen der resistenten CML-Maus 315 sekundär seriell transplantiert. Damit soll das in Kap. 4.6.

beschriebene partielle Ansprechen dieser Maus und damit die Ursache der Resistenzentwicklung untersucht werden. Die Empfängerermäuse wurden nun außerdem in zwei Therapiegruppen aufgeteilt. Dabei wurden die Mäuse 400 – 402 wiederum erst nach Diagnosestellung einer leukämischen Erkrankung mit Imatinib therapiert, die Mäuse 403 – 405 jedoch bereits 12 d nach Tx. Die Entscheidung für diesen frühen Therapiebeginn wurde getroffen, weil ein zu später Therapiebeginn bei großer Tumorlast eine mögliche Ursache für die rasche Entwicklung einer resistenten Erkrankung und das Versagen einer Therapie mit Imatinib, wie es bei Maus 315 zu beobachten war, sein könnte. Auch kann ein früher Therapiebeginn eventuell die Entstehung von weiteren Mutationen in Bcr-Abl selbst, aber auch in anderen Genen, die zur Resistenzentwicklung beitragen, verhindern.



**Abbildung 31.** Sekundäre serielle Transplantation der Mäuse 400-405 mit  $2 \times 10^6$  Milzzellen der Maus 315 (CML) sowie anschließende tertiäre serielle Tx der Mäuse 500-503 mit derselben Zahl an Zellen von Maus 403 (ALL). Die Therapie erfolgte nach einem festgelegten Schema. Jeweils eine Hälfte der Empfängerermäuse wurde unmittelbar nach Tx (12 bzw. 6d) behandelt, während die andere Hälfte erst nach Krankheitsbeginn (400-402), also zu einem deutlich späteren Zeitpunkt, bzw. nicht therapiert wurde (500, 501). Erst nach der tertiären Transplantation zeigten die Mäuse kein Ansprechen mehr auf Imatinib und verstarben bereits nach etwa drei Wochen, was darauf hinweist, dass der Grund für die Resistenz mit größter Wahrscheinlichkeit intrinsischer Natur ist.

Der Vergleich des Gesamt-Überlebens beider Gruppen (Abb. 31) zeigt tatsächlich, dass ein

früher Therapiebeginn möglicherweise die Progression der Ph<sup>+</sup> malignen Erkrankung verzögert und somit das Leben der Mäuse wesentlich verlängert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Mäuse 404 und 405 nach 180 Tagen bei guter Gesundheit aus analytischen Gründen elektiv getötet wurden. Während diese Mäuse bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Resistenz entwickelt hatten, kam es bei Maus 403 nach längerer Behandlung mit Imatinib zu einer relativ raschen Entwicklung einer resistenten ALL.

Allein auf Grund des relativ langen mittleren Überlebens der zweiten Gruppe (Mäuse 400 – 402) von 80,7 Tagen dürfen keine Rückschlüsse auf ein mögliches Ansprechen auf Imatinib gezogen werden. Die Therapie wurde nach dem Auftreten erster Symptome der hämatologischen Neoplasie durchschnittlich erst 15,3 Tage vor dem Tod dieser Mäuse, d.h. 65,4 Tage nach Tx, begonnen. Somit war hier die Latenz bis zur Entwicklung der Ph<sup>+</sup> Leukämie im Vergleich zur primären seriellen Tx einfach deutlich länger.

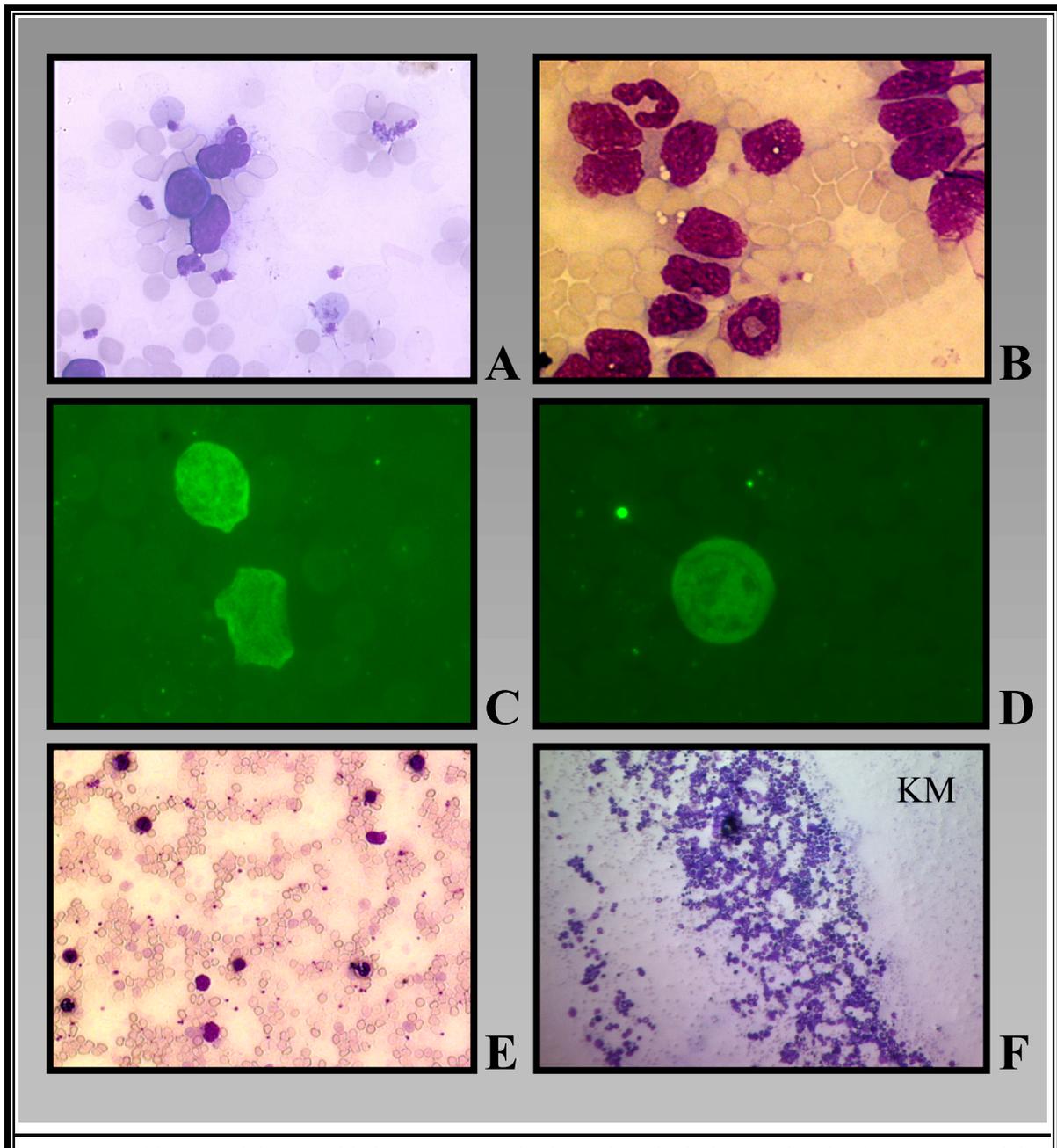
Die Entwicklung einer „echten“ Resistenz gegenüber Imatinib konnte nun insbesondere bei Maus 403 vermutet werden, welche insgesamt 56 Tage mit dem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt wurde. Um nun eine Antwort auf die Frage zu finden, ob die Ursache der Resistenzentwicklung im Mausmodell intrinsischer Natur oder eine Folge von Bystander-Effekten ist, wurden  $2 \times 10^6$  Milzzellen dieser Maus tertiär seriell transplantiert, wobei nun jeweils zwei Empfängermause bereits 6 Tage nach Tx mit Imatinib bzw. nicht behandelt (0,1 ml Placebo) wurden (Abb. 31). Interessanterweise zeigte sich hier kein Ansprechen der Mäuse 502 und 503 mehr. In Verbindung mit der geringen Latenzzeit sowie der enormen Progredienz der malignen Erkrankung weist dies deutlich auf das Vorliegen einer intrinsischen Ursache der Resistenzentwicklung hin. Unabhängig von einer Behandlung mit Imatinib verstarben die Tiere nach durchschnittlich 22 bzw. 20 Tagen. Es kommen somit Resistenzmechanismen auf zellulärer Ebene, wie z.B. Mutationen der ATP-Bindungsdomäne von Bcr-Abl, sekundäre genetische Alterationen oder eine massive Überexpression von Bcr-Abl, als mögliche molekulare Ursachen in Frage.

#### **4.8. Resistente Mäuse rezidivieren häufiger mit akuten lymphatischen Leukämien**

Obwohl alle primär transplantierten (300 – 303), alle primär seriell transplantierten Mäuse (308 – 316) sowie eine sekundär seriell transplantierte Maus (400) zunächst an einem CML-ähnlichen Syndrom erkrankten, rezidivierten sieben von zehn mit Imatinib behandelten Tieren nach einer hämatologischen Remission mit einer resistenten akuten lymphatischen Leukämie. Schließlich kam es nach der sekundären und tertiären seriellen Tx auch bereits zum Auftreten primärer akuter lymphatischer Leukämien.

Insgesamt konnten acht akute lymphatische Leukämien der B-Zelllinie sowie zweimal eine T-ALL diagnostiziert werden. Dieses Verhältnis von 4:1 entspricht dabei ungefähr der

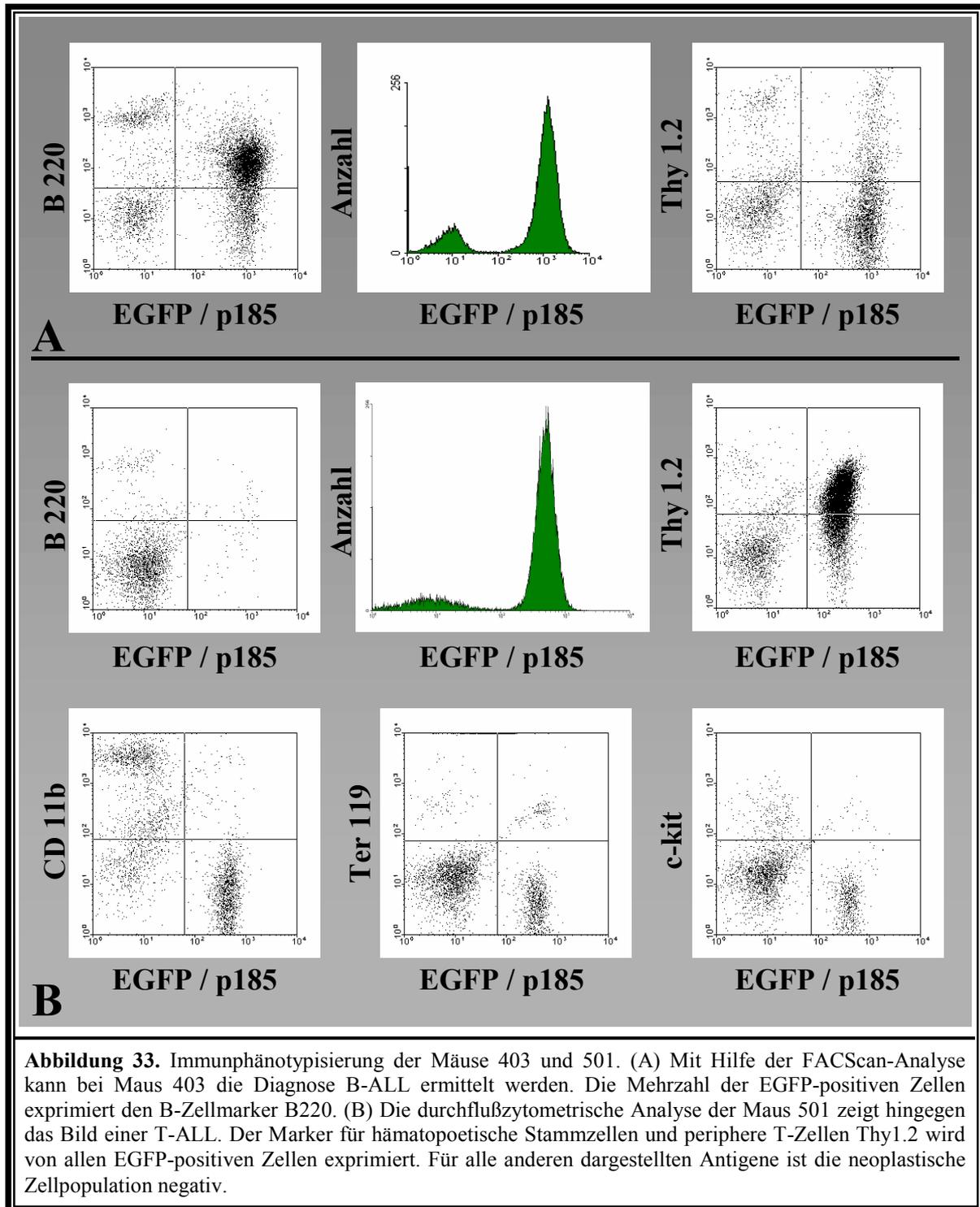
klinischen Häufigkeitsverteilung von B- und T-ALL. Interessanterweise handelte es sich beim Auftreten sekundärer akuter lymphatischer Leukämien immer um Leukämien vom B-Zelltyp, während 40 % der primären ALLs der T-Zell-Reihe angehörten.



