

**SRC-KINASEN ALS THERAPEUTISCHE
ZIELSTRUKTUR BEI PHILADELPHIA-
POSITIVEN LEUKÄMIEN**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER FAKULTÄT
FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE DER LUDWIG-MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT MÜNCHEN

vorgelegt von
Nicola Simon
aus
Nürnberg

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Horst Domdey betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, dass ich die Dissertation selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

München, 20.5.2003

Nicola Simon

Dissertation eingereicht am: 04.07.2003

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Hallek

Zweitgutachter: Hon.-Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am: 22.07.2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis Mai 2003 in der KKG Gentherapie an der GSF unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Warmuth, M.*, **Simon, N.***, Mitina, O., Mathes, R., Fabbro, D., Manley, P. W., Buchdunger, E., Forster, K., Moarefi, I., Hallek, M. (2003). Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases. *Blood* 101, 664-672.

*geteilte Erstautorenschaft

Schuster, C., Forster, K., Dierks, H., Elsasser, A., Behre, G., **Simon, N.**, Danhauser-Riedl, S., Hallek, M., Warmuth, M. (2003). The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. *Blood* 101, 655-663.

Simon N., Cotte S., Hallek M. (2003). The dual-specific Src/Abl kinase inhibitor CGP76030 overcomes imatinib mesylate-resistance in bone marrow cells transformed by Bcr-Abl. Manuscript in preparation.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	9
1.1	PHILADELPHIA POSITIVE LEUKÄMIEN	9
1.1.1	Das Philadelphia Chromosom	9
1.1.2	Klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie Ph-positiver Leukämien	10
1.1.2.1	CML.....	10
1.1.2.2	ALL.....	11
1.1.2.3	CNL	12
1.1.3	Therapie Philadelphia-positiver Leukämien.....	12
1.1.3.1	Konventionelle Therapieansätze bei CML und ALL	12
1.1.3.2	„Small molecule drugs“: Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI571 ..	13
1.1.3.3	Mechanismen der Resistenzentstehung gegen STI571	15
1.1.4	Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch Bcr-Abl	16
1.1.4.1	Aktivierung des Ras-Signalwegs	17
1.1.4.2	Aktivierung des PI3/Akt-Signalwegs	18
1.1.4.3	Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs	19
1.1.4.4	Aktivierung der Src-Kinasen-Familie.....	20
1.2	DIE FAMILIE DER SRC-KINASEN	21
1.2.1	Die Struktur von Src-Kinasen.....	22
1.2.2	Die Regulation von Src-Kinasen	23
1.2.3	Gewebeverteilung der Expression von Src-Kinasen	25
1.2.4	Die Rolle von Src-Kinasen in der Hämatopoese	27
1.2.5	Src-Kinasen als Proto-Onkogen	28
1.2.5.1	Erhöhte Src-Kinase-Aktivität in humanen Neoplasien.....	28
1.2.5.2	Die Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr für die Induktion einer Ph-positiven B-ALL	29
2	ZIELE DER ARBEIT	32
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	MATERIAL.....	33
3.1.1	Chemikalien und Enzyme	33
3.1.1.1	Puffer und Lösungen.....	33
3.1.1.2	Inhibitoren.....	34
3.1.2	Bakterienstamm	34
3.1.3	Nährlösungen und Zusätze für Bakterien.....	34

3.1.4	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	35
3.1.4.1	Zelllinien.....	35
3.1.4.2	Zellkulturmedien.....	36
3.1.5	Vektoren und Primer.....	36
3.1.5.1	Vektoren.....	36
3.1.5.2	Primer.....	37
3.1.6	Antikörper.....	38
3.1.7	Protein-Analyse (Western Blot).....	39
3.1.8	Mausstamm.....	40
3.2	METHODEN.....	41
3.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	41
3.2.2	Transfektion und Lyse von Zellen.....	42
3.2.3	Apoptosemessung mittels FACS-Analyse.....	43
3.2.4	Retrovirale Infektion.....	44
3.2.5	Bestimmung des Retrovirus-Titers.....	45
3.2.6	Knochenmarks-Transplantation: Induktion von B-ALL in Mäusen.....	45
3.2.7	Protein Analyse.....	47
4	ERGEBNISSE.....	53
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES BINDUNGSMECHANISMUS DES ABL-SPEZIFISCHEN KINASE-INHIBITORS STI571.....	53
4.1.1	Die Positionen 315 und 380 in der Kinase-Domäne von Abl sind wichtig für die STI571-Bindung.....	53
4.1.2	Die Konformation der katalytischen Schleife in Abl beeinflusst die Bindung von STI571 an Abl.....	56
4.2	DUALSPEZIFISCHE SRC/ABL-INHIBITOREN.....	59
4.2.1	PP1 und CGP76030 führen in Bcr-Abl-positiven Zellen zu Wachstumsstop und Apoptose.....	59
4.2.2	STI571, PP1 und CGP76030 hemmen Bcr-Abl über einen überlappenden Bindungsmechanismus.....	61
4.2.3	STI571-Resistenz vermittelnde Bcr-Abl Mutationen bewirken keine vollständige biologische Resistenz gegenüber PP1 und CGP76030.....	63
4.2.4	Differenzielle Effekte von PP1, CGP76030 und STI571 auf die Aktivität von Src-Kinasen.....	65

4.3	DER EFFEKT DES DUALSPEZIFISCHEN SRC/ABL INHIBITORS CGP76030 IN EINEM TIERMODELL FÜR DIE PHILADELPHIA-(BCR-ABL) POSITIVE B-ALL.....	68
4.3.1	CGP76030 inhibiert Wachstum von Bcr-Abl-transformierten murinen Knochenmarkszellen.....	68
4.3.2	Charakterisierung des induzierten Krankheitsphänotyps im Tiermodell ..	71
4.3.3	Der Einfluss von STI571 und CGP76030 auf das Überleben in einem Tiermodell für Bcr-Ablwt-positive B-ALL	76
4.3.4	In einem Mausmodell für Bcr-Abl-positive, STI571-resistenter B-ALL verlängert eine Behandlung mit 50 mg/kg CGP76030 das Überleben nicht	85
5	DISKUSSION.....	93
5.1	PP1 UND CGP76030 HEMMEN WACHSTUM UND ÜBERLEBEN VON ZELLEN, DIE STI571-RESISTENTES BCR-ABL EXPRIMIEREN	93
5.2	DER EFFEKT VON CGP76030 IN EINEM TIERMODELL FÜR BCR-ABL-POSITIVE B-ALL	96
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	102
8	LEBENS LAUF.....	114

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die beteiligten Chromosomen bei der Philadelphia-Translokation.	9
Abbildung 2: Bindungsmodus des STI571-Derivats an die Abl-Kinase.	14
Abbildung 3: Schematische (A) und strukturelle (B) Darstellung von Src-Kinasen.	23
Abbildung 4: Das retrovirale Transduktions Replantations-Modell für Bcr-Abl- positive Leukämien.	30
Abbildung 5: Der Effekt des Austausches der Aminosäuren an den Positionen 315 und 380 auf die Inhibition von Bcr-Abl durch STI571.	55
Abbildung 6: Bedeutung von Phe382 und der katalytischen Schleife von Abl für die STI571-Bindung.	58
Abbildung 7: Hemmung der Kinaseaktivität von Bcr-Abl Wildtyp durch PP1 und CGP76030.	60
Abbildung 8: Effekt von CGP76030 auf Wachstum und Überleben von Bcr-Abl+- Zelllinien und AML-Zelllinien.	61
Abbildung 9: Charakterisierung des Bindungsmodus der dualspezifischen Src/Abl- Inhibitoren PP1 und CGP76030.	63
Abbildung 10: Die Bedeutung der Konformation der A-Schleife für die Bindung der Inhibitoren PP1 und CGP76030 an Bcr-Abl.	65
Abbildung 11: Unvollständige Resistenz von 32D _{Bcr-Abl} Zellen, die CGP76030- und PP1- resistente Mutanten exprimieren.	67
Abbildung 12: Expression verschiedener Src-Kinasen in Knochenmarkszellen.	69
Abbildung 13: Der biologische Effekt von STI571 und CGP76030 auf Bcr-Abl- transformierte murine Knochenmarkszellen.	70
Abbildung 14: Einige Charakteristika des induzierten Krankheitsphänotyps.	73
Abbildung 15: Charakterisierung von Knochenmarkszellen aus einer terminal erkrankten Maus mit verschiedenen Oberflächenmarkern.	75

Abbildung 16: Die Überlebenskurve (A) und der jeweilige Phänotyp (B, C, D) der geopfertten Mäuse des Bcr-Ablwt infizierten Transplantats.	80
Abbildung 17: Leukozytenwerte der Nicht-Therapiegruppe (A), der STI571-Therapiegruppe (B) und der CGP76030- Therapiegruppe (C) im zeitlichen Verlauf. 84	
Abbildung 18: Die Überlebenskurve (A) und der jeweilige Phänotyp (B, C, D) der geopfertten Mäuse des Bcr-AblThr315Ile infizierten Transplantats.	89
Abbildung 19: Die Leukozytenzahlen der Nicht- Therapiegruppe (A), der STI571- Therapiegruppe (B) oder der CGP76030- Therapiegruppe des Bcr- AblThr315Ile Transplantats im zeitlichen Verlauf.	92

1 Einleitung

1.1 Philadelphia positive Leukämien

1.1.1 Das Philadelphia Chromosom

Die Philadelphia-Translokation war eine der ersten chromosomalen Aberrationen, die mit dem Vorkommen einer bestimmten Neoplasie korreliert wurde. Schon 1960 wurde im Falle der chronisch myeloischen Leukämie (CML) ein verkürztes Chromosom 22 beschrieben (Nowell and Hungerford, 1960). Später konnte mittels verbesserter Bandentechnik gezeigt werden, dass dem verkürzten Chromosom 22 eine balancierte, reziproke Translokation zwischen dem Chromosom 9 und 22 ($t(9;22)(q34;q11)$) zugrunde lag (Rowley, 1973) (siehe Abbildung 1), die nach ihrem Entdeckungsort Philadelphia-Translokation genannt wurde.

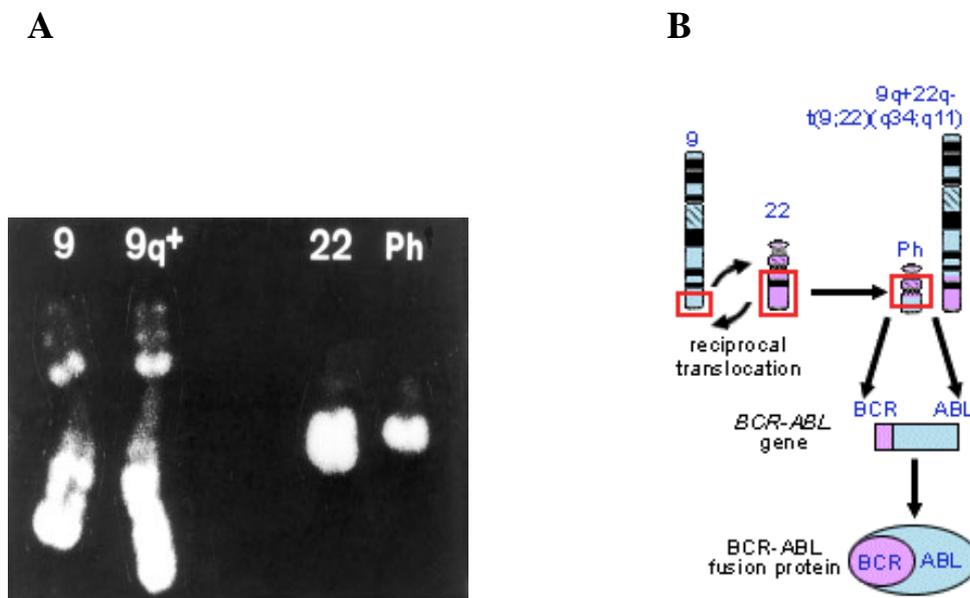


Abbildung 1: Die beteiligten Chromosomen bei der Philadelphia-Translokation. (A) Chromosomen mittels Bandentechnik angefärbt (übernommen von Heisterkamp and Groffen, 2002). (B) Schematische Darstellung der Philadelphia-Translokation mit dem resultierenden Genprodukt und dem Bcr-Abl Fusionsprotein (übernommen aus Genes and Disease, NCBI)

Weitere Untersuchungen zeigten, dass durch diese Translokation die „Breakpoint-Cluster-Region“ (BCR) auf Chromosom 22 mit dem *c-abl* Gen von Chromosom 9 fusioniert wurde (de Klein et al., 1982). Dieses Hybrid-Gen wurde nach den beteiligten Gen-Loci *bcr-abl* genannt. Sowohl im *bcr*-Locus als auch im *abl*-Locus kann die Translokation durch verschiedene Bruchpunkte entstehen. Dabei ist immer ein fester Anteil des *abl*-Gens involviert, während der Anteil des *bcr*-Gens variabel ist und so unterschiedliche *bcr-abl*-Hybride erzeugt. Interessanterweise führen diese im gewissem Umfang auch zu unterschiedlichen leukämischen Phänotypen. Die Fusion von *c-abl* an *bcr* führt jedoch in allen Fällen zu einer konstitutiven Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase. Zahlreiche Experimente in Zellkultur und in Tiermodellen konnten die Wichtigkeit dieser Aktivierung von c-Abl für die transformierende und leukämogene Potenz von Bcr-Abl belegen.

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie Ph-positiver Leukämien

Die Fusion von *bcr* an das *abl* Proto-Onkogen kann je nach Bruchpunkt drei verschiedene *bcr-abl* Isoformen erzeugen, die mit unterschiedlichen Typen von Leukämien assoziiert sind: p185, p210 und p230. Die Isoform p185 ist assoziiert mit 20-30% der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), p210 mit 90% der Fälle einer chronisch myeloischen Leukämie (CML), und p230 mit einem Teil der Patienten mit chronischer neutrophiler Leukämie (CNL).

1.1.2.1 CML

Die CML betrifft meist ältere Menschen. Das mittlere Alter für eine Erstdiagnose beträgt 45-55 Jahre. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1-2 Fällen pro 100 000 Einwohner.

Vom biologischen Gesichtspunkt kann man die CML als eine klonale, myeloproliferative Erkrankung definieren, die von hämatopoetischen Stammzellen ausgeht. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine erhöhte Zahl an weißen Blutkörperchen (normalerweise 50.000-300.000/ μ l) mit einer hohen Anzahl an reifen Neutrophilen mit Metamyelocyten und Myelozyten und wenig Blasten. Ein weiteres Charakteristikum ist der stadienhafte Verlauf der Erkrankung. Sie beginnt mit einer

chronischen Phase, die eine uncharakteristische Symptomatik aufweist, und geht nach 2-3 Jahren über eine Akzelerationsphase in die terminale Blastenkrise über. Während dieses aggressiven Stadiums zeigt die Erkrankung ein polysymptomatisches Krankheitsbild, das durch Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Schwellungen von Milz und Leber gekennzeichnet ist. Eine Kontrolle der peripheren Leukozyten- und Thrombozytenzahl kann durch Chemotherapeutika nicht mehr ausreichend erfolgen. Die reguläre Hämatopoese im Knochenmark wird zunehmend durch den malignen Zellklon verdrängt, was Anämien und Thrombozytopenien zur Folge hat.

Dieses finale Stadium der Blastenkrise zeichnet sich durch eine Blockierung der Differenzierung der malignen Zellen aus. Im peripheren Blut finden sich dadurch meist mehr als 30% undifferenzierter, blastärer Zellen, wobei diese meist myeloischen (ca. 60%) oder B-lymphoiden Ursprungs (ca. 30%) sind. Bei einem B-lymphoiden Ursprung der Blasten entspricht das Krankheitsbild weitgehend einer ALL, während die malignen Zellen bei einem myeloischen Ursprung denen einer akuten myeloischen Leukämie gleichen. Des Weiteren treten extramedulläre, leukämische Infiltrate auf. Die Blastenkrise führt, trotz Behandlung, meist innerhalb von wenigen Monaten zum Tod, häufig durch Infektionen, Blutungen oder einen terminalen Blastenschub mit Multiorganversagen.

1.1.2.2 ALL

Die ALL wird definiert als eine maligne Erkrankung der Lymphopoese, die durch die klonale Proliferation undifferenzierter lymphatischer Zellen charakterisiert ist. Die Inzidenz der ALL beträgt 1:100 000.

Ca. 20-30% der Fälle einer ALL sind mit einer Philadelphia-Translokation assoziiert. In diesen Patienten spielt das Bcr-Abl Fusionsgen eine ursächliche Rolle in der Leukämogenese und ist essentiell für die leukämische Transformation. Die klinischen Symptome der Philadelphia-positiven (Ph-positiven) ALL entsprechen größtenteils denen der lymphatischen Blastenkrise (z.B. Schwächegefühl, Blutungen, Infektanfälligkeit und Knochenschmerzen). Die Ursache dafür ist vor allem in der Verdrängung der normalen Hämatopoese, insbesondere der Erythropoese, durch den malignen Zellklon zu sehen.

Gemäß zytochemischen und immunzytologischen Kriterien handelt es sich bei der Ph-positiven ALL um eine B-Vorläufer-ALL, verursacht durch einen tiefgreifenden Differenzierungsstopp in der B-Zell-Reihe. Die Frage, ob es sich bei der Ph-positiven ALL um eine eigenständige Krankheit handelt oder um eine erst zum Zeitpunkt der Blastenkrise diagnostizierte CML, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Radich, 2001).

1.1.2.3 CNL

Die CNL ist eine sehr seltene myeloproliferative Erkrankung, charakterisiert durch eine Vermehrung überwiegend ausgereifter neutrophiler Granulozyten. Die CNL verläuft meist weit weniger aggressiv als die CML oder Ph-positive ALL. Pane et al. (1996) konnten bei einigen Patienten eine Philadelphia-Translokation und die Expression von p230^{Bcr-Abl} nachweisen.

1.1.3 Therapie Philadelphia-positiver Leukämien

1.1.3.1 Konventionelle Therapieansätze bei CML und ALL

Als konventionelle Therapien werden vor allem einerseits die allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) mit möglichst weitgehend HLA-kompatiblen Knochenmark von verwandten oder nichtverwandten Spendern und zum anderen der Einsatz von verschiedenen Chemotherapeutika (Hydroxyharnstoff, Cytosinarabinsid) verwendet. Des Weiteren wird bei der CML häufig Interferon- α eingesetzt.

Für den Patienten ist jede der oben genannten Therapien problematisch. Eine KMT bedarf geeigneter Spender und ist mit hoher Toxizität verbunden. Sie wird deshalb vor allem bei jüngeren Patienten (<50 Jahre) durchgeführt, bei denen die Erfolgsaussichten weitaus größer sind als bei älteren Patienten (>50 Jahre). Die Verwendung von Chemotherapeutika und Interferon- α kann den Patienten nicht dauerhaft heilen und führt zudem meist zu erheblichen Nebenwirkungen. Bei der ALL wird wegen der schlechten Ansprech- und Remissionsraten der Chemotherapie wann immer möglich nur die allogene KMT durchgeführt.

1.1.3.2 „Small molecule drugs“: Der Tyrosinkinase-Inhibitor STI571

Als eine neue, innovative Therapiemöglichkeit sind in den letzten Jahren immer mehr sogenannte „small molecule drugs“ entwickelt worden. „Small molecule drugs“ sind niedermolekulare Substanzen, die ein für die Krankheit relevantes Protein blockieren. Sie stellen also ein Mechanismus-basiertes Medikament dar. Die Ph-positiven Leukämien gelten als ein Paradebeispiel für die erfolgreiche Anwendung solcher Medikamente.

Für die Induktion der Leukämie durch Bcr-Abl ist eine konstitutive Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase im Bcr-Abl Fusionsprotein essentiell. Eine Blockierung der ATP-Bindestelle durch einen kompetitiven Inhibitor und die damit verbundene Inaktivierung der Tyrosinkinase in Bcr-Abl galt daher schon seit längerem als ein vielversprechender Therapieansatz (Warmuth et al., 1999). 1996 wurde von Druker und Kollegen im Tiermodell die therapeutische Wirksamkeit einer Substanz mit dem Namen STI571 („Imatinib“, CGP57148) berichtet, die nach dem oben genannten Prinzip zu funktionieren schien. STI571 ist ein Phenylaminopyrimidin-Derivat, welches spezifisch die Abl-Kinase, Stammzellfaktor-Rezeptor-Kinase (c-Kit) und PDGF-Rezeptor-Kinase inhibiert.

Wie die Kristallstruktur der Abl-Kinase-Domäne mit einem STI571-Derivat zeigte, bindet der Inhibitor in eine „Tasche“, die benachbart zur ATP-Bindungsstelle liegt (Schindler et al., 2000) (siehe Abbildung 2). Eine wesentliche Voraussetzung dafür scheint eine inaktive Kinase-Domäne zu sein, die zu einer geschlossenen Konformation der Aktivierungsschleife führt (Schindler et al., 2000). In aktiven Kinasen stabilisiert eine offene Konformation die Aktivierungsschleife und bildet eine Plattform für die Bindung von Substraten aus. Diese aktive Konformation der Schleife ist in allen bekannten Strukturen von aktiven Kinasen sehr ähnlich. Die Konformation der Aktivierungsschleife in inaktiven Kinasen weist dagegen häufig große Unterschiede auf. Die Bindung von STI571 an die inaktive Kinase könnte daher eine Erklärung für die hohe Spezifität der Substanz sein.

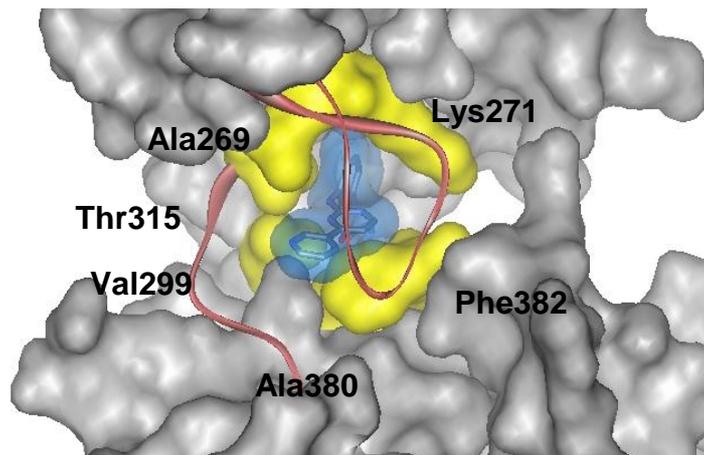


Abbildung 2: Bindungsmodus des STI571-Derivats an die Abl-Kinase. Ein STI571-Derivat (blau) bindet in eine definierte Tasche (Aminosäuren, gelb dargestellt) der Abl-Kinase. Das Computermodell wurde mittels WebLab ViewerPro Software (Cambridge, England) erstellt und basiert auf den veröffentlichten Koordinaten des Abl/STI571 Kristallstruktur-Komplexes (Schindler et al., 2000).

In Zellkultur-Experimenten sowie an Patientenmaterial konnte gezeigt werden, dass STI571 tatsächlich das Überleben Bcr-Abl-positiver, nicht aber negativer Zellen hemmte (Carroll et al., 1997; Deininger et al., 1997; Druker et al., 1996). Langzeit-Kulturen von Knochenmark, die mit STT571 in vitro kultiviert wurden, zeigten eine reduzierte Anzahl an CML-Vorläuferzellen, aber nur wenig Toxizität auf normale Zellen (Kasper et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass STI571 auch in einem Mausmodell die Expansion humaner Ph-positiver- Zelllinien verminderte (le Coutre et al., 1999).

Auch in der Klinik ist STI571 inzwischen als Therapiemöglichkeit bei Ph-positiven Leukämien etabliert. Zahlreiche klinische Studien konnten die Wirksamkeit des Inhibitors belegen. Bei CML Patienten in der späteren chronischen Phase, die eine klinische Interferon- α -Resistenz aufwiesen, führte STI571 in 98% der Fälle zu einer hämatologischen Remission mit Normalisierung des peripheren Blutbildes. Diese Remissionen waren unter kontinuierlicher Verabreichung von STI571 stabil (Druker et al., 2001b).

Weniger erfolgversprechend sind die Ergebnisse der Studien bei CML-Patienten in der Blastenkrise oder bei Ph-positiven B-ALL-Patienten. Diese Patienten sprachen meist ebenfalls gut auf STI571 an, jedoch war dieser Effekt im Patienten nicht stabil (Druker et

al., 2001a). In einer Phase-I-Studie entwickelten über 90% der Patienten mit Ph-positiven B-ALL und 82% der Patienten in der Blastenkrise ein Rezidiv, die Leukämie wurde gegenüber STI571 resistent.

1.1.3.3 Mechanismen der Resistenzentstehung gegen STI571

Grundsätzlich muss man zwei Mechanismen für die Entstehung eines Rezidivs trotz kontinuierlicher STI571 Verabreichung unterscheiden. Zum einen kann Resistenz durch eine Reaktivierung der Abl-Kinase in Bcr-Abl verursacht werden. Eine solche Reaktivierung kann durch eine Punktmutation in Bcr-Abl an einer für die STI571-Bindung wichtigen Position erfolgen. Eine weitere Möglichkeit ist die Amplifikation oder die Überexpression des Bcr-Abl Gens. Der damit verbundene Anstieg von Kinase-Aktivität kann so von STI571 nicht mehr ausreichend blockiert werden (le Coutre et al., 2000). Eine Reaktivierung der Abl-Kinase kann auch Bcr-Abl unabhängig erfolgen, zum Beispiel (z.B.) durch eine Überexpression des MDR-Gens („multiple drug resistance“) und dem aktiven Transport des Inhibitors aus der Zelle (Mahon et al., 2000).

2001 fand Gorre et al. in Patienten eine Punktmutation, die im Bcr-Abl Protein an der Position 315 ein Threonin statt eines Isoleucins aufwies und dadurch die Bindung des Inhibitors verhinderte. Inzwischen wurden zahlreiche weitere Punktmutationen in Patienten gefunden, welche die Bindung von STI571 an Bcr-Abl negativ beeinflussen (Roumiantsev et al., 2002; Shah et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002). Die darin berichtete Häufigkeit solcher Mutationen in resistenten Patienten liegt zwischen 30-90%, wobei davon am häufigsten (ca. 60%) die Aminosäuren an den Positionen 253, 255, 315 und 351 betroffen waren. Auch eine Amplifikation des Bcr-Abl-Gens wurde in STI571-resistenten Patienten gefunden (Gorre et al., 2001).

Die zweite Möglichkeit, eine Resistenz gegenüber STI571 zu entwickeln, besteht in dem Auftreten von sekundären Mutationen. Bcr-Abl greift in eine Vielzahl von Signalkaskaden ein, die das Überleben der Zelle oder das Fortschreiten des Zellzyklus positiv beeinflussen. Dazu gehört z.B. der Ras-Signalweg, die Signalwege von PI3/AKT, Jak/STAT und die Signalwege ausgehend von der Src-Kinasen-Familie. Durch sekundäre Mutationen könnten Proteine aus diesen Signalwegen in die Lage versetzt werden, die transformierende Funktion von Bcr-Abl zu übernehmen. Dabei wird die Kinase-Aktivität

von Bcr-Abl weiterhin durch STI571 inhibiert, doch die konstitutive Aktivierung der Signalkaskaden, die für das Fortschreiten der Leukämie wichtig sind, findet immer noch durch die sekundär mutierten Proteine statt.

Das häufige Auftreten von Mutationen und daraus resultierenden Resistenzen, vor allem in der Blastenkrise und der B-ALL, wird oft mit einer besonderen genomischen Instabilität bei Ph-positiven Patienten erklärt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass in einem Mausmodell die Expression von Bcr-Abl eine genetische Instabilität induzierte (Salloukh and Laneuville, 2000). Eine mögliche Erklärung könnte in der negativen Regulierung von DNA-Reparaturproteinen liegen. CD34-positive Zellen von CML Patienten exprimieren im Vergleich zu Neuroblastoma-Patienten deutlich weniger PKcs („DNA-dependent protein kinases“), die Teil eines der wichtigsten Reparatursysteme für DNA-Doppelstrangbrüche und V(d)J-Rekombinationen ist. Weiterhin konnte in einem induzierbaren Zellkultur-System gezeigt werden, dass Bcr-Abl die Expression dieser PKcs herunterregulierte (Deutsch et al., 2001).

Aufgrund der auftretenden Resistenzen gegenüber dem Inhibitor STI571 ist eine Heilung Ph-positiver Leukämien nur eingeschränkt möglich. Wegen des komplexen Spektrums an Mutationen, die im Bcr-Abl Gen die Bindung des Inhibitors verhindern können, ist eine zweite Generation von Abl-Inhibitoren mit Aktivität gegenüber allen Bcr-Abl Mutanten nur schwer vorstellbar. Ein alternativer Angriffspunkt für Inhibitoren könnte jedoch eine Blockierung von Proteinen innerhalb der Signalkaskaden sein, die von Bcr-Abl induziert werden und wichtig für den Transformationsprozess sind. Die Induktion der Leukämie könnte so durch Inhibition eines zweiten Proteins, unabhängig von der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl, gestoppt werden.

1.1.4 Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch Bcr-Abl

Die zelluläre Proteinkinase c-Abl gehört zur Familie der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen. Ihre Kinase-Aktivität und ihre Lokalisation sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern wird vom zellulären Kontext (Pendergast et al., 1991; Van Etten et al., 1989) und extrazellulären Stimuli (Lewis et al., 1996), wie z.B. vom Kontakt zur extrazellulären Matrix, streng kontrolliert. Im Gegensatz dazu besitzt Bcr-Abl eine deregulierte, konstitutiv aktive Tyrosinkinase-Aktivität (Konopka et al., 1984) und ist ausschließlich im

Zytoplasma lokalisiert, wo es mit einer Vielzahl an Proteinen des Zytoskeletts assoziiert ist (McWhirter and Wang, 1991; McWhirter and Wang, 1993). Dadurch kann Bcr-Abl eine Vielzahl von Signalmolekülen des Zytoplasmas und des Zytoskeletts konstitutiv aktivieren, was für die Bcr-Abl induzierte Leukämogenese wichtig zu sein scheint. Durch verschiedene experimentelle Ansätze wurde bisher die transformierende Potenz des Ras-Signalwegs, des Jun-Kinase Signalwegs und des PI3-Kinase belegt (Raitano et al., 1995; Sawyers et al., 1995; Skorski et al., 1997).

1.1.4.1 Aktivierung des Ras-Signalwegs

Ras-Proteine gehören zu der Superfamilie der monomeren GTPasen. Sie sind aktiv, wenn sie GTP (Guanintriphosphat) gebunden haben, und inaktiv bei gebundenen GDP (Guanindiphosphat). Durch die Hydrolyse von GTP durch GAP-Proteine (**GTPase activating proteins**), aber auch durch die Freisetzung des gebundenen GDPs, vermittelt durch GEF-Proteine (**Guanin nucleotide Exchange Factors**), kann die Aktivität der Ras-Proteine genau reguliert werden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Weiterleitung von Signalen der Zelloberfläche zu anderen Teilen der Zelle. Ras-Proteine geben z.B. Signale von Rezeptor-Tyrosinkinasen zum Zellkern weiter, um dort Zellproliferation und Differenzierung zu stimulieren. Der Kontakt zwischen Rezeptor und den Ras-Proteinen wird durch Adaptermoleküle vermittelt. Dafür bildet sich ein membrannaher Komplex aus, der aus den Adapterproteinen wie Shc, Grb2 und CRKL, sowie dem GEF-Protein Sos besteht. Bindet der Rezeptor seinen Liganden und wird so aktiviert, kann er Sos phosphorylieren, welches durch die Adaptermoleküle in räumlicher Nähe gehalten wird. Die Aktivierung von Sos vermittelt nun die Abspaltung des GDPs in Ras. Daraufhin kann Ras ein GTP binden und in seiner aktiven Form verschiedene Signalwege anschalten. Eine der prominentesten Signalkaskaden, die aktives Ras initiieren kann, ist die Serin/Threonin Phosphorylierungs-Kaskade der MAP-Kinasen (**mitogen-activated protein kinases**).

