

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

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

**Untersuchung des Einflusses der Bcr-Abl Resistenzmutationen T315I und
Y253H auf die Kinaseaktivität und das onkogene Potential**

Susanne Feihl

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. Priv.-Doz. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 10.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.09.2009 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Chronisch myeloische Leukämie | 1 |
| 1.1.1 | Epidemiologie und Ätiologie | 1 |
| 1.1.2 | Klinischer Verlauf | 1 |
| 1.1.3 | Pathogenese | 2 |
| 1.2 | Die Tyrosinkinase Bcr-Abl | 3 |
| 1.2.1 | Protein-Tyrosinkinasen | 3 |
| 1.2.2 | Aufbau und Funktion der Tyrosinkinase c-Abl | 4 |
| 1.2.3 | Aufbau und Funktion von Bcr | 5 |
| 1.2.4 | Bcr-Abl | 6 |
| 1.3 | Selektive Inhibition der Tyrosinkinase Bcr-Abl durch Imatinib | 11 |
| 1.3.1 | Wirkungsweise von Imatinib | 11 |
| 1.3.2 | Ergebnisse der klinischen Anwendung von Imatinib | 12 |
| 1.3.3 | Resistenzmechanismen | 13 |
| 1.4 | Punktmutationen in der Bcr-Abl Tyrosinkinase | 15 |
| 1.5 | Aufgabenstellung | 18 |
| 2 | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Materialien | 19 |
| 2.1.1 | Chemikalien und biogene Substanzen | 19 |
| 2.1.2 | Medien und Supplemente für die Zellkultur | 20 |
| 2.1.3 | Enzyme | 21 |
| 2.1.4 | Zelllinien | 22 |
| 2.1.5 | Vektoren und DNA-Konstrukte | 22 |
| 2.1.6 | Bakterienstämme | 23 |
| 2.1.7 | Oligonukleotide für die RT-PCR | 23 |
| 2.1.8 | Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine | 23 |
| 2.1.9 | Mäuse und tierexperimentelle Materialien | 23 |
| 2.1.10 | Molekularbiologische Kitsysteme | 24 |
| 2.1.11 | Standard Geräte | 24 |
| 2.1.12 | Standard Lösungen und Puffer | 25 |
| 2.2 | Methoden | 28 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Arbeitstechniken | 28 |
| 2.2.2 | Arbeiten mit Bakterien | 32 |
| 2.2.3 | Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien | 34 |
| 2.2.4 | Proteinbiochemische Methoden | 40 |
| 2.2.5 | Tiermodell | 43 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3 | Ergebnisse | 48 |
| 3.1 | Untersuchung der Enzymaktivität der Bcr-Abl Punktmutationen T315I und Y253H | 48 |
| 3.1.1 | Herstellung der Bcr-Abl Vektorkonstrukte | 48 |
| 3.1.2 | Phosphorylierungskinetik eines synthetischen Abl Substrates | 49 |
| 3.1.3 | Proteinphosphorylierung in Ba/F3 Zellen | 52 |
| 3.2 | Charakterisierung der Bcr-Abl Punktmutanten in einem kompetitiven Repopulationsassay | 53 |
| 3.2.1 | Etablierung eines kompetitiven Repopulationsassays | 53 |
| 3.2.2 | Retrovirale Transduktion- und Transplantation | 58 |
| 3.2.3 | <i>In-vitro</i> Vergleich des Wachstumsverhalten der Bcr-Abl Punktmutanten und des Bcr-Abl Wildtyps | 64 |
| 3.2.4 | <i>In-vivo</i> Vergleich des transformierenden Potentials der Bcr-Abl Punktmutanten und des Bcr-Abl Wildtyps | 67 |
| 4 | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Untersuchung des Einflusses der Punktmutanten T315I und Y253H auf die Kinaseaktivität von Bcr-Abl im Zellmodell | 73 |
| 4.1.1 | Vergleich der Kinaseaktivität <i>in vitro</i> | 74 |
| 4.1.2 | Vergleich der Kinaseaktivität <i>in vivo</i> | 75 |
| 4.1.3 | Auswirkung der Bcr-Abl Punktmutationen auf die Imatinibsensitivität <i>in vitro</i> | 76 |
| 4.2 | Etablierung eines kompetitiven Knochenmark Repopulations-/Transformationsassay | 77 |
| 4.2.1 | Untersuchung der transformierenden Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten T315I und Y253H <i>in vitro</i> | 78 |
| 4.2.2 | Untersuchung der transformierenden Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten T315I und Y253H <i>in vivo</i> | 79 |
| 5 | Zusammenfassung | 82 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 84 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 99 |
| 8 | Publikation | 100 |
| 9 | Danksagung | 101 |
| 10 | Lebenslauf | 102 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| α | anti |
| λ | Wellenlänge |
| μg | 10^{-6} Gramm |
| μl | 10^{-6} Liter |
| μmol | 10^{-6} Mol |
| μM | 10^{-6} Mol/Liter |
| Abb. | Abbildung |
| A.d. | Aqua destillata |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| b | Base |
| BBMM | Basal Bone Marrow Medium |
| Bcr | breakpoint cluster region |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Celsius |
| CCR | vollständige zytogenetische Remission |
| cDNA | komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>) |
| CFU | colony forming unit |
| CIAP | alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase) |
| CML | chronisch myeloische Leukämie |
| CSF | Colony stimulating factor |
| D | Aspartat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | 2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Extinktion |
| E.coli | Escherichia coli |

| | |
|--------|--|
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EGFP | grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>) |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| et al. | et aliter |
| F | Farad |
| FACS | Durchflusszytometer |
| FCS | fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FS | Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>) |
| 5-FU | 5-Fluoruracil |
| Grb | growth factor receptor-binding protein |
| Gy | Gray (1 Gy=1 J/kg) |
| h | human / Stunde |
| H | Histidin |
| Her2 | Human epidermal growth factor receptor 2 |
| HRP | Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>) |
| I | Isoleucin |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IRES | interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>) |
| JAK | Janus Kinase |
| kb | Kilobase(n), 1000 Basenpaare |
| kD | Kilodalton |
| KM | Knochenmark |
| LB | Luria-Bertani |
| lin | linear |
| log | logarithmisch |
| LTR | long terminal repeat |
| m | murin |
| M | Marker / Methionin |
| mA | Milliampere |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>) |
| M-Bcr | major breakpoint cluster region |
| m-Bcr | minor breakpoint cluster region |
| MCR | starke zytogenetische Remission |

| | |
|-------------|---|
| mM (mmol/l) | 10^{-3} Mol/Liter |
| min | Minute(n) |
| MPS | myeloproliferatives Syndrom |
| mRNA | <i>messenger</i> -RNA |
| mut | Mutante |
| ng | 10^{-9} Gramm, Nanogramm |
| nm | 10^{-9} Meter, Nanometer |
| nM (nmol/l) | 10^{-9} Mol/l |
| NaCl | Natriumchlorid |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDGF | Platelet-Derived Growth Factor |
| PE | Phycoerythrin |
| pH | pondus Hydrogenii (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration) |
| PI | Propidiumiodid |
| PKC | Proteinkinase C |
| PVDF | Polyvinylidifluorid |
| pY | Phosphotyrosin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkriptase / Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion |
| s | Sekunde |
| SH | Src-homology |
| SS | Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>) |
| SCF | Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| STI | Signal Transduction Inhibitor |
| T | Threonin |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TKD | Tyrosinkinasedomäne |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Einheit (<i>unit</i>) |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |

| | |
|----|---------|
| WT | Wildtyp |
| Y | Tyrosin |

1 Einleitung

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) war die erste maligne Erkrankung, deren Pathogenese mit einer spezifischen, chromosomalen Anomalie in Verbindung gebracht werden konnte. Die Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms, das für das Onkogen Bcr-Abl kodiert, führte zur beispielhaften Entdeckung molekularer Mechanismen der Krankheitsentstehung und der Entwicklung zielgerichteter Therapieversuche im Bereich der hämatologischen Neoplasien.

1.1 Chronisch myeloische Leukämie

Der chronisch myeloischen Leukämie, die zu den myeloproliferativen Syndromen gehört, liegt eine maligne Entartung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks zugrunde (Silver, 1990). Diese monoklonale Erkrankung betrifft die Myelo-, Erythro- und Megakaryopoese, sowie die B- und einen Teil der T-Lymphozyten (Fialkow et al., 1977). Klinisch steht die Verdrängung der gesunden Hämatopoese durch die Zunahme der Granulozyten und ihrer Vorstufen im Vordergrund.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die CML hat eine Inzidenz von 1/100000 Einwohner und tritt vor allem in der 5. bis 6. Lebensdekade auf mit einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts (Faderl et al., 1999; Peschel et al., 2003). Die Ätiologie der CML ist noch nicht vollständig geklärt. Als auslösende Faktoren wurden ionisierende Strahlung und Benzol identifiziert (Cortez et al., 1996). Darüber hinaus werden mögliche genetische Zusammenhänge mit dem HLA Antigen CW3 und CW4 diskutiert (Bortin et al., 1987).

1.1.2 Klinischer Verlauf

Bei den meisten Patienten kann ein mehrstufiger Verlauf von der chronischen über die akzelerierte Phase zur Blastenkrise beobachtet werden. In der initialen chronischen Phase, die durchschnittlich 3,5-5 Jahre dauert, findet sich in der Regel eine ausgeprägte Leukozytose mit Granulozytenvorstufen im peripheren Blut (Cortez et al., 1996). Der Anteil der Promyelozyten und Blasten im peripheren Blut und Knochenmark liegt bei unter 10% (Peschel et al., 2003). Ungefähr 40% der Patienten zeigen in der chronischen Phase einen beschwerdefreien Verlauf und werden nur durch eine Routineuntersuchung diagnostiziert (Sawyers, 1999). Andere Patienten klagen über unspezifische Symptome wie Müdigkeit,

Leistungsminderung, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Neben einer Splenomegalie findet sich in 10 bis 40% der Fälle eine Hepatomegalie, als Ausdruck der Zellinfiltration von Milz und Leber (Cortez et al., 1996).

Die akzelerierte Phase bezeichnet die Übergangsphase zwischen chronischer Phase und Blastenschub. Hinweisend auf die akzelerierte Phase ist eine zunehmende Leukozytose mit Anstieg der Vorstufen auf 10-20%, Basophilie, Anämie, Thrombozytopenie oder Thrombozytose, zunehmende Milzvergrößerung und Fieberschübe.

Mindestens 20 % der Patienten gehen ohne Zeichen der Akzelerationsphase in den Blastenschub, die dritte Phase der CML, über. Dabei sind vermutlich zusätzliche zytogenetische und molekulare Mutationen für den Übergang der akzelerierten Phase in den Blastenschub verantwortlich. Auf dieses Stadium der Erkrankung weist eine massive Leukozytose mit mehr als 30% Blasten und Promyelozyten im peripheren Blut und über 50% blastärer Zellen im Knochenmark hin. Darüberhinaus kann die Verdrängung der normalen Hämatopoese zu Anämie und Thrombopenie führen. Zwei Drittel der Patienten entwickeln eine myeloische Blastenkrise mit Anstieg der Myeloblasten und Promyelozyten, circa ein Drittel der Fälle entwickeln eine lymphatische Blastenkrise. Der Verlauf der Blastenkrise gleicht einer akuten Leukämie und endet in der Regel rasch letal.

1.1.3 Pathogenese

Das Philadelphia-Chromosom war die erste chromosomale Anomalie, die als auslösender Faktor für die Entstehung einer hämatologischen Erkrankung identifiziert wurde. Im Jahr 1960 entdeckten Nowell und Hungerford in Philadelphia (USA) bei CML-Patienten eine Chromosomenveränderung im Karyogramm (Nowell and Hungerford, 1960). Diese Translokation, die 1973 durch Rowley den Chromosomen 9 und 22 zugeordnet wurde, erhielt den Namen seines Entdeckungsortes Philadelphia (Rowley, 1973). Der Anteil der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph+) Patienten mit CML wird in der Literatur bei über 90% angegeben. Vermutlich liegt er aber nahezu bei 100%, da durch neuere Methoden wie z.B. der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) bei vielen primär negativ getesteten Personen eine maskierte Translokation t(9;22) nachgewiesen werden konnte. Bei etwa 20% der Erwachsenen mit akuter lymphatischer Leukämie ist das Philadelphia Chromosom ebenfalls diagnostizierbar (Pui et al., 2004).

Das Philadelphia-Chromosom ist ein gekürztes Chromosom 22, das durch reziproke Translokation t(9;22)(q34;q11) von Teilen des langen Arms des Chromosoms 9 auf das Chromosom 22 entsteht und auf molekularer Ebene zur Fusion der Gene Bcr und c-Abl führt. Dies hat eine konstitutive Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase mit proliferationsfördernder Wirkung zur Folge.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Bcr-Abl ausreicht, um myeloide Zellen zu transformieren und im Mausmodell eine CML-ähnliche Erkrankung zu induzieren (Daley et al., 1990). Die retrovirale Transduktion und Transplantation von murinen Knochenmarkzellen in myeloablativ bestrahlte Mäuse führt zu einem myeloproliferativen Syndrom, das viele Merkmale der CML im Menschen aufweist. Dies beweist, dass der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase Bcr-Abl die entscheidende Rolle bei der Pathogenese der CML zugeschrieben werden kann.

1.2 Die Tyrosinkinase Bcr-Abl

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben, hat die Translokation t(9;22) auf molekularer Ebene die Expression der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase Bcr-Abl zur Folge. In den folgenden Kapiteln werden die pathophysiologischen Mechanismen beschrieben, die zur Deregulation der Tyrosinkinase und damit zur Leukämogenese führen.

1.2.1 Protein-Tyrosinkinasen

Proteintyrosinkinasen sind wichtige Regulatoren der intrazellulären Signaltransduktion und des Zellwachstums. Im Humangenom existieren mehr als 90 Gene, die für Tyrosinkinasen kodieren und 43 tyrosinkinase-ähnliche Gene, deren Expressionsprodukte zelluläre Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Neovaskularisation und Migration regulieren (Krause and Van Etten, 2005). Es existieren zwei Klassen von Tyrosinkinasen die transmembranären Rezeptortyrosinkinasen (RTK) mit einer Liganden bindenden extrazellulären Domäne und einer intrazellulären Kinasedomäne, und die nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen, denen eine transmembranäre Domäne fehlt (Krause and Van Etten, 2005). Tyrosinkinasen werden von spezifischen Signalen aktiviert und katalysieren die Übertragung des γ -Phosphatrestes von Adenosintriphosphat (ATP) auf den Tyrosinrest eines Substratproteins (Hunter, 1991). Ihre Aktivität ist normalerweise streng kontrolliert. Durch Mutationen veränderte Tyrosinkinasen zeigen oft eine deregulierte Kinaseaktivität, die zu zellulärer Transformation führt und dadurch zur Entstehung von Neoplasien beiträgt (Hunter, 1997; Robinson et al., 2000). Bcr-Abl wurde als erste deregulierte Tyrosinkinase in direkte Verbindung mit der Pathogenese einer hämatologischen Krebserkrankung gebracht (Krause and Van Etten, 2005).

1.2.2 Aufbau und Funktion der Tyrosinkinase c-Abl

Das Protoonkogen c-Abl kodiert für eine 145 kD große nicht-Rezeptor Tyrosinkinase, die ubiquitär exprimiert wird und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu finden ist (Wang, 1993). C-Abl wurde als zelluläres Homolog von v-Abl, des viralen Onkogens des „Abelson murine leukemia virus“ identifiziert, das in der Lage ist, hämatopoetische Zellen zu transformieren (Daley and Baltimore, 1988; Davis et al., 1985; Goff et al., 1980; Konopka et al., 1984).

Kristallstrukturanalysen und begleitende Struktur-Funktionsanalysen zeigten eine den Src-Kinasen ähnliche Proteinstruktur, sowie ähnliche Regulationsmechanismen (Hantschel et al., 2003; Hantschel and Superti-Furga, 2004). Die zwei Mitglieder der Abl-Familie, c-Abl und Arg bilden mit neun Kinasen der Src-Familie und fünf Mitgliedern der Tec-Familie eine Superfamilie, die durch eine N-terminale SH3- und SH2-Domäne sowie eine Tyrosinkinasedomäne charakterisiert ist. Während die Src-Familie einen kurzen C-terminalen Fortsatz besitzt, befindet sich am C-terminalen Ende der Abl-Kinasen ein 600 Aminosäuren langer Bereich. Dieser wird von einem einzigen Exon codiert und als «last exon region» bezeichnet. Hier finden sich eine Vielzahl funktioneller Domänen, drei Kernlokalisationssequenzen und ein Kernexportsignal, die für die schnelle Relokalisation von c-Abl zwischen Zellkern und Zytoplasma verantwortlich sind. Stromaufwärts der SH3 Domäne befindet sich die «cap» Region, die für die Autoinhibition eine wichtige Rolle spielt und durch alternatives Spleißen in zwei Varianten vorkommt (Pluk et al., 2002).

Bisherige Erkenntnisse zeigen dass Abl in zahlreiche zelluläre Abläufe involviert ist, die für Zelldifferenzierung, Zellentwicklung und DNA-Reparatur von Bedeutung sind.

Die Lokalisation von c-Abl in der Zelle, bestimmt dabei die Funktion der Kinase. Nukleäres c-Abl ist vermutlich an der Zellzyklusregulation beteiligt (Wang, 1993). Während der G1 Phase wird c-Abl durch das Retinoblastoma Protein (RB) inhibiert und in der S-Phase aktiviert (Welch and Wang, 1993). Auch ionisierende Strahlung und DNA-schädigende Chemikalien können zu einer Aktivierung von c-Abl führen (Kharbanda et al., 1995; Wang, 1998). Aktiviertes Abl phosphoryliert die RNA Polymerase II und stimuliert zusammen mit bestimmten Transkriptionsfaktoren die Transkription von S-Phase Genen (Birchenall-Roberts et al., 1997; Welch and Wang, 1993). Cytoplasmatisches c-Abl wird durch Adhäsion an Integrine reguliert, ist an der Stabilisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und wurde kürzlich als wichtiger Regulator von cytoplasmatischen Signalprozessen entschlüsselt (Burton et al., 2003; Coyne and Bergelson, 2006; Lewis et al., 1996; Reeves et al., 2005; Sirvent et al., 2008; Van Etten, 1999; Van Etten et al., 1994; Zipfel et al., 2004).

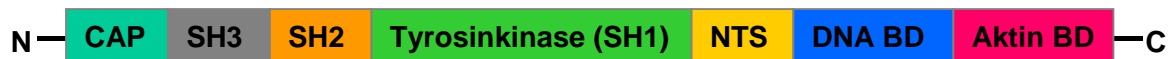


Abb. 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl

CAP: „cap“ Region; SH3: Src-homologe Domäne 3; SH2: Src-homologe Domäne 1; NTS: nukleäres Translokationssignal; DNA BD: DNA bindende Domäne; Aktin BD: Aktin bindende Domäne

1.2.3 Aufbau und Funktion von Bcr

Der Fusionspartner von c-Abl, das Bcr-Gen, kodiert für ein 160kD Protein, das im Zytoplasma lokalisiert ist. Bcr ist ein komplexes Molekül mit vielen verschiedenen funktionellen Domänen (Laurent et al., 2001). Dem ersten Exon von Bcr wird eine essentielle Rolle bei der Aktivierung der transformierenden Funktion von Bcr-Abl zugeschrieben. In diesem Bereich befindet sich die Oligomerisierungsdomäne (coiled-coiled Motiv), die eine Dimerisierung oder Oligomerisierung von Bcr-Abl ermöglicht und so seine Funktion aktiviert (McWhirter et al., 1993). Außerdem ist die Oligomerisierungsdomäne durch Assoziation an Actinfilamente für die zytosolische Lokalisation verantwortlich (McWhirter and Wang, 1991, 1993). Bcr besitzt drei SH2 bindende Domänen. Zwei dieser Domänen interagieren mit der SH2 Domäne von Abl. Eine dritte SH2 bindende Domäne enthält den Phosphotyrosinrest 177, der das Adapterprotein Grb2 bindet (siehe Kapitel 1.2.4.1). (Pendergast et al., 1991b; Pendergast et al., 1993). Eine Serin/Threonin-Kinase im Exon 1 ermöglicht die Autophosphorylierung von Bcr an Serin- oder Threoninresten (Maru and Witte, 1991). Neben der Kinasedomäne befinden sich im Exon 1 sogenannte 14-3-3 proteinbindende Stellen (Reuther 2004). Die Familie der 14-3-3 Proteine ist an zahlreichen wichtigen Signaltransduktionsprozessen beteiligt (Aitken, 2002; Clokie et al., 2005; Fu et al., 2000; Mackintosh, 2004; Tzivion and Avruch, 2002). C-terminal verfügt Bcr über Sequenzen die Homologien zu Proteinen aufweisen, welche regulatorische Aktivität gegenüber GTP bindenden Proteinen aufweisen. Es handelt sich um eine zentral gelegene Guanin-nucleotide-exchange-factor Region (GEF), die durch den Austausch von GDP durch GTP, Ras aktiviert. Eine C-terminale Region zeigt Homologie zu einer GTPase Aktivierungsdomäne (GAP) für die Proteine p21rho und p21rac, zwei Mitgliedern der RAS Familie. GAP katalysiert die Hydrolyse von Ras gebundenem GTP und inaktiviert dadurch RAS (Diekmann et al., 1991; Gibbs et al., 1990).

Eine weitere C-terminal lokalisierte funktionelle PSD-95/discs large/ZO-1 (PDZ) bindende Domäne wurde kürzlich identifiziert. Diese interagiert mit membranassoziierten PDZ bindenden Proteinen im Bereich der Verbindung epithelialer Zellen, bindet ein mit Ras interagierendes Protein (AF-6) und tritt mit dem „ERB2 interacting Protein“ (ERBIN) in Verbindung (Boisguerin et al., 2004; Radziwill et al., 2003).

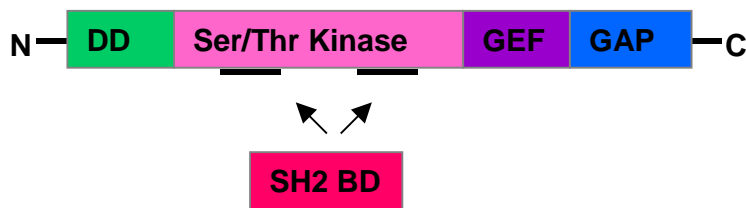


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Bcr

DD: Dimerisierungsdomäne; SH2 BD: SH2 bindende Domäne; GEF: Guanin-nucleotide-exchange factor; GAP: GTPase Aktivierungsdomäne

1.2.4 Bcr-Abl

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben resultiert das Fusionsprotein Bcr-Abl aus der reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 (siehe Abb. 3. A). Der Bruchpunkt auf Chromosom 9 liegt im 11 Exons umfassenden Genlocus von c-Abl und ist normalerweise im ersten Intron lokalisiert. Somit werden die Exons e2 bis e11 (a2 bis a11) auf das Chromosom 22 in die „major breakpoint cluster region“ (M-bcr) des Bcr Gens transloziert (Kurzrock et al., 1988). Der Bcr Genlocus umfasst 20 Exons, wobei sich die M-bcr zwischen Exon 12 und 16 (auch als b1 bis b5 bezeichnet) befindet. Die Bruchpunkte liegen zwischen den Exons b2 und b3 oder b3 und b4, wodurch ein Bcr-Abl Fusionsgen mit der Verbindung b2a2 oder b3a2 entsteht. Dieses Fragment wird in eine 8,5 kb umfassende mRNA transkribiert und in ein 210kD großes Fusionsprotein ($p210^{\text{Bcr-Abl}}$) translatiert (siehe Abb. 3) (Kurzrock et al., 1988). Bei der Ph positiven akuten lymphatischen Leukämie des Erwachsenen wird in etwa 50-80% der Fälle ein 185 kD großes Bcr-Abl Protein exprimiert ($p185^{\text{Bcr-Abl}}$) (Clark et al., 1987). Der Bruchpunkt auf Chromosom 22 kann dabei im ersten Intron (zwischen Exon e1 und e2) von Bcr lokalisiert werden, der minor breakpoint cluster region. Durch Fusion mit Abl entsteht die Verbindung e1a2 (Kurzrock et al., 1987). Eine dritte breakpoint cluster region (μ -Bcr) zwischen e19 und e20 führt zu einem Fusionstranskript mit der Verbindung e19a2 und wird in ein 230kD großes Protein translatiert wie Abb. 3 zeigt. Diese Variante ist mit der chronisch neutrophilen Leukämie und Thrombozytose assoziiert (Pane et al., 1996).

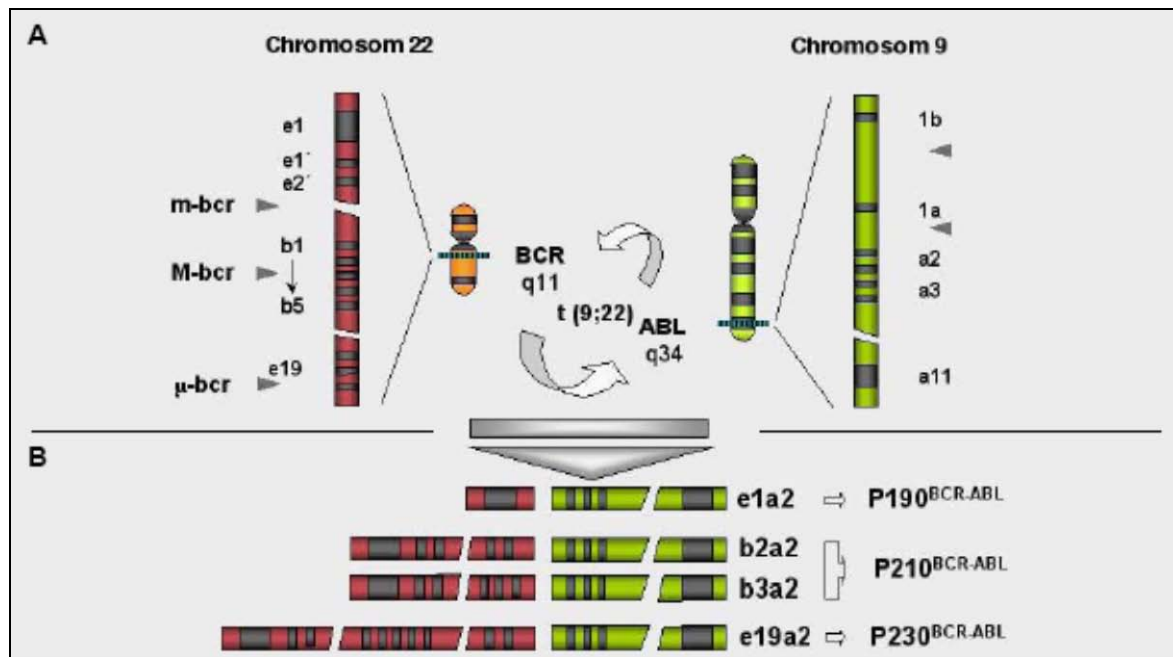


Abb. 3: Schema Translokation t (9;22), modifiziert nach (Faderl et al., 1999)

a) Im oberen Teil der Abbildung sind die Gene Bcr und Abl mit der Nummerierung der Exons dargestellt. Die Pfeilspitzen zeigen die Lage der möglichen Bruchpunkte an. Der Bruchpunkt des Abl Chromosoms befindet sich meist oberhalb von Exon a2. Die Lage des Bruchpunktes auf Chromosom 22 variiert hingegen, sie liegt aber meistens in der M-Bcr Region (major breakpoint cluster region). Das Bcr-Gen besitzt mit m-Bcr (minor breakpoint cluster region) und μ-Bcr (dritter breakpoint unterhalb von M-Bcr) zwei weitere Bruchpunktregionen. Je nach Lage des Bruchpunktes in Bcr werden unterschiedlich lange Segmente des Bcr-Gens mit dem Abl Segment fusioniert.

b) Der untere Teil der Abbildung zeigt die resultierenden unterschiedlich langen mRNAs. b2a2 und b3a2 kodieren für das Fusionsprotein Bcr-Abl p210, das vor allem bei CML Patienten gefunden wird. e1a2 wird in das für die ALL typische Bcr-Abl p190 translatiert und e19a2 in das Bcr-Abl Protein p230, das bei der chronisch Neutrophilen-Leukämie vorgefunden wird.

Die Fusion von Bcr- Sequenzen mit c-Abl führt zur Aktivierung und Deregulierung der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erklärt, führt das Oligomerisierungssignal in Bcr zur Dimer- und Tetramerbildung von Bcr-Abl Proteinen (McWhirter et al., 1993). Dies ermöglicht die gegenseitige Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Darüber hinaus ist Bcr für die zytoplasmatische Lokalisation verantwortlich und besitzt die Autophosphorylierungsstelle Tyr 177 (McWhirter and Wang, 1993; Pendergast et al., 1993; Puil et al., 1994). Dieser Phosphotyrosinrest 177 bindet das Adapterprotein Grb2, das eine wichtige Rolle im Ras-Signaltransduktionsweg spielt und zur Aktivierung der onkogenen Eigenschaften von Bcr-Abl beiträgt (Pendergast et al., 1993). Mit seinen verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsdomänen aktiviert das Bcr-Abl Protein zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionswege und führt durch die überschießende Kinaseaktivität zu einer Veränderung des biologischen Zellverhaltens. Dies zeigt sich in einer Induktion der Zellproliferation, einem veränderten Differenzierungsverhalten, der Apoptoseinhibition und veränderten Adhäsionseigenschaften an Stromazellen (Chopra et al., 1999; Di Bacco et al., 2000; Faderl et al., 1999).

1.2.4.1 Signaltransduktion durch Bcr-Abl

In der Zelle führt die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase Bcr-Abl zur Induktion zahlreicher promotogener und antiapoptotischer Signalkaskaden. Zu den drei wichtigsten Signalwegen über die Bcr-Abl seine onkogene Wirkung entfaltet gehören der Ras/Raf/Mek/Erk-, Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt und der JAK/STAT-Signalweg.

Der Ras/Raf/Mek/Erk-Signaltransduktionsweg

Ras ist in die Regulation von Zellproliferation und Differenzierung involviert und wird als wichtigster Signalweg in der Pathogenese der CML bezeichnet (Sawyers et al., 1995). Die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 177 im Bcr-Segment, interagiert mit den Adapterproteinen Grb-2 und Gab2 (Sattler et al., 2002). Grb-2 bindet an das Sos (son of sevenless) Protein, einem Ras Aktivatorprotein, das den Austausch von GDP durch GTP am Ras-Protein fördert. Darüber hinaus sind zwei weitere Adapterproteine, CRKL und SHC bekannt, die durch Bindung an Bcr-Abl den Ras-Signalweg aktivieren (Oda et al., 1994; Pelicci et al., 1995). Aktiviertes Ras führt zur Translokation der Raf-Kinase an die Zellmembran. Durch Phosphorylierung erfolgt hier die Aktivierung von Raf, als dessen wichtigstes downstream Target die Familie der Mek-Kinasen identifiziert wurde. Die Physiologischen Substrate der Mek-Kinase gehören zur Familie der mitogen aktivierten Protein Kinasen (MAPK) oder „extracellular-signal-regulated kinases“ (Erk) (Cortez et al., 1997; Raitano et al., 1995; Skorski et al., 1995; Steelman et al., 2004). Der Ras/Raf/Mek/Erk Signalweg endet im Zellkern mit der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Chang et al., 2003).

Phosphatidylinositol 3'(PI3-)-Kinase/Akt Signaltransduktionsweg

Der PI3-Kinase Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei Differenzierung, Proliferation, Motilität und Metabolismus der normalen Zelle (Fruman et al., 1998). PI3 Kinasen können nach Struktur und Substratspezifität in mehrere Klassen eingeteilt werden. Durch Tyrosinkinasen aktivierte PI3 Kinasen werden meist der Klasse 1a zugeordnet (Kharas and Fruman, 2005; Vanhaesebroeck et al., 2005). Aktivierte PI3 Kinasen der Klasse 1a konvertieren Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3), einem wichtigen „Second Messenger“ (Vanhaesebroeck et al., 2001). Bereits seit einigen Jahren ist eine Akkumulation von PIP3 in Bcr-Abl transformierten Zellen bekannt (Jain et al., 1996; Varticovski et al., 1991). Der Einsatz von PI3 Kinase Inhibitoren zeigte durch eine Blockade der Transformation myeloider und lymphoider Zellen die

Relevanz dieser Signalkaskade für die transformierende Wirkung des Onkogens Abl (Kharas et al., 2004).

Die Aktivierung der PI3 Kinase erfolgt über die Bindung der Adapterproteine Grb2 und Gab2 an die Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 177 im Bcr- Segment oder über eine Bindung der Proteine Crkl und c-Cbl an Abl. Möglicherweise erfolgt eine Aktivierung der PI3 Kinase auch downstream des Onkogens Abl über Src, Ras und insulin-receptor substrate-1 (IRS-1). Als Effektoren der PI3 Kinase konnten bereits eine große Anzahl von Proteinen identifiziert werden. Als wichtigster downstream Effektor in Bcr-Abl transformierten Zellen gilt die Serin/Threonin Kinase Akt. In seiner aktivierten Form unterstützt Akt durch Phosphorylierung zahlreicher Substratproteine die Proliferaton, das Wachstum und die Überlebensdauer Bcr-Abl transformierter Zellen (Brazil et al., 2004; Downward, 2004; Kharas and Fruman, 2005; Vanhaesebroeck et al., 2001).

Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Janus Kinasen (JAKs) spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch Zytokin-Rezeptoren (Liu et al., 1997; Schindler and Darnell, 1995). Signal transducers and activators of transcription (STATs) werden durch JAKs phosphoryliert, dimerisieren und wandern in den Zellkern, um dort die Gentranskription zu regulieren. Der JAK/STAT-Signalweg stellt somit die unmittelbare Verbindung zwischen Zytokinrezeptoren und Gentranskription dar (Sattler and Salgia, 1997). Bisher konnten der Familie der Janus Kinasen vier verschiedene Proteine und der Familie der STATs sieben verschiedene Mitglieder zugeordnet werden (Kisseleva et al., 2002). Ohne physiologischen Stimulus und ohne Phosphorylierung von JAK induziert Bcr-Abl direkt die Aktivierung von STAT5. Die konstitutive STAT5-Phosphorylierung führt zu wachstumsfaktor-unabhängiger Zellproliferation Bcr-Abl positiver Zellen (Carlesso et al., 1996; Steelman et al., 2004).

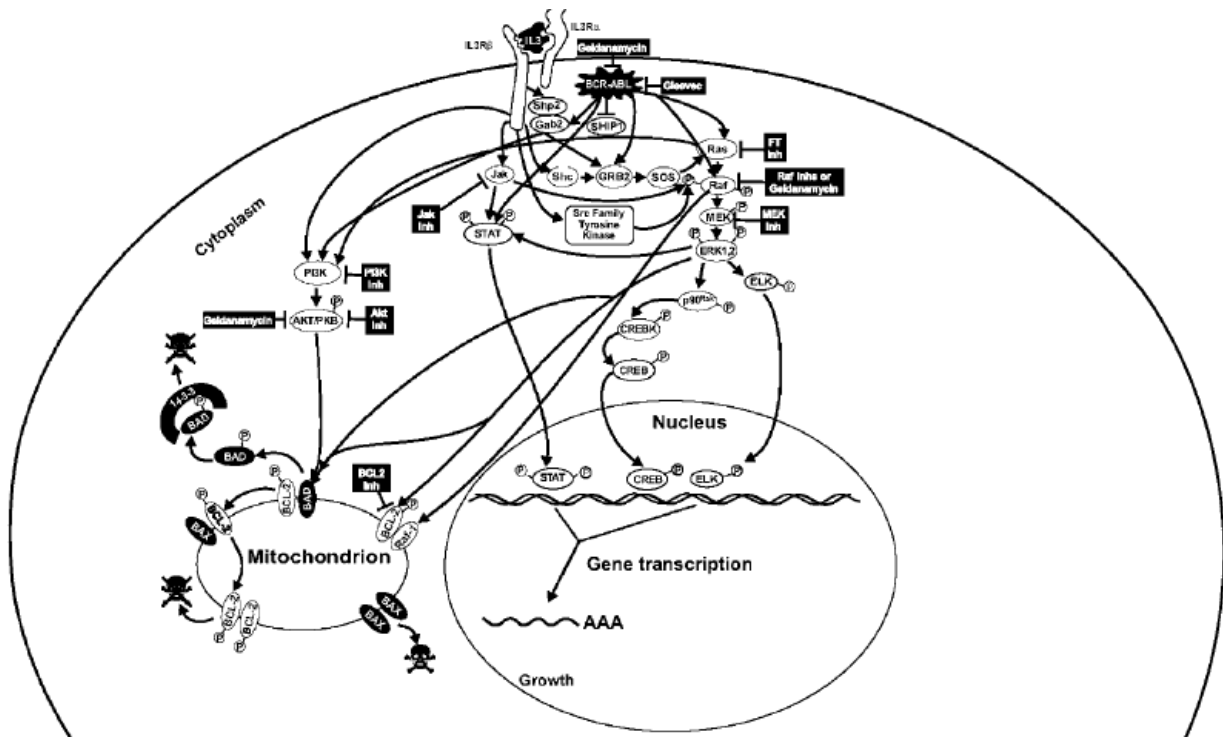


Abb. 4 Bcr-Abl Signaltransduktion modifiziert nach Steelman et al., 2004

1.2.4.2 Veränderung des Adhäsionsverhaltens und der zytoskeletalen Funktion hämatopoetischer Zellen durch Bcr-Abl

Die Interaktion hämatopoetischer Zellen mit Matrix Komponenten ist ein wichtiger regulatorischer Prozess, der die Differenzierung, Apoptose, Proliferation und das Homing hämatopoetischer Zellen beeinflusst. Dabei spielen vor allem die Stromazellen des Knochenmarks und die von ihnen produzierten Zytokine eine wichtige Rolle.

Im Gegensatz zu normalen hämatopoetischen Vorläufer-Zellen, zeigen Bcr-Abl positive Progenitor Zellen ein vermindertes Adhäsionsverhalten an Stromazellen und extrazelluläre Matrix (Gordon et al., 1987; Verfaillie et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer Ausschwemmung unreifer Zellen ins periphere Blut und zu extramedullärer Proliferation dieser Zellen in Geweben wie Milz und Leber. Außerdem wird die negativ regulatorische Funktion der Adhäsion auf die Zellproliferation aufgehoben. Es konnte gezeigt werden, dass β -Integrine eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Zellinnerem und extrazellulärer Matrix spielen und so Signale zur Regulation der Zellproliferation übermitteln (Lewis et al., 1996). Das von CML-Zellen exprimierte β -Integrin zeigt eine veränderte Funktion, weshalb Signale, die die normale Hämatopoese regulieren nicht übertragen werden können. Die Kolokalisation von Bcr-Abl mit Adhäsionsproteinen wie Paxillin, Tensin, Talin und Vinculin im Zytoskelett, führt vermutlich ebenfalls zu einer Beeinflussung der Zellmobilität und Adhäsion

(Salgia et al., 1995; Sattler and Salgia, 1997). Für viele hämatologische Erkrankungen konnte kürzlich der Einfluss des Stromal derived factor-1 (SDF-1) und seines G-Protein gekoppelten transmembran Rezeptors, CXCR4 auf ein verändertes Migrationsverhalten der hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt werden (Burger and Kipps, 2006; Hideshima et al., 2004). Die starke Expression von Bcr-Abl p210 in der Blastenkrise der CML führt vermutlich zu einer verminderten Produktion des CXCR4 Rezeptors. Die konsekutive Abnahme der durch CXCR4 vermittelten Signale begünstigt die Ausschwemmung hämatopoetischer Vorläuferzellen ins periphere Blut und die Kolonisation nicht-hämatopoetischer Gewebe (Geay et al., 2005).

1.3 Selektive Inhibition der Tyrosinkinase Bcr-Abl durch Imatinib

Selektive Proteinkinase Inhibitoren, die Einfluss auf maligne Erkrankungen mit gestörter Signaltransduktion haben, sind ein vielversprechender Versuch in der Entwicklung neuer Medikamente. Aufgrund ihrer Deregulation in malignen Neoplasien, waren die Proteinkinasen Bcr-Abl, EGFR, HER2 und Proteinkinase C (PKC) die ersten Zielstrukturen für die Entwicklung selektiver Inhibitoren. Da die Tyrosinkinase Bcr-Abl ein essentieller Faktor für die Pathogenese der Ph positiven CML ist, stellt sie ein besonders attraktives Ziel für die Anwendung eines selektiven Inhibitors dar (Druker and Lydon, 2000).

Der Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib mesylate (Glivec[®] ; frühere Bezeichnung STI 571, CGP57148B) wurde 1996 von der Firma Novartis entwickelt und lässt sich in die Klasse der 2-Phenylaminopyrimidin Verbindungen einordnen (Buchdunger et al., 1996; Druker et al., 1996; Zimmermann et al., 1996). Imatinib ist ein potenter relativ selektiver Inhibitor des onkogenen Fusionsproteins Bcr-Abl (Druker and Lydon, 2000; Druker et al., 1996). Neben der Abl Kinase zeigt Imatinib auf einige weitere Proteinkinasen inhibitorische Wirkung, unter anderem auf die Rezeptor-Tyrosinkinase „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGF-R), die Rezeptor-Tyrosinkinase cKit und die Abl verwandte Tyrosinkinase Arg (Abl related gene) (Buchdunger et al., 2000; Druker and Lydon, 2000; Heinrich et al., 2000).

1.3.1 Wirkungsweise von Imatinib

Die Kinasedomäne eukaryotischer Tyrosinkinasen besitzt eine bilobäre Struktur und besteht aus einer ATP-Bindungsdomäne, einer katalytischen Domäne und einer Aktivierungsschleife (activation loop). Der Inhibitor Imatinib bindet im Bereich der ATP-Bindungsstelle der Abl-Kinase. Die ATP Bindungsstelle befindet sich an der Verbindung der beiden Lobi und wird von einer begrenzten Anzahl hochkonservierter Aminosäurereste gebildet, die mit dem Inhibitor interagieren (Jun and Schindler, 2000; Nagar et al., 2002). Die für diese Arbeit

wichtigen Aminosäuren Threonin 315 und Tyrosin 253 treten beide mit dem Inhibitor Imatinib in Interaktion. Die Aminosäure Threonin 315 steht über eine essentielle Wasserstoffbrückenbindung direkt mit Imatinib in Verbindung. Zwischen Imatinib und der Aminosäure Tyrosin 253, sowie einer Reihe weiterer Aminosäuren sind van der Waals Kräfte wirksam, die die Oberflächenkomplementarität erhöhen. Die Aktivierungsschleife (activation loop) kontrolliert phosphorylierungsabhängig die katalytische Aktivität der Kinase (Johnson et al., 1996). In aktivierten Kinasen wird die Schleife in einer offenen Konformation stabilisiert. Strukturanalysen haben ergeben, dass sich viele aktive Kinasen in dieser Konformation des activation loops ähnlich sind. Inaktive Kinasen zeigen jedoch große Unterschiede bezüglich der Konformation dieser Schleife. Dies ist auch der Grund für die Spezifität von Imatinib. Aus Kristallstrukturanalysen wurde ersichtlich, dass Imatinib spezifisch die inaktive Konformation des activation loops erkennt und somit nur an die inaktive unphosphorylierte Kinase bindet (Jun and Schindler, 2000). Der gebundene Inhibitor stabilisiert die inaktive Konformation der Kinase und führt auf diese Weise zur Inhibition von Bcr-Abl (Gambacorti-Passerini et al., 2003).

In Bcr-Abl exprimierenden Zellen führt Imatinib neben der Induktion von Apoptose, zur Inhibition der Autophosphorylierung von Bcr-Abl, sowie der Substratphosphorylierung und damit zur Aufhebung promotogener Signale (Deininger et al., 1997; Druker et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1997).

1.3.2 Ergebnisse der klinischen Anwendung von Imatinib

Die zielgerichtete Therapie mit Imatinib hat zu einer einschneidenden Veränderung der CML Behandlung geführt. In den ersten klinischen Phase 1 Studien wurde bei geringen Nebenwirkungen ein signifikanter therapeutischer Nutzen mit Imatinib erzielt. Behandelt wurden Patienten in der chronischen Phase mit erfolgloser IFN- α Therapie. Bei 53 von 54 Patienten konnte eine vollständige hämatologische Remission erreicht werden und 31% dieser Patienten erreichten eine komplette oder starke zytogenetische Remission (Druker et al., 2001b).

In Phase 2 Studien wurde Imatinib als Monotherapie in allen Stadien der CML eingesetzt. Bei Patienten mit erfolgloser IFN- α Therapie, wurde in 95 % deäällē ein vollständiges hämatologisches Ansprechen (CHR) beobachtet. Bei 60% der Fälle konnte ein inkomplettes zytogenetisches Ansprechen (MCR) beobachtet werden und komplette zytogenetische Remission (CCR) in 41% der Fälle (Kantarjian et al., 2002; Ottmann et al., 2002; Sawyers et al., 2002; Talpaz et al., 2002). Nur bei 26% dieser Patienten kam es innerhalb von vier Jahren zu einem Rezidiv. Auch bei Patienten in der akzelerierten Phase und im

Blastenschub konnten gute Ansprechraten auf Imatinib beobachtet werden, jedoch traten häufiger Rezidive auf (Sawyers et al., 2002; Talpaz et al., 2002).

In einer grossen internationalen Phase III Multicenter-Studie wurde Imatinib mit der Standardtherapie IFN- α plus Cytarabin (Ara-C) verglichen (IRIS-Studie). Einschlusskriterien waren eine neu diagnostizierte CML in chronischer Phase, die abgesehen von Hydroxyurea oder Anagrelide noch nicht therapiert worden war, sowie ein Lebensalter zwischen 18 und 70 Jahren. Nach einem medianem follow-up von 60 Monaten hatten 69% der Patienten der Imatinibgruppe und 3% der Patienten der IFN- α plus Ara-C Gruppe ihre initiale Therapie weitergeführt. 65% der Patienten der IFN- α plus Ara-C Gruppe hatten zur Imatinibtherapie gewechselt. Die häufigsten Gründe dafür waren Therapieunverträglichkeit, das Ausbleiben einer CHR oder MCR sowie Krankheitsprogression. Aufgrund der geringen verbliebenen Patientenzahl der IFN- α plus Ara-C Gruppe konzentrierte sich die Auswertung der Studie auf die Imatinibgruppe. Die Analyse der mit Imatinib behandelten Patientengruppe anhand der Kaplan-Meier Methode ergab folgende Ergebnisse: CHR 98%; MCR 92%; CCR 87%. Die 5-Jahres Überlebensrate betrug 89% und ist damit höher als in allen bisher veröffentlichten prospektiven Studien zur Therapie der CML (Silver et al., 1999). In dieser Studie konnte also bei einem großen Teil der Patienten mit CML in der chronischen Phase ein dauerhaftes Ansprechen unter kontinuierlicher Imatinibtherapie gezeigt werden (Druker et al., 2006).

Generell wird Imatinib von Patienten mit Bcr-Abl positiven Leukämien sehr gut toleriert (Druker et al., 2001b). Die Toxizität von Imatinib ist nicht höher als die von Hydroxyurea und sogar geringer als die Toxizität von Interferon- α (Goldman and Melo, 2003). Imatinib wird oral gut absorbiert und besitzt in der Kapselform eine Bioverfügbarkeit von 98%.

1.3.3 Resistenzmechanismen

Trotz der bemerkenswerten Behandlungserfolge mit Imatinib, zeigte sich schnell das Problem der Resistenzentwicklung gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor. Abhängig vom Zeitpunkt der Resistenzentstehung, kann eine primäre von einer sekundären Resistenz unterschieden werden. Während das initiale Ausbleiben eines bestimmten hämatologischen oder zytogenetischen Ansprechens zu einem festgelegten Zeitpunkt nach Therapiebeginn als primäre Resistenz definiert wird, bezeichnet die sekundäre Resistenz das erneute Auftreten des leukämischen Klonen nach anfänglichem Therapieerfolg mit Imatinib. Anhand klinischer und laborchemischer Parameter ist eine weitere Einteilung in hämatologische, zytogenetische oder molekulare Resistenz möglich (Baccarani et al., 2006; Melo and Chuah, 2007). Ausführliche Untersuchungen zum Verständnis der Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib führten zu einer Einteilung in Bcr-Abl abhängige und Bcr-Abl unabhängigen Resistenzenstehung.

Einer der Hauptmechanismen der Bcr-Abl abhängigen Resistenzentwicklung ist das Auftreten von Punktmutationen in der Bcr-Abl Kinasedomäne (Abb. 5 C) (siehe Kapitel 1.4) (Gorre et al., 2001; Roumiantsev et al., 2002; Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002). Auch Bcr-Abl Amplifikation auf genomischer oder transkriptioneller Ebene gehört zu den Bcr-Abl abhängigen Resistenzmechanismen (Abb. 5 E) (Gorre et al., 2001).

Neben klonaler Evolution mit genetischen Zusatzaberrationen werden das α_1 -acidic glycoprotein und das multidrug-resistance gene 1 (MDR-1) als Ursachen für die Bcr-Abl unabhängige Resistenzentwicklung diskutiert (Abb. 5 A und B). Vermutlich bindet das Plasmaprotein α_1 -acidic glycoprotein STI und verringert dadurch die Bioverfügbarkeit von STI (Gambacorti-Passerini et al., 2000). Die Überexpression des MDR-1 Gens, das für ein transmembranöses Transporterprotein kodiert, führt möglicherweise durch erhöhten Medikamentenefflux aus der Zelle ebenfalls zu Resistenz (Mahon et al., 2003). Auch die Überexpression von Lyn einer Src Kinase führt zu Bcr-Abl unabhängiger Imatinibresistenz (Donato et al., 2003).

Das Wissen über die verschiedenen Mechanismen der Imatinibresistenz hat vor allem Bcr-Abl abhängige Resistenzen zu einem attraktiven Therapieziel gemacht und die Entwicklung neuer Tyrosinkinaseinhibitoren vorangetrieben. Der Einsatz neuer Tyrosinkinaseinhibitoren ist bereits als Secondline-Therapie bei Imatinibresistenz oder - unverträglichkeit indiziert. Zur Verfügung stehen Dasatinib, Nilotinib Bosutinib und INNO-406. Dasatinib ist für die CML nach Imatinib-Versagen und die Ph-positive ALL zugelassen, Nilotinib für die CML in chronischer und akzelerierter Phase nach Imatinib - Versagen. Bosutinib und INNO-406 befinden sich derzeit noch in klinischer Prüfung (Cortes et al., 2008; le Coutre et al., 2008).

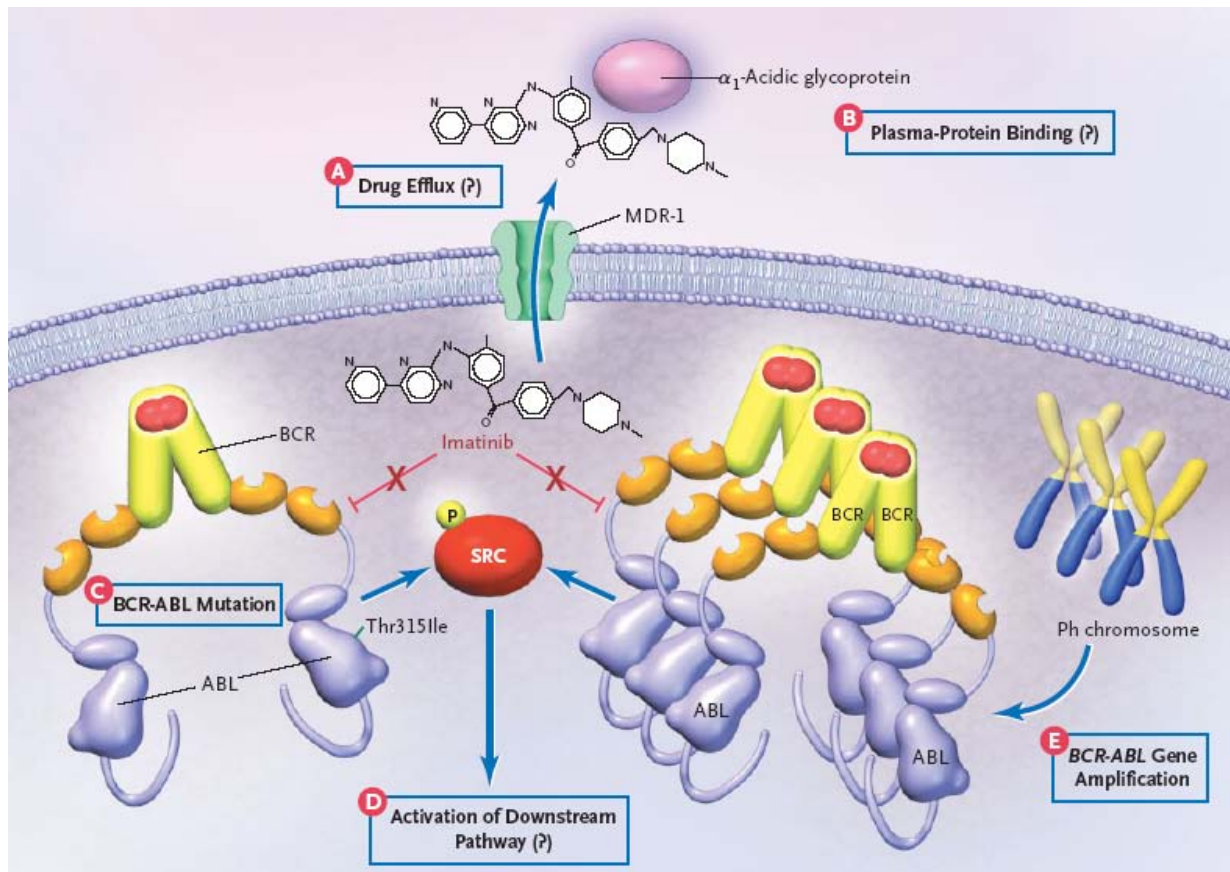


Abb. 5: Resistenzmechanismen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (Krause and Van Etten, 2005)

A: Membranöse Transporter Proteine wie das multidrug-resistance gene 1 (MDR-1) können die intrazelluläre Konzentration des Medikaments verringern.

B: Plasmaproteine wie das α_1 -acidic glycoprotein können durch Inhibitorbindung die effektive Medikamentkonzentration ebenfalls vermindern.

C: Mutationen in der Bcr-Abl Kinasedomäne können die Wirkung des Inhibitors vermindern oder aufheben.

D: Konstitutive Aktivierung eines Signaltransduktionsweges downstream der Tyrosinkinase, senkt die Abhängigkeit der malignen Erkrankung von Bcr-Abl.

E: Amplifikation des Bcr-Abl Gens führt zu einer Überproduktion der Tyrosinkinase und damit zu einer relativen Resistenz gegenüber dem Inhibitor. Die Rolle der Mechanismen A, B und D bei Imatinib resistenten CML Patienten wurde noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.4 Punktmutationen in der Bcr-Abl Tyrosinkinase

Wie bereits in Kapitel 1.3.3 erwähnt, gehören Bcr-Abl Punktmutationen zu den wichtigsten Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Imatinib. Bislang konnten mehr als 50 verschiedene Punktmutationen identifiziert werden, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen und so die Bindung von Imatinib an die Tyrosinkinase unterbinden. (Branford et al., 2002; Branford et al., 2003; Hochhaus et al., 2002; Jabbour et al., 2006; Shah et al., 2002; Soverini et al., 2006; von Bubnoff et al., 2002) Mutationen und Kristallstrukturanalysen haben ergeben, dass Bcr-Abl Punktmutanten auf verschiedenen Wegen die Imatinibbindung verhindern (Nagar et al., 2002; Schindler et al., 2000). Sie können zum einen die direkte Bindung des Inhibitors an die Bcr-Abl Tyrosinkinase

beeinflussen, zum anderen durch Stabilisierung einer bestimmten Konformation der Tyrosinkinase indirekt die Bindung von Imatinib verhindern (O'Hare et al., 2007). Innerhalb der Abl-Struktur treten die Bcr-Abl Punktmutationen in bestimmten Bereichen auf und können demzufolge in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Die erste Gruppe umfasst Mutationen im Bereich der Imatinib-Bindungsstelle (z.B. T315, F317 und E255). Die in dieser Struktur lokalisierten Aminosäurereste treten über Wasserstoffbrücken oder van der Waals-Kräften mit Imatinib in Verbindung. Ein Austausch dieser Aminosäuren verhindert damit die direkte Bindung des Inhibitors. (Azam et al., 2003a; Gorre et al., 2001; Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002)

Die zweite Gruppe beinhaltet Mutationen, die sich in verschiedenen Strukturbereichen der Tyrosinkinase befinden und durch Konformationsänderung von Bcr-Abl indirekt die Imatinibbindung beeinflussen.

Einer dieser Bereiche ist der N-terminal gelegene P-loop (auch als first loop bezeichnet), eine hochkonservierte Glycin-reiche Struktur, die normalerweise als Nukleotid-Bindungsschleife für die Phosphatgruppe des ATP dient. Die Konfiguration des P-Loops bietet dem Inhibitor Imatinib eine hydrophobe Bindungstasche. Vermutlich wird durch Mutationen (z.B. G250, Q252, Y253 und E255) diese für die Imatinibbindung wichtige P-loop Konformation destabilisiert (Branford et al., 2002; Hochhaus et al., 2001; Jabbour et al., 2006; von Bubnoff et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Bereich der Kinase ist der activation-loop (A-loop), eine Region die N- und C-terminale Lobi der Kinasedomäne verbindet. Es konnte gezeigt werden, dass der activation-loop eine geschlossene (inaktive) Konformation einnehmen muss, um die Imatinibbindung zu ermöglichen. Stabilisation der offenen (aktiven) Form durch Phosphorylierung an Tyrosin 393 führt zu einer verminderten Inhibition der Abl-Kinase durch Imatinib (Schindler et al., 2000). Man nimmt an, dass Mutation in diesem Bereich (z.B. H396, V379 und L378) die Kinase daran hindern, die für die Imatinibbindung nötige inaktive Konformation einzunehmen (von Bubnoff et al., 2002).

Eine dritte Region, die katalytische Domäne befindet sich im C-terminalen Lobus der Kinase. Die genauen strukturellen Veränderungen, die durch resistenzvermittelnde Mutationen (z.B. E355, M351 und V379) in dieser Region hervorgerufen werden, konnten noch nicht im Detail definiert werden (Shah et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde beispielhaft die zu Gruppe eins gehörende Mutation T315I behandelt. Diese auch als „gatekeeper“ bezeichnete Mutation war die erste bei Imatinib behandelten Patienten entdeckte Mutation (Gorre et al., 2001). Dabei führt die Punktmutation des Nukleotids 944 der Abl Kinase zum Austausch der Aminosäure Threonin durch Isoleucin an Position 315. Wie Strukturanalysen zeigten, bildet die Aminosäure Threonin nicht nur eine wichtige Wasserstoffbrückenbindung zu Imatinib aus, sondern reguliert auch den Zugang zu

einer hydrophoben Tasche. Somit beeinflusst dieser Aminosäureaustausch vermutlich auch durch sterische Mechanismen die Imatinibbindung (Schindler et al., 2000). Die Identifizierung der Mutation T315I in einer signifikanten Anzahl von Patienten mit primärer Imatinibresistenz weist zusätzlich auf eine erhöhtes onkogenes Potential der Bcr-Abl T315I Mutante hin (Pfeifer et al., 2007; Shah et al., 2002).

Die zweite in dieser Arbeit untersuchte Punktmutation Y253H, befindet sich in der Region des P-loops. Der P-loop ist die am häufigsten mutierte Struktur der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Hier lassen sich 36 bis 48% aller Punktmutationen detektieren (Jabbour et al., 2006). Die Punktmutation Y253H (Y: Tyrosin; H:Histidin) resultiert aus einem Nukleotidaustausch an Position 757 und führt zum Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Histidin (Roumiantsev et al., 2002). Die von uns untersuchte Aminosäure Y253 steht über van-der-Waals-Kräfte mit Imatinib in Verbindung und bildet zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit N322 (Asparagin322) aus, die die Oberflächenkomplementarität mit STI571 erhöht (Abb. 6). Der Aminosäureaustausch führt zum Verlust dieser Wasserstoffbrückenbindung und zur Stabilisierung des aktiven Zustands der Abl-Kinase (Schindler et al., 2000).

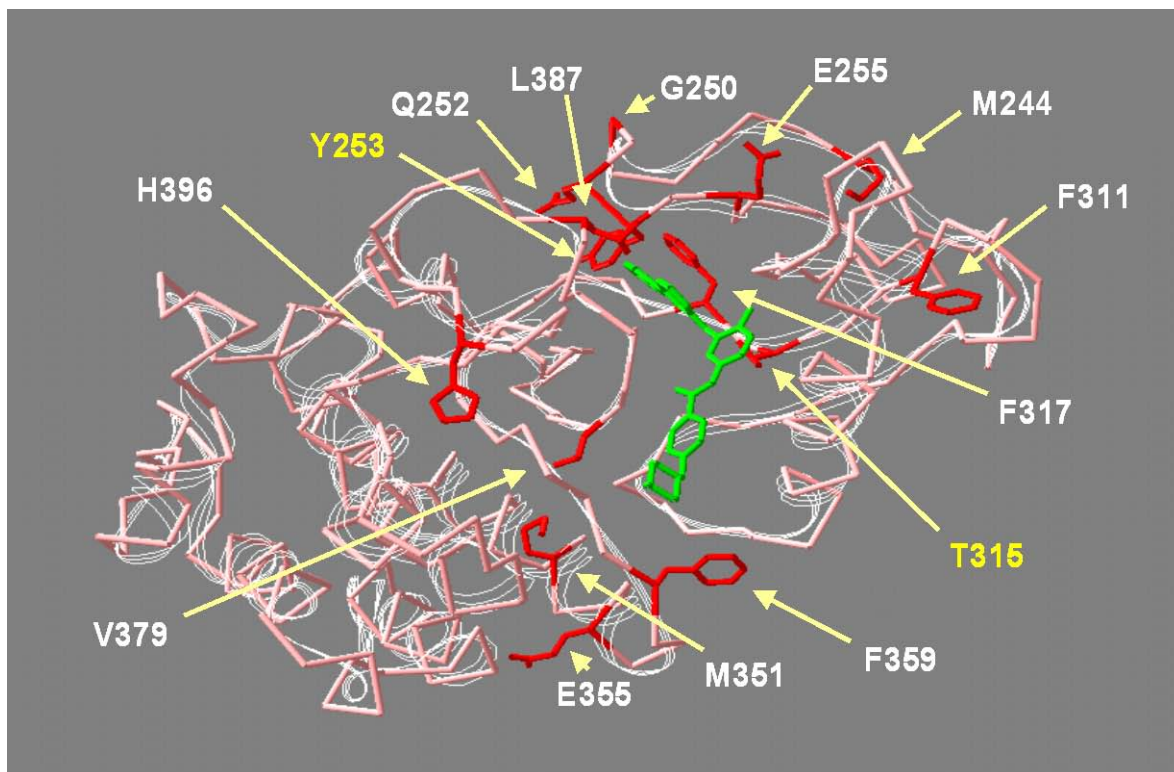


Abb. 6: Kristallstruktur der Abl Kinasedomäne in Komplex mit Imatinib (modifiziert nach (von Bubnoff et al., 2003b)).

Das Polypeptidgerüst ist in weiss, die Helix-, Faltblatt- und Schleifenstruktur der Abl- Kinasedomäne in rosa dargestellt. Imatinib ist in grün abgebildet und die Seitenketten mutierte Aminosäuren in rot.

1.5 Aufgabenstellung

Mutationen in der Bcr-Abl Kinase sind eine häufige Ursache für die Imatinibresistenz bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium der CML oder Ph+ ALL. Die wichtige Rolle der Punktmutationen bei der Entwicklung der Imatinibresistenz wurde bereits durch zahlreiche Untersuchungen im Zellmodell, Kristallstrukturanalysen und klinische Daten bestätigt. Hingegen wurde die Auswirkung der Mutationen auf das onkogene Potential von Bcr-Abl *in vivo* noch nicht genauer analysiert. Darüber hinaus existieren kontroverse Daten über den Einfluss der Punktmutationen auf die Kinaseaktivität und die transformierende Kapazität von Bcr-Abl *in vitro* (Azam et al., 2008; Griswold et al., 2006; Mian et al., 2009; Roumiantsev et al., 2002; Skaggs et al., 2006; Yamamoto et al., 2004).

