

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Rolle von ICSBP in der Genetik BCR-ABL-induzierter
Transformation und bei der Resistenzentstehung von BCR-ABL-
transformierten Zellen gegenüber Imatinib**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Katharina Schmidt aus Meschede
Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 07.10.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. A. Burchert

1. Korreferent: Prof. Dr. M. Koch

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

1	Einleitung.....	1
1.1	Chronische myeloische Leukämie (CML)	1
1.1.1	Molekulargenetik von BCR-ABL	1
1.1.2	Molekulare Mechanismen BCR-ABL-vermittelter leukämischer Transformation	3
1.1.3	Progression der CML	5
1.1.4	Klinische Grundlagen der CML.....	6
1.1.5	Therapie der CML	7
1.1.6	Molekulare Wirkungsweise von Imatinib.....	8
1.1.7	Molekulare Mechanismen der Imatinib-Resistenz	10
1.1.8	Strategien zur Überwindung der Imatinib-Resistenz.....	13
1.2	Die Familie der Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs).....	16
1.2.1	Der Transkriptionsfaktor IRF-8	18
1.2.2	Die Bedeutung der IRFs für die CML	19
1.3	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Zelllinien und Primärzellen	21
2.1.2	Biologisches Material	21
2.1.3	Primer	22
2.1.4	Antikörper.....	22
2.1.5	Lösungen und Puffer	23
2.1.6	Reagenzien	25
2.1.7	Vorrichtungen und Software	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	29
2.2.3	Isolierung von mononukleären Knochenmarkzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten.....	30
2.2.4	DNA-Extraktion	31
2.2.5	Quantifizierung von DNA	31
2.2.6	Protein-Extraktion.....	32
2.2.7	Western Blot.....	32
2.2.8	Gewinnung von Plasmid-DNA	35
2.2.9	Retrovirale Transduktion	36
2.2.10	Replattierungsassay in Methylcellulose.....	38
2.2.11	N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierter Mutageneseassay	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Standardisierung einer PCR zur Genotypisierung des ICSBP-Gens	40
3.2	Keine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP in der onkogenen Transformation	43
3.3	Erhöhte imatinibinduzierte Resistenzbildung von 32D/BA-ICSBP-Zellen gegenüber 32D/BA-Zellen im N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierten Mutageneseassay	47
4	Diskussion	50
4.1	Keine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP in der onkogenen Transformation	50
4.2	Erhöhte imatinibinduzierte Resistenzbildung von 32D/BA-ICSBP-Zellen gegenüber 32D/BA-Zellen im N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierten Mutageneseassay	53
5	Zusammenfassung	56
6	Summary	58
7	Literaturverzeichnis	60
8	Verzeichnis akademischer Lehrer	70
9	Danksagung	71
10	Ehrenwörtliche Erklärung	72

Abkürzungsverzeichnis

(m-)BCR	engl.: <i>(major) breakpoint cluster region</i>
AID	engl.: <i>activation-induced cytidine deaminase</i>
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
allo-SZT	Allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
cDNA	Kopie-DNA (engl.: <i>copy-DNA</i>)
CFU	Koloniebildende Einheit (engl.: <i>colony forming unit</i>)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Gemeinsame myeloische Vorläuferzelle (engl.: <i>common myeloid progenitor</i>)
CRKL	engl.: <i>CRK-like protein</i>
CSR	Klassenwechsel-Rekombination (engl.: <i>class-switch-recombination</i>)
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-N-Triphosphat (N = Adenosin, Cytidin, Thymidin, Guanosin)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
et. al.	et alii
FasL	Fas Ligand
FBS	Fötales Kälberserum (engl.: <i>foetal bovine serum</i>)
FSC	Forward Scatter
GAS	Interferon- γ -aktivierte Sequenz

	(engl.: <i>gamma activated sequence</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP	Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzelle (engl.: <i>granulocyte-macrophage progenitor</i>)
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
h	Stunden (engl.: <i>hours</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (engl.: <i>haematopoietic stem cell</i>)
ICS	Interferon-Konsensussequenz (engl.: <i>interferon consensus sequence</i>)
ICSBP	Interferon-Konsensussequenz bindendes Protein (engl.: <i>interferon consensus sequence binding protein</i>)
ICSBP fw	ICSBP Forward-Primer
ICSBP rv	ICSBP Reverse-Primer
IM	Imatinib Mesylat
ISRE	engl.: <i>interferon-stimulated response element</i>
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LOH	Verlust der Heterozygotie (engl.: <i>loss of heterozygosity</i>)
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Nachrichten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
NaCl	Natriumchlorid
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)

PDGF	engl.: <i>platelet derived growth factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RT	<ol style="list-style-type: none">1. Raumtemperatur2. reverse Transkriptase3. reverse Transkription
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
sek	Sekunden
SHC	engl.: <i>SRC-homology containing protein</i>
SHM	Somatische Hypermutation
SSC	Side Scatter
STAT	Signalweiterleiter und Transkriptionsaktivator (engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
u	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Chronische myeloische Leukämie (CML)

Die CML ist eine hämatopoetische Stammzell-Erkrankung, die durch die reziproke chromosomale Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (Rowley, 1973) charakterisiert ist. Diese Translokation führt zur Bildung eines verkürzten Chromosoms 22 (Philadelphia-Chromosom), welches das BCR-ABL-Fusionsgen trägt (Abb. 1).

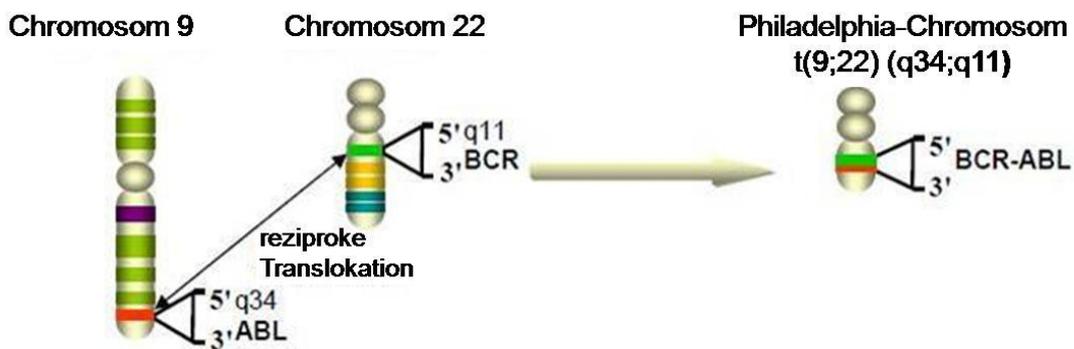


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Philadelphia-Chromosoms. Die Chromosomen 9 und 22 tragen jeweils die c-ABL- und c-BCR-Gene. Die Translokation führt zur Bildung eines verkürzten Chromosoms 22 (Philadelphia-Chromosom), welches das BCR-ABL-Hybridgen trägt.

1.1.1 Molekulargenetik von BCR-ABL

Der Bruchpunkt innerhalb des ABL-Gens kann entweder stromaufwärts des ersten alternativen Exons 1b, stromabwärts des zweiten alternativen Exons 1a oder, am häufigsten, zwischen den beiden auftreten.

Bei den meisten Patienten mit CML tritt der Bruchpunkt im BCR-Gen zwischen den BCR-Exons 12-16 auf. Dieser Abschnitt wird als „major breakpoint cluster region“ (M-bcr) definiert. Durch diese Translokation wird ein Teil des BCR-Gens mit einem Teil des ABL-Gens, das eine Tyrosinkinase kodiert, fusioniert. Aufgrund von alternativem Splicing entstehen Fusionstranskripte mit entweder b2a2- oder b3a2-Junktionen (Abb. 2). Das chimäre BCR-ABL-Onkogen wird in ein chimäres Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 210 (p210) kDa translatiert, das konstitutive ABL-Kinaseaktivität im Zytoplasma aufweist. Die Aktivität der Kinase

wird durch das Verhältnis zwischen aktivem und inaktivem Zustand definiert. Das bedeutet, dass sich die konstitutiv aktive Kinase häufiger im aktivierten Zustand befindet als das normale 145-kDa-ABL-Genprodukt (Melo, 1996). Es wird angenommen, dass die konstitutive Kinaseaktivität entscheidend für die Pathogenese der CML ist (Konopka et al., 1984).

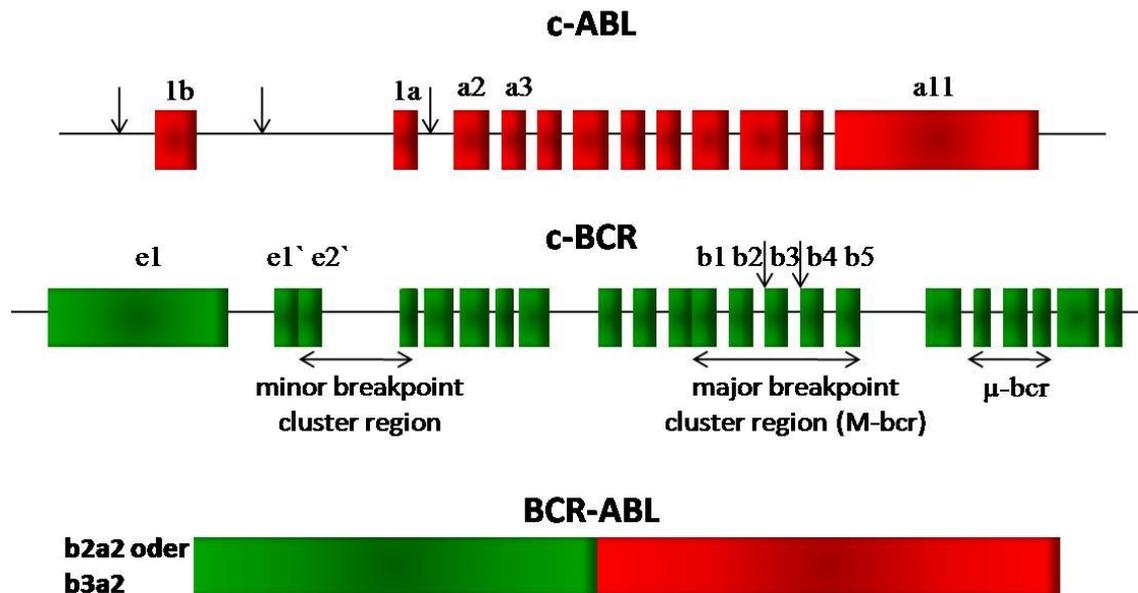


Abbildung 2: Bildung der BCR-ABL-mRNA. Schematische Darstellung der genomischen Organisation von c-BCR und c-ABL mit Lokalisation der Bruchpunkte bei der Translokation der Chromosomen 9q und 22q. Die Translokation führt zur Bildung des Philadelphia-Chromosoms, welches das BCR-ABL-Fusionsgen trägt. Die Exons werden als Kästchen angegeben, die Bruchpunkte als Pfeile.

In den meisten Fällen von CML entstehen die Bruchpunkte im BCR-Gen bei 22q11 innerhalb einer 5,8 kb-Sequenz, die die Exons b1-b5 umfasst und als *major breakpoint cluster region* (M-bcr) bekannt ist. Bruchpunkte im ABL-Gen bei 9q34 entstehen innerhalb einer Region von ca. 30 kb am 5'-Ende des ABL-Genes, entweder stromaufwärts des ersten alternativen Exons 1b, stromabwärts des zweiten alternativen Exons 1a oder häufiger zwischen diesen beiden. Alle möglichen Bruchpunkte und folgenden Translokationen führen zur Bildung einer mRNA, bei der durch alternatives Spleißing BCR-Sequenzen (Exon b2 oder b3) mit dem ABL-Exon a2 fusioniert sind. Es entstehen die Fusionstranskripte b2a2 oder b3a2, die ein 210-kDa-Protein (p210^{BCR-ABL}) bilden.

Das ABL-Protein ist eine rezeptorunabhängige Tyrosinkinase, die ubiquitär exprimiert wird. Innerhalb des Proteins können mehrere strukturelle Domänen definiert werden: Nahe dem N-Terminus von ABL finden sich drei SRC-Homologie-Domänen

(SH1-SH3): SH1 hat die Tyrosinkinase-Funktion (Cohen et al., 1995), während SH2 und SH3 Interaktionen mit anderen Proteinen erlauben. Prolinreiche Sequenzen im Zentrum des Moleküls können mit den SH3-Domänen anderer Proteine wie CRK interagieren. Zusätzlich hat ABL ein Kernlokalisierungssignal, ein Kernexportsignal sowie eine DNA- und eine aktinbindende Domäne (Quintas-Cardama and Cortes, 2009). Die ABL-Kinase transduziert Signale von Wachstumsfaktoren der Zelloberfläche und Adhäsionsrezeptoren und reguliert so den Zellzyklus und die Zytoskelettstruktur (Hernandez et al., 2004).

Das 160-kDa-BCR-Protein wird ebenso wie ABL ubiquitär exprimiert. Am N-Terminus von BCR finden sich eine Oligomerisationsdomäne und eine Serin/Threonin-Kinase. Die Oligomerisationsdomäne vermittelt Homotetraoligomerisation von BCR und in BCR-ABL ist diese Domäne für die Aktivierung der ABL-Kinase unerlässlich (McWhirter et al., 1993).

Bemerkenswert ist, dass bei 5-10 % aller Patienten mit CML kein Philadelphia-Chromosom, wohl aber ein BCR-ABL-Fusionsgen nachweisbar ist. Ursache sind alternative Translokationen mit varianten Rearrangierungen von ABL innerhalb des BCR-Lokus oder auch die Beteiligung weiterer Chromosomen (Huret, 1990).

1.1.2 Molekulare Mechanismen BCR-ABL-vermittelter leukämischer Transformation

Substrate von BCR-ABL sind Adaptermoleküle (wie GRB2, *docking protein1*, GAB2 und CRKL), Zytoskelett-Proteine (wie Paxillin, Talin und die Fokale Adhäsionskinase) und Proteine mit katalytischer Funktion (wie PI3-Kinase, SHP2 und Kinasen der SRC-Familie). Diese Proteine aktivieren eine Reihe von Signalwegen wie RAS, die MAP-Kinase, STAT5 und die PI3-Kinase. Die Aktivierung dieser Signalwege führt zu konstitutiv aktiven mitogenen Signalen, einer defekten Adhärenz von Stromazellen und extrazellulärer Matrix und zu einem reduzierten Ansprechen auf apoptoseinduzierende Stimuli (Abb. 3).

Zusammenfassend kann man sagen, dass BCR-ABL gleichzeitig proliferative Stimuli vermittelt und Apoptose unterdrückt. Dies steht im Einklang mit dem Konzept, dass proliferative Stimuli zur Apoptose führen, solange ihnen nicht durch anti-apoptotische Signale begegnet wird (Evan et al., 1995).

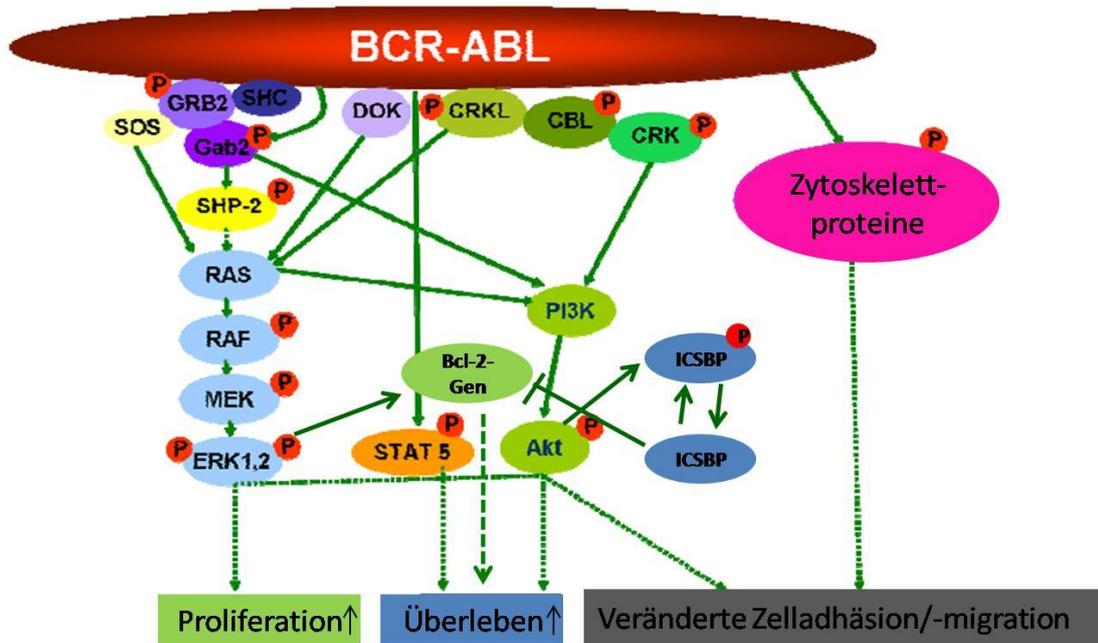


Abbildung 3: Signaltransduktionswege in BCR-ABL-positiven Zellen. Die BCR-ABL-Proteine können Autophosphorylierung induzieren. Phosphorylierung (P) an Y177 erzeugt eine Bindungsstelle für *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) (Pendergast et al., 1993). GRB2 bindet an BCR-ABL über dessen SH2-Domäne und bindet an SOS (Puil et al., 1994) und *GRB2-associated binding protein 2* (GAB2) über dessen SH3-Domäne. SOS wiederum aktiviert RAS. Infolge der Phosphorylierung durch BCR-ABL rekrutiert GAB2 Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und SHP2-Proteine (Sattler et al., 2002). Die SH2-Domäne von ABL kann SHC binden, welches infolge der Phosphorylierung auch GRB2 rekrutieren kann.

Das Docking-Protein (DOK) interagiert auch mit BCR-ABL und aktiviert RAS (Carpino et al., 1997). Interessanterweise wird BCR-ABL-abhängige Phosphorylierung von PI3K auch durch CRKL vermittelt. *Interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) reguliert Bcl-2 herunter und führt zu vermehrtem Überleben myeloischer Vorläuferzellen. BCR-ABL interagiert über eine prolinreiche Sequenz innerhalb von ABL direkt mit der SH3-Domäne von CRKL. CRKL wird durch BCR-ABL thyrosinphosphoryliert und bindet durch seine SH2-Domäne an CBL und bildet einen multimerischen Komplex mit PI3K (Sattler et al., 1996). Die SH3-Domäne von ABL und die SH3-Bindungsstellen in der C-terminalen Region können verschiedene Proteine binden, die an der Regulation von Zelladhäsion und -migration beteiligt sind. CRKL kann auch direkt RAS aktivieren, diese Aktivität scheint jedoch auf Fibroblasten beschränkt zu sein (Senechal et al., 1996). BCR-ABL aktiviert auch STAT5 durch Phosphorylierung. Die Mediatoren dieser Aktivierung bleiben jedoch unklar (Nieborowska-Skorska et al., 1999). BCR-ABL kann über die Aktivierung von RAS-, SHP2-, PI3K-AKT- und STAT-Signaltransduktionswegen Zellproliferation und Überleben induzieren.

Grüne Pfeile zeigen direkte Interaktionen und/oder Aktivierung. Gestrichelte Pfeile zeigen multiple Schritte an. Dies ist ein vereinfachtes Diagramm. Es wurde über viele weitere Assoziationen zwischen BCR-ABL-Signalproteinen berichtet.

1.1.3 Progression der CML

Die Mechanismen, die für die Progression der CML verantwortlich sind, sind komplex und nur teilweise verstanden. Trotz der Bedeutung der BCR-ABL-Expression für die CML spielen wahrscheinlich BCR-ABL-unabhängige Mechanismen eine wichtige Rolle in der Progression der CML.

BCR-ABL verleiht betroffenen hämatopoetischen Vorläuferzellen in der chronischen Phase (siehe 1.1.4) einen Proliferations- und Überlebensvorteil, ohne die Differenzierung der Zellen zu beeinflussen (Huntly et al., 2004; Quintas-Cardama and Cortes, 2009). Die Progression der CML ist jedoch durch eine verminderte hämatopoetische Ausreifung der Zellen gekennzeichnet. Genetische Instabilität und zusätzliche chromosomale Defekte werden regelmäßig in der Blastenkrise gefunden.

Eine der häufigsten Mutationen, die mit CML-Progression assoziiert werden, betrifft den Tumorsuppressor p53, der in 25-30 % der Patienten mit myeloischer Blastenkrise (siehe 1.1.4) mutiert ist (Quintas-Cardama and Cortes, 2009). IKZF1, das für den Transkriptionsfaktor Ikaros kodiert und für die normale lymphatische Entwicklung benötigt wird, ist regelmäßig in der Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphatischen Leukämie (Ph-positive ALL) verloren, nicht aber in der chronischen Phase der CML. Die Deletion von Ikaros wurde dagegen auch als eine erworbene Läsion in der Zeit der Transformation von CML zu ALL (lymphatische Blastenkrise) beobachtet. Des Weiteren wird die Aktivierung von SRC-Kinasen mit der Progression der CML und mit Imatinib-Resistenz in Verbindung gebracht. Die Aktivierung von SRC-Kinasen durch BCR-ABL ist essentiell für die Induktion einer B-Zell-ALL, während sie für die Induktion eines CML-ähnlichen myeloproliferativen Syndroms entbehrlich ist (Hu et al., 2004).