Mandanás et al. konnten in verschiedenen Bcr-Abl-positiven Zellen eine Aktivierung von Ras zeigen (Mandanás et al., 1993). Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Ras durch Bcr-Abl ist jedoch noch unklar. Alles deutet darauf hin, dass verschiedene Signalwege von verschiedenen Stellen innerhalb des Bcr-Abl-Proteins induziert werden können. Die Aktivierung von Ras setzt die Bildung eines Bcr-Abl/Adaptermolekül/Sos-Protein-Komplexes voraus. Zum einen kann dieser Komplex durch die Bindung der SH2-

Domäne von Grb2 an das Tyr177 von Bcr-Abl zustande kommen. Bcr-Abl Mutanten an Tyr177 verhindern die Grb2-Bindung und sind nicht mehr in der Lage, primäre Knochenmarkskulturen oder Rat1-Fibroblasten zu transformieren (Pendergast et al., 1993). Bcr-Abl kann aber auch Shc direkt phosphorylieren und so die Bildung eines Shc-Grb2-Sos-Komplexes vermitteln (Matsuguchi et al., 1994), oder es rekrutiert und phosphoryliert CKRL über seine CRKL-Bindestelle (Sattler and Salgia, 1998). Die effiziente Aktivierung des Ras-Signalweges erfolgt wahrscheinlich im Zusammenspiel aller drei Adaptermoleküle (Grb2, Shc und CRKL).

Die Bedeutung des Ras-Signalweges für die transformierende Wirkung von Bcr-Abl ist in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden. Dominant-negative Mutanten von Ras, Grb2 und Raf (einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase) konnten die Transformation hämatopoetischer Zellen durch Bcr-Abl blockieren (Cortez et al., 1996; Gishizky et al., 1995; Salomoni et al., 1998; Sawyers et al., 1995). Weiterhin induziert Bcr-Abl über den Ras-Signalweg die Expression von Bcl-2, eines anti-apoptotischen Proteins der Bcl-2 Familie (Sanchez-Garcia and Martin-Zanca, 1997).

1.1.4.2 Aktivierung des PI3/Akt-Signalwegs

Einer der wichtigsten intrazellulären Signalwege, der zu Zellwachstum führt, wird von der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-Kinase) initiiert. Die PI3-Kinase wird von Rezeptoren aktiviert und phosphoryliert keine Proteine, sondern Inositol-Phospholipide. Dadurch entstehen Phosphatidylinositol (PI) 3,4-bisphosphat und PI-3,4,5-trisphosphat. Diese dienen als Plattformen für Signalmoleküle, die so in Signalkomplexen zusammengebracht werden und für eine Weiterleitung des Signals von der Zelloberfläche in die einzelnen Kompartemente der Zelle sorgen. Die Bindung an diese Plattform erfolgt vor allem durch die PH-Domäne („Pleckstrin-homology domain“) der Signalmoleküle. Beispiele für Proteine mit einer PH-Domäne sind Akt (auch Proteinkinase B genannt) und PDK1 („Phosphatidylinositol-dependent kinase“). Beide werden mit Aktivierung der PI3-Kinase an der Membran lokalisiert. Akt ändert dadurch seine Konformation und kann von PDK1 phosphoryliert werden. Für eine Aktivierung von Akt müssen sowohl Threonin 308 als auch Serin 473 phosphoryliert werden. Dies wird von PDK1 zusammen mit PDK2 vermittelt (Datta et al., 1999).

Die PI3-Kinase-Aktivität kann durch Bcr-Abl reguliert werden und ist notwendig für das Wachstum Ph-positiver Zellen. Mit spezifischen Antisense-Oligonukleotiden für die p85-Untereinheit der PI3-Kinase konnte die Koloniebildung von CD34+ CML Zellen blockiert werden (Skorski et al., 1995). Auch die Aktivierung von Akt scheint für die transformierende Funktion von Bcr-Abl wichtig zu sein. Die Expression einer dominant negativen Mutante von Akt, zusammen mit Bcr-Abl, verringerte stark die Induktion eines leukämischen Phänotyps in der Maus (Skorski et al., 1997).

1.1.4.3 Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs

Der Jak/STAT-Signalweg stellt der Zelle einen der direktesten Wege zur Verfügung, Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern zu leiten. Bisher wurden 4 Janus Kinasen (Jak) isoliert: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2. Jede von ihnen ist mit einem bestimmten Zytokin-Rezeptor assoziiert. Mit Dimerisierung des Rezeptors nach Ligandenbindung können sie sich gegenseitig phosphorylieren und aktivieren. Anschließend phosphorylieren sie spezifische Tyrosinreste im Rezeptor, die als Andockstelle für STAT-Faktoren („signal transducers and activators of transcription“) benutzt werden können. Die gebundenen STAT-Proteine werden ebenfalls von den Jaks phosphoryliert und dissoziieren vom Rezeptor. Insgesamt sind 7 STAT-Proteine bekannt: STAT1 – 4, STAT 5A, STAT5B und STAT6. Die Phosphorylierung der STAT-Proteine führt schließlich zu der Bildung von stabilen Homo- oder Heterodimeren, die in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren spezifisch wirken können.

Auch Bcr-Abl kann den Jak/STAT-Signalweg initiieren. In hämatopoetischen Zelllinien führt Bcr-Abl zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT5, STAT1 und STAT3, wobei STAT5 am prominentesten aktiviert zu sein scheint (Ilaria and Van Etten, 1996). Da dominant negative Mutanten von Jak diese Aktivierung nicht blockieren konnten, scheint sie in diesem System Jak-unabhängig zu verlaufen. Auch in Patientenmaterial konnte eine konstitutive Aktivierung von STAT-Proteinen nachgewiesen werden (Chai et al., 1997). Dabei wurde teilweise auch eine erhöhte Jak-Aktivität festgestellt. Noch ist also unklar, welche Rolle die Jak-Proteine in der Bcr-Abl induzierten STAT-Aktivierung spielen.

Die Aktivierung von STAT5 durch Bcr-Abl scheint auf jeden Fall wichtig für die Transformation hämatopoetischer Zellen zu sein. Die Expression von dominant negativen

STAT5 reduzierte das Überleben und Wachstum von K562-Zellen, 32D_{Bcr-Ablwt} oder Ba/F3_{Bcr-ABlwt} im Wachstumsfaktor-freien Kulturbedingungen (de Groot et al., 1999; Nieborowska-Skorska et al., 1999) sowie Resistenz gegenüber Strahlung und Zytostatika (Sillaber et al., 2000). Eines der Gene, die in Bcr-Abl-positiven Zellen durch STAT-Faktoren induziert werden, ist das anti-apoptotische Gen Bcl-xL (Gesbert and Griffin, 2000). In CD34 positiven CML-Patientenzellen kann ein Inhibitor der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl die Expression von Bcl-xL vermindern (Horita et al., 2000). Interessanterweise erfolgte dabei die Reduktion der Bcl-xL Expression in CML-Zellen von Patienten der chronischen Phase schneller als in den CML-Zellen von Patienten der Blastenkrise. Auch CyclinD1 wird in Bcr-Abl-positiven Zellen STAT-abhängig reguliert (de Groot et al., 2000).

Die Rolle von STAT5 in der Pathogenese Bcr-Abl-positiver Leukämien in vivo ist dagegen immer noch ungeklärt. Sexl et al. konnte in STAT5a/b-Knockout-Mäusen immer noch durch Transplantation von Bcr-Abl infizierten Knochenmark eine letale Leukämie ohne Veränderung der Überlebenskurven erzeugen (Sexl et al., 2000). Jedoch scheint der induzierte Phänotyp in den Mäusen zur B-lymphatischen akuten Leukämie verschoben zu sein. Möglicherweise kompensieren redundante Signalwege das Fehlen von STAT5, wobei aber der experimentelle Beweis dafür noch fehlt.

1.1.4.4 Aktivierung der Src-Kinasen-Familie

Auch Mitglieder der Familie der Src-Kinasen können von Bcr-Abl aktiviert werden. Danhauser-Riedl et al. konnte in hämatopoetischen, Bcr-Abl exprimierenden Zelllinien zeigen, dass Bcr-Abl die Kinase-Aktivität der Src-Kinasen Lyn und Hck erhöhte (Danhauser-Riedl et al., 1996). Weiterhin fand man beide Kinasen im Komplex mit Bcr-Abl vorliegen, sowohl in Bcr-Abl-positiven Zelllinien als auch nach Überexpression von Bcr-Abl und verschiedener Src-Kinasen in Cos7-Zellen und Insektenzellen (Danhauser-Riedl et al., 1996; Lionberger et al., 2000; Stanglmaier et al., 2003; Warmuth et al., 1997). Interessanterweise scheint Bcr-Abl vor allem inaktives Hck zu binden und seine Affinität zu Hck nach dessen Aktivierung zu verlieren. Die Komplexbildung kann von mehrere Domänen in Bcr-Abl ausgehen (Lionberger et al., 2000; Stanglmaier et al., 2003). Bei einer Bindung können die SH3 und SH2 Domänen von Hck sowie der Bcr-Teil, die SH3-Domäne und der C-terminale Teil von Bcr-Abl potentiell beteiligt sein.

Überraschenderweise kommt die Bindung von Hck und Bcr-Abl auch dann zustande, wenn die Kinase-Domäne mittels einer Punktmutation in der ATP-Bindestelle inaktiv gehalten wird (Warmuth et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Hck die Grb2-Bindestelle von Bcr-Abl an der Position Tyr177 phosphoryliert (Warmuth et al., 1997). Eine Aktivierung des Ras-Signalweges über das Adaptermolekül Grb2 ist also denkbar. Auch die Bcr-Abl abhängige STAT5 Aktivierung kann durch Hck vermittelt werden (Klejman et al., 2002). Mit Hilfe Kinase-inaktiver, dominant negativer Hck-Mutanten konnte die Bcr-Abl induzierte STAT5 Aktivierung blockiert werden.

Einen Hinweis auf die biologische Relevanz der Aktivierung von Hck durch Bcr-Abl konnte Lionberger et al. liefern. Die Expression Kinase-inaktiver, dominant negativer Mutanten von Hck in der myeloischen Zelllinie DAGM unterdrückte Bcr-Abl induziertes Wachstum (Lionberger et al., 2000). In STI571-resistenten Zelllinien und Blasten von STI571-resistenten CML- und ALL-Patienten konnte des weiteren eine Hochregulation von Lyn und Hck beobachtet werden (Donato et al., 2003). Src-Kinasen könnten also als wichtige Mediatoren für STI571-Resistenz und damit als eine relevante Zielstruktur für eine neue Klasse dualspezifischer Src/Abl-Inhibitoren in Frage kommen. Interessanterweise zeigt ein Vergleich der Abl- und Src-Kinase eine hohe Homologie der ATP-Bindetasche und der direkt benachbarten STI571-Bindetasche, was die Blockierung beider Kinasen mit denselben Inhibitoren möglich macht. Ob Src-Kinasen aber tatsächlich in Bcr-Abl induzierten Leukämien eine Rolle spielen, bleibt noch zu klären.

1.2 Die Familie der Src-Kinasen

Die Familie der Src-Kinasen besteht aus neun Mitgliedern: Src, Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Yes und Yrk. Jedes dieser Signalmoleküle katalysiert die Übertragung eines γ -Phosphats von ATP auf einen spezifischen Tyrosin-Rest eines Proteinsubstrats. Dies führt zu einer Modulation von Protein-Protein-Interaktionen oder enzymatischen Reaktionen. Aktivierte Src-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung, weswegen strenge Kontrollmechanismen die katalytische Aktivität genau regulieren.

1.2.1 Die Struktur von Src-Kinasen

Der strukturelle Aufbau von Src-Kinasen ähnelt sich innerhalb der Familie sehr (siehe Abbildung 3). Jedes Mitglied besitzt einen myristolierten N-Terminus. Daran schließt sich eine nicht-konservierte Domäne, die „Unique region“ an, die als einzige Domäne essentielle Unterschiede innerhalb der Familie aufweist. Dem folgt eine SH3- („Src-homology 3“) Domäne, eine SH2-Domäne, die Tyrosin-Kinase-Domäne (SH1-Domäne) und ein kurzer C-terminaler Schwanz. Die SH2- und SH3-Domänen finden sich auch in einer Vielzahl anderer Signalmoleküle wieder und stellen einen grundlegenden Mechanismus dar, Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln. Die SH2-Domäne erkennt und bindet phosphorylierte Tyrosinreste in einem spezifischen Kontext, während die SH3-Domäne an spezifische Sequenzen in Proteinen bindet, die Polyproline enthalten. Die SH1-Domäne besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Schleife und ist der katalytische Teil des Proteins. Sie bindet ATP und katalysiert die Übertragung eines γ -Phosphat von ATP auf einen spezifischen Tyrosin-Rest eines Proteinsubstrats. In der Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne befindet sich eine kurze α -Helix, welche die Autophosphorylierungsstelle (Tyr416) enthält. Diese Helix ist zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Schleife der Kinase-Domäne eingebettet. Die N-terminale Myristolierungsstelle dient als Membrananker und sorgt für eine Lokalisierung der Src-Kinasen auf der zytosolischen Seite der Zellmembran.

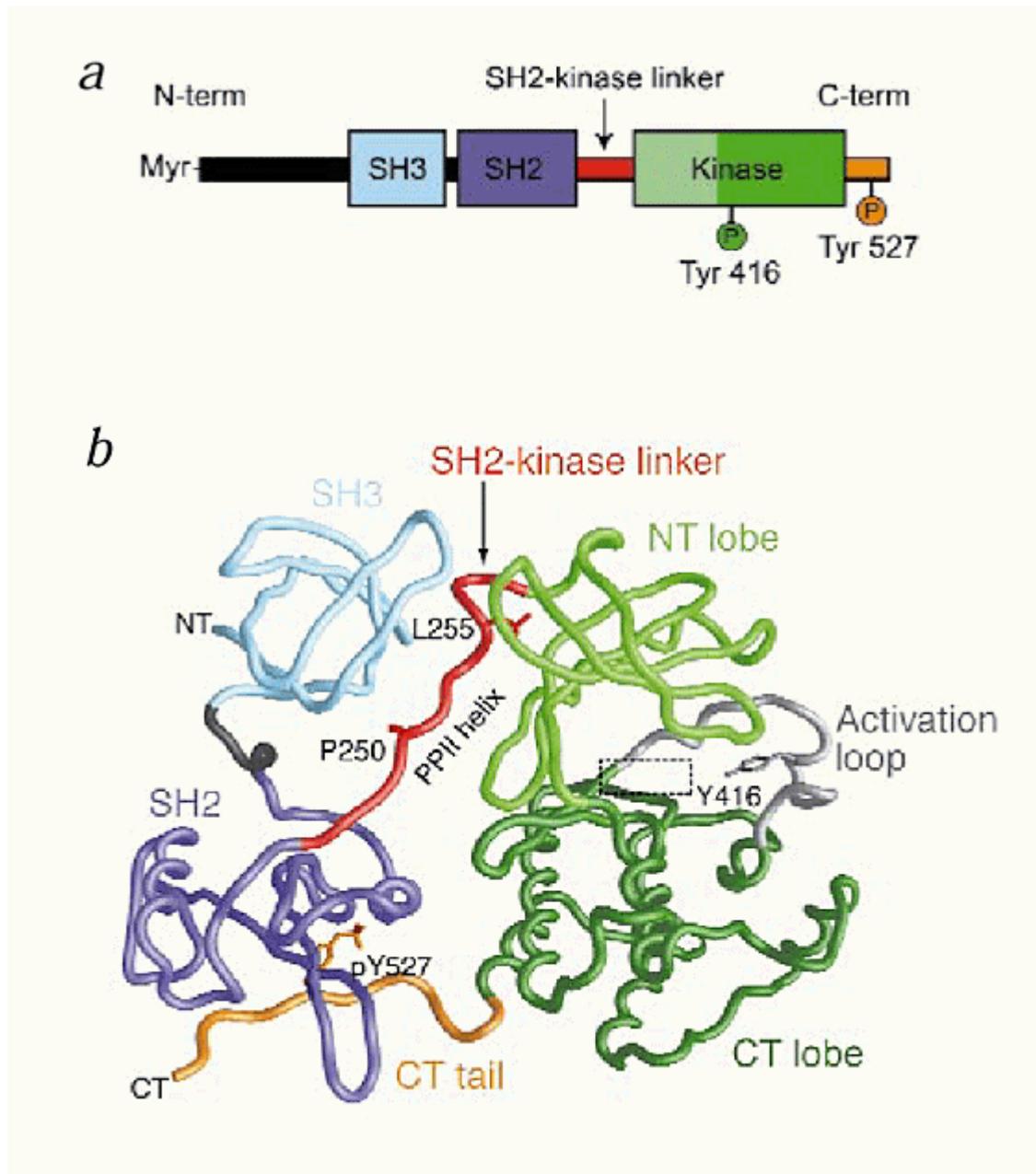


Abbildung 3: Schematische (A) und strukturelle (B) Darstellung von Src-Kinasen (übernommen aus Hubbard et al., 1998). CT: C-terminal, NT: N-terminal, PP: Polyprolin

1.2.2 Die Regulation von Src-Kinasen

Da Src-Kinasen eine essentielle Rolle für das Überleben und korrekte Funktionieren der Zelle spielen, ist ihre Regulation vielfältigen Mechanismen unterworfen (Hubbard et al., 1998). Es gibt zwei wichtige, regulatorische Tyrosin-Phosphorylierungsstellen. Autophosphorylierung des Tyrosins 416 (Nummerierung für c-Src), das sich in der Aktivierungsschleife der SH1-Domäne befindet, führt zu einer Stimulation der Kinase-

Aktivität. Eine Phosphorylierung des Tyrosins 527 im C-terminalen Schwanz, z.B. von der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Csk (C-terminale Src-Kinasen), führt dagegen zu einer Hemmung der Kinase-Aktivität. Tyr416 ist also eine aktivierende, Tyr527 eine inhibierende Phosphorylierungsstelle. Mit Hilfe der Kristallstruktur von Src (Williams et al., 1997; Xu et al., 1999; Xu et al., 1997) und Hck (Schindler et al., 1999; Sicheri et al., 1997) konnte gezeigt werden, dass die negative Regulation von Tyr527 durch eine intramolekulare Bindung der SH2-Domäne mit seinem eigenen Tyrosin-phosphorylierten C-terminalen Schwanz zustande kommt. Weiterhin wurde eine Interaktion der SH3-Domäne mit einer Polyprolin-Helix zwischen der Kinase-Domäne und der SH2-Domäne gefunden. Dieser Bereich, auch „SH2-Kinase-Linker“ genannt, beinhaltet die für eine SH3-Bindung notwendige Polyprolin-Konsensussequenz. Er wird von einem konservierten Leucin (Leu255) stabilisiert, das in einen hydrophoben Spalt der Aminosäuren Trp286 und Tyr326 ragt. Mutationen des Leu255 führten zu einer konstitutiven Aktivierung der Src-Kinase und zeigten dessen Wichtigkeit auf (Gonfloni et al., 1999).

Diese beiden intramolekularen Interaktionen schaffen die strukturellen Voraussetzungen für eine effiziente Inhibition der Kinase-Aktivität. Sie führen zu einer sogenannten „geschlossenen“ Konformation des Proteins, welche die Bindung von ATP an das katalytische Zentrum blockiert und so die Aktivierung der Kinase-Domäne verhindert. In dieser „geschlossenen“ Konformation kommt eine für die ATP-Bindung wichtige Salzbrücke zwischen Lys295 und Glu310 nicht mehr zustande, sodass die Koordination der Phosphat-Gruppen des ATP's nicht mehr erfolgen kann. Des Weiteren sind die Seitenketten der Autophosphorylierungsstelle Tyr416 in eine hydrophobe Tasche (Phe278, Ile411, Phe424 und Pro425) eingebettet und so vor Phosphorylierung geschützt. Auch dient die Aktivierungsschleife in dieser „geschlossenen“ Konformation wahrscheinlich nicht als eine geeignete Plattform für die Bindung potentieller Substrate, wie ein Vergleich mit der Kristallstruktur der Tyrosin-Kinase-Domäne des Insulin-Rezeptors mit gebundenem Substrat (Hubbard, 1997) zeigt.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Src-Kinasen zu aktivieren. Ein wichtiger Mechanismus besteht in der Verdrängung der SH2-Domäne bzw. SH3-Domänen von ihren intramolekularen Interaktionspartnern. Aufgrund des Sequenz-Zusammenhangs der Phosphotyrosinreste bzw. des Polyprolin-Bereichs ist die Affinität dieser intramolekularen Bindungen suboptimal, und fremde Proteine, die Phosphotyrosinreste bzw. Polyproline

enthalten, können die SH2- bzw. SH3-Domänen von Src-Kinasen mit einer höheren Affinität binden. Zum Beispiel wird durch PDGF („platelet derived growth factor“) der PDGF-Rezeptor aktiviert und kann durch Dimerisierung Tyr-Reste phosphorylieren. Eines der phosphorylierten Tyrosine ist Tyr579 in der membrannahen Region („Juxtamembrane Region“) des Rezeptors, das mit hoher Affinität die SH2-Domäne von Src binden kann. Wenn erst einmal die reprimierende Konformation der Src-Kinasen aufgebrochen ist, erfolgt rasch eine Autophosphorylierung von Tyr416, was die Rekonfigurierung der Aktivierungsschleife erlaubt und zu einer vollständigen Aktivierung der Kinase führt. Ein weitere Möglichkeit, die „geschlossene“ Konformation des Proteins zu destabilisieren, besteht in der Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosin-Restes (Tyr527) durch verschiedene Phosphatasen (z.B. Csk).

1.2.3 Gewebeverteilung der Expression von Src-Kinasen

Manche Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, wie z.B. Lck, Fgr, Blk oder Hck, werden grundsätzlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert, während andere wie z.B. c-Src, c-Yes oder Lyn ein breiteres Expressionsspektrum zeigen und in vielen verschiedenen Gewebstypen exprimiert werden (Bolen et al., 1991).

Lck wird normalerweise in Zellen lymphoiden Ursprungs exprimiert. Eine starke Expression von Lck findet man in reifen peripheren CD4⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten wie auch in unreifen CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen im Thymus. Auch periphere NK-Zellen („natural killer cells“) zeigen einen signifikanten Lck Level (Bolen et al., 1991).

Normalerweise findet man c-Fgr vor allem in differenzierten myeloischen Zellen des Knochenmarks, in zirkulierenden Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Aber auch durch den Epstein-Barr-Virus (EBV) transformierte B-Zellen können c-Fgr exprimieren, selbst wenn nicht-transformierte B-Zellen das nicht tun (Bolen et al., 1991). Die Expression von c-Fgr scheint während der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von monozytischen Zellen einem komplexen Regulationsmechanismus unterworfen zu sein. Monozyten des Knochenmarks exprimieren nur wenig c-Fgr mRNA, können jedoch durch Stimulation mit CSF-1 („Colony-stimulating factor“) zu Differenzierung angeregt werden, was mit einer ca. 20-fachen Zunahme an c-Fgr mRNA einhergeht (Bolen et al., 1991).

Hck wird ausschließlich im hämatopoetischen System der myeloischen Linie exprimiert, vor allem in Monozyten und Granulozyten. Außerdem findet man Hck in einigen Zelllinien leukämischen Ursprungs wie HL-60 (Granulozyten) oder U937 (Monozyten). Grundsätzlich scheint Hck sowohl in unreifen wie auch in reifen myeloischen Zellen exprimiert zu werden, jedoch steigt mit zunehmender Reifung der Zelle auch der Level an Hck mRNA (Bolen et al., 1991).

Blk mRNA wurde bei Mäusen in Milzgewebe, aber nicht im Thymus, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere und Verdauungstrakt gefunden. Blk wird in B-lymphoiden Zelllinien exprimiert, aber nicht in Zelllinien T-lymphoiden, myeloischen, erythroiden, fibroblastoiden, neuronalen oder hepatozellulären Ursprungs (Bolen et al., 1991).

C-Src findet man fast in jedem Zelltyp, auch wenn das Expressionsniveau stark variiert. Besonders hohe c-Src-Protein-Spiegel und Tyrosinkinase-Aktivität findet man in neuronalen Gewebe und in den Blutplättchen. c-Src ist sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten myelo-monozytischen Leukämien zu finden, weniger aber in normalen myeloischen Zellen (Bolen et al., 1991).

c-Yes mRNA wurde in kultivierten humanen embryonalen Fibroblasten, der Plazenta, humanen embryonalen Lungen-, Milz- und Nierengewebe sowie in einigen Zelllinien (KB, K562, A431) gefunden. Weiterhin konnte eine relative hohe Kinase-Aktivität von c-Yes in Blutplättchen, NK-Zellen und normalen peripheren T-Zellen festgestellt werden, eine relativ geringe Kinase-Aktivität dagegen in Monozyten und B-Zellen (Bolen et al., 1991).

Lyn wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Lyn mRNA wurde in humaner Plazenta, fötalem Gehirn, Lunge, Leber und Niere detektiert. Innerhalb des hämatopoetischen Systems wird Lyn bevorzugt in Makrophagen, Monozyten, Blutplättchen und B-Zellen exprimiert. In normalen T-Zellen findet man keine Lyn mRNA, jedoch in T-Zelllinien, die mit HTLV-I („human T-cell lymphotropic virus“) infiziert wurden. Auch in B-Zelllinien (z.B. Raji) oder myeloischen Zelllinien (HL-60, K562) wird Lyn mRNA exprimiert. Außerdem scheinen reife B-Zelllinien mehr Lyn zu exprimieren als prä-B-Zelllinien (Bolen et al., 1991).

Fyn wird in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert. Humane Monozyten (aber nicht polymorphonukleäre Zellen), Blutplättchen, aufgereinigte T-Zellen und NK-Zellen

exprimieren Fyn. Fyn-Expression kann über eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit CD3-Antikörpern oder Concanavalin A induziert werden. Allerdings konnte keine gesteigerte Fyn-Expression in irgendeinem Differenzierungsstadium normaler murinen T-Zellen festgestellt werden (Bolen et al., 1991).

1.2.4 Die Rolle von Src-Kinasen in der Hämatopoese

Die Rolle von Src-Kinasen in der Hämatopoese ist mit Hilfe von „Knockouts“ (KO) einzelner oder mehrerer Src-Kinasen in Mäusen untersucht worden. Dabei hat sich die hohe funktionelle Redundanz innerhalb der Familie als ein besonderes Problem erwiesen. Eine gezielte homozygote Deletion einer einzelnen Src-Kinase führte in Mäusen oft zu keinem oder nur geringen Phänotyp, weswegen „double“ oder sogar „triple“ KO-Mäuse für einen tieferen Einblick in die Funktion von Src-Kinasen nötig waren.

Src^{-/-}-Mäuse haben eine ähnlich hohe Lebenserwartung wie Wildtyp-Mäuse und fallen im allgemeinen nur durch eine Verhärtung der Knochen (Osteopetrose) auf. Fyn^{-/-}-Mäuse zeigen neuronale Entwicklungsschäden. „Single“ KO von Hck, Fgr und Blk haben dagegen keinen erkennbaren Phänotyp, während die Deletion von zwei oder drei dieser Src-Kinasen zu Defekten in der Embryonalentwicklung und perinataler Letalität führte (Lowell und Soriano, 1996).

Eine fehlerhafte Hämatopoese konnte in Lck^{-/-}- und Fyn^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Sie wiesen eine gestörte T-Zell-Entwicklung auf (Lowell and Soriano, 1996). Lyn^{-/-}-Mäuse zeigten dagegen einen Defekt in der B-Zell-Entwicklung, der durch eine reduzierte Anzahl an reifen peripheren B-Zellen und eine gesteigerte Anzahl an lymphoblastoiden Zellen gekennzeichnet ist. Des weiteren wurde eine verlängerte Hyperaktivierung des B-Zell-Rezeptors nach Stimulation entdeckt. In vitro Versuche mit aufgereinigten B-Zellen aus der Milz von Lyn^{-/-}-Mäusen zeigten eine verzögerte Tyrosin-Phosphorylierung sowohl von Ig- α , Ig- β und Syk, die an den ersten Schritten der B-Zell-Rezeptor (BCR)-Aktivierung beteiligt sind als auch von späteren Signalmolekülen wie Vav oder Shc (Chan et al., 1997). Lyn scheint also für die initiale BCR-Aktivierung von Bedeutung zu sein, wie z.B. die Phosphorylierung der ITAM's („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) im B-Zell-Rezeptorkomplex. Aber auch in der negativen Regulation des B-Zell-Rezeptorkomplexes spielt Lyn eine Rolle. Die Aktivierung des B-Zell-Rezeptorkomplexes

rekrutiert inhibitorische Rezeptoren, wie FcγRIIb1 und CD22. Diese inhibitorischen Rezeptoren werden an spezifischen Tyrosin-Resten phosphoryliert, vor allem durch Lyn, und rekrutieren ihrerseits bestimmte Phosphatasen (SHIP-1 oder SHP-1) (Ono et al., 1996), welche die Proliferation der B-Zellpopulation durch Blockierung des Ras-Signalweges und des intrazellulären Calciums-Level verhindern können (Chan et al., 1997). Diese negative Regulierung der Immunantwort durch Lyn könnte auch das Auftreten einer lupus-artigen Autoimmunerkrankung in älteren Lyn^{-/-}-Mäusen erklären. Allerdings scheint dabei auch Fyn eine wesentliche Rolle zu spielen, da eine zusätzliche Deletion von Fyn den Phänotyp der Krankheit erheblich verstärkt (Yu et al., 2001). In Bezug auf die Myelopoese zeigen Src^{-/-}Hck^{-/-}-Doppel-KO-Mäuse einen Anstieg in der extramedullären Hämatopoese (Lowell et al., 1996), die aber auch mit der schwerwiegenden Osteopetrose dieser Mäuse, die zu einem Rückgang intramedullärer Hämatopoese führte, erklärt werden kann. Hck^{-/-}Fgr^{-/-}-Doppel-KO-Mäuse zeigen dagegen einen Defekt in der Funktion von polymorphonucleären Neutrophilen (Mocsai et al., 1999). Bei Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}-Mäusen konnte in Makrophagen ein Defekt in der Induktion des Integrin-Signalwegs und in der Makrophagen-Aktivierung durch Lipopolysaccharide festgestellt werden (Meng and Lowell, 1997).

1.2.5 Src-Kinasen als Proto-Onkogen

1.2.5.1 Erhöhte Src-Kinase-Aktivität in humanen Neoplasien

C-Src wurde als Proto-Onkogen mit Entstehung, Wachstum, Progression und Metastasierung einer Vielzahl an humanen Krebsarten (Colonkarzinom, Brustkrebs, Gehirntumor, Pankreastumor) in Verbindung gebracht (Irby and Yeatman, 2000). Sowohl eine erhöhte Proteinexpression von Src-Kinasen als auch eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität wird oft in humanen Neoplasien beobachtet.

Schon Vorstufen einiger Kolonkarzinome zeigen eine erhöhte Src-Aktivität, die mit fortschreitenden Krankheitsverlauf zunimmt, und in einer starken Expression und dem Auftreten von konstitutiv aktivierenden Mutationen von Src in Metastasen resultiert (Irby et al., 1999). Eine erhöhte Src-Aktivität führt aber weder in vitro noch in vivo zu einer verstärkten Proliferation, sondern dereguliert die Ausbildung von E-Cadherin und Integrin

abhängigen Zell-Zellkontakten (Avizienyte et al., 2002). Src scheint in Kolonkarzinomzellen das Adhäsionsverhalten zu ändern und so die Tumorsektion zu unterstützen.

In humanen Brustkrebsgewebe wurde eine 4-20fach höhere Src-Kinase-Aktivität gefunden (Egan et al., 1999; Jacobs and Rubsamen, 1983; Muthuswamy et al., 1994). Die Bedeutung der konstitutiven Aktivierung von Src ist mit Hilfe von transgenen Mäusen untersucht worden. Die Expression des viralen „polyoma middle T antigen“ unter der Kontrolle des MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) Promotors induzierte stark metastasierenden Brustkrebs mit erhöhter Src-Kinase-Aktivität (Guy et al., 1994). Auch Mäuse, die das *neu* Proto-Onkogen (c-erbB2) überexprimieren, entwickelten Brustkrebstumore mit einer 6-8fach höheren Src-Kinase Aktivität (Muthuswamy et al., 1994).