**Abbildung 32.** Ausstriche verschiedener Mäuse mit akuter lymphatischer Leukämie. (A) (B) Ausstriche der B-ALL-Maus 315 bei Betrachtung mit verschiedenen Lichtmikroskopen zeigen das Auftreten von leukämischen Blasten im PB. (C) (D) Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung von Blutausstrichen der Maus 316 (B-ALL) konnten EGFP-positive Zellen dargestellt werden. (E) Ein Blutausstrich von Maus 403 bei geringerer Vergrößerung verdeutlicht das Vorliegen einer signifikanten Leukozytose bei Prominenz von leukämischen Blasten und lymphozytären Zellen. (F) Gezeigt werden kann durch Abbildung eines KM-Ausstrichs von Maus 313 (B-ALL) das Vorliegen von hyperzellulärem KM.

Auch nach einer initialen hämatologischen Remission erfolgte ein regelmäßiges Monitoring der Mäuse. Insbesondere bei der Entwicklung eines Rezidivs sowie aus analytischen Gründen

wurden nach dem Tod der Tiere Blut- und KM-Ausstriche angefertigt. So konnten auf einfache Weise wichtige Hinweise auf das Vorliegen eines Rezidivs in Form einer akuten lymphatischen Leukämie gesammelt werden. In Abbildung 32 sind zwei Blutausstriche der Maus 315 (B-ALL) bei unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt, die neben der Leukozytose das Auftreten von leukämischen Blasten im PB zeigen. Relativ schwierig ist die



fluoreszenzmikroskopische Abgrenzung einer ALL, wobei hier genau auf die lymphozytären

und blastären Charakteristika zu achten ist. Die Bilder (C) und (D) zeigen das Auftreten von EGFP-positiven blastären Zellen im PB von Maus 316 (B-ALL), was auch eine progrediente leukämische Neoplasie vermuten lässt, jedoch nicht spezifisch für eine ALL ist. Wichtige diagnostische Hinweise liefert schließlich der KM-Befund. Der Ausstrich von Maus 313 (B-ALL) in Abbildung 32 (F) weist eine dichte Durchsetzung des Knochenmarks mit leukämischen Blasten bei weitgehender Verdrängung von Thrombo-, Erythro- und Granulopoese auf, was erst bei stärkerer Vergrößerung deutlich wird.

Obwohl dieser KM-Befund bereits typische Merkmale einer akuten lymphatischen Leukämie aufweist, kann anhand der Zytodiagnostik alleine die Diagnose nicht gestellt werden. Erst mit Hilfe der Immunphänotypisierung ist der differentialdiagnostische Ausschluss eines CML-Blastenschubes und einer akuten myeloischen Leukämie möglich.

Exemplarisch sind die Ergebnisse der FACScan-Analyse von Maus 403 und 501 in Abbildung 33 dargestellt. Die Mehrzahl der transformierten EGFP-positiven Zellen von Maus 403 (A) exprimiert den B-Zellmarker B220. Vom Antikörper gegen Thy1.2, einem T-Zellmarker, werden diese Zellen nicht erkannt. Immunologisch kann so die Diagnose einer lymphatischen Leukämie der B-Zell-Reihe gestellt werden. Das negative Ergebnis bei Markierung der Zellen mit einem myeloischen Marker ist hier nicht dargestellt.

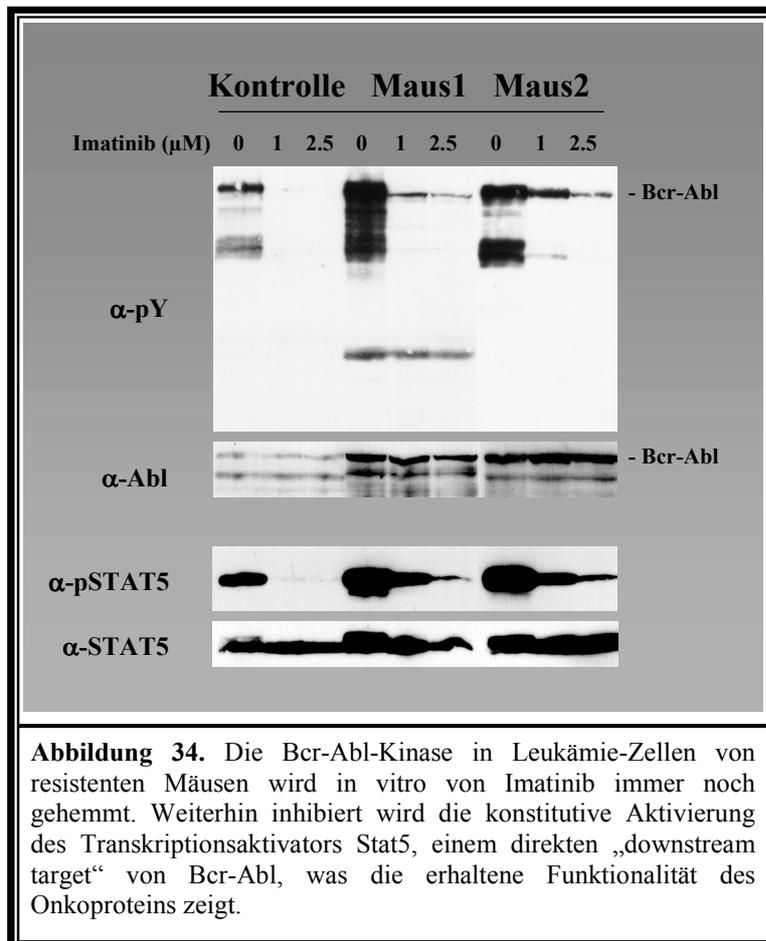
Die Analyse der Milzzellen von Maus 501 (B) zeigt das Vorliegen einer T-ALL. Fast alle Zellen der neoplastischen, EGFP-positiven Population exprimieren Thy1.2 bei gleichzeitig fehlender Expression von B220, CD11b, Ter119 und c-kit.

#### **4.9. In vitro (Western-Blot) zeigt sich eine erhaltene Funktionalität und Hemmbarkeit von Bcr-Abl trotz Resistenz der Leukämiezellen in vivo**

Wie in Kapitel 4.7. beschrieben, ist bei der Resistenzentwicklung im CML-Mausmodell von einer intrinsischen Ursache auszugehen. Eine mögliche Rolle sog. Bystander- bzw. extrinsischer Mechanismen, wie z.B. einer Erhöhung der Plasma-AGP-Spiegel (Gambacorti-Passerini et al., 2000), erschien auf Grund der Ergebnisse der seriellen Transplantation unwahrscheinlich. Um nun einzelne intrinsische Ursachen (Kap. 4.7.) zu beleuchten, wurden in vitro die Expression, die Aktivität sowie die Hemmbarkeit des Onkoproteins Bcr-Abl durch Imatinib proteinbiochemisch untersucht.

Dabei wurden leukämische Zellen einer nicht behandelten CML-Maus sowie zweier Mäuse mit Imatinib-resistenter leukämischer Erkrankung nach Inkubation (2h) mit jeweils 0, 1 oder 2,5  $\mu\text{M}$  Imatinib entsprechend Kapitel 3.5.1. lysiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung des Proteingemisches durch SDS-PAGE sowie nach dem Western-Blot-Verfahren die immunchemische Darstellung der transferierten Proteine (Abb. 34).

Will man die Expression des Onkoproteins Bcr-Abl beurteilen, muss zunächst ein Vergleich der Proteinladung erfolgen. Im Vergleich zur Kontrollmaus stellt sich bei den resistenten Tieren eine sichtbar stärkere Abl-Bande dar, was darauf hinweist, dass hier deutlich mehr Protein eingesetzt wurde. Es ist nämlich davon auszugehen, dass das endogene Protein Abl in allen Tieren ähnlich stark exprimiert wird. Folglich relativiert sich auch die stärkere Bcr-Abl-



Bande bei Markierung mit einem  $\alpha\text{-Abl}$ - oder einem  $\alpha\text{-pY}$ -Antikörper.

Die Hemmbarkeit der Tyrosin-Phosphorylierung von Bcr-Abl durch Imatinib bleibt auch in resistenten Mäusen erhalten. Somit sollte zumindest dieses transformierende Potential des malignen Klons, das entscheidend von der Autophosphorylierung dieses Onkogens abhängt (Konopka et al., 1985), bei vergleichbarer Imatinib-Konzentration *in vivo* deutlich reduziert sein. Bei der Kontrollmaus wird bereits bei einer Imatinib-Konzentration von 1,0  $\mu\text{M}$  die Kinase-Aktivität von Bcr-Abl fast komplett inhibiert,

was bei beiden resistenten Mäusen hier möglicherweise auf Grund der höheren Proteinladung nicht entsprechend zur Darstellung kommt. Eine Erhöhung der Konzentration hat aber einen weiteren Hemmeffekt. Somit ist davon auszugehen, dass eine Mutation innerhalb der Gensequenz von Bcr-Abl, welche die Imatinib-Bindung beeinträchtigen könnte, als Ursache für die Resistenz nicht in Frage kommt. Auch Sequenzierungsuntersuchungen des Bcr-Abl-Onkogens konnten hier keine Mutationen zeigen (Miething et al., 2002).

Als Element des Bcr-Abl-Signaltransduktionsweges spielt der Transkriptionsfaktor Stat5, der in Bcr-Abl-exprimierenden Zellen konstitutiv aktiviert ist (Carlesso et al., 1996; Shuai et al., 1996), eine entscheidende Rolle beim Transformationsprozess (Nieborowska-Skorska et al., 1999). Weil gezeigt wurde, dass Bcr-Abl Stat5 unabhängig von Janus-Kinasen aktiviert (Ilaria et al., 1996), kann der funktionelle Effekt einer Inhibierung von Bcr-Abl durch Imatinib im Immunoblot gezeigt werden (Abb. 34). In Abhängigkeit von der Imatinib-Konzentration

vermindert sich der relative Anteil von phosphoryliertem Stat5 parallel zur Blockierung der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl, was insgesamt die erhaltene Funktionalität des Onkoproteins, damit die transformierende Potenz und schließlich die effektive Inhibierung durch Imatinib anzeigt.

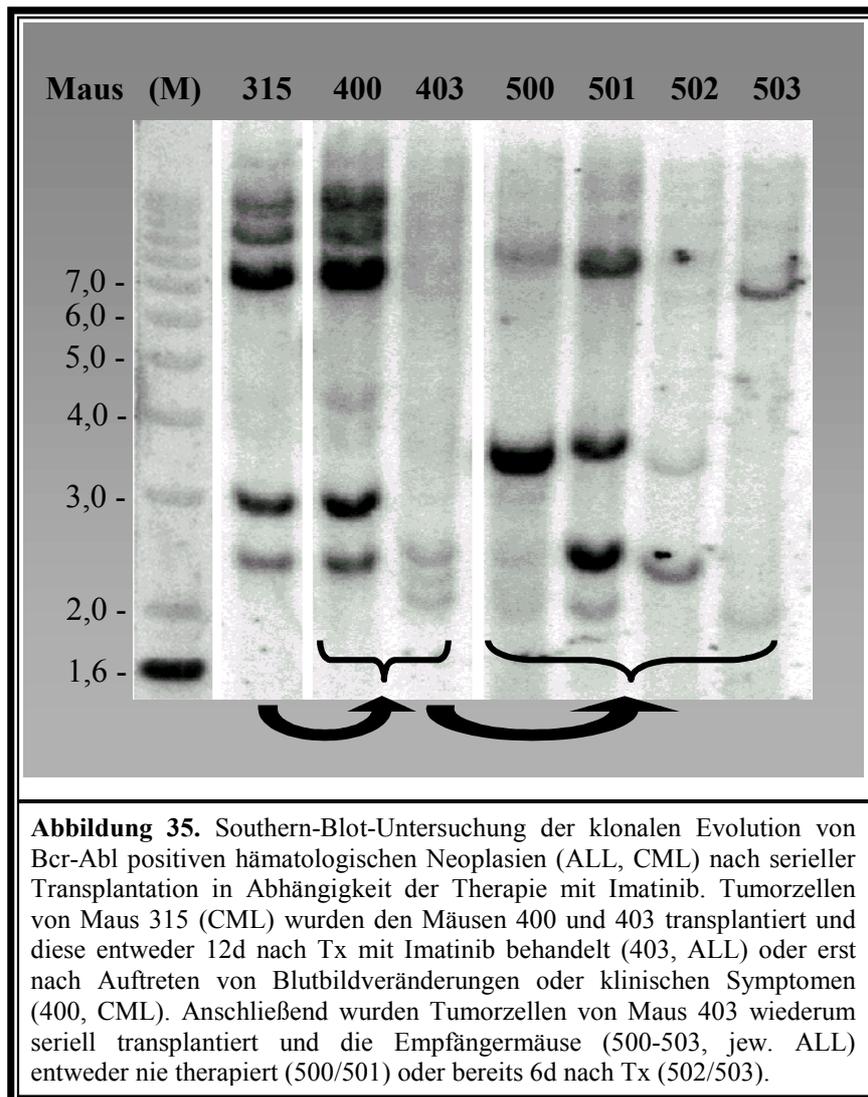
#### **4.10. Untersuchung der klonalen Evolution leukämischer Zellen nach serieller Tx**

Auf Grund der Tatsache, dass sich Retroviren an zufälligen Lokalisationen in das Zellgenom integrieren, kommt es zu unterschiedlichen Integrationsstellen des Bcr-Abl-IRES-EGFP-Provirus im Maus-Genom. Durch Wahl geeigneter Schnittstellen und Sonden lässt sich daher im Southern-Blot feststellen, ob ein (monoklonal) oder mehrere (polyklonal) Viruspartikel in die Zelle integriert sind. Die Zelle kann durch ihr retrovirales „Integrationsmuster“ eindeutig gekennzeichnet werden. Es handelt sich bei den induzierten leukämischen Neoplasien im murinen retroviralen CML-Transduktions- und Transplantationsmodell mehrheitlich um polyklonale Erkrankungen. Bereits in früheren Untersuchungen konnte dies durch Southern-Blot-Analyse gezeigt werden (Pear et al., 1998; Li et al., 1999).

