

Molekulare Wirkmechanismen von Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela C. Brännert

aus München

Düsseldorf, Februar 2010

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. R. Haas

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2010

Nihil tam difficile est, quin quaerendo investigari possiet.

Publius Terentius Afer (163 v. Chr.)

Für meine Eltern.

Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

Early in vivo changes of the transcriptome in Philadelphia chromosome-positive CD34+ cells from patients with chronic myelogenous leukemia following imatinib therapy.
Bruennert D, Czibere A, Bruns I, Kronenwett R, Gattermann N, Haas R, Neumann F.
Leukemia. 2009 May;23(5):983-5

Molekular zielgerichtete Therapie der chronisch myeloischen Leukämie.

Neumann F, **Bruennert D**, Gattermann N, Fenk R. Onkologische Chemie 2009/2010, Band 1, S. 77-84

Die Daten wurden auf mehreren nationalen und internationalen Kongressen in Form von Vorträgen und Postern präsentiert.

Im Rahmen der 184. Jahrestagung der Rheinisch-Westfälischen Gesellschaft für Innere Medizin (RWGIM) wurde ein Posterpreis gewonnen.

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1. <i>Die Hämatopoetische Stammzelle</i>	<i>1</i>
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Physiologische Blutbildung im Knochenmark	1
1.2. <i>Chronische myeloische Leukämie</i>	<i>4</i>
1.2.1. Definition und Epidemiologie	4
1.2.2. Historischer Überblick	4
1.2.3. Charakterisierung der Phasen und klinische Merkmale	5
1.2.4. Molekularbiologie	6
1.2.5. Diagnostik	8
1.2.6. Geschichte der Therapie der CML.....	9
1.3. <i>Tyrosinkinase-Inhibitoren</i>	<i>10</i>
1.3.1. Wirkmechanismus des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib.....	10
1.3.2. Wirkmechanismus von Nilotinib	11
1.4. <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	<i>13</i>
<i>2. Material und Methoden</i>	<i>15</i>
2.1. <i>Geräte</i>	<i>15</i>
2.2. <i>Software</i>	<i>15</i>
2.2.1. Programme	15
2.2.2. <i>Datenbanken</i>	<i>16</i>
2.3. <i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>16</i>
2.4. <i>Chemikalien</i>	<i>17</i>
2.5. <i>Antikörper</i>	<i>18</i>
2.6. <i>Molekularbiologische Kits</i>	<i>19</i>
2.7. <i>Oligonukleotide</i>	<i>19</i>
2.8. <i>Patientencharakteristika und Ansprechen auf Imatinib</i>	<i>20</i>
2.9. <i>Die K562 Zelllinie als Modell für die chronische myeloische Leukämie</i>	<i>20</i>
2.10. <i>Isolierung von CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut</i>	<i>21</i>
2.11. <i>Reinheitsbestimmung der CD34+ selektionierten Zellen</i>	<i>22</i>
2.12. <i>Bestimmung der Zellzahl und Vitalität</i>	<i>24</i>
2.13. <i>Fluoreszenz In Situ Hybridisierung</i>	<i>25</i>
2.13.1. Allgemeines	25
2.13.2. Herstellung der Präparate	26
2.13.3. Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung	28
2.14. <i>Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus CD34+ Zellen und K562 Zellen</i>	<i>28</i>
2.15. <i>Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäurelösungen</i>	<i>29</i>
2.16. <i>RNA-Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bioanalyzers Agilent 2100</i>	<i>29</i>
2.17. <i>Genexpressionsanalysen mit Affymetrix Genchips</i>	<i>30</i>
2.17.1. Theoretischer Hintergrund	30
2.17.2. aDNA-Synthese und <i>in vitro</i> Transkription von isolierter Total-RNA	32
2.17.3. Fragmentierung der aRNA	32