Es konnte festgestellt werden, dass einige Mutationen im Patienten bereits vor der Therapie mit Imatinib auftreten. Außerdem gibt es Arbeiten, die auf eine schlechtere Prognose für Patienten mit P-loop Mutationen hinweisen. Dies lässt vermuten, dass die Punktmutationen nicht nur die Imatinibresistenz beeinflussen sondern auch eine pathophysiologische Rolle spielen (Branford et al., 2003; Hofmann et al., 2003; Kreuzer et al., 2003; Roche-Lestienne et al., 2003). Dies ist von großer klinischer Relevanz, da eine erhöhte Kinaseaktivität möglicherweise in Abwesenheit von Imatinib die Selektion eines mutierten Klones verursacht und zu einem aggressiveren Krankheitsbild mit schlechterem Ausgang führen könnte. Im Gegensatz dazu könnten bei verminderter Kinaseaktivität die mutierten Klone durch Bcr-Abl wt exprimierende Zellen ersetzt werden und dadurch in Analogie zur antiretroviralen Therapie bei HIV ein wiederholtes Ansprechen nach Pausieren der Kinase inhibierenden Therapie erlauben (Gulick, 2002).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von zwei Bcr-Abl Punktmutationen auf die Kinaseaktivität und die transformierenden Eigenschaften von Bcr-Abl wt zu untersuchen. Dazu wurden Zelllinien und primäre murine KM-Zellen mit Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut transformiert und sowohl *in vitro* als auch in einem syngenen Knochenmark-Transplantationsmodell untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

| | |
|---|-------------------------------------|
| Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| Agar | Difco, Detroit, USA |
| Agarose | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Fluka, Deisenhofen |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Aqua ad injectabilia, steril | Braun, Melsungen |
| ATP | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Bactoagar | Difco, Detroit, USA |
| Bacto-Hefeextrakt | Difco, Detroit, USA |
| Bacto-Trypton | Difco, Detroit, USA |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| BSA, Fraktion V | Roth, Karlsruhe |
| Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten | Boehringer, Mannheim |
| Chloroform | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Dithiothreitol (DTT) | Promega, Heidelberg |
| dNTP-Mix, 10 mM | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Essigsäure | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Fluka, Deisenhofen |
| 5-Fluorouracil (5-FU, Ribofluor®) | Ribosepharm GmbH, München |
| Glucose | Roth, Karlsruhe |
| Glycerol | Fluka, Deisenhofen |
| Glycerol-2-phosphat | Aldrich Chemical Company, Steinheim |
| Glycin | Merck, Darmstadt |
| Hank´s balanced salt solution (HBBS) | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Imatinib (STI 571, Glivec®) | Novartis, Basel, Schweiz |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Kaliumhydrogencarbonat | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Fluka-Chemie, Deisenhofen |
| Natriumazid | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Fluka-Chemie, Deisenhofen |
| Natriumdextransulfat | Farmacia, Freiburg |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Natriumfluorid | Fluka, Deisenhofen |
| Natriumhydroxid | Merck, Darmstadt |
| Natriumorthovanadat | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Natriumpyrophosphat | Fluka Chemie, Neu-Ulm |
| Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest | Biochrom AG, Berlin |
| Polybren (Hexadimethrinbromid) | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Propidiumiodid | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Protein A Sepharose Lösung | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Protein G PLUS-Agarose | Santa Cruz, Heidelberg |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat | Pierce, Rockford, USA |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Fluka, Deisenhofen |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) | Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Trockenmilchpulver | Fluka-Chemie, Deisenhofen |
| Trypanblau | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Tween 20 | Fluka-Chemie, Deisenhofen |

2.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

| | |
|------------------------------|-------------------------------|
| DMEM, Zellkulturmedium | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Diphtherietoxin | Calbiochem, La Jolla, CA, USA |
| FCS Gold | PAA, Pasching, Österreich |
| Hygromycin B, 50mg/ml in PBS | Clontech, Palo Alto, CA, USA |
| IMDM, Zellkulturmedium | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| L-Glutamin, 200 mM | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

| | |
|---|---|
| Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Methocult TM H4230 | Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada |
| Muriner, rekombinanter Stammzellfaktor (SCF) | R&D Systems, Wiesbaden |
| Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-3 | R&D Systems, Wiesbaden |
| Murines, rekombinantes Interleukin (IL)-6 | R&D Systems, Wiesbaden |
| Natriumhydrogen carbonat-Lösung 7,5% | Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen |
| Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin/ Streptomycin Lösung | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| RNAClean™ | Hybaid, Milford, MA, USA |
| RPMI 1640, Zellkulturmedium | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Zeocin, 100 mg/ml | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| <i>EcoRI</i> , 100 U/μl | New England Biolabs, Schwalbach |
| <i>Xho1</i> , 10 U/μl | Roche, Mannheim |

Polymerasen:

| | |
|------------------|--------------------------|
| <i>Pfu-Turbo</i> | Statagene, La Jolla, USA |
|------------------|--------------------------|

Alkalische Phosphatase:

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| <i>CIAP</i> , 20-30 U/μl | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
|--------------------------|----------------------------|

Antikörper:

| | |
|---|-----------------------------|
| Anti-Abl (8E9), monoklonal, Maus IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg ? |
| Anti-Abl (K-12) | Santa Cruz, Heidelberg |
| Anti-β-Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG1? | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Anti-Phospho-Tyrosin (4G10), monoklonal, Maus IgG | Upstate Biotechnology, |
| New York, USA | |
| Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG | Amersham, Braunschweig |
| Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG | Amersham, Braunschweig |
| Anti-Maus CD11b (M1/70), Mac1, Integrin α _M chain, | |
| PE-konjugiert, Ratte IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg |

| | |
|---|---------------------------|
| Anti-Maus CD16/CD32 (2.4G2), FcγIII/II Receptor, Ratte IgG (Maus BD Fc Block™) | BD-Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus CD45 (30-F11), LCA, Ly-5, PE-Cy5-konjugiert, Ratte IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus CD45/B220 (RA3-6B2), B220, PE-konjugiert, Ratte IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2, PE-konjugiert, Ratte IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus Ly-6G (Gr-1)/Ly-6C (RB6-8C5), Gr-1, PE-konjugiert, Ratte IgG | BD-Pharmingen, Heidelberg |

2.1.4 Zelllinien

Suspensionszellen:

Ba/F3 murine pre-B-Zelllinie

Adhärenzte Zellen:

NIH3T3 murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie

ΦNX-Eco (Phoenix E) retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei);

293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil transfiziert mit Moloney *GagPol-IRE5-Lyt2* Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney *ecotropic envelope* Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)

Die Zelllinien Ba/F3 und NIH3T3 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig bezogen. Die Verpackungs-Zelllinie Phoenix E wurde uns von Gary P. Nolan, Stanford, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Vektoren und DNA-Konstrukte

Vektoren:

| | | |
|------------|--------------|---|
| Name: | Resistenzen: | Firma: |
| MSCV MigR1 | Ampicillin | J. Miller/ W. Pear, Philadelphia,USA (Pear et al., 1998) |

DNA-Konstrukte:

Bcr-Abl p210 wt in MigR1

Bcr-Abl p210 wt in MSCV

J. Miller/ W.Pear, Philadelphia, USA
(Pear et al., 1998)

Bcr-Abl p210 T315I in MigR1

Bcr-Abl p210 Y253H in MigR1

2.1.6 BakterienstämmeEscherichia Coli DH5 α TM

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

F- Φ 80d/lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*,
recA1, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*,
 λ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*Epicurian ColiTM XL-1Blue Supercompetent Cells

Stratagene, Heidelberg

recA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*,
relA1, *lac* [F'*proAB*, *lacI*^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]**2.1.7 Oligonukleotide für die RT-PCR**

Name: Sequenz:

RT-PCR Bcr-Abl p210 3' 5'-ACATCACGCCAGTCAACAGTCTGG-3'

RT-PCR Bcr-Abl p210 5' 5'-GACATGCCATAGGTAGCAATTTCC-3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg synthetisiert.

2.1.8 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker

Amersham Biosciences, Braunschweig

2.1.9 Mäuse und tierexperimentelle MaterialienMausstamm:

Balb/C

Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln

Tierexperimentelle Materialien:

| | |
|--|------------------------------------|
| Animal Bedding Fibre | Altromin GmbH, Lage-Lippe |
| Caesium 137- Strahlenquelle (33300 GBq) | Buchler GmbH, Braunschweig |
| Discardit™ II Spritze, steril | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| EDTA-Kapillaren (20µl) | Sarstedt, Mümbrecht |
| Falcon™ Zellsieb (100 µm) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Global Rodent Breeding (25 kGy bestrahlt) | Harlan Teklad, Blackthorn, England |
| Infrarotlampe | Royal Philips Elektronik, Hamburg |
| Käfigsystem | Thoren, PA, USA |
| Microlance™ Injektionskanüle, steril (27G 3/4) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Objektträger (ISO Norm 8037/1) | Roth, Karlsruhe |
| S-Monovette®, EDTA | Sarstedt, Nümbrecht |
| Spritzen (5 ml, ohne Nadel) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Sub-Q, sterile PP Spritze, 1ml, 26G 1/2 | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Venenverweilkanülen (1ml) | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Vet abc Blood Counter | Scil, Viernheim |

2.1.10 Molekularbiologische Kitsysteme

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| QIAGEN® Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® Spin Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| Rapid DNA Ligation Kit | Roche, Penzberg |
| Titan One Tube RT-PCR Kit | Roche, Penzberg |

2.1.11 Standard Geräte

| | |
|---|-----------------------------------|
| Agarosegel Elektrophoresekammer | Kodak, New Haven, USA |
| Analysenwaage BP 221S | Satorius, Göttingen |
| CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB | Nunc, Wiesbaden |
| Digitalwaage LC 1200 S | Satorius, Göttingen |
| Durchflusszytometer (EPICS®XL) | Beckman-Coulter, Krefeld |
| Entwickler Hyperprocessor | Amersham, Braunschweig |
| Fluoreszenzmikroskop | Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg |
| Heizblock 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| IBI geneZapper 450/2500 Elektroporator | Eastman Kodak, New Haven, USA |

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Incubator-Shaker Innova 4000 | New Brunswick Scientific, Edison, USA |
| Kühlzentrifuge J2-HS | Beckman, Fullerton, USA |
| Kühlzentrifugen 5417R, 5810R | Eppendorf, Hamburg |
| Lichtmikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Jena |
| LKB Ultraspec III, Spektralphotometer | Pharmacia, Uppsala, Schweden |
| Magnetrührgerät IKAMG RH | Janke & Kunkel, Staufen |
| Mikroskop V 200 | Hund, Wetzlar |
| Multi-Gel Long Elektrophoresekammer | Biometra, Göttingen |
| Neubauer-Zählkammer | Reichert, New York, USA |
| PCR-Thermocycler | MWG-Biotech, Ebersberg |
| pH-Meter Φ 32 | Beckman, Fullerton, USA |
| Refrigerated Incubator-Shaker Innova | New Brunswick Scientific, Edison, USA |
| Schüttler WT 12 | Biometra, Göttingen |
| Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8 | Holten, Gydewang, Dänemark |
| Stromgenerator, Powerpack P25 | Biometra, Göttingen |
| Tischzentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg |
| Transphor Electrophoresis Unit | Hoefer, San Fransisco, USA |
| Trio-Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| UV-Lampe TI 2 | Biometra, Göttingen |
| Vortex REAX-Top | Heidolph, Nürnberg |
| Varioklav Dampfsterilisator | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| Wasserbad 1083 | GFL, Burgwedel |
| Zentrifuge GS-6K | Beckman, Fullerton, USA |

2.1.12 Standard Lösungen und Puffer

| | |
|--|--|
| Ampicillin-Stammlösung: | 50 mg/ml in A.d. |
| Amidoschwarz-Entfärbelösung: | 10% Methanol 10% Essigsäure in A.d. |
| Basales Knochenmarksmedium (BBMM): | 325 ml IMDM 150 ml FCS 25 ml BSA (10% in IMDM) 5 ml L-Glutamin- Lösung (200mM) 100 μ M 2-Mercaptoethanol |
| 2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung | |

| | |
|--------------------------------------|--|
| BM-Medium | IMDM 20% FCS 1% BSA |
| DNA-Probenpuffer (10-fach): | 50% Glycerin 0,2% Bromphenolblau 0,5 M EDTA in A.d. |
| FACS-Puffer: | 1% BSA in PBS |
| Kinasepuffer: | 25mM Tris-HCl pH7 5mM β -Glycerolphosphat 2mM DTT 0,1mM Na_3VO_4 10mM MgCl_2 |
| Luria-Bertani (LB) Medium (flüssig): | 1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Hefeextrakt 1% NaCl in A.d. mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert |
| LB-Medium (fest): | 1,5% Bacto-Agar 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d. |
| RBC (Red Blood Cell)-Puffer: | 150 mM NH_4Cl 1 mM KHCO_3 |

| | |
|--|--|
| | 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH7.3 in A.d. |
| Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach): | 0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in A.d. |
| SDS-Elektrophoresepuffer: | 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. |
| SDS-Probenpuffer (2-fach): | 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d. |
| Prästimulationsmedium: | BBMM 10 ng/ml mL-3 12 ng/ml mL-6 50 ng/ml mSCF |
| SOC-Medium: | 2% Bacto-Trypton 0,55% Bacto-Hefeextrakt 0,5% 1M NaCl 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt autoklaviert 1% 2M Glukose (frisch zugegeben) 1% 2M MgCl ₂ (frisch zugegeben) sterilfiltriert (0,2µm Filter) |
| TAE-Puffer (10-fach): | 0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8) in A.d. |
| TNE-Puffer: | 10 mM Tris (pH 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA(genomische DNA) |

| | |
|---------------------------------------|---|
| Transferpuffer: | 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d. 20% Methanol in A.d. |
| Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach): | 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d. |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen ermöglichen die sequenzspezifische Spaltung von doppelsträngiger DNA (Sambrook et al., 1989). Dabei entstehen abhängig vom verwendeten Enzym komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) oder stumpfe Enden (*blunt ends*). Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in *Units* (U) angegeben. Eine *Unit* entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden. Eine quantitative Spaltung der DNA wird sichergestellt, indem die Restriktionsnukleasen im Überschuss zugesetzt werden. Um die DNA in definierte Fragmente zu zerlegen, wird sie mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in der vom Hersteller empfohlenen Pufferlösung inkubiert. Die für das jeweilige Enzym optimierten Inkubationsbedingungen werden vom Hersteller angegeben. In der Regel erfolgt die Inkubation bei 37°C für 2 h. Nach erfolgter Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C denaturiert oder durch Aufreinigung im Agarosegel (Kapitel 2.2.1.3) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

2.2.1.2 5'-Dephosphorylierung von DNA

Wird für die Linearisierung von Plasmiden nur ein Restriktionsenzym eingesetzt, liegt die Vektor-DNA nach dem Verdau mit identischen Restriktionserkennungssequenzen an 5'- und 3'- Ende vor. Diese werden von der Ligase bevorzugt religiert ohne ein DNA-Fragment einzufügen. Die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe verhindert die Religation des Klonierungsvektors, wodurch die Effizienz der Klonierung erheblich verbessert wird, da eine Ligation dann nur zwischen den freien 5'-Phosphatgruppen der Fremd-DNA und den 3'-OH-

Enden des Plasmids möglich ist. Die Hydrolyse der freien 5'-Phosphatreste wird von der alkalischen Phosphatase *CIA*P katalysiert. Die Dephosphorylierung kann direkt im Restriktionsansatz durchgeführt werden, indem dieser mit 10-fachem Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird. Die Inkubation erfolgt 1 bis 2 h bei 37°C. Anschließend wird das Enzym durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 10 min inaktiviert.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer: 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA in A.d.

DNA-Probenpuffer: 50% (m/V) Glycerol, 0,5% (m/V) Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Agarosegelelektrophorese ist die Standardmethode für die Auftrennung, Identifizierung, Reinigung und präparative Isolierung von linearen DNA-Fragmenten. Unter den geleelektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nucleinsäuren ionisiert, so dass die Polydesoxynucleotide als Polyanionen vorliegen. Die DNA-Fragmente wandern somit im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist und ihre Beweglichkeit weitgehend von der Molekülgröße bzw. -länge abhängt. Agarose, ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid, bildet nach Aufkochen in Pufferlösung beim anschließenden Abkühlen eine Matrix aus, die bewirkt, dass kleinere DNA-Fragmente leichter und schneller durch sie hindurch wandern als größere. Durch Variation der Agarosekonzentration können unterschiedliche Trennbereiche erzielt werden. Mit niedrigprozentigen Gelen lassen sich größere DNA-Fragmente separieren, während hochprozentigere Gele der Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente dienen. Die Zugabe DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, ermöglicht die Visualisierung der DNA-Fragmente nach Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm. Zur Größenbestimmung müssen bei der elektrophoretischen Trennung Größenstandards (DNA-Molekulargewichtsmarker) mit aufgetrennt werden.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose in TAE-Puffer vorsichtig aufgekocht bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 50°C wird die Lösung mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Bei Raumtemperatur erstarrt das Gel innerhalb von 30-60 min. Die Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Fragmente erfolgt in einer mit TAE-Puffer gefüllten DNA-Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 20-210 V. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Nucleinsäuremoleküle visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zur präparativen Isolierung (Kapitel 2.2.1.4) ausgeschnitten.

2.2.1.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten können diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit einem sterilen Einmalskalpell unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Um Veränderungen der DNA in Form von Strangbrüchen und Dimerbildungen zu vermeiden, wird eine UV-Quelle mit geringer Bestrahlungsstärke verwendet und die Expositionszeit der DNA in UV-Licht möglichst gering gehalten. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgt nach dem Protokoll des „QIAquick® Gel Extraction Kit“. Die DNA wird je nach erwünschter Konzentration mit 20-50µl Elutionspuffer oder A.d. von der Säule eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Da das Absorptionsmaximum von Proteinen in wässriger Lösung bei 280 nm liegt, ist es außerdem möglich, durch eine Messung der Extinktion E bei 260 nm und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung zu überprüfen. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit. Je größer der Quotient aus spezifischem (E_{260}) zu unspezifischem Signal (E_{280}) ist, desto reiner ist die Nukleinsäureprobe. Ist der Quotient kleiner als 1,7 liegen Verunreinigungen vor. Bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 handelt es sich um eine reine Nukleinsäurelösung. Die bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Extinktion beträgt eins ($E_{260}=1$) für doppelsträngige DNA der Konzentration 50 µg/ml (und einzelsträngige RNA der Konzentration 40 µg/ml.) Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten Nukleinsäuren erfolgt mit dieser Methode.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird die linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA kovalent verknüpft (Sambrook et al., 1989). Das Schließen der Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende wird von der ATP-abhängigen T4-Ligase katalysiert. Vektor- und Fragment-DNA liegen bei der Ligation in einem Verhältnis von 1:3-1:7 vor. Die Menge der eingesetzten DNA wird photometrisch bestimmt oder mittels Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Ligation wird nach dem Protokoll des „Rapid DNA Ligation Kit“ durchgeführt. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor ohne einzufügende Fremd-DNA. Nach erfolgter Ligation kann die rekombinante DNA

zur Transformation von kompetenten Bakterien (Kapitel 2.2.2.3) eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.7 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgt nach der Vorschrift des „RNAClean™“-Systems, welches auf einer von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode basiert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Hierbei werden jeweils 10^7 Zellen mit der „RNAClean™“-Lösung versetzt und durch Vortexen in Lösung gebracht. Die Lösung kann für spätere Verarbeitung bei -80°C gelagert werden. Nach Zugabe von Chloroform und starkem Vortexen bildet sich eine Suspension, die nach 5-minütiger Inkubation auf Eis in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert wird. Der wässrige Überstand wird abgenommen, mit eiskaltem Isopropanol versetzt und zur Fällung der RNA bei -20°C 15 min inkubiert. Die präzipitierte RNA wird bei 4°C abzentrifugiert und das Sediment nach Waschen mit Ethanol (70%) und Trocknen in 10-50 μl Wasser aufgenommen. Da RNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist, wird sie bei -80°C gelagert.

2.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Die PCR beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen DNA-Strang durch semikonservative Replikation zu verdoppeln und ihrer Thermostabilität. Zu Beginn jedes Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (*Template*) durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so dass beim anschließenden Abkühlen auf die Anlagerungstemperatur Startermoleküle spezifisch an die Zielregion hybridisieren können (*annealing*). Als Startermoleküle werden synthetische DNA-Oligonukleotide (*Primer*) verwendet, welche die zu amplifizierende Region begrenzen. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase bei Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) den neuen DNA-Doppelstrang (*extension*). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert. Die thermostabile, aus dem marinen Archäebakterium *Pyrococcus furiosus* gewonnene *Pfu*-Polymerase besitzt neben der 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'→5'-Exonuclease-Prüffunktion (*proofreading*) (Lundberg et al., 1991). Die *Pfu*-Polymerase arbeitet mit einer zwölfmal höheren Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase, da sie aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität am 3'-Ende falsch eingebaute Nucleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nucleotid einsetzt. Durchgeführt wird die PCR in einem

Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt. Neben der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente können Mutationen an doppelsträngiger DNA vorgenommen werden, die in Punktmutation, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren resultieren. Außerdem ist es möglich, durch PCR-Mutagenese neue Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in die Matrizen-DNA einzuführen.

Reverse-Transkriptase PCR

Mit Hilfe der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) lassen sich spezifisch RNA-Sequenzen amplifizieren. Es erfolgt zuerst eine cDNA-Einzelstrangsynthese mit RNA als Matrize, darauf folgt eine PCR mit spezifischen Primern, in der die zuvor gebildete cDNA als Matrize dient. Für die Einzelstrangsynthese können Oligo(dT)- oder „Random“-Primer eingesetzt werden. Die 15 bis 20 bp langen Oligo(dT)-Primer hybridisieren im Bereich des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA. „Random“-Primer sind Hexanucleotide mit einer statistischen Basenzusammensetzung. So können sie entsprechend ihrer Sequenz an den verschiedensten Stellen eines mRNA-Moleküls hybridisieren und damit eine cDNA-Synthese über die gesamte Länge der mRNA einleiten. Außerdem ist es möglich bereits für die cDNA-Synthese spezifische Primer zu verwenden.

Für die RT-PCR wird das „Titan One Tube RT-PCR Kit“ eingesetzt. Dieses beinhaltet einen Enzymmix, der es erlaubt, die reverse Transkription und die PCR nacheinander in einem Reaktionsgefäß durchzuführen. Für die Einzelstrangsynthese werden dieselben spezifischen Primer wie für die anschließende PCR verwendet. Nach 30-minütiger RT-Reaktion bei 50°C folgt eine PCR mit 35 Zyklen. Die Produkte werden zur Analyse auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, mittels UV-Licht visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kulturbedingungen

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0
LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert
Ampicillin-Stammlösung (1000x): 50 mg/ml in A.d., sterilfiltriert

Das Luria-Bertani (LB)- Medium wird entsprechend der Vorschrift angesetzt. Mit Natronlauge wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird das Medium autoklaviert. Das Selektionsmedium enthält zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin. Die Anzucht einer Bakterienkultur sollte in Gegenwart eines Antibiotikums stattfinden, um sicherzustellen, dass nur Zellen wachsen können, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten. Flüssigkulturen werden bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt. Für Kulturplatten werden dem LB-Medium vor dem

Autoklavieren 1,5% (m/V) Bactoagar zugesetzt. Nach Abkühlen auf 50°C und Zusatz des entsprechenden Antibiotikums werden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen.

2.2.2.2 Kompetente Bakterien

Nicht behandelte Bakterienzellen nehmen zirkuläre Fremd-DNA nur in geringem Maße auf. Um Bakterien effizient transformieren zu können, muss deshalb die Bakterienwand durch chemische oder physikalische Behandlung durchlässig gemacht werden. Die auf diese Art behandelten Bakterien werden als „kompetent“ bezeichnet. Kompetente Bakterien müssen bei –80°C gelagert und immer auf Eis aufgetaut werden, da sie sonst die Fähigkeit verlieren DNA aufzunehmen. Die verwendeten Stämme DH5 α und Epicurian XL1-Blue wurden bereits kompetent erworben.

2.2.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

SOC-Medium: 2% Bacto-Trypton; 0,55% Bacto-Hefeextrakt; 0,5% 1M NaCl; 0,5% 1M KCl in A.d. mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt; autoklaviert
1% 2M Glukose (frisch zugegeben); 1% 2M MgCl₂ (frisch zugegeben); sterilfiltriert

Durch kurzzeitige Hitzebehandlung kann Vektor-DNA in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust werden. Dazu werden 50 μ l des kompetenten Bakterienstamms auf Eis aufgetaut, mit 0,5 μ g Plasmid-DNA (Retransformation) oder 5 μ l Ligationsansatz (Kapitel 2.2.1.6) vorsichtig gemischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Durch die Kälte lagern sich die Plasmide an der Zellwand an. Anschließend erfolgt der Hitzeschock bei 37°C (*DH5 α*) bzw. 42°C (*Epicurian XL1-Blue*) für 45 Sekunden. Durch die schlagartige Erwärmung werden die Plasmide in die Zelle aufgenommen. Danach inkubiert man die Bakterien 2 min auf Eis. Eine Retransformation wird anschließend direkt auf einer LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen, während mit Ligationsansatz transformierte Bakterien zunächst für 1 h bei 225 Upm und 37°C in SOC-Medium inkubieren. Die Bakterien werden bei 3000 Upm zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 μ l verworfen. Das Sediment wird in der Restflüssigkeit resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die anschließende Inkubation der Platten bei 37°C sollte 12-16 h nicht überschreiten, da sich bei längerer Inkubation Satellitenkolonien bilden können. Durch das auf dem Plasmid befindliche β -Lactamasegen sind nur erfolgreich transformierte Bakterienzellen in der Lage, auf ampicillinhaltigem Nährboden Kolonien zu bilden.

2.2.2.4 Kultivierung der transformierten Bakterien

Die durch die Transformation entstandenen Kolonien werden zur Anreicherung in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Dazu impft man das Medium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte an und lässt die Bakterienkultur über Nacht bei 37°C und 225 Upm schütteln. Anschließend kann die Vektor-DNA wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben isoliert werden.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxi Präparation)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach erwünschter DNA-Menge mit unterschiedlichen Präparationskits. Kleinere Mengen (<20 µg), die nur zu analytischen Zwecken benötigt werden, können mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ isoliert werden. Dazu impft man den Klon, der das zu amplifizierende Plasmid enthält in 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum an und kultiviert die Bakterien über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C. Mit dem „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ können bis zu 500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, indem man den entsprechenden Klon nach 1-4 h Vorkultur in 200 ml LB-Selektionsmedium überimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wird bei 5000 Upm 5 min abzentrifugiert und das Sediment dem entsprechenden Protokoll folgend aufgearbeitet.

2.2.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS

RPMI-Kulturmedium: RPMI 1640, 2mM Glutamin; 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung; 10% FCS

Zytokin: murines IL-3

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Die adhärennten Zelllinien NIH3T3 und Phoenix E werden in DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung durch enzymatischen Abbau vom Boden abgelöst. Dazu wäscht man die Zellen vorsichtig mit sterilem PBS, versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen der Trypsin/EDTA-Lösung und inkubiert die Zellen 1-5 min bei 37°C. Die Inkubationszeit sollte nicht überschritten werden, da die Zellen sonst durch Anverdau der Zellmembran Schaden nehmen können. Nach sichtbarem Ablösen der Zellen werden diese mit Medium abgespült und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Durch das im Medium enthaltene FCS und die Verdünnung wird das Trypsin inaktiviert. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt. NIH3T3-Zellen werden auf

diese Weise alle 4-6 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Da Phoenix E-Zellen sehr empfindlich auf zu geringe und zu hohe Zelldichte reagieren, müssen diese jeden Tag auf die Hälfte verdünnt werden.

Die Suspensionszelllinien Ba/F3 wird alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Diese Linie wächst in RPMI-Kulturmedium in stehenden Zellkulturflaschen und benötigen als Wachstumsfaktor 0,2 ng/ml murines IL-3.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zellen können zur dauerhaften Lagerung tiefgefroren werden. Bei Bedarf werden die Dauerkulturen wieder aufgetaut und weiterkultiviert.

Von einer dichten Zellsuspension wird 1 ml entnommen, in einem Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen Einfriermedium vermischt und sofort bei -80°C eingefroren. Für längere Lagerung können die Zellen nach 12 h in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.2.3.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme des Kryoröhrchens aus dem flüssigen Stickstoff wird dieses sofort in ein 37°C -Wasserbad überführt und die Zellen darin aufgetaut. Die Zellsuspension wird vorsichtig in Kulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation wird das enthaltene DMSO entfernt. Für die Kultivierung werden die Zellen anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen werden diese mit Trypanblau inkubiert und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopiert. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen im mikroskopischen Bild hell, während tote Zellen und Zelltrümmer mit Trypanblau tiefblau gefärbt werden.

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0.5%-igen Trypanblaulösung werden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden 4 Großquadrate ausgezählt, wobei man nur vitale, nicht angefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellkonzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.3.5 Transfektionsmethoden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, wie beispielsweise die liposomale Transfektion (Lipofektion), die Elektroporation oder die retrovirale Transduktion. Die jeweils verwendete Transfektionsmethode ist sowohl von der zu transfizierenden Zelllinie, als auch von deren weiteren Verwendung abhängig. So eignet sich die Lipofektion um Plasmid-DNA transient, d.h. vorübergehend in adhärenente Zellen einzubringen, während Suspensionszellen effizienter durch Elektroporation transfiziert werden können. Um ohne Selektion eine stabile Integration der DNA in das Zellgenom zu erreichen, transduziert man die Zielzellen retroviral.

Lipofektion adhärenenter Zellen

Lipofectamine™2000
Opti-MEM®I, Serum reduziertes Medium

Bei der Lipofektion verwendet man kationische Lipide, um die negativ geladenen DNA-Moleküle zu binden und in die Zellen einzuschleusen. Die Komplexe verschmelzen mit der lipophilen Zellmembran oder werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen.

Lipofectamine™2000 wird für die Transfektion der Virus-Produktions-Zelllinie Phoenix E verwendet. Dafür werden die Zellen am Vorabend so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 90-95% aufweisen. Auf einer 60 mm Kulturschale plattiert man 2×10^6 Phoenix E Zellen aus und kultiviert diese über Nacht. Die hohe Dichte ist vor allem dann notwendig, wenn Retrovirus generiert werden soll. Für die Transfektion einer 60 mm Platte werden jeweils 500 µl Opti-MEM®I mit 20 µl Lipofectamine™2000 in einem Reaktionsgefäß und mit 10 µg Plasmid-DNA in einem anderen Reaktionsgefäß gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Ansätze werden miteinander vermischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Medium auf den Zellen gewechselt, indem man das alte Medium absaugt und durch 3 ml frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt. Anschließend wird der gesamte Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Für proteinbiochemische Untersuchungen können die Zellen 24-48 h nach der Transfektion geerntet und weiterverarbeitet, oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert werden. Für die Gewinnung von Retroviren muss das Transfektionsmedium nach 24 h gewechselt werden und die Zellen werden weiter in Kultur gehalten.

Elektroporation

Elektroporationsmedium: RPMI 1640; 25% FCS

Bei der Elektroporation werden Zellen in einer DNA-haltigen Lösung einem kurzen Stromstoß ausgesetzt, der für eine kurze Zeit in der Cytoplasmamembran Poren erzeugt (Neumann et al., 1982; Potter, 1988). Durch diese Poren kann Plasmid-DNA sowohl passiv durch Diffusion als auch elektrophoretisch in die Zelle gelangen (Sukharev et al., 1994).

Die in Suspension wachsende Zelllinie Ba/F3 wird durch Elektroporation und anschließende Selektion stabil mit Plasmid-DNA transfiziert. Dafür werden 5×10^6 exponentiell wachsende Zellen aus der Kultur entnommen, bei 1200 Upm 5 min zentrifugiert und in 400 µl Elektroporationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine Biorad-Elektroporationsküvette (0,4 cm) überführt und mit 20 µg Plasmid-DNA versetzt. Anschließend werden die Zellen zweimal bei 400 Volt und 950 µF für 5 msec elektroporiert. Für die Weiterkultivierung überführt man die Zellen in 5 ml RPMI-Kulturmedium mit IL-3. Nach 48 h wird mit der Selektion begonnen. Bei Verwendung der Vektoren MigR1 oder MSCV kann diese durch Faktorenentzug erfolgen. Proliferation und Überleben der murinen Zelllinie Ba/F3 ist abhängig von IL-3. Wird den Zellen das Zytokin entzogen gehen diese in Apoptose (Rodriguez-Tarduchy et al., 1990). Onkogene sind in der Lage, diese Zelllinien zur IL-3-Unabhängigkeit zu transformieren. Somit können Zellen, welche erfolgreich mit einem Onkogen transfiziert wurden, von nicht transfizierten Zellen durch Faktorentzug getrennt werden. MigR1 elektroporierte Zellen können außerdem durch durchflußzytometrisches Sortieren (FACSsort) der EGFP-positiven Zellen selektioniert werden.

Gewinnung von Retrovirus und retrovirale Transduktion

Das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen mit Hilfe von Retroviren wird als retrovirale Transduktion bezeichnet. Retroviren sind in der Lage, ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion einer Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Das virale Hüllprotein (*envelope*) besteht aus einem Transmembranprotein und einem Oberflächenprotein, welches spezifisch mit dem Virusrezeptor an der Oberfläche der Zielzelle interagiert und somit die Virusaufnahme vermittelt. Die Anwesenheit eines geeigneten Rezeptors auf der Zielzelle legt fest, ob die Zelle von dem Virus infiziert werden kann. Das ecotrope Oberflächenprotein interagiert mit einem Aminosäure-Transporterprotein, das nur von Mauszellen exprimiert wird (Wang et al., 1991), was bedingt, dass durch Viruspartikel mit ecotropem Hüllprotein nur murine Zellen transduziert werden können. Die Virusverpackungszelllinie Phoenix E trägt ein retrovirales Provirus, das die für die viralen Proteine kodierenden Gene enthält. Transfiziert man diese Zellen mit einem retroviralen Vektor, der neben dem zu transduzierenden Gen das

Verpackungssignal ψ enthält, produzieren die Zellen retrovirale Partikel, die in das Kulturmedium sezerniert werden.

Um Retrovirus zu generieren werden Phoenix E-Zellen wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben transfiziert. 24 h nach der Lipofektion wird das Transfektionsmedium abgenommen und durch 3 ml DMEM-Kulturmedium ersetzt. Der retrovirale Überstand wird 36 und 48 h nach der Transfektion gesammelt, filtriert (0,45 μm) und bei 4°C gelagert. Da die Hüllproteine ecotroper Viren sehr empfindlich gegenüber mechanischer und thermischer Belastung sind, sollte der retrovirale Überstand nicht erwärmt oder eingefroren werden. Der Virustiter kann wie in Kapitel 2.2.3.8 beschrieben bestimmt werden. Die Transduktion von murinen Zielzellen durch Retrovirus erfolgt durch Inkubation der Zellen mit retroviralem Überstand, welchem zuvor 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybren zugesetzt wurde. Das Polykation Polybren verbessert die Interaktion zwischen viralem Oberflächenprotein und zellulärem Virusrezeptor, wodurch eine höhere Transduktionseffizienz erzielt wird (Arcasoy et al., 1997; Conti et al., 1991). Die Transduktionseffizienz kann nach zwei Tagen durchflußzytometrisch bestimmt werden (Kapitel 2.2.3.7).

2.2.3.6 Selektion der Virusverpackungszelllinie

Wie bereits beschrieben trägt die Verpackungszelllinie Phoenix E ein retrovirales Provirus und stellt somit die viralen Strukturproteine und Enzyme zur Verfügung. Werden die Zellen über längere Zeit kultiviert, kann das zum Verlust des Provirus führen, wodurch die Verpackungseffizienz geringer wird. Die proviralen Gene beinhalten als Selektionsmarker Resistenz vermittelnde Gene für Hygromycin und Diphtherietoxin. Um eine Verringerung des retroviralen Titers zu vermeiden, wird die Zelllinie regelmäßig selektioniert. Dazu werden die Zellen nach 4-6 Wochen Kultur eine Woche unter Zusatz von 300 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin und 2 $\mu\text{g/ml}$ Diphtherietoxin zum DMEM-Kulturmedium kultiviert.