BCR-ABL-transformierte hämatopoetische Stammzellen (HSCs) sind im Gegensatz zu anderen Fusionsonkogenen wie MOZ-TIF2 oder MLL-ENL, die an humanen Leukämien beteiligt sind, nicht in der Lage, Vorläuferzellen Selbsterneuerungskapazität zu verleihen (Savona and Talpaz, 2008). Im Menschen ist die Progression zur Blastenkrise mit einer 6-10-fachen Expansion von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen (GMPs) und weniger mit einer Expansion des Stammzellpools assoziiert (Quintas-Cardama and Cortes, 2009). Darüber hinaus können im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung Zellen gefunden werden, die Selbsterneuerungskapazität besitzen, obwohl sie immunphänotypisch eher

Vorläuferzellen gleichen, besonders den GMPs (Savona and Talpaz, 2008). Der β -Catenin-Signalweg scheint an dem Prozess der Akquisition der Selbsterneuerungskapazität von GMPs beteiligt zu sein (Jamieson et al., 2004a). Man kann also davon ausgehen, dass es in der CML zwei unterschiedliche Zelltypen gibt, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben:

1. BCR-ABL-positive-HSCs (CML-Stammzellen) mit niedriger Proliferationsrate, welche die indolente chronische Phase unterhalten.
2. Leukämische GMPs, die für die rapide Zellexpansion im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit verantwortlich sind (Savona and Talpaz, 2008).

1.1.4 Klinische Grundlagen der CML

Die CML ist durch drei Krankheitsphasen gekennzeichnet: Die **chronische Phase** ist durch Leukozytose mit gehäuftem Auftreten myeloischer Vorstufen im peripheren Blut, Splenomegalie sowie ein hyperzelluläres Knochenmark (KM) charakterisiert. Begleitend können unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Gewichtsverlust oder Leistungsabfall auftreten. Bei mehr als der Hälfte der Patienten wird die Diagnose in dieser Phase bei Routineuntersuchungen gestellt (Cobaleda et al., 2000; Quintas-Cardama and Cortes, 2006).

Bekanntere Faktoren, die das Risiko an CML zu erkranken erhöhen, sind ionisierende Strahlung (Tanaka et al., 1989) und Benzolexposition (Mehlman, 2006).

Die mittlere Dauer der chronischen Phase beträgt 3-4 Jahre. Die Akzeleration zur Blastenkrise kann auf zusätzliche genetische und/oder epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden (Ren, 2005). Die **Akzelerationsphase** liegt nach WHO-Kriterien beim Vorhandensein von mindestens einer der folgenden Veränderungen vor: 10-19 % Blastenanteil der Leukozyten im peripheren Blut oder der Knochenmarkzellen, mindestens 20 % basophile Zellen im peripheren Blut, dauerhafte Thrombozytopenie ($< 100 \times 10^9/l$) oder Thrombozytose ($> 1000 \times 10^9/l$), zunehmende Splenomegalie und Leukozytose und zusätzliche genetische Veränderungen, die bei Diagnosestellung in der chronischen Phase der CML noch nicht vorhanden waren.

Die **Blastenkrise** ist das Endstadium der Erkrankung und ist durch eine Differenzierungsblockade der Zellen charakterisiert. Nach WHO-Kriterien liegt sie bei Vorhandensein mindestens einer der folgenden Veränderungen vor: Blastenanteil der

Leukozyten im peripheren Blut oder der Knochenmarkzellen mindestens 20 %, extramedulläre Blastenproliferation und Blastencluster in der Knochenmarkbiopsie (Vardiman et al., 2002). Die häufigsten Todesursachen bei Patienten in dieser Phase sind Infektionen und Hämorrhagien (Schiffer, 2007).

1.1.5 Therapie der CML

Therapie vor 2001:

Die CML ist zu einem Modell hinsichtlich der Erforschung und Behandlung unter den malignen Erkrankungen geworden. Die Behandlung hat sich in den letzten Jahren dramatisch geändert. Vor 1980 wurde die CML konventionell mit Busulfan oder Hydroxyurea behandelt, wenn eine allogene Knochenmarktransplantation nicht in Betracht gezogen werden konnte. Bei dieser Therapie lag der Fokus auf der Erhaltung einer normalen Leukozytenzahl (hämatologische Remission). Die Behandlung mit Interferon- α (IFN- α) stellte eine signifikante Veränderung dar, da mit dieser Therapie erstmals dauerhafte (Median > 30 Monate) zytogenetische Remissionen bei 12 % der Patienten in der chronischen Phase beobachtet werden konnten (Talpoz et al., 1991). Das mittlere Überleben von CML-Patienten in der chronischen Phase, die mit IFN- α behandelt worden waren, lag bei 5,5 Jahren, bei Patienten, die mit Busulfan behandelt worden waren, bei 3,7 Jahren und das mittlere Überleben in der Hydroxyurea-Gruppe bei 4,7 Jahren. (Hehlmann et al., 1994). 1997 konnten Guilhot et al. zudem zeigen, dass die Kombination von IFN- α und Cytarabinen einer Monotherapie mit IFN- α überlegen war. Nach 12 Monaten hatten 41 % der Patienten in der IFN- α -Cytarabin-Gruppe eine major zytogenetische Remission (Fehlen des Philadelphia-Chromosoms (Ph-Negativität) in > 66 % der Zellen im peripheren Blut und/oder KM) und 24 % der Patienten, die mit IFN- α allein behandelt worden waren (Guilhot et al., 1997).

Allogene Stammzelltransplantation:

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) ist die einzige erwiesene kurative Behandlung der CML. Sie ist mit einer hohen therapieassoziierten Mortalität assoziiert. Diese wird durch das Auftreten einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD), Infektionen oder Sekundärmalignome bedingt (Grigg and Hughes, 2006; Hochhaus et al., 2004). Patienten, die auf Imatinib-Therapie nicht ansprechen, junge Patienten mit passenden

Familienspendern und solche, die eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ablehnen, können einer Stammzelltransplantation zugeführt werden (Schiffer, 2007). Aktuelle Daten zeigen ein exzellentes Gesamtüberleben, auch bei imatinibresistenten Patienten (siehe 1.1.7), bei Vorliegen eines passenden Familien- oder Fremdspenders (Saussele et al., ASH Annual Meeting Abstract 2008). Kriterien für den Erfolg der Transplantation sind das Alter des Patienten, das Vorhandensein eines HLA-identischen Spenders sowie der Zeitpunkt der Transplantation in Bezug auf das Krankheitsstadium und die Krankheitsdauer seit der Diagnose (Angstreich et al., 2005; Jabbour et al., 2007).

1.1.6 Molekulare Wirkungsweise von Imatinib

Nachdem das BCR-ABL-Fusionsgen, das eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase kodiert, als ursächliche Mutation für die CML erkannt worden war, wurde seit Ende der 1980er Jahre an einer Substanz geforscht, die Proteinkinasen hemmt. Mit Imatinib (STI571, IM, Gleevec oder Glivec, Novartis, Basel, Schweiz) wurde eine Verbindung mit guter Löslichkeit und Bioverfügbarkeit gefunden, die darüber hinaus eine hohe Selektivität für die Inhibition von BCR-ABL-exprimierenden Zellen aufweist.

In vitro-Assays zeigten, dass Imatinib die Kinaseaktivität von Ph-positiven Zellen, die von Patienten mit CML oder ALL gewonnen worden waren, mit einer 50%igen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) im Bereich von 0,1 bis 0,5 μ M hemmt. Dies zeigt, dass Imatinib die Zellmembran effektiv penetriert. Neben ABL werden auch die Tyrosinkinasen c-KIT und der PDGF-Rezeptor durch Imatinib gehemmt (Buchdunger et al., 2000).

Die Erforschung der Kristallstruktur der katalytischen Region der ABL-Kinase im Komplex mit Imatinib hat erheblich zum Verständnis der molekularen Wirkung von Imatinib sowie der Resistenzmechanismen gegenüber Imatinib beigetragen. Imatinib blockiert kompetitiv die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL und verhindert damit die Phosphorylierung von Tyrosinresten von BCR-ABL selbst sowie von seinen Zielproteinen (Levitzki and Gazit, 1995) (Abb. 4).

Eine interessante Entdeckung ist, dass Imatinib die Kinase-Domäne von ABL in deren inaktiver Konformation bindet. In diesem Zustand verschließt die A-Schleife, das wichtigste regulatorische Element, das katalytische Zentrum. Diese Art der Bindung ist

entscheidend für die hohe Selektivität von Imatinib gegenüber anderen Kinasen, da die strukturelle Diversität der A-Schleifen verschiedener Kinasen an ihren inaktiven Zustand gebunden ist, während die A-Schleifen der aktiven Kinasen große Ähnlichkeiten aufweisen (Deininger et al., 2005).

Mutationen der Kinase-Domäne finden sich in 50-90 % bei Patienten mit sekundärer Resistenz (Gorre et al., 2001; Hochhaus et al., 2002; Quintas-Cardama and Cortes, 2009; Shah et al., 2002) (siehe 1.1.7).

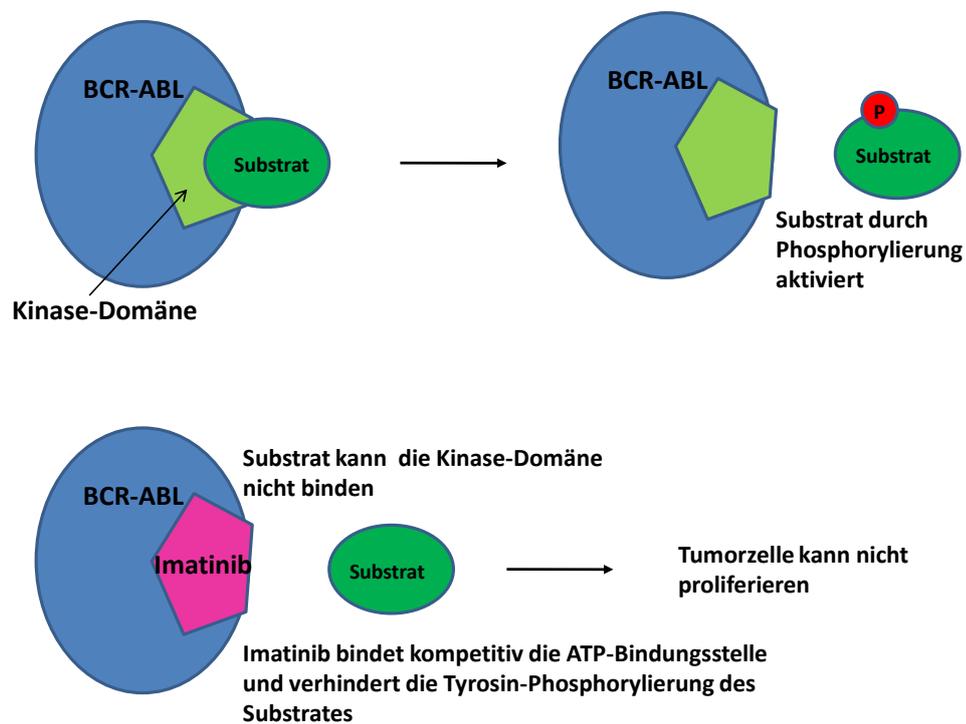


Abbildung 4: Wirkmechanismus von Imatinib. Die BCR-ABL-Tyrosinkinase hat eine ATP-Bindungsstelle. BCR-ABL phosphoryliert seine Substrate, indem es das terminale Phosphat von ATP auf Tyrosinreste seiner Substrate überträgt. Imatinib bindet die ATP-Bindungsstelle von BCR-ABL und inhibiert kompetitiv die Enzymaktivität des Proteins.

Therapie mit Imatinib:

Die zentrale Rolle von BCR-ABL in der Pathogenese der CML macht es zu einem attraktiven Ziel der medikamentösen Therapie. Durch die Entwicklung des ABL-Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib wurde die erste „targeted therapy“ möglich. 2001 wurde Imatinib zur Behandlung der CML zugelassen (Druker et al., 1996).

Der Nutzen von Imatinib gegenüber einer Therapie mit INF- α plus Cytarabine wurde endgültig in der IRIS-Studie gezeigt. In dieser Studie erreichten nach 12 Monaten 84,5 % der Patienten in der Imatinib-Gruppe gegenüber 30,3 % der Patienten in der INF- α -Cytarabine-Gruppe eine major zytogenetische Remission. Nach 12 Monaten waren 96,6 % in der Imatinib-Gruppe und 79,9 % in der INF- α -Cytarabin-Gruppe ohne Krankheitsprogression (O'Brien et al., 2003). Aufgrund des exzellenten hämatologischen und zytogenetischen Ansprechens hat sich Imatinib zur Erstlinien-Therapie für die neu diagnostizierte CML etabliert (Deininger et al., 2005). Es gibt jedoch zwei Problemfelder in der imatinibbasierten Therapie für Patienten mit CML. Eines ist die Persistenz BCR-ABL-positiver Zellen unter Imatinib-Therapie, welche als „minimale residuelle Erkrankung“ (MRD) bezeichnet wird und bedeutet, dass Imatinib die CML nicht heilt. Das andere große Problem ist ein Rezidiv der Erkrankung aufgrund von Resistenz gegenüber Imatinib (Deininger et al., 2005; Hochhaus et al., 2002).

1.1.7 Molekulare Mechanismen der Imatinib-Resistenz

Definition der klinischen Imatinib-Resistenz und Antwort auf Imatinib

Es gibt zwei Arten der Imatinib-Resistenz: Primäre Resistenz und sekundäre oder „erworbene“ Resistenz entsprechend den Kriterien, die in einer Arbeit des *European Leukemia Net* (Baccarani et al., 2006) zusammengefasst wurden. Danach sprechen Patienten mit einer primären Resistenz schon initial nicht auf eine Imatinib-Behandlung an, während die sekundäre Resistenz ein Fehlen der hämatologischen oder zytogenetischen Remission charakterisiert. Die zytogenetische Remission wird in komplette (Ph-Negativität der Zellen im peripheren Blut und/oder KM), major und minor (Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms in > 33 % der Zellen im peripheren Blut und/oder KM) Remission unterteilt.

Resistenzmechanismen können sowohl BCR/ABL-abhängig als auch BCR-ABL-unabhängig sein. Daraus ergeben sich unterschiedliche Strategien zur Überwindung der Imatinib-Resistenz.

BCR-ABL-unabhängige Mechanismen der Imatinib-Resistenz

Neben dem BCR-ABL-abhängigen Resistenzmechanismus gibt es *in vitro* Hinweise auf BCR-ABL-unabhängige Resistenzmechanismen. BCR-ABL-positive Zelllinien

überlebten in Anwesenheit von Imatinib, obwohl die BCR-ABL-Tyrosinkinase stark inhibiert war. Zu BCR-ABL-unabhängigen Resistenzmechanismen zählen die Aktivierung alternativer anti-apoptotischer Wege wie etwa des SRC-Signalweges (Donato et al., 2003). Imatinibresistente LAMA84-Zellen wiederum zeigten eine erhöhte Expression von MDR2, eine Efflux Pumpe, die die intrazelluläre Konzentration von Imatinib reduziert (Mahon et al., 2003).

Es konnte auch gezeigt werden, dass NF- κ B in mehreren Zelllinien an BCR-ABL-unabhängiger Imatinib-Resistenz beteiligt ist (Dai et al., 2004). In Primärzellen konnte gezeigt werden, dass alleiniges Blockieren der SRC-Kinase Lyn ausreicht, um Apoptose in BCR-ABL-positiven Primärzellen zu induzieren (Ptasznik et al., 2004). Zusammengefasst bleibt BCR-ABL der primäre Angriffspunkt der Imatinib-Resistenz, aber BCR-ABL-unabhängige *off-target*-Inhibition scheint zur Überwindung der Imatinib-Resistenz beizutragen.

BCR-ABL-abhängige Mechanismen der Imatinib-Resistenz

Wenn die BCR-ABL-positiven Zellen in Anwesenheit von Imatinib die BCR-ABL-Kinaseaktivität behalten, wird der Resistenzmechanismus als BCR-ABL-abhängig bezeichnet. Mehrere Mechanismen der Resistenzbildung wurden identifiziert (Deininger et al., 2005), darunter die Amplifikation des BCR-ABL-Gens, das zu einer Überexpression des BCR-ABL-Proteins führt, und Punktmutationen in der katalytischen Domäne der BCR-ABL-Kinase, welche die Bindung von Imatinib beeinträchtigen. Mutationen der Kinase-Domäne finden sich in 50-90 % bei Patienten mit sekundärer Resistenz. Mehr als 100 Punktmutationen sind bisher bekannt (Gorre et al., 2002; Hochhaus et al., 2002; Quintas-Cardama and Cortes, 2009; Shah et al., 2002). Sie finden sich in vielen Aminosäuren (Tabelle 1.1), sind jedoch regelmäßig in folgenden Regionen zu finden:

1. P-Schleifen-Mutation: Mutationen der phosphatbindenden Schleife führen zu einer Unterbrechung der Hydrogenbindung, die die Bindung von Imatinib zur P-Schleife stabilisiert und zu einer Verlagerung des Gleichgewichtes zur aktivierten Form der Kinase, welche die Bindung von Imatinib erschwert.
2. A-Schleifen-Mutation: Mutationen in der A-Schleife, die für die Kinase-Aktivität verantwortlich ist, verhindern, dass die Kinase ihre inaktive Form einnehmen kann. Dies geht mit einer erschwerten Bindung von Imatinib einher.

3. Mutation von T315: Eine Mutation von T315 führt ebenfalls zur Unterbrechung der Hydrogenbindung, die die Bindung von Imatinib an die ABL-Kinase stabilisiert. Diese Mutation führt zu einer hochgradigen Insensitivität gegenüber Imatinib (Deininger et al., 2005).

Tabelle 1.1: Aktivität von Imatinib und den Tyrosinkinase-Inhibitoren der 2. Generation Dasatinib und Nilotinib gegen eine Auswahl von BCR-ABL-Mutanten in Patienten mit CML. Alle Konzentrationen stellen die IC₅₀-Werte dar.

	Imatinib (nM)	Nilotinib (nM)	Dasatinib (nM)	
	Natives BCR-ABL	260	13	0,8
P-Schleife	M244V	2000	38	1,3
	G250E	1350	48	1,8
	Q252H	1325	70	3,4
	Y253H	>6400	450	1,3
	Y253F	3475	125	1,4
	E255K	5200	200	5,6
	E255V	>6400	430	11
	ATP-Bindungsstelle	V299L	540	NV
F311L		480	23	1,3
T315I		>6400	>2000	>200
T315A		971	61	125
F317L		1050	50	7,4
F317V		350	NV	53
Katalytische Domäne	M351T	880	15	1,1
	E355G	2300	NV	1,8
	F359V	1825	175	2,2
	V379I	1630	51	0,8
	A-Schleife	L387M	1000	49
H396R		1750	41	1,3
H396P		850	41	0,6

Hohe Sensitivität	Mittlere Sensitivität	Hohe Insensitivität
-------------------	-----------------------	---------------------

1.1.8 Strategien zur Überwindung der Imatinib-Resistenz

Dosiseskalation von Imatinib

Eine Erhöhung der täglichen Imatinib-Dosis von 400 mg/Tag auf 800 mg/Tag ist wirkungsvoll bei Punktmutationen, die zu einer niedrig- und mittelgradigen Resistenz gegenüber Imatinib führen, z.B. H396P, nicht aber bei hochresistenten Mutanten wie T315I oder E255K (Corbin et al., 2003).

Neue Tyrosinkinase-Inhibitoren

Neue Substanzen, die bei Imatinib-Resistenz wirksam sind, sind beispielsweise Dasatinib (Sprycel) und Nilotinib (Tasigna). Dasatinib ist ein potenter Tyrosinkinase-Inhibitor, der ebenso wie Imatinib BCR-ABL, c-KIT und PDGFR inhibiert, aber auch verschiedene onkogene Proteine wie SRC-Kinasen (Shah et al., 2004; Talpaz et al., 2006), und 2006 in den USA und der EU für die Therapie imatinibresistenter oder -intoleranter Patienten zugelassen wurde. Er ist bei den meisten Mutationen der BCR-ABL-Kinase-Domäne mit Ausnahme der T315I-Mutation wirksam. Dasatinib bindet im Gegensatz zu Imatinib nicht nur die inaktive, sondern auch die aktive Konformation von BCR-ABL (Talpaz et al., 2006). Nilotinib, ein selektiver BCR-ABL-Kinase-Inhibitor, zeigt eine 20-50-fach höhere Potenz als Imatinib und inhibiert neben BCR-ABL ebenfalls c-KIT und PDGFR. Ähnlich wie Dasatinib ist Nilotinib wirkungsvoll bei fast allen bekannten BCR-ABL-Mutationen mit Ausnahme der T315I-Mutation (Kantarjian et al., 2006; Weisberg et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass CD34⁺-Zellen gegenüber Dasatinib und Nilotinib resistent sind (Melo and Chuah, 2008). Bosutinib (SKI-606) ist ein potenter Tyrosinkinase-Inhibitor, der sich derzeit in Phase III-Studien befindet. Er inhibiert BCR-ABL und SRC-Kinasen, jedoch nicht signifikant c-KIT oder PDGFR (Tab. 1.2). Bosutinib hat sich *in vitro* als wirksam gegen fast alle imatinibresistenten BCR-ABL-positiven Zelllinien mit Ausnahme der T315I-Mutation erwiesen. Auch scheint er CD34⁺-Zellen nicht eliminieren zu können (Puttini et al., 2006).