Weiterhin ist eine erhöhte Tyrosinkinase-Aktivität von Src in Pankreastumoren (Lutz et al., 1998), Lungenkrebs (Mazurenko et al., 1992), Neuro- und Retinoblastomas (Bjelfman et al., 1990) und einer Reihe anderen Neoplasien gefunden worden. Eine Aktivierung der Src-Kinasen Lck, Lyn und Fgr konnte dagegen mit leukämischen Wachstums korreliert werden (Dai et al., 1998; Danhauser-Riedl et al., 1996). Jedoch fehlt bislang ein experimenteller Nachweis, ob Src-Kinasen wirklich eine Rolle bei der Entstehung oder Progression einer Leukämie spielen.

1.2.5.2 Die Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr für die Induktion einer Ph-positiven B-ALL

Für die Untersuchung von Bcr-Abl-induzierten Leukämien hat sich das retrovirale Transduktions-Retransplantations-Modell in der Maus als besonders hilfreich erwiesen (siehe Abbildung 4). In diesem Modell wird Knochenmark aus einer Spendermaus mit einem Retrovirus infiziert, der für Bcr-Abl codiert. Nach der Infektion wird das Knochenmark intravenös Empfänger-mäusen gespritzt, deren eigenes Knochenmark vorher durch Bestrahlung abgetötet worden ist. Je nach Protokoll können so zwei Formen von Bcr-Abl-positiven Leukämien erzeugt werden. Zum einen kann eine Leukämie induziert werden, die der CML ähnelt, wobei es in diesem Fall häufig zu gemischten Krankheitsphänotypen kommt (CML, B-ALL und Makrophagentumoren). Zum anderen

kann auch eine Bcr-Abl-positive B-ALL induziert werden, die selten einen gemischten Phänotyp aufweist.

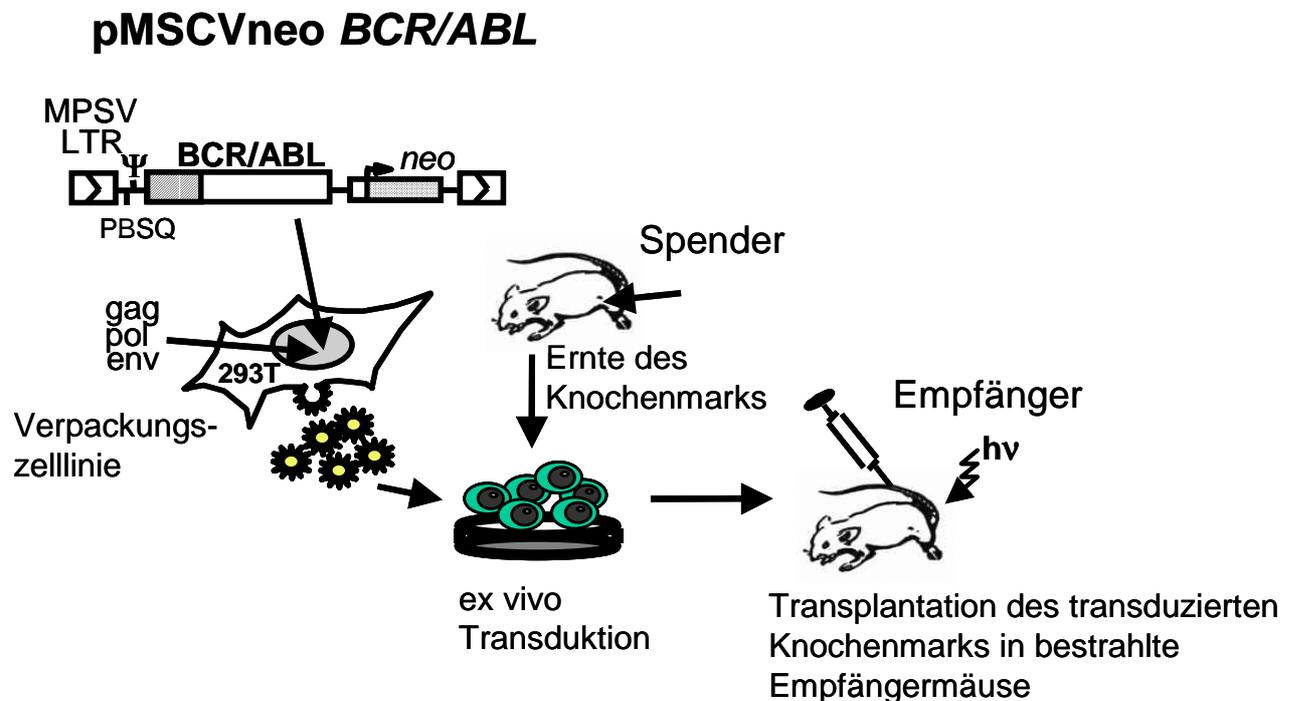


Abbildung 4: Das retrovirale Transduktions Retransplantations-Modell für Bcr-Abl-positive Leukämien. Bcr-Abl-codierender Retrovirus wird in 293T Zellen hergestellt. Bcr-Abl wird ex vivo über retrovirale Infektion in Knochenmark eingebracht. Das infizierte Knochenmark wird anschließend in eine zuvor bestrahlte Empfängermäuse injiziert.

Mit Hilfe dieses Modells konnte Schaoguang Li im Labor von Rick van Etten am Center for Blood Research in Boston einen ersten Hinweis auf eine potentielle Rolle von Src-Kinasen bei der Bcr-Abl induzierten Leukämie erbringen (S. Li, pers. Mitteilung). Er setzte als Knochenmarksspender sowohl Wildtyp-Mäuse als auch $Lyn^{-/-}/Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ -Knock-out-Mäuse ein und verglich die Überlebenskurven der Empfängertiere. Bei der Induktion einer myeloproliferativen Erkrankung konnte er keine signifikanten Unterschiede in den Überlebenskurven feststellen. Die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr scheinen also für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven myeloproliferativen Erkrankung nicht von Bedeutung zu sein. Eine genauere Analyse der verstorbenen Tiere zeigte jedoch, dass die Mäuse aus der Gruppe, die Knochenmark von $Lyn^{-/-}/Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ -Knock-out Mäusen erhalten hatten, ausschließlich eine myeloproliferative Erkrankung entwickelt

hatten. Die B-ALL- und Makrophagentumor-Komponenten des normalerweise gemischten Phänotyps im CML-Modell fehlten.

Um die Bedeutung der Src-Kinasen für die Entstehung einer B-ALL zu klären, wurden Wildtyp-Mäuse und $Lyn^{-/-}/Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ -Knock-out-Mäuse als Knochenmarkspender in dem beschriebenen Modell zur Induktion einer B-ALL verwendet. 70% der Mäuse, die Knochenmark von Wildtyp-Mäusen erhalten hatten, entwickelten binnen 4-8 Wochen eine letale B-ALL. Im Gegensatz dazu zeigten sich im gleichen Zeitraum keinerlei Krankheitssymptome bei den Mäusen, die mit Bcr-Abl transduziertem $Lyn^{-/-}/Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ -Knochenmark retransplantiert wurden. Die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr scheinen also für die Entstehung einer Bcr-Abl-positiven B-ALL von essentieller Bedeutung zu sein. Der hier verwendete Ansatz birgt jedoch auch einige Nachteile. Zum Beispiel hängt die Vergleichbarkeit der Überlebenskurven von einer ähnlich effektiven Infektion des Wildtyp-Knochenmarks und des $Lyn^{-/-}/Hck^{-/-}/Fgr^{-/-}$ -Knochenmarks ab. Der unterschiedliche Phänotyp des Knochenmarks könnte aber durchaus einen Einfluss auf die Effizienz der Infektion ausüben. Aus diesem Grund müssen die hier beschriebenen Daten in weiteren Experimenten bestätigt werden.

2 Ziele der Arbeit

In Vorarbeiten der Gruppe konnten Src-Kinasen als eine der Proteinfamilien identifiziert werden, die in Bcr-Abl-positiven Zellen konstitutiv aktiviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl und Src-Kinasen intrazytosolisch in einem direkten, physikalischen Komplex vorliegen, und Bcr-Abl die Src-Kinasen Lyn und Hck über einen Kinase-unabhängigen Mechanismus aktiviert (Warmuth et al., 1997).

Um die Rolle der Src-Kinasen in Bcr-Abl-positiven Leukämien weiter zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Sind Src-Kinasen therapeutisch relevante Zielmoleküle, und ist es möglich, durch Inhibition von Src-Kinasen Überleben und Wachstum Bcr-Abl-positiver Zellen negativ zu beeinflussen?
2. Welche Aminosäuren in Bcr-Abl vermitteln Resistenz gegenüber STI571, und sind diese Aminosäuren auch wichtig für die Bindung der dualspezifischen Src/Abl-Inhibitoren PP1 und CGP76030?
3. Stellt die Verwendung des dualspezifischen Src/Abl-Inhibitors CGP76030 einen therapeutischen Ansatz dar, um eine Resistenz gegenüber STI571 in vivo zu überwinden?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Enzyme

3.1.1.1 Puffer und Lösungen

TAE 50x	2 M 1 M 62,5 mM	Tris/HCl; NaAcetat; EDTA; pH 8,5;
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris EDTA; pH 8,0;
Tris-Glycin-Lösung	1,21% 0,75%	Tris base Glycin
PBS	(PAN, Aidenbach)	
DNA-Auftragspuffer (10x)	Tris/HCl pH 8 EDTA pH 8 Glyzerin Bromphenolblau	10 mM 50 mM 50% 0,01%
Ammonium-Chlorid (pH 7,4-7,6)	(CellSystems, St. Katharinen)	
2-Mercaptoethanol	(Sigma, St. Louis USA)	
BSA	(Sigma, St. Louis USA)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Sigma, St. Louis USA)	
Fötale Kälberserum (FCS)	(PAN, Aidenbach)	
Ficoll	(Immuno GmbH, Heidelberg)	
Trypanblau 0,5%	(Serva, Heidelberg)	
Murines IL-3	(TEBU (Peprotech), Offenbach)	

Murines IL-6	(TEBU (Peprotech), Offenbach)
murines SCF	(TEBU (Peprotech), Offenbach)
D(-)-Weinsäure	(Roth, Karlsruhe)

3.1.1.2 Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden in Pulverform zur Verfügung gestellt und für die Zellkulturexperimente in DMSO, für die Tierexperimente in Wasser (bei CGP76030 pH 4, mit Weinsäure eingestellt) gelöst.

PP1	(ALEXIS Biochemicals, San Diego, USA)
STI571 (Gleevec)	zur Verfügung gestellt von E. Buchdunger und D. Fabbro (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz)
CGP57030	zur Verfügung gestellt von E. Buchdunger und D. Fabbro (Novartis Pharmaceuticals, Basel, Schweiz)

3.1.2 Bakterienstamm

E.coli XL1-Blue, Genotyp: endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10, (tet^R)], (Stratagene, Heidelberg)

3.1.3 Nährlösungen und Zusätze für Bakterien

LB-Medium	5 g/l	NaCl
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Baktotrypton
LB-Plattenmedium	LB-Medium + 1,5% Agar pH 7,5	
SOC	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCL
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	0,5%	Hefeextrakt
	2%	Baktotrypton
	20mM	Glucose

TYM-Medium:	Trypton	2%
	Hefeextrakt	0,5%
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	10 mM
TfbI Puffer:	KOAc	30 mM
	MnCl ₂	50 mM
	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	15%
TfbII Puffer:	NaMOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	KCl	10 mM
	Glycerin	15%
Ampicillin	50 mg/ml in Wasser	

3.1.4 Zelllinien und Zellkulturmedien

3.1.4.1 Zelllinien

Zelllinie	Kurzbeschreibung	Referenzen
NIH 3T3	Maus- Fibroblasten	DSMZ Nr.:ACC 59 (Andersson et al, 1969) (Copeland et al., 1979)
293 T-Zellen	humane Fibroblasten (Niere) mit large T transfiziert	DSMZ Nr.: ACC 305 (Graham et al., 1977)
WEHI-3B	murine myelomonozytische Leukämiezelllinie, IL-3 Produzent	DSMZ Nr.: ACC 26 (Warner et al., 1969)
32D	Il-3 abhängige murine Knochenmarkszelllinie	DMSZ Nr.:ACC 411 (Greenberger et al., 1983)
Ba/F3	Il-3 abhängige murine pro-B-Zelllinie	DMSZ Nr.:ACC 300 (Palacios et al., 1984)
Cos7	Nierenzelllinie von grüner Meerkatze	(Gluzman Y., 1981)
U937	humane histiocytische Leukämie (AML)	DMSZ Nr.:ACC 5 (Sundström et al., 1976)

HL-60	humane akute myeloische Leukämie (AML)	DMSZ Nr.:ACC 3 (Collins et al., 1977)
OCI-AML5	humane akut myeloische Leukämie (AML)	DMSZ Nr.:ACC 247 (Wang et al., 1991)
K562	humane myeloische Leukämie in Blastenkrise, tragen Philadelphia-Chromosom	DMSZ Nr.:ACC 10 (Lozzio et al., 1973)
LAMA-84	humane myeloische Leukämie in Blastenkrise, tragen Philadelphia-Chromosom	DMSZ Nr.:ACC 168 (Seigneurin et al., 1987)

3.1.4.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden von PAN (Aidenbach) bezogen.

RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS

HL-60, U937, OCI-AML5, LAMA, K562, WEHI-3B

RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 10% WEHI-3B Überstand

32D, Ba/F3

DMEM Medium (PAN: P04-03590, Aidenbach), 10% FCS

293T, NIH3T3, Cos7

Whittlock/Witte Media: RPMI 1640, 20% FCS, 0,5% Penicillin/Streptomycin, 50 µM

2-Mercaptoethanol, 1 µM Ciprobay

murine Knochenmarkszellen

3.1.5 Vektoren und Primer

3.1.5.1 Vektoren

pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

pApuro (Dr. Seth Corey, Pittsburgh, USA)

pMSCV-neo (Clontech, Palo Alto, USA)

pMSCV-IRES EGFP (Rick Van Etten, Boston)

MCV-ecopac (Rick Van Etten, Boston)

3.1.5.2 Primer

Der Primer Lyn2 wurde von MWG (Ebersberg), alle anderen Primer wurden von Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenz	Funktion
Abl T338I	5'-Pho-ccg ttc tat atc atc atc gag ttc atg acc-3'	PCR-Mutagenese
Abl T338V	5'-Pho-ccg ttc tat atc atc gtc gag ttc atg acc-3'	PCR-Mutagenese
Hck T338I	5'-Pho-ccc atc tac atc atc atc gag ttc atg gcc-3'	PCR-Mutagenese
Hck T338V	5'-Pho-ccc atc tac atc atc gtc gag ttc atg gcc-3'	PCR-Mutagenese
Hck T338 anti	5'-Pho-ctc ctt ggt gac cac cgc atg aag ttt gac-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338I	5'-Pho-cca ttt aca tca tca tcg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338V	5'-Pho-cca ttt aca tca tcg tcg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338F	5'-Pho-cca ttt aca tca tct ttg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338L	5'-Pho-cca ttt aca tca tcc tgg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338M	5'-Pho-cca ttt aca tca tca tgg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338N	5'-Pho-cca ttt aca tca tca atg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338Q	5'-Pho-cca ttt aca tca tcc agg agt aca tg-3'	PCR-Mutagenese
Lyn T338 mut back	5'-Pho-gct cct ccc tgg tga cca c-3'	PCR-Mutagenese
Hck 2	5'-cag tga aga cga tga agc cag-3'	Sequenzierung
Lyn2	5'-cag gaa cta tgt ctg tgc-3'	Sequenzierung
ABLS	5'-gcc agt acg ggg agg tgt a-3'	Sequenzierung

3.1.6 Antikörper

Spezifität	Subtyp	Firma
CD11b/Mac-1	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	Becton-Dickinson (PharMingen)
Gr-1 (Ly-6G)	Ratte-anti-Maus IgG2b, PE-gekoppelt	Becton-Dickinson (PharMingen)
CD45R/B220	Ratte-anti-Maus IgG2a, PE-gekoppelt	Becton-Dickinson (PharMingen)
Isotyp IgG2a	Ratte-anti Maus, Pe-gekoppelt	Becton-Dickinson (PharMingen)
Isotyp IgG2b	Ratte-anti Maus, Pe-gekoppelt	Becton-Dickinson (PharMingen)
Hck (M-28)	Ziege-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
Hck (N-30)	Rabbit-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
c-src (N-16)	Rabbit-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
c-Fgr (C-1)	Rabbit-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
Blk (K-23)	Rabbit-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
Lyn (44)	Rabbit-polyclonal, nicht gekoppelt	Santa Cruz, Heidelberg
Fyn (FYN3)	Rabbit-polyclonal,	Santa Cruz, Heidelberg

	nicht gekoppelt	
c-abl (AB3)	Maus-monoclonal,	Oncogene, Schwalbach
	nicht gekoppelt	
Anti-Rabbit IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') ₂	Amersham, Freiburg
Anti-Maus IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') ₂	Amersham, Braunschweig
Anti-Ziege IgG	Sekundärantikörper, HRP-gekoppeltes F(ab') ₂	Amersham, Braunschweig

3.1.7 Protein-Analyse (Western Blot)

Ammoniumpersulfat (Biomol, Hamburg)
(APS)

TEMED (Roth, Karlsruhe)

Glycin (ICN, Aurora, Ohio, USA)

SDS (ICN, Aurora, Ohio, USA)
(Sodium Dodecyl Sulfat)

Acrylamid 40% (Serva, Heidelberg)

Tris (Amersham, Freiburg)

See Blue® Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe)

Zell-Lysispuffer
 Tris pH8 20 mM
 NaCl 150 mM
 Glycerol 10%
 NP40 1%
 EDTA 10 mM
 ad 100 ml Aqua dest.

+ 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid
 + 10 µg/ml Aprotinin
 + 10 µg/ml Leupeptin
 + 2 mM Natriumorthovanadat (Sigma, St. Louis USA)

3.1.8 Mausstamm

Für alle Mausexperimente wurde der Mausstamm Black 6 (C57BL/6Ntac) der Firma Taconic Farm verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Plattenkultur

Zur Herstellung der Platten wurde das autoklavierte Medium nach dem Abkühlen auf 55°C in sterile Petrischalen gegossen und die Platten bei 4°C invertiert gelagert. Für die Anlegung von Plattenkulturen wurden die Bakterien aus einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatel auf sterile LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Flüssigkultur

Mittels einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien von Plattenkulturen oder aus Cryo-Kulturen gepickt, in LB/Amp-Medium überimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann die Plasmid-DNA isoliert.

Cryo-Kulturen von Bakterien

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur abzentrifugiert und in LB-Amp Medium aufgenommen, das zusätzlich 20% DMSO enthielt. Diese Suspension wurde in 2 ml Röhren abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

Herstellung kompetenter Bakterien

Mit einer gepickten Einzelkolonie des Bakterienstammes XL-1 blue wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD 600 von 0.7 bis 0.8 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhren aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zelleniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4°C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden vorsichtig in je 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben)

wurde der Niederschlag in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen, zügig zu 200 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C . Die Transformations-effizienz betrug zwischen 0.7 und $2.0 \cdot 10^8$ Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

Transformation von Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter E. coli XL1 blue Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA wurde zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden durchgeführt. Dann wurden die Bakterien sofort wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400 µl warmen SOC-Medium wurde für 60 min bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.2 Transfektion und Lyse von Zellen

Transfektion von Cos7-Zellen

Zur Expression von Bcr-Abl in Cos7-Zellen wurden die Zellen 12-24 h von der Transfektion in TC75-Zellkulturflaschen ausgesät. Hierzu wurde eine konfluent gewachsene Flasche 1:6 verdünnt. Die Zellen wurden später mit $1,5\mu\text{g}$ DNA unter Verwendung des Effekten-Transfektions-Kits der Firma Qiagen transfiziert. Hierzu wurde die DNA in $150\mu\text{l}/\mu\text{g}$ Transfektions-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von $8\mu\text{l}/\mu\text{g}$ Enhancer für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe des Effekten-Transfektionsreagenz ($10\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA) wurde die Lösung für weitere 10 min inkubiert. Danach wurde die Lösung langsam auf die Zellen pipettiert, nachdem zuvor das Medium komplett von den Zellen abgenommen worden war. Schließlich wurden 3 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium inklusive des Transfektions-Reagenz entfernt, und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut mit frischem Medium für weitere 24 Stunden inkubiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Flasche abgelöst und lysiert.

Lyse von Cos7-Zellen

Zwei Tage nach der Transfektion wurde das Medium einer TC75 Flasche abgenommen und mit 3ml Trypsin die Zellen abgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl Zell-Lysispuffer aufgenommen und 30 min bei 4°C für 15min im Überkopfschüttler inkubiert. Das unlösliche Zellmaterial wurde anschließend durch Zentrifugation entfernt (15000 x g, 10min, 4°C) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers.

Lyse von 32 D Zellen

1×10^7 Zellen/100µl Lysispuffer wurden während des exponentiellem Wachstums geerntet und 2 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Bestimmung der Aktivität der Inhibitoren wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren oder DMSO bei einer Zelldichte von 5×10^6 /ml für 2 Stunden inkubiert. 1×10^7 Zellen wurden in 100 µl Lysispuffer lysiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen mit Lysispuffer wurden die Zellen für 25 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 15 000 x g zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits der Firma Pierce (Rockford, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers bestimmt.

3.2.3 Apoptosemessung mittels FACS-Analyse

Um die Induktion der Apoptose durch die Inhibitoren zu bestimmen, wurden 5×10^4 Zellen/ml mit den jeweiligen Konzentrationen der Inhibitoren oder DMSO inkubiert. Die Apoptose wurde anhand der Bindung von FITC-konjugiertem Annexin-V an die Membran der apoptotischen Zellen gemessen. 5×10^4 Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 100µl Annexin-V-Bindungspuffer, 2-4 µl Annexin-V-FITC und 2-4 µl Propidiumiodid resuspendiert und für 20 min bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in 200 µl Annexin-V-Bindungspuffer aufgenommen. Die Zahl der Annexin-V-positiven Zellen im Vergleich zu

den Annexin-V-negativen Zellen wurde per FACS-Analyse an einem Coulter EPICS XL-4 Farben Cytometer bestimmt.

3.2.4 Retrovirale Infektion

Die retrovirale Infektion von 32D oder Baf/3 Zellen erfolgte in 24-Well-Platten. Dazu wurden 5×10^4 Zellen mit jeweils gleichen Mengen an Retrovirus in einem Gesamtvolumen von 500 μ l mit 8 μ g/ml Polybren für 4-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1,5 ml Medium auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation der Zellen für 48 Stunden bei 37°C wurde mit der Selektion begonnen. Entweder wurde den infizierten Zellen 1 mg/ml G418 zugegeben und 4 Tage nach Infektion auf IL-3 unabhängiges Wachstum selektiert, oder nach 48 h sofort auf IL-3 unabhängiges Wachstum selektiert.

Die retrovirale Infektion von frisch präpariertem murinen Knochenmarkszellen erfolgte in 6-Well-Platten. Die Zellen wurden in DMEM Medium (4,5 g/L Glucose) mit 10% WEHY-Überstand, 10% FCS und 0,5% Penicillin/Streptomycin isoliert. Für die Infektion wurden 1×10^6 Zellen/ml mit jeweils gleichen MOIs der retroviralen Stocks in einem Gesamtvolumen von 4 ml mit 2 μ g/ml Polybren, 5 μ g/ml IL-7 und 10 mM HEPES inkubiert. Es wurde eine Spininfektion durchgeführt. Dazu wurden der Ansatz bei 1530 x g für 90 min bei 30°C zentrifugiert. Dem folgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 37°C. Die infizierten Zellen wurden anschließend 2 mal mit PBS gewaschen und im Whitlock/Witte Medium aufgenommen. Nach 5 Tagen wurden die toten Zellen mittels Zentrifugation entfernt.

Für die retrovirale Infektion von NIH3T3 Zellen wurden ein Tag vor Infektion 2×10^5 Zellen in ein 6-Well ausgesät. Die Infektion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1ml DMEM Medium mit 10%FCS, 8 μ g/ml Polybren und Virus. 24 Stunden nach Infektion wurde das Medium gegen 2ml frisches Medium gewechselt. 48 Stunden später erfolgte die GFP Messung mittels FACS-Analyse.

Für retrovirale Infektion von Rat-1 Fibroblasten wurden ein Tag vorher $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6cm-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Verdünnungen des Virusstocks (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), 8 μ g/ml Polybren in DMEM mit 10%FCS in einem Gesamtvolumen von 2ml infiziert.

3.2.5 Bestimmung des Retrovirus-Titers

Die Titerbestimmung des pMSCV-b/a IRES GFP-Virus wurde über GFP-Messung per FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden NIH3T3 Zellen mit 250 μ l, 125 μ l, 62,5 μ l, 31,25 μ l, 15,6 μ l und 7,8 μ l Viruspräparation infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Danach wurde die Zellzahl pro Well und der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Der Titer berechnete sich aus der Gesamtzellzahl pro 6-well x Anteil der GFP-positiver Zellen \div μ l Virus-Präparation x 1000 = CFU/ml.

Der Titer des pMSCV-Bcr-Abl-Neomycin Virus wurde in Rat-1 Zellen bestimmt. Rat-1 Zellen wurden mit verschiedenen Viruskonzentrationen infiziert (siehe Abschnitt 6.2.4) und unter G418-Selektion gesetzt. 24 Stunden nach Infektion wurde das Medium mit Virus und Polybren abgenommen und frisches Medium mit 800 μ g/ml G418 zu den Zellen gegeben. Alle 2 Tage wurden die infizierten Zellen gewaschen und das Medium mit G418 ausgetauscht. Ungefähr am Tag 9 nach Infektion wurden die Zellen mit 0,5% Crystal Violet (Sigma Ca. CO775, St. Louis, USA) und 20% Methanol für 10 min auf dem Schüttler gefärbt. Die angefärbten Kolonien wurden gezählt und der Titer bestimmt.

3.2.6 Knochenmarks-Transplantation: Induktion von B-ALL in Mäusen

Spendertiere

Es wurden 8-12 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse als Knochenmarksspender verwendet.

Ernte der Knochenmarkszellen

Die Spendermäuse wurden durch CO₂-Begasung geopfert. Anschließend wurden Tibia und Femur freipräpariert und die Knochen ohne Verzögerung in einen Zellkultur-Arbeitsplatz überführt. Dort wurden die Knochen durch Abschneiden der Enden geöffnet und über einer 50 ml Röhre das Knochenmark ausgespült. Dazu wurde eine 10 ml Spritze mit DMEM-Medium (+ 10% WEHY, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) gefüllt und mit einer 27Ga ½ Nadel bestückt. Dann wurde die Nadel in die Markhöhle eingeführt und das

Knochenmark mit Medium ausgespült. Die Prozedur wurde vom anderen Ende des Knochens wiederholt. Um Klumpen zu vermeiden wurde, das Knochenmark anschließend kräftig auf und ab pipettiert und anschließend für 10 min stehen gelassen, um zellfremde Bestandteile der Präparation absetzen zu lassen. Der Überstand wurde danach in eine frische Röhre überführt und für die Infektion eingesetzt.

Lyse der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden nur lysiert, wenn das infizierte Knochenmark ausschließlich für Zellkultur-Experimente diente, oder zur Bestimmung der Zellzahl. Für die Transplantation wurde infiziertes Knochenmark mit Erythrozyten verwendet. Die Lyse erfolgte mit Ammoniumchlorid-Lösung (150 mM NHCl_4 , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Dazu wurden die Zellen pelletiert, das Pellet dann in 2-3 ml Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Ammoniumchlorid-Lösung mit 10-15 ml DMEM-Medium (+ 10% WEHY, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) verdünnt, abzentrifugiert und dann noch einmal mit dem Medium gewaschen.

Infektion der Knochenmarkszellen

Für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL wurde das Bcr-Abl-Gen durch retrovirale Infektion in die Knochenmarkszellen eingebracht. Die in dieser Arbeit verwendeten Titer lagen je nach Experiment zwischen 1×10^7 und 5×10^7 CFU/ml. Die Infektion ist im Abschnitt „retrovirale Infektion“ beschrieben. Nach der Infektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in DMEM (mit 10% FCS) aufgenommen.

Transplantation

Als Empfängermäuse wurden 8-10 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse verwendet. 2-5 Stunden vor dem Transplantat wurden die Mäuse einmalig mit einer Dosis von 870Gcy bestrahlt. Pro Tier wurden 1×10^6 infizierte Knochenmarkszellen in 300 μ l intravenös gespritzt. Dazu wurde die Schwanzvene der Maus für 1-2min in warmes Wasser gehalten, um die Vene deutlicher hervortreten zu lassen. Anschließend wurden 300 μ l der Zellsuspension in die Schwanzvene injiziert.

Analysen der Mäuse

Um den Krankheitsverlauf zu dokumentieren, wurden in regelmäßigen Intervallen die Mäuse gewogen, auf physische und motorische Auffälligkeiten hin untersucht und peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurde die Vene mit einem Skalpell leicht angeritzt und das hervorquellende Blut mittels einer Kapillare (Microvette CB 300, Sarstedt, Nümbrecht), die mit Kalium-EDTA beschichtet war, aufgefangen. Die Blutanalysen wurden von Dr. Diem aus der Physikalischen Chemie am Klinikum Großhadern durchgeführt. Dort wurden Leukozytenzahlen bestimmt und die Blutausstriche per Pappenheim-Färbung gefärbt.

Von den geopferten Mäusen wurde Lunge, Milz und Leber auf Krankheitssymptome untersucht und anschließend in Formalin aufbewahrt. Das Knochenmark wurde isoliert und per FACS-Analyse die Zahl der Zellen bestimmt, die sowohl CD45R/B220 als auch GFP exprimierten. Im Vergleich dazu wurden die Zellen auch auf die Expression von Mac-1/GFP und GR-1/GFP hin untersucht. Auch die jeweiligen Isotypen wurden bei der Färbung als Kontrollen mit verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Lyse der Erythrozyten mit 1 µl Antikörper in 150 µl PBS. Die Proben wurden 30 min unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert, danach einmal mit PBS gewaschen und das Pellet in 1% Paraformaldehyd /PBS resuspendiert. Die gefärbten Zellen wurden dadurch fixiert und konnten in den folgenden 7 Tagen analysiert werden. Dies wurde mittels FACS-Analyse im Klinikum Großhadern unter Aufsicht von Tatjana Heller durchgeführt.

3.2.7 Protein Analyse

Lyse von Zellen

Die Zusammensetzung des Lysispuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung und sollten je nach Fragestellung immer optimiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysispuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. NP40 ist ein etwas stärkeres Detergens, kann aber in geringeren Konzentrationen verwendet werden und macht auch Membranproteine gut löslich. Die Funktionen der anderen Komponenten sind: Glycerin → Gefrierschutz, EDTA → Komplexierung von Mg^{2+} und Mn^{2+} und damit Inhibierung von Kinasen, NaCl →

Osmolarität, Tris-Cl → pH-Puffer, Natriumfluorid → Serin- und Threonin-Phosphatase-inhibitor, und Phenylphosphat → Phosphataseninhibitor. Zusätzlich wurden dem Lysis-puffer folgende Inhibitoren zugefügt: PMSF, Leupeptin, Aprotinin (Protease-Inhibitoren), sowie Na-Orthovanadat (Tyrosinphosphatase-Inhibitor). Alle Zelllysate müssen auf Eis gehalten werden, um Proteine und Proteinkomplexe zu schützen (Proteolyse, Dissoziation).

SDS-PAGE und Westernblot

Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht über Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einem konstanten Verhältnis (1 SDS/2 Aminosäuren) so an Proteine, dass die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird.