2.2.3.7 Durchflußzytometrische Messung der EGFP-Expression (FACS-Analyse)

Die Transfektionseffizienz kann durchflußzytometrisch bestimmt werden, wenn der zur Transfektion verwendete Vektor für ein fluorochromes Protein kodiert. Bicistronische Vektoren tragen neben dem zu untersuchenden Gen ein zweites Gen, das z.B. für ein Fluorochrom kodiert. Bei dem verwendeten Plasmid MSCV MigRI handelt es sich hierbei um das für das grün fluoreszierende Protein EGFP kodierende Gen. Zwischen den Genen befindet sich die Sequenz für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Beide Gene werden zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert. Von diesem Transkript erfolgt die parallele Translation der beiden Gene zu einzelnen Proteinen, wobei die IRES die

Translation des zweiten Gens vermittelt. Somit exprimieren alle erfolgreich transfizierten Zellen zusätzlich EGFP und können darüber im Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass die Elektronen der Fluorochrome angeregt durch einen Argon-Laser auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und unter Abgabe von Energie in Form von Licht spezifischer Wellenlänge auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Die Zellen fließen einzeln in einem Trägerstrom durch ein Rohr, wobei das emittierte Licht von einem Detektor erfasst wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge des Fluorochroms. Somit können auch Rückschlüsse auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens gezogen werden. Zusätzlich werden über die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße (im „Forward-Scatter“, FS) und die Granularität der Zelle (im „Sideward-Scatter“; SS) gewonnen.

Um den Anteil der EGFP-positiven Zellen nach Lipofektion, Elektroporation oder retroviraler Transduktion zu bestimmen, werden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in PBS aufgenommen, durch ein Zellsieb ($40 \mu\text{m}$) pipettiert und im Durchflusszytometer gemessen. Der Anteil der EGFP-positiven Zellen wird nach der Messung als Punktwolkendiagramm oder Histogramm dargestellt.

2.2.3.8 Titerbestimmung

Der Virustiter im Überstand der Virusverpackungszelllinie Phoenix E wird mittels standardisierter retroviraler Transduktion der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 bestimmt. Dazu werden für jeden zu titrierenden Überstand drei Schalen einer 6-Schalen-Zellkulturplatte mit jeweils $2,5 \times 10^4$ NIH3T3-Zellen beschickt. Nach der durchschnittlichen Verdopplungszeit der Fibroblasten (ca. 14 h) erfolgt die Titerbestimmung in einer Verdünnungsreihe. Der retrovirale Überstand wird im Verhältnis von 1:20, 1:200 und 1:500 mit $4 \mu\text{g/ml}$ Polybren-haltigem DMEM-Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 48-72 h wird die Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3.7). Die Berechnung der Einzeltiter (infektiöse retrovirale Partikel pro ml) erfolgt durch Multiplikation von 5×10^4 (Zellzahl bei Infektion) mit dem Verdünnungsfaktor (20, 200 oder 500) und dem prozentualen Anteil der EGFP-positiven Zellen der jeweiligen Verdünnungsstufe. Der Virustiter (CFU/ml, *colony forming units*/ ml, infektiöse retrovirale Partikel/ ml) entspricht dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml A.d

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1 M Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycin in A.d.

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Herstellung von Zelllysaten wird das Sediment in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 Upm, 20 min, 4°C) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wird die Lösung 10 min bei 95°C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation kann das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4) aufgetrennt werden.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

Lysis-Puffer
Protein A-Sepharose-Lösung/ Protein G PLUS- Agarose
Spezifische Antikörper
SDS-Probenpuffer (2-fach)

Durch Immunpräzipitation können einzelne Proteine aus einem Zelllysate isoliert werden. Dabei bindet ein spezifischer Antikörper ein Antigen des zu präzipitierenden Proteins. Die Präzipitation erfolgt durch Adsorption des Antikörper-Protein-Konjugats an Sepharose-gekoppeltes Protein A bzw. Agarose-gekoppeltes Protein G (Protein A/G-*Beads*). Aufgrund der Masse der Sepharose/Agarose lassen sich die Komplexe durch Zentrifugation aus dem Lysat separieren.

Die Zellen werden wie in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben in 1 ml Lysispuffer lysiert und zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit 30 µl Protein A/G-*Beads* versetzt und 10 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an Protein A/G bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die *Beads* werden bei 14.000 Upm abzentrifugiert und verworfen. Der verbleibende Überstand wird mit 2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und bei 4°C für 2 h rotierend inkubiert. Als Negativ-Kontrolle kann die Hälfte des Lysats mit der gleichen Menge eines unspezifischen Antiserums gleichermaßen behandelt werden. Anschließend werden die Lysate mit 30 µl Protein A/G -Lösung bei 4°C 30 min auf dem Rollrad inkubiert. Die gebundenen Immunkomplexe werden 5 min bei 14.000 Upm und 4°C abzentrifugiert, Überstand abnehmen und zweimal mit jeweils 500 µl Lysis-Puffer gewaschen.

Das verbleibende Sediment wird mit 30 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und sie von den *Beads* abzulösen. Nach kurzer Zentrifugation können die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4) weiterverarbeitet werden.

2.2.4.3 Kinase-Assay

Kinasepuffer: 25mM Tris-HCl pH7; 5mM β -Glycerolphosphat, 2mMDTT, 0,1mM Na₃VO₄, 10mM MgCl₂
ATP; Samplebuffer

Kinasen können durch eine katalytische Reaktion Phosphatgruppen an Proteine anlagern. Verwendet man ein spezifisches Substrat für eine Kinase, so kann über die Menge des phosphorylierten Substrats zu bestimmten Zeitpunkten eine Aussage über die Aktivität der Kinase getroffen werden.

Wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben wird das zu untersuchende Protein immunpräzipitiert. Nach dem Waschen der Immunkomplexe mit Lysispuffer (siehe vorletzter Absatz) werden diese für den Kinase- Assay einmal mit 1fach Kinasepuffer gewaschen und das Pellet anschliessend in 15µl 2fach Kinasepuffer resuspendiert und 10µl des spezifischen Substrats zugegeben. Durch Zugabe von 200µM ATP werden die Reaktionen gestartet. Dazu werden die Proben bei 30°C für die vorgesehene Zeit inkubiert. Durch Zugabe von Samplebuffer wird die Reaktion gestoppt und die Proben werden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.4.4 SDS-Gelelektrophorese

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED
Sammelgel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED
SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Die Wandergeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld hängt von ihrer Größe, Form und elektrischen Ladung ab. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-DISK-PAGE) werden die Proteine bei der Probenvorbereitung in SDS-Probenpuffer denaturiert und durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS die Eigenladung der Proteine dahingehend verändert, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (Laemmli, 1970). Niedermolekulare Thiole bewirken eine Reduktion der Disulfidbrücken in den Polypeptiden. Somit werden Proteine bei der SDS-PAGE ausschließlich nach ihrer molaren Masse aufgetrennt. Im diskontinuierlichen System passieren sie zunächst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und des Sammelgels bewirkt eine Fokussierung des Proteingemisches im Sammelgel. Beim Einwandern der Proteine in das Trenngel, das eine geringere Porengröße und einen höheren

pH-Wert als das Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt. Der Auftrennungsbereich der Proteine kann durch Variation der Trenngelporengröße, also durch variierende Polyacrylamid-Konzentration (5-15%) festgelegt werden.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wird das Trenngel je nach gewünschter Auftrennung der Proteine mit 5-15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, luftblasenfrei in die Gelvorrichtung gegossen und mit 500 µl Methanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels, wird das Methanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die vorbereiteten hitzedenaturierten Proteine (aus den Kapiteln 2.2.4.1 und 2.2.4.2) werden in die Probenaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25-120 Volt) aufgetrennt. Ein Molekulargewichtsmarker, der aus farbstoffmarkierten Proteinen definierten Molekulargewichts besteht, wird zum Molekulargewichtvergleich auf einer Spur des Gels aufgetragen. Nach dem Lauf wird das Gel aus der Kammer entnommen und die Proteine werden wie in Kapitel 2.2.4.5 beschrieben auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.2.4.5 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Nach Abschluss der Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4) erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran unter Verwendung des „*Wet-Blot*“-Verfahrens. Die zugeschnittene PVDF-Membran wird mit Methanol benetzt und in Transferpuffer überführt. Das SDS-Gel wird in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale luftblasenfrei auf die Membran gelegt und zwischen zwei Schichten Cellulosefilterkarton (*Whatman-Paper*) eingespannt. Anschließend werden die Schichten entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstantem Stromfluss (1000 mA). Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine.

2.2.4.6 Immunchemischer Nachweis von transferierten Proteinen

PBS-Tween-(PBST)-Puffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Blockier-Puffer: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS-Tween-Puffer; 5% BSA in PBS-Tween-Puffer

Bei der Immunfärbung werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper markiert und mittels eines Chemolumineszenz-Systems nachgewiesen. Dazu wird die Membran

unmittelbar nach dem Transfer (Kapitel 2.2.4.5) in PBST-Puffer gewaschen und anschließend 30 min bei 37°C in Blockier-Puffer inkubiert. Das Blockieren dient dazu, überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Da einige Milchproteine in phosphorylierter Form vorliegen und somit eine Reaktion mit phosphospezifischen Antikörpern eingehen können, wird bei Detektion phosphorylierter Proteine Blockier-Puffer mit BSA verwendet. Der Primäantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird entsprechend der Angaben des Herstellers in Blockier-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Antikörper-Antigen-Reaktion erfolgt innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Nach Inkubation mit Primäantikörper wird die Membran dreimal 10 min mit PBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend inkubiert man die Membran bei Raumtemperatur mit einem gegen den F_c-Teil des Primäantikörpers gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäantikörper für eine weitere Stunde. Die Membran wird daraufhin zweimal mit PBST-Puffer sowie einmal mit PBS gewaschen und zur Detektion mit Chemolumineszenz-Substrat-Lösung inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt. Das erzeugte Signal wird auf einen Hyperfilm übertragen und dokumentiert.

2.2.4.7 Entfernen gebundener Antikörper von der Membran

Amidoschwarz-Entfärbelösung: 10 % Essigsäure; 10 % Methanol in A.d.

Um die an eine Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran zweimal 15 min mit Amidoschwarz-Entfärbelösung schüttelnd inkubiert und anschließend mit A.d. gewaschen. Eine auf diese Weise behandelte Membran kann erneut, wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben, geblockt und mit Antikörper inkubiert werden.

2.2.5 Tiermodell

2.2.5.1 Präparation von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen

Basales Knochenmarksmedium (BBMM): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA (10% in IMDM);
5 ml L-Glutamin-Lösung (200mM); 100µM 2-Mercaptoethanol; 2,5 ml
Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Zur Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark männlicher Balb/C-Mäuse, wird diesen 5-Fluorouracil (150 mg/kg) intravenös verabreicht (Spain and Mulligan, 1992). Nach 4 Tagen werden die Spendermäuse durch zervikale Dislokation getötet und Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entnommen. Anschließend wird das Knochenmark mit BBMM unter Verwendung einer Injektionskanüle (27G 3/4) aus den Knochen gespült und

durch ein Zellsieb der Porenweite 100 µm pipettiert, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die Zentrifugation erfolgt bei 1000 Upm für 6 min.

2.2.5.2 Prästimulation von murinen Knochenmarkzellen

Prästimulationsmedium: BBMM; 10 ng/ml mL-3; 12 ng/ml mL-6; 50 ng/ml mSCF

Retrovirale Transduktion ist ausschließlich bei sich teilenden Zellen möglich. Deshalb ist es notwendig, die Knochenmarkzellen vor der Infektion zu stimulieren. Dazu werden diese direkt nach der Präparation (Kapitel 2.2.5.1) in Prästimulationsmedium aufgenommen und ca. 20 h bei 37°C kultiviert.

2.2.5.3 Retrovirale Transduktion der Knochenmarkzellen

Vor Infektion der Knochenmarkzellen wird der durch Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E gewonnene retrovirale Überstand wie in Kapitel 2.2.3.8 beschrieben titriert. Für die Knochenmarkinfektion eignen sich retrovirale Überstände, deren Virustiter über 1×10^5 CFU/ml liegt. Der retrovirale Gentransfer in die Knochenmarkzellen wird mit Hilfe der „Spin“-Infektion durchgeführt. Bei dieser Methode werden die prästimulierten Zellen nach Zentrifugation in BBMM (1/4 des Gesamtvolumens) aufgenommen und die Zellsuspension mit retroviralem Überstand (3/4 des Gesamtvolumens) vermischt. Nach Supplementierung des Gemisches mit 10 ng/ml mL-3, 12 ng/ml mL-6, 50 ng/ml mSCF und 4 µg/ml Polybren wird der Infektionsansatz in eine 12-Schalen-Mikrotiterplatte verteilt und diese bei 1200 x g und 32°C 90 min zentrifugiert („Spin“-Infektion). Anschließend werden die Zellen bei den üblichen Bedingungen weiterkultiviert. Die „Spin“-Infektion wird insgesamt viermal im Abstand von 12 h durchgeführt, wobei vor jedem Zentrifugationsschritt Medium, retroviraler Überstand und Supplemente erneuert werden. Nach weiterer 12-stündiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen zentrifugiert, in HBSS resuspendiert und transplantiert (Kapitel 2.2.5.4). Vor Transplantation der Empfängermause mit den transduzierten Zellen, wird der Anteil der EGFP-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3.7).

2.2.5.4 Knochenmarktransplantation

Die 6 - 8 Wochen alten, weiblichen Balb/C- Empfängermause werden vor der Knochenmarktransplantation mit einer Dosis von 800 rad (8 Gy) letal bestrahlt. Durch diese myeloablative Bestrahlung ist gewährleistet, dass deren Hämatopoese nach der Transplantation ausschließlich von den Spenderzellen ausgeht. Die Transplantation erfolgt

durch intravenöse Injektion der Knochenmarkzellen in die Schwanzvene der Mäuse. Das Volumen der Zellsuspension pro Injektion sollte 200 µl nicht überschreiten. Eine Rekonstitution der letal bestrahlten, transplantierten Mäuse ist nach etwa 10 Tagen zu erwarten.

2.2.5.5 Überwachung der transplantierten Mäuse

Um die Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung zu erkennen und den Verlauf einer solchen zu überwachen, wird ab dem Zeitpunkt der Rekonstitution in regelmäßigen Abständen peripheres Blut aus der Schwanzvene abgenommen und analysiert.

Ein Blutbild wird aus 20 µl peripherem Blut erstellt. Um Gerinnung zu verhindern, entnimmt man das Blut mit einer EDTA-beschichteten Kapillare. Zur Analyse wird es in das Blutbildgerät (VetABC-Blood-Counter) überführt. Ein Tropfen peripheres Blut wird verwendet, um einen Blutausschlag anzufertigen. Hierbei wird das Blut auf die untere Hälfte eines Glasobjektträgers getropft und mit der Kante eines zweiten Trägers ausgestrichen. Für Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop werden die Ausstriche direkt nach Anfertigung verwendet. Lichtmikroskopische Untersuchungen werden nach Pappenheimfärbung durchgeführt. Die Blutausschläge wurden freundlicherweise vom „Hämatologischen Routinelabor“ gefärbt.

Für eine durchflusszytometrische Immunphänotypisierung (Kapitel 2.2.5.9) des peripheren Bluts werden 100-200 µl Blut in ein EDTA-gefülltes Röhrchen abgenommen und die Erythrozyten durch hypotone Lyse entfernt (Kapitel 2.2.5.6).

2.2.5.6 Hypotone Lyse von Erythrozyten

RBC (Red Blood Cell)-Puffer: 150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, pH7.3 in A.d.

Das frisch entnommene periphere Blut wird im zehnfachen Volumen RBC-Puffer aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Durch den hypotonen Puffer schwellen die Erythrozyten an und lysieren. Nach Zentrifugation (1000 Upm, 8 min) wird der Überstand verworfen und das Sediment, das die Leukozyten enthält, mit PBS gewaschen.

2.2.5.7 Therapie mit Imatinib

Für die Imatinib-Behandlung transplantierte Mäuse wird eine entsprechende Menge der Imatinib-Stammlösung in A.d. gelöst und den Tieren per os mit einer Venenverweilkanüle verabreicht. Über den Schlauch der Kanüle, der im Ösophagus der Maus platziert wird, kann pro Maus ein Volumen von 100-200 µl appliziert werden.

2.2.5.8 Aufbereitung von Organen transplantierte Mäuse

Nach Versterben der Mäuse infolge einer hämatologischen Erkrankung, werden diese auf pathologische Veränderungen der Organe untersucht. Nach Eröffnen von Abdomen und Thorax erfolgt eine Splenektomie und das Entfernen von Femur und Tibia. Falls weitere Organe (Thymus, Lymphknoten, etc.) pathologisch vergrößert sind oder sich Tumoren gebildet haben, werden auch diese entnommen. Alle Gewebe und Organe werden gewogen und vermessen und bis zur weiteren Verarbeitung in HBSS aufbewahrt. Die Knochenmarkszellen werden wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben gewonnen. Von allen Organen wird ein kleiner Teil zur späteren histologischen Untersuchung in Formaldehyd-Lösung (4% in PBS) konserviert. Der Rest wird mit einem Skalpell zerkleinert und zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen durch ein 100 µm Zellsieb gespült. Ein Teil der so gewonnenen Zellen wird durchflusszytometrisch immunphänotypisiert (Kapitel 2.2.5.9), während die verbleibenden Zellen für spätere Analytik viabel kryokonserviert (Kapitel 2.2.3.2) werden.

2.2.5.9 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

FACS-Puffer: 0,1% BSA in PBS

Bei der Immunphänotypisierung werden zellspezifische Oberflächenantigene mit Fluorochrom-gekoppelten spezifischen Antikörpern markiert und in einem Durchflusszytometer analysiert (vgl. 2.2.3.7). Da die Antikörper spezifische Antigene erkennen, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Antigendichte auf der jeweiligen Zelle. Durch Kombination mehrerer mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelter Antikörper können auch Subpopulationen gemessen werden.

Zur Phänotypisierung werden die aufgearbeiteten Zellen (aus den Kapiteln 2.2.5.6 und 2.2.5.8) in FACS-Puffer aufgenommen und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte verteilt. Pro spezifischem Antikörper und Zellart verwendet man eine Vertiefung. Das Volumen pro Kavität beträgt 200 µl. Die F_c-Block™-Lösung und alle Antikörperlösungen werden im Verhältnis von 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt eingesetzt. Jedem Loch werden zum Maskieren unspezifischer Bindungsstellen 3 µl F_c-Block™-Lösung zugesetzt. Nach Zugabe von 3 µl des CyChrome™-gekoppelten CD45-Panleukozytenmarkers pipettiert man jeweils 3 µl der Phycoerythrin (PE)-gekoppelten, spezifischen Antikörper zu. Der Ansatz inkubiert unter Ausschluss von Licht mindestens 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Platte bei 4°C und 1450 Upm 5 min zentrifugiert und die Zellen dreimal mit jeweils 200 µl FACS-Puffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen werden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Vor der Analyse im Durchflusszytometer wird jedem

Ansatz 1 µg/ml Propidiumiodid zugesetzt, um den Ausschluss toter Zellen in der Auswertung zu ermöglichen. Die Auswertung erfolgt wie in Abb. 7 schematisch dargestellt.

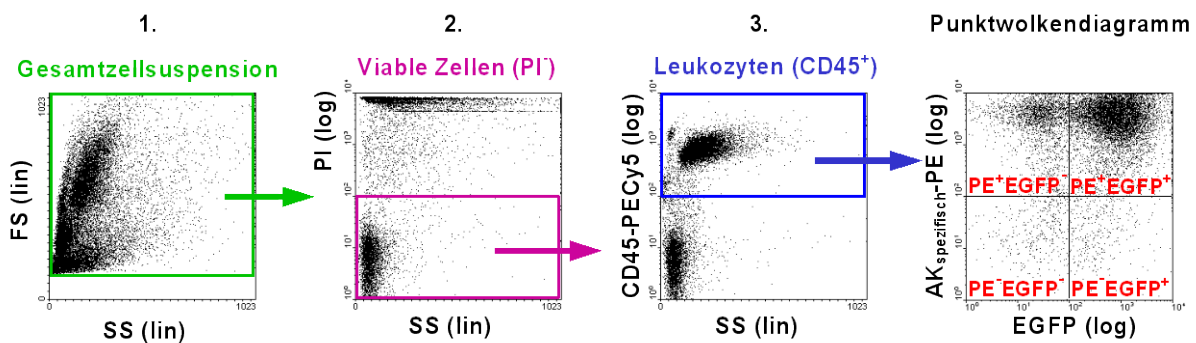


Abb. 7: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen

Zur Generierung der Punktwolkendiagramme mit Auftragung der EGFP-Expression auf der X- und PE-Fluoreszenz auf der Y-Achse durchlaufen die Zellen folgende Ausschlusskriterien:

Die Gesamtzellsuspension geht in die Analyse von Größe (Forward Scatter; FS) und Granularität (Sideward Scatter; SC) ein. Dort werden Zeldupletten und -trümmer ausgeschlossen.

Tote Zellen verlieren ihre Membranintegrität und können deshalb mit Propidiumiodid (PI) gefärbt werden. Im zweiten Schritt werden nur die viablen Zellen, welche keine PI-Fluoreszenz zeigen ausgewählt (rosa).

In die eigentliche Analyse gehen letztendlich nur die Leukozyten ein. Dazu werden die Zellen mit dem CyChrome™-gekoppelten Panleukozytenmarker (anti CD45) gefärbt.

lin: lineare Darstellung; log: logarithmische Darstellung; -: negativ; +: positiv.

2.2.5.10 In vitro Liquid- und Methylzellulose- Assay

BM-Medium: IMDM, 20%FCS, 1%BSA

Methylzellulose: Methocult TM H4230

Um murine mit einem Onkogen transduzierte Zellen *in vitro* zu analysieren, können Milzzellen von ersttransplantierten erkrankten Mäusen verwendet und im Liquid- oder Methylzellulose-Assay untersucht werden. Für den Liquidassay werden die Zellen in BM-Medium resuspendiert, in einer 12-Loch-Zellkulturplatte mit 1×10^5 Zellen pro well ausplattiert und regelmässig mikroskopisch und im Durchflusszytometer (FACScan) analysiert.

Für den Methylzellulose-Assay, werden 4×10^4 Zellen in 1ml Methylzellulose pro well in einer 12-Loch-Zellkulturplatte ausplattiert. Nach 14 Tagen Inkubation bei 37°C erfolgt die Analyse des Assays. Die Kolonien werden gezählt, einzelne Kolonien gepickt und im Durchflusszytometer der Anteil der EGFP exprimierenden Kolonien beurteilt. Darüberhinaus kann die Morphologie der Kolonien mikroskopisch beurteilt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Enzymaktivität der Bcr-Abl Punktmutationen T315I und Y253H

Bcr-Abl Punktmutationen sind neben Bcr-Abl Amplifikation und klonaler Evolution die Hauptursache für Therapieresistenz unter Imatinibbehandlung (Cortes et al., 2003; Gorre et al., 2001; Jun and Schindler, 2000; von Bubnoff et al., 2002). Da diese Punktmutationen aber nicht nur die Imatinibbindung beeinflussen könnten, sondern möglicherweise auch die Kinaseaktivität des Bcr-Abl Enzyms verändern, wurde im Folgenden die Auswirkung der Punktmutationen T315I und Y253H auf die Enzymaktivität der Bcr-Abl Kinase untersucht.

3.1.1 Herstellung der Bcr-Abl Vektorkonstrukte

Die in dieser Arbeit verwendeten Bcr-Abl Punktmutanten wurden aus Patientenmaterial gewonnen. Dabei handelte es sich um Patienten mit dem Rezidiv einer Ph⁺, Imatinib resistenten CML oder ALL (von Bubnoff et al., 2002). Aus den Zellen dieser Patienten wurde RNA isoliert und mit den entsprechenden Primern über eine RT-PCR die jeweilige cDNA von Bcr-Abl T315I und Y253H hergestellt (Kapitel 2.2.1.8). Als Trägerplasmid für die Bcr-Abl Punktmutanten wurde der bicistronische MSCV MigR1 Vektor verwendet, da dieser Vektor eine für spätere Versuche wichtige Markierung der Punktmutanten ermöglicht. Bicistronische Vektoren tragen neben dem zu analysierenden Gen ein zweites Gen und die Sequenz für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES). Aufgabe der IRES ist es, die Translation des zweiten Gens zu vermitteln. Nach Transkription der beiden Gene zu einer gemeinsamen mRNA, erfolgt die parallele Translation zu einzelnen Proteinen. Das zweite Gen des verwendeten MSCV MigR1 Vektors kodiert für die Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) und kann mit dem Durchflusszytometer (FACScan) detektiert werden. Durch Messung der EGFP Expression kann somit zugleich die Translation der jeweiligen Bcr-Abl Punktmutante kontrolliert und gemessen werden.

Die beiden Mutationstranskripte wurden jeweils in die *EcoR1* Schnittstelle des MigR1 kloniert (Kapitel 2.2.1.1, 2.2.1.6). Durch Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.2) mit *Xho1* und anschließender Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.1.3) wurde der Erfolg der Klonierung überprüft. Nach erfolgreicher Klonierung sind in der Agarosegelelektrophorese zwei Banden mit einer Größe von etwa 12 kb und 0,8kb zu sehen (siehe rechte Bahn Abb. 8).

Für einen Vergleich der Kinaseaktivität von Bcr-Abl, wurde auch das Bcr-Abl Wildtyp Transkript in die *EcoR1 site* des MSCV MigR1 Vektors subkloniert.

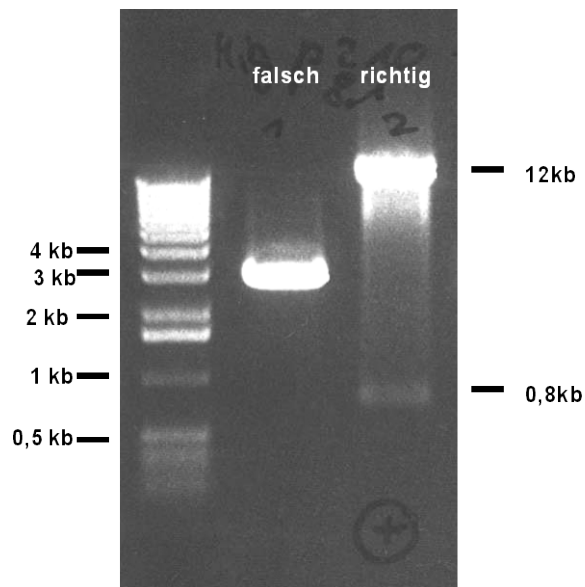


Abb. 8: Restriktionsverdau mit *Xho*1

Nach erfolgreicher Klonierung des Mig-Bcr-Abl mit Konstrukts, zeigt der Restriktionsverdau in der Agarosegelelektrophorese zwei Banden (siehe rechte Bahn).

3.1.2 Phosphorylierungskinetik eines synthetischen Abl Substrates

Ein einzelner Aminosäureaustausch zeigt möglicherweise starke Auswirkungen auf die Enzymaktivität von Tyrosinkinase. Zur Analyse etwaiger Effekte der Mutationen T315I und Y253H auf die Bcr-Abl Kinaseaktivität, wurde die Phosphorylierungskinetik eines Abl Substrates untersucht.

Zunächst wurden 293T Zellen mit den MigR1 Vektorkonstrukten Bcr-Abl wt, Bcr-Abl T315I und Bcr-Abl Y253H transient transfiziert (Kapitel 2.2.3.5). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die den leeren MigR1 Vektor enthielten. Nach 48h wurden die Zellen lysiert (Kapitel 2.2.4.1) und eine Abl-Immünpräzipitation (IP) durchgeführt (Kapitel 2.2.4.2). Aus den mit Bcr-Abl wt, T315I und Y253H transfizierten Zelllysaten wurde mit dem Anti-Abl Antikörper K-12 das Bcr-Abl Protein präzipitiert. Als Kontrolle diente zum einen eine Abl-IP von Zellen, die den leeren Mig-Vektor trugen und zum anderen eine IP der Bcr-Abl wt transfizierten Zellen mit einem Kontrollantikörper. Voraussetzung für den Vergleich der Substratphosphorylierungskinetik der Bcr-Abl Mutanten mit Bcr-Abl Wildtyp sind gleiche Mengen an präzipitiertem Abl Protein. Dazu sollte die Transfektionseffizienz der drei Bcr-Abl Konstrukte gleich sein. Der Transfektionserfolg wurde mittels Western Blot untersucht. Die Zellen wurden lysiert, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Kapitel 2.2.4.4) und auf eine Nylonmembran geblottet (Kapitel 2.2.4.5). Anschließend wurde die Expression von Bcr-Abl mit dem Anti-Abl Antikörper (8E9) dargestellt (Kapitel 2.2.4.6). Abb. 9a zeigt die Input

Kontrolle der 293 Zellen und lässt anhand der Intensität der Banden erkennen, dass äquivalente Mengen der verschiedenen Abl Proteine eingesetzt wurden.

Die Kinasereaktionen wurden mit einem synthetischen Abl-Substrat durchgeführt. Bei dem Substrat handelt es sich um die GFP Sequenz, die am 3`Ende mit einem Peptid verbunden ist, das aus sieben Aminosäuren (AIYAAPF) besteht. Dieses Peptid besitzt eine für die Abl-Kinase optimierte Phosphorylierungsstelle (Yang et al., 1999). Der Kinaseassay wurde wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben ausgeführt, und die Substratphosphorylierung nach einer Inkubationszeit von 0; 1; 5; 10 und 20 Minuten bestimmt (Miething et al., 2003). Die Substrate wurden auf ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, durch Gelelektrophorese isoliert und anschließend auf eine Nylonmebran geblottet. Eine äquivalente Substratladung wurde durch Amidoschwarzfärbung kontrolliert und ist in der unteren Bande der Abb. 9b wt, c T315I, d Y253H abgebildet. Zur Darstellung der Substratphosphorylierung wurde ein Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine verwendet (anti Phosphotyrosin). Die obere Bande der Abb. 9b c d zeigt die Substratphosphorylierung von Bcr-Abl wt (b), Bcr-Abl T315I (c) und Bcr-Abl Y253H (d) nach 0, 1, 5, 10 und 20 Minuten. Ein Vergleich der drei oberen Banden, zeigt eine gleiche Bandenstärke an den jeweiligen entsprechenden Zeiten auf. Die drei Bcr-Abl Proteine phosphorylieren somit das Substrat mit der gleichen Effizienz und Kinetik. Dies deutet darauf hin, dass sich die Kinaseaktivität der zwei Mutanten *in vitro* nicht wesentlich vom Bcr-Abl Wildtyp unterscheidet.

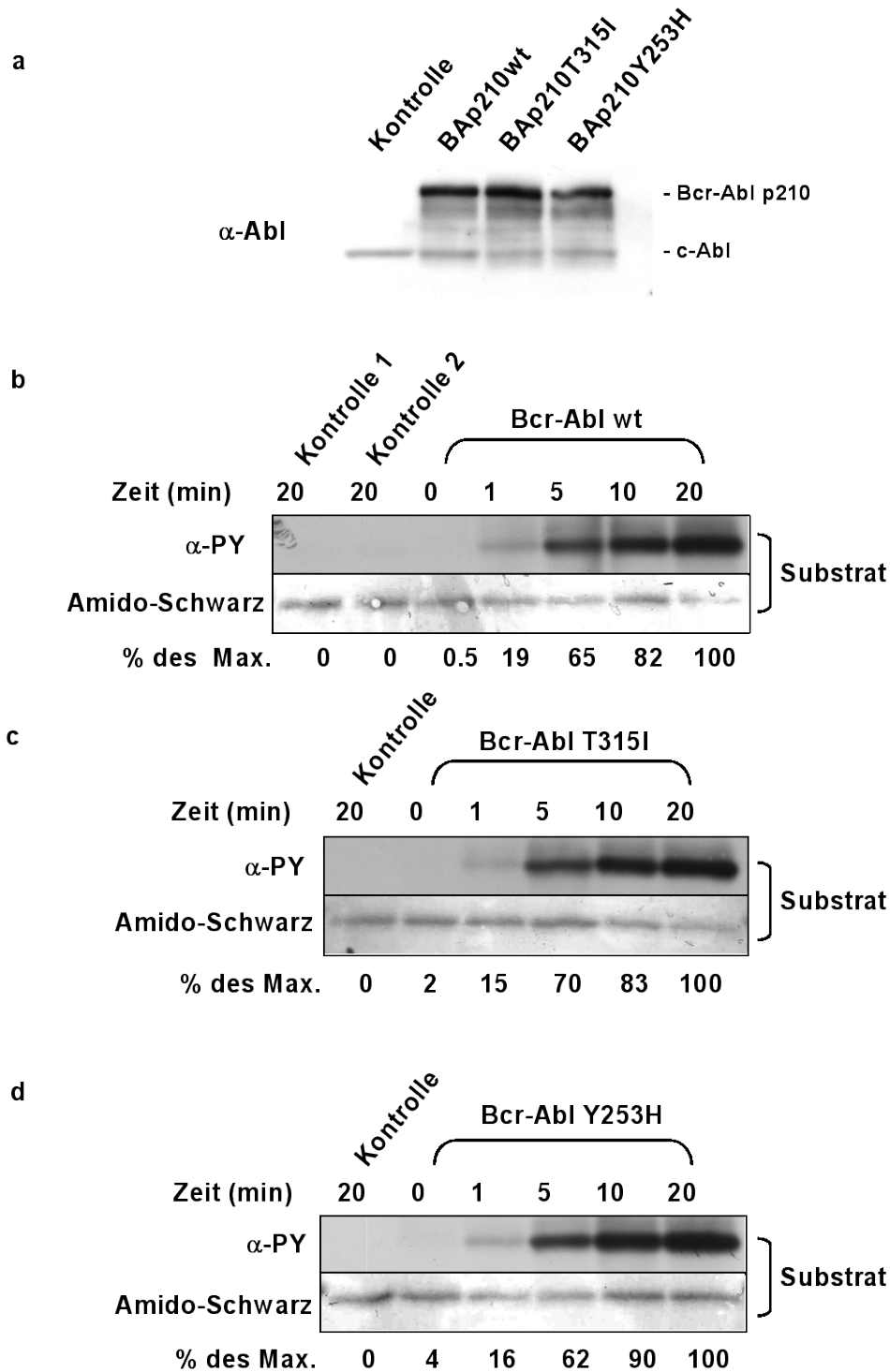


Abb. 9: Kinaseassay mit einem synthetischen Abl-Substrat

a) 293T Zellen wurden mit Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut Konstrukten transfiziert und die Proteine im Western Blot mit dem Anti-Abl Antikörper (8E9) zur Input Kontrolle immunchemisch dargestellt.
 Der Kinaseassay mit einem synthetischen Abl-Substrat zeigt die Phosphorylierungskinetik von immunpräzipitiertem Bcr-Abl wt b) Bcr-Abl T315I c) und Bcr-Abl Y253H d).