Tabelle 1.2: Profil der Kinase-Targets von Inhibitoren, die zur Behandlung der CML verwendet werden können

TKI	ABL	ABL _{T315I}	KIT	PDGFR	SRC	Andere
Imatinib	+	-	++	++	LCK	+
Dasatinib	+++	-	++	++	+++	+++
Nilotinib	++	-	+	+	-	-
Bosutinib	++	-	-	-	+++	+

+, schwache/moderate Inhibition; ++, moderate/starke Inhibition; +++, sehr starke Inhibition. Abkürzung: LCK: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*

Wirkstoffe, die BCR-ABL über andere Mechanismen herunterregulieren

Geldanamycin und sein weniger toxisches Analogon 17-AAG führen zum Abbau des BCR-ABL-Proteins, indem sie das Hitzeschockprotein 90 (Hsp-90) inhibieren. Dieses wirkt als Chaperon und wird zur Stabilisierung der Konformation von BCR-ABL benötigt. Zelllinien mit einer E255K- und T315I-Mutation des BCR-ABL-Proteins erwiesen sich als sensibel gegenüber Geldanamycin und 17-AAG (Gorre et al., 2002). Eine Kombination von Imatinib und 17-AAG führte zu einer synergistischen Wachstumshinderung und Induktion der Apoptose in imatinibresistenten CML-Zelllinien (Radujkovic et al., 2005).

Kombinationstherapien

Ein interessanter Ansatz zur Überwindung der Imatinib-Resistenz stellt neben neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren auch die Kombination von Imatinib mit anderen Substanzen, z.B. klassischen Chemotherapeutika, Tyrosinkinase-Inhibitoren oder spezifischen Inhibitoren zusätzlicher proliferativer Signalmoleküle wie z.B. Ras, dar. Prä-klinische Untersuchungen von Weisberg et al. zeigten bereits eine additive Zytotoxizität von Nilotinib und Imatinib (Weisberg et al., 2007), was die klinische Bedeutung einer Kombination zweier Tyrosinkinase-Inhibitoren nahelegt.

Inhibition von Signalwegen stromabwärts von BCR-ABL:

Die konstitutive Aktivierung der BCR-ABL-Tyrosinkinase führt zur Aktivierung mitogener Signalwege stromabwärts von BCR-ABL, z.B. Signalwege über Ras, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*, Phosphatidyl-Inositol-3 (PI-3)-Kinase und Myc. Tyrosinkinase-Inhibitoren mit Inhibitoren dieser Signalwege zu kombinieren, könnte

einen synergistischen anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekt in CML-Zellen ergeben. Mehrere Verbindungen, darunter Farnesyltransferase-Inhibitoren (unterbrechen den Ras-Signalweg), Inhibitoren zyklinabhängiger Kinasen (CDKs) und Inhibitoren des Targets von Rapamycin in Säugetieren (mTOR), welche den Signalweg der PI-3-Kinase unterbrechen, haben einen synergistischen oder additiven Effekt in imatinibresistenten Zelllinien gezeigt, die BCR-ABL überexprimieren (Deininger et al., 2005).

Histon-Deacetylase-Inhibitoren induzieren die Acetylierung von Histonen und inhibieren die ATP-Bindung und Chaperon-Funktion des Hitzeschockproteins 90 (Bali et al., 2005). Darüber hinaus induzieren sie die Transkription des CDK-Inhibitors p21 (Zhang et al., 2004).

T315I-Kinase-Inhibitoren:

In 4-19 % der Patienten mit imatinibresistenter CML wird die Mutation T315I gefunden, welche resistent gegenüber Inhibitoren der ABL- und SRC-Kinasen ist. Daher stellt die Entwicklung eines T315I-Inhibitors eine große therapeutische Herausforderung dar. MK-0457 ist ein Inhibitor von Aurora-Kinasen, welche in vielen Karzinomen überexprimiert sind. Er ist in der Lage, auch T315I-mutiertes BCR-ABL zu binden. In einer Phase I-Studie zeigte sich bei 33 % der Patienten mit fortgeschrittener CML und T315I-Mutation eine komplette zytogenetische Remission (Melo and Chuah, 2008) (Tab. 1.3).

Tabelle 1.3: Beispiele von Signaltransduktionsinhibitoren für eine Kombinationstherapie mit Imatinib

Target	Wirkstoff	Wirksamkeit in imatinibresistenten Zellen	Klinische Studien
Hitzeschockprotein 90	Geldanamycin (17-AAG)	Ja	Nein
Farnesyltransferase	Lonafarnib, Tipifamid	Ja	Ja
zyklinabhängige Kinasen	Flavopiridol	Ja	Ja
mTOR	Rapamycin	Ja	Ja
Histon-Deacetylase	LBH 589	Ja	Nein
T315I-BCR-ABL	MK-0457	Ja	Ja

1.2 Die Familie der Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs)

Die Familie der IRFs umfasst 10 Faktoren, die schon lange als intrazelluläre Mediatoren der Effekte von Interferonen bekannt sind und nach dieser Funktion benannt wurden.

Die Struktur der IRFs besteht aus mehreren Domänen; einige dieser Domänen sind allen Familienmitgliedern gemein, während andere spezifisch für einzelne Familienmitglieder sind.

Alle 10 Faktoren besitzen die konservierte DNA-bindende Domäne (DBD), die der Bindung von spezifischen DNA-Sequenzen wie z.B. *interferon-stimulated response element* (ISRE), *Ets-IRF composite element* (EICE) und GAS (*gamma interferon-activation site*) dient (Decker et al., 1997). Diese Elemente werden in den Promotoren vieler Gene exprimiert, die durch Interferon- α/β reguliert werden (Lohoff and Mak, 2005). Dabei reguliert INF- α/β die Genexpression vorwiegend über ISRE, während INF- γ -vermittelte Genexpression über GAS verläuft (Holtschke et al., 1996). Die Konsensussequenz, **AANNGAAA**, konnte als Erkennungssequenz innerhalb der DNA-Elemente definiert werden. Aufgrund der Homologie der DBDs aller IRFs, kann die Erkennungssequenz von allen IRFs erkannt werden (Fujii et al., 1999). Auf diese Weise regulieren die IRFs die Transkription bestimmter Zielgene.

Die DBD aller IRFs ist am N-Terminus lokalisiert. Sie besteht aus fünf Tryptophanresten, die jeweils durch 10-18 Aminosäuren voneinander getrennt sind (Harada et al., 1989). Alle Faktoren mit Ausnahme des Faktors 6 besitzen zudem eine DNA-interagierende Domäne (IAD). Diese ist am C-Terminus lokalisiert und erleichtert die Interaktion der IRFs untereinander oder mit Komplexpartnern, denn nur als Komplex können die IRFs mit ihren Zielgenen interagieren (Meraro et al., 1999). Mögliche Komplexpartner sind die IRFs untereinander und der Faktor PU.1, ein Mitglied der Ets-Familie (Brass et al., 1999). Die Komplexpartner der IRFs nehmen zudem Einfluss auf das Bindungsverhalten und so auf die Transkriptionskontrolle der Zielgene.

Interferone binden an ihre Rezeptoren und aktivieren den JAK-STAT-Signalweg. In der Folge binden STATs (*signal transducers and activators of transcription*) an die Promotoren der IRFs und regulieren so Transkription und Expression (Taniguchi et al., 2001) (Abb. 5).

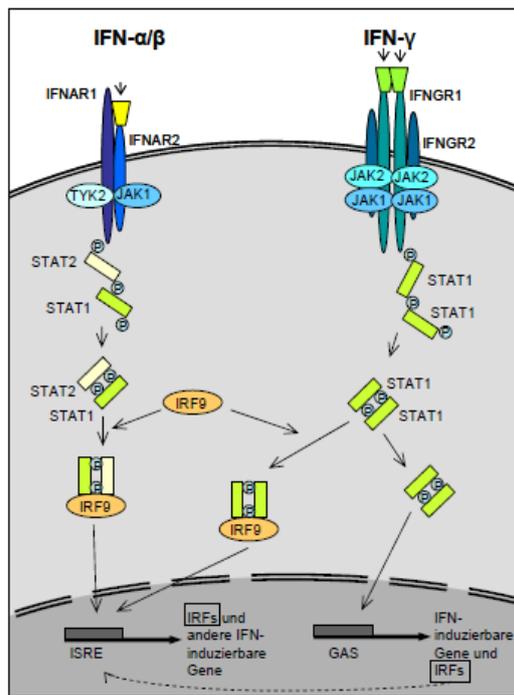


Abbildung 5: IRFs im Interferon-Signalweg (modifiziert nach Taniguchi et al., 2001). Im IFN- α/β -Signalweg kommt es nach Bindung von IFN- α/β an ihren Rezeptor zur Aktivierung von JAK1 und TYK2, welche den IFN- α -Rezeptor 1 (IFNAR1) an einem intrazellulären Tyrosin (Position 455) phosphorylieren. STAT2 bindet nun an den phosphorylierten IFNAR1, wird ebenfalls phosphoryliert und rekrutiert STAT1. STAT1 und STAT2 bilden, zusammen mit IRF-9, einen heterotrimeren Komplex, ISGF3 γ , der an das ISRE-Element bindet und zur Aktivierung von IRFs und anderen IFN-induzierbaren Genen führt. Im IFN- γ -Signalweg kommt es nach Bindung eines IFN- γ -Dimers zur Aktivierung der Januskinasen JAK1 und JAK2 und damit zur Phosphorylierung eines intrazellulären Tyrosins (Position 423) des IFNGR1. STAT1 wird nach Bindung an dieses Tyrosin selbst phosphoryliert und bildet ein Homodimer, den GAF-Komplex, welcher GAS bindet und die Transkription von IRFs sowie anderen IFN-induzierbaren Genen aktiviert. Zusammen mit IRF-9 kann das STAT1-Dimer auch an ISRE-Elemente binden.

Neben der Vermittlung der biologischen Effekte von Interferonen wurden in Folge zahlreiche andere Funktionen der IRFs entdeckt. Dazu gehören die Zellzyklusregulation (Tanaka et al., 1996), Tumorsuppressoraktivität (Holtschke et al., 1996; Nozawa et al., 1999), die Regulation der Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen (Hobart et al., 1997) sowie die angeborene und erworbene Immunantwort mit T-Zell-Differenzierung (Lohoff and Mak, 2005). Stimulus der Induktion der IRFs ist hierbei nicht notwendigerweise Interferon, sondern u.a. auch Viren, Lipopolysaccharide (LPS), Zytokine und der Tumornekrosefaktor (TNF) (Meraro et al., 1999). Der biologische Effekt eines IRF ist folglich abhängig vom zellulären Stimulus, vom Komplexpartner sowie vom Zelltyp (Taniguchi et al., 2001). Darüber hinaus kann die biologische Aktivität der IRFs durch Phosphorylierung (Sharf et al., 1997), Methylierung (Ortmann et al., 2005) sowie proteolytische Prozessierung (Palombella and Maniatis, 1992) modifiziert werden.

Zu den von IRFs regulierten Genen gehören unter anderem INF- β , - α , - γ , Fas-Ligand (FasL) (Chow et al., 2000), verschiedene Interleukine (IL-4, IL-18 etc.) (Lohoff and Mak, 2005) und Gene der MHC-Klasse-I und -II (Hobart et al., 1997). Zusätzlich zu den bereits erwähnten IRFs wurden in den letzten Jahren weitere viral kodierte IRFs

identifiziert, die möglicherweise auch mit zellulären IRFs interferieren (Lohoff and Mak, 2005).

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor IRF-8

IRF-8, auch als *interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) bezeichnet, ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der IRFs. Er wird ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und wird hauptsächlich durch Interferon- γ in diesen Zellen induziert (Nelson et al., 1996). Mehrere Studien deuten darauf hin, dass ICSBP im Komplex mit IRF-1 und IRF-2 durch Bindung an ISRE (Sharf et al., 1995) oder im Komplex mit PU.1 durch Bindung an EICE (Meraro et al., 1999) seine Zielgene reguliert (Sharf et al., 1995). ICSBP hat eine duale Funktion: Allein wirkt es als Repressor anderer IRFs wie etwa IRF-1 und IRF-10. Im Komplex mit IRF-1 und PU.1 aktiviert es jedoch die Transkription der Zielgene (Eklund et al., 1998). Folglich kann die Funktion von ICSBP durch interagierende Partner beeinflusst werden.

In myeloischen Vorläuferzellen lenkt ICSBP die Differenzierung in plasmazytische dendritische Zellen (Tsujimura et al., 2003) und reife Makrophagen über eine erhöhte Expression makrophagenspezifischer Gene. Gleichzeitig wird über Repression von Genen, die an der Differenzierung von Granulozyten beteiligt sind, die Ausreifung der Granulozyten gehemmt. Die Bindungsaktivität an ISRE und EICE deutet darauf hin, dass ICSBP die Entwicklung der myeloischen Zellen über ihre Transkription beeinflusst (Tamura et al., 2000).

ICSBP ist ein wichtiger Modulator von Immunantworten und reguliert die Differenzierung in Th-1-Zellen. In T-Zellen wird ICSBP durch IFN- γ hochreguliert. ICSBP kooperiert nun mit PU.1 und triggert die Expression von IL-18, welches ein adäquater Stimulus für die Induktion von Th-1-Zellen ist (Kim et al., 1999). ICSBP-defiziente Mäuse kennzeichnen eine Immundefizienz und eine erhöhte Anfälligkeit für intrazelluläre Pathogene (Scharton-Kersten et al., 1997).

1.2.2 Die Bedeutung der IRFs für die CML

Bedeutung für die CML haben unter den IRFs besonders IRF-4 und ICSBP. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Expression von ICSBP im Verlauf der CML konnte gezeigt werden, dass ICSBP im peripheren Blut bei einem Großteil der Patienten mit CML signifikant erniedrigt oder nicht nachweisbar ist. Unter Imatinib- und INF- α -Therapie ist es jedoch *in vivo* induzierbar, um im fortgeschrittenen Stadium der CML, der Blastenkrise, wieder abzufallen. Dies legt nahe, dass die Expression des ICSBP-Gens herunterreguliert ist und nicht das Gen selbst verloren wurde. Niedrige ICSBP-Spiegel werden daher mit einer Progression der Erkrankung in Verbindung gebracht (Schmidt et al., 1998).

ICSBP-defiziente Mäuse zeigen eine dysregulierte Hämatopoese und entwickeln ein CML-ähnliches Syndrom mit massiver Granulozytose und Progression zur Blastenkrise (Holtschke et al., 1996). Burchert et al. fanden zudem heraus, dass ICSBP in BCR-ABL-exprimierenden Zellen die imatinibinduzierte Apoptoserate erhöht. Einige dieser Effekte von ICSBP können teilweise durch eine ICSBP-induzierte Unterdrückung von Bcl-2, einem der anti-apoptotischen Hauptziele von BCR-ABL, erklärt werden (Burchert et al., 2004). Diese Daten deuten darauf hin, dass ICSBP eine wichtige Rolle in der Entstehung maligner myeloischer Erkrankungen spielt und weisen auf eine Funktion von ICSBP als Tumorsuppressor und Regulator von Apoptose hin (Schmidt et al., 1998).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Teil 1:

In Methylcellulose-Replattierungsassays konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass sich mit p185^{BCR-ABL} transduzierte mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{-/-}-Mäusen bis zu viermal replattieren ließen, während entsprechende Zellen von ICSBP^{+/+}-Mäusen bereits nach dem ersten Replattieren keine koloniebildenden Einheiten (CFUs) mehr aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass ICSBP im BCR-ABL-Kontext an der Selbsterneuerungskapazität der Zellen und folglich an der Progression der CML beteiligt ist.

Im vorliegenden Experiment gingen wir der Frage nach, ob der genetische Selektionsdruck im Methylcellulose-Replattierungsassay durch Inaktivierung eines der beiden ICSBP-Allele in mononukleären Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/-}-Mäusen zu einem funktionellen Verlust des verbliebenen ICSBP-Allels führen würde.

Fragestellung: Gibt es eine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP bei der onkogenen Transformation in der Hämatopoese?

Teil 2:

Es konnte sowohl auf Stammzebene als auch in Zelllinien gezeigt werden, dass BCR-ABL-transformierte 32D-Zellen (32D/BA) sich gegenüber Imatinib-Therapie resistenter zeigten als 32D/BA-ICSBP-Zellen (Burchert et al., 2004). Da bei CML-Patienten in 50-90 % Punktmutationen für Resistenzen verantwortlich sind (Gorre et al., 2001), war unsere Hypothese, dass ICSBP für genomische Stabilität verantwortlich ist.

Fragestellung: Trägt das Nicht-Expimieren von ICSBP zur Resistenzentwicklung von 32D/BA-Zellen unter Imatinib-Behandlung durch die Entstehung von Punktmutationen bei?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Primärzellen

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Zelllinien sowie murine mononukleäre Knochenmarkzellen kultiviert und für Experimente eingesetzt (Tabelle 2.1 und 2.2).

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Art	Herkunft
Ecotrope Phoenix-Zellen	basierend auf der 293T Zelllinie, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig
32D-p210 ^{BCR-ABL} (32D/BA)	murine myeloische Vorläuferzellen	Labor Burchert, Marburg
32D-p210 ^{BCR-ABL} -ICSBP (32D/BA-ICSBP)	murine myeloische Vorläuferzellen	Labor Burchert, Marburg

Tabelle 2.2: Verwendete murine mononukleäre Knochenmarkzellen

Art	Stamm	Alter	Herkunft
Mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP ^{+/+} - und ICSBP ^{+/-} -Mäusen	C57B6J	12-16 Wochen	Jackson Lab, USA

2.1.2 Biologisches Material

In Tabelle 2.3 sind die verwendeten Bakterien dargestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterien

Art	Firma
Chemically Competent Escherichia coli	Invitrogen

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft
MIGR1	Pear Lab, USA
MIGR1 p185 ^{BCR-ABL}	

2.1.3 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Martinsried bezogen.

Tabelle 2.5: Sequenzen der Primer zur genomischen DNA-Analyse

Gen	Name	Richtung	Sequenz 5'-3'
ICSBP	ICSBP geno 1	sense	5'- CATGGCACTGGTCCAGATGTCTTCC -3'
	ICSBP geno 2	reverse (Wildtypallel)	5'- CTCCAGGGGATACGGAACATGGTC -3'
	ICSBP geno 3	reverse (mutantes Allel)	5'- CGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCC -3'

2.1.4 Antikörper

Die im Western Blot verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper im Western Blot

Spezifität	Spezies	Besonderheit	Stockkonzentration	Konzentration	Hersteller
pCRKL	Kaninchen	polyklonal IgG	200 µg/ml	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
CRKL	Kaninchen	polyklonal IgG	200 µg/ml	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
ICSBP	Gans	polyklonal IgG	200 µg/ml	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

Anti-Gans	Kaninchen	HRP-konjugiert	0,5 g/l	1:2000	Dako Cytomation
Anti-Kaninchen	Gans	HRP-konjugiert	0,25 g/l	1:1000	Dako Cytomation

2.1.5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer, die in der Arbeit zum Einsatz kamen, wurden nach den in Tabelle 2.7 angegebenen Vorschriften angesetzt.