Die Zahl der Klone einer primären CML-Maus konnte aber durch Behandlung mit Imatinib von durchschnittlich  $9 \pm 0,7$  auf  $4,25 \pm 0,9$  reduziert werden (Wolff et al., 2001). Dies schien sehr wahrscheinlich auf die Elimination hämatopoetischer Klone zurückzuführen zu sein, welche das Onkogen nur auf niedrigem Level exprimierten sowie keinerlei Zeichen einer Resistenz aufwiesen.

Es ist anzunehmen, dass durch serielle Transplantation in Kombination mit einer Imatinib-Therapie die klonale Selektion weiter fortschreitet. Eine mögliche Selektion einzelner Zellklone sollte dabei in dieser Arbeit mit Hilfe des Southern-Blot-Verfahrens untersucht werden (Abb. 35). Deshalb wurde genomische DNA aus PB-, KM oder Milzzellen einer primär seriell transplantierten (315), zweier sekundär seriell transplantierten (400, 403) sowie von vier tertiär seriell transplantierten Mäusen (500-503) untersucht.

Zunächst wurde die genomische DNA aus den Mauszellen extrahiert und anschließend mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaut (Kap. 3.1.9.). Eco RI schneidet sowohl genau einmal die provirale Sequenz (vgl. Kap. 4.3.), als auch die jeweils nächstgelegene Eco RI-Schnittstelle innerhalb der murinen genomischen DNA. So entstanden u.a. DNA-Fragmente, welche die Gensequenz des grün-fluoreszierenden Proteins EGFP enthielten und schließlich durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten EGFP-DNA-Sonde detektiert werden konnten. Einzelne Integrationsstellen der proviralen DNA konnten dabei unterschieden werden, weil alle DNA-Fragmente auf Grund der zufälligen Verteilung der Eco RI-Schnittstellen in der nativen genomischen DNA eine unterschiedliche Länge aufwiesen.



Nach dem Southern-Blot-Verfahren sollte jeder leukämische Klon in Form einer spezifischen Bande, d.h. eines charakteristischen Fragmentes, sichtbar werden. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Wolff et al., 2001) kam es unter Behandlung mit Imatinib zu einer Selektion, die sich in einem Übergang von einer poly- zu oligoklonalen Erkrankung niederschlug. Z.B. fanden sich bei der resistenten Maus 315 nach Imatinib-Behandlung fünf retrovirale Integrationsbanden. Genau dasselbe Muster

zeigte sich auch bei Maus 400, die genau wie Maus 315 eine resistente CML-ähnliche Erkrankung entwickelte. Bei Maus 403 hingegen, welche an einer Imatinib-resistenten ALL erkrankte, trat ein deutlich abweichendes Integrationsmuster auf.

Nach tertiärer serieller Tx der Mäuse 500 – 503 mit leukämischen Zellen dieser resistenten Maus 403 blieb zumindest ein teilweise ähnliches Integrationsmuster nachweisbar. Zusätzlich kam es unabhängig von einer Imatinib-Behandlung zur Selektion neuer Klone.

Eine weiterführende Analyse der genetischen Alterationen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht unternommen. Die bis hierher durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass a) die Entwicklung eines Modells der Imatinib-Resistenz möglich ist, das b) diese Resistenzentwicklung nicht von Bystandereffekten verursacht wird und das c) auch Punktmutationen in Bcr-Abl nicht als Ursache für diese Resistenz in Frage kommen können.

## 5. Diskussion

### 5.1. Der Einfluss einer kontinuierlichen Imatinib-Therapie auf das KM-Engraftment im syngenem Maus-Modell– Kombination zweier Therapieoptionen bei CML

Obwohl die allogene SZT als der alleinige kurative therapeutische Ansatz für Ph<sup>+</sup> Leukämien betrachtet wird, können auch bei einem gewissen Anteil der transplantierten Patienten Rezidive beobachtet werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass es durch den therapeutischen Einsatz von Imatinib möglich ist, hier in einigen Fällen erneut eine hämatologische Remission zu induzieren (Fischer, 2002; Wassmann et al., 2001; Olavarria et al., 2002). Somit könnten therapeutische Ansätze, welche eine Therapie mit Imatinib sowie die allogene bzw. autologe SZT kombinieren, einen positiven Effekt auf das Gesamt-Überleben haben. Bisher ist jedoch unklar, ob eine dauerhafte Imatinib-Therapie während der Tx einen negativen Einfluss auf die Transplantation hat. Aus diesem Grund wird bisher bei allen Patienten, die transplantiert werden sollen, Imatinib etwa 14 Tage vor der Tx abgesetzt. Deshalb wurde in dieser Studie der Frage nachgegangen, ob die kontinuierliche Gabe von Imatinib im Rahmen der KMT das hämatopoetische Engraftment in einem Mausmodell beeinflusst. Zunächst wurde ein klonaler Methylzellulose Colony Assay eingesetzt, um mögliche inhibitorische Einflüsse von Imatinib auf hämatopoetische Progenitor- bzw. Stammzellen in vitro zu untersuchen, was in älteren Studien in ähnlicher Form bereits durchgeführt wurde (Druker et al., 1996). Unsere Ergebnisse zeigen dabei aber deutlicher, dass sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung gesorteter c-kit<sup>+</sup> hämatopoetischer Progenitorzellen durch Imatinib in vitro gehemmt werden. Bei einer Imatinib-Konzentration von 5,0 µM kam es im Vergleich zu den Kontrollzellen, welche nicht mit Imatinib inkubiert wurden, zu einer deutlichen Reduktion der Kolonienzahl auf 9,5% (Sca1<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Kolonien) bzw. 28,1% (Sca1<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Kolonien). Dabei könnte eine Erklärung für diesen deutlichen Effekt im Methylzellulose-Assay die Inhibierung von c-kit und PDGFR sein. Diese beiden Moleküle, deren Aktivität durch Imatinib auch sehr effektiv gehemmt wird, spielen möglicherweise eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Reduktion von Proliferation und Differenzierung. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Inhibierung der gesorteten c-kit<sup>+</sup> Zellen durch Imatinib in dieser Arbeit gegenüber einer älteren Studie (Druker et al., 1996), bei der ungesortete KM-Zellen eingesetzt wurden, deutlich stärker ausgeprägt war. Bei unseren in vitro-Untersuchungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass der c-kit-Ligand SCF einen wichtigen Faktor im Zytokincocktail, welcher der Methylzellulose beigemischt wurde, darstellt. Obwohl daher der in vitro-Assay nicht den in vivo-Bedingungen entspricht, so deuten unsere Ergebnisse doch auf eine durch Imatinib induzierte Verzögerung der hämatopoetischen Rekonstitution hin.

Um schließlich einen möglichen *in vivo*-Effekt zu zeigen, untersuchten wir den Einfluss von Imatinib auf das KM-Engraftment im syngenen murinen Transplantationsmodell. Dabei war interessanterweise durch den Vergleich von acht Kontrollmäusen mit acht Mäusen, die bereits 7 Tage vor Tx mit Imatinib behandelt wurden, kein signifikanter Unterschied in der kompletten hämatologischen Rekonstitution und dem Engraftment ableitbar. Während die Gabe von 50 mg/kg/d Imatinib keinen signifikanten Effekt hatte, war die vollständige hämatologische Regeneration entsprechend älteren Daten (Weissman et al., 2000) hauptsächlich abhängig von der Anzahl der transplantierten KM-Zellen.

Sowohl ein Kurzzeit- als auch ein erfolgreiches Langzeit-Engraftment konnte durch regelmäßige Bestimmung des Blutbildes über einen Zeitraum von wenigstens 42 Tagen sowie durch FACS-Analyse der hämatopoetischen Zellpopulationen nach erfolgreichem Engraftment nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden primär transplantierte und mit Imatinib bzw. Placebo behandelte Mäuse sekundär transplantiert (Kap. 4.2.2.), wobei die Blutbild- sowie die FACS-Analyse wiederum eine normale hämatologische Rekonstitution und ein erfolgreiches Engraftment demonstrierten. Alle sekundär transplantierten Mäuse regenerierten unabhängig von einer kontinuierlichen Behandlung mit Imatinib exakt zum gleichen Zeitpunkt nach Tx. Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass *in vivo* in transplantierten Mäusen das Engraftment und die Proliferation der hämatopoetischen Progenitor- bzw. Stammzellen zumindest nicht signifikant beeinflusst wird.

Verschiedene Mechanismen könnten nun für die unterschiedlichen Effekte von Imatinib *in vitro* und *in vivo* verantwortlich gemacht werden. Die Durchführung der Colony Assays erfolgte mit Hilfe von Methylzellulose-Medium, das nur eine begrenzte Zahl an Wachstumsfaktoren und Zytokinen enthielt und somit natürlicherweise nur eingeschränkt in der Lage war, *in vivo*-Bedingungen zu repräsentieren. Außerdem muss erwähnt werden, dass Colony Assays nicht primär die Funktion von Stammzellen zeigen, sondern mit ihrer Hilfe eher das proliferative Potential von partiell differenzierten Progenitorzellen untersucht werden kann. Relativ neue Daten beschreiben dabei einen deutlich stärkeren inhibitorischen Einfluss von Imatinib auf partiell differenzierte Ph<sup>+</sup> Progenitorzellen von CML-Patienten als auf primitive Ph<sup>+</sup> (CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>) Stammzellen (Graham et al., 2002). Somit können potentiell synergistische Effekte von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, Zytokinen, dem Mikromilieu des KMs sowie eine verminderte Empfindlichkeit der primitiven Progenitorzellen die Unterschiede zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Daten erklären.

Nicht sicher geklärt werden kann schließlich, ob durch die zweimal tägliche Gabe von 0,5 mg Imatinib z.B. auch ein Plasmaspiegel von 5,0 µM erreicht wird. Obwohl sicher therapeutisch wirksame Plasmaspiegel vorliegen, wurden bisher für das murine System nur Daten für die Gabe von 2,5 mg/d publiziert (Kap. 5.2.), wobei durchschnittliche Spiegel von 11,8 ± 3,5 µM gemessen werden konnten (Wolff et al., 2003). Möglicherweise kann auch hiermit der

Unterschied zwischen den Ergebnissen *in vitro* und *in vivo* geringfügig relativiert werden. Man muss allerdings davon ausgehen, dass Plasmaspiegel, welche deutlich unter 5,0  $\mu\text{M}$  liegen, relativ unwahrscheinlich bleiben.

Die Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass Imatinib potentiell auch bei Patienten mit  $\text{Ph}^+$  Leukämien keinen negativen Effekt auf das Engraftment hämatopoetischer Stammzellen besitzt. Man kann dies annehmen, obwohl sich die Transplantationsbedingungen im murinen System sowie das syngene Mausmodell selbst vom klinisch-therapeutischen Ansatz deutlich unterscheiden. Die kontinuierliche Gabe von Imatinib auch und insbesondere während einer allogenen SZT könnte somit einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen, ohne dass negative Einflüsse auf das Engraftment und die hämatologische Regeneration zu befürchten sind. Weitere Studien müssen zeigen, ob sich diese Ergebnisse auch im klinischen Ansatz bestätigen lassen.