Inhaltsverzeichnis

2.17.4.	Hybridisierung der fragmentierten cRNA auf Affymetrix Microarrays.....	33
2.17.5.	Scannen der hybridisierten Arrays und Datenanalyse.....	34
2.18.	<i>Statistische Analysen und Ermittlung von differenziell hoch- oder herunterregulierten Genen.....</i>	35
2.18.1.	Analyse der Genexpressionsdaten von CML-Patienten vor und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie.....	35
2.18.2.	Analyse der Genexpressionsdaten der K562 Zelllinie	35
2.19.	<i>Verifizierung ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen „real-time“ PCR.....</i>	36
2.19.1.	Reverse Transkription	36
2.19.2.	Primer Design	37
2.19.3.	Quantitative „real time“ PCR	37
2.19.4.	Berechnung der Signifikanz	38
2.19.5.	DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.20.	<i>Untersuchung zur Proliferation</i>	39
2.21.	<i>Apoptose-Assay.....</i>	40
2.21.1.	Sandwich-ELISA	40
2.21.2.	Annexin-5-Assay	41
2.22.	<i>Zellzyklus-Analysen</i>	42
2.23.	<i>Western Blot Analysen.....</i>	44
2.23.1.	Herstellung von Zelllysaten für die Proteinanalyse	44
2.23.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
2.23.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.23.4.	Western Blot.....	46
2.23.5.	Immundetektion zum Nachweis von Proteinen.....	46
3.	<i>Ergebnisse.....</i>	48
3.1.	<i>Fluoreszenz in Situ Hybridisierung.....</i>	48
3.1.1.	Untersuchung der CD34+ Zellen von Patienten vor und nach 7 Tagen Therapie	48
3.2.	<i>Genexpressionsdaten</i>	49
3.2.1.	<i>Genexpressionsdaten der CML-Patienten.....</i>	49
3.2.1.1.	<i>BCR-ABL Signaling</i>	51
3.2.1.2.	<i>Zellzyklus und Proliferation.....</i>	51
3.2.1.3.	<i>DNA Replikation und DNA Reparatur.....</i>	51
3.2.1.4.	<i>Zelladhäsion und –motilität</i>	52
3.2.1.5.	<i>Apoptose.....</i>	52
3.2.2.	<i>Vergleich Imatinib-, Nilotinib- und DMSO-behandelter K562 Zellen.....</i>	55
3.2.2.1.	<i>BCR-ABL Signaling</i>	59
3.2.2.2.	<i>Proliferation und Zellzyklus.....</i>	59
3.2.2.3.	<i>Apoptose.....</i>	59
3.2.2.4.	<i>Krankheitsprogress und Imatinibresistenz-assoziierte Gene</i>	59
3.2.2.5.	<i>DNA Replikation und DNA Reparatur.....</i>	60
3.2.2.6.	<i>Adhäsion</i>	60
3.3.	<i>Bestätigung ausgewählter Gene durch quantitative real-time PCR</i>	63
3.3.1.	<i>Quantitative real-time PCR der CD34+ Zellen von CML-Patienten.....</i>	63
3.3.2.	<i>Quantitative real-time PCR für die K562 Zelllinie</i>	64
3.4.	<i>Funktionelle Analysen.....</i>	67
3.4.1.	<i>Untersuchungen zur Proliferation der K562 Zellen</i>	67
3.4.2.	<i>Untersuchungen zur Apoptose der K562 Zellen</i>	68
3.4.3.	<i>Zellzyklusanalyse der K562 Zellen.....</i>	69
3.5.	<i>Proteinexpression.....</i>	72
3.5.1.	<i>Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von STAT5.....</i>	72
3.5.2.	<i>Proteinexpression von CDC25C und Phosphorylierungsstatus</i>	72
3.5.3.	<i>Proteinexpression der Protoonkogene PIM-1 und PIM-2.....</i>	73