Tabelle 2.7: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
1-Butanol, wassergesättigt	25 ml 1-Butanol, 25 ml dH ₂ O
2 % BSA in PBS	10 g BSA, 500 ml PBS
2-Mercaptoethanol-IMDM-Stock	7 µl Mercaptoethanol, 10 ml IMDM
Agarosegel	1,5 g Agarose, 100 ml TAE-Puffer
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10 %	1 g Ammoniumperoxidisulfat/10 ml dH ₂ O
Ampicillin	1 g Ampicillin/10 ml dH ₂ O
Blockierungslösung, 5 %	2,5 g Magermilchpulver, 50 ml TBST
BSA, 10 %	1 g BSA/10 ml dH ₂ O
CaCl ₂ , 2 M	29,4 g CaCl ₂ , 100 ml dH ₂ O
Chloroquin	0,516 g Chloroquindiphosphat, 10 ml dH ₂ O
Diphtherietoxin	1 mg Diphtherietoxin/1 ml dH ₂ O
EDTA, 0,2 M	3,72 g EDTA, 50 ml dH ₂ O
Elektrophorese-Puffer, 5x	15,15 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS <i>ad</i> 1000 ml mit dH ₂ O
HBS	8 g NaCl, 6,5 g HEPES, 10 ml aus dem Stock 0,525 g Na ₂ HPO ₄ in 50 ml dH ₂ O <i>ad</i> 500 ml mit dH ₂ O; pH=7,05
Imatinib (STI571, IM, Glivec)	5,897 mg Imatinib, 10 ml dH ₂ O (Endkonzentration 1 mM)
IMDM (supplementiert zur Transduktion)	50 ml IMDM, 20 % FBS, 1 % P/S, 1 % 2 x 10 ⁻⁴ M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/ml rSCF, 10 ng/ml IL-3, 50 ng/ml hIL-6, 5 µg/ml Polybrene

Interleukin-3 (IL-3)	0,5 µl IL-3 Stock, 49,5 µl RPMI 1640
Interleukin-6 (IL-6)	2,5 µl Il-6 Stock, 47,5 µl RPMI 1640
Luria Broth-Festmedium (LB)	32 g/1 l dH ₂ O, 100 µg Ampicillin/ml LB-Medium
Luria Broth-Flüssigmedium (LB)	25 g/200 ml dH ₂ O, 100 µg Ampicillin/ml LB-Medium
MACS-Puffer	5 g BSA, 10 ml 0,2 M EDTA, 990 ml PBS
Natriumorthovanadat	0,184 g/10 ml dH ₂ O
N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)	50 mg ENU, 1ml DMSO
PBS	1 PBS-Tablette/500 ml dH ₂ O
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	0,1742 g PMSF, 10 ml Methanol
Polybrene	5 µg Polybrene, 1 ml dH ₂ O
Probenpuffer (Western Blot)	1 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 1,6 ml Glycerol, 1,6 ml 10 % (w/v) SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,4 ml 0,5 % Bromphenolblau, 3 ml dH ₂ O
Radio-Immuno-Präzipitationsassay (RIPA)-Puffer	3 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,263 g 150 mM NaCl, 0,3 ml NP-40, 0,15 g Natriumdeoxycholat, 0,03 g SDS, Frisch dazu: 1 mM PMSF, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 Tablette Pepstatin/10 mL RIPA-Puffer
Red Blood Cell (RBC)-Lysepuffer, 10x	8,02 g NH ₄ Cl, 1 g KHCO ₃ , 100 ml dH ₂ O
Retronectin	2,5 mg Retronectin, 2,5 ml dH ₂ O; Verdünnung 1:20 mit PBS
Sammelgel, 5 %	0,83 ml Rotiphorese Gel 30, 0,63 ml 1 M Tris, pH 6,8, 0,05 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % APS, 0,005 ml TEMED, 3,4 ml dH ₂ O
SDS (sodium dedecyl sulfate), 10 %	10 g SDS/100 ml dH ₂ O
Stem Cell Factor (SCF)	50 ng SCF, 50 µl RPMI1640
Stripping-Puffer	3,125 ml 1M Tris, pH 6,8, 375 µl β-Mercaptoethanol, 10 ml 10 % SDS, 36,5 ml dH ₂ O
TBS, 10x	48,4 g Tris, 160 g NaCl <i>ad</i> 2000 ml mit dH ₂ O, pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter HCl
TBST	1 l TBS, 1 ml Tween-20
Transfer-Puffer, 1x	5,8 g Tris, 2,9 g Glycin, 4 g SDS, 200 ml Methanol
Trenngel, 8 %	4 ml Rotiphorese Gel 30, 3,8 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 0,15 ml 10 % SDS, 0,15 ml 10 % APS, 0,009 ml

	TEMED, 6,9 ml dH ₂ O
Tris, 1 M	121,14 g Tris <i>ad</i> 1 l mit dH ₂ O, pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter HCl
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), 50x	121 g Trisbase, 28,55 ml Eisessig, 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) <i>ad</i> 500 ml dH ₂ O.
vollständiges DMEM	DMEM , 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
vollständiges IMDM	IMDM, 20 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
vollständiges RPMI 1640	RPMI 1640, 10 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
X-Vivo 15 (supplementiert zur Transduktion)	43, 5 ml X-Vivo 15, 10 % (v/v) BSA, 1 % P/S, 2 mM L-Glutamin, 2 x 10 ⁻⁴ M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/ml rSCF, 10 ng/ml mIL-3, 50 ng/ml hIL-6

2.1.6 Reagenzien

In Tabelle 2.8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kits, in Tabelle 2.9 die eingesetzten Reagenzien und in Tabelle 2.10 die verwendeten Vorrichtungen und Softwares aufgeführt.

Tabelle 2.8: Verwendete Kits

Enzym	Hersteller
AmpliTaq DNA Polymerase, Six Paq with GeneAmp 10x PCR Buffer	Roche
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
Omniskript RT Kit (200)	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen

Tabelle 2.9: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1-Butanol	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Albumine from bovine serum, Cohn V fraction	Sigma Life Science
Ammoniumchlorid reinst (NH_4Cl)	Merck
Ammoniumperoxidisulfat, 98 %	Aldrich
Ampicillin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Chloroquin (Chloroquindiphosphat)	Sigma
complete, Mini+complete, Mini, Easypack Sample (Protease Inhibitor Cocktail Tablets)	Roche
Deoxycholic acid, Sodium salt	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$)	Merck
Diphtherietoxin	Sigma
DMEM	invitrogen
DNA-Marker, 50 bp Leiter	Fermentas
Ethanol, 70 % (v/v)	Fischar
Ethydiumbromid-Lösung	Promega
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Foetal Bovine Serum (FBS)	PAA
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell
Glycerol wasserfrei reinst	Merck
Glycin	Roth
HEPES	Molecular Sigma Biology

Hygromycin B	Roche
Igepal CA630 (Nonidet P40)	Fluka
IL-3	ImmunoTools
IL-6	ImmunoTools
Imatinib (STI571, IM, Glivec)	Novartis Pharma
IMDM	Invitrogen
Isopropanol	Fluka
Kaliumhydrogencarbonat zur Analyse (KHCO ₃)	Merck
LB Agar	Invitrogen
L-Glutamine, 2 mM	Gibco BRL
Luria Broth Base	Invitrogen
Magermilchpulver für die Mikrobiologie	Merck
Magnesiumchlorid, 25 mM	Fermentas
Methylcellulose Medium for Mouse Cells	Stem Cell Technologies Inc
N, N, N', N',-Tetramethylethylenediamine	Sigma
N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)	Sigma
Nylon membrane optimized for nucleic acid transfer	Amersham Life Science
Orange Loading Dye, 6x	Fermentas
PBS-Tabletten	Invitrogen Corporation (Gibco)
Penicillin/Streptomycin, 100x	PAA
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Polybrene (Hexadimethrin Bromid > = 95 %)	Sigma
Polylysine	Sigma
Random Hexamer Primer	Fermentas
Retronectin	Takara
rm SCF	ImmunoTools
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
RPMI 1640	Invitrogen

rRNasin-RNase-Inhibitor	Promega
S.O.C.-Medium	Gibco/BRL
Salzsäure, konzentriert	Merck
SDS ultra pure	Carl Roth
Sodium Butyrate (histone deacetylase inhibitor)	Upstate cell signaling solutions
Sodium chloride (Natriumchlorid)	Riedel-de Haën
Sodium Orthovanadate (Natriumorthovanadat)	Sigma
Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 99+%, for biochemistry	Acros organics
UltraPure Agarose	Invitrogen
X-Vivo 15	BioWhittaker Lonza

2.1.7 Vorrichtungen und Software

Tabelle 2.10: Verwendete Vorrichtungen und Software

Methoden	Vorrichtung	Software	Firma
Durchflusszytometrie	FACScan	Cell Quest	Becton Dickinson
GFP-Fluoreszenz	Fluovert		Leitz
Photometrie	GeneQuant II		Pharmacia Biotech
PCR	Mastercycler Eppgradient S		Eppendorf
Proteinbestimmung (Western Blot)		Ascend Software for Multiskan	Thermo Labsystems
Sortieren	MoFlo	Dako summit	Dako cytometry

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle immortalisierten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ sowie 90 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Die ecotropen Phoenix-Zellen wurden in DMEM mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) unterhalten. Die leicht adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 % des Bodens der Kulturflaschen gesplittet. Alle 2-3 Monate wurden die Phoenix-Zellen in Hygromycin (300 µg/ml) und Diphtherietoxin (1 µg/ml) für 2 Wochen passagiert.

Die 32D-Zelllinie wurde in RPMI 1640 mit 10 % FBS und 1 % P/S unterhalten.

Beide Zelllinien wurden alle 2-3 Tage gesplittet: Nach Zellzählung eines mit Trypanblau (1:1, Blaufärbung toter Zellen) versetzten Aliquots in der Neubauer-Zählkammer wurden die Zelllinien bei einer Konzentration von 2-5 x 10⁵ Zellen pro 1 ml Medium eingestellt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt, der dafür 1993 mit dem Nobelpreis in Chemie geehrt wurde. Die PCR ist heute für die molekularbiologische Forschung unverzichtbar. Sie dient der Amplifikation definierter DNA- bzw. cDNA-Sequenzen. In dieser Arbeit wurde sie zur genomischen DNA-Analyse eingesetzt. Die Grundidee dieser Methode ist, zu einem bestimmten DNA-Zielstrang (Matrize), eine komplementäre DNA durch das Enzym Polymerase (isoliert aus *thermophilus aquaticus*) zu gewinnen. Die Startsequenz bilden zwei Oligonukleotide (Primer), die sich an das 3'-OH-Ende der gewünschten Gensequenz anlagern und mit Hilfe der DNA-Polymerase den Genabschnitt verlängern (Extension).

Die PCR amplifiziert die DNA-Sequenzen in aufeinanderfolgenden, dreischrigen Zyklen: 1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA in Einzelstränge bei einer Temperatur > 92 °C, so dass sich die Primer an jeweils einem Einzelstrang anlagern und ihn verlängern können. 2. Anlagerung (Annealing) der Primer an die Matrize während der Annealing-Temperatur (Temperatur, bei der die Hälfte der Oligonukleotide an die DNA bindet). 3. Synthese des Tochterstranges durch die hitzestabile Polymerase. Etwa 20-40 Zyklen werden durchlaufen, die in einem Thermalcycler automatisiert ablaufen. In jedem Zyklus dienen die zuvor generierten Tochterstränge als Matrize für den

folgenden Zyklus. Daraus folgt, dass in jedem Zyklus die DNA verdoppelt wird, so dass sich eine exponentielle Amplifikation der DNA ergibt.

Neben DNA, Primern und Taq-Polymerase müssen im Reaktionsgemisch alle vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in einer Pufferlösung vorhanden sein.

Bei jedem Reaktionsansatz wurde eine Positiv- sowie eine Leerwertkontrolle mitgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermalcycler in 0,5 µl PCR-Gefäßen durchgeführt. Die Beurteilung der Amplifikation erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in 1,5%igen Agarosegelen.

PCR zur genomischen Analyse des ICSBP-Gens

Eine PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

Ansatz: ca. 100 ng DNA, 10 µM Primer „ICSBP geno 1“ und „ICSBP geno 3“, 3,3 µM Primer „ICSBP geno 2“, 400 µM dNTPs, 1,25 U Taq-Polymerase, 2 mM MgCl₂, 10x PCR-Puffer und RNase-freies Wasser in einem Volumen von 25 µl.

Tabelle 2.1: PCR-Bedingungen zur genomischen Analyse des ICSBP-Genes

Gen	Primer	Denaturierung ¹	Annealing	Elongation ²	Zykluszahl
ICSBP	ICSBP geno 1-3	95°C, 30 sek	66°C, 30 sek	72°C, 1 min	40

¹Die initiale Denaturierung im 1. Zyklus der PCR dauerte 4 min 30 sek. ²Auf den letzten Zyklus folgte eine Inkubation von 10 min bei 72 °C, um eine Komplettierung der noch unvollständigen Moleküle zu ermöglichen.

2.2.3 Isolierung von mononukleären Knochenmarkzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten

Durch Zentrifugation von gesamtem KM über einen Ficoll-Dichtegradienten konnten mononukleäre Zellen (Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, Progenitoren, Stammzellen) von den übrigen hämatopoetischen Zellen wie Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden. Das KM wurde mit MACS-Puffer aus Tibia und Femur der Mäuse herausgewaschen und danach nicht weiter verdünnt. Auf 8 ml Ficoll wurden ebenfalls 8 ml der KM/MACS-Puffer-Suspension aufgetragen. Daran anschließend wurden die Proben bei 800 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase

wurde in ein neues Falcon-Röhrchen pipettiert, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und erneut bei 300 g für 5 min mit Bremse zentrifugiert. Waren noch Erythrozyten im Zellpellet vorhanden, wurde es je nach Größe des Zellpellets in 1-2 ml 1x RBC-Lysepuffer resuspendiert, 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend noch zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und danach entsprechend seiner Größe in 2-5 ml vollständigem IMDM resuspendiert. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden entweder direkt zur DNA-Extraktion verwendet oder in 90 % FBS und 10 % DMSO bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Zur Verwendung der mononukleären Zellen für den Replattierungsassay wurde das Zellpellet in X-Vivo-Medium resuspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

2.2.4 DNA-Extraktion

Als Vorlage für die PCR-Analyse des ICSBP-Gens diente reine DNA, die mit Hilfe von Silicasäulen aus murinen mononukleären Knochenmarkzellen gewonnen wurde. Zur DNA-Extraktion wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (250) von Qiagen verwendet und entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf der Eigenschaft von DNA, bei hohen Salzkonzentrationen an Silicate zu binden. Nach anschließendem Waschvorgang und Degradation von RNA durch RNase kann die DNA durch RNase-freies Wasser eluiert werden. Die DNA wurde anschließend bei - 20 °C gelagert.

2.2.5 Quantifizierung von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption (OD = optische Dichte) der Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Absorption von 1 Einheit (unit) entspricht 50 µg DNA pro ml ($A_{260} = 1 \rightarrow 50 \mu\text{g/ml}$). Diese Messung ist nur bei neutralem pH gültig. Daher ist es nötig, die DNA-Proben zu verdünnen. Die Konzentration in µg/ml ergibt sich aus der Formel: $c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$. Die Ratio der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ($OD_{260 \text{ nm}} / OD_{280 \text{ nm}}$) spiegelt den Grad der Kontamination mit Protein wider und sollte bei DNA nahe 1,8 liegen.

2.2.6 Protein-Extraktion

Die folgenden Schritte zur Herstellung von Gesamtzelllysaten für Western Blot-Experimente wurden stets auf Eis durchgeführt. Ein Zellpellet, bestehend aus ca. 5×10^6 Zellen, wurde zunächst in PBS gewaschen und anschließend in 200 μ l RIPA-Puffer mit frisch hinzugefügtem Phosphatase-Inhibitor (Orthovanadat) und Proteinase-Inhibitoren (PMSF, Pepstatin) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (14 000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode bestimmt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in alkalischer Lösung in Anwesenheit von Protein (Biuret-Reaktion) mit nachfolgender Bildung eines farbigen Komplexes mit BCA (Bicinchoninic Acid). Nach den Vorgaben des Herstellers wurden hier 10 μ l des Proteinextraktes bzw. je 10 μ l des Proteinstandards (0, 125, 500, 750, 1000, 1500, 2000 μ g/ml) mit 200 μ l BCA Working Reagent (50 Teile BCA Reagenz A, 1 Teil BCA Reagenz B) in einer 96-Well-Platte versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde die Extinktion (OD) bei 620 nm mit Hilfe der Ascend Software Version gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve ermittelt. Proteinextrakte wurden bei - 80 °C gelagert; nach dem Auftauen der Aliquots wurde die Proteinbestimmung jedoch stets wiederholt.

2.2.7 Western Blot

Der Western Blot wird verwendet, um spezifische Proteine, die von Antikörpern erkannt werden, zu identifizieren. Dazu werden die Proteine zunächst mit 4x Probenpuffer versetzt, um anschließend durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt zu werden. Im Anschluss daran werden die Proteine elektrophoretisch auf eine Membran (hier Nitrocellulose-Membran) transferiert. Um unspezifisches Binden der Primärantikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran mit 5%iger Blockierungslösung 60 min bei RT inkubiert. Dabei binden die Proteine der Blockierungslösung an alle Stellen auf der Membran, an die die Zielproteine nicht gebunden haben. Erst dann wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert, der nun keine anderen Bindungsstellen mehr hat, als die des spezifischen Zielproteins.

Mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit einer Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt und gegen den primären Antikörper gerichtet ist, lässt sich auf dem Röntgenfilm die Bande des zu detektierenden Proteins sichtbar machen. Dafür wird der Röntgenfilm 5 min mit einer Luminollösung inkubiert. Die HRP katalysiert nun die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann und proportional zur detektierten Proteinmenge ist.

Gelelektrophorese

Das Gel für die SDS-PAGE wurde in eine Mini-Western-Blotting-Einheit (Biorad) gegossen. Zwischen zwei senkrecht eingespannte Glasplatten wurde so viel Trenngel (8 %) gegossen, bis die Markierung der Vorrichtung erreicht war. Das Gel wurde mit einer dünnen Schicht wassergesättigtem Butanol überschichtet, damit eine glatte Oberfläche entstand. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit wurde Butanol mit destilliertem Wasser abgewaschen, das Trenngel mit einem Sammelgel (5 %) überschichtet und ein Kamm zur Bildung von 10 Taschen eingefügt. Das Sammelgel führt dazu, dass alle Proteine in einer dichten Front verlaufen und gleichzeitig das Trenngel erreichen, um dort ihrer Größe nach getrennt zu werden. Während der Polymerisationszeit wurden 30 µg Protein mit 4x Probenpuffer versetzt (beispielsweise 20 µl Proteinextrakt und 5 µl Probenpuffer) und 15 min bei 70 °C denaturiert. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde es in 1x Elektrophoresepuffer eingespannt und die Proben sowie ein Proteinmarker zur Größenbestimmung in die Geltaschen eingefüllt. Bis die Proben das Sammelgel durchquert hatten, erfolgte die Elektrophorese bei 80 V, anschließend für etwa 45 min bei 120 V. Danach wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wurde im Anschluss dem Semidry-Blotten zugeführt.

Blotting

Der Aufbau des Sandwichblots entspricht dem Prinzip des Semidry-Blottings:

- Kathodenplatte
- 3 Lagen Gel-Blotting-Papier, getränkt in 1x Transferpuffer
- Trenngel
- Nylonmembran, eingeweicht in 1x Transferpuffer
- 3 Lagen Gel-Blotting-Papier, getränkt in 1x Transferpuffer
- Anodenplatte

Die Proteine wurden für 1 h bei 200 mA (bei 2 Membranen) auf die Membran geblottet.

Detektion

Die Nylonmembran wurde anschließend 60 min in 5%iger Blockierungslösung auf dem Schüttler geschwenkt. Die entsprechende Menge des primären Antikörpers wurde in 3 ml 5%iger Blockierungslösung gelöst und die Membran darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die ungebundenen Antikörper durch Waschen mit TBST auf dem Schüttler (1x1 min, 1x10 min, 1x1 min bei RT) entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde nun abermals in 3 ml 5%iger Blockierungslösung verdünnt und die Membran darin 2 h auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Schließlich wurden die nicht gebundenen sekundären Antikörper durch Waschen mit TBST (2x1 min und 3x15 min bei RT) entfernt.

Die Detektion der gebundenen Antikörper wurde mit Hilfe des ECL-Kits (GE Healthcare) durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Lösung A mit 25 µl der Lösung B versetzt und die Membran 5 min auf dem Schüttler mit dieser Lösung inkubiert. Die Membran wurde schließlich zwischen 2 Plastikfolien gelegt und in der Dunkelkammer in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL) exponiert. Die Expositionsdauer betrug je nach Signalstärke 20 sek bis 4 min.

Strippen der Membran

Durch das sogenannte Strippen der Membran werden die zuvor aufgebrauchten Antikörper durch Waschvorgänge wieder von der Membran entfernt, so dass die gleiche Membran mehrmals mit verschiedenen Antikörpern untersucht werden kann. Diese Methode bietet sich insbesondere an, wenn die Banden der verschiedenen Proteine eng beieinander liegen oder für das gleiche Protein sowohl die phosphorylierte als auch die

dephosphorylierte Expression untersucht werden soll (beispielsweise pCRKL und CRKL). Die Membran wurde zu diesem Zweck 30 min bei 60 °C im Wasserbad mit Stripping-Puffer inkubiert und anschließend mit 1x TBST (5x2 min) und 1x TBS (2x10 min) gewaschen. Die Membran wurde dann erneut 2-3 h in Blockierungslösung geblockt, um anschließend mit primären Antikörpern inkubiert zu werden.

2.2.8 Gewinnung von Plasmid-DNA

Transformation, Selektion und Inokulation

Die Transformation von chemisch kompetenten E-coli-Bakterien mit den Plasmidvektoren MIGRI p185^{BCR-ABL} und MIGR1 erfolgte durch Inkubation von E-coli-Bakterien mit 50-500 ng Plasmid auf Eis für 20 min und anschließendem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Nach einer Inkubation auf Eis für 2-5 min wurde dem Ansatz SOC-Medium hinzugefügt, um ihn anschließend besser auf den LB-Agarplatten ausstreichen zu können. Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Eine Kontrolle mit E-coli-Bakterien ohne Vektor wurde immer mitgeführt. Die auf dem Vektor kodierte β -Laktamase vermittelt eine Resistenz gegenüber dem im LB-Agar enthaltenen Ampicillin. Durch Koloniebildung der E-coli-Bakterien nach Zugabe des Vektors bei gleichzeitigem Absterben der Kontroll-E-coli-Bakterien kann ein Wachstum durch Kontamination ausgeschlossen werden und zeigt Wachstum aufgrund erfolgreicher Transformation an. Es wurden von beiden LB-Agarplatten 1-2 Kolonien gepickt, in jeweils 2 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin überführt und für 5-6 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Wenn Bakterienwachstum durch Trübung des LB-Mediums erkennbar war, wurde der Ansatz in 198 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin überführt und 18 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert.