Zusätzlich wurde die Technik der *disc*-Elektrophorese (*discontinuous* pH) angewandt. Hierbei wird mit zwei unterschiedlichen Gelen bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgt ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hat zur Folge, dass die Banden schärfer begrenzt sind und besser aufgetrennt werden.

Herstellen der Polyacrylamidgele

Zwei Glasplatten (für 8 x 10 cm große Gele) wurden mit 70% Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Die Reagenzien wurden in der oben angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagrecht gehaltenen Glasplatten laufen gelassen. Der Zwischenraum wurde bis etwa 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf dieselbe Weise mit etwas Wasser überschichtet und für mindestens eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Wasserschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgossen. Nach zweimaligem Ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt.

APS 10%:

10%-ige Lösung von APS in dd H₂O, die

Trenngel 10%:

Acrylamid/Bis.(40%) 1,25 ml

aliquotiert und bei -20 °C gelagert wird	4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
	dd H ₂ O	2,5 ml
	TEMED	17 µl
	APS 10%	7 µl

4x Tris-Cl/SDS pH 8,8:

dd H ₂ O	300 ml
Tris	91 g
SDS	2 g
dd H ₂ O	ad. 500 ml
mit HCl pH 8,8/6,8 einstellen	

Sammelgel:

Acrylamid/Bis. (40%)	150 µl
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	0,4 ml
dd H ₂ O	1 ml
TEMED	2 µl
APS 10%	8,5 µl

→ mit 0,45 µm Filter filtrieren

Trenngel 7%:

Acrylamid/Bis. (40%)	875 µl
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
dd H ₂ O	2,7 ml
TEMED	17 µl
APS 10%	7 µl

Dann wurde ein vorher mit 70% Ethanol gereinigter Kamm (10 Zähne) so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt.

Laden und Starten des Gels

2x Probenpuffer:

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5 ml
SDS 10%	20 ml
β-ME	2 ml
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	1 mg
dd H ₂ O	45,5 ml

5x Elektrophoresepuffer:

Tris	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g

dd H₂O ad. 1000 ml

Rainbow-Marker (Mix aus angefärbten, rekombinanten Proteinen):

250 kD	blau
160 kD	rot
105 kD	grün
75 kD	gelb
50 kD	violett
35 kD	blau
30 kD	orange
25 kD	grün
15 kD	blau
10 kD	rot

Die Lysate oder IPs wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5 min auf 100°C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit 5 µl Proteinmarker beladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei 4 °C im Kühlraum statt. Der Gellauf erfolgte bei 100-125 V.

Transfer (Westernblot)

Transferpuffer:

Tris	24,22 g
Glycin	115,3 g
Methanol	1600 ml
dd H ₂ O	ad. 8000 ml

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese zur weiteren Handhabung auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in dd H₂O geschwenkt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman 3 MM-Papierstücke der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Wenn die blaue Farbmarker-Bande am unteren Rand der Glasplatte angelangt war, wurde der Gellauf beendet und das Sammelgel abgeschnitten. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei (ausrollen mit Pipette) aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman, Gel, Nitrocellulose, Whatman, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt,

dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4°C (Kühlraum) und 100 V für etwa eine Stunde.

Da Antikörper auch unspezifisch an verschiedene Materialien binden können, ist es notwendig, alle Stellen der Membran, an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem „inerten“ Protein zu blockieren. Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 2 h in einer Plastikschiene mit Blocking-Solution (5% Magermilchpulver oder 5% BSA in TBST) geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1x TBST gespült und einmal für 5 min in 1x TBST geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution wegzuwaschen. Wenn eine Inkubation mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt werden sollte, wurde die Membran an den entsprechenden Stellen mit einem Skalpell geschnitten.

Antikörper-Inkubation

Die meisten der verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:5000 Verdünnungen jeweils in Blocking-Solution eingesetzt.

Die Membran wurde in ein Falconröhrchen eingerollt, so dass die Proteinseite nach innen zeigte. Die Inkubation erfolgte in dem Röhrchen mit 3 ml der Antikörperlösung für 1-2 Stunden auf einem Taumelrolleninkubator. Dann wurde die Membran zunächst viermal mit TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper ebenfalls in dem Röhrchen für 30 min inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem dreimaligen Waschen.

Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dabei wird durch die an die sekundären Antikörper gebundene Peroxidase die Oxidation eines Diacylhydrazids katalysiert. Bei dieser Reaktion entstehen Stickstoff und Licht, das Schwärzungen auf einem aufgelegten Film erzeugt.

Die ECL-Lösungen wurden 1:1 gemischt (2 + 2 ml für eine etwa 8 x 10 cm große Membran). Die Membran wurde mit einem Papiertuch gut getrocknet und in einer Plastikschiene mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf ein

mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt. Das Ganze wurde mit einer Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für 2-60 Sekunden mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Foliestift übertragen.

Strippen der ECL-Blots

Stripping-Solution:

Tris-Cl pH 6,7	3,78 g
SDS	10 g
β-ME	3,5 ml
dd H ₂ O	ad. 500 ml

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die Membran mehrfach (bis zu dreimal) einer Immundetektion zu unterziehen. Bei dem sogenannten „Strippen“ werden zunächst sowohl die sekundären als auch die primären Antikörper von der Membran entfernt. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich.

Die Membran wurde im Wasserbad bei 50 °C für 30 min in Stripping-Solution geschüttelt, dann mit 1x TBS einmal gespült und zweimal für 10 min gewaschen. Schließlich wurde erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert wie oben angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Bindungsmechanismus des Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors STI571

4.1.1 Die Positionen 315 und 380 in der Kinase-Domäne von Abl sind wichtig für die STI571-Bindung

Laut Computermodellen des Abl/STI571Komplexes mit Mutationen an den Positionen Thr315M und Ala380Thr würden Aminosäuren mit sperrigeren Seitenketten den Zugang zu der Inhibitor-Bindetasche stark einschränken (siehe Abbildung 5A). Die Positionen Thr315 und Ala380 könnten also eine Spezifitätsdeterminante für die Bindung von STI571 darstellen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden folgende Punktmutationen in Bcr-Abl mittels PCR-Mutagenese eingebracht: Thr315 wurde mutiert zu Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Methionin (Met), Glutamin (Gln) oder Phenylalanin (Phe). Ala380 wurde mutiert zu Cystein (Cys) oder Threonin (Thr). Die Expression in Cos7-Zellen zeigte bei allen Mutanten der Position 315 eine dem Bcr-Abl-Wildtyp vergleichbare, teilweise leicht erhöhte, spontane Kinase-Aktivität (siehe Abbildung 5B). Im Gegensatz dazu führten die Mutationen Ala380Cys und Ala380Thr zu einer ca. 50% niedrigeren Kinase-Aktivität (siehe Abbildung 5B).

Substrat- und Autophosphorylierung (pTyr245-Abl) von Bcr-Abl Wildtyp konnte mit STI571 in einer konzentrationsabhängigen Weise gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Die Mutanten Thr315Val, Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met, Thr315Gln und Thr315Phe, sowie Ala380Thr zeigten dagegen bis zu einer Konzentration von 10 μ M STI571 keinen Rückgang der Autophosphorylierung von Bcr-Abl (siehe Abbildung 5B).

Weiterhin sollte der biologische Effekt von STI571 auf die hergestellten Mutanten von Bcr-Abl untersucht werden. Dazu wurden Bcr-Abl Wildtyp und die oben genannten Bcr-Abl-Mutanten in die hämatopoetische, IL-3-abhängige Zelllinie 32D mittels retroviraler Infektion eingebracht. Da die Kinase-Aktivität von Bcr-Abl diese Zelllinie zu IL-3-unabhängigen Wachstum transformiert, konnten positive Mischklone durch IL-3 Entzug selektiert werden. Dosis-Wirkungskurven zeigten, dass in 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen mit 1 μ M –

2,5 μM STI571 ein kompletter Proliferationsstopp und Apoptose von ca. 90% der Zellen innerhalb von zwei Tagen induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt korrelierte sowohl mit einer kompletten Herunterregulierung der Bcr-Abl Autophosphorylierung als auch mit einer Inhibition der Phosphorylierung von STAT5 und Jnk (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte mit 1 μM und 2,5 μM STI571 in 32D-Zellen, welche die Mutanten von Bcr-Abl exprimierten, keine Blockierung der Proliferation und keine Apoptose induziert werden (siehe Abbildung 5C). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit allen Mutanten erzielt, mit Ausnahme der Mutation Ala380Cys, die in 32D-Zellen keine Resistenz vermitteln konnte (siehe Abbildung 5C). Die Mutation Ala380Thr konnte in 32D-Zellen keine vollständige Resistenz gegenüber STI571 erzeugen, da 2,5 μM STI571 eine deutliche Inhibition der Zellproliferation und ca. 20% bis 25% apoptotischer Zellen zur Folge hatte (siehe Abbildung 5C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse die Bedeutung der Positionen 315 und 380 als Spezifitätsdeterminanten auf, die den Zugang zur Inhibitor-Bindetasche kontrollieren.

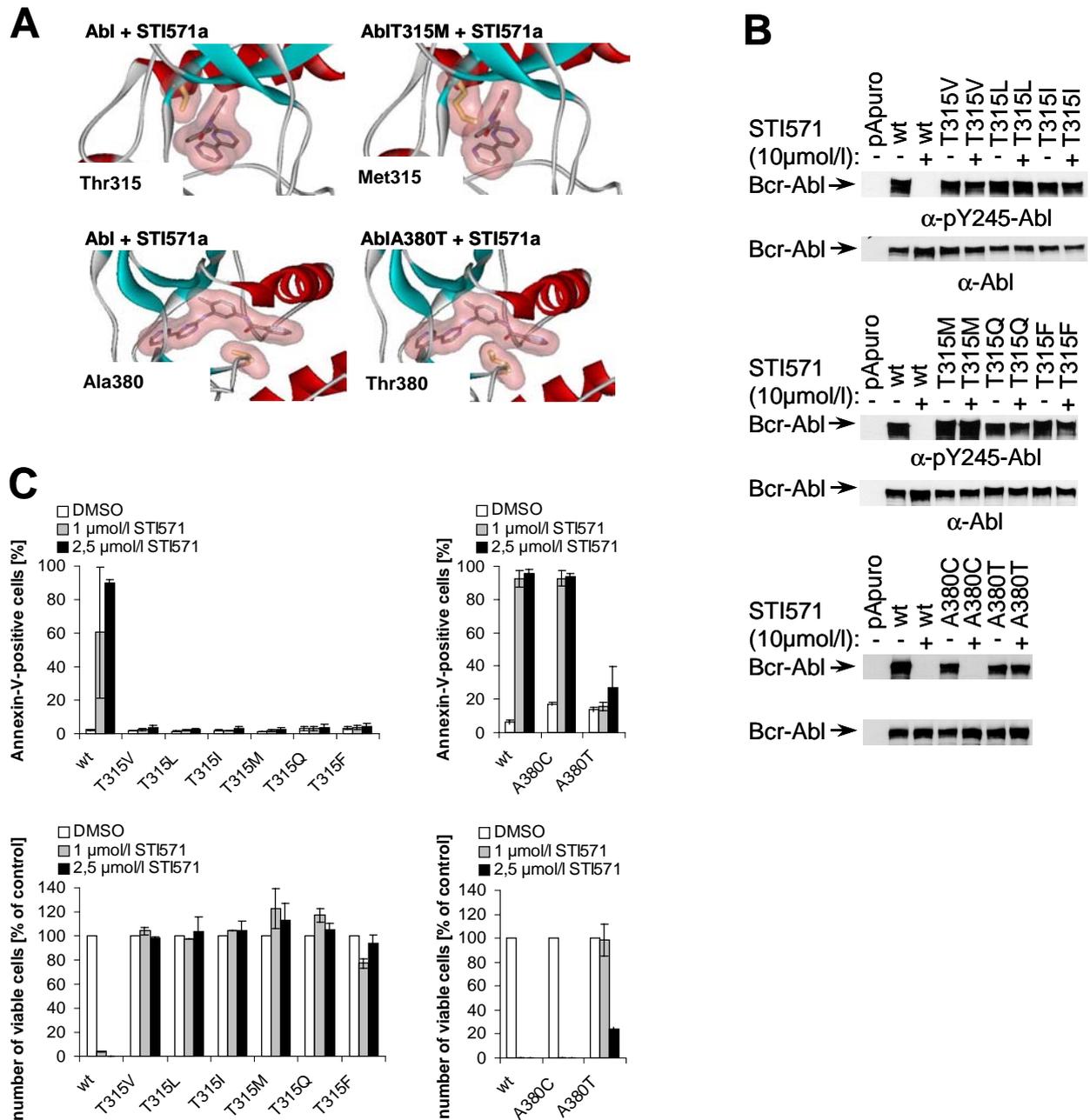


Abbildung 5: Der Effekt des Austausches der Aminosäuren an den Positionen 315 und 380 auf die Inhibition von Bcr-Abl durch STI571. (A) Computer-Modelle von STI571 in Komplex mit Abl oder einem Mutanten von Abl an der Position 315 zu Methionin und 380 zu Threonin. Die Mutationen wurden in die Abl Struktur mit Hilfe der Swiss Prot Structure Viewers software eingebracht und basieren auf bereits veröffentlichten Koordinaten des Abl/STI571-Analogen Komplexes (Schindler et al., 2000). (B) Cos7-Zellen wurden entweder mit pApuro, Bcr-Ablwt oder den angegebenen Mutanten von Bcr-Abl an den Positionen 315 und 380 transfiziert. Die Zellen wurden entweder unbehandelt lysiert oder vorher für 4h mit 10 µM STI571 inkubiert. Phosphorylierung von Bcr-Abl wurde durch einen anti-phospho-Abl-Antikörper ermittelt. Expression wurde durch einen anti-Abl-Antikörper kontrolliert. (C) Überleben und Proliferation von 32D-Zellen, die Bcr-Ablwt oder einen der beschriebenen Bcr-Abl Mutanten an Position 315 und 380 exprimieren. 5×10^4 Zellen/ml wurden jeweils ausgesät und mit DMSO, 1 oder 2,5 µM STI571 behandelt. Überleben und Proliferation wurden 48h später mittels FACS-Analyse ermittelt.

4.1.2 Die Konformation der katalytischen Schleife in Abl beeinflusst die Bindung von STI571 an Abl

Gemäß der Kristallstruktur des Abl/STI571-Komplexes schien die Ausbildung einer inaktiven Konformation der katalytischen Schleife („Activation-(A)-Loops“) von Abl eine weitere Voraussetzung für die Bindung von STI571 an Abl zu sein (Schindler et al., 2000). Für eine genetische Validierung dieser Hypothese wurden nach intramolekularen Interaktionen der Aktivierungsschleife von inhibierten Abl mit anderen Regionen des Moleküls gesucht. Eine Störung dieser Interaktionen könnte zu einer Destabilisierung der A-Schleife führen, was Abl hyperaktivieren und zu einer Desensibilisierung gegenüber STI571 führen könnte. Es gelang uns, eine Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen Arg386 (auf der A-Schleife) und Asp276/Glu279 (auf dem β 3- α C-Loop) zu identifizieren (siehe Abbildung 6A), die innerhalb STI571-sensitiver Kinasen hoch konserviert war. Weiterhin stand keine dieser Aminosäuren in direktem Kontakt mit STI571.

Um die Bedeutung dieser Interaktion für die Regulation der Kinase-Aktivität und für die Bindung von STI571 zu beweisen, wurden die beiden Aminosäuren Asp276 und Glu279 zu Serin mutiert. Die Expression von Bcr-Abl Asp276Ser/Glu279Ser in Cos7-Zellen zeigte eine geringfügige, aber reproduzierbare Erhöhung der Kinase-Aktivität (siehe Abbildung 6B) und eine deutlich reduzierte Sensibilität der Mutante gegenüber STI571 (siehe Abbildung 6C). Darüber hinaus führte die Expression dieser Mutante in 32D-Zellen zu einer Zunahme der IC₅₀ (Inhibitorischen Konzentration 50%) etwa um das 10fache, von ca. 0,069 μ M in 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen auf ca. 0,71 μ M in 32D_{Bcr-Abl Asp276Ser/Glu279Ser} (siehe Abbildung 6D). Im Vergleich zu Bcr-Ablwt wurde die Zahl der apoptotischen Zellen bei 2 μ M STI571 von 90% auf 30% reduziert (siehe Abbildung 6D).

Kristallstruktur-Analysen zeigten, dass die Aminosäure Arg386 mit konservierten Autophosphorylierungs-Tyrosinen auf der A-Schleife in aktiven Kinasen interagiert, wie z.B. Lck („lymphoid T-cell protein tyrosine kinase“) oder dem Insulin-Rezeptor (IRK) (Hubbard, 1997; Yamaguchi and Hendrickson, 1996). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Dephosphorylierung von Tyr393, einer der wichtigsten Autophosphorylierungsstellen von Abl, eine Voraussetzung für die STI571-Bindung sein könnte. Eine Mutante dieser Autophosphorylierungsstelle zu Phenylalanin sollte demnach nicht mehr dephosphoryliert werden können und dadurch eine gesteigerte Sensitivität gegenüber

STI571 besitzen. Überraschenderweise hatte jedoch die Mutation von Tyr393 in Bcr-Abl zu Phenylalanin (Bcr-Abl_{Tyr393Phe}) kaum einen Effekt auf die Sensitivität von Bcr-Abl gegenüber STI571 in Cos7-Zellen und auch nur einen geringfügigen biologischen Effekt in 32D-Zellen (siehe Abbildung 6C-D). Diese Daten belegen, dass die Ausbildung einer inaktiven Konformation der A-Schleife von Abl eine wichtige Voraussetzung für STI571-Bindung darstellt, während die Dephosphorylierung von Tyr393 durch endogene Phosphatasen kein limitierender Faktor für die STI571 Bindung an Abl zu sein scheint.

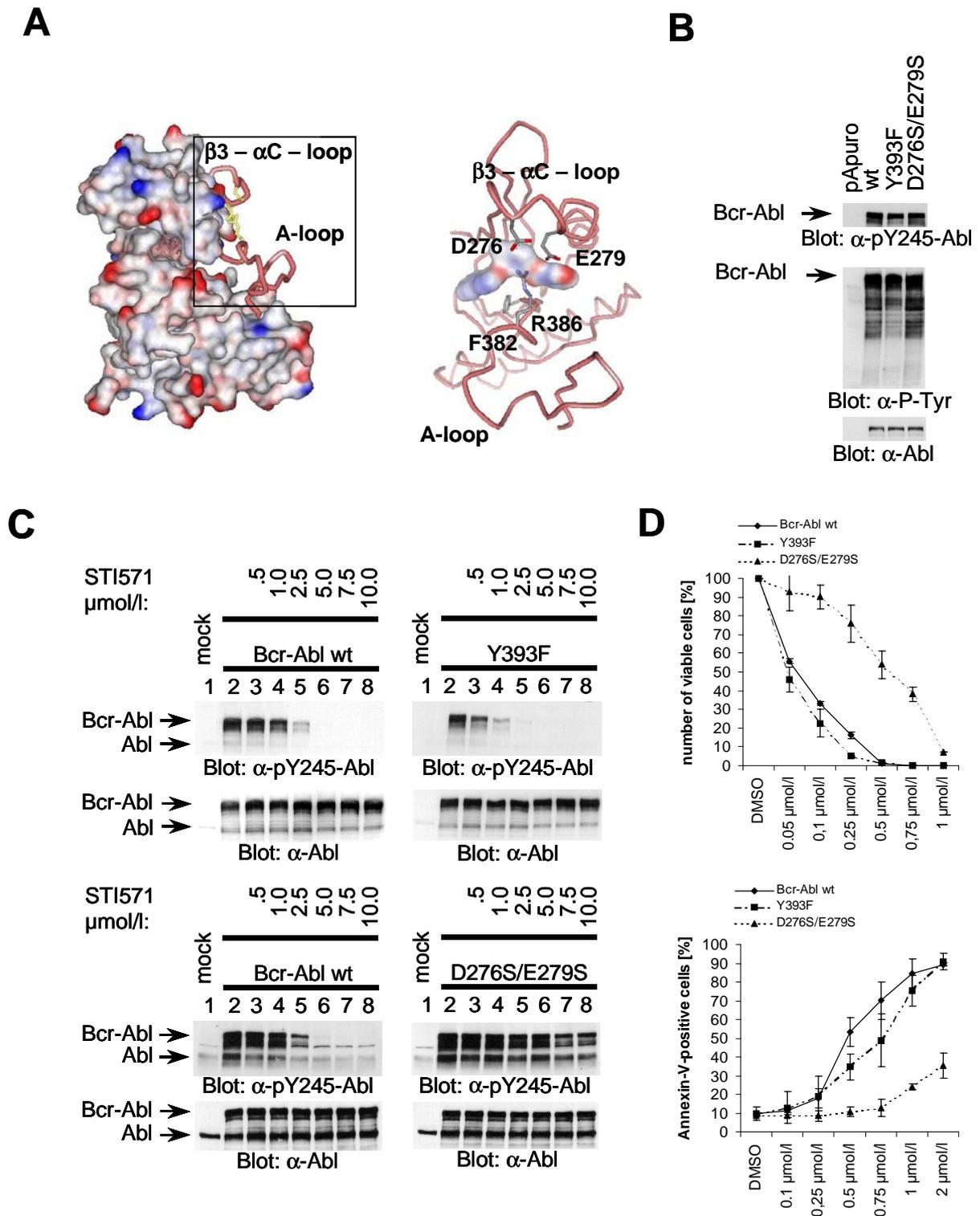


Abbildung 6: Bedeutung von Phe382 und der katalytischen Schleife von Abl für die STI571-Bindung. (A) Schematische Darstellung der Wechselwirkung des A-Loop mit dem $\beta 3$ - αC -Loop über die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen Arg386 (R386) und Asp276/Glu279 (D276/E279). (B) Cos7-Zellen wurden mit 1 μ g pApuro, Bcr-Ablwt, Bcr-AblTyr393Phe oder Bcr-AblAsp276Ser/Glu279Ser transfiziert. Die Aktivität der verschiedenen Bcr-Abl Mutanten wurde über einen Phospho-Abl-Antikörper und einen Phosphotyrosin-Antikörper bestimmt. (C) Phospho-Abl- und Abl-Immunoblots von Lysaten von Cos7-Zellen, die mit pApuro, Bcr-Ablwt oder den angegebenen Bcr-Abl Mutanten transfiziert waren. Die Zellen waren entweder unbehandelt oder wurden mit den angegebenen Mengen an STI571 inkubiert. (D) Proliferation und Überleben von

32D-Zellen, die entweder Bcr-Ablwt oder einen der angegebenen Bcr-Abl Mutanten exprimierten und mit verschiedenen Konzentrationen von STI571 inkubiert wurden.

4.2 Dualspezifische Src/Abl-Inhibitoren

4.2.1 PP1 und CGP76030 führen in Bcr-Abl-positiven Zellen zu Wachstumsstop und Apoptose

Das rasche Auftreten von direkten STI-Resistenzen während der Therapie in Patienten mit fortgeschrittenen Bcr-Abl-positiven Leukämien könnte die Inhibition von zusätzlichen Signalmolekülen notwendig machen, um Bcr-Abl-positiven B-ALL und CML in der Blastenkrise zu therapieren. Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, aktiviert Bcr-Abl über einen Kinase-unabhängigen Mechanismus Src-Kinasen (Warmuth et al., 1997), die durch STI571 nicht direkt inhibiert werden können. Die unterschiedliche Sensitivität von Abl und Src-Kinasen auf STI571 könnte auf die unterschiedliche Konformation der A-Schleife und die Orientierung von Phe382 zurückzuführen sein. Jedoch sind die Aminosäuren, welche die STI571-Bindetasche bilden, hoch homolog. Aus diesem Grunde kann man bei vielen Src-Kinase-Inhibitoren eine Kreuzreaktivität auf die Abl-Kinase feststellen.

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.1 vorgestellten Bcr-Abl Mutanten konnte der Bindungsmodus und die biologische Aktivität von zwei dualspezifischen Src/Abl-Inhibitoren, PP1 und CGP76030, charakterisiert werden (siehe Abbildung 7A-B). Beide Substanzen hemmten Bcr-Ablwt konzentrationsabhängig. Etwa 25-50 μM PP1 und 5-10 μM CGP76030 waren nötig, um die Autophosphorylierung und die Substratphosphorylierung von Bcr-Ablwt in Cos7-Zellen zu hemmen (siehe Abbildung 7C). Die Hemmung der Substratphosphorylierung durch STI571 korrelierte stark mit der Hemmung der Autophosphorylierung. Interessanterweise blieb im Gegensatz dazu bei der Inhibition mit PP1 oder CGP76030 in Bcr-Ablwt ein gewisser Restanteil an Autophosphorylierung zurück, selbst wenn die Substratphosphorylierung vollständig blockiert werden konnte (siehe Abbildung 7C-D). Sowohl PP1 als auch CGP76030 induzierten einen Wachstumsstop und Apoptose in 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen. Dabei waren in Bezug auf den erzielten Effekt in 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen 50 μM PP1 und 5 μM CGP76030 mit 2,5 μM STI571 vergleichbar (siehe Abbildung 7E-F). Dieser biologische Effekt korrelierte gut mit den Konzentrationen,

welche für eine Inhibition der Autophosphorylierung von Bcr-Abl und Src-Kinasen in $32D_{Bcr-Ablwt}$ Zellen nötig waren (siehe Abbildung 11C). Im Gegensatz zu STI571 beeinflussten sowohl PP1 als auch CGP76030 das Überleben und Wachstum parentaler $32D$ -Zellen negativ (Daten nicht gezeigt).

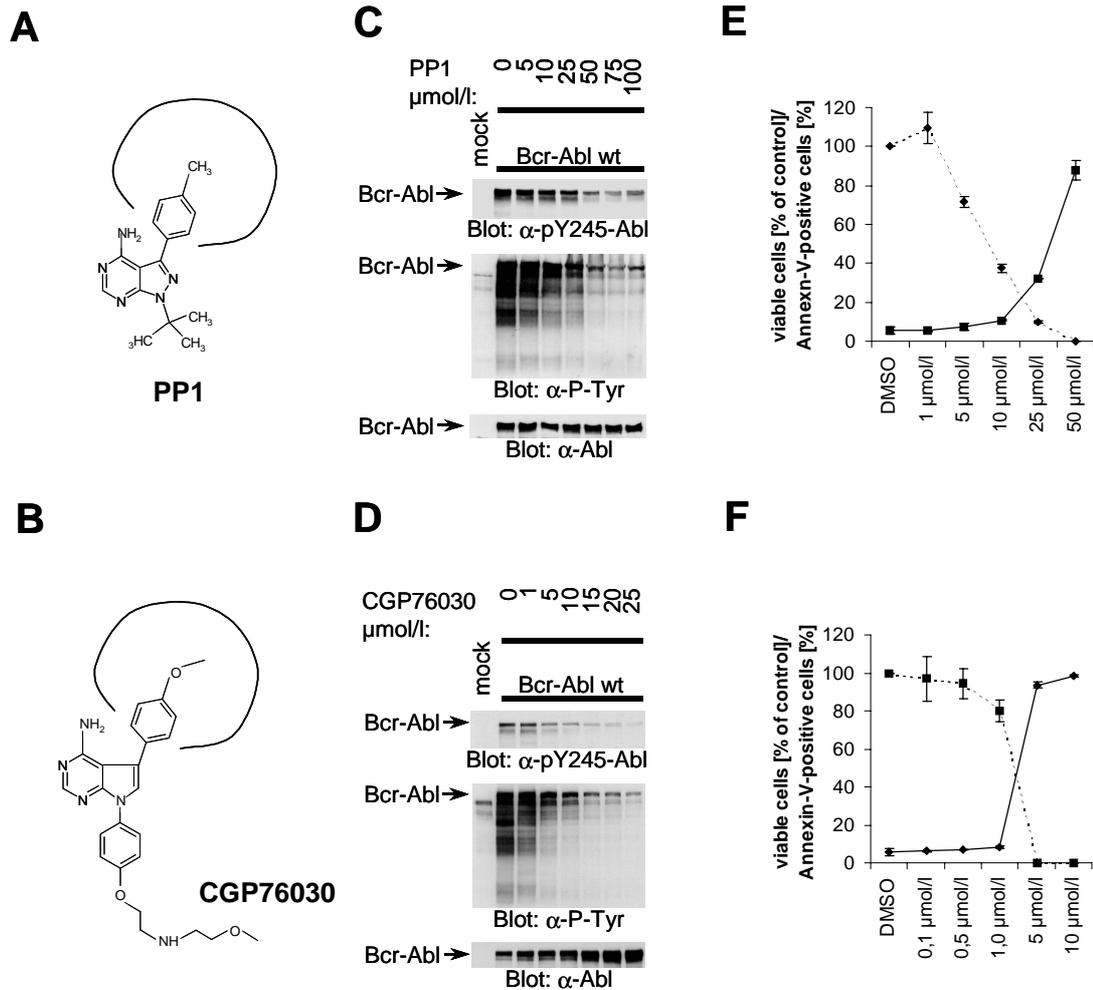


Abbildung 7: Hemmung der Kinaseaktivität von Bcr-Abl Wildtyp durch PP1 und CGP76030. PP1 und CGP76030 inhibieren Bcr-Ablwt konzentrationsabhängig und induzieren Apoptose in $32D_{Bcr-Ablwt}$ Zellen. (A-B) Strukturformeln der Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030. (C-D) Cos7-Zellen wurden mit pApuro oder Bcr-Ablwt transfiziert und entweder unbehandelt belassen oder mit den angegebenen Konzentrationen von PP1 und CGP76030 4h vor Lyse inkubiert. Phosphorylierung von Bcr-Abl und von zellulären Proteinen wurden mit einem anti-phospho-Abl- und einem anti-phospho-Tyrosin-Antikörper ermittelt. Die gleichmäßige Expression von Bcr-Abl wurde über einen anti-Abl-Antikörper kontrolliert. (E-F) Überleben (durchgezogene Linie) und Proliferation (gestrichelte Linie) von $32D_{Bcr-Ablwt}$ Zellen in der Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen von PP1 (E) und CGP76030 (F).

Dieser Effekt spiegelt möglicherweise die Bedeutung von Src-Kinasen innerhalb der IL3-abhängigen Signaltransduktion wieder, die von verschiedenen Forschergruppen belegt wurde (Reddy et al., 2000).

Um den Effekt von CGP76030 auf Wachstum und Überleben von Bcr-Abl-positiven Zellen weiter zu untersuchen, wurden zwei Bcr-Abl⁺-Zelllinien (K562 und LAMA84) und eine Reihe von Bcr-Abl⁻-Zelllinien (U937, HL-60, OCI-AML5) mit unterschiedlichen Konzentrationen von STI571 oder CGP76030 inkubiert. Der biologische Effekt beider Inhibitoren war vergleichbar. CGP76030 inhibierte bei den angegebenen Konzentrationen Wachstum und Überleben der Bcr-Abl⁺ Zellen, nicht aber der Bcr-Abl⁻-Zelllinien (siehe Abbildung 8 A-B). Dies deutet darauf hin, dass CGP76030 nicht generell toxisch ist, sondern über einen spezifischen Mechanismus wirkt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit PP1 erhalten (Daten nicht gezeigt).