## **5.2. Etablierung eines retroviralen Maus-Modells für die $\text{Ph}^+$ CML zur Untersuchung der Entwicklung von Resistenzen bei kontinuierlicher Therapie mit Imatinib**

Das Philadelphia-Chromosom ist ein verkürztes Chromosom 22, das durch reziproke Translokation,  $t(9;22)(q34;q11)$ , zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 entsteht. Diese genetische Alteration und damit die Expression des onkogenen Hybrid-Gens BCR-ABL kann in leukämischen Zellen von ca. 95% der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gefunden werden. Außerdem tragen 5% der Kinder und 15 bis 30% der adulten Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie sowie 2% der Patienten mit neu diagnostizierter akuter myeloischer Leukämie dieses Onkogen (Kurzrock et al., 1988).

Nach Untersuchungen des onkogenen Potentials von Bcr-Abl *in vitro* (Daley et al., 1988) hat man bald auch versucht, durch Überexpression des BCR-ABL-Onkogens *in vivo* ein CML-ähnliches Krankheitsbild im Tiermodell zu induzieren (Hariharan et al., 1989; Daley et al., 1990; Elefanty et al., 1990; Kelliher et al., 1990; Pear et al., 1998). Seit seiner Entwicklung hat sich dieses murine, retrovirale Transduktions- und Transplantationsmodell schließlich als wichtiger Baustein der Grundlagenforschung hämatologischer Neoplasien etabliert. Mit Hilfe des Mausmodells der CML konnten so die molekularen Signaltransduktionswege von Bcr-Abl, der Einfluss von Bcr-Abl-Mutanten auf die Leukämogenese oder die Rolle unterschiedlicher Hybrid-Gene (P190, P210 oder P230) bzw. bestimmter Signalwege auf das Spektrum Bcr-Abl-induzierter Leukämien untersucht werden (Li et al., 1999; Million et al., 2000; Roumiantsev et al., 2001; Zhang et al., 2001). Eine Gemeinsamkeit aller Studien lag dabei aber darin, dass alle Mäuse nach ihrer Rekonstitution mit syngenen  $\text{Ph}^+$  KM-Zellen und einer von der Effizienz der retroviralen Infektion abhängigen Latenzzeit nach Tx innerhalb

sehr kurzer Zeit infolge einer fulminanten myeloproliferativen Erkrankung verstarben. Diese zeichnete sich durch Splenomegalie sowie eine massive Granulozytose aus.

Nach der Identifizierung des potenten Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib war es nun möglich, dieses Modell weiterzuentwickeln. Obwohl Imatinib ursprünglich als ein spezifischer Inhibitor für PDGFR entwickelt werden sollte (Buchdunger et al., 2000), wurde relativ bald deutlich, dass insbesondere alle Abl-Tyrosinkinasen sehr effektiv und relativ selektiv gehemmt werden können. Andere Tyrosinkinasen wie EGFR, FLT1 oder FLT3 wurden mit Ausnahme von c-kit, dem Rezeptor für SCF, nicht inhibiert (Heinrich et al., 2000). Imatinib, ein 2-Phenylaminopyrimidin, geht dabei eine sehr enge Bindung mit der hochkonservierten ATP-Bindungstasche der katalytischen Domäne ein (Schindler et al., 2000). Außerdem kommt es zum Auftreten zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen, wie z.B. zwischen der sekundären Aminogruppe von Imatinib und der Seitenkette von Thr<sup>315</sup>, einem Ort, der durch Punktmutation auch für das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib verantwortlich ist. Entscheidend für die Imatinib-Bindung der Abl-Tyrosinkinasen ist aber die Einnahme einer inaktiven Konformation, d.h. eines Zustandes, in dem der zentrale „activation loop“ nicht phosphoryliert ist. Diese Konformation unterscheidet sich deutlich von der Konformation aktiver Tyrosinkinasen sowie sogar inaktiver Formen der nahe verwandten Src-Tyrosinkinasen. Sowohl diese Spezifität als auch die Tatsache, dass das durch Imatinib hemmbare Onkoprotein Bcr-Abl in fast allen Patienten mit CML auftritt und stark exprimiert wird, erhöhte das Interesse an der Weiterentwicklung dieses molekularen Therapieansatzes entscheidend (Druker et al., 1996). Unser Ziel war dabei die Etablierung eines Mausmodells der Imatinib-Resistenz. Primär sollte die Frage beantwortet werden, ob Bystander-Mechanismen, wie z.B.  $\alpha$ 1-Glykoprotein-Überexpression, oder der leukämische Klon selbst für die Imatinib-Resistenzentwicklung verantwortlich sind, was von großem klinischen Interesse ist. Denn obwohl in klinischen Studien große Erfolge in der Behandlung der CML mit Imatinib erzielt wurden, entwickeln viele Patienten mit fortgeschrittener CML oder einem Ph<sup>+</sup> ALL-Rezidiv relativ rasch eine Imatinib-Resistenz (Druker, Talpaz et al., 2001; Hochhaus et al., 2002; Kantarjian et al., 2002; O'Brien et al., 2003).

Ein kritisches Element der Etablierung eines Mausmodells der CML unter kontinuierlicher Therapie mit Imatinib war zunächst eine gute Transfektionseffizienz und damit die Produktion hoher retroviraler Titer. Die für die Entstehung einer murinen CML-ähnlichen Erkrankung entscheidende Zielzelle ist dabei eine unreife Stammzelle oder frühe myeloide Progenitorzelle (Jamieson et al., 2004), die nur in niedriger Frequenz im KM enthalten ist und nur durch hohe retrovirale Titer erfolgreich infiziert werden kann. Erst ab einem Anteil von mehr als 60% erfolgreich transfizierter Virus-Produktionszellen konnten hohe Titer erzielt werden. Insbesondere bei Verwendung der Lipofektion mit neuen kommerziellen Lipofektionsmitteln waren beständig Werte zwischen 90 und 100% erreichbar. Auch mit der

CaCl<sub>2</sub>-Methode, welche initial verwendet wurde, konnte eine gute Transfektionseffizienz erreicht werden, doch war diese auf Grund des nötigen Einsatzes verschiedener Medien, deren pH-Wert exakt einzustellen war, deutlich anfälliger und nicht immer befriedigend reproduzierbar. Vor der Infektion von murinem KM wurde meist der virale Titer bestimmt. Erfahrungsgemäß konnte der retrovirale Überstand zur Infektion der syngenen KM-Zellen eingesetzt werden, wenn mehr als  $1 \times 10^5$  Viruspartikel pro ml vorhanden waren. Auf Grund eigener Daten sowie aus älteren Publikationen weiß man, dass niedrigere Titer die Infektion einer ausreichenden Zahl neoplastischer Zellen nicht sicher gewährleisten. Mit einem Titer von  $2,52 \times 10^5$  war es z.B. möglich, durch „Spin-Infektion“ 39% der eingesetzten KM-Zellen zu infizieren.

Um zunächst zu zeigen, dass es in Analogie zu älteren Studien möglich ist, in primär transplantierten Mäusen eine myeloproliferative Krankheit zu induzieren, wurden primär vier Mäuse mit  $4,0 \times 10^5$  der transformierenden EGFP-positiven, frisch infizierten KM-Zellen transplantiert. Die Tatsache, dass dabei drei Mäuse ohne Therapie nach  $14 \pm 1$  Tagen starben, spricht sowohl für eine erfolgreiche Infektion aber auch für eine große initiale Tumormass. Die Milz- und KM-Zellen der vierten Maus wurden elektiv am 11. Tag nach Tx gewonnen, als bereits klinisch eindeutig das Vorliegen einer Leukämie zu erkennen war. Nachdem schließlich eine CML-ähnliche Erkrankung diagnostiziert worden war, wurden die Milzzellen dieser Maus für die serielle Tx aufbereitet. Auf diesem Wege konnte gewährleistet werden, dass eine größere Zahl sublethal bestrahlter Mäuse mit dem gleichen Pool transformierter, Bcr-Abl positiver Zellen ausgestattet wurde. Dies erleichterte eine statistisch sinnvolle Untersuchung des therapeutischen Effektes von Imatinib bei Mäusen mit einem Ph<sup>+</sup> CML-ähnlichen Syndrom.

Nach der sekundären Tx von  $2 \times 10^6$  Milzzellen kam es nun erst nach  $26 \pm 8$  d (Zeitraum vergleichbar mit älteren Studien) zum Auftreten einer hämatologischen Neoplasie, wobei initial ohne den Selektionsdruck einer therapeutischen Intervention alle Mäuse ein CML-ähnliches Syndrom entwickelten (Abb. 24). Die hohe Effizienz der seriellen Tx einer Maus mit finaler CML kam insgesamt nicht überraschend, weil, wie in einer inzwischen publizierten Studie (Wolff et al., 2001) gezeigt wurde, auch Mäuse mit einer CML-ähnlichen Erkrankung, die bereits behandelt wurden, sogar unabhängig vom Ansprechen auf Imatinib erfolgreich seriell transplantiert werden konnten. In unserer Arbeit konnten wir eine Effizienz der primären seriellen Tx von 100% erreichen.

Bei allen primär seriell transplantierten Tieren kam es nach 3-4 Wochen zu einem massiven Anstieg der Leukozytenzahl. Daraufhin wurde den Mäusen zweimal täglich 0,5 mg Imatinib per os appliziert. Die Tiere sprachen schnell und gut auf die Therapie an, so dass bei allen Tieren mit einer CML-ähnlichen Erkrankung bereits nach  $10 \pm 3$  Tagen eine hämatologische

Remission erreicht werden konnte. Es zeigte sich bei allen Tieren eine signifikante Reduktion der Leukozytenzahl sowie ein deutliches klinisches Ansprechen.

Bei sieben von neun dieser primär seriell transplantierten Mäuse kam es schließlich zum Auftreten einer resistenten ALL, wobei es sich häufiger um einen B-Zell- als um einen T-Zell- bzw. gemischten T- und B-Zell-Immunphänotyp handelte. Zwei Mäuse hingegen zeigten nach einem initialen hämatologischen Ansprechen einen raschen Wiederanstieg ihrer Leukozytenzahl trotz kontinuierlicher Erhöhung der Imatinib-Dosis. Sie erlagen schließlich einer CML-ähnlichen Erkrankung. Insgesamt konnte in unserem Modell das Leben der primär seriell transplantierten Mäuse um insgesamt  $32 \pm 6$  Tage verlängert werden.

Der Hauptgrund dafür, dass es häufiger zum Auftreten einer resistenten ALL kommt, scheint darin zu liegen, dass es mehr B-ALL- als CML-Vorläufer gibt. Dies könnte u.a. auch die höhere Zahl an B-ALL-Erkrankungen mit langer Latenzzeit nach Infektion mit niedrigen Titern erklären. Initial scheint aber die höhere Proliferationsrate der CML-Klone das synchrone Auftreten einer ALL zu verdecken. Erst durch die Behandlung mit Imatinib kann die geringere Zahl der stärker proliferierenden CML-Stammzellklone supprimiert werden, wobei evtl. primär resistente B-ALL-Klone zu Tage gebracht werden. Man kann sich vorstellen, dass diese B-ALL-Klone auf Grund ihrer Zahl sowie der leichteren Infizierbarkeit eher von retroviral induzierten Mutationen betroffen sind.

Dass die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs in diesem Modell im Vergleich zu einer anderen Studie (Wolff et al., 2001) nur von relativ kurzer Dauer war, ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Transduktions- bzw. Transplantationsbedingungen zurückzuführen. Dazu gehören z.B. der Einsatz einer höheren Zahl infizierter KM-Zellen und die hohe Infektionseffizienz. Möglicherweise erhöht dabei eine größere Zahl leukämischer Klone die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Resistenzen. Als weitere Faktoren sind vermutlich auch der Zeitpunkt des Therapiebeginns sowie die tägliche Imatinib-Dosis mitverantwortlich für die Dauer der hämatologischen Remission.

Das Erreichen nur kurzfristiger Remissionen und damit chronisch myeloischer Erkrankungen mit kurzer chronischer Phase oder das häufige Auftreten von akuten lymphatischen Leukämien kann möglicherweise auch mit der Verwendung des onkogenen Konstruktes p190 (welches auch als p185 bezeichnet wird) Bcr-Abl erklärt werden. Obwohl gezeigt wurde, dass alle Formen von Bcr-Abl (p190, p210 und p230) ein identisches CML-ähnliches Syndrom in Mäusen induzieren können, besitzt p190 in vitro eine höhere Tyrosinkinaseaktivität und ist auch klinisch gegenüber p210 und p230 mit unterschiedlichen Phänotypen der Ph<sup>+</sup> Leukämien assoziiert (Li et al., 1999; Voncken et al., 1995). Während 50% der adulten Patienten und 80% der Kinder mit Ph<sup>+</sup> akuten lymphatischen Leukämien das Fusionsgen p190 Bcr-Abl aufweisen, kommt es bei CML-Patienten nur in etwa 2-3% der Fälle vor, was eindeutig dafür spricht, dass die lymphoide gegenüber der myeloiden Differenzierung durch p190 Bcr-Abl

stärker gefördert wird (Quackenbush et al., 2000).