Plasmidextraktion

Die Extraktion der Plasmide aus der Bakterienkultur erfolgte unter Verwendung des Plasmid Maxi Kits. Das Prinzip dieses Protokolls ist 1. die alkalische Lyse der Bakterien, 2. die Adsorption der DNA an das Anionenaustauschharz der Qiagen-Düse, 3. das Waschen und Eluieren und 4. die Konzentration und Entsalzung der DNA durch Präzipitation in Isopropanol.

2.2.9 Retrovirale Transduktion

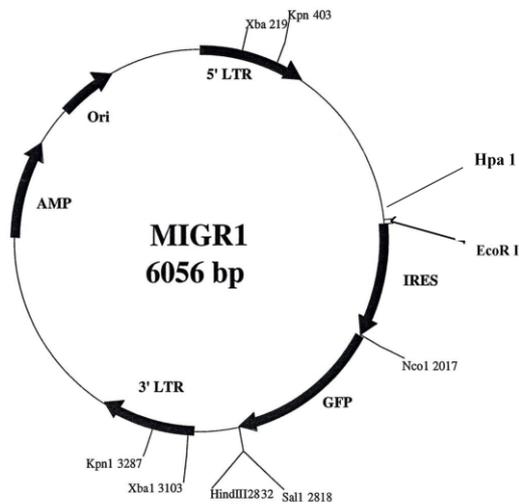


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Vektors MIGR1. Die Lokalisation von IRES, GFP und AMP ist dargestellt. LTR: *long terminal repeats*; Ori: *origin of replication*; *Xba*, *Kpn*, *Hpa*1, *Eco*R1, *Nco*1, *Sall*, *Hind*III, *Xba*1, *Kpn*1: Schnittstellen. An der Schnittstelle *Hpa*1 wurde das Gen für BCR-ABL in den Vektor kloniert.

Zur Retroviruspräparation muss lediglich das Plasmid eingebracht werden. Der MIGR1-Vektor ist vom Murinen Stammzellvirus (MSCV) abgeleitet und enthält das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP), das Gen für Ampicillin (AMP) sowie das Gen für IRES (engl.: *internal ribosomal entry site*). Für den Vektor MIGR1 p185^{BCR-ABL} wurde an der Schnittstelle *Hpa*1 das Gen für p185^{BCR-ABL} in den Vektor kloniert (Abb. 6).

Die Rezeptoren des Retrovirus sind ecotrop, d.h. der Transfer genetischer Information ist auf sich teilende Mauszellen beschränkt, während bei amphotropen Rezeptoren die Weitergabe von Genen auf nahezu alle sich teilenden Säugetierzellen stattfinden kann.

Die Phoenix-Zelllinie ist in hohem Grade transfektabel; die Transfektionsrate kann mehr als 50 % betragen.

Das *gag-pol*-Element wurde mit einem Resistenzgen gegenüber Hygromycin, die genetische Information für die Hüllproteine mit einem Resistenzgen gegenüber Diphtherietoxin eingeführt. Nach Selektion der Zellen mit Hygromycin und Diphtherietoxin exprimieren die Phoenixzellen über Monate stabil sowohl das

Ziel der retroviralen Transduktion ist es, Zellen mit einem Retrovirus zu infizieren, so dass sich das Genom des Retrovirus in das Genom der Zielzelle integriert und in diese neue genetische Information einbringt, z.B. ein Onkogen. Zur Retroviruspräparation wurden ecotrope Phoenixzellen verwendet, welche die Fähigkeit zur Produktion von Retroviren haben. Phoenixzellen basieren auf der 293T-Zelllinie, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie. In die 293T-Zelllinie wurden Konstrukte eingebracht, die zur Produktion von *gag-pol* (= Helferelemente: Integrase, reverse Transkriptase) und Hüllpro-

gag-pol-Element als auch die Gene für die Hüllproteine. Um eine Expression dieser Gene dauerhaft sicherzustellen, sollten die Phoenixzellen alle 2-3 Monate in Hygromycin (300 µg/ml) und Diphtherietoxin (1 µg/ml) für ein bis zwei Wochen erneut selektiert werden.

Knochenmarkisolation

Gesamtes Knochenmark wurde aus ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen des Stammes C57B6J gewonnen. Die Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt 12-16 Wochen alt und in guter gesundheitlicher Verfassung. Es wurden an beiden Hinterbeinen Tibia und Femur isoliert und das Knochenmark mit MACS-Puffer herausgespült.

Präparation von Retrovirus

Die Retrovirusproduktion benötigt insgesamt zehn Tage. Am Tag 1 wurden ecotrope Phoenixzellen in vollständigem DMEM ausgesät und bis Tag 4 bei 37 °C im Brutschrank unter exponentiellen Wachstumsbedingungen expandiert. Am Tag 5 wurden Kulturflaschen mit Polylysin beschichtet, darin 5 mio Zellen in vollständigem DMEM ausgesät und bis Tag 7 bei 37 °C im Inkubator expandiert. Phoenixzellen lassen sich am besten bei einer Konfluenz von 70 % transfizieren. Am Tag 7 wurde die Transfektion der Phoenixzellen mit dem Plasmid MIGR1 bzw. MIGR1 p185^{BCR-ABL} unter Zusatz von CaCl₂ durchgeführt. Dazu wurden 160 µg Plasmid mit 488 µl CaCl₂ versetzt und mit dH₂O auf 4000 µl aufgefüllt. Jeweils 2000 µl dieser Lösung wurden tropfenweise mit 2000 µl HBS versetzt, so dass ein Präzipitat der DNA sichtbar wurde. 12 ml vollständiges DMEM wurden mit 4 µl 0,1 M Chloroquindiphosphat (Endkonzentration 33 µM) sowie 4 ml DNA-Präzipitat versetzt und zu den adhären Phoenixzellen in die Kulturflasche gegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 16 h wurde das Medium abgenommen, durch 16 ml vollständiges DMEM und 160 µl 1 M Butyrat (Endkonzentration 10 mM) ersetzt und 8 h bei 37 °C inkubiert. Nach 8 h wurde das Medium durch RPMI 1640 ersetzt und 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Transfektion produzieren die Phoenixzellen Retrovirus, der im Überstand verbleibt. Am Tag 9 und 10 wurde insgesamt viermal virushaltiger Überstand geerntet und das Medium jeweils durch RPMI 1640 ersetzt. Der virushaltige Überstand wurde entweder direkt zur retroviralen Transduktion von murinen mononukleären Knochenmarkzellen verwendet oder bei - 80 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut.

Transduktion von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark von ICSBP^{+/-}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen

Die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark von ICSBP^{+/-}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in X-Vivo-15-Medium in 6-Well-Platten ausgesät und 48 h inkubiert. Zur Transduktion mit Retroviren müssen sich die Zellen in Proliferation befinden, da nur sich teilende Zellen infiziert werden können. Daher wurde das X-Vivo-15-Medium mit 10 % (v/v) BSA, 1 % (v/v) P/S, 2 mM L-Glutamin, 2×10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/ml rSCF, 10 ng/ml mIL-3 und 50 ng/ml hIL-6 supplementiert.

6-Well-Platten wurden 2 h mit 1,5 ml Retronectin pro Well inkubiert. Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen 2 % BSA in PBS 30 min bei RT geblockt. Nach 48 h wurden die Zellen mit 2,5 ml virushaltigem Überstand pro Well versetzt und bei 32 °C und 2500 rpm 90 min zentrifugiert. Auf die retronectinbedeckten 6-Well-Platten wurde 1 ml virushaltiger Überstand gegeben und die Platten bei 37 °C 90 min inkubiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Zellen bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in vollständigem IMDM resuspendiert und auf die 6-Well-Platten überführt, deren Boden mit an Retronectin gebundenen Viren bedeckt war. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Proliferation wurde das Medium darüber hinaus mit 1 % (v/v) 2×10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/ml rSCF, 10 ng/ml IL-3, 50 ng/ml hIL-6 sowie 5 µg/ml Polybrene supplementiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Messung der Transduktionseffizienz anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung der GFP-positiven Zellen mit Hilfe des Cell-Quest-Software-Paketes.

2.2.10 Replattierungsassay in Methylcellulose

Die sortierten GFP-positiven Zellen wurden mit IMDM gewaschen und anschließend bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml 48 h in IMDM, supplementiert mit 20 % FBS, 1 % P/S, 1 % 2×10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/ml rSCF, 10 ng/ml IL-3 und 50 ng/ml hIL-6, kultiviert. Nach 48 h wurden 3000 Zellen in 300 µl vollständigem IMDM mit 3 ml Methylcellulose gut gemischt und jeweils 1,5 ml in insgesamt 2 Petrischalen (Ø 35 mm) ausplattiert. Nach 10-14 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde die Anzahl der CFUs in beiden Petrischalen ermittelt. Jeweils 3000 Zellen von

jedem Zelltyp wurden zum weiteren Replattieren verwendet. 3000 Zellen in 300 µl vollständigem IMDM wurden gut mit 3 ml Methylcellulose gemischt und jeweils 1,5 ml in 2 Petrischalen (Ø 35 mm) ausplattiert. Nach 10-14-tägiger Inkubation im Brutschrank wurde abermals die Anzahl der CFUs in beiden Petrischalen ermittelt. Replattierungen wurden so lange durchgeführt wie mikroskopisch CFUs sichtbar waren.

2.2.11 N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierter Mutageneseassay

ENU wurde bei einer Konzentration von 50 mg/ml in DMSO bei - 80 °C in Aliquots gelagert. Die 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen wurden bei einer Konzentration von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml in vollständigem RPMI 1640 bei exponentieller Wachstumsrate unterhalten. ENU wurde den Zellen bei einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden für 12-24 h im Brutschrank kultiviert, im Anschluss dreimal mit RPMI 1640 gewaschen und schließlich unter exponentiellen Wachstumsbedingungen in komplettem RPMI 1640 expandiert.

Resistenzscreen: Nach ENU-Vorbehandlung wurden 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen in 96-Well-Platten bei einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Well in 200 µl vollständigem RPMI 1640 in Anwesenheit einer Imatinib-Konzentration von 4 µM kultiviert. Nicht mutagenisierte 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen wurden ebenfalls bei einer Imatinib-Konzentration von 4 µM als Kontrollen mitgeführt. Alle 2-3 Tage wurden 100 µl des Überstandes abpipettiert und 100 µl frisches vollständiges RPMI 1640 mit einer Imatinib-Konzentration von 8 µM hinzugefügt. Die Wells wurden dabei unter dem Lichtmikroskop und anhand der Farbe des Mediums auf Zellwachstum untersucht. Bei Wachstum in einem Well wurden die Zellen in eine 24-Well-Platte überführt und weiterhin in Anwesenheit von 4 µM Imatinib expandiert.

3 Ergebnisse

3.1 Standardisierung einer PCR zur Genotypisierung des ICSBP-Gens

Zur Genotypisierung des ICSBP-Gens wurde eine PCR etabliert. Mithilfe einer Gradienten-PCR wurde die optimale Schmelztemperatur der eingesetzten Primer ermittelt. Dazu wurden 12 PCR-Ansätze mit je 100 ng DNA von mononukleären Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}-Mäusen zubereitet und jeder dieser Ansätze im Thermalcycler einer anderen Schmelztemperatur im Bereich von 54,9 °C bis 65,9 °C zugeführt. Insgesamt wurde die DNA in 40 Zyklen amplifiziert (Abb. 7).

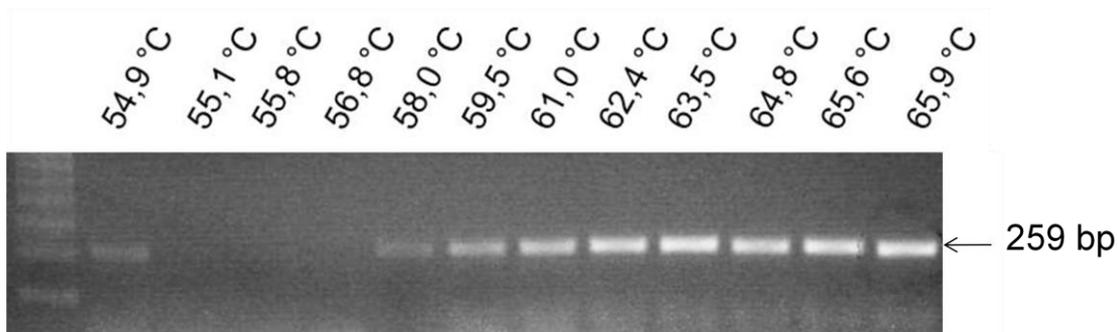


Abbildung 7: Gradienten-PCR der Primer-Schmelztemperatur. Genomische DNA mononukleärer Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}-Mäusen wurde mit den Primern *ICSBP fw* (Forward-Primer) und *ICSBP rv* (Reverse-Primer) bei Schmelztemperaturen im Bereich von 54,9 °C – 65,9 °C in 40 Zyklen amplifiziert. Es wurde ein 123 bp-DNA-Leiter verwendet. Der Pfeil markiert die Bande des amplifizierten Fragmentes des ICSBP-Wildtyp-Allels bei 259 bp.

Eine Schmelztemperatur von 65,9 °C zeigte die höchste Intensität der ICSBP-Wildtyp-Bande. Im Folgenden wurde nun die PCR mit genomischer DNA mononukleärer Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden drei Primer verwendet, die sowohl ein definiertes Fragment des Wildtyp-Allels als auch ein Fragment des mutanten Allels amplifizieren. In Abbildung 8A sind das ICSBP-Gen (Exon 1-3) sowie die Bindungsstellen der Primer schematisch dargestellt. Deutlich konnten die Banden der amplifizierten Fragmente des Wildtyp-Allels bei 259 bp sowie des mutanten Allels bei 547 bp voneinander unterschieden werden (Abb. 8B).

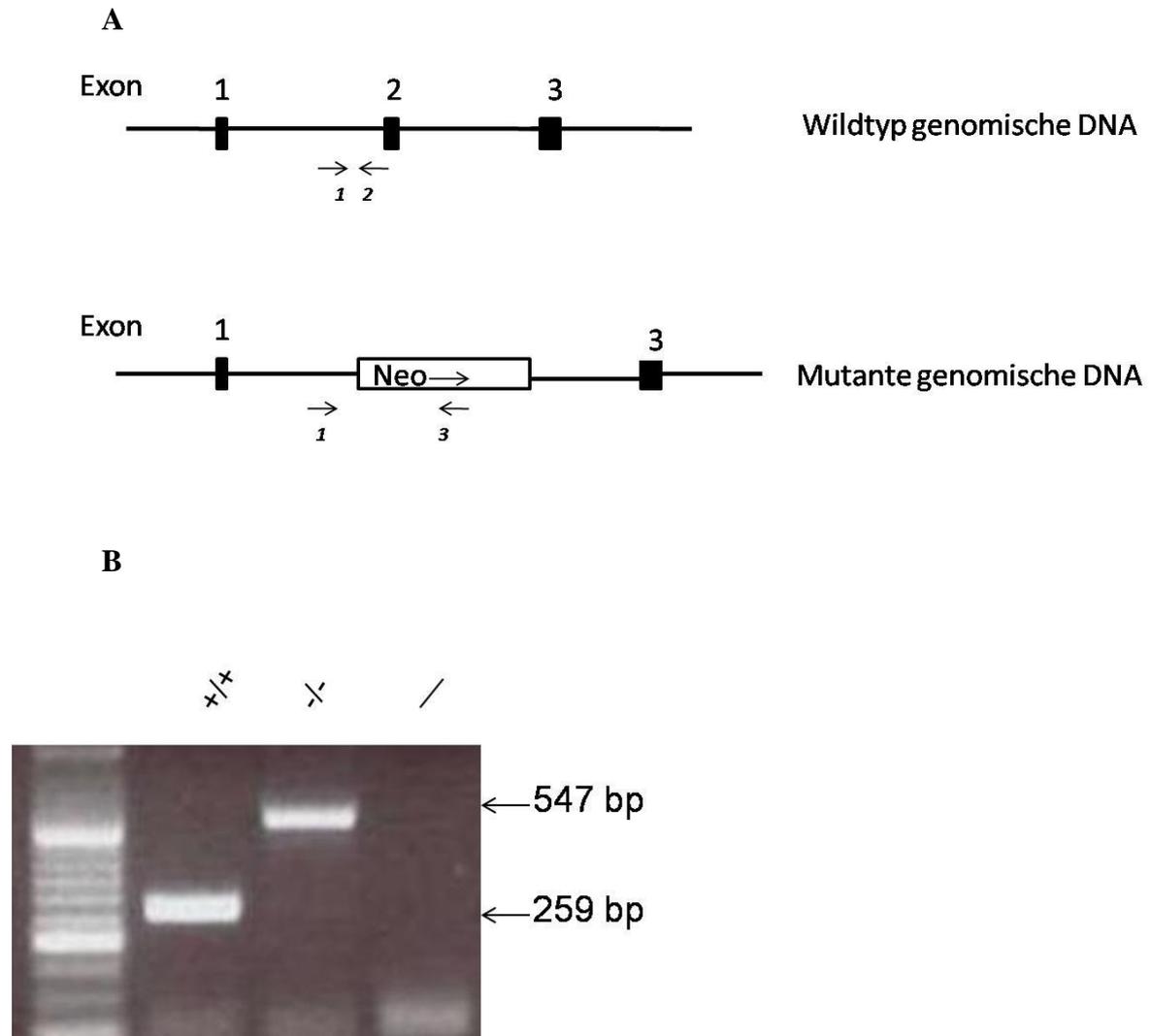


Abbildung 8: Differenzierung des ICSBP-Wildtyp-Allels (Exon 1-3) und des mutanten ICSBP-Allels. A) Schematische Darstellung: Die relative Position der Exons wird angezeigt. Gefüllte Kästchen repräsentieren ICSBP-kodierende Exons, die Linien repräsentieren nicht-kodierende Sequenzen. Man erhielt das mutante Allel, indem Exon 2 durch Endonukleasen entfernt und ein Neomycin-Resistenzgen mit einem bakteriellen Vektor in das Wildtyp-Allel kloniert wurde. Die Neomycin-Resistenz ist als offenes Kästchen dargestellt. Die Pfeile zeigen die Bindungsstellen der verwendeten Primer zur Amplifizierung eines definierten Fragmentes des Wildtyp- bzw. des mutanten Allels an. Der Primer *ICSBP fw* (1) bindet in der 2. nicht-kodierenden Sequenz, Primer *ICSBP rv1* (2) bindet im Exon 2 und Primer *ICSBP rv2* (3) innerhalb des Neomycin-Resistenzgenes. B) Genotypisierung einer *ICSBP^{+/+}*- und einer *ICSBP^{-/-}*-Maus mit den Primern *ICSBP fw*, *ICSBP rv1* und *ICSBP rv2*. Es wurde ein 123 bp-DNA-Leiter verwendet. Die Pfeile markieren die Bande des amplifizierten Fragmentes des Wildtyp-Allels bei 259 bp und des mutanten Allels bei 547 bp. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt.

Im Folgenden wurde die PCR mit genomischer DNA von $ICSBP^{+/-}$ -Mäusen durchgeführt und eine Reduktion des Primers *ICSBP rv1* auf ein Drittel der Konzentrationen von Primer *ICSBP fw* und *ICSBP rv2* erwies sich als notwendig, um gleichzeitig die Banden des Wildtyp- und des mutanten Allels zu erhalten.

Da die Aktivität der Taq-Polymerase magnesiumabhängig ist, wurde die DNA von $ICSBP^{+/-}$ -Mäusen in vier PCR-Ansätzen mit $MgCl_2$ -Konzentrationen im Bereich von 1-2 mM bei einer Schmelztemperatur von 66 °C und reduzierter Konzentration von Primer *ICSBP fw1* in 40 Zyklen amplifiziert. Beide Banden zeigten ihre größte Intensität in Anwesenheit von 2 mM $MgCl_2$ (Abb. 9).

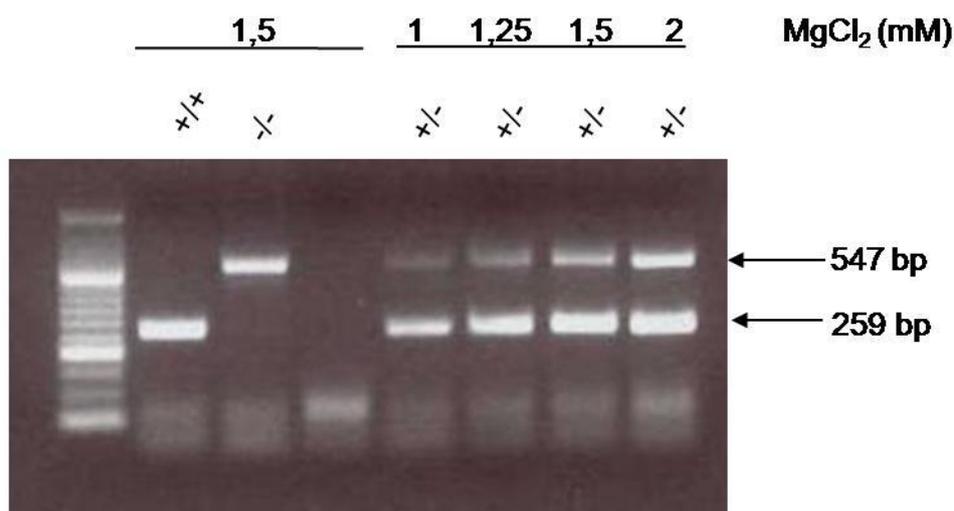


Abbildung 9: PCR mit einem $MgCl_2$ -Gradienten. Genomische DNA mononukleärer Knochenmarkzellen von $ICSBP^{+/-}$ -Mäusen wurde mit den Primern *ICSBP fw*, *ICSBP rv1* und *ICSBP rv2* mit $MgCl_2$ -Konzentrationen im Bereich von 1-2 mM in 40 Zyklen amplifiziert. Positivkontrollen von mononukleären Knochenmarkzellen von $ICSBP^{+/+}$ - und $ICSBP^{-/-}$ -Mäusen sowie eine Negativkontrolle ohne DNA wurden bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 1,5 mM mitgeführt. Es wurde ein 50 bp-DNA-Leiter verwendet. Die Pfeile markieren die Bande des amplifizierten Fragmentes des Wildtyp-Allels bei 259 bp und des mutanten Allels bei 547 bp.