Inhaltsverzeichnis

4.	<i>Diskussion.....</i>	<i>74</i>
4.1.	<i>FISH-Analyse und Patientencharakteristika.....</i>	<i>76</i>
4.2.	<i>Genexpressionsanalysen.....</i>	<i>77</i>
4.2.1.	<i>Genexpressionsanalysen der CML-Patienten.....</i>	<i>77</i>
4.2.1.1.	<i>Im BCR-ABL Signaling wird wenig verändert.....</i>	<i>77</i>
4.2.1.2.	<i>Zellzyklus und Proliferation werden durch Imatinib gebremst.....</i>	<i>78</i>
4.2.1.3.	<i>DNA Replikation und Reparatur werden in Imatinib-behandelten Zellen vermindert.....</i>	<i>79</i>
4.2.1.4.	<i>Imatinib führt zu erhöhter Zelladhäsion und verringerter Motilität.....</i>	<i>81</i>
4.2.1.5.	<i>Imatinib hat wenig apoptotische Wirkung.....</i>	<i>81</i>
4.2.2.	<i>Analyse der Genexpressionsdaten und ihre funktionelle Bedeutung bei der K562 Zelllinie</i>	<i>82</i>
4.2.2.1.	<i>Das BCR-ABL Signaling ist gegensätzlich zur unbehandelten CML reguliert.....</i>	<i>84</i>
4.2.2.2.	<i>Proliferation und Zellzyklus werden durch Imatinib und Nilotinib gebremst.....</i>	<i>86</i>
4.2.2.3.	<i>Geringe apoptotische Effekte auf die Zellen nach 24-stündiger Inkubation der TKIs.....</i>	<i>88</i>
4.2.2.4.	<i>Beide TKIs wirken Krankheitsprogress entgegen.....</i>	<i>91</i>
4.2.2.5.	<i>Es tritt weniger DNA Reparatur und Replikation auf.....</i>	<i>92</i>
4.2.2.6.	<i>Imatinib und Nilotinib erzeugen ein heterogenes Bild bei der Zelladhäsion.....</i>	<i>93</i>
4.3.	<i>Schlussfolgerung.....</i>	<i>95</i>
4.4.	<i>Ausblick.....</i>	<i>96</i>
5.	<i>Zusammenfassung.....</i>	<i>98</i>
5.1.	<i>Summary.....</i>	<i>99</i>
6.	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>101</i>
	<i>Danksagung.....</i>	<i>116</i>
	<i>Eidesstattliche Versicherung.....</i>	<i>117</i>

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Amino-Actinomycin D
abl	abelson Gen
ABTS	2,2'-azino-di-[3-athylbenzthiazolin sulfonal]
ad	<i>addendum</i> (Zugabe)
AK	Antikörper
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
ARG	<i>abl related gene</i>
aRNA	<i>antisense</i> RNA
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
bcr	breakpoint cluster region
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BrdU	Bromdesoyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> (Cyclin abhängige Kinase)
CDS	Coding Sequence
CFU	<i>colony forming unit</i> (Kolonie-bildende Einheit)
CKI	<i>cyclin dependent kinase inhibitor</i> (Cyklin abhängige Kinaseinhibitor)
c-KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
CLP	<i>common lymphoide progenitor</i> (lymphoide Progenitorzelle)
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	<i>common myeloide progenitor</i> (myeloide Progenitorzelle)
Cy5	Cyanin5 Farbstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desosyguanintriphosphat
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
Epo	Erythropoietin
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>flow cytometry</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (Fötales Rinderserum)
FDR	<i>false discovery rate</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung

Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigungskraft (9,81 m/s ²)
G	Gauge
G-CSF	<i>colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor</i>
GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
Glu	Glutaminsäure
GvHD	<i>graft versus host disease</i>
HG	<i>human genome</i> (Humangenom)
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSC	<i>hematopoietic stem cell</i> (Hämatopoetische Stammzelle)
HSP	Hitzeschock-Protein
I	Isoleucin
IFN	Interferon
Iso	Isotyp-Kontrollantikörper
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCB	<i>lower confidence bound</i>
L-Glu	L-Glutamin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>
MEP	<i>myeloid-erythroid progenitors</i> (megakaryozytäre Progenitorzelle)
MNCs	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
MTS	MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NQO2	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2</i>
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Peripheres Blut
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (salzhaltiger Phosphatpuffer)
PBSCT	Blutstammzelltransplantation
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PES	Phenazin Ethosulfat
PFA	Paraformaldehyd
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI3K	<i>phosphoinositide-3-kinase</i>
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin / Streptomycin
PU.1	<i>spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPMI	RPMI-1640 Zellkulturmedium
RT	Reverse Transkription

Abkürzungsverzeichnis

rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Ser	Serin
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
Ser216	Serin (Aminosäure 216)
SSC	<i>side scatter</i>
T	Threonin
TBE	Tris-Borat-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS/T	<i>Tris-buffered saline/Tween20</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TPO	<i>thyroid peroxidase</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr694	Tyrosin (Aminosäure 694)
U	<i>Unit</i> (Einheit)
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. Die Hämatopoetische Stammzelle