Basierend auf ersten pharmakokinetischen Studien (Druker et al., 1996; le Coutre et al., 1999) wurde für unser CML-Modell eine Imatinib-Dosis von 1,0 mg/d (50 mg/kg/d) gewählt. Die eingesetzte Menge liegt so deutlich über der therapeutisch applizierten Dosis bei Patienten mit Ph<sup>+</sup>-Leukämien (3-15 mg/kg/d). Dabei konnten pharmakokinetische Daten im humanen System zeigen, dass bei täglich einmaliger Gabe von 600 mg Imatinib (ca. 9 mg/kg/d), einer therapeutisch wirksamen Dosis bei CML-Patienten, mittlere Plasmaspiegel von maximal  $3,93 \pm 1,91 \mu\text{g/ml}$  ( $7,8 \mu\text{M}$ ) erreicht werden können (Mauro et al., 2001). Weil bekannt ist, dass die Halbwertszeit von Imatinib in Mäusen kürzer ist (Gambacorti-Passerini et al., 2000), wurde die deutlich höhere Imatinib-Dosis nicht nur zweimal täglich verabreicht, sondern es wurden auch die vor wenigen Monaten veröffentlichten neuen pharmakokinetischen Daten für das murine System analysiert (Wolff et al., 2003). Nach täglicher Gabe von 2,5 mg (150 mg/kg/d) wurde dabei eine mittlere Imatinib-Plasmakonzentration von  $11,8 \pm 3,5 \mu\text{M}$  gemessen. Diese Ergebnisse, wenn sie auch auf niedrigen Fallzahlen basieren, zeigen, dass die Wahl einer Dosis von 2 x 0,5 mg/d keinesfalls zu hoch angesetzt ist. So konnten wir auch nach einer Dosiserhöhung bei Auftreten erster Zeichen einer Resistenz in einigen Fällen einen positiven therapeutischen Effekt erzielen.

Schließlich war ein Ziel der Etablierung des Mausmodells für die CML zur Untersuchung von Imatinib-Resistenzmechanismen, anhand der Transplantation von drei Kontrollmäusen zu zeigen, dass ein mögliches onkogenes Potential im Rahmen der retroviralen Integration (Insertionsmutagenese) allein nicht zur Generierung einer leukämischen Erkrankung ausreicht. Nach der Transplantation einer dem CML-Mausmodell vergleichbaren Zahl syngener KM-Zellen, welche mit dem Kontrollvektor MigR1-Leervektor-IRES-EGFP retroviral infiziert wurden, kam es bei allen Kontrollmäusen auch nach 6 Monaten ohne therapeutische Intervention nicht zum Auftreten einer neoplastischen Erkrankung. So kann man annehmen, dass durch zufällige Integration der Vektor-DNA kein obligates Onkogen generiert bzw. Tumorsuppressoren ausgeschaltet wurde. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass ruhende Alterationen auf molekularer Ebene auftreten, welche erst im Zusammenwirken mit anderen neoplastischen Veränderungen maligne Tumoren induzieren („second hits“).

Obwohl man erkannte, dass auch durch kontinuierliche Therapie mit Imatinib bei Patienten Resistenzen auftraten und dabei Imatinib in der Lage war, resistente Klone zu selektionieren (Druker, Sawyers et al., 2001), war die relativ rasche Entwicklung von Resistenzen gegenüber Imatinib im Mausmodell eine große Überraschung. Und gerade weil wir dieses Phänomen im Gegensatz zu früher veröffentlichten Modellen (Wolff et al., 2001) bereits nach wenigen Wochen beobachten konnten, war unser CML-Mausmodell die geeignete Grundlage für die Untersuchung von Imatinib-Resistenzmechanismen. Unser Schwerpunkt war dabei, Hinweise auf mögliche Ursachen für die Entwicklung dieser Resistenzen zu finden.

### 5.3. Identifikation möglicher intrinsischer Ursachen der Resistenzentwicklung

Imatinib wurde erstmals 1998 therapeutisch eingesetzt bei CML-Patienten, die gegenüber Interferon-alpha refraktär waren bzw. es nicht toleriert haben (Savage et al., 2002). Obwohl bereits gezeigt wurde, dass mit Imatinib bei CML-Patienten in der chronischen Phase sehr gute Erfolge erzielt werden (Druker, Talpaz et al., 2001; Kantarjian et al., 2002), musste man trotzdem bei der Mehrzahl der Patienten mit einer CML-Blastenkrise ein deutlich verkürztes Ansprechen auf Imatinib feststellen, wobei kein definitiver Überlebensvorteil ableitbar war (Druker, Sawyers et al., 2001; Wadhwa et al., 2002). Offenbar kommt es bei dieser Patientenpopulation im fortgeschrittenen Stadium mehrheitlich zum Auftreten von Resistenzen. Sowohl in vitro-Studien mit resistenten Zelllinien (Mahon et al., 2000) als auch klinische Studien (Gorre et al., 2001; von Bubnoff et al., 2002) konnten dabei zuletzt verschiedene Resistenzmechanismen aufdecken (von Bubnoff et al., 2003).

Die Etablierung des murinen retroviralen Resistenzmodells ermöglichte es uns, Imatinib-Resistenzmechanismen in Mäusen zu untersuchen bzw. neue, unbekannte Mechanismen aufzudecken. Zunächst sollte dabei anhand serieller Transplantationen die Frage geklärt werden, ob die rasch aufgetretenen Resistenzen der primär seriell transplantierten Mäuse rein intrinsischer Natur sind, d.h. ob genetische Mutationen des Hybrid-Gens BCR-ABL oder sekundäre genetische Alterationen zur Transformation beitragen, oder ob eher Maus-spezifische Bystander-Effekte, wie z.B. die Hochregulierung Imatinib-bindender Proteine (z.B. saures  $\alpha$ 1-Glykoprotein), die Progression der CML-ähnlichen Erkrankung verursachen. Einen Beitrag konnte dazu eine erste weitere serielle Tx einer primär seriell transplantierten Maus leisten (Abb. 31). Eine Hälfte der sekundär seriell transplantierten Mäuse wurde wiederum erst nach dem Auftreten einer leukämischen Erkrankung mit Imatinib therapiert. Obwohl diese Tiere im Vergleich zur primären Tx eine längere mittlere Überlebenszeit von 80,7 Tagen zeigten, konnte maximal noch ein partielles Ansprechen auf Imatinib nachgewiesen werden. Die Mäuse (400-402) verstarben sogar bereits 15,3 Tage nach Diagnosestellung und Beginn der Imatinib-Therapie. Die Ursache für das längere Gesamt-Überleben lag somit auf Grund unterschiedlicher Transplantationsbedingungen allein in der verlängerten Latenzzeit bis zur Entwicklung der Ph<sup>+</sup> Leukämie.

Mit Hilfe der zweiten Gruppe sollte schließlich u.a. näher untersucht werden, ob ein frühzeitiger Therapiebeginn einen Überlebensvorteil bringt. Werden dabei neoplastische Klone möglicherweise inhibiert und vernichtet oder ist möglicherweise in Einzelfällen bei den primär seriell transplantierten Mäusen allein eine zu hohe Tumorlast bzw. ein zu später Therapiebeginn die alleinige Ursache der Resistenzentwicklung? Deshalb wurden die Mäuse der zweiten sekundär transplantierten Gruppe, obwohl dieser Ansatz im Vergleich zum klinisch-therapeutischen Vorgehen wenig sinnvoll erscheint, ohne Diagnosestellung einer

myeloproliferativen Erkrankung, d.h. bereits ab dem 12. Tag nach Tx, therapiert. Zunächst kann auf Grund unserer Untersuchungen gesagt werden, dass im Mausmodell ein früher Beginn der Imatinib-Therapie möglicherweise die Progression der Ph<sup>+</sup> malignen Erkrankung verzögern bzw. sogar zu einem rezidivfreien Überleben führen kann. So überlebten zwei Mäuse dieser Gruppe zumindest 180 Tage nach Tx. Sofern man also von einer 100%igen Effizienz der seriellen Tx ausgehen kann, scheint eine durch Imatinib induzierte Heilung in diesem Modell in Einzelfällen möglich zu sein. Eine weitere Maus dieser Gruppe hingegen entwickelte schließlich 56 Tage nach Beginn der Gabe von Imatinib eine resistente Leukämie. Gerade weil diese Maus (403) über einen längeren Zeitraum mit Imatinib behandelt wurde und mit Hilfe des Southern-Blot-Verfahrens nachgewiesen werden konnte, dass Imatinib offensichtlich in der Lage ist, resistente Klone zu selektionieren, kann hier von einer „echten“ Resistenz ausgegangen werden, welche mit Sicherheit nicht auf einer zu hohen Tumorlast beruhen konnte. Insgesamt konnte aber in diesem Fall mit der Strategie einer längerfristigen Imatinib-Therapie das Gesamt-Überleben im Vergleich zur ersten Gruppe (400-402) nicht verbessert werden. Möglicherweise wurden also hier nicht nur sensible Klone vernichtet, sondern auch bestehende resistente Klone oder neu entstandene Klone mit sekundären genetischen Alterationen selektioniert. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass es einerseits präexistente resistente Klone gibt, welche die Maus bei der Transplantation mitbekommen hat (400-402), andererseits Resistenzen sich z.B. auf Grund von Mutationen oder Bystander-Effekten später noch entwickeln können (403).

Um nun schließlich die Frage zu beantworten, ob die Ursache der Resistenzentwicklung im Mausmodell intrinsischer Natur oder eine Folge von Bystander-Effekten ist, wurden Milzzellen dieser resistenten Maus (403) wiederum seriell transplantiert. Zwei Empfängermäuse wurden bereits 6 Tage nach Tx mit 2,0 mg/d Imatinib, zwei weitere mit Placebo behandelt. Es gab keinen Überlebensvorteil der mit Imatinib behandelten Mäuse. Bereits nach durchschnittlich 22 bzw. 20 Tagen verstarben alle transplantierten Tiere an einer fulminant verlaufenden Leukämie. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass eher zellintrinsische Faktoren und nicht Bystander-Effekte für die Resistenzentstehung verantwortlich sind. Für die Resistenz kommen nun weiterhin unterschiedliche intrinsische Ursachen, wie z.B. Mutationen der ATP-Kinasedomäne bzw. auch außerhalb dieser Domäne (Azam et al., 2003), genomische Amplifikationen von Bcr-Abl bzw. massive Überexpression der Bcr-Abl-Transkripte (Gorre et al., 2001; Hochhaus, 2003) sowie sekundäre und retroviral-induzierte genetische Alterationen, in Frage.

Um den Resistenzmechanismus weiter zu analysieren, wurde im Western-Blot zunächst die Expression des Onkoproteins p190 Bcr-Abl sowie die Inhibierbarkeit der Tyrosinkinase in resistenten Mauszellen in vitro untersucht. Im Vergleich zu den Zellen einer Kontrollmaus mit unbehandeltem CML-ähnlichem Syndrom konnte selbst eine mäßige Überexpression von

Bcr-Abl in den Zellen zweier Mäuse mit einer resistenten Leukämie nicht sicher nachgewiesen werden. Allerdings muss hier, um eine signifikante Aussage machen zu können, eine deutlich höhere Zahl resistenter Mäuse untersucht werden. Beeindruckend war hingegen die Tatsache, dass p190 Bcr-Abl auch in den Zellen resistenter Mäuse bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  deutlich inhibiert wird, wobei sich bei einer Erhöhung auf 2,5  $\mu\text{M}$  ein noch stärkerer Hemmeffekt zeigt. Dieses Resultat machte das Vorliegen einer Mutation der Gensequenz von Bcr-Abl, welche die Imatinib-Bindung beeinträchtigen könnte, als Ursache für die Resistenzentwicklung unwahrscheinlich. Durch Sequenzierung der Kinasedomäne des BCR-ABL-Gens aus den resistenten Mäusen konnte zudem das Vorliegen einer Mutation ausgeschlossen werden (Miething et al., 2002). Insgesamt ist damit davon auszugehen, dass auch in vivo die gesteigerte und unregulierte Tyrosinkinaseaktivität von Bcr-Abl, welche die charakteristische Eigenschaft dieses Moleküls und Voraussetzung für die transformierende Aktivität ist (Pendergast et al., 1993), inhibiert wird.

Parallel konnte nicht nur die konstitutive Aktivierung von Stat5, einer charakteristischen Eigenschaft Bcr-Abl-exprimierender Zellen (Carlesso et al., 1996; Shuai et al., 1996), sondern auch die Inhibierbarkeit dieses Signalweges durch Imatinib auch in resistenten Zellen gezeigt werden. Die erhaltene Funktionalität des Onkoproteins Bcr-Abl wurde dabei durch die Verminderung des relativen Anteils von phosphoryliertem Stat5, das eine wichtige Rolle in Bcr-Abl-abhängigen antiapoptotischen Signalwegen spielt (Horita et al., 2000), indirekt nachgewiesen.