3.1.3 Proteinphosphorylierung in Ba/F3 Zellen

Der im vorherigen Kapitel beschriebene Kinaseassay zeigte keinen bedeutenden Einfluss der beiden Punktmutanten auf die Phosphorylierung eines einzelnen Substrates. Um jedoch auch mögliche Auswirkungen der Punktmutanten auf die Autophosphorylierung von Bcr-Abl und das gesamte Proteinphosphorylierungsmuster in hämatopoetischen Zellen zu erfassen, wurden die Bcr-Abl Mutanten in die murine pre-B Zelllinie Ba/F3 transfiziert und mittels Western Blot der gesamte Proteinphosphorylierungsstatus der Bcr-Abl Mutanten untersucht. Die Vektorkonstrukte MigR1 Bcr-Abl wt, Bcr-Abl T315I und Bcr-AblY253H wurden in Ba/F3 Zellen elektroporiert und für 48h mit IL-3 inkubiert (Kapitel 2.2.3.5). Durch anschließenden Faktorentzug konnten die erfolgreich transfizierten von den nicht transfizierten Zellen getrennt werden. Die Proliferation der Ba/F3 Zelllinie ist Zytokin abhängig. Wird den Zellen IL-3 entzogen gehen sie in Apoptose (Rodriguez-Tarduchy et al., 1990). Onkogene wie Bcr-Abl können diese Zellen zu Faktorunabhängigkeit transformieren. Eine Selektionskontrolle der Bcr-Abl tragenden Ba/F3 Zellen ermöglicht die durchflusszytometrische Messung des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP), dessen Koexpression der bicistronische MigR1 Vektor bewirkt (vgl. Kapitel 3.1.1).

Nach erfolgreicher Selektion wurden die Zellen mit ansteigenden Imatinibkonzentrationen (0; 1 und 5µM) für 6h inkubiert, anschließend lysiert und die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran transferiert und mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (anti pY) inkubiert. Nach Entfernung des Erstantikörpers wurde mit Anti-Abl die Menge des enthaltenen Abl-Proteins bestimmt. Als Beladungskontrolle diente Anti β-Actin.

Während in Kapitel 1.1.2 nur die *in vitro* Transphosphorylierung eines Substrates dargestellt ist, demonstriert dieses Experiment neben der Autophosphorylierung von Bcr-Abl die Gesamtproteinphosphorylierung *in vivo*. Ein Vergleich der Proteinphosphorylierung der nicht Imatinib behandelten Bcr-Abl wt und mut transformierten Ba/F3 Zellen in Abb. 10 lässt keinen bedeutenden Unterschied des Phosphotyrosinsignals in Spur 1; 4 und 7 erkennen. Ein Vergleich der Autophosphorylierung von Bcr-Abl spricht ebenfalls nicht für eine erhöhte Kinaseaktivität der Punktmutanten. Dieser Versuch zeigt weder eine veränderte Substratspezifität noch ein erhöhtes Phosphorylierungspotential für die Bcr-Abl Punktmutanten auf.

Die mit Imatinib inkubierten Bcr-Abl wt Zellen (Spur 2 und 3) weisen eine starke Abnahme des Phosphorylierungssignals auf, während die Bcr-Abl Y253H transfizierten Zellen nur mit einer geringen Abnahme der Phosphorylierungsintensität antworten (Spur 5 und 6) und die T315I Mutante keine Signalabnahme zeigt (Spur 8 und 9). Das gleichbleibende beziehungsweise nur gering abnehmende Phosphorylierungssignal der mit Bcr-Abl mut

transfizierten Zellen zeigt deutlich die anhaltende Aktivität der Tyrosinkinase und damit die erwartete Imatinibresistenz der Bcr-Abl Punktmutanten.

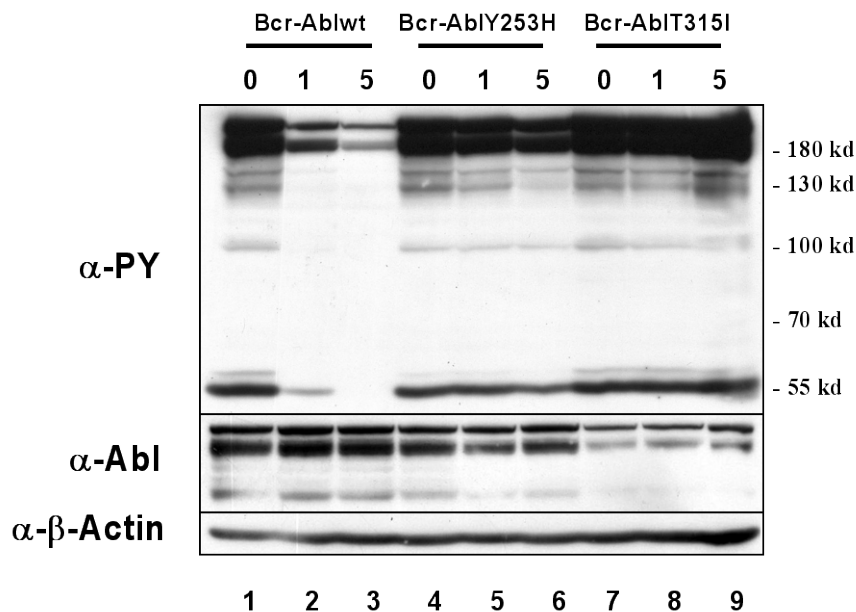


Abb. 10: Proteinphosphorylierung in Ba/F3 Zellen

Ba/F3 Zellen wurden mit Mig Bcr-Abl wt, Mig Bcr-Abl T315I und Mig Bcr-Abl Y253H transfiziert, für 6h mit 0, 1 und 5 μ M Imatinib inkubiert und daraus Lysate gewonnen. Die Proteine wurden im Western Blot mit Anti-Phosphotyrosin und Anti-Abl immunchemisch dargestellt. Als Beladungskontrolle diente Anti- β -Actin.

3.2 Charakterisierung der Bcr-Abl Punktmutanten in einem kompetitiven Repopulationsassay

In den bereits aufgeführten *in vitro* und *in vivo* Versuchen zeigten die Punktmutationen weder im Kinaseassay bei der Transphosphorylierung eines Substrates eine erhöhte Enzymaktivität noch in den transformierten Pre-B-Zellen ein erhöhtes Auto- oder Transphosphorylierungspotential. Das nächste Ziel dieser Arbeit war es, das onkogene Potential der Bcr-Abl Punktmutanten T315I und Y253H in primären murinen Knochenmarkzellen direkt mit Bcr-Abl Wildtyp zu vergleichen und die transformierenden Eigenschaften *in vivo* zu analysieren. Außerdem sollten die genauen Auswirkungen einer Imatinibbehandlung auf die Bcr-Abl Punktmutanten und den Bcr-Abl Wildtyp *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

3.2.1 Etablierung eines kompetitiven Repopulationsassays

Bisher wurde noch kein Tiermodell beschrieben, das die Untersuchung der Bcr-Abl Punktmutanten *in vivo* ermöglichte. Basierend auf dem murinen

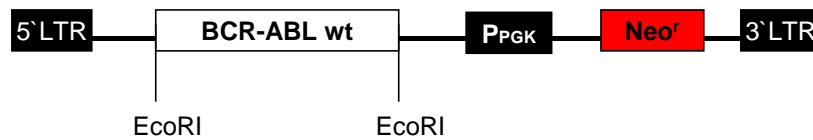
Knochenmarktransplantationsmodell wurde ein kompetitiver Knochenmark-Repopulationsassay etabliert, mit dem das Wachstums- und das transformierende Potential der beiden Punktmutanten direkt mit Bcr-Abl Wildtyp verglichen werden konnten.

3.2.1.1 Markierung der Bcr-Abl Punktmutanten mit dem Fluorochrom EGFP

Für den Repopulationsassay war es wichtig, durch eine Markierung eine Unterscheidung zwischen Bcr-Abl wt und Bcr-Abl Punktmutanten zu erzielen. Deshalb wurde der auf dem MSCV Vektor basierende bicistronische MigR1 Vektor als Trägerplasmid für die Bcr-Abl Punktmutanten gewählt. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, ermöglicht dieser Vektor neben der Expression des zu untersuchenden Proteins, die Koexpression des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP). Die Bcr-Abl Wildtyp cDNA wurde in die *EcoR1* Schnittstelle des EGFP negativen retroviralen MSCV Vektors kloniert. Transduziert man Zellen mit dem Mig-Bcr-Abl mut Konstrukt, so ist es möglich über Durchflusszytometrie den EGFP positiven und damit Bcr-Abl mut koexprimierenden Zellanteil zu identifizieren. Auf diese Weise wurde die für den kompetitiven Repopulationsassay wichtige Unterscheidung des EGFP positiven, damit Bcr-Abl mut exprimierenden, vom EGFP negativen, also Bcr-Abl wt tragenden Zellanteil erreicht.

Beide retroviralen Vektoren besitzen sogenannte 5'-und 3'-LTR (Long Terminal Repeat), die aus regulatorischen Sequenzen (Promotor, Enhancer, Poly-A-Schwanz) bestehen und das zu übertragene Gen Bcr-Abl und einen Selektionsmarker (EGFP bzw Neo^r) flankieren. Darüberhinaus besitzen beide Plasmide das Verpackungssignal Φ , das für die Verpackung der viralen RNA in Viruskapside notwendig ist.

MSCV-p210wt



MIG-p210T315I/Y253H

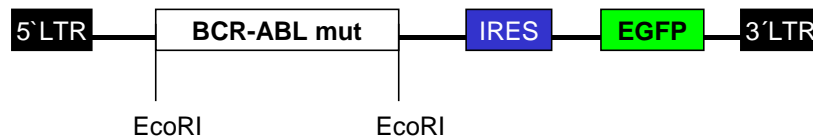


Abb. 11: Schematische Ansicht der Vektorkonstrukte

Struktureller Aufbau der retroviralen Vektoren MSCV Bcr-Abl wt und Mig Bcr-Abl T315I/Y253H. Die Bcr-Abl wt cDNA wurde in die *EcoRI* Schnittstelle des MSCV Vektors kloniert. Die T315I und Y253H Mutanten (Bcr-Abl mut) wurden in die *EcoRI* Schnittstelle des MigR1 Vektors kloniert, der das grün fluoreszierende Protein (EGFP) über eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) koexprimiert. Abkürzungen: LTR, long terminal repeat; PPGK, Promotor der Phosphoglyceratkinase, kontrolliert die Expression des Neomycin Resistenzgens *Neo^r*.

3.2.1.2 Expressionskontrolle der Vektorkonstrukte

Der MigR1 Vektor basiert auf dem retroviralen MSCV Vektor und enthält den MSCV LTR Promotor und eine IRES-EGFP Kasette. Vor kurzem wurde für den retrovirale Mig R1 Vektor eine etwas stärkere Expression als für den MSCV Vektor nachgewiesen (Miething et al., 2003). Der MSCV Vektor trägt neben dem LTR Promotor einen PGK (Phosphoglyceratkinase) Promotor, der für die Expression des Neomycin Resistenzgens verantwortlich ist. Vermutlich kommt es durch kompetitive Hemmung der beiden Promotoren des MSCV-PGK-Neo Vektors zu dem geringen Aktivitätsunterschied zwischen dem MSCV und dem MigR1 Vektor. Das möglicherweise stärkere Expressionspotential des Mig Vektors ist der Grund, weshalb dieses Plasmid als Träger der Punktmutanten verwendet wurde. Die Expression der Punktmutanten sollte mindestens gleich oder stärker als die von Bcr-Abl wt sein, damit mögliche Hinweise auf eine erhöhtes transformierendes Potential der Mutanten nicht durch eine verminderte Expression maskiert werden.

Zur Kontrolle der Expression wurden NIH3T3 Zellen mit den drei Vektorkonstrukten infiziert und die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht (Kap.2.2.4.4, 2.2.4.5 und 2.2.4.6). Die Expression des Abl-Proteins wurde mit dem Anti-Abl Antikörper (8E9) dargestellt und zeigt in Abb. 12 eine gleiche Bandenintensität für alle drei Vektorkonstrukte. Die drei Konstrukte weisen also keine auffälligen Aktivitätsunterschiede auf und exprimieren gleiche Mengen des Abl-Proteins. Zur Ladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen β -Actin verwendet (untere Bande)

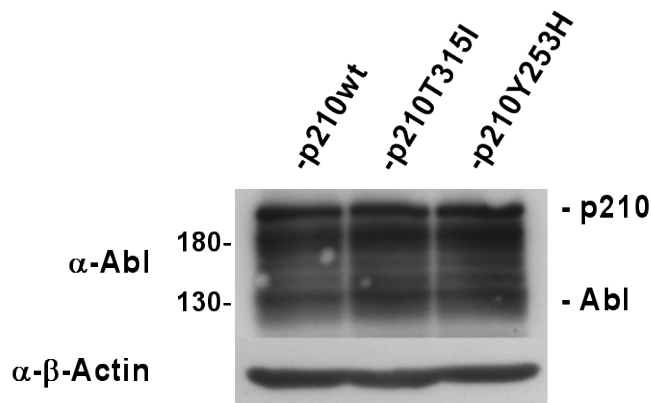


Abb. 12: Expressionskontrolle der Vektorkonstrukte in NIH3T3 Zellen

Aus NIH3T3 Zellen, die mit Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut Konstrukten infiziert worden waren, wurden Lysate hergestellt. Die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem Antikörper gegen Abl, zeigt eine gleiche Bandenintensität. Zur Kontrolle der Ladung wurde ein Antikörper gegen β -Aktin verwendet.

3.2.1.3 Das murine Knochenmarktransplantationsmodell als Basismodell für einen kompetitiven Repopulationsassay

Zur Durchführung des kompetitiven Repopulationsassays wurde das murine Knochenmarktransplantationsmodell verwendet. Durch retroviralen Gentransfer kann mit diesem Mausmodell der Einfluss von Onkogenen auf die Hämatopoese untersucht werden. Das retrovirale Transduktions- und Transplantationsverfahren ist wie in Abb. 13 dargestellt, in mehrere Schritte unterteilt.

Durch Transfektion der Virusproduktionszelllinie Phoenix E mit den Mig-Bcr-Abl mut Konstrukten und dem MSCV-Bcr-Abl wt Konstrukt werden retrovirale Partikel gewonnen. Diese Virionen tragen die Information für die zu transduzierenden Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut Gene. Die Transfektionseffizienz wird mit dem FACScan durch Messung des EGFP positiven Zellanteils bestimmt (Kapitel 2.2.3.7). Mit dieser Methode kann nur die Transfektionseffizienz der Bcr-Abl mut Konstrukte überprüft werden. Da aber die Transfektion mit dem Bcr-Abl wt Konstrukt unter denselben Bedingungen durchgeführt wird, gehen wir von einer sehr ähnlichen Effizienz der Transfektion aus. Anschließend wird die Anzahl der infektiösen, retroviralen Partikel durch Titration bestimmt (Kapitel 2.2.3.8), da die Virusqualität eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche retrovirale Infektion von Knochenmarkzellen ist. Parallel zu diesem Schritt wird Spendermäusen, die 4 Tage zuvor mit 5-Fluoruracil (5-FU) behandelt wurden, das Knochenmark für die Transduktion entnommen (Kapitel 2.2.5.1). Durch Kultivierung in einem Prästimulationsmedium werden die Stammzellen zum Eintritt in den Zellzyklus bewegt, da die retrovirale Transduktion nur in proliferierende Zellen möglich ist. Die Transduktion der Knochenmarkzellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben. Die Knochenmarkzellen werden mit den retroviralen Partikeln infiziert. Der Anteil der erfolgreich mit Bcr-Abl infizierten Zellen wird durchflusszytometrisch durch Messung der EGFP

Expression der mit Bcr-Abl mut infizierten Zellen ermittelt (Kapitel 2.2.3.7). Wie bereits bei der Transfektion gehen wir davon aus, dass der Wert der erfolgreich mit Bcr-Abl wt infizierten Zellen dem Wert der mit Bcr-Abl mut transduzierten Zellen entspricht.

Um einen direkten Vergleich des onkogenen Potentials durchführen zu können, werden die Bcr-Abl wt infizierten Knochenmarkzellen mit Bcr-Abl T315I oder Bcr-Abl Y253H transduzierten Zellen in einem bestimmten Verhältnis vermischt und eine genaue Anzahl dieser Zellen in Empfängerermäuse transplantiert. Vor der Transplantation werden Empfängerermäuse mit 800 rad myeloablativ bestrahlt. Durch die myeloablative Bestrahlung wird gewährleistet, dass die Hämatopoese nur von den transplantierten Spenderzellen ausgeht.

Die Transplantation einer Mischung aus Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut infizierter Stammzellen führt zu einer kompetitiven Repopulation in den Empfängerermäusen und ermöglicht durch regelmäßige durchflusszytometrische Messungen die Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens und der biologischen Aktivität von Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut.

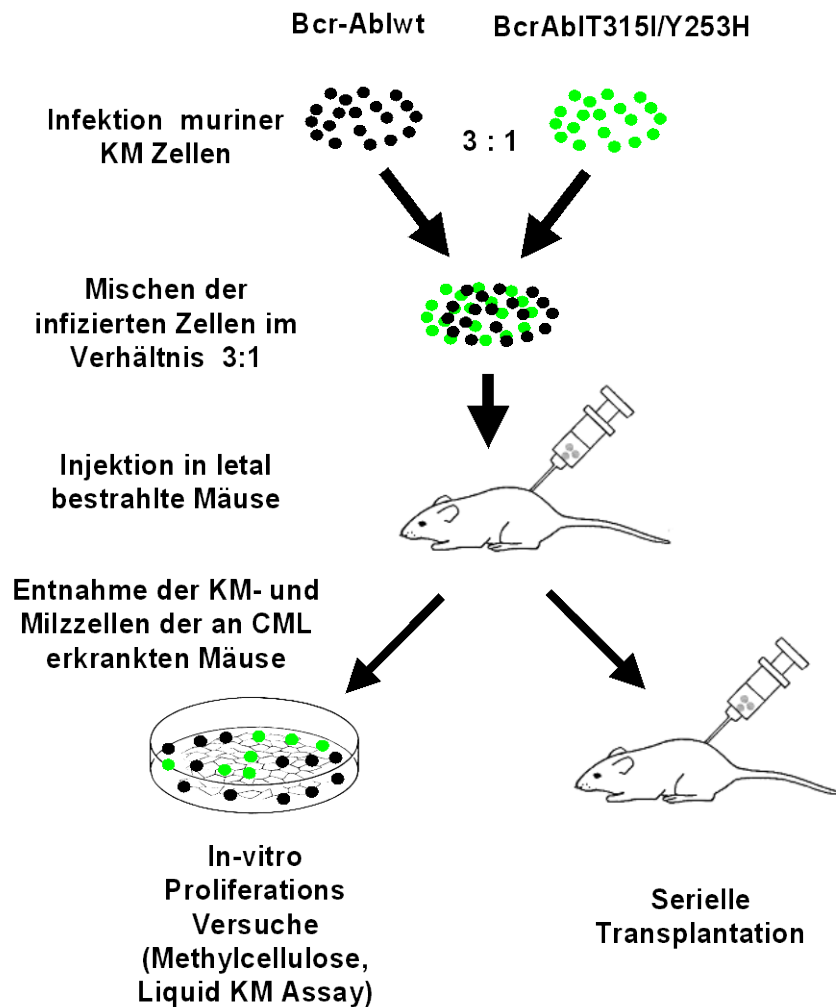


Abb. 13: Schematische Darstellung des retroviralen Transduktions-, Transplantationsprotokolls

In diesem kompetitiven Repopulationsassay wurden EGFP negative Bcr-Abl wt und EGFP positive Bcr-Abl mut infizierte Knochenmarkzellen in letal bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Milzzellen dieser Mäuse wurden für *in vitro* Versuche und serielle Transplantation verwendet.

3.2.2 Retrovirale Transduktion- und Transplantation

In diesem Abschnitt wird beispielhaft die retrovirale Transduktion- und Transplantation beschrieben. Dieses Transplantationsverfahren wurde für die beide Mutanten mehrfach durchgeführt.

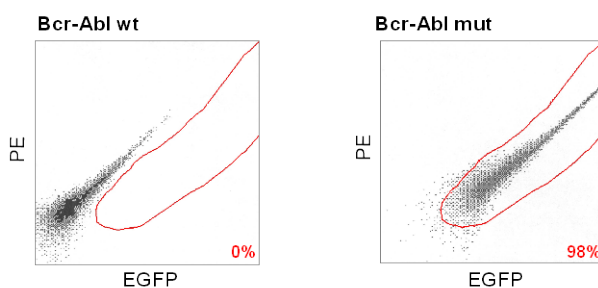
3.2.2.1 Retroviraler Gentransfer

Der retrovirale Gentransfer wurde wie oben beschrieben mit Bcr-Abl wt, Bcr-Abl T315I und Bcr-Abl Y253H durchgeführt. Die Ergebnisse der Transfektion, Virustitration und der

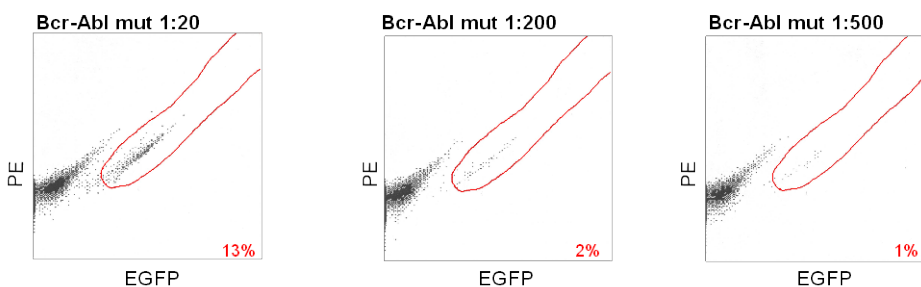
retroviralen Infektion der murinen Knochenmarkzellen sind exemplarisch in Abb. 14 dargestellt.

Die durchflusszytometrische Analyse der mit Bcr-Abl mut Vektorkonstrukten transfizierten Zellen zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse 98% EGFP positive Zellen. Dies bedeutet, 98% der Zellen sind an der Virusproduktion beteiligt. Um zu ermitteln, ob die für eine erfolgreiche Knochenmarktransduktion nötige Mindestzahl von 1×10^5 retroviraler Partikel pro ml im gewonnenen Überstand enthalten ist, wurde dieser titriert (Kapitel 2.2.3.8). NIH3T3 Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:20; 1:200 und 1:500 mit dem retroviralen Überstand infiziert. Der Titer wurde über die durchflusszytometrische Bestimmung der infizierten Zellen berechnet und ergab in diesem Beispiel einen Wert von etwa 2×10^5 retroviralen Partikeln pro ml. Die Virusüberstände unserer drei Vektorkonstrukte wurden dann für die Infektion muriner Knochenmarkzellen verwendet. Die Anzahl der erfolgreich transduzierten Knochenmarkzellen wurden im Durchflusszytometer durch Messung der EGFP positiven Zellen bestimmt. Zur Ermittlung des korrekten Anteils infizierter Progenitorzellen müssen zunächst Erythrozyten und Zelltrümmer von der Analyse ausgeschlossen werden. Dies geschieht durch Messung der Zellgröße mit Hilfe des „Forward Scatters“ (FS) und der Zellgranularität im „Sideward Scatter“ (SS) (Abb. 14c, linkes Bild). Nur große und wenig granuliert Zellen werden in die EGFP Analyse miteinbezogen. Die Infektionseffizienz für Bcr-Abl mut transduzierten Progenitorzellen betrug in diesem Beispiel 14%. Da das Verfahren für die Transduktion mit Bcr-Abl wt unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, gehen wir davon aus, dass sich der Anteil Bcr-Abl wt infizierter mononukleären Zellen ebenfalls in diesem Bereich befinden.

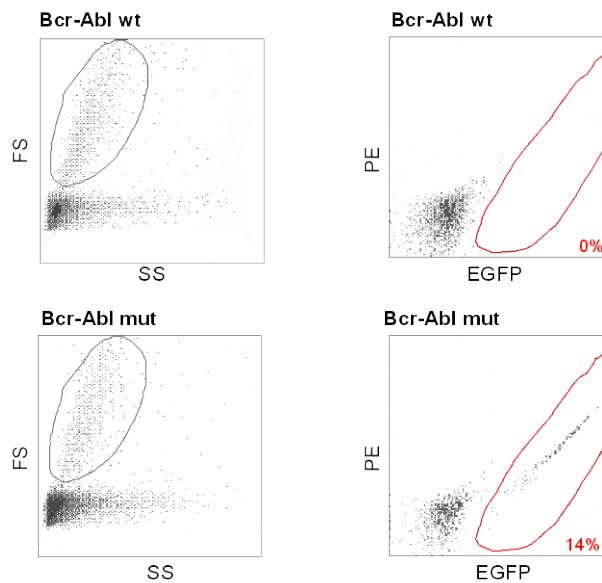
a) Phoenix



b) NIH3T3



c) Knochenmark

**Abb. 14: Retrovirale Transfektion, Virustitration und Transduktion in murines Knochenmark**

Der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen wird von der roten Ellipse umschlossen und ist in Prozentzahlen angegeben.

a) Durchflusszytometrische Analyse der Virusproduktionszelllinie Phoenix E, die mit dem EGFP negativen Bcr-Abl wt Konstrukt (links) und einem Bcr-Abl mut Konstrukt (rechts) transfiziert wurde. Wir nehmen an, dass die gemessene Transfektionseffizienz der Bcr-Abl mut Zellen den Bcr-Abl wt Zellen entspricht.

b) Repräsentative Titerbestimmung eines Virusüberstandes einer Bcr-Abl Mutante. NIH3T3 Zellen wurde in einer Verdünnungsreihe (1:20; 1:200 und 1:500) mit dem Virus infiziert und die Anzahl der retroviralen Partikel pro ml errechnet.

c) Transduktion von murinem Knochenmark mit Bcr-Abl wt (oben) und Bcr-Abl mut tragenden Virionen (unten). Zelltrümmer und Erythrozyten wurden von der Analyse ausgeschlossen und nur die Zellen in der schwarzen Ellipse weiter analysiert (links). Wie in den Abbildungen rechts zu sehen, konnte nur für die Bcr-Abl Mutante der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen und damit die Transduktionseffizienz bestimmt werden. Wir gehen davon aus, dass sich die Infektionseffizienz für Bcr-Abl wt in einem ähnlichen Bereich befindet.

3.2.2.2 Primärtransplantation

Die mit Bcr-Abl wt infizierten Knochenmarkzellen wurden im Verhältnis 3:1 mit Bcr-Abl T315I oder Bcr-Abl Y253H transduzierten Zellen gemischt. Pro Mutante wurden drei Mäuse transplantiert. Den zuvor letal bestrahlten Mäusen wurde eine Anzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen des jeweiligen Mischungsansatzes injiziert. Die transplantierten Mäuse beider Gruppen (n=6) entwickelten eine sehr aggressive myeloproliferative Erkrankung. Diese war gekennzeichnet durch eine massiven Expansion myeloischer Zellen im peripheren Blut, Milz und Knochenmark. Aufgrund der rapide progredient verlaufenden Erkrankung mussten die Tiere nach ca. 14 Tagen getötet werden. Zur Charakterisierung des myeloproliferativen Syndroms und um die Entwicklung der Bcr-Abl Punktmutation tragenden Zellpopulation zu verfolgen, wurden mit den Geweben Blut, Milz und Knochenmark folgende Analysen durchgeführt:

Blutbildanalyse

Regelmässige Blutbildkontrollen zeigten in beiden Mausgruppen als erstes Erkrankungsanzeichen einen starken Leukozytenanstieg. Im Endstadium der Erkrankung wurden im peripheren Blut Höchstwerte von $81,4 \times 10^3$ bis 300×10^3 Leukozyten pro μl ermittelt. Die differenzierte Zuordnung der Leukozyten erfolgte durch Ausstriche und Immunphänotypisierung.

Morphologie

Morphologische Analysen von Blutausstrichen zeigten eine starke Expansion neutrophiler Granulozyten (Abb. 15). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen demonstrierten die Proliferation einer EGFP positiven Zellpopulation und damit die Expression von Bcr-Abl mut in den leukämischen Zellen (Abb. 15 b).

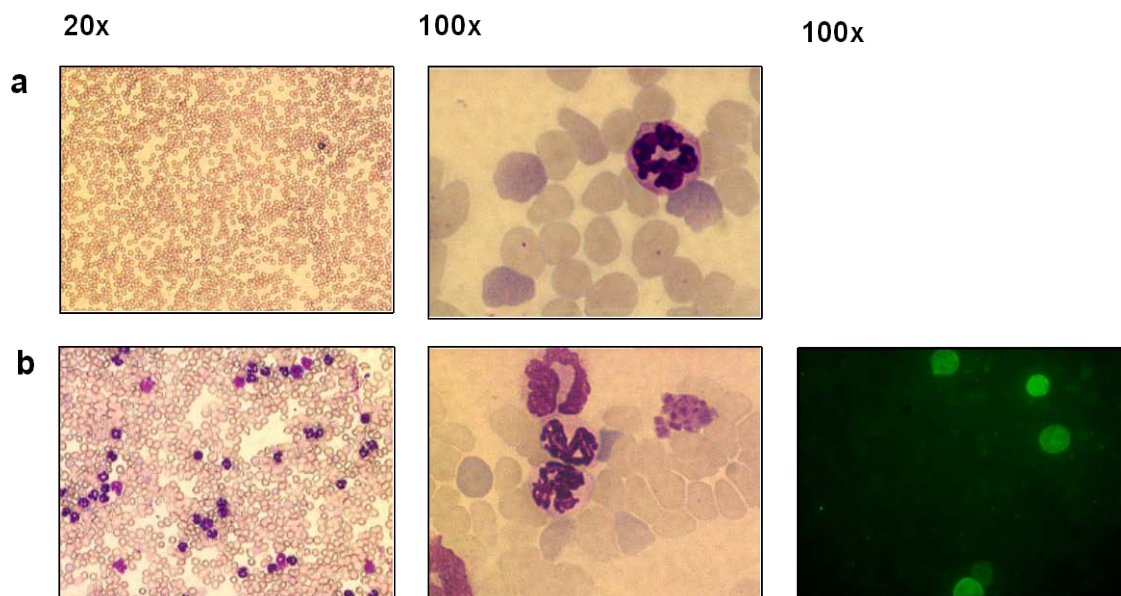


Abb. 15: Blutausstriche einer Kontrollmaus und einer Maus mit MPS

Mikroskopische Aufnahmen von Blutausstrichen einer gesunden Kontrollmaus (a) und einer Maus, die mit Bcr-Abl wt/Bcr-Abl mut infizierten Zellen transplantiert wurde (b). Im Vergleich zur Kontrollmaus ist in b eine deutliche Granulozytose erkennbar. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in b (rechts) bestätigt die Anwesenheit EGFP/ Bcr-Abl mut exprimierender Zellen.

Milzgewicht und Milzgröße

Nach dem Tod wurde den Tieren die Milz entnommen, gewogen und vermessen. Bei allen Mäusen wurde bedingt durch leukämische Infiltration eine massive Splenomegalie festgestellt. Das Milzgewicht der erkrankten Tiere war auf 600 bis 1490mg angestiegen während bei Kontrollmäusen Werte zwischen 130 und 210mg gemessen wurden (Abb. 16). Daraufhin wurden die Milzen für durchflusszytometrische Analysen zu Einzellzell suspensionen weiterverarbeitet.



Abb. 16: Darstellung des Größenunterschieds einer Kontrollmilz und einer durch myeloproliferative Infiltration vergrößerten Milz.

Durchflusszytometrie

Zur immunphänotypischen Charakterisierung der leukämischen Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Kapitel 2.2.5.9). Dazu wurden fluorochrommarkierte, monoklonale Antikörper verwendet, die die Oberflächenantigene myeloischer Zellen, B- oder T-Lymphozyten erkennen. Die Antikörper zur Detektion myeloischer Zellen sind gegen das Integrin CD11b (Mac-1), einem Oberflächenmolekül, das sich unter anderem auf monozytären, granulozytären und dendritischen Zellen befindet, (Leenen et al., 1994; Springer et al., 1979) und gegen das granulozytenspezifische Gr-1 (Ly-6G) (Fleming et al., 1993; Lagasse and Weissman, 1996) gerichtet. Zur Erkennung von B-Lymphozyten diente der Antikörper B220 (CD45R/B220). Die Detektion der T-Lymphozyten erfolgte mit dem Antikörper Thy1.2 (CD90.2) (Coffman, 1982; Hathcock et al., 1992; Ledbetter et al., 1980).