3.2 Keine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP in der onkogenen Transformation

Mit dem Onkogen BCR-ABL transduziertes Knochenmark hat nur eine begrenzte Fähigkeit, seriell in mit Cytokinen ergänzten Methylcellulose-Kulturen replattiert zu werden. Nach der 2. Replattierung können keine CFUs mehr nachgewiesen werden (Huntly et al., 2004). Chaturvedi et al. konnten allerdings zeigen, dass sich mit BCR-ABL transduzierte mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{-/-}-Mäusen viermal in Methylcellulose-Kulturen replattieren ließen. Dies zeigt eine Kooperation von BCR-ABL und dem Verlust von ICSBP. In dem vorliegenden Replattierungsassay wurde untersucht, ob sich eine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL und ICSBP in der onkogenen Transformation der Hämatopoese nachweisen lässt. In drei unabhängigen Experimenten wurde das Replattierungsverhalten von mononukleären Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen, die jeweils retroviral mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} bzw. MIGR1 transduziert worden waren, verglichen.

Transfektion von ecotropen Phoenixzellen mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} und MIGR1

Zur Retrovirusherstellung wurden ecotrope Phoenixzellen mit dem Plasmid MIGR1 p185^{BCR-ABL} sowie dem Kontrollvektor MIGR1 transfiziert. Dabei konnten Transfektionsraten der Phoenixzellen erreicht werden, die im Fluoreszenzmikroskop auf 50-70 % geschätzt wurden (Abb. 10).

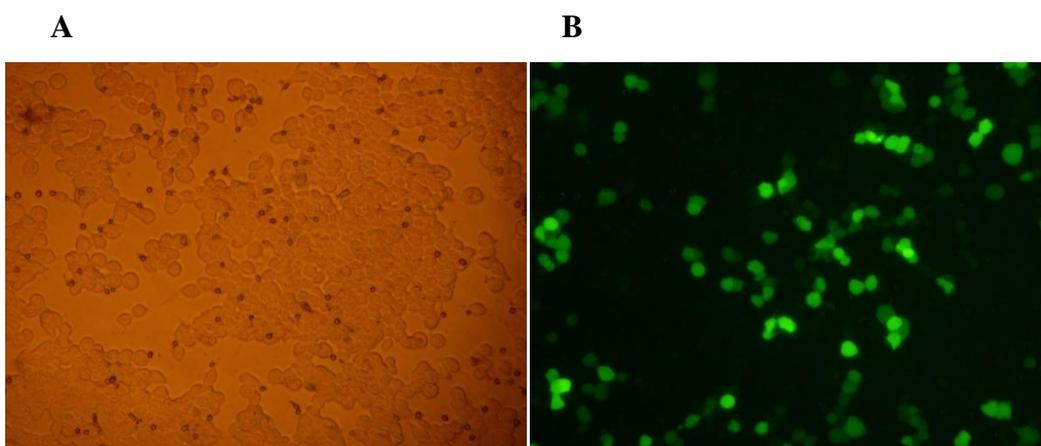


Abbildung 10: Transfizierte Phoenixzellen mit MIGR1. A) Mikroskopische Übersichtsaufnahme. B) Übersichtsaufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Originalgröße, x40.

Retrovirale Transduktion mononukleärer Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/-}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} und MIGR1

Mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/-}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen wurden mit Retroviren, die das Plasmid MIGR1 p185^{BCR-ABL} bzw. MIGR1 enthielten, transduziert. Die transduzierten Zellen wurden durchflusszytometrisch sortiert, so dass für den Replattierungsassay ausschließlich Zellen verwendet wurden, die das Plasmid MIGR1 p185^{BCR-ABL} bzw. MIGR1 enthielten (Abb. 11).

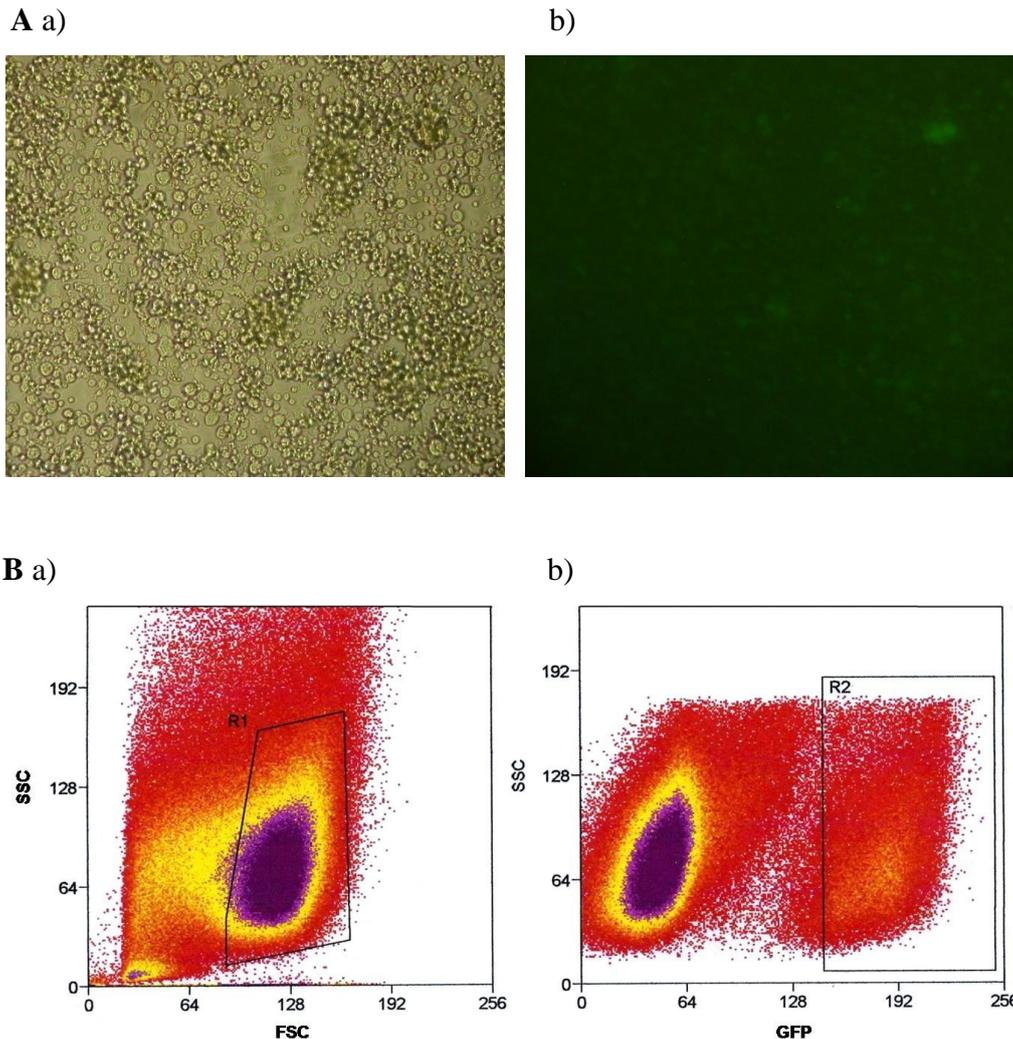


Abbildung 11: A) Retroviral transduzierte mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/-}-Mäusen. a) Mikroskopische Übersichtsaufnahme. b) Übersichtsaufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Originalgröße, x40. **B) Analyse der Transduktionseffizienz.** Repräsentativer Dot-Plot von retroviral transduzierten mononukleären Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/-}-Mäusen. a) Das Side-Scatter (SSC) ist gegen das Forward-Scatter (FSC) aufgetragen. Entsprechend den Eigenschaften des FCS und SSC wurde in R1 streng für lebende Zellen gegatet. b) Die GFP-Positivität der lebenden Zellen ist gegen das SSC aufgetragen. In R2 wurde streng für stark GFP-positive Zellen gegatet.

Replattierungsassay in Methylcellulose

14 Tage nach dem Ausplattieren von 2x1500 Zellen in Methylcellulose wurde die Anzahl der CFUs bestimmt. Dabei wurde ein Klon von ≥ 50 Zellen als CFU definiert.

Alle Zelltypen zeigten eine annähernd gleiche Anzahl an CFUs. Mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen zeigten in 3 Durchläufen durchschnittlich 71±43 CFUs, mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen 57±27 CFUs, mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen 66±11 CFUs und mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen 43±15 CFUs.

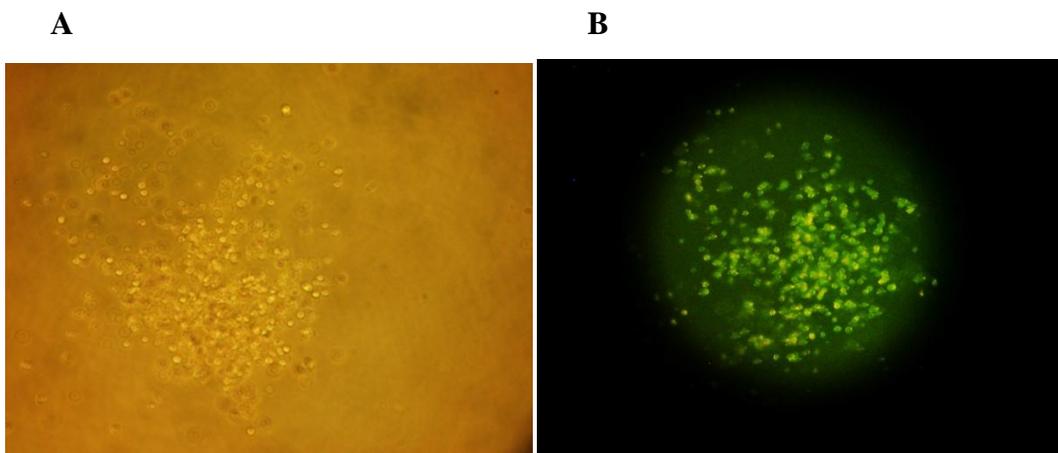


Abbildung 12: CFU 14 Tage nach der Ausplattierung. A) Mikroskopische Übersichtsaufnahme einer CFU aus einer mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierten ICSBP^{+/-}-mononukleären Knochenmarkzelle. B) Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop. Originalgröße, x40.

Je Zelltyp wurden 2x1500 Zellen zur 1. Replattierung eingesetzt und in Methylcellulose ausplattiert. Nach 14 Tagen zeigte sich in allen Zelltypen eine abnehmende Anzahl an CFUs. Mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen zeigten in 3 Durchläufen durchschnittlich 52±45 CFUs, mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen 53±44 CFUs, mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen 38±19 CFUs und mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen 24±8 CFUs.

Bei der 2. Replattierung, welche erneut mit 2x1500 Zellen in Methylcellulose durchgeführt wurde, zeigten sich nach 14 Tagen, mit Ausnahme eines einzelnen Durchganges, bei dem 24 CFUs in den mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierten ICSBP^{+/+}-Zellen nachweisbar waren, keine CFUs mehr (Abb. 13).

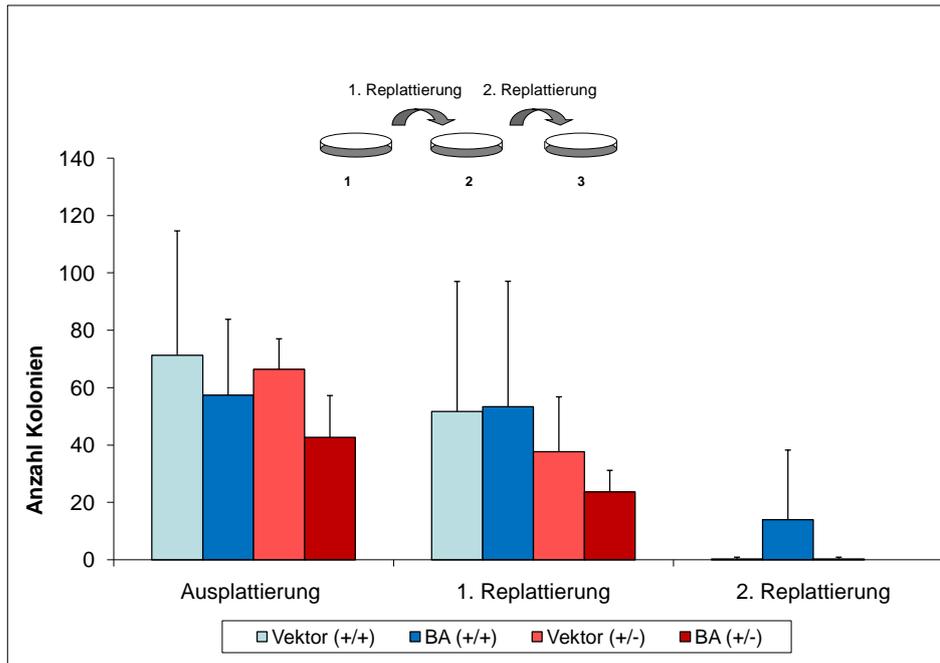


Abbildung 13: Replattierungsassay in Methylcellulose. Von retroviral transduzierten mononukleären Knochenmarkszellen von ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen wurden je Genotyp 2x1500 Zellen in Methylcellulose ausplattiert und nach 14 Tagen die Anzahl der CFUs ermittelt. Jeweils 2x1500 Zellen wurden so lange replattiert, bis sich keine CFUs mehr zeigten.

Vektor (+/+) = mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen, BA (+/+) = mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/+}-Zellen, Vektor (+/-) = mit MIGR1 transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen, BA (+/-) = mit MIGR1 p185^{BCR-ABL} transduzierte ICSBP^{+/-}-Zellen.

3.3 Erhöhte imatinibinduzierte Resistenzbildung von 32D/BA-ICSBP-Zellen gegenüber 32D/BA-Zellen im N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierten Mutageneseassay

Es wurde ein etablierter ENU-basierter Mutageneseassay (Bradeen et al., 2006) durchgeführt, um das Resistenzverhalten von 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen unter Imatinib-Behandlung miteinander zu vergleichen.

In drei unabhängigen Experimenten wurden mutagenisierte 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen kontinuierlich einer Imatinib-Konzentration von 4 μM ausgesetzt, welche dem Plasma-Trough-Spiegel von Patienten entspricht, die mit 800 mg Imatinib täglich therapiert werden (Peng et al., 2004). Kontrollzellen ohne vorausgehende ENU-Behandlung wurden bei einer Imatinib-Konzentration von 4 μM in jedem Experiment mitgeführt. Zellwachstum wurde jedoch in keinem Fall beobachtet.

10 bis 14 Tage nach Behandlungsbeginn mit Imatinib bildeten sich die ersten resistenten Zellklone. Wells mit Zellwachstum wurden expandiert. Um sicherzustellen, dass das Wachstum nicht auf den Verlust des BCR-ABL-Gens zurückzuführen war, wurde die GFP-Positivität der Zellklone durchflusszytometrisch gemessen. In der Durchflusszytometrie zeigte sich durchschnittlich eine 98%ige ($\pm 1\%$) GFP-Positivität der imatinibresistenten Zellklone, während in der Kontrollpopulation der Zelllinie 32D der Anteil GFP-positiver Zellen vernachlässigbar klein war (Abb. 14). Diese Ergebnisse implizieren, dass die resistenten Zellklone eine Resistenz gegenüber Imatinib entwickelt haben.

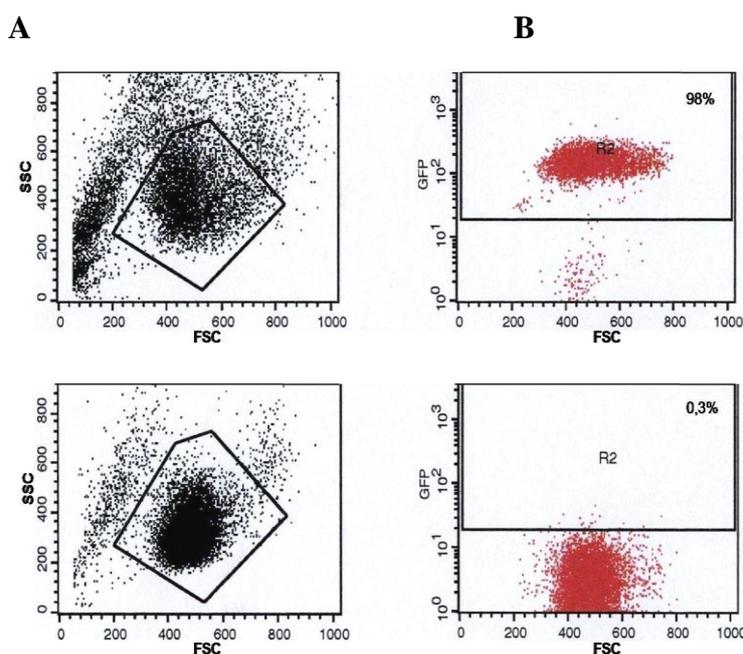


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der GFP-Positivität. Repräsentativer Dot Plot der Zellklone der Zelllinien 32D/BA und 32D/BA-ICSBP (oben) und Dot Plot der Kontrollpopulation der Zelllinie 32D (unten). A) Das FSC ist gegen das SSC aufgetragen. Entsprechend den Eigenschaften des FSC und SSC wurde in R1 streng für lebende Zellen gated. B) Die GFP-Positivität der lebenden Zellen ist gegen das FCS aufgetragen. Das Gate R2 wurde gesetzt, indem nicht transduzierte Zellen ausgeschlossen wurden.

Überraschenderweise zeigten in allen drei Experimenten ENU-mutagenisierte 32D/BA-ICSBP-Zellen mehr imatinibresistente Zellklone als ENU-mutagenisierte 32D/BA-Zellen. In der letztgenannten Zelllinie bildete sich in nur einem Experiment ein Klon pro 96-Well-Platte. In den ENU-mutagenisierten 32D/BA-ICSBP-Zellen bildeten sich im 1. Experiment 9, im 2. und 3. Experiment jeweils 4 Zellklone pro 96-Well-Platte (Abb. 15).

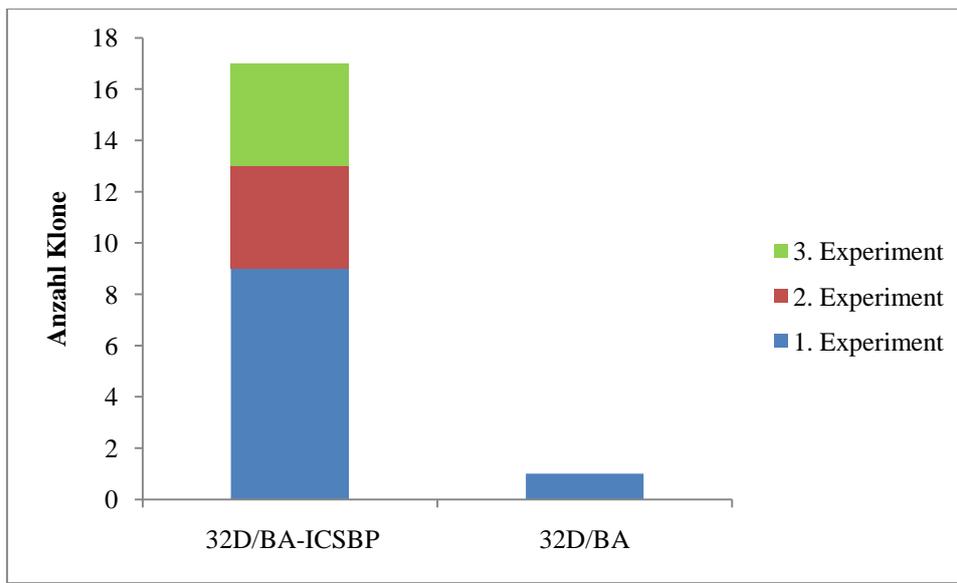


Abbildung 15: Imatinibresistente Zellklone der Zelllinien 32D/BA und 32D/BA-ICSBP im ENU-basierten Mutageneseassay. ENU-behandelte 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen wurden bei einer Imatinib-Konzentration von 4 μM in 96-Well-Platten kultiviert. Wells mit Zellwachstum wurden expandiert. Die Anzahl der Klone der Zelllinie 32D/BA-ICSBP (17) und der Zelllinie 32D/BA (1) wurde in insgesamt 3 Experimenten erhalten.