Mit Hilfe des Southern-Blot-Verfahrens sollte schließlich gezeigt werden, ob nach seriellen Transplantationen in Kombination mit einer kontinuierlichen Imatinib-Therapie klonale Evolution noch stattfinden kann. Andererseits wären einzelne, primär resistente Klone einer primär mit Imatinib behandelten Spendermaus allein für die Entwicklung von Resistenzen verantwortlich, ohne dass eine weitere Imatinib-induzierte klonale Selektion möglich ist. Nachdem gezeigt worden war, dass die Zahl der Klone einer primären CML-Maus durch die Behandlung mit Imatinib von durchschnittlich  $9 \pm 0,7$  auf  $4,25 \pm 0,9$  reduziert werden kann (Wolff et al., 2001), war es unser Ziel, den weiteren Verlauf der klonalen Evolution nach serieller Tx und weiterer Behandlung mit Imatinib zu untersuchen. Kann die Zahl der Zellklone dabei bis zum Auftreten eines einzelnen primär resistenten Klons reduziert werden oder ist Imatinib nicht in der Lage, weitere Klone dieser primären CML-Mäuse zu unterdrücken bzw. zu eliminieren?

In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Wolff et al., 2001) kam es bei einer primär mit Imatinib behandelten, jedoch resistenten CML-Maus (315) zum Auftreten von fünf dominanten leukämischen Klonen bzw. Integrationsstellen. Bei einer seriell transplantierten Maus, die nur kurzzeitig und erst 61 Tage nach der Tx mit Imatinib behandelt wurde (400), trat das identische Integrationsmuster wiederum auf. Dies spricht sowohl für das Vorliegen

zellspezifischer Ursachen als auch für die Tatsache, dass das Auftreten der Resistenz zeitlich vor der seriellen Tx lag. Bisher nicht sicher geklärt werden können das rasche Auftreten einer Resistenz und das nur minimale Ansprechen der Maus 315 auf Imatinib. Obwohl bereits kurz nach dem Auftreten klinischer Symptome einer CML-ähnlichen Erkrankung eine Therapie mit Imatinib begonnen wurde, konnte keine hämatologische Remission erreicht werden. So erlag die Maus bereits 14 Tage später der rasch progredient verlaufenden myeloproliferativen Erkrankung. Die Tatsache, dass die Erkrankung bereits 4 Tage nach Beginn der Imatinib-Gabe progredient war, macht dabei die Insertionsmutagenese als eine entscheidende Ursache der Resistenzentstehung wahrscheinlich. Insbesondere wenn man bedenkt, dass die Spendermaus (300) der initialen Tx nur 11 Tage überlebte, scheint die Entstehung sekundärer genetischer Aberrationen als Ursache der Resistenzentwicklung eher abwegig. Keineswegs schließt dies allerdings eine generell höhere Mutationsrate oder intrinsische Resistenz gegenüber Imatinib aus.

Interessanterweise konnte aber bei Maus 403, welche bereits 12 d nach Tx und insgesamt 56 d mit Imatinib behandelt wurde, eine deutliche Reduktion der Zahl der leukämischen Klone beobachtet werden. Ein dominanter Klon muss dabei auf Grund des Integrationsmusters entweder in Folge genetischer Alterationen neu entstanden oder auf Grund des Selektionsdruckes erstmals sichtbar geworden sein. Imatinib ist somit in der Lage, auch nach serieller Tx bei frühzeitiger, kontinuierlicher Anwendung weiterhin einen Selektionsdruck zumindest auf partiell resistente Klone auszuüben. Bei der anschließenden seriellen Tx von Zellen dieser resistenten Maus (403), kam es bei allen Empfängermäusen zum Auftreten einer primär resistenten leukämischen Erkrankung. Die Therapie von zwei Mäusen mit 50 mg/kg/d hatte keinerlei Einfluss auf das Gesamt-Überleben dieser Tiere, was wiederum dafür spricht, dass die Ursache der Resistenz im transplantierten leukämischen Klon selbst liegt und nicht Folge von Bystander-Mechanismen ist. Im Southern-Blot ist dabei zu beobachten, dass entweder jeweils einer der beiden Spender-Klone weiterhin präsent war oder ein neuer Klon mit ähnlicher Insertionsstelle selektioniert wurde. Weiterhin kam es unabhängig von einer Imatinib-Behandlung zum Auftreten zusätzlicher, mehr oder weniger dominanter Klone.

Insgesamt waren schließlich unter dem Selektionsdruck von Imatinib maximal zwei bis vier resistente Klone für das Auftreten einer primär resistenten Leukämie dieser mit Zellen der resistenten Maus 403 transplantierten Tiere verantwortlich. Abhängig von einer Therapie mit Imatinib traten interessanterweise hier aber unterschiedliche ALL-Phänotypen auf. Bei Gabe von Imatinib konnte zweimal ein B-Zell-Phänotyp beobachtet werden, während die Gabe von Placebo jeweils zum Auftreten einer T-Zell-ALL führte.

Die definitive Aufklärung des verantwortlichen Resistenzmechanismus war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Insbesondere sekundäre Alterationen auf genetischer Ebene („second hits“), welche nicht Bcr-Abl betreffen, kommen weiterhin in unserem Mausmodell

als Resistenzmechanismus in Frage. Außerdem kann die Amplifikation und Überexpression von Bcr-Abl, was in einigen Mäusen in einer parallelen Studie als Ursache der Resistenzentwicklung diskutiert wurde (Wolff et al., 2001) nicht ausgeschlossen werden. Auf Grund der bekannten genetischen Instabilität von Ph<sup>+</sup> Zellen und dem damit begründbaren Auftreten von zytogenetischen und molekularen Alterationen in 50% bis 80% der CML-Patienten im Stadium der Transformation zur Blastenkrise (Faderl et al., N. Engl. J. Med., 1999) ist die Entwicklung neuer genetischer Ereignisse im Laufe der Therapie mit Imatinib nicht auszuschließen. Das Auftreten von polyklonalen myeloproliferativen Erkrankungen im Mausmodell, d.h. die Generierung von verschiedenen proviralen Integrationsstellen innerhalb des murinen Genoms im Rahmen der retroviralen Transduktion, unterstützt allerdings die Hypothese, dass wahrscheinlich bereits durch die retrovirale Integration selbst (Insertionsmutagenese) verschiedene genetische Alterationen entstehen. Diese unterschiedlichen molekularen Veränderungen der einzelnen Klone, welche bereits zum Zeitpunkt der Tx vorliegen, stellen vermutlich die Hauptursache für die Entwicklung von Resistenzen in unserem Modell dar.

Wenn man schließlich alle Ergebnisse betrachtet, muss man annehmen, dass in unserem Modell auch ein sequentieller Prozess der Resistenzentwicklung vorliegt. Bei einer primär mit Imatinib behandelten Maus kommt es initial zu einer Suppression bzw. Eradikation der gegenüber Imatinib sensitivsten Klone (Maus 315). Möglicherweise bleiben zunächst auch partiell resistente Klone dominant, da die Mäuse auf Grund nicht optimaler lokaler Imatinib-Spiegel bzw. einem verspäteten Therapiebeginn einer fulminanten myeloproliferativen Erkrankung erliegen. Während primär resistente Klone hier auf Grund von Selektionsnachteilen noch eine untergeordnete Rolle spielen, gewinnen sie nach der seriellen Tx bei frühem Beginn der Therapie mit Imatinib die Oberhand. Man kann vermuten, dass alle supprimierten sensitiven Klone auf Grund der geringen Zellzahl nicht effizient seriell transplantierbar waren und somit nun bei ausreichend rascher Imatinib-Gabe (Maus 403) primär partiell resistente Klone dem Selektionsdruck ausgesetzt sind. Unabhängig davon, ob diese partielle Resistenz auf einer Überexpression von Bcr-Abl, auf Mutationen oder sekundären genetischen Alterationen beruht, werden diese Klone nun bei kontinuierlicher Imatinib-Gabe supprimiert bzw. eliminiert. Übrig bleiben wenige primär resistente Ph<sup>+</sup> Klone, welche bei sekundärer serieller Tx die Entwicklung primär resistenter Leukämien zu verantworten haben.

Wie auch in älteren Studien bereits gezeigt wurde (Li et al., 1999), führt also die serielle Transplantation zur Selektion, wofür mehrere Gründe verantwortlich gemacht werden können. Sekundäre zytogenetische und molekulare Alterationen spielen dabei wahrscheinlich auch eine gewisse Rolle. Einerseits kann sich im Laufe der Zeit ein Überlebensvorteil für bestimmte Klone ausbilden, wie z.B. durch Überexpression von Bcr-Abl oder auf Grund

zufällig akquirierter oder retroviral-induzierter Mutationen. Andererseits verliert möglicherweise eine partiell resistente CML-Stammzelle eines dominanten, malignen Klons ihre Stammzeleigenschaften oder sie differenziert auf Grund sekundärer genetischer Ereignisse in eine ALL aus, was jeweils zum Verschwinden des Klons führt.

Wir konnten in unserer Studie erfolgreich ein retrovirales Mausmodell der CML für die Untersuchung von Imatinib-Resistenzmechanismen etablieren, womit es uns gelungen ist zu zeigen, dass die Ursache der Resistenzentwicklung in unserem Modell zellintrinsischer Natur ist. Sehr wahrscheinlich ist die Insertionsmutagenese hauptverantwortlich für das Auftreten primär Imatinib-resistenter Leukämien nach serieller Tx, jedoch muss auch davon ausgegangen werden, dass sekundäre genetische Alterationen eine gewisse Rolle spielen. Dies muss in weiteren Untersuchungen, wie z.B. der Analyse von proviralen Integrationsstellen, näher evaluiert werden, um möglicherweise neue Mechanismen zu finden, die zur Therapieresistenz und zur Progression von Leukämien beitragen.

## 6. Zusammenfassung

Die allogene Stammzelltransplantation ist weiterhin die einzige kurative Therapie der Ph<sup>+</sup> Leukämien. Trotzdem bleibt die Zulassung von Imatinib im Jahr 2001 ein Meilenstein in der Geschichte der Behandlung der CML. Die Erfolge mit der molekularen Imatinib-Therapie sind wohl unumstritten, wenn auch Langzeitergebnisse noch ausstehen.

Nach allogener SZT kommt es bei einem signifikanten Anteil der CML-Patienten aber zu einem Rezidiv. In dieser Situation ist es möglich, wie in einigen ausgewählten Fällen gezeigt wurde, mit Hilfe von Imatinib wieder Remissionen zu induzieren. Deshalb ist davon auszugehen, dass neue therapeutische Ansätze, welche die allogene SZT mit der Imatinib-Behandlung kombinieren, zu einem verbesserten Überleben führen.

Um zunächst zu verifizieren, ob Imatinib einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung c-kit<sup>+</sup> Stamm-/Progenitorzellen hat, wurde ein Methylzellulose-Assay durchgeführt. Unter in vitro-Bedingungen reduzierte sich bei einer Imatinib-Konzentration von 5,0 µM die Zahl der CFUs z.B. auf weniger als 30%. Dieses Ergebnis war immer vermutet worden, weil Imatinib auch c-kit und den PDGFR inhibiert.

Auf Grund ähnlicher Ergebnisse wurde bisher eine kontinuierliche Imatinib-Therapie zugunsten der Transplantation unterbrochen. Es wurden negative Einflüsse auf das Engraftment der transplantierten Zellen vermutet. Im murinen Transplantationsmodell ließ sich dieser Verdacht allerdings nicht bestätigen. Beim Vergleich von acht mit Imatinib behandelten Mäusen mit acht Kontrollmäusen war kein signifikanter Unterschied bezüglich der kompletten hämatopoetischen Rekonstitution nach einer SZT erkennbar. Auch ein erfolgreiches Langzeit-Engraftment wurde durch serielle Transplantationen bestätigt. Die Untersuchungen im Mausmodell lieferten somit keine Hinweise dafür, dass Imatinib das Engraftment nach SZT negativ beeinflusst.

Für die klinische Behandlung der CML von großer Bedeutung ist, dass es, wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, nach langfristiger, kontinuierlicher Behandlung mit Imatinib häufig zum Auftreten von Resistenzen kommt.

Für die weitgehende Untersuchung dieser Problematik im murinen System konnten wir zunächst ein Mausmodell der Imatinib-Resistenz etablieren. Nach der erfolgreichen retroviralen Infektion und Transplantation von murinen KM-Zellen, wurde bei allen Mäusen bereits nach zwei Wochen die Entwicklung eines CML-ähnlichen Syndroms beobachtet. Zur Generierung einer Vielzahl von Mäusen mit ähnlichem Zellpool wurde eine Maus schließlich seriell transplantiert. Dabei entwickelten alle neun Empfängeräuse nach durchschnittlich 26 Tagen ebenso ein CML-ähnliches Syndrom mit einem massiven Anstieg der Leukozytenzahl. Kurze Zeit nach Beginn einer Imatinib-Therapie mit 0,5 mg bid konnte ein gutes hämatologisches Ansprechen mit deutlicher klinischer Verbesserung der Mäuse gezeigt

werden. Jedoch wurde bereits  $32 \pm 6$  Tage nach der ersten Dosis die Entwicklung eines Rezidivs beobachtet. Es konnte zunächst klinisch das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib nachgewiesen werden. Insgesamt rezidierten sieben Mäuse mit einer Imatinib-resistenten ALL. Nur zwei Mäuse zeigten das Bild eines resistenten CML-ähnlichen Syndroms.