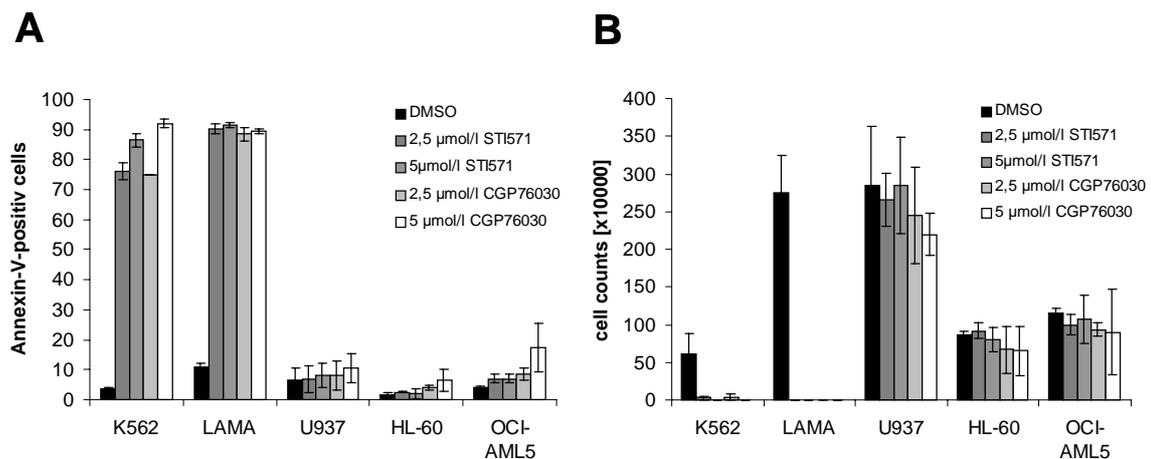


Abbildung 8: Effekt von CGP76030 auf Wachstum und Überleben von Bcr-Abl⁺-Zelllinien und AML-Zelllinien. Die verwendeten Bcr-Abl⁺ und AML-Zelllinien wurden mit den angegebenen Mengen an CGP76030 inkubiert. DMSO wurde als Vehikel-Kontrolle verwendet. Der Anteil Annexin-V-positiver Zellen (A) und Lebendzellzahlen (B) wurden nach drei Tagen bestimmt.

4.2.2 STI571, PP1 und CGP76030 hemmen Bcr-Abl über einen überlappenden Bindungsmechanismus

Mit Hilfe der beschriebenen Punktmutanten von Bcr-Abl wurde der Bindungsmodus von PP1 und CGP76030 genauer charakterisiert. Genau wie STI571 konnten PP1 (100

μM) und CGP76030 (25 μM) in Cos7-Zellen die Bcr-Abl-Mutanten Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met, Thr315Gln und Thr315Phe nicht hemmen (siehe Abbildung 9). Die Mutante Bcr-AblThr315Val zeigte jedoch noch eine dem Wildtyp vergleichbare PP1-Sensitivität, obwohl diese Mutation gegenüber STI571 eine komplette Resistenz erzeugte. Die Inhibition von Bcr-AblThr315Val durch 25 μM CGP76030 war deutlich reduziert (siehe Abbildung 9). Zusammengefasst zeigen diese Daten eine unterschiedliche Bedeutung der H-Brücken zwischen Thr315 und PP1 bzw. Thr315 und CGP76030 für die Inhibitorbindung.

Im Gegensatz zu der Position 315 in Bcr-Abl, die für die Bindung von PP1 und CGP76030 von elementarer Bedeutung war, spielte die Position 380 keine Rolle. Die beiden untersuchten Mutanten an dieser Position (Ala380Cys und Ala380Thr) zeigten eine dem Wildtyp vergleichbare Sensitivität gegenüber PP1 und CGP76030 (siehe Abbildung 9). Bei Expression der Mutante Bcr-AblAsp276Ser/Glu279Ser in Cos7-Zellen konnte auch hier eine Inhibition durch PP1 und CGP76030 mit einer dem Bcr-Ablwt vergleichbaren Kinetik festgestellt werden (siehe Abbildung 10A-B). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass STI571, PP1 und CGP76030 in die gleiche, der ATP-Bindestelle benachbarten Inhibitor-Bindetasche binden und dabei überlappende Bindungsmodi besitzen. Jedoch scheint die Bindung von PP1 und CGP76030 unabhängig von der Konformation der A-Schleife zu sein, da die Bcr-Abl Mutanten AblAsp276Ser/Glu279Ser keine Resistenz erzeugten. Weiterhin könnte die fehlende oder inkomplette Resistenz der Bcr-Abl Mutanten Thr315Val, Ala380Cys und Ala380Thr ein Zeichen dafür sein, dass PP1 und CGP76030 den Eingang zur Inhibitor-Bindetasche nicht so perfekt ausfüllen wie STI571, was über eine Kristallstruktur aber noch zu beweisen wäre. Diese Überlegung ist jedoch vereinbar mit der Tatsache, dass PP1 und CGP76030 zusätzlich zu Bcr-Abl die Familie der Src-Kinasen und andere Zielmoleküle inhibieren können.

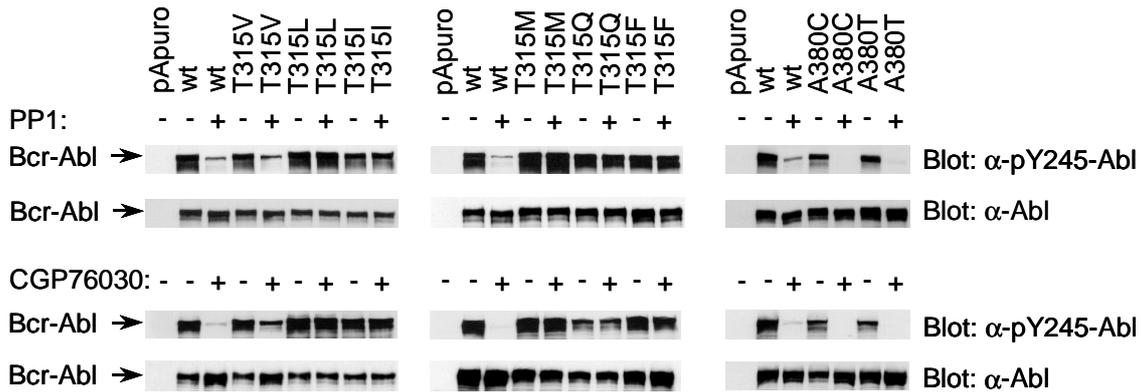


Abbildung 9: Charakterisierung des Bindungsmodus der dualspezifischen Src/Abl-Inhibitoren PP1 und CGP76030. Phospho-Abl und Abl Immunoblots aus Lysaten von Cos7-Zellen, die mit pApuro, Bcr-Ablwt oder einem der angegebenen Bcr-Abl Mutanten transfiziert waren. Die Zellen verblieben entweder unbehandelt oder wurden mit 100 μ M PP1 oder 25 μ M CGP76030 inkubiert.

4.2.3 STI571-Resistenz vermittelnde Bcr-Abl Mutationen bewirken keine vollständige biologische Resistenz gegenüber PP1 und CGP76030

Die Charakterisierung des Bindungsmodus von STI571, PP1 und CGP76030 mit Hilfe der untersuchten Bcr-Abl Punktmutanten, führte zu der Identifikation von Bcr-Abl Mutanten (Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met, Thr315Gln und Thr315Phe) mit einer vergleichbaren Resistenz gegenüber jedem der drei Inhibitoren. Mit Hilfe dieser Mutanten war es möglich, Bcr-Abl abhängige Effekte von Bcr-Abl unabhängigen Effekten zu trennen. Dafür wurde Bcr-Abl mit jeweils einer Mutation an den Positionen 315 oder 380 in 32D-Zellen exprimiert und mit STI571, PP1 und CGP76030 inkubiert. Die Expression der Bcr-Abl Mutanten Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met, Thr315Gln und Thr315Phe und Ala380Thr führte zu einer kompletten oder teilweisen (Ala380Thr) Resistenz gegenüber STI571 in Bezug auf Zellproliferation und Überleben (siehe Abbildung 11A-B). Im Gegensatz dazu konnten PP1 und CGP76030 das Wachstum und Überleben von solchen 32D-Zellen, die PP1- und CGP76030-resistente Mutanten von Bcr-Abl (Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met, Thr315Gln und Thr315Phe) exprimierten noch zu einem gewissen Grad negativ beeinflussen (siehe Abbildung 11A-B). Interessanterweise wurde in diesen Zellen deutlich mehr Apoptose durch CGP76030 als durch PP1 induziert, während die Hemmwirkung der Inhibitoren auf die Zellproliferation vergleichbar war. Wie aufgrund

der Ergebnisse in Cos7-Zellen erwartet, zeigten 32D-Zellen, welche die Bcr-Abl Mutanten Thr315Val, Ala380Thr und Ala380Cys exprimierten, eine dem Bcr-Ablwt vergleichbare Reduktion der Zellproliferation und Induktion der Apoptose gegenüber PP1 und CGP76030 (siehe Abbildung 11A-B). Darüber hinaus konnte keinerlei Resistenz gegenüber PP1 und CGP76030 in 32D-Zellen beobachtet werden, welche die Mutation Asp276Ser/Glu279Ser exprimierten (siehe Abbildung 10C-D). Da diese Mutante von Bcr-Abl noch sensitiv gegenüber PP1 und CGP76030 ist, kann der beobachtete Effekt sowohl auf eine direkte Inhibition der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl zurückzuführen als auch Abl-unabhängig verursacht worden sein.

Weiterhin sollte der Effekt von PP1 und CGP76030 auf Bcr-Abl-Aktivität in 32D-Zellen untersucht werden, die entweder Bcr-Ablwt oder eine der resistenten Mutanten, wie z.B. Thr315Gln, exprimierten. Wie Abbildung 11C mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper zeigt, reduzierten alle drei Inhibitoren die Aktivität von Bcr-Ablwt. Im Gegensatz dazu konnte kein Effekt der Inhibitoren auf die Aktivität von Bcr-Abl in 32D_{Bcr-Abl Thr315Gln} Zellen festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 32D-Zellen erhalten, die andere inhibitor-resistente Mutanten von Bcr-Abl, wie z.B. Thr315Leu, Thr315Ile, Thr315Met und Thr315Phe, exprimierten. Zusammengefasst bedeutet dies, dass PP1 und CGP76030 unabhängig von einer Abl-Hemmung einen Wachstumsstopp und Apoptose induzieren können.

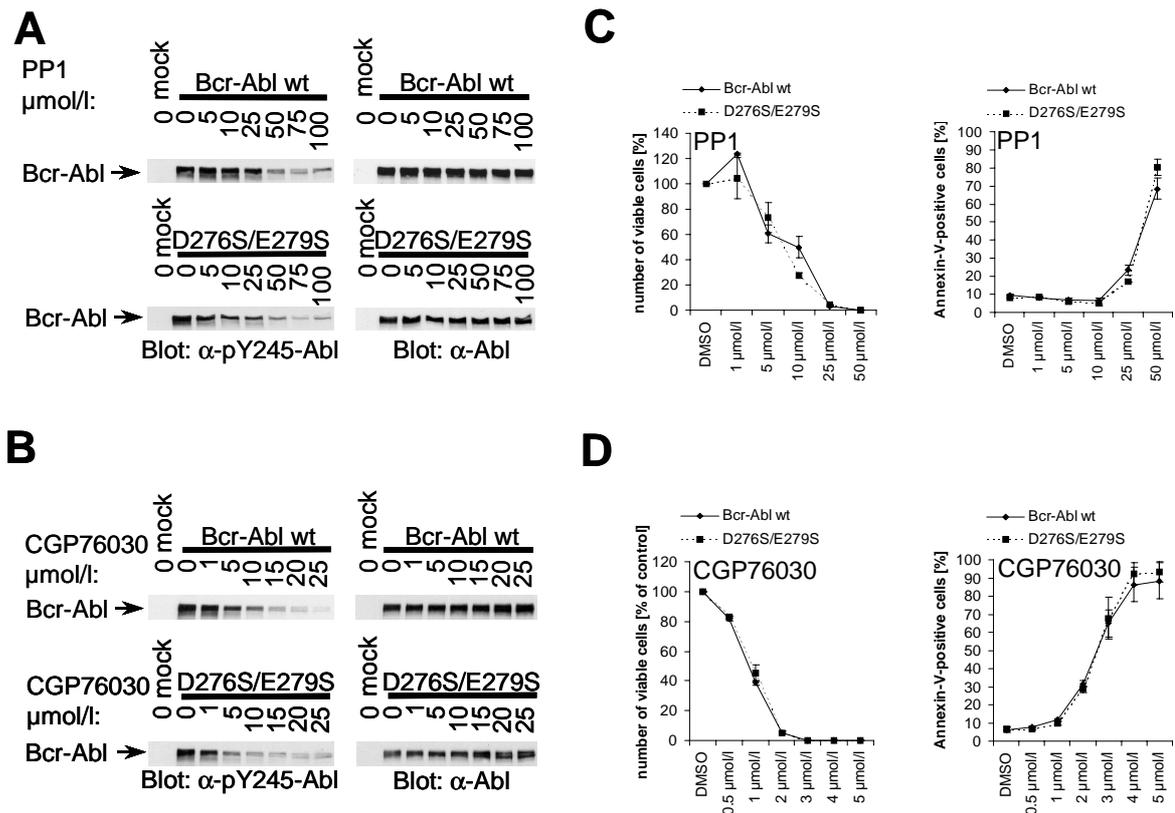


Abbildung 10: Die Bedeutung der Konformation der A-Schleife für die Bindung der Inhibitoren PP1 und CGP76030 an Bcr-Abl. (A-B) Phospho-Abl und Abl Immunoblots aus Lysaten von Cos7-Zellen, die mit pAuro, Bcr-Ablwt oder Asp276Ser/Glu279Ser transfiziert wurden. Die Zellen waren entweder unbehandelt, oder wurden mit den angegebenen Konzentrationen von PP1 (A) oder CGP76030 (B) inkubiert. (C-D) Proliferation (linke Hälfte) und Überleben (rechte Hälfte) von 32D_{Bcr-Ablwt} oder 32D_{Bcr-Abl Asp276Ser/Glu279Ser} Zellen, die mit den angegebenen Konzentrationen von PP1 (C) oder CGP76030 (D) inkubiert wurden.

4.2.4 Differenzielle Effekte von PP1, CGP76030 und STI571 auf die Aktivität von Src-Kinasen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Abl-unabhängigen biologischen Effekte von PP1 und CGP76030 mit der zusätzlichen Inhibition von Src-Kinasen korrelierten. In Abwesenheit der Inhibitoren konnte über einen phospho-spezifischen pan-Src-Antikörper eine starke Autophosphorylierung detektiert werden (siehe Abbildung 11C). In 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen konnten PP1 und CGP76030, jedoch nicht STI571, die Autophosphorylierung der Src-Kinasen vollständig blockieren, was die von der Abl-Kinase-Aktivität unabhängige Aktivierung der Src-Kinasen veranschaulicht (Warmuth et al., 1997). Die Inhibition der

Src-Kinasen durch PP1 und CGP76030 konnte sowohl in 32D_{Bcr-Ablwt} Zellen als auch in 32D-Zellen festgestellt werden, die eine Inhibitor-resistente Mutante von Bcr-Abl exprimierten. Außerdem führte in 32D_{Bcr-AblThr315Gln} Zellen PP1 und CGP76030 zu einer geringen, jedoch reproduzierbaren Reduktion der zytosolischen Tyrosin-Phosphorylierung, wogegen man mit STI571 diesen Effekt nicht beobachten konnte (siehe Abbildung 11C).

Auch der Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Aktivität potentieller Signaltransduktions-Partner sollte untersucht werden. Alle drei Inhibitoren blockierten die Autophosphorylierung von STAT5, Jnk und Akt in 32D-Zellen, die Bcr-Ablwt exprimierten. Inhibition von STAT5 und Jnk konnte nicht in 32D-Zellen festgestellt werden, welche die Inhibitor-resistente Mutante Thr315Gln von Bcr-Abl exprimierten. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Signalwege, die zu einer Aktivierung von STAT5 und Jnk führen, direkt von der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl abhängen (siehe Abbildung 11C). Auch die Blockierung der Autophosphorylierung von Akt durch STI571 konnte in den Inhibitor-resistenten 32D_{Bcr-AblThr315Gln} Zellen aufgehoben werden. Überraschenderweise konnte in diesen Zellen die Aktivität von Akt immer noch durch PP1 und CGP76030 negativ beeinflusst werden (siehe Abbildung 11D). Diese führte zu der Hypothese, dass sowohl Bcr-Abl als auch Src-Kinasen zu der Regulation von Akt in Bcr-Abl-positiven Zellen beitragen.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die von STI571 abweichende biologische Wirkung von PP1 und CGP76030 auf 32D_{Bcr-Ablwt} und 32D_{Bcr-AblThr315Gln} Zellen zumindest teilweise durch die zusätzliche Hemmung von Lyn und anderen Src-Kinasen erklärt werden können. Jedoch kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass PP1 und CGP76030 den beobachteten biologischen Effekt über die Inhibition zusätzlicher, noch unbekannter, Kinasen erzielen.

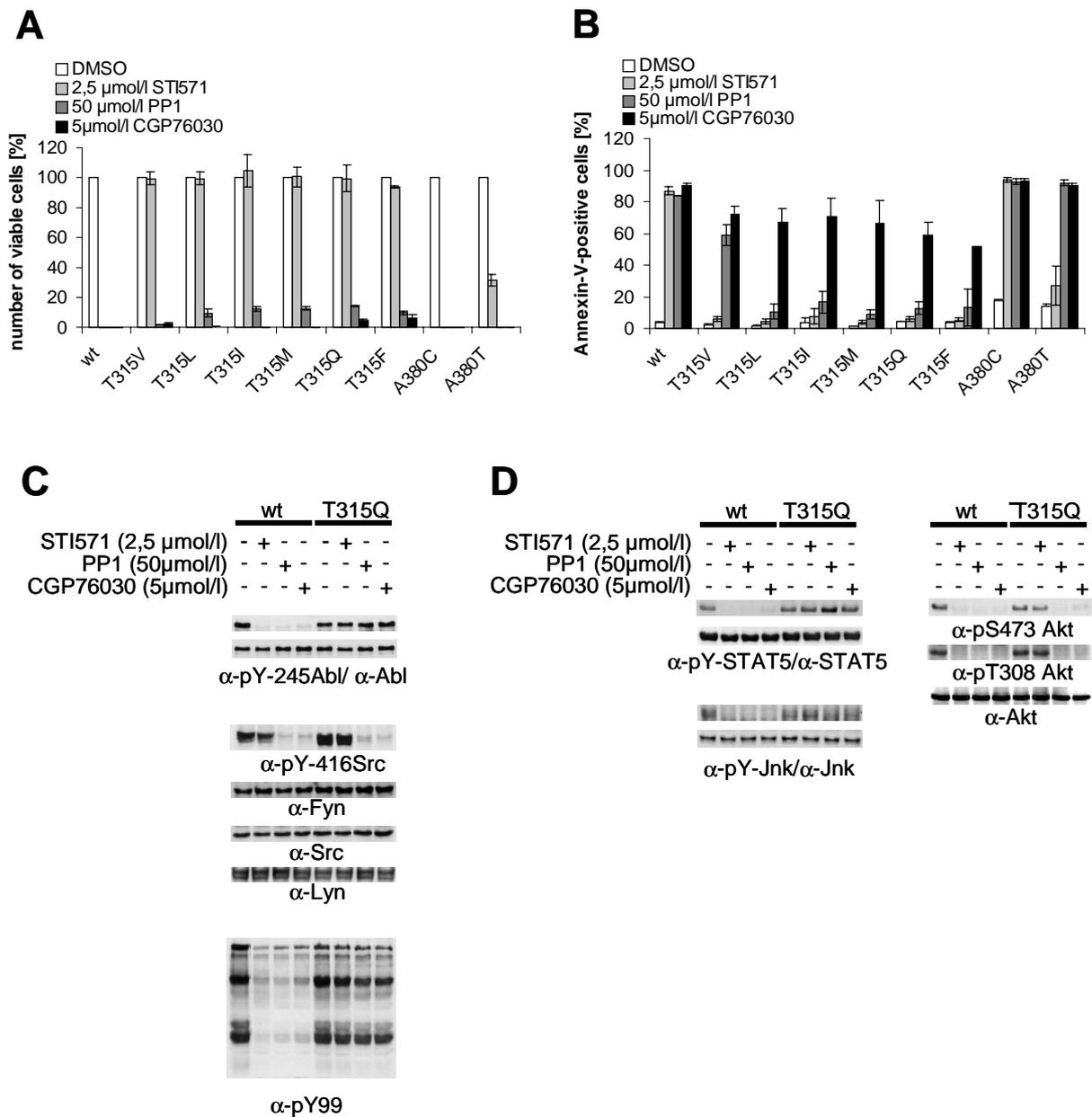


Abbildung 11: Unvollständige Resistenz von 32D_{Bcr-Abl} Zellen, die CGP76030- und PP1-resistente Mutanten exprimieren. (A-B) Der Effekt von STI571, PP1 und CGP76030 nach 48h auf Proliferation (A) und Überleben (B) von 32D-Zellen, die Bcr-Ablwt oder eine der untersuchten Mutanten an den Positionen 315 und 380 von Bcr-Abl exprimieren. (C-D) Phospho-Abl-, phospho-Src-, panphospho-Tyrosin-, phospho-STAT5-, phospho-Jnk- und phospho-Akt-Western-Blots von 32D_{Bcr-Ablwt}-Zellen und 32D_{Bcr-AblThr315Gln}-Zellen, die mit den angegebenen Konzentrationen von STI571, PP1 und CGP76030 2h vor Lyse inkubiert wurden. Als Expressionskontrolle dient jeweils die Detektion mittels Abl-, Src-, Fyn-, Lyn-, STAT5-, Jnk- und Akt-Antikörpern.

4.3 Der Effekt des dualspezifischen Src/Abl Inhibitors CGP76030 in einem Tiermodell für die Philadelphia-(Bcr-Abl) positive B-ALL

4.3.1 CGP76030 inhibiert Wachstum von Bcr-Abl-transformierten murinen Knochenmarkszellen

Die bisherigen Untersuchungen des biologischen Effekts von CGP76030 wurden ausschließlich in Zelllinien durchgeführt. Für einen Einsatz des Inhibitors CGP76030 in einem *in vivo* Mausmodell wie dem retroviralen Knochenmarks-Transduktions-/Transplantations-Modell (siehe Abbildung 4 und Methoden) musste sichergestellt werden, dass CGP76030 auch das Wachstum von murinen, Bcr-Abl-positiven Knochenmarkszellen negativ beeinflusst. Dazu wurde Knochenmark von C57BL/6 Mäusen aus Tibia und Femur gewonnen und mit einem Retrovirus infiziert, das entweder Bcr-Ablwt oder die resistente Mutante Bcr-AblThr315Ile codierte. Nicht-infiziertes Knochenmark starb nach etwa 5-6 Tagen ohne Zytokine wie IL-7 ab. Im Gegensatz dazu transformierte Bcr-Abl infiziertes Knochenmark zu Zytokin-freiem Wachstum.

Zunächst wurden die Bcr-Abl-transformierten Knochenmarkszellen näher charakterisiert. Eine FACS-Analyse mit myeloischen (GR-1 und Mac-1) und lymphatischen (CD19 und CD38) Oberflächenmarkern ergab einen B-lymphatischen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Expression von Bcr-Abl im Western-Blot überprüft und ein Expressionsprofil verschiedener Src-Kinasen erstellt (siehe Abbildung 12).

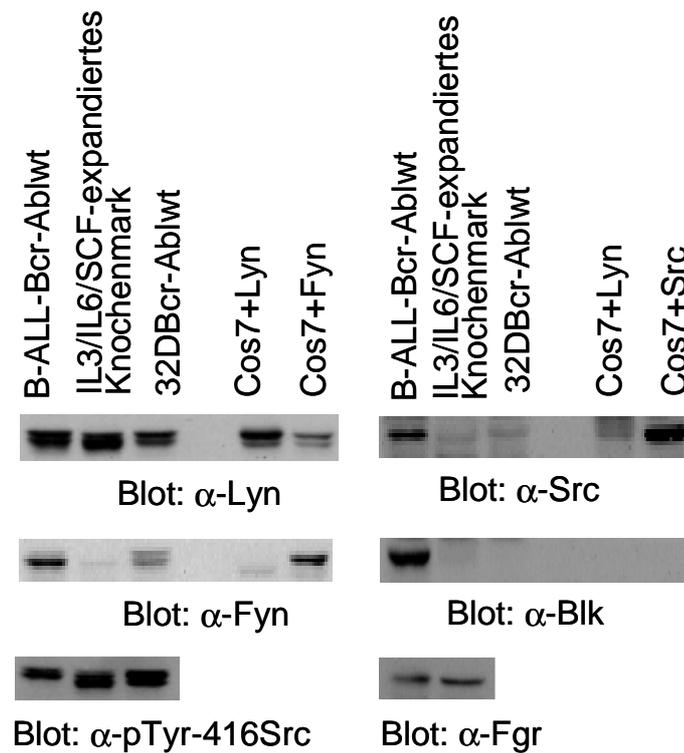


Abbildung 12: Expression verschiedener Src-Kinasen in Knochenmarkszellen. Lyn, Src, Fyn, Blk, Fgr und phospho-Src Western Blots von Lysaten aus Knochenmarkszellen, die mit Bcr-Ablwt transformiert wurden oder mit einem Zytokincocktail (IL-3, IL-6, SCF) expandiert wurden, sowie von Cos7-Zellen, die entweder mit Lyn, Fyn oder Src transfiziert wurde. IL: Interleukin, SCF: Stammzellfaktor

Um die biologische Aktivität von CGP76030 in Bcr-Abl-transformierten murinen Knochenmarkszellen zu untersuchen, wurden Knochenmarkszellen, die entweder Bcr-Ablwt und die Inhibitor-resistenten Mutante Bcr-AblThr315Ile exprimierten, mit verschiedenen Konzentrationen von STI571 oder CGP76030 inkubiert. Sowohl STI571 als auch CGP76030 inhibierten konzentrationsabhängig das Wachstum von Bcr-Ablwt transformierten Knochenmarkszellen (siehe Abbildung 13A-B). Im Gegensatz dazu konnte das Wachstum von Bcr-AblThr315Ile transformierten Knochenmarkszellen durch bis zu 5 μ M STI571 nur geringfügig gehemmt werden (siehe Abbildung 13A). CGP76030 blockierte dagegen das Wachstum von Bcr-AblThr315Ile transformierten Knochenmarkszellen mit einer ähnlichen Dosisabhängigkeit, wie sie bei der Inhibition von Bcr-Ablwt transformierten Knochenmarkszellen festgestellt wurde (siehe Abbildung 13B).

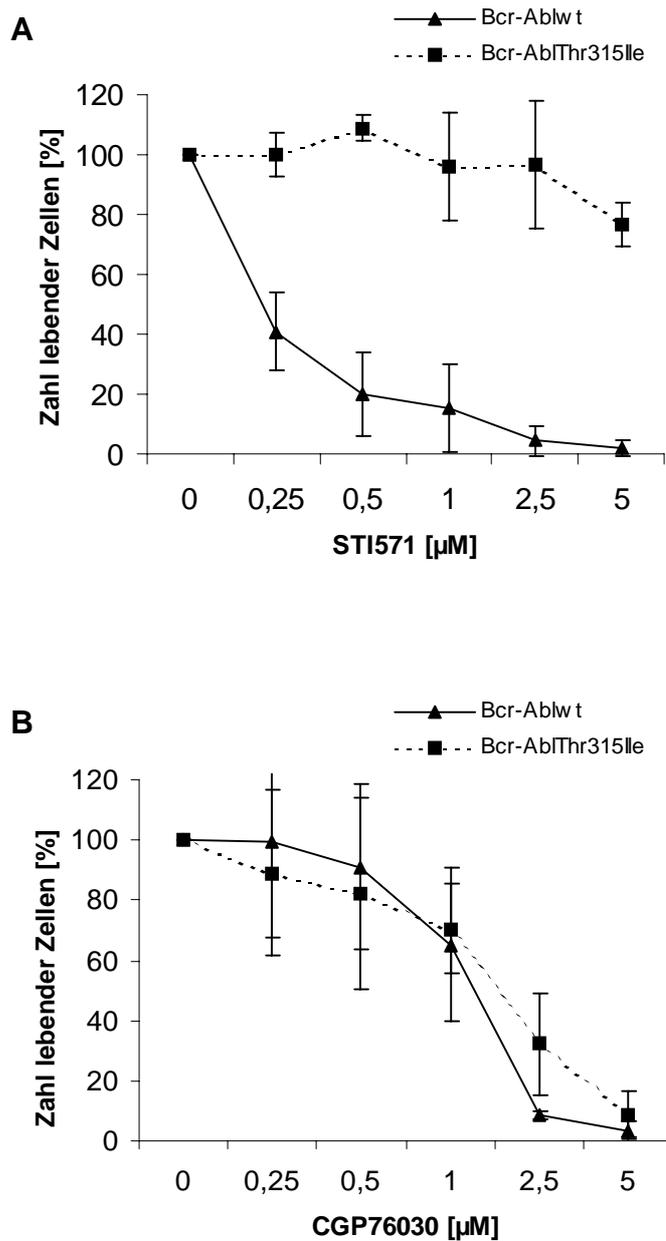


Abbildung 13: Der biologische Effekt von STI571 und CGP76030 auf Bcr-Abl-transformierte murine Knochenmarkszellen. Wachstum von Bcr-Ablwt und Bcr-AblThr315Ile transformierten Knochenmarkszellen in der Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von STI571 (A) und CGP76030 (B). Die Daten stellen Mittelwerte aus 2 (A) bzw. 3 (B) unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass CGP76030 das Wachstum von Bcr-Abl-transformierten murinen Knochenmarkszellen unabhängig von der Aktivität der Bcr-Abl Kinase hemmen kann. Diese *in vivo* Daten stehen mit den Ergebnissen im Einklang, die mit der Zelllinie 32D erhalten wurden (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Src-Kinasen Src,

Lyn, Fyn, Blk, und Fgr werden in Bcr-Abl-transformierten Knochenmark exprimiert; des weiteren konnte eine hohe Kinase-Aktivität der Src-Kinasen-Familie mit Hilfe eines phosphospezifischen pan-Src-Antikörpers detektiert werden. Die Inhibition der Zellproliferation durch CGP76030 in Bcr-AblThr315Ile transformierten Knochenmarkszellen könnte also über die Blockierung von Src-Kinasen erklärt werden. Nichtsdestotrotz besteht die Möglichkeit, dass die inhibitorische Wirkung von CGP76030 über die Blockierung zusätzlicher, noch unbekannter Kinasen zustande kommt.

4.3.2 Charakterisierung des induzierten Krankheitsphänotyps im Tiermodell

Mit Hilfe des retroviralen Transduktions-Retransplantations-Modell für Bcr-Abl-positive Leukämien (siehe Abbildung 4) wurde eine Philadelphia-positive B-ALL in C57BL/6 Mäusen induziert. Dazu wurde Bcr-Ablwt und Bcr-AblThr315Ile in den retroviralen Vektor pMSCV-IRES-EGFP kloniert. Die Produktion retroviraler Stocks erfolgte mit Hilfe transienter, CaCl₂-vermittelter Co-Transfektion von 293T Zellen mit retroviraler Vektor-DNA (pMSCV-Bcr/Ablwt bzw. pMSCV-Bcr/AblThr315Ile), sowie eines ekotropen Verpackungsplasmids (MCV-ecopac). 48 h nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet und in Aliquots bei -80°C gelagert. Virustiter wurden mittels FACS-Analyse infizierter NIH3T3 Zellen ermittelt.

Die transplantierten Mäuse wurden im täglichen Verlauf auf Krankheitszeichen untersucht. Dabei konnten bei manchen Tieren Gewichtsverlust, Lähmungserscheinungen (siehe Abbildung 14B), Apathie, Atemnot, Tumore oder ein Erguss ins Peritoneum als ein Hinweis auf eine Erkrankung beobachtet werden. Um den Krankheitsverlauf genauer zu verfolgen, wurde 1-2mal wöchentlich peripheres Blut analysiert. Dabei wurde ein Blutaussstrich angefertigt, die Zahl der leukämischen Zellen im peripheren Blut mittels GFP-Expression per FACS-Analyse ermittelt sowie die Leukozytenzahlen bestimmt. Die Pappenheim-Färbung der Blutaussstriche sowie die Bestimmung der Leukozytenzahlen wurde in der klinischen Chemie des Klinikums Großhadern (München) unter der Leitung von Dr. Diem vorgenommen. Terminal erkrankte Mäuse wurden geopfert und pathologisch untersucht, insbesondere auf Infiltration von Lunge, Milz und Leber mit leukämischen Zellen. Weiterhin wurde eine Differenzierung der leukämischen Zellen im Knochenmark

anhand von Oberflächenmarkern vorgenommen (Mac-1 und Gr-1 für myeloische Zellen, B220 für lymphatische Zellen der B-Zellreihe).