Die unter Imatinib-Exposition herangewachsenen Zellklone waren resistent gegenüber 4 μM Imatinib, da im Western Blot alle Klone, trotz permanenter Imatinib-Exposition, eine starke CRKL-Phosphorylierung (pCRKL) aufwiesen (Abb. 16). CRKL ist ein wichtiges Substrat von BCR-ABL. Hinweis für die Kinaseaktivität von BCR-ABL ist daher die Phosphorylierung von CRKL (Druker et al., 2001). Da der hier durchgeführte ENU-Mutageneseassay praktisch ausnahmslos zur Imatinib-Resistenz über Induktion von Punktmutationen in der BCR-ABL-Kinase-Domäne führt (Bradeen et al., 2006; von Bubnoff et al., 2006), kann man davon ausgehen, dass die hier vorliegenden resistenten Klone eine Punktmutation in der BCR-ABL-Kinase-Domäne als Ursache der Resistenzentstehung aufweisen.

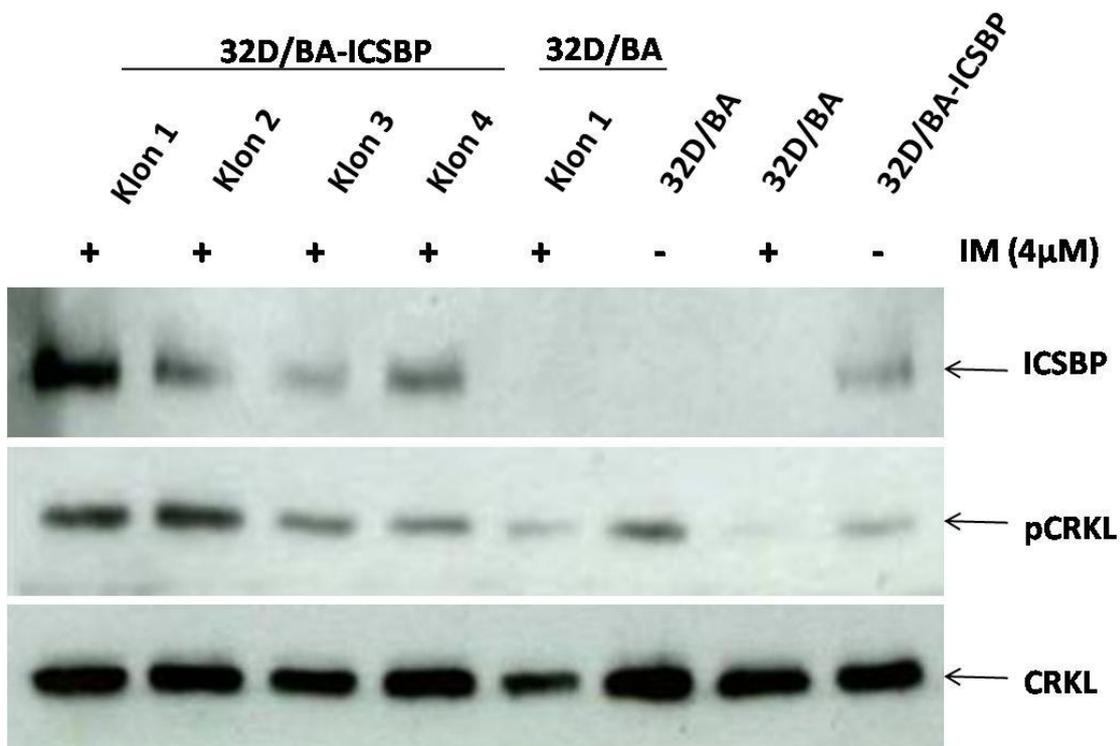


Abbildung 16: p-CRKL-Expression imatinibresistenter Zellklone im ENU-basierten Mutageneseassay. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zelllysate in einer 8%igen SDS-PAGE getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit den angegebenen Antikörpern geblottet. Es wird die p-CRKL- und ICSBP-Expression der imatinibresistenten Zellklone der Zelllinien 32D/BA und 32D/BA-ICSBP und der Kontrollen (32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen) dargestellt. Zur Ladungskontrolle wurde die Membran mit CRKL-Antikörpern geblottet. Die Zelllysate wurden nach 18-stündiger Behandlung mit 4 μM Imatinib (IM +) oder von unbehandelten Zellen (IM -) hergestellt.

4 Diskussion

4.1 Keine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP in der onkogenen Transformation

Die Expression von BCR-ABL in HSCs ruft ein CML-ähnliches Syndrom hervor (Jamieson et al., 2004a; Kelliher et al., 1990), aber kooperierende genetische oder epigenetische Ereignisse sind erforderlich, um den Übergang von der eher indolenten chronischen Phase zur Blastenkrise, einer akuten Leukämie, herbeizuführen (Goldman and Melo, 2003; Jamieson et al., 2004a; Sawyers, 1999). Unser Interesse war es, eine genetische Evidenz für die Kooperation zwischen BCR-ABL und dem Verlust von ICSBP in der onkogenen Transformation der Hämatopoese zu finden.

Die spezifischen verantwortlichen genetischen Läsionen und Signalpfade, die für die Generierung der Blastenkrise verantwortlich sind, sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden (Jamieson et al., 2004b). Eine Reihe genetischer und/oder epigenetischer Veränderungen in Tumorsuppressorgenen wurde in CML-Fällen beschrieben, die eine Progression zur Blastenkrise zeigten: IKZF1, das für den Transkriptionsfaktor Ikaros kodiert und für die normale lymphatische Entwicklung benötigt wird, ist regelmäßig in der Ph-positiven-ALL verloren, nicht aber in der chronischen Phase der CML. Die Deletion von Ikaros wurde dagegen auch als eine erworbene Läsion in der Zeit der Transformation von CML zu ALL (lymphatische Blastenkrise) beobachtet (Mullighan et al., 2008).

In der CML werden in der chronischen Phase üblicherweise keine Mutationen im p53-Gen entdeckt, sind jedoch regelmäßig in der Blastenkrise vorhanden. Honda et al. konnten zeigen, dass der erworbene Verlust von p53 *in vivo* zur blastären Transformation von BCR-ABL-exprimierenden hämatopoetischen Zellen beiträgt (Honda et al., 2000). Hämatopoetische Vorläuferzellen wie CMPs (engl.: *common myeloid progenitor*) und GMPs sind Zellpopulationen, die auf Zelldifferenzierung und Apoptose festgelegt sind. Dennoch können ihnen Onkogene wie z.B. MOZ-TIF2 den Phänotyp leukämischer Stammzellen verleihen, wie in seriellen Replattierungsassays beobachtet wurde, und rufen eine akute monozytische Leukämie (AML) hervor. Leukämie-assoziierte Onkogene variieren jedoch in ihrer Fähigkeit, hämatopoetischen Vorläuferzellen Eigenschaften leukämischer Stammzellen zu verleihen (Huntly et al., 2004). Daraus ergibt sich, dass Replattierungsassays nicht notwendigerweise für alle Onkogene seriell durchführbar sind. BCR-ABL allein hat beispielsweise nicht die

Fähigkeit, hämatopoetischen Vorläuferzellen Eigenschaften leukämischer Stammzellen zu verleihen, so dass diese sich nicht seriell replattieren lassen (Huntly et al., 2004). Welche Transkriptionsfaktoren und Kinasen kooperieren also mit BCR-ABL beim Übergang von der eher indolenten chronischen Phase zur Blastenkrise?

In Patienten mit CML ist die Expression von ICSBP sowohl in lymphatischen als auch in myeloischen Zellen stark vermindert oder gar nicht mehr nachweisbar (Schmidt et al., 1998). Chaturvedi et al. konnten zeigen, dass sich mit BCR-ABL transduzierte mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{-/-}-Mäusen viermal in Methylcellulose replattieren ließen. Dies deutet darauf hin, dass ICSBP an der Verleihung der Selbsterneuerungskapazität der hämatopoetischen Progenitoren und folglich an der Progression der CML beteiligt ist.

Schmitt et al. konnten zudem zeigen, dass p53^{+/-}-Mäuse, die Eμ-myc überexprimieren, im Laufe der Myc-induzierten Lymphomagenese immer ihr verbliebenes p53-Wildtyp-Allel verlieren. Die Inaktivierung der Apoptose stromabwärts von p53 verringerte dagegen den Druck, p53 zu mutieren (Schmitt et al., 2002).

Durch den genetischen Selektionsdruck durch Inaktivierung eines ICSBP-Allels im Replattierungsassay mit ICSBP^{+/-}- p185^{BCR-ABL}-transformierten murinen mononukleären Knochenmarkzellen war ein Verlust der Heterozygotie (LOH; engl.: *loss of heterozygosity*) durch Mutation oder Deletion im verbliebenen ICSBP-Allel denkbar. Im Replattierungsassay verhielten sich allerdings die BCR-ABL-transduzierten ICSBP^{+/-}-Zellen wie ICSBP^{+/+}-Zellen; lediglich ein einmaliges Replattieren der Zellen war möglich. Das macht deutlich, dass der genetische Selektionsdruck im Replattierungsassay durch Inaktivierung eines der beiden ICSBP-Allele nicht ausreicht, um auch das andere Allel durch Mutation oder Deletion zu inaktivieren. Wie zuvor ausgeführt, konnten Honda et al. zeigen, dass in BCR-ABL-transgenen p53^{+/-}-Mäusen LOH des verbliebenen p53-Allels eine blastäre Transformation von BCR-ABL-exprimierenden hämatopoetischen Zellen induziert (Honda et al., 2000). Auch *in vitro* konnte LOH in Zellkulturen aus p210^{BCR-ABL} Arf^{+/-}-B-Vorläuferzellen induziert werden (Williams et al., 2006). Es wurde jedoch noch nie LOH in einem semisoliden Agaroseassay beobachtet. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das Ausbleiben von LOH in dem vorliegenden Replattierungsassay mit heterozygotem Knochenmark in dem Assay selbst begründet ist und dieses Experiment *in vivo* durchgeführt werden muss. Ein Standardvorgehen wäre dabei, Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen mit BCR-ABL zu transduzieren, die Mäuse mit den transduzierten

Zellen zu transplantieren und serielle Retransplantationen durchzuführen, um zu sehen, ob durch diese Transplantationen LOH auftritt.

Die dauerhafte Aktivierung eines Proto-Onkogens im Kontext einer normalen Zelle stellt eine schwerwiegende Dysregulation in der zellulären Homöostase dar. Normale Zellen antworten auf diesen Verlust der Homöostase mit der oben genannten Aktivierung der wichtigsten Tumorsuppressor-Pfade ARF/p53 und INK4a/Rb, die zusammen zelluläre Seneszenz induzieren, die sogenannte „Onkogen induzierte Seneszenz“ (OIS), welche einen wesentlichen Tumorsuppressionsmechanismus darstellt (Nieto et al., 2007). Unsere Ergebnisse zeigen, dass es BCR-ABL allein nicht gelingt, die Zellen zu transformieren. Andererseits werden zwei Wochen nach dem Ausplattieren CFUs beobachtet. Erst nach dem 1. Replattieren geht die Zahl der CFUs zurück. Das deutet darauf hin, dass die Antwort auf das Onkogen BCR-ABL, die OIS, im Replattierungsassay verspätet einsetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass ICSBP als Kooperationspartner von BCR-ABL nicht ausreicht, um den Übergang von der chronischen Phase zur Blastenkrise herbeizuführen. Zur Induktion der Selbsterneuerungskapazität der CML-Zellen ist ein Zusammenspiel von leukämieassoziierten Fusionsgenen und mehreren hämatopoetischen Transkriptionsfaktoren wahrscheinlicher.

4.2 Erhöhte imatinibinduzierte Resistenzbildung von 32D/BA-ICSBP-Zellen gegenüber 32D/BA-Zellen im N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU)-basierten Mutageneseassay

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von ICSBP bei der Resistenzentstehung von BCR-ABL-transformierten Zellen gegenüber Imatinib untersucht. Von ICSBP ist bekannt, dass es die Wirkung von BCR-ABL antagonisiert und Apoptoseresistenz in BCR-ABL-transformierten Zellen aufheben kann. Dies legt eine Funktion von ICSBP als Tumorsuppressor und Regulator von Apoptose nahe (Burchert et al., 2004; Gabriele et al., 1999).

Es stellte sich die Frage, ob ICSBP auch die Therapieresistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren beeinflussen kann. Dazu wurde der vorliegende standardisierte ENU-Mutageneseassay gewählt (Bradeen et al., 2006). ENU ist eine alkylierende Substanz, die Punktmutationen in das Genom der Zellen einbringt (Liu et al., 2003). Erwartet war eine geringere Punktmutationsrate in der 32D/BA-ICSBP-Zelllinie als in der 32D/BA-Zelllinie, da von Burchert et al. bekannt ist, dass Imatinib-Behandlung von 32D/BA-ICSBP-Zellen eine größere Induktion der Apoptose im Vergleich zu 32D/BA-v-Zellen bewirkt (Burchert et al., 2004).

Es konnte jedoch eine erhöhte Resistenzrate der 32D/BA-ICSBP-Zellen im vorliegenden Assay beobachtet werden. Wie ist dieses Ergebnis zu werten? Eine Erklärung könnte sein, dass ICSBP den Zellen eine so starke Apoptose-Empfindlichkeit verleiht, dass nur ein Resistenzmechanismus auftreten kann, der abrupt und sofort in Kraft tritt. Es können keine Genregulationen sein, die über eine längere Expositionsdauer mit Imatinib induziert werden (adaptive Resistenz), z.B. die Aktivierung von PI-3-Kinase/Akt/mTor (Burchert et al., 2005) oder das Überexprimieren von Zytokinen wie GM-CSF (Wang et al., 2007), und zu einer Selektion von Klonen mit relativ schwachen Resistenzmechanismen führen. Denkbar wäre auch, dass ICSBP selber eine Rolle in der Mutationsregulation spielt, d.h. an der Regulation von Mismatch-Repair-Genen beteiligt ist, die für die Reparatur von Genen verantwortlich sind. Dies wäre eine völlig neue Funktion von ICSBP.

In der Tat ist die Expression von ICSBP in reifen B-Zellen am stärksten (Zhou et al., 2009), in denen somatische Hypermutation (SHM) und Klassenwechsel-Rekombination (CSR; engl.: *class-switch recombination*) stattfinden. Hier müssen die Zellen permissiv für Punktmutationen sein und es konnte gezeigt werden, dass ICSBP in reifen B-Zellen MDM2, einen Inhibitor von p53, reguliert. Dies führt dazu, dass die Zellen physiologische DNA-Brüche tolerieren, die normalerweise die Apoptose triggern würden (Zhou et al., 2009). Auf diese Weise soll ICSBP diese Permissivität ausüben. Klinisch wird es von

Bedeutung, weil ICSBP bei CML-Patienten fehlt (Schmidt et al., 1998) und sich auf diese Weise die niedrigere Mutationsfrequenzrate bei CML-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Ph-positiver ALL, die bei Imatinib-Resistenz praktisch immer mutiert ist, erklären lässt (Armstrong and Look, 2005). *Activation-induced cytidine deaminase* (AID), welche in reifen B-Zellen für SHM und CSR verantwortlich ist, wurde als ein BCR-ABL-induzierter Mutator in Ph-positiven ALL-Zellen gefunden. Dies könnte relevant für die besonders ungünstige Prognose dieses Leukämie-Subtypen sein (Feldhahn et al., 2007).

Die genetische Ursache von Mutationsentstehung unter Imatinib-Therapie bleibt weiterhin nur unzureichend verstanden. Klemm et al. konnten jedoch unlängst zeigen, dass AID in Zellen der B-lymphatischen Blastenkrise im Gegensatz zu Zellen der chronischen Phase exprimiert wird und durch Induktion von genetischer Instabilität zu Imatinib-Resistenz und Progression zur lymphatischen Blastenkrise führt (Klemm et al., 2009).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, eine genetische Evidenz für die Kooperation von ICSBP-Defizienz mit BCR-ABL in der onkogenen Transformation zu zeigen. Dies gelang in diesem spezifischen Replattierungsassay nicht. Andererseits wurde eine bisher nicht bekannte neue Funktion von ICSBP als Regulator von Punktmutationen über einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus identifiziert. Welche Möglichkeiten gibt es, die für diesen Mechanismus verantwortlichen Targets von ICSBP aufzudecken? Gegenstand weiterführender Experimente sollte z.B. eine Behandlung von 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen mit DNA-schädigenden Wirkstoffen wie Bestrahlung, Zytostatika oder ENU sein. In einem Gen-Array würden dann die für den jeweiligen DNA-Damage-Mechanismus bekannten Reparaturenzyme untersucht und ihre Expression in 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen verglichen. Zur Verdeutlichung werden in Tabelle 4.1 die Klassifikation von Genreparatur-Mechanismen sowie die an Apoptose, Zellzyklus und DNA-Reparatur beteiligten Gene dargestellt.

Tab. 4.1: Ausgewählte, an der Regulation von Apoptose, Zellzyklus und DNA-Reparatur beteiligte Gene

Funktion		Gen
Apoptose		p53, Arf, Ikaros
Zellzyklus	Zellzyklus-Arrest	Chek1, p21
	Zellzyklus-Checkpoint	Rad1
	Andere Gene in Verbindung mit Zellzyklus	Atm, Rad17
DNA-Reparatur	Bindung geschädigter DNA	Rad1, Rad51, Rad51c
	Basenexzisions-Repair	Parp1, Parp2, Mre11, Mpg
	Nukleotidexzisions-Repair	Rad23a
	Doppelstrangbruch-Repair	Rad52
	Mismatch-Repair	Mlh1, Mlh3, Pms1, Pms2
	Andere Gene in Verbindung mit DNA-Reparatur	Lig1

5 Zusammenfassung

Die ursächliche Mutation in der CML ist die reziproke chromosomale Translokation t(9;22)(q34;q11), die für das Fusionsprotein BCR-ABL, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, kodiert. Die CML ist durch drei Krankheitsphasen gekennzeichnet, dazu gehören die chronische Phase, die Akzelerationsphase und die Blastenkrise. Die eher indolente chronische Phase akzeleriert nach etwa 3-5 Jahren zur Blastenkrise, einer akuten Leukämie. Welche Faktoren mit BCR-ABL kooperieren und die Progression von der chronischen Phase zur Blastenkrise herbeiführen, ist bisher nur unzureichend verstanden. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Gruppe der Interferon regulatorischen Faktoren (IRFs), darunter insbesondere ICSBP und IRF-4, in der Pathogenese der CML eine wichtige Rolle spielt. In peripherem Blut von Patienten mit CML in der chronischen Phase ist die ICSBP-Expression im Vergleich zu Normalblut signifikant vermindert. Eine Therapie mit $\text{INF-}\alpha$ vermag die ICSBP-Expression der Patienten wieder anzuheben und zwischen gutem Ansprechen und hoher ICSBP-Expression besteht eine positive Korrelation (Schmidt et al., 1998). Diese Daten deuten auf eine antileukämische Wirkungsweise von ICSBP bei Erkrankungen des myeloischen Systems hin.

In dieser Arbeit wurde versucht, mithilfe eines Replattierungsassays in Methylcellulose eine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit dem Verlust von ICSBP in der onkogenen Transformation der Hämatopoese zu finden. Grundlage dieses Experimentes war die Beobachtung, dass sich BCR-ABL-transduzierte mononukleäre Knochenmarkzellen von ICSBP^{-/-}-Mäusen deutlich häufiger replattieren ließen als entsprechende Zellen von ICSBP^{+/+}-Mäusen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Replattierungsverhalten von BCR-ABL-transduzierten mononukleären Knochenmarkzellen von ICSBP^{+/+}- und ICSBP^{+/-}-Mäusen untersucht. Für die Analyse des genomischen ICSBP-Status dieser Zellen wurde zu Beginn eine PCR standardisiert. Beide Zelltypen unterschieden sich jedoch nicht wesentlich in ihrem Replattierungsverhalten mit der Unfähigkeit, über die erste Replattierung hinaus CFUs zu bilden. Die Ergebnisse deuten an, dass der genetische Selektionsdruck durch Inaktivierung eines der beiden ICSBP-Allele während des Replattierungsassays nicht ausreicht, um einen Verlust der Heterozygotie herbeizuführen. Eine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit dem Verlust von ICSBP in der onkogenen Transformation konnte daher nicht gefunden werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Beitrag von ICSBP zur Resistenzentstehung unter kontinuierlicher Anwesenheit von Imatinib untersucht. Ausgangspunkt dieses Experimentes war die Entdeckung, dass ICSBP die imatinibinduzierte Apoptoserate erhöht (Burchert et al., 2004). Diese Daten weisen auf eine Funktion von ICSBP als Tumorsuppressor und Regulator von Apoptose hin. In einem ENU-basierten Mutageneseassay wurde die Resistenzfrequenz von 32D/BA- und 32D/BA-ICSBP-Zellen miteinander verglichen und es konnte überraschend gezeigt werden, dass ICSBP die Mutationsfrequenz zu erhöhen scheint. ENU erzeugt Punktmutationen in multiplen Genen, so dass die Genese der Resistenz multifaktoriell bedingt sein kann. Im Western Blot zeigte sich jedoch in den resistenten Zellklonen unter Imatinib-Behandlung eine aktive Tyrosinkinase. Dies lässt vermuten, dass Punktmutationen im Bereich der Kinase-Domäne von BCR-ABL für die Resistenz verantwortlich sind. Ob die Vorbehandlung der Zellen mit ENU Einfluss auf die erhöhte Resistenzbildung von 32D/BA-ICSBP-Zellen hat und über welchen Mechanismus ICSBP zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Imatinib führt, wird Teil weiterer Studien sein.