Deutliche Hinweise dafür, dass die zu beobachtenden Resistenzen im Mausmodell intrinsischer Natur sind, d.h. im klonalen Zellpool selbst liegen, und nicht Bystander-Effekte eine Rolle spielen, ergaben sich aus den Ergebnissen serieller Transplantationen. Bereits nach zweimaliger Tx einer mit Imatinib behandelten Maus kam es zum Auftreten primärer Resistenzen. Resistenzmechanismen auf zellulärer Ebene, wie z.B. Mutationen der ATP-Bindungsdomäne von Bcr-Abl, sekundäre genetische Alterationen oder eine massive Überexpression von Bcr-Abl stellen somit mögliche Ursachen dar.

Schließlich konnte durch *in vitro*-Experimente noch eine erhaltene Funktionalität und Hemmbarkeit von Bcr-Abl trotz Resistenz der Leukämiezellen *in vivo* gezeigt werden. Weil auch bei Sequenzierungsuntersuchungen hier keine Bcr-Abl-Mutationen nachgewiesen werden konnten, scheint auch dieser Mechanismus unwahrscheinlich. Proteinbiochemisch ergaben sich außerdem keine Hinweise auf eine Überexpression von Bcr-Abl.

Letztendlich bleibt die Insertionsmutagenese wahrscheinlich hauptverantwortlich für das Auftreten Imatinib-resistenter Leukämien. Jedoch muss auch davon ausgegangen werden, dass sekundäre genetische Alterationen eine gewisse Rolle spielen. Weitere Untersuchungen auf genetischer Ebene müssen deshalb folgen, um möglicherweise neue Mechanismen zu finden, die einen Beitrag zur Verbesserung der Therapie und Prognose der CML leisten können.

## 7. Literaturverzeichnis

Abelson HT., Rabstein LS. Lymphosarcoma: Virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 30 (1970) 2213-2222.

Arico M., Valsecchi MG., Camitta B., Schrappe M., Chessells J., Baruchel A., Gaynon P., Silverman L., Janka-Schaub G., Kamps W., Pui CH., Masera G. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 342 (2000) 998-1006.

Azam M., Latek RR., Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imitinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112 (2003) 831-843.

Barnes DJ., Melo JV. Cytogenetic and molecular genetic aspects of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 108 (2002) 180-202.

Bennet JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Medical and Surgical Journal* 64 (1845) 413-423.

Bartram CR., de Klein A., Hagenmeijer A., van Agthoven T., van Kessel AD., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith MA., Davies T., Stone M., Heisterkamp N., Stephenson JR., Groffen J. Translocation of c-Abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306 (1983) 277-280.

Berger U., Engelich G., Reiter A., Hochhaus A., Hehlmann R. Imatinib and beyond – the new CML study IVA randomized controlled comparison of imatinib vs imatinib/interferon-alpha vs imatinib/low-dose AraC vs imatinib after interferon-alpha failure in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 83 (2004) 258-264.

Bocchia M., Gentili S., Abruzzese E., Fanelli A., Iuliano F., Tabilio A., Amabile M., Forconi F., Gozzetti A., Raspadori D., Amadori S., Lauria F. Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet* 365 (2005) 657-662.

Boxer LM. The role of oncogenes in hematologic malignancies. *Annu. Rev. Med.* 45 (1994) 1-11.

Brouard M., Saurat JH. Cutaneous reactions to STI571. *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 618-619.

Buchdunger E., Cioffi CL., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker BJ., Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295(1) (2000) 139-145.

Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Muller M., Druker BJ., Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res.* 56 (1996) 100-104.

- Buchdunger E., Zimmermann J., Mett H., Meyer T., Muller M., Regenass U., Lydon NB. Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2558-2562.
- Buesø Ramos CE., Cortes J., Talpaz M., O'Brien S., Giles F., Rios MB., Medeiros LJ., Kantarjian H. Imatinib mesylate therapy reduces bone marrow fibrosis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 101 (2004) 332-336.
- Capdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. rev. 1* (2002) 493-502.
- 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. *J. Exp. Med.* 183 (1996) 811-820.
- Cathcart K., Pinilla-Ibarz J., Korontsvit T., Schwartz J., Zakhaleva V., Papadopoulos EB, Scheinberg DA. A multivalent bcr-abl fusion peptide vaccination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103 (2004) 1037-1042.
- Chan LC., Karhi KK., Rayter SI., Heisterkamp N., Eridani S., Powles R., Lawler SD., Groffen J., Foulkes JG., Greaves MF. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 325 (1987) 635-637.
- Cortes J., Albitar M., Thomas D., Giles F., Kurzrock R., Thibault A., Rackoff W., Koller C., O'Brien S., Garcia-Manero G., Talpaz M., Kantarjian H. Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Blood* 101 (2003) 1692-1697.
- Cortes J., Giles F., O'Brien S., Thomas D., Garcia-Manero G., Rios MB., Faderl S., Verstovsek S., Ferrajoli A., Freireich EJ., Talpaz M., Kantarjian H. Result of high-dose imatinib mesylate in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 102 (2003) 83-86.
- Cortes J., Kantarjian HM. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review with emphasis on biology and therapy. *Cancer* 76 (1995) 2393-2417.
- Daley GQ., Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependant hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr-abl protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 9312-9316.
- Daley GQ., Van Etten RA., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 bcr-abl gene of the Philadelphia Chromosome. *Science* 247 (1990) 824-830.
- De Klein A., van Kessel AG., Grosveld G., Bartram CR., Hagemeijer A., Bootsma D., Spurr NK., Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300 (1982) 765-767.

Deininger MW., O'Brien SG., Ford JM., Druker BJ. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 1637-1647.

Downing JR., Shannon KM. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell* 2 (2002) 437-445.

Druker BJ., Lydon NB. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* 105 (2000) 3-7.

Druker BJ., Sawyers CL., Kantarjian H., Resta DJ., Reese SF., Ford JM., Capdeville R., Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1038-1042.

Druker BJ., Talpaz M., Resta DJ., Peng B., Buchdunger E., Ford JM., Lydon NB., Kantarjian H., Capdeville R., Ohno-Jones S., Sawyers CL. Efficacy and Safety of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1031-1037.

Druker BJ., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal GM., Fanning S., Zimmermann J., Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2 (1996) 561-566.

Elefanty AG., Hariharan IK., Cory S. Bcr-Abl, the hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple hematopoietic neoplasms in mice. *EMBO J.* 9 (1990) 1069-1078.

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., Kantarjian HM. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann. Intern. Med.* 131 (1999) 207-219.

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 164-172.

Feinberg AP., Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 (1983) 6-13.

Fialkow PJ., Martin PJ., Najfeld V., Penfold GK., Jacobson RJ., Hansen JA. Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 58 (1981) 158-163.

Fischer T. Results up to now of administration of STI-571 (Glivec) in recurrence after allogenic and autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *Med. Klin.* 97 (Suppl. 1) (2002) 22-27.

Gale RP., Hehlmann R., Zhang MJ., Hasford J., Goldman JM., Heimpel H., Hochhaus A., Klein JP., Kolb HJ., McGlave PB., Passweg JR., Rowlings PA., Sobocinski KA., Horowitz MM. Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 91 (1998) 1810-1819.

Gambacorti-Passerini C., Barni R., le Coutre P., Zucchetti M., Cabrita G., Cleris L., Rossi F., Gianazza E., Brueggen J., Cozens R., Pioltelli P., Pogliani E., Corneo G., Formelli F., D'Incalci M.

Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR- ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 1641-1650.

Gambacorti-Passerini C., Tornaghi L., Cavagnini F., Rossi P., Pecori-Giraldi F., Mariani L., Cambiaghi N., Pogliani E., Corneo G., Gnessi L. Gynaecomastia in men with chronic myeloid leukaemia after imatinib. *Lancet* 361 (2003) 1954-1956.

Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br. J. Haematol.* 110 (2000) 2-11.

Goff SP., Gilboa E., Witte ON., Baltimore D. Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell* 22 (1980) 777-785.

Goldman JM., Melo JV. Targeting the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1084-1086.

Goldman JM., Melo JV. Chronic Myeloid Leukemia – Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 1451-1464.

Gorre ME., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao PN., Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293 (2001) 876-880.

Graham SM., Jorgensen HG., Allan E., Pearson C., Alcorn MJ., Richmond L., Holyoake TL. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99 (2002) 319-325.

Gratwohl A., Hermans J., Goldman JM., Arcese W., Carreras E., Devergie A., Frassoni F., Gahrton G., Kolb HJ., Niederwieser D., Ruutu T., Vernant JP., de Witte T., Apperley J. Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 352 (1998) 1087-1092.

Groffen J., Stephenson JR., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram CR., Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36 (1984) 93-99.

Guilhot F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. *Oncologist* 9 (2004) 271-281.

Guilhot F., Chastang C., Michallet M., Guerci A., Harousseau JL., Maloisel F., Bouabdallah R., Guyotat D., Cheron N., Nicolini F., Abgrall JF., Tanzer J. Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 223-229.

Hariharan IK., Harris AW., Crawford M., Abud H., Webb E., Cory S., Adams JM. A bcr-v-abl oncogene induces lymphomas in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2798-2805.

Heinrich MC., Griffith DJ., Druker BJ., Wait CL., Ott KA., Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96(3) (2000) 925-932.

Heisterkamp N., Stephenson JR., Groffen J., Hansen PF., de Klein A., Bartram CR., Grosveld G. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306 (1983) 239-242.

Hermans A., Heisterkamp N., von Lindern M., van Baal S., Meijer D., van der Plas D., Wiedemann LM., Groffen J., Bootsma D., Grosveld G. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 51 (1987) 33-40.

Hochhaus A. Cytogenetic and Molecular Mechanisms of Resistance to Imatinib. *Semin. Hematol.* 40 (2 Suppl. 3) (2003) 69-79.

Hochhaus A., Kreil S., Corbin AS., La Rosée P., Müller MC., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross NCP., Berger U., Gschaidmeier H., Druker BJ., Hehlmann R. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16 (2002) 2190-2196.

Hochhaus A., La Rosée P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia : strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 18 (2004) 1321-1331.

Holtz MS., Slovak ML., Zhang F., Sawyers CL., Forman SJ., Bhatia R. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. *Blood* 99 (2002) 3792-3800.

Hoover RR., Mahon FX., Melo JV., Daley GQ. Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 100 (2002) 1068-1071.

Horita M., Andreu EJ., Benito A., Arbona C., Sanz C., Benet I., Prosper F., Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.* 191 (2000) 977-984.

Hunter T. Oncoprotein Networks. *Cell* 88 (1997) 333-346.

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. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 31704-31710.

Jackson AL., Loeb LA. On the origin of multiple mutations in human cancers. *Semin. Cancer Biol.* 8 (1998) 421-429.

Jamieson CHM., Ailles LE., Dylla SJ., Muijtjens M., Jones C., Zehnder JL., Gotlib J., Li K., Manz MG., Keating A., Sawyers CL., Weissman IL. Granulocyte-Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 657-667.

Kantarjian HM., O'Brien S., Cortes JE., Shan J., Giles FJ., Rios MB., Faderl SH., Wierda WG., Ferrajoli A., Verstovsek S., Keating MJ., Freireich EJ., Talpaz M. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer* 97 (2003) 1033-1041.

Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A., Guilhot F., Schiffer C., Gambacorti-Passerini C., Niederwieser D., Resta D., Capdeville R., Zoellner U., Talpaz M., Druker B. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 645-652.

Kantarjian H., Talpaz M., O'Brien S., Garcia-Manero G., Verstovsek S., Giles F., Rios MB., Shan J., Letvak L., Thomas D., Faderl S., Ferrajoli A., Cortes J. High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood* 103 (2004) 2873-2878.

Kantarjian HM., Talpaz M., O'Brien S., Giles F., Garcia-Manero G., Faderl S., Thomas D., Shan J., Rios MB., Cortes J. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 101 (2003) 473-475.

Kelliher MA., McLaughlin J., Witte ON., Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR-ABL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 6649-6653.

Konopka JP., Watanabe SM., Singer JW., Collins SJ., Witte ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 1810-1814.

Kurzrock R., Gutterman JU., Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 990-998.

Kvasnicka HM., Thiele J., Staib P., Schmitt-Graeff A., Griesshammer M., Klose J., Engels K., Kriener S. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood* 103 (2004) 3549-3551.

La Rosée P., O'Dwyer ME., Druker BJ. Insights from pre-clinical studies for new combination treatment regimens with the Bcr-Abl kinase inhibitor imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) in chronic myelogenous leukemia: a translational perspective. *Leukemia* 16 (2002) 1213-1219.

Lange RD., Moloney WC., Yamawaki T. Leukemia in atomic bomb survivors. I. General observations. *Blood* 9 (1954) 574-585.