Die Immunphänotypisierung mit diesen Oberflächenmarkern wurde mit peripherem Blut und den Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks und der Milz dieser Mäuse durchgeführt (Kapitel 2.2.5.8). Charakteristisch für eine myeloproliferative Erkrankung zeigten die Mäuse beider Gruppen in den Geweben Blut, Milz und Knochenmark eine starke Expansion CD11b positiver also myeloischer Zellen. Hingegen war der Anteil B220 und Thy1.2 exprimierender Zellen sehr gering. In Abb. 17 ist exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse von peripherem Blut, Milz und Knochenmark einer Maus mit myeloproliferativem Syndrom (MPS) dargestellt.

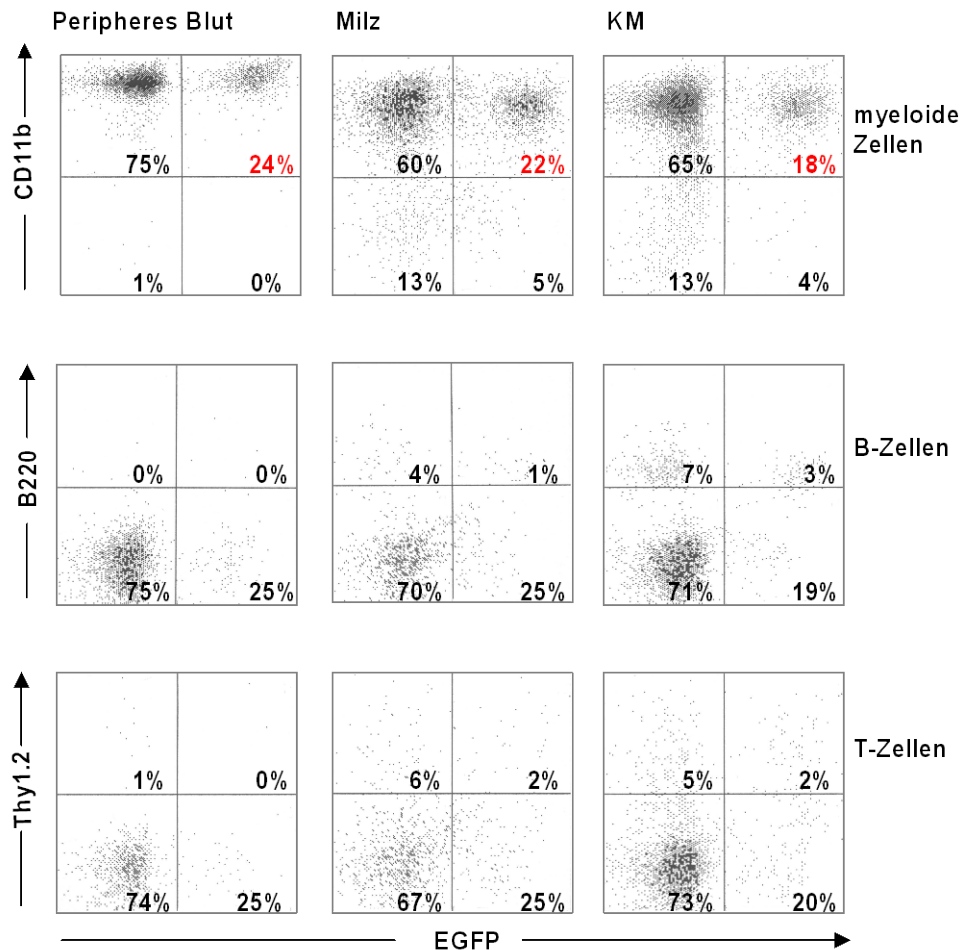
Darüber hinaus wurde durchflusszytometrisch auch die Entwicklung der EGFP positiven Bcr-Abl mut exprimierenden Zellpopulation in Blut, Milz und Knochenmark verfolgt. Es wurden bei beiden Mausgruppen Werte von etwa 20-26% EGFP positiver Zellen gemessen. Das Verhältnis Bcr-Abl wt zu Bcr-Abl mut ist damit annähernd beim initial transplantierten Verhältnis von 3:1 geblieben.

Abb. 17: Immunphänotypisierung von Blut-, Milz- und Knochenmarkszellen einer Maus mit MPS

Die Punktwolkendiagramme wurden wie in Kapitel 2.2.5.9 beschrieben ermittelt. Nach rechts ist die EGFP Expression aufgetragen. Auf der Y-Achse sind die Oberflächenmarker CD11b, B220 und Thy1.2 dargestellt. Die Zahlen bezeichnen den prozentualen Zellanteil im jeweiligen Quadranten.

In der ersten Diagrammreihe wurde der Anteil der CD11b positiven myeloiden Zellen ermittelt. Charakteristisch für ein MPS zeigt sich eine starke Expansion der myeloiden Zellreihe. Die roten Zahlen geben den Anteil der EGFP positiven und damit Bcr-Abl mut exprimierenden Zellen unter den myeloiden Zellen an.

In der mittleren und unteren Diagrammreihe wurde der Anteil der Zellen untersucht, die den Oberflächenmarker B220 und Thy1.2 tragen. Erwartungsgemäss wurde nur ein geringer Anteil an B-Zellen und T-Zellen in den verschiedenen Geweben ermittelt.



Die Verwendung von zahlreichen Knochenmarkszellen, die sich durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren während der Transduktion (siehe Kapitel 2.2.2.5) in verschiedenen Differenzierungsstadien befinden, führt zu einer polyklonalen sehr aggressiv verlaufende myeloproliferative Erkrankung. Der aggressive und schnelle Krankheitsverlauf der primär transplantierten Mäuse ließ keinen Vergleich des Wachstumsverhaltens zwischen der Bcr-Abl wt und der Bcr-Abl mut infizierten Zellpopulation zu. Um eine Oligo- oder sogar monoklonale Erkrankung mit einem annähernd chronischem Krankheitsverlauf zu induzieren, ist jedoch die Transplantation einer genauer definierten Menge von „leukemia-initiating cells“ notwendig. Deshalb wurden die Milz- und Knochenmarkszellen dieser primär transplantierten Mäuse für weitere Experimente verwendet.

3.2.3 *In-vitro* Vergleich des Wachstumsverhalten der Bcr-Abl Punktmutanten und des Bcr-Abl Wildtyps

In den folgenden Versuchen wurden Milzzellen von Mäusen eingesetzt, die wie oben beschrieben mit einer Mischung aus EGFP negativen Bcr-Abl wt und EGFP positiven Bcr-Abl T315I bzw. Y253H transformierten Zellen transplantiert worden waren. Zwei unabhängig transplantierte Mäuse wurden für jede Mutante analysiert. Der initiale durchschnittliche Anteil EGFP positiver Zellen lag für die Bcr-Abl T315I Mutante bei 15 und 18% und für die Bcr-Abl Y253H Mutante bei 17 und 26%.

3.2.3.1 Liquidassay

Für jede Mutante wurden die leukämischen Zellen von zwei Mäusen in BM-Medium ohne Wachstumsfaktoren mit ansteigenden Imatinibkonzentrationen (0, 0.25, 0.5, 1 μ M Imatinib) resuspendiert und als Dreifachansatz in 12-Loch-Zellkulturplatten ausplattiert (Kapitel 2.2.5.10.). Der Anteil EGFP positiver, Bcr-Abl mut transduzierter Zellen wurde in regelmäßigen Abständen mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Der prozentuale Anteil Bcr-Abl T315I/EGFP positiver Zellen stabilisierte sich in den Ansätzen ohne Imatinib nach einer Woche bei 20% EGFP positiven Zellen (Abb. 18 oben). Ähnliche Wachstumseigenschaften bestätigten sich für die Mischung aus Bcr-Abl wt und Bcr-Abl Y253H transduzierter Zellen. Der Anteil der Bcr-Abl Y253H/EGFP positiven Zellen zeigte anfänglich eine leichte Abnahme, stabilisierte sich jedoch dann ebenfalls bei etwa 20% (Abb. 18 unten).

Durch Zugabe von Imatinib zeigte sich eine deutliche Selektion der Bcr-Abl mut exprimierenden Zellpopulation. Wie in Abb. 18 oben zu sehen, führt bereits der Einsatz von 25 μ M Imatinib mit einem durchschnittlichen Anteil von 58 bis 75% zu einem starken Anstieg der Bcr-Abl T315I exprimierenden Zellpopulation. Die Erhöhung der Imatinibkonzentration auf 0.5 und 1 μ M lässt den Bcr-Abl T315I/EGFP positiven Zellanteil auf über 90% anwachsen.

Auch der Liquidassay mit der Mischung aus Bcr-Abl Y253H und Bcr-Abl wt transduzierter Zellen demonstriert bereits bei einer Konzentration von 0,25 μ M einen deutlichen Anstieg der Bcr-Abl Y253H/EGFP positiven Zellen auf etwa 60 bis 80% (Abb. 18 unten). Der Einsatz von 0,5 und 1 μ M Imatinib führt zu einem raschen Anwachsen der Bcr-Abl Y253H exprimierenden Zellen auf über 90%, wie die beiden oberen Kurven in Abb. 18 unten zeigen.

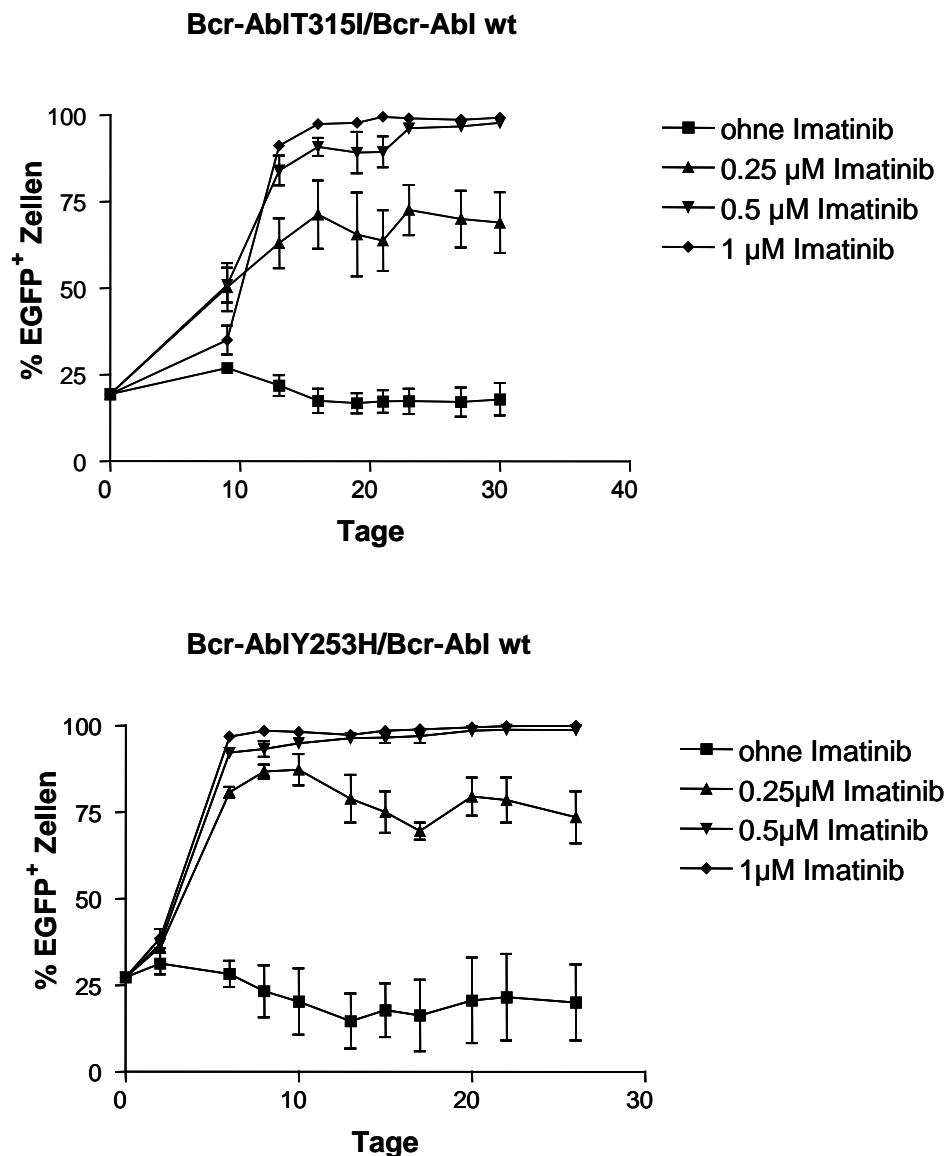


Abb. 18: Liquid-Transformations-Assay

Milzzellen von Mäusen, die mit einer Mischung aus EGFP⁻ Bcr-Abl wt und EGFP⁺ Bcr-Abl mit transformierten Zellen transplantiert worden waren, wurden in diesem Versuch eingesetzt. Der Versuch wurde mit den Zellen von zwei unabhängig transplantierten Mäusen als Dreifachansatz mit verschiedenen Imatinibkonzentrationen durchgeführt. Der Anteil EGFP⁺, Bcr-Abl exprimierender Zellen wurde in regelmässigen Abständen gemessen.

3.2.3.2 Methylzellulose-Assay

Für diesen Versuch wurden die Milzzellen von zwei unabhängig primär transplantierten Mäusen eingesetzt. Die Zellen wurden in dreifach Ansätzen in Methylzellulose ohne Wachstumsfaktoren mit ansteigenden Imatinibkonzentrationen (0, 0.25, 0.5, 1 μ M Imatinib) ausplattiert (Kapitel 2.2.5.10.). Nach 14 Tagen wurden die Kolonien pro Well gezählt, die einzelnen Kolonien wurden gepickt und der prozentuale Anteil Bcr-Abl mut/ EGFP positiver Kolonien mit dem FACScan bestimmt. Im Durchschnitt wurden für jede Platte und jede Imatinibkonzentration 20 Kolonien analysiert. Mit steigender Imatinibkonzentration nahm auch die Anzahl der Kolonien ab. Der Zusatz von Imatinib bewirkte, wie schon im Liquid

Assay beobachtet, eine starke Selektion der Bcr-Abl mut exprimierenden Zellpopulation (Abb. 19). Ohne Imatinib konnte, verglichen mit dem Ausgangswert, weder für Bcr-Abl T315I noch für Bcr-Abl Y253H eine signifikante Änderung im prozentualen Anteil EGFP positiver Zellen festgestellt werden.

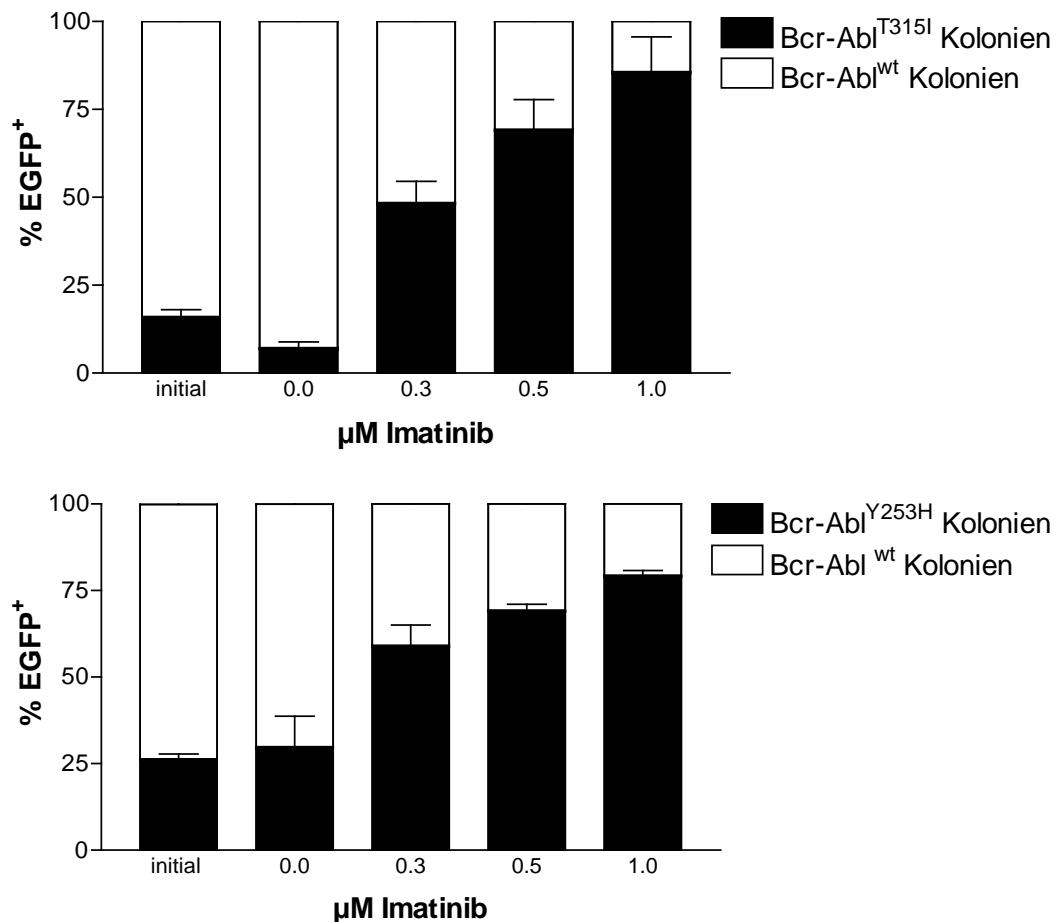


Abb. 19: Methylzelluloseassay

Milzzellen von Mäusen, die mit einer Mischung aus EGFP- Bcr-Abl wt und EGFP+ Bcr-Abl mut transformierten Zellen transplantiert worden waren, wurden in diesem Versuch eingesetzt. Der Versuch wurde mit den Zellen von zwei unabhängig transplantierten Mäusen als Dreifachansatz mit verschiedenen Imatinibkonzentrationen durchgeführt. Nach 14 tägiger Inkubation wurden die Kolonien gezählt und der Anteil der EGFP+/Bcr-Abl mut exprimierenden Kolonien mit dem Durchflusszytometer ermittelt.

Der direkte Vergleich der Bcr-Abl Punktmutanten mit Bcr-Abl Wildtyp zeigte in keinem der beiden *in-vitro* Assays einen Wachstumsvorteil für die Punktmutanten. Eine Imatinib abhängige Selektion der Bcr-Abl Punktmutanten wurde bereits bei geringen Konzentrationen des Inhibitors beobachtet.

3.2.4 *In-vivo* Vergleich des transformierenden Potentials der Bcr-Abl Punktmutanten und des Bcr-Abl Wildtyps

Der kompetitive Repopulationsassay hatte in den primären Transplantationsexperimenten keinen proliferativen Vorteil für die Bcr-Abl Punktmutanten aufzeigen können. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben führte die primäre Transplantation zu einer polyklonalen sehr aggressiv und schnell verlaufenden myeloproliferativen Erkrankung. Um eine genaue Anzahl von „leukemia-initiating cells“ (LICs) zu transplantieren und dadurch eine oligoklonale weniger aggressiv verlaufende Erkrankung zu induzieren wurden die Milzzellen der „primären“ Mäuse seriell transplantiert. Die serielle Transplantation, die auch zu einer längeren Überlebenszeit der Tiere führte, ermöglichte den direkten Vergleich des onkogenen Potentials von Bcr-Abl mut und Bcr-Abl wt *in vivo*.

3.2.4.1 Bcr-Abl T315I/Y253H transformierte Zellen zeigen im Vergleich mit Bcr-Abl wt Zellen keinen Wachstumsvorteil in seriell transplantierten Mäusen

Es wurden drei subletal bestrahlte Mäuse mit je 3×10^6 Milzzellen seriell transplantiert. Der Anteil EGFP/Bcr-Abl T315I positiver Zellen lag bei 25%. Die Mäuse entwickelten mit einer Latenzzeit von 10 bis 15 Tagen ein myeloproliferatives Syndrom und zeigten eine Überlebensdauer von durchschnittlich 21 Tagen. Wie bereits in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, wurden in regelmäßigen Abständen Blutbildanalysen, eine Immunphänotypisierung und die Messung der EGFP positiven Zellpopulation im peripheren Blut durchgeführt. Die Färbung mit den Antikörpern gegen CD11b, B220 und Thy1.2 zeigte im peripheren Blut der erkrankten Mäuse einen starken Anstieg der CD11b positiven myeloiden Zellen und nur sehr wenige B- und T-Lymphozyten. In Abb. 20a ist repräsentativ die durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes einer Maus der Bcr-Abl T315I Gruppe dargestellt. Die Punktwolkendiagramme zeigen im Verlauf eine Zunahme der CD11b positiven granulozytären Zellen. Dies bestätigt den myeloiden Charakter der Erkrankung. Nach rechts ist der Anteil der EGFP exprimierenden Zellen aufgetragen. Der im Endstadium der Erkrankung gemessene Wert von 15% EGFP/Bcr-AblT315I positiver Zellen zeigt bei der abgebildeten Maus im Vergleich zum initialen Wert eine leicht Abnahme der Bcr-Abl mut exprimierenden Zellen. Dies ist auch in Abb. 20b zu sehen, in der die Entwicklung der EGFP positiven Zellpopulation und die stark ansteigenden Leukozytenzahlen derselben Maus dargestellt sind. Eine Analyse der Bcr-Abl mut tragenden Zellpopulation der gesamten Mausgruppe ergab jedoch weder eine signifikante Zu- noch Abnahme des Bcr-Abl T315I exprimierenden Zellanteils. In keiner der analysierten Tiere konnte also ein Wachstumsvorteil der Bcr-Abl T315I gegenüber der Bcr-Abl wt transformierten leukämischen Zellen beobachtet werden. Dies bestätigt Abb. 20c. Dargestellt ist der durchschnittliche Wert der EGFP/Bcr-Abl T315I exprimierenden Zellen dieser Mausgruppe im Anfangs- und Endstadium der

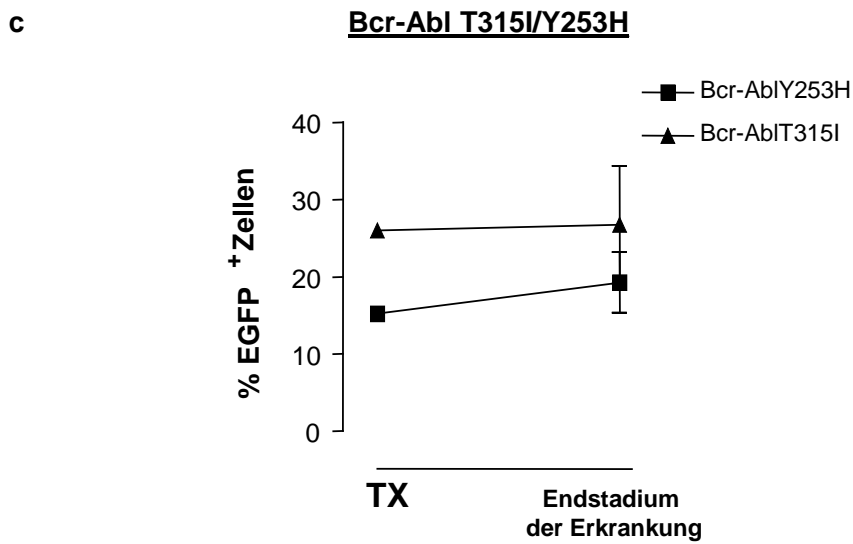
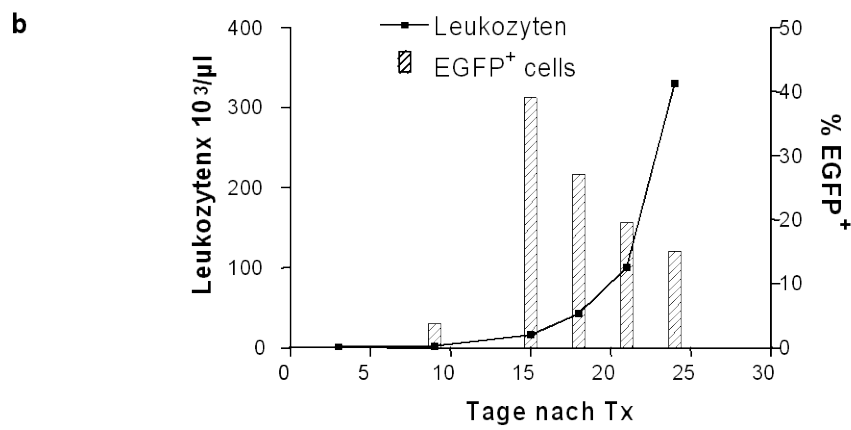
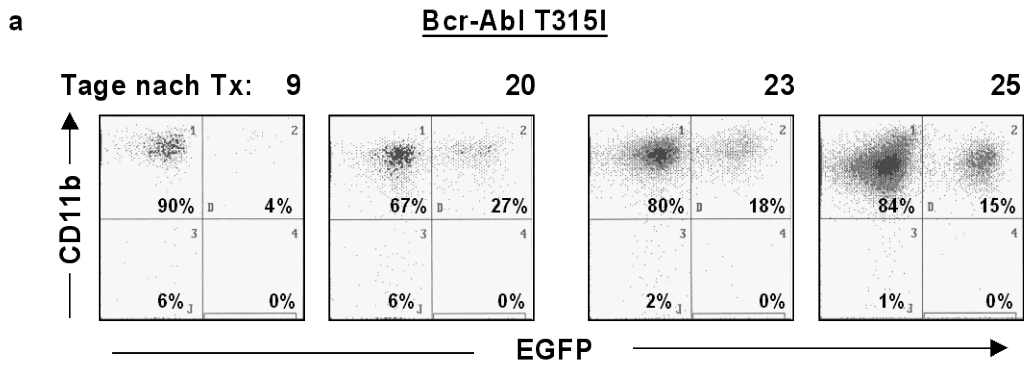
Erkrankung. Die Fraktion Bcr-Abl T315I/ EGFP positiver Zellen stabilisierte sich bei 25,7% und kommt dem Ausgangswert von 25% sehr nahe (Abb. 20c).

Zusammenfassend ergab die *in-vivo* Analyse der Bcr-Abl T315I Punktmutante in einem kompetitiven Repopulationsassay kein erhöhtes transformierendes Potential verglichen mit Bcr-Abl wt.

In einem nächsten Schritt wurden die onkogenen Eigenschaften der Bcr-Abl Y253H Mutante in unserem *in-vivo* Modell untersucht. Wieder wurde eine Mischung aus 3×10^6 Bcr-Abl wt und Bcr-Abl Y253H transformierten Milzzellen in 3 subletal bestrahlte Mäuse transplantiert. Der initiale Anteil der EGFP/Bcr-Abl Y253H tragenden Zellen betrug 15,2%. Die Empfängermäuse entwickelten innerhalb von 18-21 Tagen ein myeloproliferatives Syndrom. Der Verlauf der CML-ähnlichen Erkrankung und die Entwicklung der Bcr-Abl Y253H exprimierenden Zellpopulation wurde wie oben beschrieben anhand von Immunphänotypisierung, Blutbildanalysen, und EGFP Bestimmung verfolgt. In der Abb. 20 d und e sind am repräsentativen Beispiel einer Maus der Bcr-Abl Y253H Gruppe die Ergebnisse der durchgeführten Messungen dargestellt.

Abb. 20d zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Entwicklung der CD11b positiven Granulozyten und der EGFP positiven Zellen über mehrere Tage. Der steile Anstieg der Leukozytenzahlen und der prozentuale Anteil EGFP positiver Zellen ist in Abb. 20e abgebildet. Ähnlich wie bei den mit Bcr-Abl T315I transplantierten Mäusen zeigte sich, bezogen auf die gesamte Mausgruppe, kein signifikanter Anstieg des Anteils EGFP/Bcr-Abl Y253H exprimierender Zellen. Im Endstadium der Erkrankung wurde bei den Mäusen ein durchschnittlicher Wert von 19,6 % EGFP/Bcr-Abl Y253H positiver Zellen ermittelt (Abb. 20c). Verglichen mit dem Ausgangswert von 15,2 % EGFP/Bcr-Abl Y253H tragender Zellen, zeigt sich keine bedeutende Veränderung der Bcr-Abl Y253H exprimierenden Zellpopulation.

Die Daten unseres *in-vivo* Modells lassen ohne Zusatz von Imatinib keinen signifikanten Wachstumsvorteil der analysierten Bcr-Abl Punktmutanten gegenüber Bcr-Abl Wildtyp erkennen.



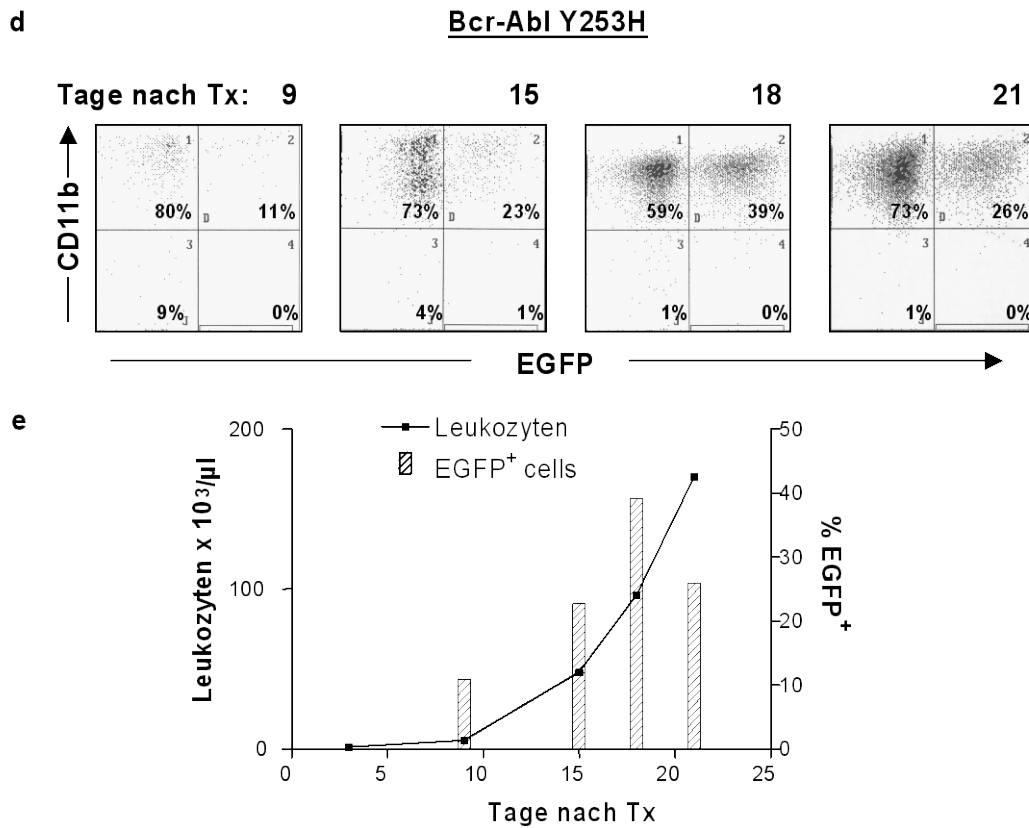


Abb. 20: Verlaufsanalyse der EGFP Expression und der Leukozytenentwicklung

a) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von peripheren Blut einer Maus, die mit einer Mischung aus EGFP⁻/Bcr-Abl wt und EGFP⁺/Bcr-Abl T315I infizierten Zellen seriell transplantiert worden war. Nach rechts ist die EGFP Expression aufgetragen, die im FL1 Kanal des Durchflusszytometer gemessen wird. CD11b-PE gefärbte Zellen werden im Kanal FL2 detektiert und sind nach oben aufgetragen. Der Zeitpunkt der Messung ist über den FACS Analysen in Tagen nach Transplantation angegeben.

b) Dieses Diagramm zeigt die Leukozytenkurve und die EGFP Fraktion der Maus aus a), die aus den Daten regelmäßiger Analysen des peripheren Blutes erstellt wurde. Die linke Y-Achse repräsentiert die Anzahl der Leukozyten und die rechte Y-Achse die relative EGFP Expression.

c) Relative EGFP Expression einer Gruppe von drei Mäusen die entweder mit Bcr-Abl T315I oder Bcr-Abl Y253H und Bcr-Abl wt transplantiert worden sind. Dargestellt ist die initiale Zellpopulation und die Population im Endstadium der Erkrankung.

d) Repräsentative durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes einer Maus, die mit einer Mischung aus EGFP⁻/Bcr-Abl wt und EGFP⁺/Bcr-Abl Y253H infizierten Zellen transplantiert worden war.

e) Darstellung der Leukozytenzahlen und der EGFP Expression der Maus aus d).