Die beobachteten Krankheitszeichen der durch Bcr-Abl induzierten Erkrankung waren heterogen. Der Krankheitszustand korrelierte nicht in allen Fällen mit der Anzahl leukämischer Zellen im peripheren Blut. Obwohl viele Tiere mit physischen Krankheitsmerkmalen (z.B. Lähmungen oder Apathie) im peripheren Blut bis zu 80% leukämischer Zellen besaßen, konnten bei einigen dieser Mäusen nur eine geringe Anzahl leukämischer Zellen im peripheren Blut festgestellt werden.

Ebenso erwies sich die Anzahl der Leukozyten im peripherem Blut als ein unzureichender Marker für eine Erkrankung. In gesunden, nicht-transplantierten C57BL/6 Mäusen wurden zwischen 4000-7000 Leukozyten pro μl gemessen. Durch die Bestrahlung der Spendermäuse wird das eigene Knochenmark abgetötet und muss von dem transplantierten Knochenmark wieder rekonstituiert werden. Dadurch sank der Leukozytenwert eine Woche nach der Transplantation auf ca. 100-200 Leukozyten pro μL ab und brauchte 2-3 Wochen, um wieder in den Normalbereich zu gelangen. Zudem wurde anschließend aufgrund der Transplantation eine überschießende Leukozytenproduktion beobachtet, die auch bei den gesunden, GFP-transplantierten Kontrolltieren 46 Tage nach der Transplantation einen Leukozytenwert von über 10000 Leukozyten pro μl verursachte (siehe Abbildung 16E).

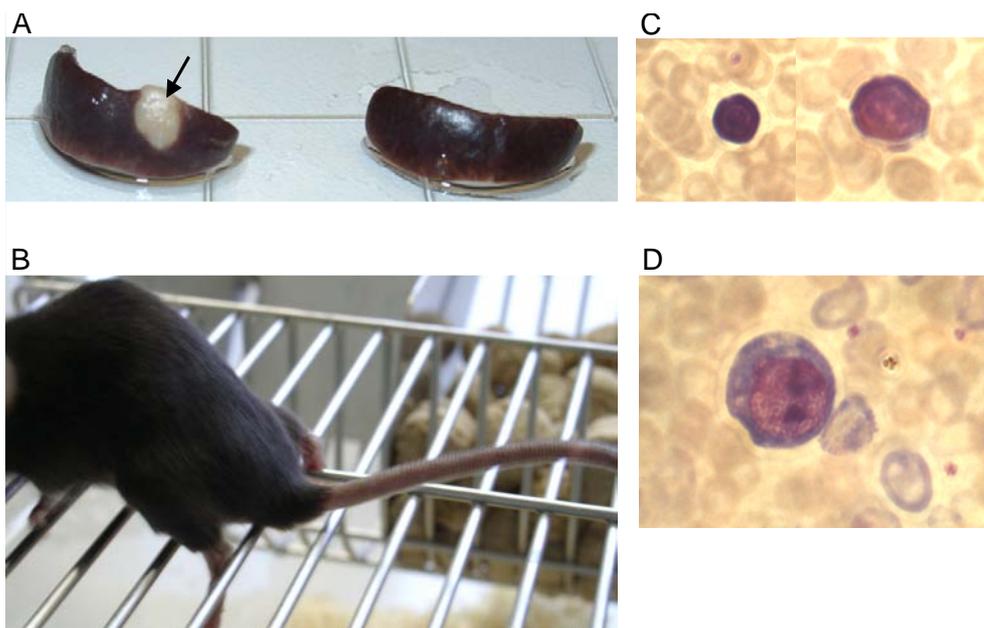


Abbildung 14: Einige Charakteristika des induzierten Krankheitsphänotyps. (A) Infiltrierte (links, schwarzer Pfeil) und gesunde Milz (rechts). (B) Maus mit Lähmungserscheinungen an den Hinterbeinen. (C-D) Pappenheim-Färbung eines Blutausstriches einer gesunden (C) und einer kranken (D) Maus. In (D) ist im peripheren Blut ein Lymphoblast zu sehen, was auf eine B-ALL hindeutet.

Eine Infiltration der Leber und Milz (siehe Abbildung 14A) mit leukämischen Zellen konnte häufig beobachtet werden, wobei der Umfang der Infiltration stark variierte. Bei vielen Tieren waren beide oder zumindest eines der Organe vergrößert. Bei der Milz konnte oft eine Gewichtszunahme von 100 mg auf 200 mg festgestellt werden. Die Lunge wies bei manchen Tieren eine maligne pleurale Infusion auf, die entweder blutig oder nicht-blutig war. Bei zwei Mäusen konnte eine Tumorbildung an der Schulter beobachtet werden.

Eine Analyse des Knochenmarks zeigte bei vielen Tieren eine hohe Anzahl leukämischer, GFP-positiver Zellen, teilweise auch bei Mäusen mit aleukämischen peripheren Blutbild. Andererseits war das Knochenmark von Tieren mit einem hohen Prozentsatz an leukämischen, GFP-positiven Zellen im peripheren Blut manchmal GFP-negativ. Dabei handelte es sich meist um Tiere mit stark infiltrierter Milz und Leber, wo wahrscheinlich die leukämischen Zellen ihren Ursprung hatten, da bei Mäusen auch in diesen Organen Hämatopoese stattfinden kann. Die verwendeten Protokolle sollten in den Mäusen zu der Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL führen. Um diese Tatsache zu

überprüfen, wurde leukämisches Knochenmark mit Antikörpern für myeloischen Oberflächenmarker (Mac-1 und Gr-1) und einem Oberflächenmarker für lymphatische Zellen der B-Zellreihe (B220) angefärbt. Abbildung 15 zeigt Knochenmarkszellen einer Maus 54 Tage nach der Transplantation mit Bcr-Abl^{Thr315Ile} infiziertem Knochenmark. Nach 11 Tagen erhielt dieses Tier zweimal täglich 50 mg/kg CGP76030. Da im retroviralen Vektor pMSCV Bcr-Abl über eine IRES-Sequenz an GFP koppelt war, konnte die Expression von GFP in 38% der Zellen mit der Expression von Bcr-Abl korreliert werden. Die gesamte GFP-positive Population war für den lymphatischen Marker B220 positiv (siehe Abbildung 15A), jedoch negativ für die myeloischen Marker Mac-1 (siehe Abbildung 15B) und Gr-1 (siehe Abbildung 15C). Bei allen getesteten Tieren mit Bcr-Abl-positiven Knochenmark konnte so die Induktion einer B-ALL sichergestellt werden.

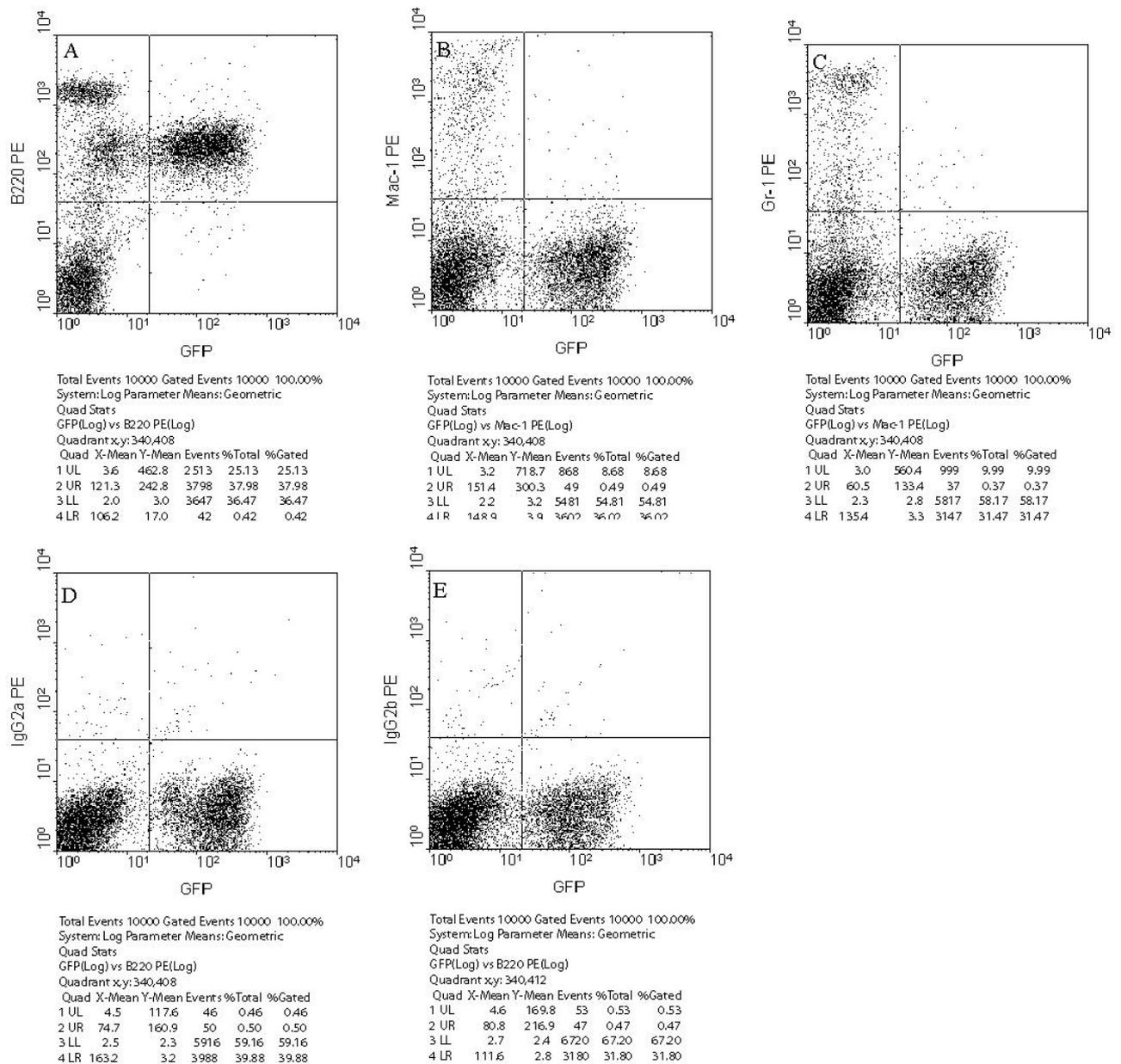


Abbildung 15: Charakterisierung von Knochenmarkszellen aus einer terminal erkrankten Maus mit verschiedenen Oberflächenmarkern. Knochenmark wurde am Tag 54 nach Transplantation aus einer terminal erkrankten Maus aus der CGP76030-Therapiegruppe isoliert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Knochenmarkszellen entweder mit PE-gekoppelten Primäantikörpern gegen CD45R/B220 (A), Mac-1 (B), Gr-1 (C) oder den passenden Isotypen (D und E) angefärbt. UL: oben links, UR: oben rechts, LL: unten links, LR: unten rechts.

Auch die mittels Pappenheim-Färbung angefertigten Blutausstriche sollten über die Zell-Morphologie des peripheren Blutes eine Aussage über die Art der induzierten Leukämie treffen. In einigen Tieren konnten unreife Lymphoblasten (siehe Abbildung 14C) identifiziert werden, die ebenfalls auf die Induktion einer B-ALL hindeuteten. Jedoch

erwies sich die Analyse der Ausstriche oft als schwierig, da in vielen Fällen keine eindeutige leukämische Morphologie zu sehen war und zudem die Analyse solcher Blutausstriche eines speziellen Trainings und Erfahrung bedarf. Aus diesem Grunde waren die Blutausstriche nur selten hilfreich bei der Identifikation der induzierten Leukämie.

Aufgrund der Analyse der geopfert Tiere kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere an einer Bcr-Abl-positiven B-ALL erkrankt waren.

4.3.3 Der Einfluss von STI571 und CGP76030 auf das Überleben in einem Tiermodell für Bcr-Abl-positiv B-ALL

Terminal erkrankte Tiere wurden durch CO₂-Aspiration geopfert. Die Einschätzung des Gesundheitszustandes der Tiere wurde erheblich erschwert durch die heterogenen Krankheitszeichen, da dadurch kein einheitliches Kriterium für eine Opfertung der Mäuse herangezogen werden konnte. Zudem korrelierte das nach außen sichtbare Allgemeinbefinden der Tiere oft nicht mit dem Krankheitsverlauf der Leukämie. Einige Mäuse zeigten im lebendigen Zustand nur geringe physische Beeinträchtigungen, obwohl sich bei der Sektion herausstellte, dass die Funktion von Milz/Leber (Infiltrate) und Lunge (carnifizierte Lunge, maligne pleurale Infusionen) stark beeinträchtigt war. Diese Tatsache konnte dazu führen, dass sich der Krankheitszustand einer Maus innerhalb von 24 Stunden rapide verschlechterte und sie nachts unerwartet verstarb, ohne sofort analysiert zu werden. Aufgrund der autolytischen Prozesse nach dem Tod eines Tieres konnten in diesen Fällen am nächsten Morgen weder die Knochenmarkszellen noch die Organe analysiert werden. Aus diesem Grund fehlen in der Abbildung 16 und der Abbildung 18 bei einigen Mäusen die Analyse der Organe und des Knochenmarks. Die Mäuse eins und zwei aus der CGP76030-Therapiegruppe des Bcr-Abl-Transplantats in Abbildung 18D zeigten schon zu Therapiebeginn schwerwiegende Symptome einer Erkrankung, wurden jedoch nicht geopfert, um einen möglichen Therapie-Effekt beobachten zu können. Aus diesem Grund verstarben diese beiden Tiere unerwartet. Demnach konnte keine Sektion und keine Analyse des Knochenmarks und der Organe durchgeführt werden.

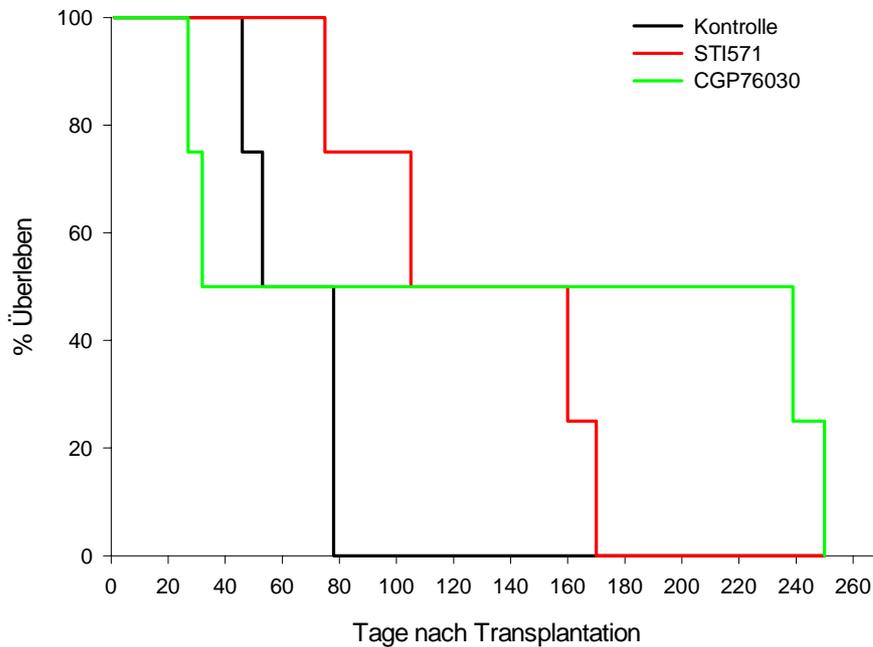
Um das retrovirale Knochenmarks-Transduktions-/Retransplantations-Modell für Bcr-Abl-positiv Leukämien (siehe Abbildung 4) im Labor zu etablieren, wurde zunächst ein Experiment mit nur 4 Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Dabei wurde Knochenmark

isoliert, mit einem Bcr-Ablwt codierenden Retrovirus infiziert und anschließend in Mäuse transplantiert. Die Tiere wurden in zwei Therapiegruppen (STI571, CGP76030, zweimal täglich 50 mg/kg) und eine Nicht-Therapiegruppe eingeteilt. Die Therapie wurde am Tag 25 nach Transplantation begonnen und endete, sobald alle Tiere aus der Nicht-Therapiegruppe terminal erkrankten, spätestens jedoch mit Tag 100 nach der Transplantation. Danach richtete sich auch der Beobachtungszeitraum, dessen Ende ebenfalls auf Tag 100 nach Transplantation festgelegt wurde. Tiere, die nach Tag 100 verstarben, wurden nicht mehr analysiert und sind in den Sektionsdaten in Abbildung 16B, C und D nicht aufgeführt.

Abbildung 16 zeigt die Überlebenskurve (siehe Abbildung 16A) und die Ergebnisse der Blutanalyse und der Sektion der geopferten Mäuse aus der Nicht-Therapiegruppe (siehe Abbildung 16B), der STI571-Therapiegruppe (siehe Abbildung 16C) und der CGP76030-Therapiegruppe (siehe Abbildung 16D). Der Kurvenverlauf der Nicht-Therapiegruppe entspricht den Daten von anderen Gruppen für dieses Modell (Dr. van Etten, persönliche Mitteilung). Wie erwartet zeigte die Therapie mit STI571 einen positiven Effekt auf das Überleben der Tiere. Bis Tag 87 nach Transplantation (Ende der Therapie) erkrankte nur eine Maus der Gruppe terminal, alle übrigen Tiere dagegen erkrankten erst nach dem Ende der Therapie. Die Tatsache, dass Mäuse in diesem Modell trotz einer STI571-Behandlung nach dem Ende der Therapie einen Rückfall erleiden, wurde auch von einer anderen Forschungsgruppe berichtet (Miething et al., 2001).

Anders verhielt es sich mit der Gruppe, die mit CGP76030 behandelt wurde. Hier erkrankten zwei Mäuse sehr früh (Tag 27 und 32). Da der Inhibitor nur für 2 Tage bzw. 7 Tage verabreicht wurde, könnte die Therapiezeit in diesen Tieren zu kurz für eine erfolgreiche Therapie gewesen sein. Interessanterweise verstarben die übrigen zwei Mäuse erst am Tag 239 bzw. 250 nach Transplantation und überlebten damit länger als die Tiere der STI571-Therapiegruppe. Da diese Tiere außerhalb des Beobachtungszeitraumes starben und nicht analysiert wurden, bleibt die eigentliche Todesursache unklar. Es ist jedoch anzunehmen, dass der Tod dieser Mäuse auf die Expression von Bcr-Abl zurückzuführen ist, da keine der Kontrollmäuse, die zu dem gleichen Zeitpunkt mit GFP-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden, bis Tag 290 (Versuchsende) irgendein Krankheitssymptom zeigten.

A



B Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der Nicht-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplan- tation)	19 Tage nach Transplantation		62 Tage nach Transplantation		letzter gemessener Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]
1	46	2400	46	†	†	8000	15
2	53	1800	5	†	†	17800	4
3	78	1000	8	6600	14,9	83500	70
4	78	1000	4,5	9800	15,3	16600	38

Maus	GFP-positive Zellen in KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	50	Milz, Leber	nein	nein	nein
2	6,6	Milz	ja (Milz)	nein	nein
3	91	Milz, Leber	ja	nein	peritonealer Erguss
4	63	Milz, Leber	nein	nein	nein

C Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der STI571-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplantation)	19 Tage nach Transplantation (vor Therapiebeginn)		62 Tage nach Transplantation (35 Tage Therapie)		letzter gemessener Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]
1	75	1100	1,9	10800	0,4	11600	0,7
2	105	3100	8,6	10600	1	7800	0,6
3	160	2500	22,4	15100	3	19600*	0,9*
4	170	1500	3,3	13700	1	30200*	0,9*

Maus	GFP-positive Zellen in KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	1,4	nein	nein	nein	Gewichtsverlust 33%, atrophe Milz/Leber
2	6	nein	nein	nein	nein

D Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der CGP76030-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplantation)	19 Tage nach Transplantation (vor Therapiebeginn)		62 Tage nach Transplantation (35 Tage Therapie)		letzter gemessener Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]
1	27	2200	69	†	†	12900	82
2	32	1600	14	†	†	8400	41
3	239	1100	4	9200	1,3	24900*	1,8*
4	250	600	4	9800	0,6	15800*	0,5*

Maus	GFP-positive Zellen im KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	-	-	-	-	Lähmung der Hinterbeine, unerwartet verstorben
2	-	-	-	-	unerwartet verstorben

E Blutanalyse der Kontrollmäuse, die mit GFP-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden

Maus	25 Tage nach Transplantation		46 Tage nach Transplantation		77 Tage nach Transplantation	
	Leukozyten pro μl	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μl	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μl	GFP-positive Zellen im PB [%]
1	2400	3	10700	1	24500	0,14
2	4000	4	15100	1	23700	0,52
3	4000	3,8	16000	1,7	26500	0,32
4	3500	4,5	13900	1,7	27300	0,28
5	4600	1,8	17400	0,5	†	†

Abbildung 16: Die Überlebenskurve (A) und der jeweilige Phänotyp (B, C, D) der geopferten Mäuse des Bcr-Ablwt infizierten Transplantats. Die Überlebenskurve (A) zeigt das Überleben [%] von Mäusen aus der CGP76030- (grüne Linie), der STI571- (rote Linie) oder der Nicht-Therapiegruppe (schwarze Linie). Der Therapiezeitraum erstreckte sich von Tag 25 bis Tag 87 nach Transplantation. Die Ergebnisse der Blutanalyse (oben) und der Sektion (unten) der einzelnen Mäuse der Nicht-Therapiegruppe sind in (B), der STI571-Therapiegruppe in (C) und der CGP76030-Therapiegruppe in (D) dargestellt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis Tag 100 nach der Transplantation, danach verstorbene Mäuse wurden nicht mehr analysiert und sind in den Sektionsdaten nicht aufgeführt. Blutwerte der letzten durchgeführten Messung am Tag 123 wurden mit * gekennzeichnet. In (E) sind die Ergebnisse der Blutanalyse von gesunden Kontrollmäusen dargestellt, die mit GFP-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden. Für die Darstellung der Überlebenskurve wurde SigmaPlot 2000 verwendet. PB: peripheres Blut, KM: Knochenmark, †: verstorben/geopfert

Für die Etablierung des Modells musste des weiteren sichergestellt werden, dass die Leukämie durch die Expression von Bcr-Abl induziert wurde und kein Nebeneffekt der Transplantation oder der Expression von GFP war. Dazu wurden 5 Kontrolliere mitgeführt, die mit GFP-infiziertem Knochenmark transplantiert wurden. Keine dieser Mäuse zeigte eines der im Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Krankheitszeichen. Die Leukozytenwerte waren dagegen deutlich erhöht (siehe Abbildung 16D). Diese Tatsache lässt sich jedoch mit einer überschießenden Leukozytenproduktion aufgrund der Transplantation erklären (siehe Abschnitt 3.3.2). An Tag 43 nach Transplantation wurde eines der Tiere (Maus 5) geopfert, um Organe und Knochenmark auf Zeichen von Leukämie zu untersuchen. Weder im peripheren Blut (0,5%) noch im Knochenmark (4,2%) konnte eine dominierende GFP-positive Zellpopulation festgestellt werden. Auch Organe wie Milz, Leber und Lunge zeigten keine Krankheitszeichen.

Eine Aussage über die Wirkung von CGP76030 versus STI571 in einem Tiermodell für Bcr-Ablwt-positive B-ALL konnte nicht getroffen werden, da die Fallzahl der verwendeten Gruppen zu klein war. Aus diesem Grund war der Unterschied in den Überlebenskurven der einzelnen Gruppen nicht signifikant: Der errechnete P-Wert zwischen der Nicht-Therapiegruppe und der STI571-Therapiegruppe betrug 0,28, zwischen der Nicht-Therapiegruppe und der CGP76030-Therapiegruppe 0,68 und zwischen der STI571- und der CGP76030-Therapiegruppe 0,32. Bestenfalls kann man eine gewisse Tendenz feststellen, dass nach Therapie-Ende Mäuse aus der CGP76030-Therapiegruppe länger überlebten als Mäuse aus der STI571 Therapiegruppe. Diese Tatsache könnte möglicherweise ein geringeres Rückfallrisiko von CGP76030 im Vergleich zu STI571 widerspiegeln.

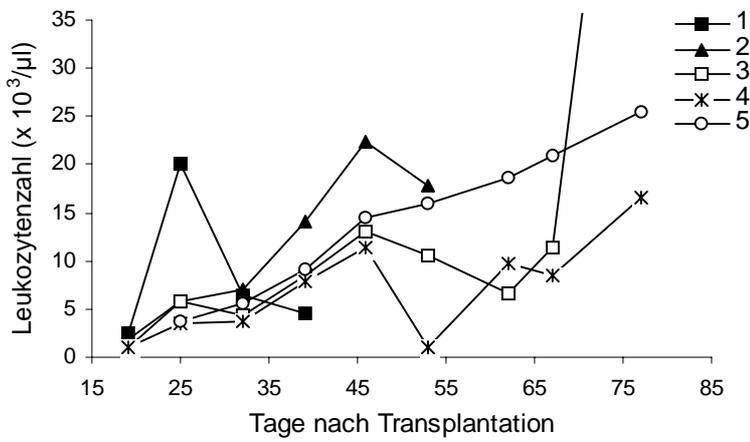
Um einen möglichen Effekt von STI571 und CGP76030 auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut zu untersuchen, wurde innerhalb des Beobachtungszeitraumes wöchentlich Blut abgenommen und in der klinischen Chemie unter Aufsicht von Dr. Diem ein Blutbild erstellt. Abbildung 17 zeigt die ermittelten Leukozytenzahlen der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf. Dabei kennzeichnet jeweils die Linie mit der Nummer 5 den Verlauf der GFP-Kontrollgruppe (n=5), die nur mit GFP- und nicht mit Bcr-Abl-infiziertem Knochenmark transplantiert wurde. Da sich die Werte der einzelnen Mäuse dieser Gruppe kaum unterschieden (siehe auch Abbildung 16E), wurde für die Kurve dieser Gruppe ein Mittelwert gebildet, um eine bessere Übersicht zu erhalten. Es stellte sich heraus, dass die Mäuse 1, 2 und 4 aus der Nicht-Therapiegruppe eine ähnlichen Anstieg des Leukozytenwertes zeigten wie die GFP-Kontrollgruppe. Der Mittelwert dieser Mäuse von Tag 46 nach Transplantation beträgt 15400 Leukozyten pro μl und stimmt in etwa mit dem Mittelwert der GFP-Kontrollgruppe dieses Tages überein (14600 Leukozyten pro μl). Bei Maus 3 konnte jedoch innerhalb von 10 Tagen eine erhebliche Zunahme der Leukozyten von ca. 10×10^3 auf 83×10^3 Leukozyten pro μl (siehe Abbildung 17A) beobachtet werden, die mit einer Zunahme von 17% auf 70% Bcr-Abl-exprimierende, GFP-positive Zellen im Blut korreliert werden konnte. Einen Tag später wurde das Tier aufgrund der terminalen Krankheitszeichen geopfert. Die Sektion zeigte 91% GFP-positive Zellen im Knochenmark, die sich als positiv für den Marker B220 herausstellten und damit als Lymphoblasten identifiziert werden konnten. Die Mäuse 1 und 4 zeigten jedoch im Vergleich mit der GFP-Kontrollgruppe keinen Anstieg in den Leukozytenzahlen, obwohl

im peripheren Blut 15% bzw. 38% und im Knochenmark 50% bzw. 63% GFP-positive Zellen detektiert werden konnten. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Zahl der Leukozyten bei manchen Tieren mit dem Krankheitszustand korreliert, jedoch bei einem Großteil der Mäuse dies nicht der Fall ist. Die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut scheint damit kein zuverlässiges Kriterium zu sein, um den Verlauf einer Bcr-Abl-positiven B-ALL in Mäusen zu beobachten.

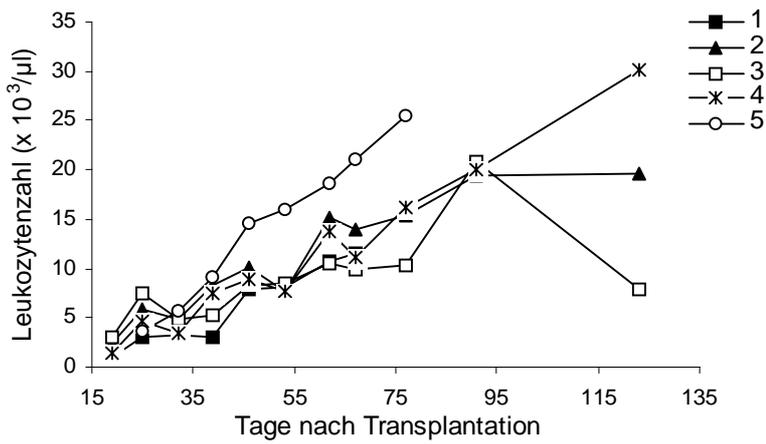
Die Mäuse 1 und 2 der STI571-Therapiegruppe, die an den Tagen 75 und 105 aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes (Apathie, stumpfes Fell, Gewichtsverlust, Dehydration) geopfert wurden, zeigten weder im peripheren Blut noch im Knochenmark GFP-positive Zellen. Auch bei der Analyse der Organe (Milz, Leber, Lunge) konnten keine Anzeichen einer Leukämie (Infiltrate, pleurale maligne Infusionen) identifiziert werden (siehe Abbildung 16C). Da das Leukämie-auslösende Onkogen Bcr-Abl ein direktes „Target“ von STI571 darstellt, kann eine andere Todesursache als Leukämie nicht ausgeschlossen werden.

Die Mäuse 1 und 2 der CGP76030-Therapiegruppe erkrankten schon an Tag 27 bzw. 32 terminal. Beide zeigten im Vergleich mit der GFP-Kontrollgruppe keinen Anstieg der Leukozytenzahlen, jedoch 82% bzw. 41% GFP-positive Zellen im peripheren Blut. Des Weiteren konnte eine Lähmung der Hinterbeine bei Maus 1 festgestellt werden, die auch bei anderen Mäusen mit einer eindeutig identifizierten B-ALL auftrat (siehe Abbildung 18B). Obwohl die Analyse der Organe bei diesen Mäusen fehlt, liegt daher nahe, dass beide Tiere an einer Leukämie erkrankt waren.

A Leukozytenzahlen der Mäuse aus der Nicht-Therapiegruppe



B Leukozytenzahlen der Mäuse aus der STI571-Therapiegruppe



C Leukozytenzahlen der Mäuse aus der CGP76030-Therapiegruppe

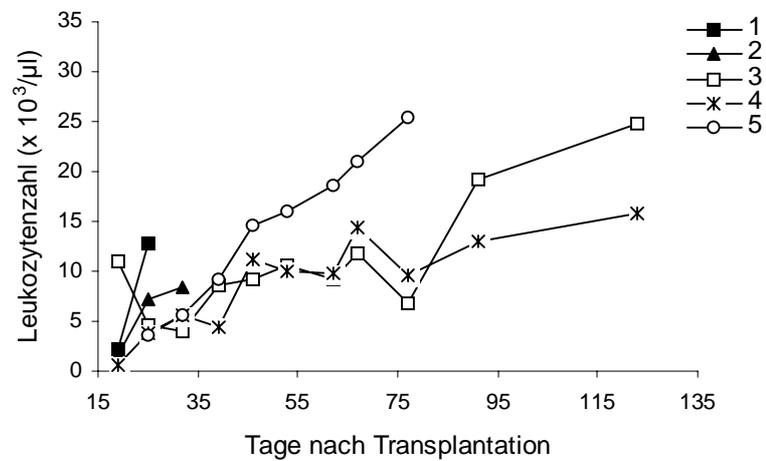


Abbildung 17: Leukozytenwerte der Nicht-Therapiegruppe (A), der STI571-Therapiegruppe (B) und der CGP76030-Therapiegruppe (C) im zeitlichen Verlauf. Die Mäuse der einzelnen Gruppen sind mit 1, 2, 3 und 4 bezeichnet. Die Nummer 5 kennzeichnet den Mittelwert aus den fünf Mäusen der GFP-Kontrollgruppe.