Le Coutre P., Mologni L., Cleris L. et al. In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL-kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1999) 163-168.

Li CL., Johnson GR. Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization. *Blood* 85 (1995) 1472-1479.

- Li S., Ilaria RL. Jr., Million RP., Daley GQ., Van Etten RA. The P190, P210, and P230 Forms of the BCR/ABL Oncogene Induce a Similar Chronic Myeloid Leukemia-like Syndrome in Mice but Have Different Lymphoid Leukemogenic Activity. *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1399-1412.
- Lugo TG., Pendergast AM., Muller AJ., Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247 (1990) 1079-1082.
- Lundberg LG., Lerner R., Sundelin P., Rogers R., Folkman J., Palmblad J. Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity. *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 15-19.
- Mahon FX., Deininger MW., Schultheis B., Chabrol J., Reiffers J., Goldman J., Melo JV. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96 (2000) 1070-1079.
- Mauro MJ., Druker BJ. STI571: Targeting BCR-ABL as Therapy for CML. *The Oncologist* 6 (2001) 233-238.
- McLaughlin J., Chianese E., Witte ON. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the p210 bcr/abl oncogene product of the Philadelphia Chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6558-6562.
- McWhirter JR., Galasso DL., Wang JYJ. A Coiled-Coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 7587-7595.
- Miething C., Grundler R., Hoepfl J., Mugler C., Gschaidmeier H., Peschel C., Duyster J. Mice with a CML-like disease relapse with ALL under STI571 treatment. *Exp. Hematol.* 30 (2002) 96a.
- Million RP., Van Etten RA. The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96 (2000) 664-670.
- Mohammadi M., McMahon G., Sun L., Tang C., Hirth P., Yeh BK., Hubbard SR., Schlessinger J. Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. *Science* 276 (1997) 955-960.
- Müller MC., Lahaye T., Hochhaus A. Resistenz auf tumorspezifische Therapie mit Imatinib durch klonale Selektion mutierter Zellen. (Resistance to tumor specific therapy with imatinib by clonal selection of mutated cells). *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127 (2002) 2205-2207.
- Nieborowska-Skorska M., Wasik MA., Slupianek A. et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J. Exp. Med.* 189 (1999) 1229-1242.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976) 23-28.
- Nowell PC., Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132 (1960) 1197.

O'Brien SG., Guilhot F., Larson RA., Gathmann I., Baccarani M., Cervantes F., Cornelissen JJ., Fischer T., Hochhaus A., Hughes T., Lechner K., Nielsen JL., Rousselot P., Reiffers J., Saglio G., Shepherd J., Simonsson B., Gratwohl A., Goldman JM., Kantarjian H., Taylor K., Verhoef G., Bolton AE., Capdeville R. Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 994-1004.

Olavarria E., Craddock C., Dazzi F., Marin D., Markt S., Apperley JF., Goldman JM. Imatinib mesylate (STI571) in the treatment of relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99 (2002) 3861-3862.

Pane F., Frigeri F., Sindona M., Luciano L., Ferrara F., Cimino R., Meloni G., Saglio G., Salvatore F., Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88 (1996) 2410-2414.

Pear WS., Miller JP., Xu L., Pui JC., Soffer B., Quackenbush RC., Pendergast AM., Bronson R., Aster JC., Scott ML., Baltimore D. Efficient and Rapid Induction of a Chronic Myelogenous Leukemia-Like Myeloproliferative Disease in Mice Receiving P210 bcr/abl-Transduced Bone Marrow. *Blood* 92 (1998) 3780-3792.

Pendergast AM., Quilliam LA., Cripe LD., Bassing CH., Dai Z., Li N., Batzer A., Rabun KM., Der CJ., Schlessinger J., Gishizki ML. BCR-ABL Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein. *Cell* 75 (1993) 175-185.

Peschel C., Duyster J., Günther Ch., Kolb HJ., Muth A., Schneller F. Chronische myeloische Leukämie (CML). *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag, München (2003) 115-130.

Popescu NC., Zimonjic DB. Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genet. Cytogenet.* 93 (1997) 10-21.

Pui CH., Gaynon PS., Boyett JM., Chessells JM., Baruchel A., Kamps W., Silverman LB., Biondi A., Harms DO., Vilmer E., Schrappe M., Camitta B. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* 359 (2002) 1909-1915.

Pui CH., Relling MV., Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1535-1548.

Quackenbush RC., Reuther GW., Miller JP., Courtney KD., Pear WS., Pendergast AM. Analysis of the biologic properties of p230 Bcr-Abl reveals unique and overlapping properties with the oncogenic p185 and p210 Bcr-Abl tyrosine kinases. *Blood* 95 (2000) 2913-2921.

Roumiantsev S., de Aoz IE., Varticovski L., Ilaria RL., Van Etten RA. The Src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 97 (2001) 4-13.

Roumiantsev S., Shah NP., Gorre ME., Nicoll J., Brasher BB., Sawyers CL., Van Etten RA. Clinical

resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10700-10705.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243 (1973) 290-293.

Salloukh HF., Launeville P. Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase. *Leukemia* 14 (2000) 1401-1404.

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.

Sattler M., Salgia R., Okuda K., Uemura N., Durstin MA., Pisick E., Xu G., Li JL., Prasad KV., Griffin JD. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-Abl, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12 (1996) 839-846.

Savage DG., Antman KH. Imatinib Mesylate – a new oral targeted therapy. *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 683-693.

Savage DG., Szydlo RM., Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br. J. Hematol.* 96 (1997) 111-116.

Sawyers CL. Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 1330-1340.

Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller WT., Clarkson B., Kuriyan J. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science* 289 (2000) 1938-1942.

Shah NP., Tran C., Lee FY., Chen P., Norris D., Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305 (2004) 319-321.

Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J., Rao X., Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13 (1996) 247-254.

Simpson AJ., Camargo AA. Evolution and the inevitability of human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 8 (1998) 439-445.

Skorski T., Bellacosa A., Nieborowska-Skorska M., Majewski M., Martinez R., Choi JK., Trotta R., Wlodarski P., Perrotti D., Chan TO., Wasik MA., Tsichlis PN., Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 16 (1997) 6151-6161.

Skorski T., Kanakaraj P., Nieborowska SM., Ratajczak MZ., Wen SC., Zon G., Gewirtz AM., Perussia B., Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86 (1995) 726-736.

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

Southern EM. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503.

Spangrude GJ., Heimfeld S., Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241 (1988) 58-62.

Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R., Trujillo JM., Gutterman JU. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann. Intern. Med.* 114 (1991) 532-538.

Talpaz M., Kantarjian HM., McCredie K., Trujillo JM., Keating MJ., Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 1065-1069.

Talpaz M., Silver RT., Druker BJ., Goldman JM., Gambacorti-Passerini C., Guilhot F., Schiffer CA., Fischer T., Deininger MW., Lennard AL., Hochhaus A., Ottmann OG., Gratwohl A., Baccarani M., Stone R., Tura S., Mahon FX., Fernandes-Reese S., Gathmann I., Capdeville R., Kantarjian HM., Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99 (2002) 1928-1937.

Thiesing JT., Ohno-Jones S., Kolibaba KS., Druker BJ. Efficacy of STI571, an Abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against Bcr-Abl-positive cells. *Blood* 96 (2000) 3195-3199.

Vigneri P., Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* 7 (2001) 228-234.

Virchow R. *Weisses Blut. Frorieps Notizen* 36 (1845) 151-156.

Vogelstein B., Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9 (1993) 138-141.

Von Bubnoff N., Schneller F., Peschel C., Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 359 (2002) 487-491.

Von Bubnoff N., Peschel C., Duyster J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 17 (2003) 829-838.

Voncken JW., Kaartinen V., Pattengale PK., Germeraad WT., Groffen J., Heisterkamp N. BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 86 (1995) 4603-4611.

Wadhwa J., Szydlo RM., Apperley JF., Chase A., Bua M., Marin D., Olavarria E., Kanfer E., Goldman JM. Factors affecting duration of survival after onset of blastic transformation of chronic

myeloid leukemia. *Blood* 99 (2002) 2304-2309.

Wang Z., Canagarajah BJ., Boehm JC., Kassisa S., Cobb MH., Young PR., Abdel-Meguid S., Adams JL., Goldsmith EJ. Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* 6 (1998) 1117-1128.

Wassmann B., Klein SA., Scheuring U., Pfeifer H., Martin H., Gschaidmeier H., Hoelzer D., Ottmann OG. Hematologic and cytogenetic remission by STI571 (Glivec) in a patient relapsing with accelerated phase CML after second allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28 (2001) 721-724.

Weisberg E., Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 95 (2000) 3498-3505.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287 (2000) 1442-1446.

Wheeler TT., Broadhurst MK., Sadowski HB., Farr VC., Prosser CG. Stat5 phosphorylation status and DNA-binding activity in the bovine and murine mammary glands. *Mol. Cell Endocrinol.* 176 (2001) 39-48.

Wolff NC., Ilaria RL. Jr. Establishment of a murine model for therapy-treated chronic myeloid leukemia using the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Blood* 98 (2001) 2808-2816.

Wolff NC., Richardson JA., Egorin M., Ilaria RL. Jr. The CNS is a sanctuary for leukemic cells in mice receiving imatinib mesylate for Bcr/Abl-induced leukemia. *Blood* 101 (2003) 5010-5013.

Young JC., Witte ON. Selective transformation of primitive lymphoid cells by the Bcr/Abl oncogene expressed in long-term lymphoid or myeloid cultures. *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 4079-4087.

Zhang X., Subrahmanyam R., Wong R., Gross AW., Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol. Cell Biol.* 21(3) (2001) 840-853.

## 8. Danksagung

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden von März 2001 bis Februar 2003 im Labor für Leukämgenese der III. Med. Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel, unserem Direktor der III. Med. Klinik, danke ich herzlich für die wertvolle Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor für Leukämieforschung am Klinikum rechts der Isar.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die freundliche Überlassung dieses interessanten Projektes, die intensive wissenschaftliche Betreuung sowie die Motivation und Hilfestellung während aller Phasen dieser Arbeit.

Für die kollegiale Zusammenarbeit, zahllose wissenschaftliche Hilfestellungen und Anregungen sowie die sorgfältige Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken bin ich Herrn Dr. Cornelius Miething sehr dankbar.

Für hilfreiche Diskussionen und ein sehr angenehmes Arbeitsklima danke ich Frau Claudia Mugler, Frau Dr. Susanne Urschel, Herrn Dr. Nikolas von Bubnoff, Frau Rebekka Grundler, Herrn Dr. Florian Bassermann, Herrn Dr. Ren-Yuan Bai, Frau Silvia Klümpen, Frau Petra Seipel, Frau Jana Sänger, Frau Christine von Klitzing, Frau Katrin Angermüller, Frau Susanne Feihl und Herrn Darioush Shirvani. Vielen Dank für die nette Zusammenarbeit.

Meinen Eltern möchte ich insbesondere für das Vertrauen und die Ermöglichung meiner langjährigen Ausbildung danken. Ohne ihr Verständnis und ihre große Unterstützung wäre auch diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## 9. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

Name: Josef Höpfl  
 Anschrift: Gsteinetstraße 12A, 93476 Blaibach  
 E-mail: mail@jhoepfl.de  
 Geburtstag / -ort: 06. August 1977 in Kötzing  
 Familienstand: ledig

### AUSBILDUNG (SCHULE / UNIVERSITÄT):

---

1989 – 1997 Benedikt-Stattler-Gymnasium in Kötzing, Abitur 1997  
 1996 Medizinertest (TMS): 98.6  
 1998 – 2000 Medizinstudium an der Universität Regensburg,  
 vorklinischer Studienabschnitt, Physikum im Herbst 2000  
 2000 Beginn des klinischen Studienabschnittes der Humanmedizin  
 an der Technischen Universität München (TUM)  
 2001 Beginn der Promotionsarbeit an der TUM im Frühjahr 2001  
 2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Herbst 2001  
 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Frühjahr 2004  
 2004 Beginn des Praktischen Jahres in New York, unterstützt durch  
 ein Stipendium des Präsidenten der TUM  
 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Frühjahr 2005

### PRAKTISCHE AUSBILDUNG (FAMULATUREN / PJ)

---

2001 – 2003 Famulaturen am Kantonsspital Luzern, im Klinikum Straubing,  
 in den University of Chicago Hospitals (Pritzker, USA), im  
 Klinikum rechts der Isar (III. Med. Klinik), am Kantonsspital  
 St. Gallen sowie in einer internistischen Praxis in München  
 2004 - 2005 Praktisches Jahr an der Cornell University in New York, USA,  
 der Tulane University Medical School in New Orleans, USA,  
 am Bristol Royal Infirmary, Bristol University, GB, sowie am  
 Kantonsspital der Universität Basel, Schweiz

### WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG:

---

2001 – 2004 Promotion in der Abt. für Exp. Hämatologie von Prof. Dr.  
 Duyster der Klinik für Hämato-/Onkologie von Prof. Peschel