3.2.4.2 Selektion der Bcr-Abl Punktmutante T315I durch Imatinib

Die Zugabe von Imatinib hatte in den Zellkulturversuchen zu einer starken Selektion der Imatinib resistenten Bcr-Abl mut exprimierenden Zellpopulation geführt. In einem *in-vivo* Versuch wurde überprüft, ob auch im Mausmodell durch Imatinib der Bcr-Abl mut tragende Zellklon die Bcr-Abl wt Zellpopulation überwächst. Es wurden 3×10^6 Milzzellen in vier subletal bestrahlte Empfängermäuse transplantiert. Die Zellen stammten von einer primär transplantierten Maus die mit einer Mischung aus Bcr-Abl wt und Bcr-Abl T315I transduzierten Zellen transplantiert worden war. Der initiale Anteil EGFP⁺/Bcr-Abl T315I tragender Zellen betrug 15,8%. Eine Mausgruppe (n=2) wurde ab Tag eins nach

Transplantation zweimal am Tag mit 100mg/kg Imatinib behandelt. Die anderen beiden Mäuse blieben unbehandelt. Das Medikament Imatinib wurde wie in Kapitel 2.2.5.7 beschrieben über eine Venenverweilkanüle per os verabreicht. Der Verlauf der myeloproliferativen Erkrankung und die Entwicklung der Bcr-Abl T315I exprimierenden Zellfraktion wurden durch regelmässige FACScan Analysen des peripheren Blutes überwacht.

In Abb. 21a und b sind die Ergebnisse der Analysen einer Imatinib behandelten Maus dargestellt. Im Verlauf der Erkrankung ist ein starker Anstieg der EGFP exprimierenden Zellpopulation zu erkennen. Der starke Anstieg des Bcr-Abl tragenden Zellanteils ließ sich in beiden Imatinib behandelten Mäusen beobachten (siehe Abb. 21c). Die unbehandelten Mäuse zeigten wie schon in Kapitel 3.2.4.1, keine sichtbare Selektion für die Bcr-Abl T315I positiven Zellen siehe Abb. 21c

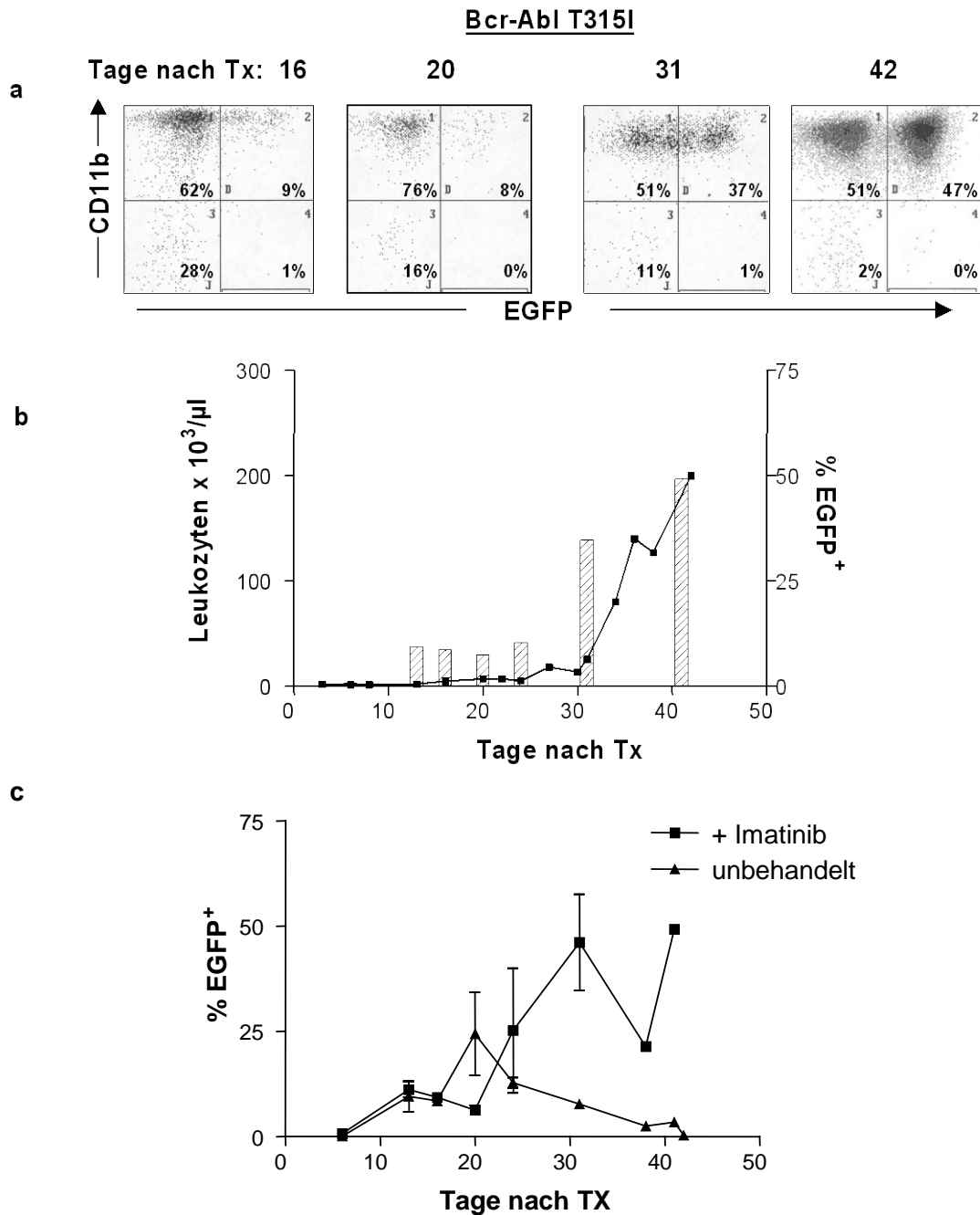


Abb. 21: Verlaufsanalyse der EGFP Expression un der Leukozytenentwicklung unter Imatinibtherapie

a) Durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes einer Maus, die seriell mit einer Mischung aus Bcr-T315I und Bcr-Abl wt infizierten Zellen transplantiert worden war. Die Maus wurde ab Tag 1 nach Transplantation zweimal täglich mit 100mg/kg Imatinib behandelt. Nach rechts ist die EGFP Expression, nach oben ist die Expression von CD11b-PE aufgetragen. Der Zeitpunkt der Analyse ist in Tagen nach Transplantation über dem FACS Fenster angegeben.

b) Das Diagramm zeigt die Leukozytenkurve und Säulen, die den Anteil der EGFP/Bcr-Abl T315I positiven Zellen der Maus aus a) über den gesamten Krankheitsverlauf darstellen.

c) Relative EGFP/Bcr-Abl T315I Expression in insgesamt vier Mäusen, die seriell transplantiert worden waren wie in a) beschrieben. Zwei dieser Mäuse wurden mit Imatinib behandelt und zwei blieben unbehandelt.

4 Diskussion

Die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase Bcr-Abl entsteht aus der reziproken Translokation t(9;22) und spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese Philadelphia positiver Leukämien. Die Entwicklung eines Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors stellt einen Meilenstein der molekularen Therapie bei Krebserkrankungen dar und ist Goldstandard bei der Therapie der CML als auch bei der Ph+ ALL (Druker et al., 2001a; Druker et al., 2001b). Während CML-Patienten in der chronischen Phase unter der Therapie mit dem Inhibitor Imatinib dauerhafte Remissionen zeigten, erlitten allerdings nahezu alle Patienten im fortgeschrittenen CML Stadium oder mit Ph+ ALL trotz weiterer Behandlung ein Rezidiv (von Bubnoff et al., 2003a). Die Mechanismen, die an der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib beteiligt sind, wurden bereits eingehend untersucht. Dabei wurden Punktmutationen in der Bcr-Abl Kinasedomäne, Bcr-Abl Amplifikation und klonale Evolution als die häufigsten Ursachen des Therapiversagens unter Imatinib ermittelt (Gorre et al., 2001; von Bubnoff et al., 2003a; von Bubnoff et al., 2002). Punktmutationen in der Abl-Kinase wurden in allen Stadien der CML beobachtet, sie treten jedoch gehäuft im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auf (Hochhaus and Hughes, 2004). Einige Untersuchungen zeigten, dass Punktmutanten bereits vor der Behandlung mit Imatinib existieren (Hofmann et al., 2003; Kreuzer et al., 2003; Roche-Lestienne et al., 2003). Außerdem gibt es bei Patienten mit P-loop Mutation Hinweise für eine schlechtere Prognose im Verlauf der Erkrankung (Branford et al., 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zumindest einigen Punktmutationen eine zusätzliche, Imatinib unabhängige Bedeutung zukommt. In biochemischen, Kristallstruktur- und Zellkultur Analysen ist die Auswirkung der meisten Punktmutationen auf die Imatinib-Antwort bereits untersucht worden (Azam et al., 2003b; Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2005). Hingegen konnte der Effekt dieser Mutationen auf die Aktivität der Bcr-Abl Kinase und den generellen Phänotyp der Erkrankung noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Die biologischen Aktivität dieser Mutationen stellt also noch immer ein kontrovers diskutiertes Thema dar (Grisworld et al., 2004; Roumiantsev et al., 2002; Yamamoto et al., 2004). In dieser Arbeit wurden zwei Bcr-Abl Punktmutanten, hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Kinaseaktivität und ihres transformierenden Potentials untersucht.

4.1 Untersuchung des Einflusses der Punktmutanten T315I und Y253H auf die Kinaseaktivität von Bcr-Abl im Zellmodell

Bcr-Abl Punktmutationen können bezüglich ihrer Lage innerhalb der Kinasedomäne in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe Kapitel 1.4). Abhängig von ihrer Lage weisen die Mutationen eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Imatinib auf (Shah et al., 2002).

Imatinib ist ein selektiver und sehr effektiver Wirkstoff, der in Konzentrationen von 0,1-1,0 μ M die Aktivität der nicht mutierten Abl Kinase inhibiert (Druker et al., 1996). Die Imatinibdosis zur Inhibition der Bcr-Abl Punktmutanten findet sich abhängig von der Mutation im Bereich des 3 bis 100-fachen. Klinischen Daten zufolge kommt den Mutationen in der Bcr-Abl Kinase neben der Imatinibresistenz möglicherweise eine weitere biologische Bedeutung zu. So ist eine Gruppe von Mutationen, die im Bereich des „ATP binding loop“ (P-loop) lokalisiert ist, in mehreren Publikationen mit einer schlechteren Überlebensdauer assoziiert (Branford et al., 2002; Soverini et al., 2005). Andere Gruppen konnten diese Assoziation allerdings nicht bestätigen (Jabbour et al., 2006; Pfeifer et al., 2007) Möglicherweise üben die verschiedenen Mutationsgruppen unterschiedlichen Einfluss auf die Kinaseaktivität von Bcr-Abl aus.

Für diese Arbeit wurden zwei Punktmutationen ausgewählt, die funktionell unterschiedliche Regionen der Kinasedomäne repräsentieren und häufig bei Patienten mit Rezidiv diagnostiziert werden. Die untersuchte Bcr-Abl Mutante T315I befindet sich an der Imatinibbindungsstelle und verhindert direkt und durch sterische Interferenz, die Bindung von Imatinib. Die auch als „gatekeeper“ bezeichnete Aminosäure Threonin an Position 315 ist die am häufigsten von einer Punktmutation betroffene Aminosäure bei Patienten mit Ph+ Leukämie (Azam et al., 2003a; Azam et al., 2008) und zeigt *in vivo* eine hochgradige Imatinibresistenz (Gorre et al., 2001). Die Punktmutation Y253H befindet sich in der Region des P-loops (nucleotide-binding loop) und beeinflusst den „induced-fit“ Mechanismus mit Imatinib. Tyrosin 253 bildet zwar nur eine schwache van der Waals Interaktion mit Imatinib aus, eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y253 und der Seitenkette von Asparagin 322 führt jedoch zu einer Faltung des P-loops und damit zu einer größeren Oberflächenkomplementarität mit Imatinib (Schindler et al., 2000).

4.1.1 Vergleich der Kinaseaktivität *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem *in vitro* Versuch der Einfluss der Bcr-Abl Punktmutationen T315I und Y253H auf die Kinaseaktivität von Bcr-Abl untersucht. Dazu wurde die Transphosphorylierung eines Substrates in einem Kinaseassay mit immunpräzipitiertem Bcr-Abl beobachtet. Als Substrat diente ein synthetisches Protein mit einer optimalen Abl-Phosphorylierungsstelle. Die Auswertung dieses Experiments ergab eine ähnliche Phosphorylierungskinetik für Bcr-Abl T315I und Bcr-Abl Y253H im Vergleich mit Bcr-Abl wt.

Bezüglich des Einflusses der Punktmutante T315I auf die Kinaseaktivität von Bcr-Abl gibt es in der Literatur kontroverse Daten. In einer von Corbin et al. veröffentlichten Arbeit wurde im Vergleich c-Abl Wildtyp mit c-Abl T315I *in vitro* eine leichte Abnahme der Kinaseaktivität von c-Abl T315I beschrieben. Für Abl T315I wurde eine Kinaseaktivität von 61% bestimmt, wobei die Kinaseaktivität des c-Abl Wildtyps mit 100% als Referenzwert galt (Corbin et al., 2002).

Die Autoren dieser Arbeit analysierten jedoch ein rekombinantes Gluthation S-Transferase Fusionsprotein, das aus Bakterien isoliert wurde und nur die Abl Kinase Domäne enthielt. Hingegen wurde in unserer Arbeit das gesamte Bcr-Abl Protein untersucht, das durch Immunpräzipitation aus einer murinen B-lymphoiden Zelllinie gewonnen worden war. Die Verwendung des gesamten Bcr-Abl Proteins könnte erklären, weshalb die Ergebnisse unseres Versuches keine Änderung der Bcr-Abl Kinaseaktivität durch die Punktmutation T315I aufzeigen.

Daten von Yamamoto et al. zeigen eine Zunahme der Kinaseaktivität der Bcr-Abl T315I Mutante. Als Substrat wurde in diesem Kinaseassay das Fusionsprotein GST-CrkL verwendet (Yamamoto et al., 2004). Die Autoren dieser Veröffentlichung haben jedoch ein Bcr-Abl Konstrukt verwendet, das nur ein kurzes Fragment von Bcr enthielt und direkt mit der SH3 Domäne von Abl fusioniert war. Dem gekürzten Bcr-Abl Konstrukt fehlte die N-terminale „cap“ Region, die vermutlich bei der Autoinhibition der Kinase mitwirkt sowie das coiled-coiled Motiv von Bcr, das die Dimerisierung von Bcr-Abl veranlasst (Nagar et al., 2003; Pluk et al., 2002). Es ist schwierig, die Ergebnisse dieser Arbeit zu interpretieren, da sich möglicherweise die Mechanismen der Kinaseaktivierung zwischen einem vollständigen und einem gekürzten Bcr-Abl Konstrukt unterscheiden.

Bezüglich der P-loop Mutation an Position 253 gibt es Untersuchungen, die eine gleichbleibende *in vitro* Kinaseaktivität unterstützen. Die Analyse der Punktmutation Y253F in einem Peptid-basierten Phosphorylierungsassay mit aufgereinigtem c-Abl zeigte eine c-Abl wt ähnliche Kinaseaktivität. Allerdings wurde eine zweite Mutationsvariante an Position Y253 verwendet, bei der die Aminosäure Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt ist (Roumiantsev et al., 2002). Außerdem wurde nicht die gesamte Bcr-Abl Kinase sondern nur c-Abl untersucht. Ein Vergleich der Kinaseaktivität mehrerer Punktmutationen unter Verwendung des gesamten immunpräzipitierten Bcr-Abl Proteins zeigte jedoch eine vergleichbare Substratphosphorylierung für Bcr-Abl wt und beide P-Loop Mutationen an Position Y253 (Skaggs et al., 2006).

4.1.2 Vergleich der Kinaseaktivität *in vivo*

Um auch die Auswirkung der Punktmutationen auf die Bcr-Abl Kinaseaktivität *in vivo* darzustellen, wurde die murine pre-B-Zelllinie Ba/F3 mit Bcr-Abl wt oder den Bcr-Abl Mutanten transformiert, und im Western Blot das Gesamtproteinphosphorylierungsmuster sowie die Autophosphorylierung von Bcr-Abl analysiert. In diesem *in vivo* Versuch konnten weder signifikante Unterschiede in der Bcr-Abl Autophosphorylierung noch in der Gesamtproteinphosphorylierung zwischen Bcr-Abl wt und Mutanten festgestellt werden. Die Bcr-Abl Punktmutanten führten also in unseren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen weder zu einer veränderten Substratspezifität noch zu einer erhöhten Kinaseaktivität von Bcr-Abl.

In einer von Azam et al. publizierten Arbeit wurde kürzlich die Aktivierung der Tyrosin Kinase c-Abl durch alleinige Mutation der sogenannten „gatekeeper“ Aminosäure Threonin gezeigt. Die dabei verwendete Mutationsvariante c-Abl T334I entspricht der Mutation T315I innerhalb der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Im Zellmodell zeigte c-Abl T334I zum einen ein ähnliches Phosphorylierungssignal wie die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase Bcr-Abl und zum anderen die Fähigkeit, die murine pre-B Zelllinie Ba/F3 zu faktorunabhängiger Proliferation zu transformieren. Darüber hinaus konnte auch im Mausmodell durch die Injektion von c-Abl T334I transfizierten Ba/F3 Zellen eine Leukämie induziert werden. Die Autoren gehen von einer durch die Mutation der Aminosäure Threonin unterstützte Stabilisierung des aktiven Status der Kinase und damit erhöhten Onkogenität aus. Aufgrund der hohen intrinsischen Aktivität der Bcr-Abl Kinase könnte es jedoch schwierig sein, eine erhöhte Kinaseaktivität auch für Bcr-Abl T315I zu bestätigen (Azam et al., 2008).

In der bereits in Kapitel 4.1.1 erwähnten Arbeit von Roumiantsev et al. wurde der Einfluss der Punktmutation Y253F auf die katalytische Aktivität von c-Abl nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* untersucht. Während die Mutante Y253F *in vitro* keine Zunahme der katalytischen Aktivität der c-Abl Kinase bewirkte, konnte im Zellmodell ein positiver Effekt dieser Mutation auf das transformierende Potential von c-Abl festgestellt werden. Vermutlich wird die Abl-Kinase zusätzlich durch die Bindung eines zellulären Inhibitors reguliert, der die Autophosphorylierung von Abl beeinflusst (Pendergast et al., 1991a; Walkenhorst et al., 1996; Wen and Van Etten, 1997). Hinsichtlich dieser Ergebnisse verhindert die Mutation Y253F nicht nur die Imatinibbindung, sondern stört möglicherweise auch die Bindung dieses negativen Regulatorproteins (Roumiantsev et al., 2002)

4.1.3 Auswirkung der Bcr-Abl Punktmutationen auf die Imatinibsensitivität *in vitro*

In dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Versuch zur Analyse der Gesamtproteinphosphorylierung wurde zusätzlich die Imatinibsensitivität der beiden Bcr-Abl Punktmutanten und des Bcr-Abl Wildtyps untersucht. Die mit den Bcr-Abl Konstrukten transformierten Ba/F3 Zellen wurden dazu mit ansteigenden Imatinibkonzentrationen (0; 1 und 5µM) inkubiert. Erwartungsgemäß zeigte sich im Western-Blot mit Anstieg der Imatinibkonzentration eine starke Abnahme des Phosphotyrosinsignals der Bcr-Abl wt Zellen. Die mit Bcr-Abl Y253H transformierten Zellen zeigten hingegen nur ein leichtes Ansprechen auf Imatinib und bei den Bcr-Abl T315I tragenden Zellen konnte keine Abnahme des Phosphotyrosinsignals festgestellt werden. Das gleichbleibende beziehungsweise nur gering abnehmende Phosphorylierungssignal vermittelt deutlich die anhaltende Aktivität der Tyrosinkinase und damit die erwartete Imatinibresistenz der Bcr-Abl Punktmutanten.

Hinsichtlich der Imatinibresistenz wurden von Roumiantsev et al. mit unseren Ergebnissen übereinstimmende Daten veröffentlicht. Dabei wurde die Imatinibsensitivität der Mutation

Y253F mit der Mutation T315I verglichen. Bcr-Abl Y253F zeigte im Vergleich mit Bcr-Abl wt deutliche Imatinibresistenz, konnte jedoch durch eine Steigerung der Imatinibkonzentration inhibiert werden. Hingegen verursachte Bcr-Abl T315I beinahe absolute Imatinibresistenz. Dies ist vermutlich auf die direkte sterische Interferenz mit Imatinib zurückzuführen (Roumiantsev et al., 2002).

4.2 Etablierung eines kompetitiven Knochenmark Repopulations-/Transformationsassay

Für die Untersuchung hämatologischer Neoplasien sind Mausmodelle ein wichtiger Bestandteil. So stammt der erste Beweis für die direkte Induktion myeloider und lymphoider Leukämien durch Bcr-Abl aus Studien mit transgenen Bcr-Abl Mäusen (Hariharan et al., 1989; Heisterkamp et al., 1990). Obwohl die Entwicklung transgener Mäuse, die Bcr-Abl exprimieren, ein gutes Modell darstellte, entwickelten viele dieser transgenen Mauslinien akute Leukämien ohne Hinweis auf eine myeloproliferative Erkrankung (Hariharan et al., 1989; Heisterkamp et al., 1990; Honda et al., 1995). Eine CML-ähnliche Erkrankung konnte erst durch die Transplantation letal bestrahlter Mäuse mit syngenen, retroviral mit Bcr-Abl transduzierten Knochenmarkzellen induziert werden. Die ersten Versuche führten mit einer sehr langen Latenzzeit bei etwa 25% der Tiere zu einem fatal verlaufenden myeloproliferativen Syndrom (Daley et al., 1990). Mittlerweile wurde das Originalprotokoll modifiziert und beinahe 100% der Mäuse entwickeln etwa vier Wochen nach Transplantation eine myeloproliferative Erkrankung (Li et al., 1999; Pear et al., 1998; Zhang and Ren, 1998). Dieses retrovirale Knochenmarktransplantationsmodell führt bei den transplantierten Empfängermäusen zu einer myeloproliferativen Erkrankung, die in vielen Aspekten der menschlichen Erkrankung sehr ähnlich ist.

Bisher wurde jedoch noch kein Tiermodell beschrieben, das die Untersuchung von Bcr-Abl Punktmutanten *in vivo* ermöglichte. Basierend auf dem murinen Knochenmarktransplantationsmodell, wurde in dieser Arbeit ein kompetitiver Knochenmark Repopulations Assay etabliert. Mit diesem Assay konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Wachstums- und transformierende Potential der beiden Punktmutanten direkt mit Bcr-Abl Wildtyp verglichen werden. Essentielle Voraussetzung für diesen Assay war die Unterscheidung zwischen Bcr-Abl mut und Bcr-Abl wt exprimierenden Zellen. Dazu wurden die Bcr-Abl Punktmutanten über den EGFP tragenden MigR1 Vektor exprimiert und somit durch die Koexpression von EGFP markiert. Bcr-Abl Wildtyp hingegen wurde in den EGFP negativen MSCV Vektor kloniert. Durchflusszytometrische Messungen erlaubten die Detektion der EGFP positiven, Bcr-Abl mut exprimierenden Zellen. Nach dem Protokoll des murinen retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell wurden Knochenmarkzellen mit

Bcr-Abl wt, Bcr-Abl T315I oder Bcr-Abl Y253H transduziert. Anschließend wurden die EGFP negativen Bcr-Abl wt exprimierenden Knochenmarkzellen in einem bestimmten Verhältnis mit EGFP positiven Bcr-Abl T315I oder Y253H tragenden Zellen vermischt und in myeloablative bestrahlte Mäuse transplantiert. Die Transplantation einer Mischung aus Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut infizierter Stammzellen führte zu einer kompetitiven Repopulation in den Empfängerermäusen. Durchflusszytometrische Messungen ermöglichten eine Analyse der EGFP exprimierenden Zellpopulation und damit die Gegenüberstellung des Wachstumsverhaltens und der biologischen Aktivität von Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut. Da die primär transplantierten Mäuse sehr rasch an einer polyklonalen sehr aggressiv verlaufenden myeloproliferativen Erkrankung verstarben, war eine genaue Analyse des transformierenden Potentials der Punktmutanten nicht möglich. Um jedoch für weitere Versuche mit einer genaueren Anzahl von „leukemia-initiating cells“ zu arbeiten, wurden leukämische Zellen aus Milz und Knochenmark dieser Mäuse für weitere Experimente verwendet.

4.2.1 Untersuchung der transformierenden Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten T315I und Y253H *in vitro*

In einer von Jiang et al. veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl transformierte primäre murine Knochenmarkzellen in einem nur mit FCS supplementierten IMDM Medium proliferieren und in einem Medium mit Methylzellulose ohne Wachstumsfaktoren Kolonien bilden (Jiang et al., 2003). In unserer Arbeit untersuchten wir ebenfalls Bcr-Abl transformierte leukämische Zellen in einem Liquid- und Methylzelluloseassay. Unser Ziel war die *in vitro* Analyse der biologischen Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten verglichen mit Bcr-Abl wt. Die leukämischen Zellen stammten von primär transplantierten Mäusen, die wie in Kapitel 4.2 beschrieben mit einer Mischung aus EGFP negativen Bcr-Abl wt und EGFP positiven Bcr-Abl T315I bzw. Y253H transformierten Zellen transplantiert worden waren. Interessanterweise konnten wir in den beiden Versuchen keinen Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen Bcr-Abl wt und Bcr-Abl mut transformierten Zellen feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die beiden analysierten Mutanten in diesen beiden Assays keinen signifikanten Einfluss auf das transformierende Potential von Bcr-Abl ausübten.

Um die Auswirkung von Imatinib auf die Bcr-Abl Punktmutanten zu beobachten, wurden in unserer Arbeit die beiden zuletzt beschriebenen *in vitro* Experimente mit ansteigenden Imatinibkonzentrationen ausgeführt. Wie erwartet führte die Zugabe von Imatinib zu einer Selektion der Bcr-Abl mut tragenden Zellen. Die Selektion war in einer dosis abhängigen Weise sowohl im Methylzellulose- als auch im Liquid Transformations Assay zu beobachten. Diese Daten unterstreichen die Rolle dieser Mutationen in der Resistenzentwicklung. Zugleich demonstrieren sie aber auch die Fähigkeit unseres Assays, Unterschiede in der proliferativen Kapazität der beiden Populationen zu detektieren.

In einer kürzlich von Griswold et al. veröffentlichten Arbeit wurde das transformierende Potential von fünf Bcr-Abl Punktmutationen mit Bcr-Abl wt verglichen. Für die Punktmutante T315I wurde ein unverändertes oder etwas geringeres und für die Mutante Y253F ein erhöhtes transformierendes Potential im Vergleich mit Bcr-Abl wt bestimmt. Zu diesem Ergebnis führte die zusammenfassende Auswertung mehrerer Versuche, die mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurden. Die einzelnen Versuche dieser Arbeit weisen jedoch kein einheitliches Ergebnis bezüglich des transformierenden Potentials der Punktmutanten auf. So zeigte die Untersuchung von retroviral infizierten primären murinen myeloiden Progenitorzellen übereinstimmend mit unseren Ergebnissen kein signifikant erhöhtes transformierendes Potential für die P-loop Mutation 253. Darüberhinaus wurden bei unseren *in vitro* Versuchen leukämische Zellen aus primär transplantierten Mäusen verwendet, während die Gruppe um Griswold et al. ihre Experimente mit retroviral infizierten Zellen durchführte. Damit entsprechen diese Versuche weniger den Verhältnissen im lebenden Organismus und erschweren eine Gegenüberstellung mit unseren Daten. Zusätzlich wurden die *in vitro* Ergebnisse von Griswold et al. nicht in einem geeigneten Mausmodell verifiziert. Wie in Kapitel 4.2.2 genauer beschrieben, wurden die Punktmutationen in einem CML Transduktions/Transplantationsmodell nur durch Analyse der Überlebensdauer der Mäuse miteinander verglichen.

4.2.2 Untersuchung der transformierenden Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten T315I und Y253H *in vivo*

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten im Mausmodell wurden Bcr-Abl transformierte Zellen seriell in subletal bestrahlte Mäuse transplantiert. Für die Transplantation wurden Milzzellen der primären Mäuse verwendet, die mit einer Mischung aus Bcr-Abl wt und Bcr-Abl T315I beziehungsweise Y253H transformierter Zellen transplantierten worden waren (siehe Kapitel 4.2). Ziel der seriellen Transplantation war es den Mäusen eine genauer definierte Anzahl „leukemia-initiating cells“ zu injizieren. Wie erwartet, entwickelten beide Mausgruppen eine myeloproliferative Erkrankung. Aufgrund eines weniger aggressiven Krankheitsverlaufs konnten diese Tiere jedoch über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Dadurch war eine aussagekräftigere Analyse der biologischen Aktivität der Punktmutanten möglich als bei der primär transplantierten Mausgruppe. Die Fraktion der EGFP positiven, Bcr-Abl mut exprimierenden Zellfraktion wurde in regelmäßigen Abständen über die gesamte Krankheitsdauer analysiert. Sowohl die Bcr-Abl T315I als auch die Bcr-Abl Y253H exprimierende Zellpopulation zeigte im Vergleich zum Ausgangswert einen stabilen Verlauf. Diese Daten sprechen gegen einen selektiven Vorteil einer der beiden Mutanten aufgrund eines erhöhten transformierenden Potentials.

Um zu demonstrieren, dass auch *in vivo* durch die Zugabe von Imatinib die Bcr-Abl mut exprimierende Zellpopulation den Bcr-Abl wt tragenden Zellklon überwächst, wurde in dieser Arbeit eine dritte Mausgruppe mit Imatinib behandelt. Diese Mäuse waren seriell mit Milzzellen der Bcr-Abl T315I Mausgruppe transplantiert worden. Erwartungsgemäß führte die Imatinibbehandlung zu einer deutlichen Selektion der Imatinib resistenten Bcr-Abl T315I exprimierenden Zellen.

Wie bereits in Kapitel 4.2.1 erwähnt, wurden von der Arbeitsgruppe Griswold et al. einige Bcr-Abl Punktmutationen ebenfalls in einem CML Transduktions/Transplantationsmodell untersucht. Jedoch wurde kein direkter kompetitiver Vergleich von Bcr-Abl wt mit Bcr-Abl mut durchgeführt. Die Mäuse wurden entweder mit Bcr-Abl wt oder Bcr-Abl mut transformierten Zellen transplantiert und Unterschiede in der Latenzzeit und der Überlebensdauer analysiert. Bezüglich dieser Kriterien zeigten die Punktmutanten T315I und Y253F in der Arbeit von Griswold keine Unterschiede auf (Griswold et al., 2006). Da es sich nicht um einen direkten kompetitiven Vergleich von Bcr-Abl wt mit Bcr-Abl mut handelt und die Erkrankung im murinen CML Modell sehr schnell und aggressiv verläuft, sind diese Ergebnisse nicht sehr aussagekräftig. Eine Interpretation dieser *in-vivo* Daten von Griswold et al. würde jedoch auf ein ähnliches transformierendes Potential für Bcr-Abl wt und Bcr-Abl Punktmutanten hinweisen. Somit würden die *in vivo* Ergebnisse nicht mit der Auswertung der *in-vitro* Daten übereinstimmen, die für die Punktmutante Y253F ein erhöhtes transformierendes Potential zeigten (Kapitel 4.2.1) (Griswold et al., 2006).

Zusammenfassend wurde in unseren Ergebnissen unter der Behandlung mit Imatinib sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Selektion der beiden Punktmutationen Bcr-Abl T315I und Bcr-Abl Y253H festgestellt. Diese Daten unterstützen die Rolle der Punktmutationen bei der Resistenzentwicklung.

Andererseits konnten wir ohne Imatinib weder eine Selektion von Bcr-Abl T315I noch von Bcr-Abl Y253H beobachten. Vermutlich haben also die Mutationen keine stärkere Auswirkung auf das transformierende Potential von Bcr-Abl. Dies bestätigt auch die Tatsache, dass bisher weder in unbehandelten Bcr-Abl exprimierenden Zelllinien noch in unbehandelten CML oder Ph+ ALL Patienten eine größere Fraktion leukämischer Zellen mit diesen Punktmutationen gefunden wurde (Kreuzer et al., 2003; Roche-Lestienne et al., 2003; Willis et al., 2005).

Jedoch wurde in früheren Arbeiten die positive oder negative Selektion leukämischer Klone mit einer Punktmutation in der Bcr-Abl Kinase ohne Imatinibbehandlung beschrieben (Kreuzer et al., 2003; Willis et al., 2005). Eine Erklärung dafür könnten sekundäre genetische Ereignisse sein, die die Wachstumseigenschaften leukämischer Zellen beeinflussen. Demnach könnten zelluläre Anpassungsvorgänge wie zusätzliche Mutationen, Bcr-Abl

Amplifikation, immunologische „escape“ Mechanismen oder andere Aberrationen zu einem Proliferationsvorteil des leukämischen Klon führen. Auch die schlechtere klinische Prognose bei Patienten mit Mutationen im P-Loop (Branford et al., 2003) könnte durch zusätzliche Mutationen erklärt werden. Eine sekundäre Mutation z.B. im Ras Protein könnte den Krankheitsverlauf beschleunigen und eine erhöhte transformierende Aktivität des mutierten Bcr-Abl Klon vortäuschen.