Bei einem Vergleich der Kurve der GFP-Kontrollgruppe und der Nicht-Therapiegruppe mit den Kurven der STI571- oder der CGP76030-Therapiegruppe fällt eine niedrigere Leukozytenzahl in den Kurven der Therapiegruppen auf (siehe Abbildung 17B und C). Der Mittelwert von Tag 46 nach Transplantation betrug bei beiden Therapie-Gruppen ca. 10000 Leukozyten pro μl und war damit um ca. 35% niedriger als bei der Nicht-Therapiegruppe oder der GFP-Kontrollgruppe (ca. 15000 Leukozyten/ μl). Da die Leukozytenzahlen, wie oben beschrieben, nur in wenigen Fällen eine Aussagekraft besaßen, ist eine Korrelation mit einem möglichen Therapie-Effekt nur schwer möglich. Unter Umständen spiegelt diese Tatsache auch einen negativen Einfluss der Inhibitoren auf die Leukozytenproduktion wieder. Eine Einschätzung der Leukämie anhand der Leukozytenzahl wurde damit zusätzlich erschwert.

Da beide Inhibitoren die Kinase-Aktivität von Bcr-Ablwt hemmen, lässt sich mit der Verwendung von Bcr-Ablwt in diesem System die Fragestellung, ob Src-Kinasen eine therapeutische Zielstruktur bei Bcr-Abl-positiven Leukämien darstellen, nicht klären. Das soeben beschriebene Experiment diente demnach vor allem als Vorversuch, um das Tiermodell zu etablieren. Aufgrund der Analyse der geopferten Mäuse kann davon ausgegangen werden, dass eine Bcr-Abl-positiv B-ALL erfolgreich induziert werden konnte.

Um die Rolle der Src-Kinasen in Bcr-Abl-positiven Leukämien genauer zu untersuchen, wurde sich deshalb im weiteren Verlauf der Arbeit auf folgende Fragestellung konzentriert: Stellt die Verwendung des dualspezifischen Src/Abl-Inhibitors CGP76030 einen therapeutischen Ansatz dar, um eine Resistenz gegenüber STI571 *in vivo* zu überwinden?

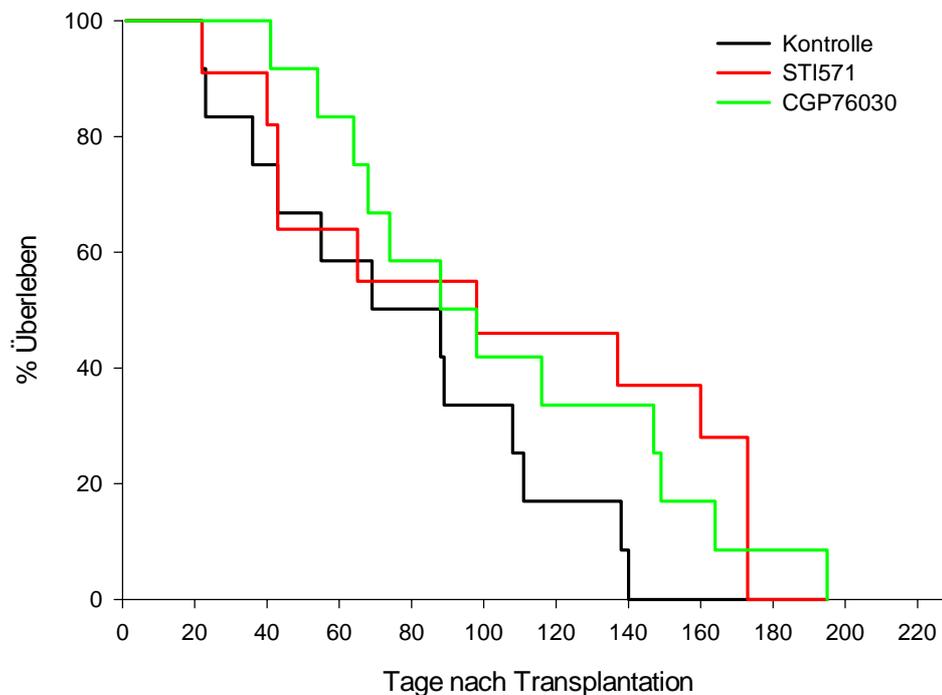
4.3.4 In einem Mausmodell für Bcr-Abl-positive, STI571-resistenter B-ALL verlängert eine Behandlung mit 50 mg/kg CGP76030 das Überleben nicht

Um einen Bcr-Abl unabhängigen Effekt von CGP76030 in dem Tiermodell für Bcr-Abl-positive B-ALL zu evaluieren, wurde Bcr-AblThr315Ile infiziertes Knochenmark transplantiert. Die Mutante Thr315Ile von Bcr-Abl ist resistent gegenüber CGP76030 und STI571. Beide Substanzen können damit die Kinase-Aktivität von Bcr-Abl nicht mehr hemmen. Sollte ein therapeutischer Effekt der Inhibitoren dennoch auftreten, ist die Hemmung von Bcr-Abl als Ursache auszuschließen. Da CGP76030, im Gegensatz zu dem sehr spezifischen Inhibitor STI571, ein dualspezifischer Src/Abl-Inhibitor ist, könnte ein therapeutischer Effekt über die Hemmung der Src-Kinasen-Familie oder anderer Zielstrukturen zustande kommen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Induktion der Krankheit wurde jeweils eine Nicht-Therapiegruppe mitgeführt. Des Weiteren wurde eine Gruppe mit STI571 behandelt und diente als Kontrolle für die Induktion einer STI571-resistenten Bcr-Abl-positiven B-ALL. Die dritte Gruppe wurde mit CGP76030 behandelt. Sowohl STI571 als auch CGP76030 wurden zweimal täglich 50 mg/kg mit Hilfe einer „Gavage“ verabreicht, außer an manchen Wochenenden, wo die Fütterung nur einmal stattfand.

Insgesamt wurden zwei voneinander unabhängige Tierversuche durchgeführt. Bei dem ersten Versuch wurden vier Mäuse pro Gruppe verwendet und ab Tag 25 nach Transplantation STI571 und CGP76030 gefüttert. Um auszuschließen, dass für einen eindeutigen Therapie-Effekt ein zu später Therapiebeginn gewählt worden war, wurde in einem zweiten Versuch, der mit 8 Mäusen pro Gruppe durchgeführt wurde, schon an Tag 11 mit der Gabe der Inhibitoren begonnen. Bei beiden Versuchen wurden die ersten Blutanalysen am Tag 22 nach Transplantation erhoben. Daraus folgt, dass im Tierversuch mit dem Therapiebeginn an Tag 25 die ersten Messwerte vor der Therapie erhoben wurden, während sie im Tierversuch mit dem Therapiebeginn an Tag 11 nach dem Start der Therapie ermittelt wurden. Bei dem Tierversuch mit Tag 11 als Therapiebeginn konnten keine Werte vor der Therapie erhalten werden, da für eine zuverlässige Messung eine Leukozytenzahl von ca. 500-1000 Leukozyten pro μl nötig waren und diese zu einem so frühen Zeitpunkt noch nicht gegeben war. Da sich die Aussage der zwei Überlebenskurven aus den beiden Tierexperimenten im Wesentlichen nicht unterschied, wurden die Daten in Abbildung 18A zu einer einzigen Überlebenskurve zusammengefasst. Die

Ergebnisse der Blutanalysen und der Sektion sind in der Abbildung 18B, C und D zusammengefasst. Dabei kennzeichnet ^a Mäuse aus dem Versuch mit dem Therapiebeginn an Tag 25, während Mäuse aus dem Versuch mit dem Therapiebeginn an Tag 11 durch ^b gekennzeichnet sind.

Der Unterschied zwischen den Überlebenskurven der Nicht-Therapiegruppe und der STI571-Therapiegruppe erwies sich als nicht signifikant mit einem P-Wert von 0,08 (siehe Abbildung 18A). Dies war zu erwarten, da für die Induktion der Leukämie eine Bcr-Abl Mutante verwendet wurde, die resistent gegenüber STI571 war. Somit sollte STI571 die Kinase-Aktivität und damit die Induktion der Leukämie nicht mehr hemmen können. Der Unterschied zwischen den Überlebenskurven der Nicht-Therapiegruppe und der CGP76030-Therapiegruppe war ebenfalls nicht signifikant (P-Wert: 0,06). Die Gabe von 50 mg/kg CGP76030 zweimal täglich hatte somit keinen positiven Einfluss auf das Überleben der Mäuse. Der berechnete P-Wert zwischen der STI571-Therapiegruppe und der CGP76030-Therapiegruppe betrug 0,7 und war ebenfalls nicht signifikant.

A

B Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der Nicht-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplan- tation)	Wert der ersten Messung 22 Tage nach Transplantation		Wert 62 Tage nach Transplantation		letzter Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro µl	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro µl	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro µl	GFP-positive Zellen im PB [%]
1	22	7000	13,2	†	†	7000	13,3
2	23	7200	63,1	†	†	7200	63
3	36	5500	10,4	†	†	2400	44,6
4	43	3500	20	†	†	10900	12,4
5	55	15200	25,4	†	†	14300	12,3
6	69	3700	20,4	8800	2,3	8800	33
7	88	3000	7,5	21200	0,4	21200	0,4
8	89	6000	1,2	12900	0,4	37700	0,3
9	108	2200	7,2	24100	1,4	17400	2
10	111	4900	6,7	24500	0,5	20900	0,5
11	138	3300	31,7	16900	9,4	18700	10
12	140	1800	1,3	18700	1	15000	4,4

Maus	GFP-positive Zellen in KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	63	ja (Milz)	ja (Milz)	nein	Lähmung der Hinterbeinen
2		-	-	-	unerwartet verstorben
3	72	nein	nein	ja (72% GFP+)	nein
4	76	Milz, Leber	nein	nein	Tumor an rechter Schulter
5	78	ja	ja	nein	nein
6	51	Leber	ja	nein	Lähmung der Hinterbeine
7	-	-	-	-	unerwartet verstorben
8	3,4	Leber	ja (Leber)	ja (25% GFP+)	maligne pleurale Infusion: nicht-blutig

C Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der STI571-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplan- tation)	Wert der ersten Messung 22 Tage nach Transplantation		Wert 62 Tage nach Transplantation (während Therapie)		letzter Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]
1 ^b	22	3200	13,2	†	†	3200	13
2 ^a	40	7700	11,5	†	†	4500	54
3 ^a	43	3200	0,5	†	†	3500	1,6
4 ^b	43	1700	18	†	†	4500	25
5 ^a	65	38600	6,6	12800	2	12800	2,2
6 ^a	98	5500	20,3	12400	0,5	15000	5
7 ^b	137	2000	19	22600	0,5	13400	0,5
8 ^b	160	1000	10,5	17500	0,3	8400	0,3
9 ^b	173	1500	6	20500	0,4	13400	0,4
10 ^b	173	1500	9	19200	0,4	8200	0,4
11 ^b	173	2200	15	26800	0,2	21400	0,2

a Therapiebeginn an Tag 25 nach Transplantation, erste Messung vor Therapiebeginn

b Therapiebeginn an Tag 11 nach Transplantation, erste Messung nach Therapiebeginn

Maus	GFP-positive Zellen in KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	59	nein	ja (Milz)	nein	nein
2	56	Milz, Leber	ja	ja	nein
3	3,7	nein	nein	ja	carnifizierte Lungen
4	61	nein	ja (Milz)	nein	1/3 der Milz dunkel gefärbt
5	3,7	Milz, Leber	ja	ja (21% GFP+)	hämorrhagischer Darminfarkt
6	Verlust der Zellen	Leber	ja (Leber)	nein	keine

D Ergebnisse der Blutanalysen (oben) und der Sektion (unten) von Mäusen aus der CGP76030-Therapiegruppe

Maus	Tag der Opferung (nach Transplan- tation)	Wert der ersten Messung 22 Tage nach Transplantation		Wert 62 Tage nach Transplantation (während Therapie)		letzter Wert vor Opferung	
		Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]	Leukozyten pro μ l	GFP-positive Zellen im PB [%]
1 ^b	41	1400	24	†	†	4900	31
2 ^b	54	1500	15	†	†	3800	3,4
3 ^a	64	3100	10,5	35300	38,3	35300	38,3
4 ^a	68	2700	0,3	8700	0,9	8700	1
5 ^b	74	1200	60	7300	5,2	7300	5,2
6 ^b	88	2500	10,2	6900	1,2	6900	1,2
7 ^a	98	1400	0,6	8800	0,4	8500	0,3
8 ^b	116	800	2,5	10700	0,3	7400	0,3
9 ^b	147	1600	7,5	10000	0,7	9300	0,6
10 ^a	149	4200	23	7300	2,9	16800	0,3
11 ^b	164	900	39	11000	1	7900	1
12 ^b	195	500	19,1	12100	2,8	6900	2,8

a Therapiebeginn an Tag 25 nach Transplantation, erste Messung vor Therapiebeginn

b Therapiebeginn an Tag 11 nach Transplantation, erste Messung nach Therapiebeginn

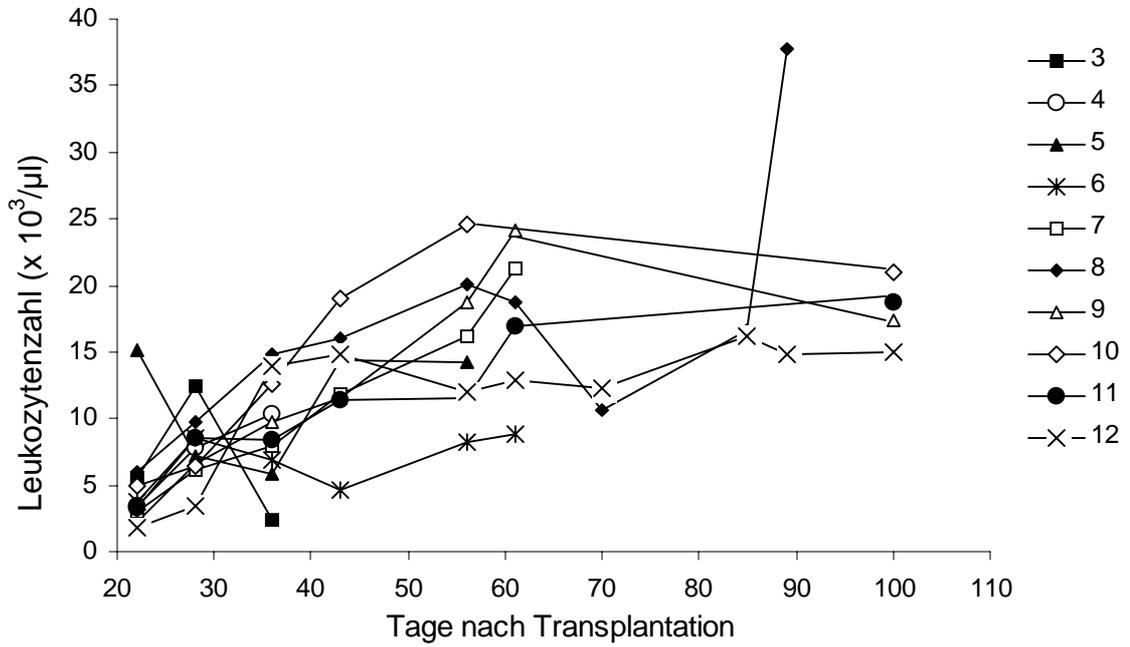
Maus	GFP-positive Zellen in KM [%]	Vergrößertes Organ	Infiltrationen in Milz/Leber	Maligne pleurale Infusionen	Besonderheiten
1	-	-	-	-	unerwartet verstorben
2	38	nein	ja (Leber)	ja	carnifizierte Lunge
3	65,3	Milz, Leber	ja	nein	gallertartiger Erguss ins Peritoneum
4	-	-	-	-	unerwartet verstorben
5	3	nein	ja (Milz)	nein	nein
6	-	-	-	-	unerwartet verstorben
7	6	nein	nein	nein	nein

Abbildung 18: Die Überlebenskurve (A) und der jeweilige Phänotyp (B, C, D) der geopfertten Mäuse des Bcr-AblThr315Ile infizierten Transplantats. Die Überlebenskurve (A) zeigt das Überleben [%] von Mäusen aus der CGP76030- (grüne Linie), der STI571- (rote Linie) oder der Nicht-Therapiegruppe (schwarze Linie). Die Ergebnisse der Blutanalyse (oben) und der Sektion (unten) der einzelnen Mäuse aus der Nicht-Therapiegruppe sind in (B), der STI571-Therapiegruppe in (C) und der CGP76030-Therapiegruppe in (D) dargestellt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis Tag 100 nach der Transplantation, danach verstorbene Mäuse wurden nicht mehr analysiert und sind in den Sektionsdaten nicht aufgeführt. Für die Darstellung der Überlebenskurve wurde SigmaPlot 2000 verwendet. PB: peripheres Blut, KM: Knochenmark, †: verstorben/geopfert

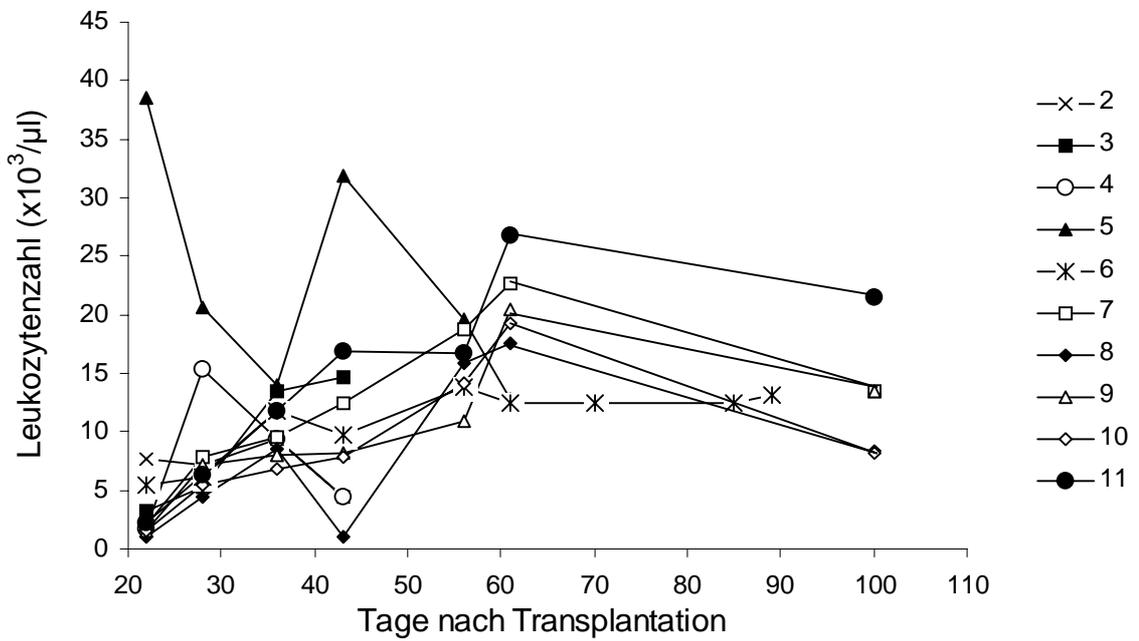
Im Vergleich mit der STI571-Therapiegruppe bzw. der Nicht-Therapiegruppe fällt bei der CGP76030-Therapiegruppe ein um etwa 20 Tage verzögerter Krankheitsbeginn auf. Dieser verzögerte „Onset“ der Leukämie konnte jedoch nicht mit dem Auftreten unterschiedlicher Symptome zwischen den Gruppen korreliert werden.

Es wurden wieder innerhalb des Beobachtungszeitraumes wöchentlich Blut abgenommen, um einen möglichen Effekt von STI571 und CGP76030 auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut zu beobachten. Abbildung 19 zeigt die Leukozytenzahlen der Nicht-Therapiegruppe (A), der STI571-Therapiegruppe (B) und der CGP76030-Therapiegruppe (C) im zeitlichen Verlauf. Wie im vorher beschriebenen Experiment (siehe Abschnitt 4.3.3) konnte eine überdurchschnittliche Zunahme der Leukozytenzahl nur in einigen Fällen (ca. 2 von 12 Mäusen pro Gruppe) beobachtet werden. Die Zahl der GFP-positiven Zellen im peripheren Blut korrelierte bei manchen Tieren mit der Zunahme an Leukozyten. So konnten z.B. bei Maus 3 aus der CGP76030-Therapiegruppe mit 35000 Leukozyten pro μl (Mittelwert der Gruppe von diesem Tag: ca. 8000) 38% GFP-positive Zellen im peripheren Blut identifiziert werden. Andererseits war dies bei einigen Mäusen auch nicht der Fall, z.B. hatte Maus 6 aus der Nicht-Therapiegruppe zwar 33% GFP-positive Zellen im peripheren Blut, jedoch eine eher erniedrigte Leukozytenzahl (siehe Abbildung 19A). Insgesamt zeigten 3/9 Mäusen der Nicht-Therapiegruppe, 2/6 Mäusen der STI571-Therapiegruppe und 2/7 Mäusen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 100 Tagen nach Transplantation eine erhöhte Zahl GFP-positiver Zellen im peripheren Blut.

A Leukozytenwerte der Nicht-Therapiegruppe



B Leukozytenwerte der STI571-Therapiegruppe



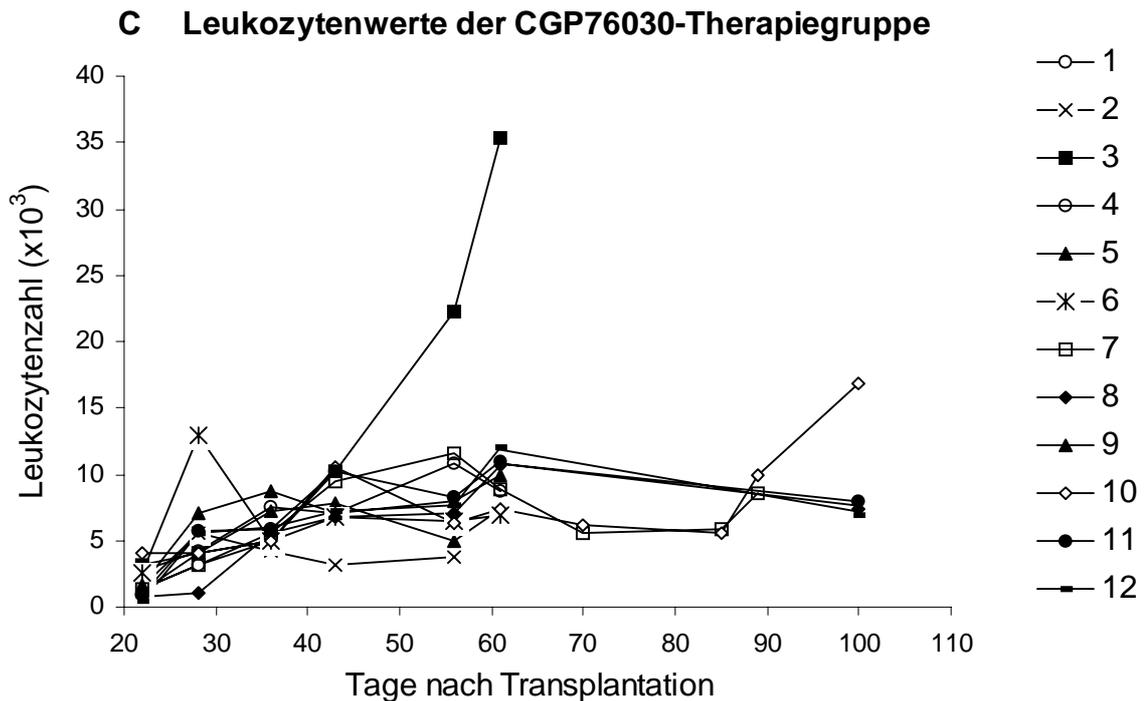


Abbildung 19: Die Leukozytenzahlen der Nicht-Therapiegruppe (A), der STI571-Therapiegruppe (B) oder der CGP76030-Therapiegruppe des Bcr-Abl^{Thr315Ile} Transplantats im zeitlichen Verlauf.

Auch in diesem Experiment war somit bei den meisten Mäusen weder die Zahl der Leukozyten noch die Zahl der GFP-positiven Zellen im peripheren Blut ein zuverlässiges Kriterium, um den Verlauf der Leukämie zu beobachten.

Insgesamt reduzierte die Gabe von CGP76030 die Zahl der Leukozyten signifikant um fast 50% im Vergleich mit der STI571- ($P=0,005$) und der Nicht-Therapiegruppe ($P=0,01$). Dies könnte wieder auf einen toxischen Effekt von CGP76030 auf Knochenmarkszellen zurückzuführen sein. Interessanterweise konnte diesmal keine Reduktion der Leukozytenzahlen mit STI571 festgestellt werden, wie das in dem vorher beschriebenen Experiment mit Bcr-Ablwt infiziertem Knochenmark war der Fall war.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CGP76030 bei der verwendeten Konzentration von 50 mg/kg keinen signifikanten Bcr-Abl-unabhängigen Effekt auf das Überleben von Mäusen in einem Tiermodell für Bcr-Abl-positive B-ALL besitzt.

5 Diskussion

5.1 PP1 und CGP76030 hemmen Wachstum und Überleben von Zellen, die STI571-resistentes Bcr-Abl exprimieren

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die in der Kristallstruktur-Analyse des Bcr-Abl-STI571-Komplexes (Schindler et al., 2000) postulierte Rolle der Aminosäure-Positionen, 315 und 380 als Determinanten für den Zugang von STI571 in die Inhibitor-Bindetasche von Abl funktionell bestätigt werden. Die Charakterisierung von Aminosäureaustauschen an den Positionen 315 und 380 bestätigte außerdem die Vorhersage, dass STI571 eher an inaktives Abl-Protein, nicht aber an aktives Abl bindet, was wahrscheinlich stark zur hohen Spezifität von STI571 beiträgt (Schindler et al., 2000). Es wurde eine Punktmutation in Bcr-Abl eingebracht, welche die Konformation der A-Schleife destabilisieren und so die aktive Konformation wahrscheinlicher machen sollte. Diese Mutation verhinderte die Ausbildung einer Wasserstoff-Brücken-Bindung zwischen Arg386 (auf der A-Schleife) und Asp276/Glu279 (beide auf der β 3- α C-Schleife). Diese Interaktion ist von besonderem Interesse, weil in den Strukturen von IRK (Insulin Receptor Kinase) und Lck die zu Arg386 homologen Aminosäuren als H-Spender für Wasserstoff-Brücken-Bindungen zu den Phosphatgruppen der autophosphorylierten Tyrosine auf der A-Schleife fungieren und dadurch zur Stabilisierung der aktiven Konformation beitragen (Hubbard, 1997; Yamaguchi and Hendrickson, 1996). In unseren Untersuchungen führte die Aufhebung dieser Wasserstoff-Brücken-Bindung zu einer Bcr-Abl Mutante, die im Vergleich zu Bcr-Ablwt deutlich weniger sensitiv gegenüber STI571 war.

Außerdem wurde die Verwendung von Inhibitor-resistenten Mutanten zur Beurteilung von Kinase-Inhibitoren erstmals an Bcr-Abl untersucht. Es wurden Inhibitor-resistente Mutanten verwendet, um den Bindungsmodus von zwei Abl-Inhibitoren zu charakterisieren - PP1 und CGP76030 - welche zusätzlich die Familie der Src-Kinasen blockieren (Hanke et al., 1996; Liu et al., 1999; Missbach et al., 1999). Beide Inhibitoren waren in der Lage, Wachstum und Überleben von Bcr-Abl+ 32D-Zellen in einem ähnlichen Ausmaß wie STI571 zu blockieren. Auch Bcr-Abl+ CML Patienten-Zelllinien wurden durch beide Substanzen getötet, nicht jedoch die getesteten AML-Zelllinien. Nichtsdestotrotz beeinflussen beide Inhibitoren das Wachstum und Überleben von

parentalen 32D negativ, was möglicherweise die Rolle der Src-Kinasen in IL-3 abhängigem Wachstum und Überleben einiger Leukämie-Zelllinien widerspiegelt (Reddy et al., 2000).

Ein Vergleich der Wirkung von PP1, CGP76030 und STI571 auf die Kinase-Aktivität der zahlreichen Mutanten von Bcr-Abl zeigte einen zum größten Teil überlappenden Bindungsmodus der drei Inhibitoren. Alle drei Substanzen waren sensitiv für die Aminosäureaustausche an der Position 315 in Abl, jedoch wurde die Bindung von CGP76030 und PP1 nicht durch den Austausch von Asp276 oder Glu279 gegen Serin beeinflusst. Dies legt nahe, dass die Konformation der A-Schleife von Abl für die Bindung von PP1 und CGP76030 keine Rolle spielt. Obwohl dieses Konzept für den Bindungsmechanismus von PP1 und CGP76030 erst mittels Kristallstruktur-Analyse bewiesen werden muss, ist diese Hypothese im Einklang mit der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur eines anderen Abl Kinase-Inhibitors, PD173955, in Komplex mit der Kinase-Domäne von Abl (Nagar et al., 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass PD173955 an eine Konformation von Abl bindet, die der Konformation aktiver Tyrosin-Kinasen ähnelt, insbesondere die Struktur der A-Schleife.

Die Mutation an der Position 380 hatte keine Auswirkungen auf die Inhibition von Bcr-Abl durch PP1 und CGP76030. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die molekulare Entfernung zwischen der Position 380 und PP1/CGP76030 größer als bei STI571 ist. (Liu et al., 1999; Schindler et al., 1999), was aber wiederum erst durch eine Kristallstruktur-Analyse bewiesen werden könnte.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von PP1 und CGP76030 an Bcr-Abl mit Hilfe Inhibitor-resistenter Mutanten charakterisiert. Dabei wurde ein etwas weniger komplexer Bindungsmodus als bei STI571 festgestellt, was zu einem gewissen Teil das etwas breitere Zielspektrum von PP1 und CGP76030 erklären könnte (Hanke et al., 1996; Missbach et al., 1999). Therapeutisch könnte die geringere Spezifität von PP1 und CGP76030 auch von Vorteil sein, da die Inhibition zusätzlicher Zielmoleküle, insbesondere der Src-Kinasen Familie, in ein therapeutisches Konzept passen könnte. Trotz des Erfolges von STI571 in klinischen Studien erleiden Patienten in der Blastenkrise oder mit Bcr-Abl+ B-ALL mit STI571 oft schnell einen Rückfall (Druker et al., 2001a). Eine kürzlich veröffentlichte Publikation stellte die Hypothese auf, dass spezifische Punktmutationen die Bindung von

STI571 an Bcr-Abl verhindert und so zur Resistenz beitragen: eine Bcr-Abl Mutation an Position 315 zu Isoleucin wurde in drei Patienten mit klinischer STI571-Resistenz identifiziert (Gorre et al., 2001). Weitere Mutationen an anderen Positionen wurden in Patienten gefunden, doch die klinische Relevanz bleibt noch zu zeigen (Hofmann et al., 2002; Shah et al., 2001; von Bubnoff et al., 2002). Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Mutation der Position 315 zu Isoleucin, aber auch zu anderen Aminosäuren, zu einer kompletten Resistenz von 32D_{Bcr-Abl} Zellen gegenüber den inhibitorischen Effekten von STI571 führt. Im Gegensatz dazu reduzierten PP1 und CGP76030 immer noch signifikant das Wachstum und Überleben von 32D-Zellen, welche die Inhibitor-resistente Bcr-AblThr315 Mutanten exprimierten. Dieser Effekt könnte über die Inhibition zusätzlicher Zielmoleküle zustande kommen, was möglicherweise hilft, die Selektion von Inhibitor-resistenten Punktmutationen, wie sie bei STI571 beobachtet werden, zu vermeiden. Es konnte nicht bewiesen werden, dass die Inhibition der Src-Kinasen der einzige oder überwiegende Grund für die beobachteten Abl-unabhängigen biologischen Effekte ist. Jedoch zeigte sich in den biochemischen Experimenten eine starke Korrelation der Effekte von PP1 und CGP76030 auf Wachstum von Zellen, die Inhibitor-resistente Bcr-Abl Mutanten exprimieren, und deren Fähigkeit, Src-Kinasen zu inhibieren. Interessanterweise wurde kürzlich ein anderer Abl-Inhibitor publiziert, PD180970, der ebenfalls zusätzlich Src-Kinasen blockiert (Dorsey et al., 2000). Die Autoren behaupten, dass der Effekt dieser Substanz größtenteils über die Inhibition von Abl zustande kommt. Jedoch wurden nur indirekte Beweise für diese Hypothese geliefert, und es wäre interessant zu sehen, wie der Effekt von PD180970 auf Zellen, die Inhibitor-resistente Mutanten exprimieren, im Vergleich zu PP1 und CGP76030 ausfällt.