Zusammenfassend lassen die erhobenen Daten folgende Schlussfolgerungen zu: Erstens konnte keine genetische Evidenz für die Kooperation von BCR-ABL mit ICSBP in der onkogenen Transformation gezeigt werden und zweitens fördert ICSBP die Resistenzentstehung BCR-ABL-transformierter 32D-Zellen gegenüber Imatinib.

6 Summary

The reciprocal gene translocation $t(9;22)(q34;q11)$ creates the Philadelphia chromosome (Ph^+) carrying the BCR-ABL fusion gene. It is the causative genetic aberration of chronic myelogenous leukaemia (CML) and encodes a constitutively active protein tyrosine kinase.

CML is characterized by three clinical stages including the chronic phase, the accelerated phase and the blast crisis. After a median of 3-4 years rather indolent chronic phase accelerates to blast crisis, an acute leukaemia. Although the underlying mechanisms are not fully understood, the appearance of additional genetic and/or epigenetic abnormalities in the blast phase strongly suggests that superimposed genetic alterations account for disease progression. There is mounting evidence that the family of interferon regulatory factors (IRFs), among them particularly IRF-8 (ICSBP) and IRF-4, is involved in the pathogenesis of CML. In the peripheral blood of CML patients in chronic phase the ICSBP-mRNA expression is very low or absent compared with blood from healthy donors. INF- α therapy leads to an increase of ICSBP transcripts in the treated patients. Furthermore there is a correlation between good response to INF- α and high ICSBP levels. These data suggest a role for ICSBP as a tumour suppressor and regulator of apoptosis in diseases of the myeloid system.

In an attempt to address whether there is genetic evidence for the cooperation between BCR-ABL and the loss of ICSBP in the oncogenic transformation of haematopoiesis we performed a replating assay. This experiment was based on the observation that BCR-ABL-transduced mononuclear bone marrow cells from ICSBP^{-/-} mice could be replated more often than the corresponding cells from ICSBP^{+/+} mice. Flow-sorted mononuclear bone marrow cells from ICSBP^{+/+} and ICSBP^{+/-} mice were transduced with BCR-ABL. We then looked for their replating capacities in methylcellulose culture. The replating pattern did not differ significantly. Both cells from ICSBP^{+/+} and from ICSBP^{+/-} mice did not form any CFUs beyond the first round of replating. These results indicate that the genetic selection pressure in the course of the replating assay is not sufficient to lead to LOH. Thus, genetic evidence for the cooperation between BCR-ABL and loss of ICSBP in transformation could not be found.

In the second part of the thesis we investigated whether ICSBP has an impact on resistance to imatinib based on the observation that 32D/BA ICSBP cells are significantly more sensitive to apoptosis in the presence of imatinib than 32D/BA cells. These data suggest a role for ICSBP as a tumour suppressor and regulator of apoptosis.

In an ENU-based mutagenesis assay we compared the resistance pattern of 32D/BA and 32D/BA-ICSBP cells and found that ICSBP seems to increase the rate of resistance. Because ENU causes point mutations in multiple proteins, we hypothesized that in our assay, resistance to imatinib may be multifactorial. However in western blot it became obvious that the resistant clones had an active tyrosine kinase suggesting that point mutations in the kinase domain of BCR-ABL may be responsible for resistance to imatinib. Whether treatment with ENU has an impact on the increased resistance in 32D/BA-ICSBP cells and by which mechanisms ICSBP leads to increased resistance to imatinib will be part of further investigation.

Taken together, genetic evidence for the cooperation between BCR-ABL and ICSBP in the oncogenic transformation could not be found, and ICSBP increases the resistance rate in BCR-ABL-transduced 32D cells in the presence of imatinib.

7 Literaturverzeichnis

Angstreich, G. R., Matsui, W., Huff, C. A., Vala, M. S., Barber, J., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Smith, B. D., and Jones, R. J. (2005). Effects of imatinib and interferon on primitive chronic myeloid leukaemia progenitors. *Br J Haematol* 130, 373-381.

Armstrong, S. A., and Look, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 6306-6315.

Baccarani M. Hematology-the European Hematology Association Education Program 2006; 2:(1).

Baikie, A. G., Court-Brown, W. M., Buckton, K. E., Harnden, D. G., Jacobs, P. A., and Tough, I. M. (1960). A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia. *Nature* 188, 1165-1166.

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 26729-26734.

Bradeen, H. A., Eide, C. A., O'Hare, T., Johnson, K. J., Willis, S. G., Lee, F. Y., Druker, B. J., and Deininger, M. W. (2006). Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* 108, 2332-2338.

Brass, A. L., Zhu, A. Q., and Singh, H. (1999). Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: inhibiting function in vivo using fused dimers. *Embo J* 18, 977-991.

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

Burchert, A., Cai, D., Hofbauer, L. C., Samuelsson, M. K., Slater, E. P., Duyster, J., Ritter, M., Hochhaus, A., Muller, R., Eilers, M., *et al.* (2004). Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP; IRF-8) antagonizes BCR/ABL and down-regulates bcl-2. *Blood* 103, 3480-3489.

Burchert, A., Schmidt, K., Neubauer, A., and Chaturvedi, A. (2009). Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) deficiency in CML confers BCR/ABL independent imatinib, nilotinib and dasatinib resistance, but restricts kinase mutation development. *Onkologie*; 32(supp 4):172.

Burchert, A., Wang, Y., Cai, D., von Bubnoff, N., Paschka, P., Muller-Brusselbach, S., Ottmann, O. G., Duyster, J., Hochhaus, A., and Neubauer, A. (2005). Compensatory

PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* *19*, 1774-1782.

Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B., and Clarkson, B. (1997). p62(dok): a constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Cell* *88*, 197-204.

Chaturvedi, A., Schmidt, K., Neubauer, A., and Burchert, A. (2009). ICSBP deficiency in CML confers direct BCR/ABL-independent imatinib resistance but restricts BCR/ABL kinase point mutation development. *Haematologica*; *94*[suppl.2]:422 abs. 1051.

Chow, W. A., Fang, J. J., and Yee, J. K. (2000). The IFN regulatory factor family participates in regulation of Fas ligand gene expression in T cells. *J Immunol* *164*, 3512-3518

Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., and Sanchez-Garcia, I. (2000). A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *95*, 1007-1013.

Cohen, G. B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* *80*, 237-248.

Corbin, A. S., La Rosee, P., Stoffregen, E. P., Druker, B. J., and Deininger, M. W. (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* *101*, 4611-4614.

Dai, Y., Rahmani, M., Pei, X. Y., Dent, P., and Grant, S. (2004). Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood* *104*, 509-518.

Decker, T., Kovarik, P., and Meinke, A. (1997). GAS elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J Interferon Cytokine Res* *17*, 121-134.

Deininger, M., Buchdunger, E., and Druker, B. J. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* *105*, 2640-2653.

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

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. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* *344*, 1031-1037.

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

Eklund, E. A., Jalava, A., and Kakar, R. (1998). PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence-binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression. *J Biol Chem* 273, 13957-13965.

Evan, G. I., Brown, L., Whyte, M., and Harrington, E. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 7, 825-834.

Feldhahn, N., Henke, N., Melchior, K., Duy, C., Soh, B. N., Klein, F., von Levetzow, G., Giebel, B., Li, A., Hofmann, W. K., *et al.* (2007). Activation-induced cytidine deaminase acts as a mutator in BCR-ABL1-transformed acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med* 204, 1157-1166.

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

Fujii, Y., Shimizu, T., Kusumoto, M., Kyogoku, Y., Taniguchi, T., and Hakoshima, T. (1999). Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *Embo J* 18, 5028-5041.

Gabriele, L., Phung, J., Fukumoto, J., Segal, D., Wang, I. M., Giannakakou, P., Giese, N. A., Ozato, K., and Morse, H. C., 3rd (1999). Regulation of apoptosis in myeloid cells by interferon consensus sequence-binding protein. *J Exp Med* 190, 411-421.

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

Gorre, M. E., Ellwood-Yen, K., Chiosis, G., Rosen, N., and Sawyers, C. L. (2002). BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* 100, 3041-3044.

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

Grigg, A., and Hughes, T. (2006). Role of allogeneic stem cell transplantation for adult chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 795-807.

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

Hao, S. X., and Ren, R. (2000). Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous

leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol Cell Biol* 20, 1149-1161.

Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1989). Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58, 729-739.

Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., Queisser, W., Loffler, H., Hochhaus, A., Heinze, B., and et al. (1994). Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84, 4064-4077.

Hernandez, S. E., Settleman, J., and Koleske, A. J. (2004). Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol* 14, 691-696.

Hobart, M., Ramassar, V., Goes, N., Urmson, J., and Halloran, P. F. (1997). IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo. *J Immunol* 158, 4260-4269.

Hochhaus, A., Berger, U., and Hehlmann, R. (2004). [Therapy of chronic myelogenous leukemia in 2004]. *Dtsch Med Wochenschr* 129, 2122-2127.

Hochhaus, A., Kreil, S., Corbin, A. S., La Rosee, P., Muller, M. C., Lahaye, T., Hanfstein, B., Schoch, C., Cross, N. C., Berger, U., et al. (2002). Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16, 2190-2196.

Holtschke, T., Lohler, J., Kanno, Y., Fehr, T., Giese, N., Rosenbauer, F., Lou, J., Knobloch, K. P., Gabriele, L., Waring, J. F., et al. (1996). Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 87, 307-317.

Honda, H., Ushijima, T., Wakazono, K., Oda, H., Tanaka, Y., Aizawa, S., Ishikawa, T., Yazaki, Y., and Hirai, H. (2000). Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* 95, 1144-1150.

Hu, Y., Liu, Y., Pelletier, S., Buchdunger, E., Warmuth, M., Fabbro, D., Hallek, M., Van Etten, R. A., and Li, S. (2004). Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 36, 453-461.

Huntly, B. J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B. H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I. R., et al. (2004). MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6, 587-596.

- Huret, J. L. (1990). Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukaemia. *Hum Genet* 85, 565-568.
- Jabbour, E., Cortes, J. E., Giles, F. J., O'Brien, S., and Kantarjian, H. M. (2007). Current and emerging treatment options in chronic myeloid leukemia. *Cancer* 109, 2171-2181.
- Jamieson, C. H., Ailles, L. E., Dylla, S. J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J. L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M. G., Keating, A., *et al.* (2004a). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351, 657-667.
- Jamieson, C. H., Weissman, I. L., and Passegue, E. (2004b). Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell* 6, 531-533.
- Kantarjian, H., Giles, F., Wunderle, L., Bhalla, K., O'Brien, S., Wassmann, B., Tanaka, C., Manley, P., Rae, P., Mietlowski, W., *et al.* (2006). Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 354, 2542-2551.
- Kelliher, M. A., McLaughlin, J., Witte, O. N., and Rosenberg, N. (1990). Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6649-6653.
- Kim, Y. M., Kang, H. S., Paik, S. G., Pyun, K. H., Anderson, K. L., Torbett, B. E., and Choi, I. (1999). Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J Immunol* 163, 2000-2007.
- Klemm, L., Duy, C., Iacobucci, I., Kuchen, S., von Levetzow, G., Feldhahn, N., Henke, N., Li, Z., Hoffmann, T. K., Kim, Y. M., *et al.* (2009). The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 16, 232-245.
- 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.
- Levitzki, A., and Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788.
- Liu, S. X., Cao, J., An, H., Shun, H. M., Yang, L. J., and Liu, Y. (2003). Analysis of spontaneous, gamma ray- and ethylnitrosourea-induced hprt mutants in HL-60 cells with multiplex PCR. *World J Gastroenterol* 9, 578-583.
- Lohoff, M., and Mak, T. W. (2005). Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 5, 125-135.
- Mahon, F. X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101, 2368-2373.

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

Mehlman, M. A. (2006). Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industries. Part XXX: Causal relationship between chronic myelogenous leukemia and benzene-containing solvents. *Ann N Y Acad Sci* 1076, 110-119.

Melo, J. V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 88, 2375-2384.

Melo, J. V., and Chuah, C. (2008). Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 427-435.

Meraro, D., Hashmueli, S., Koren, B., Azriel, A., Oumard, A., Kirchhoff, S., Hauser, H., Nagulapalli, S., Atchison, M. L., and Levi, B. Z. (1999). Protein-protein and DNA-protein interactions affect the activity of lymphoid-specific IFN regulatory factors. *J Immunol* 163, 6468-6478.

Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C. H., *et al.* (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-114.

Nelson, N., Kanno, Y., Hong, C., Contursi, C., Fujita, T., Fowlkes, B. J., O'Connell, E., Hu-Li, J., Paul, W. E., Jankovic, D., *et al.* (1996). Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation. *J Immunol* 156, 3711-3720.

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, 1229-1242.

Nieto, M., Barradas, M., Criado, L. M., Flores, J. M., Serrano, M., and Llano, E. (2007). Normal cellular senescence and cancer susceptibility in mice genetically deficient in Ras-induced senescence-1 (Ris1). *Oncogene* 26, 1673-1680.

Nowell, P. C., and Hungerford, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85-109.

Nozawa, H., Oda, E., Nakao, K., Ishihara, M., Ueda, S., Yokochi, T., Ogasawara, K., Nakatsuru, Y., Shimizu, S., Ohira, Y., *et al.* (1999). Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygoty for p53. *Genes Dev* 13, 1240-1245.

O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., *et al.* (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348, 994-1004.

Ortmann, C. A., Burchert, A., Holzle, K., Nitsche, A., Wittig, B., Neubauer, A., and Schmidt, M. (2005). Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region. *Nucleic Acids Res* 33, 6895-6905.

Palombella, V. J., and Maniatis, T. (1992). Inducible processing of interferon regulatory factor-2. *Mol Cell Biol* 12, 3325-3336.

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 et al. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.

Peng, B., Hayes, M., Resta, D., Racine-Poon, A., Druker, B. J., Talpaz, M., Sawyers, C. L., Rosamilia, M., Ford, J., Lloyd, P., and Capdeville, R. (2004). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* 22, 935-942.

Ptasznik, A., Nakata, Y., Kalota, A., Emerson, S. G., and Gewirtz, A. M. (2004). Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 10, 1187-1189.

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

Puttini, M., Coluccia, A. M., Boschelli, F., Cleris, L., Marchesi, E., Donella-Deana, A., Ahmed, S., Redaelli, S., Piazza, R., Magistroni, V., et al. (2006). In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res* 66, 11314-11322.

Quintas-Cardama, A., and Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619-1630.

Quintas-Cardama, A., and Cortes, J. E. (2006). Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 81, 973-988.

Radujkovic, A., Schad, M., Topaly, J., Veldwijk, M. R., Laufs, S., Schultheis, B. S., Jauch, A., Melo, J. V., Fruehauf, S., and Zeller, W. J. (2005). Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia* 19, 1198-1206.

Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 5, 172-183.

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

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

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

Saussele, S., Lausecker, M., Gratwohl, A., Heim, D., Beelen, D.W., Döhner, H., Schwerdtfeger, R., Ho, A.D., Kolb, H.-J., Pffirmann, M., Müller, M., Leitner, A., Proetel, U., Kovalevskaya, E., Haferlach, C., Schlegelberger, B., Hasford, J., Hochhaus, A., and Hehlmann, R.. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in the Imatinib-Era: High Survival Rate Following Allogeneic HSCT after Imatinib Failure: Results of the German CML Study IV. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2008.

Savona, M., and Talpaz, M. (2008). Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 8, 341-350.

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

Scharton-Kersten, T., Contursi, C., Masumi, A., Sher, A., and Ozato, K. (1997). Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction. *J Exp Med* 186, 1523-1534.

Schiffer, C. A. (2007). BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 357, 258-265.

Schmidt, M., Nagel, S., Proba, J., Thiede, C., Ritter, M., Waring, J. F., Rosenbauer, F., Huhn, D., Wittig, B., Horak, I., and Neubauer, A. (1998). Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood* 91, 22-29.

Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R. M., and Lowe, S. W. (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1, 289-298.

Senechal, K., Halpern, J., and Sawyers, C. L. (1996). The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J Biol Chem* 271, 23255-23261.

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

Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., and Sawyers, C. L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305, 399-401.

- Sharf, R., Azriel, A., Lejbkowitz, F., Winograd, S. S., Ehrlich, R., and Levi, B. Z. (1995). Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. *J Biol Chem* *270*, 13063-13069.
- Sharf, R., Meraro, D., Azriel, A., Thornton, A. M., Ozato, K., Petricoin, E. F., Larner, A. C., Schaper, F., Hauser, H., and Levi, B. Z. (1997). Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J Biol Chem* *272*, 9785-9792.
- Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R., Trujillo, J. M., and Gutterman, J. U. (1991). Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann Intern Med* *114*, 532-538.
- Talpaz, M., Shah, N. P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., *et al.* (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* *354*, 2531-2541.
- Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., and Ozato, K. (2000). ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* *13*, 155-165.
- Tanaka, K., Takechi, M., Hong, J., Shigeta, C., Oguma, N., Kamada, N., Takimoto, Y., Kuramoto, A., Dohy, H., and Kyo, T. (1989). 9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo)* *30*, 352-358.
- Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., and Taniguchi, T. (1996). Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* *382*, 816-818.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N. (2001). IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* *19*, 623-655.
- Tsujimura, H., Tamura, T., and Ozato, K. (2003). Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* *170*, 1131-1135.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* *100*, 2292-2302.
- von Bubnoff, N., Manley, P. W., Mestan, J., Sanger, J., Peschel, C., and Duyster, J. (2006). Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood* *108*, 1328-1333.
- Wang, Y., Cai, D., Brendel, C., Barrett, C., Erben, P., Manley, P. W., Hochhaus, A., Neubauer, A., and Burchert, A. (2007). Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. *Blood* *109*, 2147-2155.

Weisberg, E., Manley, P. W., Breitenstein, W., Bruggen, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, A., Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., *et al.* (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7, 129-141.

Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A., and Griffin, J. D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7, 345-356.

Williams, R. T., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2006). Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6688-6693.

Zhang, S. Q., Yang, W., Kontaridis, M. I., Bivona, T. G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J. A., Schraven, B. L., Philips, M. R., and Neel, B. G. (2004). Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* 13, 341-355.

Zhou, J. X., Lee, C. H., Qi, C. F., Wang, H., Naghashfar, Z., Abbasi, S., and Morse, H. C., 3rd (2009). IFN regulatory factor 8 regulates MDM2 in germinal center B cells. *J Immunol* 183, 3188-3194.

8 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Bauer, Baum, Becker, Bien, Burchert, Daut, Donner-Banzhof, Eilers, Fuchs-Winkelmann, Geks, Görg, Gress, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Hertl, Höglinger, Hofmann, Holland, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kill, Klose, Kohlmann, Kühnert, Lang, Lemke, Lill, Liss, Lohoff, Maisch, Mittag, Moll, Möller, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Röhm, Rothmund, Röper, Rosenow, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seitz, Sommer, Steininger, Tackenberg, Vogelmeier, Weihe, Westermann, Wulf

in Tromsø (Norwegen):

Bekkelund, Dahl, Høyfødte, Lager, Laukli, Maltau, Mellgren, Småbakke

in Biel/Bienne (Schweiz):

Brantschen, Würsten

9 Danksagung

Herrn PD Dr. Andreas Burchert danke ich für die Vergabe des Themas und seine gute Betreuung. Er war zu jedem Zeitpunkt ein wertvoller Diskussions- und Ansprechpartner.

Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer danke ich für die Schaffung der Rahmenbedingungen innerhalb seiner Klinik, die mir die Durchführung der experimentellen Versuche ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Anuhar Chaturvedi und Frau Ashu Kumari für zahlreiche Hilfestellungen im Labor sowie die vielen interessanten Diskussionen. Von ihnen habe ich die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens gelernt. Ich danke ihnen ganz herzlich für ihre moralische Unterstützung, für viele offene Gespräche sowie für so manche lustige Stunde im Labor.

Frau Sonja Tajstra danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima im Labor.

Herrn Thorsten Volkmann danke ich für seine Verlässlichkeit und seine Geduld im Umgang mit dem oft widerspenstigen Sorter.

Meinen Eltern danke ich für Ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums. Ohne sie wäre mir Vieles nicht möglich gewesen.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Rolle von ICSBP in der Genetik BCR-ABL-induzierter
Transformation und bei der Resistenzentstehung BCR-ABL-
transformierter Zellen gegenüber Imatinib**

in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter der Leitung von PD Dr. Andreas Burchert mit Unterstützung durch Herrn Dr. Anuhar Chaturvedi und Herrn Thorsten Volkmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Burchert, A., Schmidt, K., Neubauer, A., Chaturvedi, A. (2009). Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) deficiency in CML confers BCR/ABL-independent imatinib, nilotinib and dasatinib resistance, but restricts kinase mutation development. *Onkologie*; 32(supp 4):172.

Chaturvedi, A., Schmidt, K., Neubauer, A., Burchert, A. (2009). ICSBP deficiency in CML confers direct BCR/ABL-independent imatinib resistance but restricts BCR/ABL kinase point mutation development. *Haematologica*; 94[suppl.2]:422 abs. 1051.