Klinisch haben diese Ergebnisse eine wichtige Bedeutung für die Therapie der Imatinib resistenten CML. Wie bereits von Hochhaus et al. beschrieben ist das Absetzen der Imatinibtherapie die wichtigste Maßnahme, um die klonale Selektion der resistenten Zellen zu beenden (Hochhaus et al., 2006). Unseren Experimenten zufolge, wäre bei einer Imatinib vermittelten Selektion der Punktmutanten T315I oder Y253H der Wachstumsvorteil durch das Absetzen von Imatinib beendet, da diese Mutanten kein erhöhtes onkogenes Potential aufweisen. Als Secondline-Therapie bei Imatinibresistenz oder – unverträglichkeit ist mittlerweile der Einsatz von Zweitgeneration-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Nilotinib (AMN107) und Dasatinib (BMS-354825) indiziert (Cortes et al., 2008; le Coutre et al., 2008). Diese Inhibitoren zeigen eine höhere Bcr-Abl Selektivität und Wirksamkeit bei Bcr-Abl Mutationen (Hochhaus et al., 2006). Ein Problem bleibt jedoch die hochresistente Mutation T315I, die auch durch Zweitgeneration Inhibitoren nicht effektiv behandelt werden kann. Zahlreiche Drittgeneration-Inhibitoren wurden bereits für eine mögliche Behandlung der T315I Mutante entwickelt. Zu erwähnen sind die Aurora Kinase Inhibitoren MK 0457 (VX-680) und PHA-739358 deren klinische Aktivität bereits in Phase I Studien getestet wurde (Giles et al., 2007; Gontarewicz et al., 2008; Young et al., 2006). Diese neu entwickelten Medikamente lassen zusammen mit der Kenntnis über das onkogene Potential der Punktmutationen, die Entwicklung individuell auf den Patienten abgestimmter Therapieschemata erwarten. Vergleichbar mit dem Konzept der HIV Therapie hat bereits in präklinischen Studien die synergistische Kombination neuer Inhibitoren Vorteile bei der Prävention oder Bekämpfung von Resistenzen angedeutet (Melo and Chuah, 2007).

In Zukunft sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, um genauere Information über die Auswirkung der Bcr-Abl Punktmutationen auf den Krankheitsverlauf der CML und der Ph+ ALL zu gewinnen und so eine Optimierung der Behandlung zu erreichen.

5 Zusammenfassung

Die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase Bcr-Abl ist das Fusionsprodukt der reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, bekannt als Philadelphia-Chromosom. Das Onkogen Bcr-Abl spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der CML und bei etwa 20% der ALL im Erwachsenenalter (Faderl et al., 1999; Pui et al., 2004). Mit dem Abl-Kinase Inhibitor Imatinib, steht seit wenigen Jahren ein relativ tumorzellenspezifischer Wirkstoff zur Verfügung, der die Therapie der Ph⁺ Leukämien signifikant beeinflusste (Druker et al., 2001a; Druker et al., 2001b). Während die meisten Patienten mit CML in der chronischen Phase dauerhaft auf Imatinib ansprechen, erleiden nahezu alle Patienten in fortgeschrittenen CML Stadien oder mit Ph⁺ ALL trotz fortgeführter Therapie ein Rezidiv (Ottmann et al., 2002). Punktmutationen in der Bcr-Abl Kinase zählen zu den wichtigsten Mechanismen, die zu einem Therapieversagen mit Imatinib führen. Zahlreiche Untersuchungen im Zellmodell, Kristallstrukturanalysen sowie klinische Daten haben die wichtige Rolle der Punktmutationen bei der Entwicklung der Imatinibresistenz bestätigt. Die Auswirkung dieser Mutationen auf das onkogene Potential von Bcr-Abl und den klinischen Krankheitsverlauf ohne Imatinibbehandlung wurde bisher noch nicht genauer untersucht.

In dieser Arbeit wurde der Effekt der P-loop Mutation Y253H und der hochgradig resistenzvermittelnden Mutation T315I auf die Kinaseaktivität *in vitro* und das transformierende Potential von Bcr-Abl *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Wir konnten zeigen, dass immunpräzipitiertes Bcr-Abl Y253H und Bcr-Abl T315I Protein eine mit Bcr-Abl Wildtyp vergleichbare *in vitro* Kinaseaktivität aufweist. Auch die *in vivo* Analyse der Bcr-Abl Autophosphorylierung und des Gesamtproteinphosphorylierungsmusters zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Bcr-Abl Y253H bzw. T315I transformierten Zellen und Bcr-Abl wt exprimierenden Zellen.

Um die transformierende Aktivität der Bcr-Abl Punktmutanten direkt mit Bcr-Abl Wildtyp zu vergleichen, etablierten wir einen kompetitiven Repopulations Assay, der auf dem murinen CML Transplantations Modell basierte. Dieser Assay ermöglichte zum einen den direkten Vergleich der proliferativen Kapazität von Bcr-Abl Mutanten und Bcr-Abl Wildtyp in murinen primären Knochenmarkzellen *in vitro* und zum anderen die *in vivo* Analyse im CML Mausmodell. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ohne Imatinib weder Bcr-Abl T315I noch Bcr-Abl Y253H exprimierende Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber Bcr-Abl wt aufweisen. Die Behandlung mit Imatinib führte erwartungsgemäß *in vitro* und *in vivo* zu einer Selektion der Bcr-Abl mut tragenden Leukämiezellen.

Demnach führen die in dieser Arbeit untersuchten Bcr-Abl Punktmutationen zu Imatinibresistenz, induzieren aber ohne Imatinib keinen Wachstumsvorteil gegenüber Bcr-Abl Wildtyp.

Klinisch unterstützen diese Daten die aktuellen Therapiempfehlungen bei Imatinibresistenter CML, die eine Beendigung der Imatinibtherapie und die Umstellung auf einen Zweitgeneration-Tyrosinkinaseinhibitor empfehlen. Da die von uns untersuchten Mutanten Bcr-Abl T315I und Y253H keinen Wachstumsvorteil gegenüber Bcr-Abl wt besitzen, würde bereits das Absetzen von Imatinib die klonale Selektion der resistenten Zellen beenden. Während der neue bereits zugelassene Inhibitor Dasatinib auch P-loop Mutationen wie Y253H hemmt ist im Falle der hochgradig resistenzvermittelnden Mutante T315I die Behandlung mit Drittgeneration-Inhibitoren zu erwägen. In Zukunft sind weitere Untersuchungen nötig, um genauere Kenntnisse über die Auswirkung der Bcr-Abl Punktmutationen auf den Krankheitsverlauf der Ph+ ALL oder CML zu erlangen und so eine Therapieoptimierung der Ph+ Leukämien zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Arcasoy, S.M., Latoche, J.D., Gondor, M., Pitt, B.R., and Pilewski, J.M. (1997). Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* 4, 32-38.

Azam, M., Latek, R.R., and Daley, G.Q. (2003a). Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112, 831-843.

Azam, M., Raz, T., Nardi, V., Opitz, S.L., and Daley, G.Q. (2003b). A screen to identify drug resistant variants to target-directed anti-cancer agents. *Biol Proced Online* 5, 204-210.

Azam, M., Seeliger, M.A., Gray, N.S., Kuriyan, J., and Daley, G.Q. (2008). Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1109-1118.

Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R. and Hehlmann, R. (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108, 1809-1820.

Birchenall-Roberts, M.C., Yoo, Y.D., Bertolette, D.C., 3rd, Lee, K.H., Turley, J.M., Bang, O.S., Ruscetti, F.W., and Kim, S.J. (1997). The p120-v-Abl protein interacts with E2F-1 and regulates E2F-1 transcriptional activity. *J Biol Chem* 272, 8905-8911.

Boisguerin, P., Leben, R., Ay, B., Radziwill, G., Moelling, K., Dong, L., and Volkmer-Engert, R. (2004). An improved method for the synthesis of cellulose membrane-bound peptides with free C termini is useful for PDZ domain binding studies. *Chem Biol* 11, 449-459.

Bortin, M.M., D'Amaro, J., Bach, F.H., Rimm, A.A., and van Rood, J.J. (1987). HLA associations with leukemia. *Blood* 70, 227-232.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Grigg, A., Arthur, C., Taylor, K., Herrmann, R., Lynch, K.P., and Hughes, T.P. (2002). High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99, 3472-3475.

Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J.F., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., and Hughes, T. (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102, 276-283.

Brazil, D.P., Yang, Z.Z., and Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.

Buchdunger, E., Cioffi, C.L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B.J., and Lydon, N.B. (2000). 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, 139-145.

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

Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761-1767.

Burton, E.A., Plattner, R., and Pendergast, A.M. (2003). Abl tyrosine kinases are required for infection by *Shigella flexneri*. *Embo J* 22, 5471-5479.

Carlesso, N., Frank, D.A., and Griffin, J.D. (1996). 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, 811-820.

Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A., and McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590-603.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Chopra, R., Pu, Q.Q., and Elefanty, A.G. (1999). Biology of BCR-ABL. *Blood Rev* 13, 211-229.

Clark, S.S., McLaughlin, J., Crist, W.M., Champlin, R., and Witte, O.N. (1987). Unique forms of the abl tyrosine kinase distinguish Ph1-positive CML from Ph1-positive ALL. *Science* 235, 85-88.

Coffman, R.L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev* 69, 5-23.

Conti, C., Mastromarino, P., Riccioli, A., and Orsi, N. (1991). Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. *Res Virol* 142, 17-24.

Corbin, A.S., Buchdunger, E., Pascal, F., and Druker, B.J. (2002). Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J Biol Chem* 277, 32214-32219.

Cortes, J., Kim, D.W., Raffoux, E., Martinelli, G., Ritchie, E., Roy, L., Coutre, S., Corm, S., Hamerschlak, N., Tang, J.L., Hochhaus, A., Houry, H. J., Brummendorf, T. H., Michallet, M., Rege-Cambrin, G., Gambacorti-Passerini, C., Radich, J. P., Ernst, T., Zhu, C., Van Tornout, J. M., and Talpaz, M. (2008). Efficacy and safety of dasatinib in imatinib-resistant or -intolerant patients with chronic myeloid leukemia in blast phase. *Leukemia* 22, 2176-2183.

Cortes, J.E., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S., Rios, M.B., Shan, J., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Thomas, D.A., Wierda, W., Ferrajoli, A., Jeha, S., and Kantarjian, H. M. (2003). Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 101, 3794-3800.

Cortez, D., Reuther, G., and Pendergast, A.M. (1997). The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 2333-2342.

Cortez, J.E., Talpaz, M., and Kantarjian, H. (1996). Chronic myelogenous leukemia: a review. *Am J Med* 100, 555-570.

Coyne, C.B., and Bergelson, J.M. (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119-131.

Daley, G.Q., and Baltimore, D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9312-9316.

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824-830.

Davis, R.L., Konopka, J.B., and Witte, O.N. (1985). Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. *Mol Cell Biol* 5, 204-213.

Deininger, M.W., Goldman, J.M., Lydon, N., and Melo, J.V. (1997). The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 90, 3691-3698.

Di Bacco, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., and Cotter, T.G. (2000). Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 5, 405-415.

Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351, 400-402.

Donato, N.J., Wu, J.Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., and Talpaz, M. (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101, 690-698.

Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15, 177-182.

Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., and Larson, R. A. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355, 2408-2417.

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

Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001a). 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**, 1038-1042.

Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., and Sawyers, C. L. (2001b). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**, 1031-1037.

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

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

Fialkow, P.J., Jacobson, R.J., and Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* **63**, 125-130.

Fleming, T.J., Fleming, M.L., and Malek, T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* **151**, 2399-2408.

Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**, 481-507.

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., and D'Incalci, M. (2000). 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**, 1641-1650.

Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G.M., Belotti, D., Pogliani, E. and Lydon, N. B. (1997). Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* **23**, 380-394.

Gambacorti-Passerini, C.B., Gunby, R.H., Piazza, R., Galiotta, A., Rostagno, R., and Scapozza, L. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. **4**, 75-85.

Geay, J.F., Buet, D., Zhang, Y., Foudi, A., Jarrier, P., Berthebaud, M., Turhan, A.G., Vainchenker, W., and Louache, F. (2005). p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression. *Cancer Res* **65**, 2676-2683.

Gibbs, J.B., Schaber, M.D., Garsky, V.M., Vogel, U.S., Scolnick, E.M., Dixon, R.A., and Marshall, M.S. (1990). Structure/function relationships of ras and guanosine triphosphatase-activating protein. *Soc Gen Physiol Ser* **45**, 77-85.

Giles, F.J., Cortes, J., Jones, D., Bergstrom, D., Kantarjian, H., and Freedman, S.J. (2007). MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 109, 500-502.

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

Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *349*, 1451-1464.

Gontarewicz, A., Balabanov, S., Keller, G., Panse, J., Schafhausen, P., Bokemeyer, C., Fiedler, W., Moll, J., and Brummendorf, T.H. (2008). PHA-680626 exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic activity on Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cell lines and primary CD34+ cells by inhibition of both Bcr-Abl tyrosine kinase and Aurora kinases. *Leuk Res* 32, 1857-1865.

Gordon, M.Y., Dowding, C.R., Riley, G.P., Goldman, J.M., and Greaves, M.F. (1987). Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 328, 342-344.

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

Griswold, I.J., MacPartlin, M., Bumm, T., Goss, V.L., O'Hare, T., Lee, K.A., Corbin, A.S., Stoffregen, E.P., Smith, C., Johnson, K., Moseson, E. M., Wood, L. J., Polakiewicz, R. D., Druker, B. J. and Deininger, M. W. (2006). Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol* 26, 6082-6093.

Grisworld, I.J., Bumm, T., O'Hare, T., Moseson, E.M., Druker, B.J., and Deininger, M.W. (2004). Investigation of the Biological Differences between Bcr-Abl Kinase Mutations Resistant to Imatinib. *Blood Vol 104*, Abstract #555.

Gulick, R.M. (2002). Structured treatment interruption in patients infected with HIV: a new approach to therapy. *Drugs* 62, 245-253.

Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., and Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112, 845-857.

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

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

Hathcock, K.S., Hirano, H., Murakami, S., and Hodes, R.J. (1992). CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells. *J Immunol* 149, 2286-2294.

- Heinrich, M.C., Griffith, D.J., Druker, B.J., Wait, C.L., Ott, K.A., and Zigler, A.J. (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 96, 925-932.
- Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P.K., and Groffen, J. (1990). Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344, 251-253.
- Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Anderson, K.C. (2004). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104, 607-618.
- Hochhaus, A., and Hughes, T. (2004). Clinical resistance to imatinib: mechanisms and implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 18, 641-656, ix.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A., La Rosee, P., Lahaye, T., Berger, U., Cross, N.C., Linkesch, W., Druker, B.J., Hehlmann, R., Gambacorti- Passerini, C., Corneo, G. and D'Incalci, M. (2001). Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293, 2163.
- Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A.S., La Rosee, P., Muller, M.C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N.C., Berger, U., Gschaidmeier, H., Druker, B. J. and Hehlmann, R (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190-2196.
- Hochhaus, A., Fischer Th., and Beelen D.W. (2006). Chronische myeloische Leukämie (CML). Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie.
- Hofmann, W.K., Komor, M., Wassmann, B., Jones, L.C., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D., Koeffler, H.P., and Ottmann, O.G. (2003). Presence of the BCR-ABL mutation Glu255Lys prior to STI571 (imatinib) treatment in patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 102, 659-661.
- Honda, H., Fujii, T., Takatoku, M., Mano, H., Witte, O.N., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1995). Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice. *Blood* 85, 2853-2861.
- Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods Enzymol* 200, 3-37.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.
- Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Talpaz, M., Bekele, N., O'Brien, S., Zhou, X., Luthra, R., Garcia-Manero, G., Giles, F., Rios, M. B., Verstovsek, S., and Cortes, J. (2006). Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 20, 1767-1773.
- Jain, S.K., Susa, M., Keeler, M.L., Carlesso, N., Druker, B., and Varticovski, L. (1996). PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85 SH2 domains with p210 BCR/abl. *Blood* 88, 1542-1550.
- Jiang, X., Stuible, M., Chalandon, Y., Li, A., Chan, W.Y., Eisterer, W., Krystal, G., Eaves, A., and Eaves, C. (2003). Evidence for a positive role of SHIP in the BCR-ABL-mediated transformation of primitive murine hematopoietic cells and in human chronic myeloid leukemia. *Blood* 102, 2976-2984.

Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85, 149-158.

Jun, J.H., and Schindler, C.W. (2000). Dextromethorphan alters methamphetamine self-administration in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 405-409.

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., Goldman, J., O'Brien, S. G., Russell, N., Fischer, T., Ottmann, O., Cony-Makhoul, P., Facon, T., Stone, R., Miller, C., Tallman, M., Brown, R., Schuster, M., Loughran, T., Gratwohl, A., Mandelli, F., Saglio, G., Lazzarino, M., Russo, D., Baccarani, M., and Morra, E. (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 346, 645-652.

Kharas, M.G., Deane, J.A., Wong, S., O'Bosky, K.R., Rosenberg, N., Witte, O.N., and Fruman, D.A. (2004). Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells. *Blood* 103, 4268-4275.

Kharas, M.G., and Fruman, D.A. (2005). ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res* 65, 2047-2053.

Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.M., Weichselbaum, R.R., and Kufe, D.W. (1995). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 376, 785-788.

Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., and Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1-24.

Konopka, J.B., Watanabe, S.M., and Witte, O.N. (1984). An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37, 1035-1042.

Krause, D.S., and Van Etten, R.A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353, 172-187.

Kreuzer, K.A., Le Coutre, P., Landt, O., Na, I.K., Schwarz, M., Schultheis, K., Hochhaus, A., and Dorken, B. (2003). Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol* 82, 284-289.

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

Kurzrock, R., Shtalrid, M., Romero, P., Kloetzer, W.S., Talpas, M., Trujillo, J.M., Blick, M., Beran, M., and Gutterman, J.U. (1987). A novel c-abl protein product in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325, 631-635.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lagasse, E., and Weissman, I.L. (1996). Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197, 139-150.

Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., and Kurzrock, R. (2001). The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 61, 2343-2355.

le Coutre, P., Ottmann, O.G., Giles, F., Kim, D.W., Cortes, J., Gattermann, N., Apperley, J.F., Larson, R.A., Abruzzese, E., O'Brien, S.G., Kuliczkowski, K., Hochhaus, A., Mahon, F. X., Saglio, G., Gobbi, M., Kwong, Y. L., Baccarani, M., Hughes, T., Martinelli, G., Radich, J. P., and Zheng, M. (2008). Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* 111, 1834-1839.

Ledbetter, J.A., Rouse, R.V., Micklem, H.S., and Herzenberg, L.A. (1980). T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med* 152, 280-295.

Leenen, P.J., de Bruijn, M.F., Voerman, J.S., Campbell, P.A., and van Ewijk, W. (1994). Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 174, 5-19.

Lewis, J.M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M.A., and Wang, J.Y. (1996). Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15174-15179.

Li, S., Ilaria, R.L., Jr., Million, R.P., Daley, G.Q., and Van Etten, R.A. (1999). 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, 1399-1412.

Liu, K.D., Gaffen, S.L., Goldsmith, M.A., and Greene, W.C. (1997). Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr Biol* 7, 817-826.

Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A., and Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.

Mahon, F.X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101, 2368-2373.

Maru, Y., and Witte, O.N. (1991). The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67, 459-468.

McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13, 7587-7595.

- McWhirter, J.R., and Wang, J.Y. (1991). Activation of tyrosinase kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11, 1553-1565.
- McWhirter, J.R., and Wang, J.Y. (1993). An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Embo J* 12, 1533-1546.
- Melo, J.V., and Chuah, C. (2007). Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett* 249, 121-132.
- Mian, A.A., Schull, M., Zhao, Z., Oancea, C., Hundertmark, A., Beisert, T., Ottmann, O.G., and Ruthardt, M. (2009). The gatekeeper mutation T315I confers resistance against small molecules by increasing or restoring the ABL-kinase activity accompanied by aberrant transphosphorylation of endogenous BCR, even in loss-of-function mutants of BCR/ABL. *Leukemia*.
- Miething, C., Mugler, C., Grundler, R., Hoepfl, J., Bai, R.Y., Peschel, C., and Duyster, J. (2003). Phosphorylation of tyrosine 393 in the kinase domain of Bcr-Abl influences the sensitivity towards imatinib in vivo. *Leukemia* 17, 1695-1699.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nagar, B., Bornmann, W.G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D.R., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2002). Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 62, 4236-4243.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., and Kuriyan, J. (2003). Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-871.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, 841-845.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). A new consistent chromosomal abnormality in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497-1499.
- O'Hare, T., Eide, C.A., and Deininger, M.W. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 110, 2242-2249.
- Oda, T., Heaney, C., Hagopian, J.R., Okuda, K., Griffin, J.D., and Druker, B.J. (1994). Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 269, 22925-22928.
- Ottmann, O.G., Druker, B.J., Sawyers, C.L., Goldman, J.M., Reiffers, J., Silver, R.T., Tura, S., Fischer, T., Deininger, M.W., Schiffer, C.A., Baccarani, M., Gratwohl, A., Hochhaus, A., Hoelzer, D., Fernandes-Reese, S., Gathmann, I., Capdeville, R., and O'Brien, S. G. (2002). A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* 100, 1965-1971.

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

Pear, W.S., Miller, J.P., Xu, L., Pui, J.C., Soffer, B., Quackenbush, R.C., Pendergast, A.M., Bronson, R., Aster, J.C., Scott, M.L., and Baltimore, D. (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92, 3780-3792.

Pellicci, G., Lanfrancone, L., Salcini, A.E., Romano, A., Mele, S., Grazia Borrello, M., Segatto, O., Di Fiore, P.P., and Pellicci, P.G. (1995). Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene* 11, 899-907.

Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Clark, R., McCormick, F., and Witte, O.N. (1991a). Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5927-5931.

Pendergast, A.M., Muller, A.J., Havlik, M.H., Maru, Y., and Witte, O.N. (1991b). BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66, 161-171.

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., and Schlessinger, J. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.

Peschel, C., Duyster, J., Günther, C., Kolb, H.-J., Muth, A., and Schneller, F. (2003). Chronisch myeloische Leukämie (CML). W Zuckschwerdt Verlag München, 115-130.

Pfeifer, H., Wassmann, B., Pavlova, A., Wunderle, L., Oldenburg, J., Binckebanck, A., Lange, T., Hochhaus, A., Wystub, S., Bruck, P., Hoelzer, D., and Ottmann, O. G. (2007). Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with de novo Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 110, 727-734.

Pluk, H., Dorey, K., and Superti-Furga, G. (2002). Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108, 247-259.

Potter, H. (1988). Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* 174, 361-373.

Pui, C.H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535-1548.

Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pellicci, P.G., Arlinghaus, R., and Pawson, T. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *Embo J* 13, 764-773.

Radziwill, G., Erdmann, R.A., Margelisch, U., and Moelling, K. (2003). The Bcr kinase downregulates Ras signaling by phosphorylating AF-6 and binding to its PDZ domain. *Mol Cell Biol* 23, 4663-4672.

Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., and Sawyers, C.L. (1995). The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11746-11750.

Reeves, P.M., Bommarius, B., Lebeis, S., McNulty, S., Christensen, J., Swimm, A., Chahroudi, A., Chavan, R., Feinberg, M.B., Veach, D., Bornmann, W., Sherman, M., and Kalman, D. (2005). Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat Med* 11, 731-739.

Robinson, D.R., Wu, Y.M., and Lin, S.F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548-5557.

Roche-Lestienne, C., Lai, J.L., Darre, S., Facon, T., and Preudhomme, C. (2003). A mutation conferring resistance to imatinib at the time of diagnosis of chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 348, 2265-2266.

Rodriguez-Tarduchy, G., Collins, M., and Lopez-Rivas, A. (1990). Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *Embo J* 9, 2997-3002.

Roumiantsev, S., Shah, N.P., Gorre, M.E., Nicoll, J., Brasher, B.B., Sawyers, C.L., and Van Etten, R.A. (2002). 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 U S A* 99, 10700-10705.

Rowley, J. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.

Salgia, R., Brunkhorst, B., Pisick, E., Li, J.L., Lo, S.H., Chen, L.B., and Griffin, J.D. (1995). Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* 11, 1149-1155.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Vol 2. Auflage (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., Gu, H., Griffin, J. D., and Neel, B. G. (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1, 479-492.

Sattler, M., and Salgia, R. (1997). Activation of hematopoietic growth factor signal transduction pathways by the human oncogene BCR/ABL. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 63-79.

Sawyers, C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340, 1330-1340.

Sawyers, C.L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J.M., Miller, C.B., Ottmann, O.G., Schiffer, C.A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M.W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., and Morra, E. (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539.

Sawyers, C.L., McLaughlin, J., and Witte, O.N. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181, 307-313.

Schindler, C., and Darnell, J.E., Jr. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64, 621-651.

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

Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., and Sawyers, C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2, 117-125.

Silver, R.T. (1990). Chronic myeloid leukemia. A perspective of the clinical and biologic issues of the chronic phase. *Hematol Oncol Clin North Am* 4, 319-335.

Silver, R.T., Woolf, S.H., Hehlmann, R., Appelbaum, F.R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J.M., Guilhot, F., Kantarjian, H.M., Lichtin, A.E., Talpaz, M., and Tura, S. (1999). An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94, 1517-1536.

Sirvent, A., Benistant, C., and Roche, S. (2008). Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell* 100, 617-631.

Skaggs, B.J., Gorre, M.E., Ryvkin, A., Burgess, M.R., Xie, Y., Han, Y., Komisopoulou, E., Brown, L.M., Loo, J.A., Landaw, E.M., and Graeber, T. G. (2006). Phosphorylation of the ATP-binding loop directs oncogenicity of drug-resistant BCR-ABL mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19466-19471.

Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Szczylik, C., Kanakaraj, P., Perrotti, D., Zon, G., Gewirtz, A., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995). C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res* 55, 2275-2278.

Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., Radaelli, F., Ciccone, F., Tiribelli, M., di Lorenzo, R., Caracciolo, C., Izzo, B., Pane, F., Saglio, G., Baccarani, M., and Martinelli, G. (2006). Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 12, 7374-7379.

Soverini, S., Martinelli, G., Rosti, G., Bassi, S., Amabile, M., Poerio, A., Giannini, B., Trabacchi, E., Castagnetti, F., Testoni, N., Luatti, S., de Vivo, A., Cilloni, D., Izzo, B., Fava, M., Abruzzese, E., Alberti, D., Pane, F., Saglio, G., and Baccarani, M. (2005). ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 23, 4100-4109.

Spain, L.M., and Mulligan, R.C. (1992). Purification and characterization of retrovirally transduced hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3790-3794.

Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S., and Milstein, C. (1979). Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 9, 301-306.

Steelman, L.S., Pohnert, S.C., Shelton, J.G., Franklin, R.A., Bertrand, F.E., and McCubrey, J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.

Sukharev, S.I., Titomirov, A.V., and Klenchin, V.A. (1994). Electrically-induced DNA transfer into cells. Electrotransfectin in vivo. In *Gene Therapeutics Methods and Applications of Direct Gene Transfer*, J.A. Wolff, ed. (Boston, Birkhäuser), pp. 210-232.

Talpaz, M., Silver, R.T., Druker, B.J., Goldman, J.M., Gambacorti-Passerini, C., Guilhot, F., Schiffer, C.A., Fischer, T., Deininger, M.W., Lennard, A.L., Hochhaus, A., Ottmann, O. G., Gratwohl, A., Baccarani, M., Stone, R., Tura, S., Mahon, F. X., Fernandes-Reese, S., Gathmann, I., Capdeville, R., Kantarjian, H. M., and Sawyers, C. L. (2002). Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99, 1928-1937.

Van Etten, R.A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9, 179-186.

Van Etten, R.A., Jackson, P.K., Baltimore, D., Sanders, M.C., Matsudaira, P.T., and Janmey, P.A. (1994). The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124, 325-340.

Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., and Foukas, L.C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30, 194-204.

Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.

Varticovski, L., Daley, G.Q., Jackson, P., Baltimore, D., and Cantley, L.C. (1991). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* 11, 1107-1113.

Verfaillie, C.M., Hurley, R., Lundell, B.I., Zhao, C., and Bhatia, R. (1997). Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? *Acta Haematol* 97, 40-52.

von Bubnoff, N., Barwisch, S., Speicher, M.R., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). A cell-based screening strategy that predicts mutations in oncogenic tyrosine kinases: implications for clinical resistance in targeted cancer treatment. *Cell Cycle* 4, 400-406.

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

- von Bubnoff, N., Peschel, C., and Duyster, J. (2003b). Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 17, 829-838.
- von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2002). BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet* 359, 487-491.
- Walkenhorst, J., Goga, A., Witte, O.N., and Superti-Furga, G. (1996). Analysis of human c-Abl tyrosine kinase activity and regulation in *S. pombe*. *Oncogene* 12, 1513-1520.
- Wang, J.Y. (1993). Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Cell Genet Dev* 3, 35-43.
- Wang, J.Y. (1998). Cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 10, 240-247.
- Welch, P.J., and Wang, J.Y. (1993). A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-790.
- Wen, S.T., and Van Etten, R.A. (1997). The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* 11, 2456-2467.
- Willis, S.G., Lange, T., Demehri, S., Otto, S., Crossman, L., Niederwieser, D., Stoffregen, E.P., McWeeney, S., Kovacs, I., Park, B., Druker, B. J., and Deininger, M. W. (2005). High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 106, 2128-2137.
- Yamamoto, M., Kurosu, T., Kakihana, K., Mizuchi, D., and Miura, O. (2004). The two major imatinib resistance mutations E255K and T315I enhance the activity of BCR/ABL fusion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 1272-1275.
- Yang, F., Liu, Y., Bixby, S.D., Friedman, J.D., and Shokat, K.M. (1999). Highly efficient green fluorescent protein-based kinase substrates. *Anal Biochem* 266, 167-173.
- Young, M.A., Shah, N.P., Chao, L.H., Seeliger, M., Milanov, Z.V., Biggs, W.H., 3rd, Treiber, D.K., Patel, H.K., Zarrinkar, P.P., Lockhart, D.J., Sawyers, C. L. and Kuriyan, J. (2006). Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer Res* 66, 1007-1014.
- Zhang, X., and Ren, R. (1998). Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3829-3840.
- Zimmermann, J., Caravatti, G., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Lydon, N.B., and Fabbro, D. (1996). Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch Pharm (Weinheim)* 329, 371-376.

Zipfel, P.A., Zhang, W., Quiroz, M., and Pendergast, A.M. (2004). Requirement for Abl kinases in T cell receptor signaling. *Curr Biol* 14, 1222-1231.

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von c-Abl | 5 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Bcr | 6 |
| Abb. 3: Schema Translokation t (9;22), (modifiziert nach Faderl et al., 1999)..... | 7 |
| Abb. 4 Bcr-Abl Signaltransduktion modifiziert nach Steelman et al.,2004 | 10 |
| Abb. 5: Resistenzmechanismen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren (Krause and Van Etten, 2005)..... | 15 |
| Abb. 6: Kristallstruktur der Abl Kinasedomäne in Komplex mit Imatinib (modifiziert nach (von Bubnoff et al., 2003). | 17 |
| Abb. 7: Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung muriner Zellen | 47 |
| Abb. 8: Restriktionsverdau mit <i>Xho1</i> | 49 |
| Abb. 9: Kinaseassay mit einem synthetischen Abl-Substrat..... | 51 |
| Abb. 10: Proteinphosphorylierung in Ba/F3 Zellen..... | 53 |
| Abb. 11: Schematische Ansicht der Vektorkonstrukte | 55 |
| Abb. 12: Expressionskontrolle der Vektorkonstrukte in NIH3T3 Zellen | 56 |
| Abb. 13: Schematische Darstellung des retroviralen Transduktions-, Transplantationsprotokolls | 58 |
| Abb. 14: Retrovirale Transfektion, Virustitration und Transduktion in murines Knochenmark..... | 60 |
| Abb. 15: Blutausstriche einer Kontrollmaus und einer Maus mit MPS..... | 61 |
| Abb. 16: Darstellung des Größenunterschieds einer Kontrollmilz und einer durch myeloproliferative Infiltration vergrößerten Milz..... | 62 |
| Abb. 17: Immunphänotypisierung von Blut-, Milz- und Knochenmarkzellen einer Maus mit MPS | 63 |
| Abb. 18: Liquid-Transformations-Assay | 65 |
| Abb. 19: Methylzelluloseassay | 66 |
| Abb. 20: Verlaufsanalyse der EGFP Expression und der Leukozytenentwicklung..... | 70 |
| Abb. 21: Verlaufsanalyse der EGFP Expression un der Leukozytenentwicklung unter Imatinibtherapie | 72 |

8 Publikation

Miething, C., Feihl, S., Mugler, C., Grundler, R., von Bubnoff, N., Lordick, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2006). The Bcr-Abl mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia* 20, 650-657.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich herzlich für die gewährte Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikums rechts der Isar, der Technischen Universität München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten Themas und die ausgezeichnete wissenschaftliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei Dr. Cornelius Miething für die Einweisung in die molekularbiologische Forschung, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die äußerst produktive Zusammenarbeit.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. Rebekka Dechow für ihre großartige Hilfsbereitschaft, wissenschaftliche Unterstützung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Claudia Mugler danke ich besonders für die freundliche Hilfestellung und ausgezeichnete Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken, sowie die besonders nette Zusammenarbeit.

Für die interessanten Diskussionen und das sehr angenehme Arbeitsklima vielen Dank an Dr. Nicolas v. Bubnoff, Dr. Florian Bassermann, Silvia Münch, Jana Sänger, Petra Seipel und alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Duyster, Bernhard und Licht.

Meinen Eltern möchte ich insbesondere für ihre stetige großartige Unterstützung danken.

10 Lebenslauf

Name: Feihl
Vorname: Susanne
Eltern: Rita Feihl, Krankenschwester
Rupert Feihl, Elektriker

Schulische Ausbildung:

1986-1990 Grundschule Deining
1990-1999 Ostendorfer-Gymnasium Neumarkt i.d.OPf, neusprachlicher
Zweig

Universitäre Ausbildung:

10/1999-10/2001 Medizinstudium an der Universität Regensburg
10/2001-03/2006 Medizinstudium an der Technischen Universität München

09/2001 Physikum
08/2002 1. Staatsexamen
03/2005 2. Staatsexamen
05/2006 3. Staatsexamen

Klinische Ausbildung:

12/2006-03/2008 Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie und
internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg
seit 04/2008 Assistenzärztin am Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Immunologie und Hygiene der Technischen Universität
München