Die Inhibition von Src-Kinasen in Zellen, die Bcr-AblThr315 Mutanten exprimieren, ging mit einem Verlust der Proteinkinase-Aktivität von Akt einher. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen die Aktivität von Akt beeinflussen, indem sie Tyrosinreste in der A-Schleife von Akt phosphorylieren und PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1), eine Serin/Threonin Kinase, die Akt an Serin- und Threoninresten phosphorylieren kann, regulieren (Chen et al., 2001; Park et al., 2001). Für die Beurteilung der fehlenden Akt-Aktivität nach Behandlung mit PP1 oder CGP76030 ist es wichtig, dass für beide Substanzen eine direkte Hemmung von Akt oder von PDK1 ausgeschlossen wurde (M. Warmuth, D. Fabro, nicht publizierte Beobachtungen 2001). Es

ist möglich, dass Src-Kinasen über die Phosphorylierung von PDK1 und Akt diesen Signalweg beeinflussen, der für die Regulierung von Zellwachstum und Überleben in Bcr-Abl+ Zellen essentiell ist. Weitere Experimente sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu belegen.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen möglichen Nutzen von dualspezifischen Src/Abl-Inhibitoren, wie PP1 und CGP76030, bei der Therapie fortgeschrittener oder STI571 resistenter Philadelphia Chromosome positiver (Ph+) Leukämien hin. Wegen ihres weniger komplexen Bindungsmodus und der zusätzlichen Inhibition der Src-Kinasen (und eventuell anderer Kinasen) könnte eine Resistenzbildung im Vergleich zu STI571 erschwert sein. Die hier zur Leukämiebehandlung vorgeschlagene Substanz CGP76030 wurde ohne gravierende Toxizität in einem Ratten-Modell für Osteoporose verwendet (Missbach et al., 1999). Es bleibt jedoch nachzuweisen, ob diese oder ähnliche Src-Kinase-Inhibitoren ausreichend spezifisch und sicher für eine klinische Anwendung sind.

5.2 Der Effekt von CGP76030 in einem Tiermodell für Bcr-Abl-positive B-ALL

Vorarbeiten, die wir gemeinsam mit Rick van Etten durchgeführt hatten, zeigten, dass mit $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -Spendermäusen im retroviralen Knochenmark-Transduktions-Retransplantation-Modell keine Bcr-Abl-positive B-ALL mehr induziert werden konnte. Die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr scheinen damit in Mäusen eine entscheidende Rolle für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL zu spielen. Substanzen, welche die Aktivität von Src-Kinasen inhibieren können, sind aufgrund dieser Resultate potentielle Medikamente für die Behandlung Bcr-Abl-positiver B-ALL.

Um die Wirksamkeit eines dualspezifischen Src/Abl-Inhibitors gegen Bcr-Abl-positive B-ALL *in vivo* zu testen, wurde das retrovirale Knochenmark-Transduktions-Retransplantation-Modell für Bcr-Abl-positive B-ALL in unserem Labor etabliert. Der Phänotyp der induzierten Erkrankung konnte, trotz der Heterogenität der einzelnen Symptome, als eine Bcr-Abl-positive B-lymphatische Leukämie bestimmt werden. Das Auftreten der ersten Krankheitszeichen wie z.B. Lähmungserscheinungen und ein hoher Prozentsatz von Bcr-Abl-positiven Zellen im Knochenmark oder peripheren Blut, in einem

Zeitraum von 20-40 Tagen nach der Transplantation deckt sich mit den Angaben aus Rick van Etten's Labor in Boston (Dr. van Etten, persönliche Mitteilung). Die maximale Lebensdauer der transplantierten Mäuse dagegen war in unseren Experimenten mit Bcr-AblThr315Ile durchschnittlich deutlich höher (ca. Tag 140) als bei den Versuchen aus Dr. van Etten's Labor (Tag 70-100). Diese unterschiedliche Überlebensdauer kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Die Qualität der Viruspräparationen könnte sich unterschieden haben und für das längere Überleben verantwortlich sein, selbst wenn der Titer immer ungefähr 1×10^7 Partikel/ml betrug. Auch könnten schon geringe Unterschiede in der Menge der injizierten Zellen bei der Transplantation einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben. Weiterhin wurde zwar der gleiche Mausstamm (C57BL/6) verwendet, jedoch von unterschiedlichen Quellen bezogen. Die Tiere, die in Dr. van Etten's Labor verwendet wurden, könnten sich also in ihrem genetischen Hintergrund geringfügig von unseren Tieren unterscheiden haben, was sich auch auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. Eine höhere Wahrscheinlichkeit, sekundäre oder tertiäre genetische Veränderungen anzuhäufen, würde den Krankheitsverlauf mit großer Sicherheit beschleunigen. Nur bei der Verwendung von Bcr-Ablwt infiziertem Knochenmark als Transplantat verlief die Erkrankung in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen ab wie in Dr. van Etten's Labor. Alle Tiere aus der Nicht-Therapiegruppe erkrankten bis Tag 78 terminal. Diese Tatsache könnte darauf hindeuten, dass der Ablauf der Leukämie durch eine unterschiedliche transformierende Kapazität von Wildtyp und resistenter Mutante von Bcr-Abl beeinflusst wurde. In diesem Fall wäre die längere Überlebensdauer von Tieren, denen Bcr-AblThr315Ile infiziertes Knochenmark transplantiert wurde, auf ein geringeres transformierendes Potenzial der resistenten Mutante zurückzuführen. In den Versuchen aus Dr. van Etten's Labor wurde immer nur Bcr-Ablwt verwendet. Ein direkter Vergleich von unseren Ergebnissen aus den Bcr-AblThr315Ile Experimenten und den Versuchen aus Boston ist somit nicht möglich.

Die Transplantationen mit Bcr-Ablwt infiziertem Knochenmark waren als **Vorversuche** geplant und wurden deshalb mit Gruppengrößen durchgeführt, die zu klein für signifikante Aussagen waren. Für eine Beantwortung der Frage, ob Src-Kinasen in Bcr-Abl-positiven Leukämien eine Rolle spielen, war die Induktion einer Leukämie mit dem Wildtyp von Bcr-Abl nicht geeignet. Der dualspezifische Src/Abl-Inhibitor CGP76030 hemmte in 32D-Zellen nicht nur die Kinase-Aktivität der Src-Kinasen, sondern auch von Bcr-Ablwt (siehe

Abbildung 7D, F). Damit kann der Effekt von CGP76030 bei der Verwendung des Wildtyps von Bcr-Abl in diesem Tiermodell nicht der Hemmung der Src-Kinasen zugeschrieben werden. Aufgrund des direkten kausalen Zusammenhangs zwischen der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl Wildtyp und Leukämie-Induktion wird bei einer gleichzeitigen Hemmung beider Zielmoleküle, Bcr-Abl und Src-Kinasen, die Wirkung vor allem über die Hemmung der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl zustande kommen, während die Hemmung der Src-Kinasen-Familie dabei eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte.

Es ist jedoch bemerkenswert, dass zwei Mäuse aus der CGP76030-Therapiegruppe erst am Tag 239 bzw. 250 nach Transplantation verstarben und damit länger überlebten als die Tiere der STI571-Therapiegruppe. Möglicherweise deutet das darauf hin, dass die gleichzeitige Inhibition von Abl und Src-Kinasen zu einer vollständigeren Elimination Bcr-Abl-positiver Zellen führte, als dies mit STI571 erfolgte. Damit könnte die Selektion Bcr-Abl-unabhängiger, STI571-resistenter Klone, erschwert worden sein. Die Erkrankung der anderen zwei Mäuse, die mit CGP76030 behandelt wurden, lässt sich durch das bereits fortgeschrittene Krankheitsbild beider Mäuse erklären. Eine Maus erkrankte terminal bereits zwei Tage, die andere 7 Tage nach Therapiebeginn. Die Behandlung mit CGP76030 könnte in beiden Fällen zu kurz gewesen sein, um einen positiven Effekt auf das Überleben zu zeigen. Weitere Experimente mit größeren Gruppen sind jedoch notwendig, um diese Daten zu bestätigen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde sich auf die Fragestellung konzentriert, welche Bcr-Abl unabhängigen Effekte CGP76030 auf das Überleben von Mäusen mit Bcr-Abl-positiver B-ALL ausübt. Dazu wurde wieder das Transduktions-/Transplantationsmodell eingesetzt. Jedoch wurde Knochenmark transplantiert, das mit einer Bcr-Abl Mutante (Bcr-AblThr315Ile) infiziert worden war, die in 32D-Zellen weder von STI571 noch von CGP76030 inhibiert werden konnte. Der Effekt von CGP76030 in diesem Modell sollte damit nicht auf eine Hemmung von Bcr-Abl zurückzuführen sein, sondern auf die Hemmung der Src-Kinasen-Familie oder anderer, noch unbekannter Zielmoleküle. Dazu wurden zwei Tierversuche durchgeführt. Für das erste Transplantat wurden 4 Mäusen pro Gruppe eingesetzt und die Therapie an Tag 25 nach Transplantation begonnen. In diesem Fall wurde dem transplantierten Knochenmark mehr Zeit für die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems gegeben. In einem zweiten Versuch wurden 8 Mäuse pro Gruppe transplantiert und an Tag 11 mit der Therapie begonnen. Hierbei sollte möglichst

früh mit der Therapie begonnen werden, um für einen eindeutigen Therapie-Effekt einen zu späten Therapiebeginn auszuschließen. Es stellte sich heraus, dass die Überlebenskurven der beiden Experimente keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen. Aus diesem Grund wurden die beiden Versuche in einer einzigen Überlebenskurve zusammengefasst. Im Vergleich mit der Nicht-Therapiegruppe zeigten sowohl STI571 als auch CGP76030 keinen signifikanten Effekt auf das Überleben der Tiere. Eine mögliche Erklärung ist, dass auch der Therapiebeginn an Tag 11 zu spät war, um einen eindeutigen Effekt zu erzielen. Möglicherweise müsste schon ein oder zwei Tage nach der Transplantation mit der Gabe der Inhibitoren begonnen werden. Dabei würde allerdings das Problem entstehen, dass die Mäuse in den ersten 10 Tagen nach Transplantation aufgrund der Bestrahlung extrem schwach und anfällig sind. Eine durchschnittliche Sterberate von 10-20% in den ersten 10 Tagen belegt diesen Aspekt. Da die Fütterung der Inhibitoren die Tiere zusätzlich stressen würde, könnte die Zahl der Todesfälle in den Inhibitorgruppen in diesen ersten 10 Tagen höher liegen als in der Nicht-Therapiegruppe, ohne einen Zusammenhang mit der Leukämie aufzuzeigen.

Leider konnten aus technischen Gründen keine Messungen der Plasmakonzentrationen der Inhibitoren durchgeführt werden. Es ist also nicht bekannt, welche Plasmaspiegel STI571 oder CGP76030 bei der Gabe von 50 mg/kg in den Mäusen in den durchgeführten Experimenten erreichte. Zu Beginn der Experimente war nur die Bioverfügbarkeit von CGP76030 in Ratten bekannt (bei 50mg/kg ca. 15 μ M maximale Plasmakonzentration, stabil für 6 Stunden). Außerdem wurde CGP76030 erfolgreich in einem Rattenmodell zur Therapie von Osteoporose eingesetzt (Missbach et al., 1999). Nach neuesten Erkenntnissen beträgt jedoch in C57/BL6 Mäusen, denen 2x täglich für 3 Tage 50mg/kg verabreicht wurden, die maximale Plasmakonzentration nur 4,5 μ M mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Stunden (M.Warmuth, persönliche Mitteilung). Die Daten aus 32D_{Bcr-Abl} Zellen deuten aber darauf hin, dass die IC₅₀ von CGP76030 für einen eindeutigen biologischen Effekt bei ca. 2,5 μ M liegt. Das bedeutet, dass nach ca. 3 Stunden die IC₅₀ unterschritten wird, und nach ca. 7 Stunden keine Inhibitorwirkung mehr im Blut nachweisbar ist. Um eine gute in vivo-Wirkung zu erhalten, sollte jedoch die Plasmakonzentration von CGP76030 zumindest über der IC₈₀ liegen, also deutlich über 2,5 μ M. Damit ist die Pharmakokinetik weitaus schlechter als in Ratten, die zu Beginn der Experimente als Richtwert für die Bioverfügbarkeit herangezogen wurde. Das Ausbleiben eines eindeutigen positiven

Effektes von CGP76030 kann damit auch auf eine zu geringe Konzentration im Plasma zurückzuführen werden.

In beiden Versuchen mit Bcr-Abl^{Thr315Ile} infizierten Knochenmark erkrankten die ersten Mäuse in den CGP76030-Therapiegruppen 20-30 Tage später als in der STI571-Therapiegruppe und der Nicht-Therapiegruppe. Dieser Umstand schlägt sich in dem Median des Überlebens nieder, der zwischen der Nicht-Therapiegruppe und der CGP76030-Therapiegruppe leicht signifikant ist ($P=0,04$), während er hoch unsignifikant ($P=0,44$) zwischen der Nicht-Therapiegruppe und der STI571-Therapiegruppe ausfällt. Jedoch ist der Median des Überlebens auch zwischen der STI571- und der CGP76030-Therapiegruppe nicht signifikant ($P=0,33$). Weitere Experimente mit großer Gruppenszahl sind daher notwendig, um einen möglichen Effekt von CGP76030 auf den Krankheitsbeginn zu veranschaulichen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CGP76030 bei der verwendeten Konzentration von 50 mg/kg keinen signifikanten Bcr-Abl-unabhängigen Effekt auf das Überleben von Mäusen in einem Tiermodell für Bcr-Abl-positive B-ALL besitzt. Einzig ein um ca. 20 Tage verzögerter Krankheitsbeginn konnte beobachtet werden. Auch bleibt aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit unklar, ob CGP76030 als ein geeigneter Kandidat für die Therapie Bcr-Abl-positiver, STI571 resistenter B-ALL in Frage kommt.

6 Zusammenfassung

Bcr-Abl ist eine onkogene Tyrosinkinase, die maßgeblich an der Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie und der Philadelphia-positiven B-ALL beteiligt ist. Die Aktivität der Tyrosinkinase von Bcr-Abl kann über den Inhibitor STI571 (Imatinib) effektiv blockiert werden, was in der Klinik zu großen therapeutischen Erfolgen führte. Vor allem im fortgeschrittenen Stadium der CML, der Blastenkrise, und der Philadelphia-positiven B-ALL führte die Behandlung mit STI571 jedoch rasch zur Ausbildung von Resistenzen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Familie der Src-Kinasen einen potentiellen Angriffspunkt für die Therapie Bcr-Abl-positiver Leukämien darstellt. Weiterhin sollte getestet werden, ob die dualspezifischen Src/Abl-Inhibitoren PP1 und CGP76030 eine STI571-Resistenz überwinden könnten. Eine Charakterisierung des Bindungsmechanismus von STI571, PP1 und CGP76030 an Abl zeigte die Position 315 in Abl als eine gemeinsame wichtige Spezifitätsdeterminante auf, wobei die Position 380 sowie eine inaktive Konformation der Aktivierungsschleife-Schleife (A-Schleife) von Abl nur für die Bindung von STI571, nicht jedoch für die Bindung von CGP76030 und PP1 wichtig zu sein scheint. In Experimenten mit Bcr-Abl-positiven Zelllinien, die resistent gegenüber STI571 waren, konnten PP1 und CGP76030 die STI571-Resistenz zu einem gewissen Grad überwinden und immer noch Wachstum und Überleben negativ beeinflussen. Jedoch konnte die Rolle der Src-Kinasen bei Bcr-Abl-positiven Leukämien nicht eindeutig bewiesen werden, da der beobachtete biologische Effekt auch über die Hemmung anderer, noch unbekannter Zielmoleküle zustande gekommen sein könnte.

Der dualspezifische Src/Abl Inhibitor CGP76030 sollte weiterhin in einem Tiermodell für Bcr-Abl-positiv, STI571-resistente B-ALL getestet werden. Ein Vorversuch mit Bcr-Abl-positiver B-ALL zeigte die erfolgreiche Etablierung des Tiermodells. Interessanterweise erlitten hierbei mit STI571-behandelte Tiere nach dem Ende der Therapie schneller einen Rückfall als mit CGP76030-behandelte Tiere. Bei der Induktion einer B-ALL mit STI571-resistentem Bcr-Abl konnte jedoch bei 50mg/kg (zweimal täglich) kein signifikanter Effekt von CGP76030 auf das Überleben der Mäuse festgestellt werden. Lediglich ein um ca. 20 Tage verzögerter Beginn der Erkrankung wurde beobachtet.

7 Literaturverzeichnis

- Avizienyte, E., Wyke, A. W., Jones, R. J., McLean, G. W., Westhoff, M. A., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2002). Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling, *Nat Cell Biol* 4, 632-8.
- Bjelfman, C., Hedborg, F., Johansson, I., Nordenskjold, M., and Pahlman, S. (1990). Expression of the neuronal form of pp60c-src in neuroblastoma in relation to clinical stage and prognosis, *Cancer Res* 50, 6908-14.
- Bolen, J. B., Thompson, P. A., Eiseman, E., and Horak, I. D. (1991). Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes, *Adv Cancer Res* 57, 103-49.
- Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N. B., Gilliland, D. G., and Druker, B. J. (1997). CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL and TEL-PDGFR fusion proteins, *Blood* 90, 4947 - 4952.
- Chai, S. K., Nichols, G. L., and Rothman, P. (1997). Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients, *J Immunol* 159, 4720-8.
- Chan, V. W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A. L., and Lowell, C. A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation, *Immunity* 7, 69-81.
- Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K. M., McCarthy, J., Chen, H., and Qiu, Y. (2001). Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem* 276, 31858-62.
- Cortez, D., Stoica, G., Pierce, J. H., and Pendergast, A. M. (1996). The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway, *Oncogene* 13, 2589 - 2594.

- Dai, Z., Quackenbush, R. C., Courtney, K. D., Grove, M., Cortez, D., Reuther, G. W., and Pendergast, A. M. (1998). Oncogenic abl and src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a ras-independent pathway [In Process Citation], *Genes Dev* *12*, 1415-24.
- Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., and Hallek, M. (1996). Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr-abl in myeloid cells, *Cancer Research* *56*, 3589 - 3596.
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts, *Genes Dev* *13*, 2905-27.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R., and Koenderman, L. (1999). STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells, *Blood* *94*, 1108-12.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., and Koenderman, L. (2000). STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells, *Mol Cell Biol Res Commun* *3*, 299-305.
- de Klein, A., van Kessel, A. G., Grosveld, G., Bartram, C. R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N. K., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Stephenson, J. R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukaemia, *Nature* *300*, 765 - 767.
- 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.
- Deutsch, E., Dugray, A., AbdulKarim, B., Marangoni, E., Maggiorella, L., Vaganay, S., M'Kacher, R., Rasy, S. D., Eschwege, F., Vainchenker, W., *et al.* (2001). BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs, *Blood* *97*, 2084-90.
- 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*, 690-8.

- Dorsey, J. F., Jove, R., Kraker, A. J., and Wu, J. (2000). The pyrido[2,3-d]pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells, *Cancer Res* 60, 3127-31.
- 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, 1038-42.
- 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, 1031-7.
- 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, *Nature Medicine* 2, 561 - 566.
- Egan, C., Pang, A., Durda, D., Cheng, H. C., Wang, J. H., and Fujita, D. J. (1999). Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530, *Oncogene* 18, 1227-37.
- Gesbert, F., and Griffin, J. D. (2000). Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5, *Blood* 96, 2269-76.
- Gishizky, M. L., Cortez, D., and Pendergast, A. M. (1995). Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 10889 - 10893.
- Gonfloni, S., Frischknecht, F., Way, M., and Superti-Furga, G. (1999). Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis, *Nat Struct Biol* 6, 760-4.

-
- 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, 876-80.
- Guy, C. T., Muthuswamy, S. K., Cardiff, R. D., Soriano, P., and Muller, W. J. (1994). Activation of the c-Src tyrosine kinase is required for the induction of mammary tumors in transgenic mice, *Genes Dev* 8, 23-32.
- Hanke, J. E., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., and Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor, *The Journal of Biological Chemistry* 271, 695 - 701.
- Heisterkamp, N., and Groffen, J. (2002). Philadelphia-positive leukemia: a personal perspective, *Oncogene* 21, 8536-8540.
- Hofmann, W. K., de Vos, S., Elashoff, D., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D., Koeffler, H. P., and Ottmann, O. G. (2002). Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study, *Lancet* 359, 481-6.
- Horita, M., Andreu, E. J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., and Fernandez-Luna, J. L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL, *J Exp Med* 191, 977-84.
- Hubbard, S. R. (1997). Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog, *Embo J* 16, 5572-81.
- Hubbard, S. R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998). Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases, *J Biol Chem* 273, 11987-90.

- Ilaria, R. L. J., and Van Etten, R. A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members, *The Journal of Biological Chemistry* 271, 31704 - 31710.
- Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., and Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers, *Nat Genet* 21, 187-90.
- Irby, R. B., and Yeatman, T. J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer, *Oncogene* 19, 5636-42.
- Jacobs, C., and Rubsamen, H. (1983). Expression of pp60c-src protein kinase in adult and fetal human tissue: high activities in some sarcomas and mammary carcinomas, *Cancer Res* 43, 1696-702.
- Kasper, B., Fruehauf, S., Schiedlmeier, B., Buchdunger, E., Ho, A., and Zeller, W. (1999). Favorable therapeutic index of a p210-bcr-abl-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors, *Cancer Chemother Pharmacol* 44, 433-438.
- Klejman, A., Schreiner, S. J., Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Wilson, M., Smithgall, T. E., and Skorski, T. (2002). The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells, *Embo J* 21, 5766-74.
- 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.
- le Coutre, P., Mologni, L., Cleris, L., Marchesi, E., Buchdunger, E., Giardini, R., Formelli, F., and Gambacorti-Passerini, C. (1999). In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor, *J Natl Cancer Inst* 91, 163-8.
- le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R., and Gambacorti-Passerini, C. (2000). Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification, *Blood* 95, 1758-66.

- Lewis, J. M., Baskaran, R., Taagepera, S., Schwartz, M. A., and Wang, J. Y. J. (1996). Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 15174 - 15179.
- Lionberger, J. M., Wilson, M. B., and Smithgall, T. E. (2000). Transformation of myeloid leukemia cells to cytokine independence by Bcr-Abl is suppressed by kinase-defective Hck, *J Biol Chem* 275, 18581-5.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D. O., and Shokat, K. M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1, *Chem Biol* 6, 671-678.
- Lowell, C., Niwa, M., Soriano, P., and Varmus, H. (1996). Deficiency of the Hck and Src tyrosine kinases results in extreme levels of extramedullary hematopoiesis, *Blood* 87, 1780-1792.
- Lowell, C. A., and Soriano, P. (1996). Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories, *Genes Dev* 10, 1845-57.
- Lutz, M. P., Esser, I. B., Flossmann-Kast, B. B., Vogelmann, R., Luhrs, H., Friess, H., Buchler, M. W., and Adler, G. (1998). Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma, *Biochem Biophys Res Commun* 243, 503-8.
- Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance, *Blood* 96, 1070-9.
- Mandanas, R. A., Leibowitz, D. S., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G. S., Miyazawa, K., Jayaram, H. N., and Boswell, H. S. (1993). Role of p21 ras in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells, *Blood* 82, 1838 - 1847.
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. J., and Griffin, J. D. (1994). Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte

macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL, *The Journal of Biological Chemistry* 7, 5016 - 5021.

Mazurenko, N. N., Kogan, E. A., Zborovskaya, I. B., and Kisseljov, F. L. (1992). Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas, *Eur J Cancer* 28, 372-7.

McWhirter, J. R., and Wang, J. Y. (1991). Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins., *Molecular and Cellular Biology* 11, 1553 - 1565.

McWhirter, J. R., and Wang, J. Y. J. (1993). An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias, *European Molecular Biology Organisation Journal* 12, 1533 - 1546.

Meng, F., and Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn, *J Exp Med* 185, 1661-70.

Miething, C., Grundler, R., Mugler, C., Peschel, C., and J., D. (2001). Mice with a CML-like disease relapse with an acute lymphocytic leukemia after treatment with STI571. Paper presented at: 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology (Orlando, Florida).

Missbach, M., Jeschke, M., Feyen, J., Muller, K., Glatt, M., Green, J., and Susa, M. (1999). A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo, *Bone* 24, 437-49.

Mocsai, A., Ligeti, E., Lowell, C. A., and Berton, G. (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck, *J Immunol* 162, 1120-6.

- Muthuswamy, S. K., Siegel, P. M., Dankort, D. L., Webster, M. A., and Muller, W. J. (1994). Mammary tumors expressing the neu proto-oncogene possess elevated c-Src tyrosine kinase activity, *Mol Cell Biol* *14*, 735-43.
- Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M. A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B., and Skorski, T. (1999). Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis, *J Exp Med* *189*, 1229-42.
- Nowell, P., and Hungerford, D. (1960). *Science* *132*, 1497-1499.
- Ono, M., Bolland, S., Tempst, P., and JV, R. (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by receptor FcRIIB., *Nature* *383*, 263-266.
- Park, J., Hill, M. M., Hess, D., Brazil, D. P., Hofsteenge, J., and Hemmings, B. A. (2001). Identification of tyrosine phosphorylation sites on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity, *J Biol Chem* *276*, 37459-71.
- Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Clark, R., McCormick, F., and Witte, O. N. (1991). Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* *88*, 5927 - 5931.
- Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., and Gishizky, M. L. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein, *Cell* *75*, 175 - 185.
- Radich, J. P. (2001). Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia, *Hematol Oncol Clin North Am* *15*, 21-36.
- 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* *92*, 11746 - 11750.

- Reddy, E. P., Korapati, A., Chaturvedi, P., and Rane, S. (2000). IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled, *Oncogene* *19*, 2532-47.
- Roumiantsev, S., NP, S., Gorre, M. E., Nicoll, J., Brasher, B. B., Sawyers, C., 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*, 10700-5.
- Rowley, J. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining, *Nature* *243*, 290 - 293.
- Salloukh, H. F., and Laneuville, P. (2000). Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase, *Leukemia* *14*, 1401-4.
- Salomoni, P., Wasik, M. A., Riedel, R. F., Reiss, K., Choi, J. K., Skorski, T., and Calabretta, B. (1998). Expression of Constitutively Active Raf-1 in the Mitochondria Restores Antiapoptotic and Leukemogenic Potential of a Transformation-deficient BCR/ABL Mutant, *J Exp Med* *187*, 1995-2007.
- Sanchez-Garcia, I., and Martin-Zanca, D. (1997). Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras., *Journal of Molecular Biology* *267*, 225 - 228.
- Sattler, M., and Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells, *Leukemia* *12*, 637-44.
- 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, *Journal of Experimental Medicine* *181*, 307 - 313.
- 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*, 1938-42.
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., and Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor, *Mol Cell* *3*, 639-48.

-
- Schuster, C., Forster, K., Dierks, H., Elsasser, A., Behre, G., Simon, N., Danhauser-Riedl, S., Hallek, M., and Warmuth, M. (2003). The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate, *Blood* *101*, 655-63.
- Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., and Ihle, J. N. (2000). Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl- and bcr/abl-induced transformation are independent of stat5, *Blood* *96*, 2277-83.
- Shah, N., Nicoll, J., Gorre, M. E., Paquette, R. L., Ford, J., and Sawyers, C. I. (2001). Resistance to Gleevec: sequence analysis reveals a spectrum of Bcr-Abl kinase domain mutations in both acquired and de-novo-resistant cases of CML in myeloid blast crisis. Paper presented at: 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology (Orlando).
- 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*, 117-25.
- Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck, *Nature* *385*, 602 - 609.
- Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D. A., Sattler, M., and Griffin, J. D. (2000). STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells, *Blood* *95*, 2118-25.
- Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J. K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T. O., *et al.* (1997). Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway, *European Molecular Biology Organisation Journal* *16*, 6151 - 6161.
- Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995). Phosphatidylinositol-3

kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells, *Blood* 86, 726 - 736.

Stanglmaier, M., Warmuth, M., Kleinlein, I., Reis, S., and Hallek, M. (2003). The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains, *Leukemia* 17, 283-9.

Van Etten, R. A., Jackson, P., and Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization, *Cell* 58, 669 - 678.

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, 487-91.

Warmuth, M., Bergmann, M., Prieß, A., Häuslmann, K., Emmerich, B., and Hallek, M. (1997). The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr, *The Journal of Biological Chemistry* 272, 33260 - 33270.

Warmuth, M., Danhauser-Riedl, S., and Hallek, M. (1999). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies, *Annals of Hematology* 78, 49 - 64.

Warmuth, M., Simon, N., Mitina, O., Mathes, R., Fabbro, D., Manley, P. W., Buchdunger, E., Forster, K., Moarefi, I., and Hallek, M. (2003). Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr- Abl kinases, *Blood* 101, 664-72.

Williams, J. C., Weijland, A., Gonfloni, S., Thompson, A., Courtneidge, S. A., Superti-Furga, G., and Wierenga, R. K. (1997). The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions, *J Mol Biol* 274, 757-75.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., and Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Mol Cell* 3, 629-38.

- Xu, W., Harrison, S., and Eck, M. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src, *Nature* *385*, 595-602.
- Yamaguchi, H., and Hendrickson, W. A. (1996). Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation, *Nature* *384*, 484 - 489.
- Yu, C. C., Yen, T. S., Lowell, C. A., and DeFranco, A. L. (2001). Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn, *Curr Biol* *11*, 34-8.

8 Lebenslauf

Name: Simon
 Vorname: Nicola
 Geburtsdatum: 12. August 1974
 Geburtsort: Nürnberg

Promotion

Seit Mai 2000 Promotion bei Prof. Dr. med. Hallek, Leiter der klinischen Kooperationsgruppe Gentherapie am Hämatologikum der GSF
 Thema: „Src-Kinasen als potentielle therapeutische Zielstruktur bei Philadelphia-positiven Leukämien“

Studium

Jan. 2000 Erwerb des Diploms in Biologie, Gesamtnote „sehr gut“ (1,2)
 Jan. 2000 - April 1999 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg bei Prof. Dr. Fey
 Thema: „Herstellung von rekombinanten scFv-Antikörper-Fragmente mit spezifischer Reaktivität gegen das humane Leukozyten-Antigen CD13“; Note „sehr gut“ (1,0)
 Feb. 1999 Diplomprüfungen in Biologie
 Mai 1996 Vordiplom Biologie, Note „gut“ (2,0)
 Nov. 1994 Beginn des Biologiestudiums an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Schule

Juli 1994 Abitur, Note 1,7
 1991 2 Wochen Schüleraustausch nach Moskau, Russland
 1989 2 Wochen Sprachkurs in London, Großbritannien
 1994 - 1985 Maria-Ward-Gymnasium, Nürnberg
 1985 - 1984 Hauptschule Eibach
 1984 - 1980 Grundschule Eibach

Privatadresse:

Wilhelm-Riehl-Str. 24
80687 München
Telefon: 089/57115712

Dienstadresse:

GSF-Forschungsinstitut für Umwelt und
Gesundheit
Hämatologikum
KKG Gentherapie
Marchioninstr. 25
81377 München
Telefon: 089/7099424
Fax: 089/7099400

Email: nicola.simon@gsf.de oder ni_side@yahoo.de