1.1.1. Definition

Eine Stammzelle ist eine Zelle, die die einzigartige Fähigkeit hat, sich selbst zu reproduzieren (Selbsterneuerung), in spezialisierte Zelltypen auszudifferenzieren (Multipotenz) (Kirchstein and Skirboll, 2001) und aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut zu wandern (Weissman, 2000). Man unterscheidet zwischen embryonalen totipotenten Stammzellen und pluripotenten adulten Stammzellen. Totipotente embryonale Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in alle Gewebsarten und Organe auszubilden, während pluripotente adulte Stammzellen in ihrem Differenzierungspotential eingeschränkt sind. Sie sind z. B. für die Blutbildung im Knochenmark verantwortlich (Haas and Kronenwett, 2005).

1.1.2. Physiologische Blutbildung im Knochenmark

Die pluripotente hämatopoetische Stammzelle (HSC) ist der Ursprung der Blutbildung (Hämatopoese), da aus ihr sämtliche Zellen des Blutes gebildet werden. Sie kommt bei adulten Menschen im Knochenmark, peripheren Blut, in der Milz und Leber vor und zeichnet sich durch die Expression von CD34 aus, einem Oberflächenmarker für die frühe hämatopoetische Stammzelle (Haas and Kronenwett, 2005). Sie erzeugt bei einer symmetrischen Zellteilung zwei gleiche Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften, während sie bei einer asymmetrischen Zellteilung zwei verschiedene Tochterzellen hervor bringt (Giebel *et al.*, 2006). Um den Stammzellpool im Knochenmark aufrecht zu erhalten, verbleibt bei der asymmetrischen Zellteilung eine Tochterzelle im pluripotenten, undifferenzierten Zustand, während sich die zweite Tochterzelle zu einer Progenitorzelle mit einem eingeschränkten Differenzierungspotential entwickelt. Diese kann sich im Knochenmark über die gemeinsame myeloide Progenitorzelle (CMP) über die megakaryozytäre Progenitorzelle (MEP) zu Erythrozyten und Thrombozyten bzw. über die granulomonozytäre Progenitorzelle (GMP) zu Monozyten, Makrophagen und Granulozyten ausdifferenzieren (Akashi *et al.*, 2000b). Alternativ kann sie sich über die lymphoide Progenitorzelle (CLP) zu einem B- oder T-Lymphozyten sowie zu einer Natürlichen Killerzelle (NK-Zelle) entwickeln (Akashi *et al.*, 2000a). Somit wird durch adulte hämatopoetische Stammzellen mit ihrer distinkten Fähigkeit der Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung über das gesamte Leben ein konstanter Vorrat an Blutzellen aller hämatopoetischer Abstammungen erzeugt (Haas and Kronenwett, 2005).

Bei der Blutbildung entstehen durch die asymmetrische Zellteilung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen Progenitorzellen und Tochterzellen, die sich im weiteren Verlauf ausdifferenzieren und ihre proliferativen Eigenschaften mit jeder Zellteilung verlieren. Die Ausdifferenzierung der Zellen erfolgt, wie in Abbildung 1.1 dargestellt, neben der Stimulation der Stammzellen durch die Transkriptionsfaktoren GATA1 und PU.1 sowie die Wachstumsfaktoren Erythropoietin (Epo) für die Ausbildung von Erythrozyten, *thyroid peroxidase* (TPO) für Thrombozyten, *granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor* (GM-CSF) und *colony stimulating factor 3 (granulocyte)* (G-CSF) für Granulozyten sowie GM-CSF und *colony stimulating factor 1 (macrophage)* (M-CSF) für Monozyten (Haas and Kronenwett, 2005). Daneben wirkt die Stimulation mit nukleärem β -Catenin anregend für die normalen gesunden hämatopoetischen Stammzellen, sich zunächst zu multipotenten Progenitoren auszubilden und dann weiter zu differenzieren (Clarke, 2004).

Die chronische myeloische Leukämie ist eine Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, bei der die soeben beschriebenen Mechanismen gestört sind, wodurch es zu einer übermäßigen Vermehrung der multipotenten Progenitorzellen kommt.

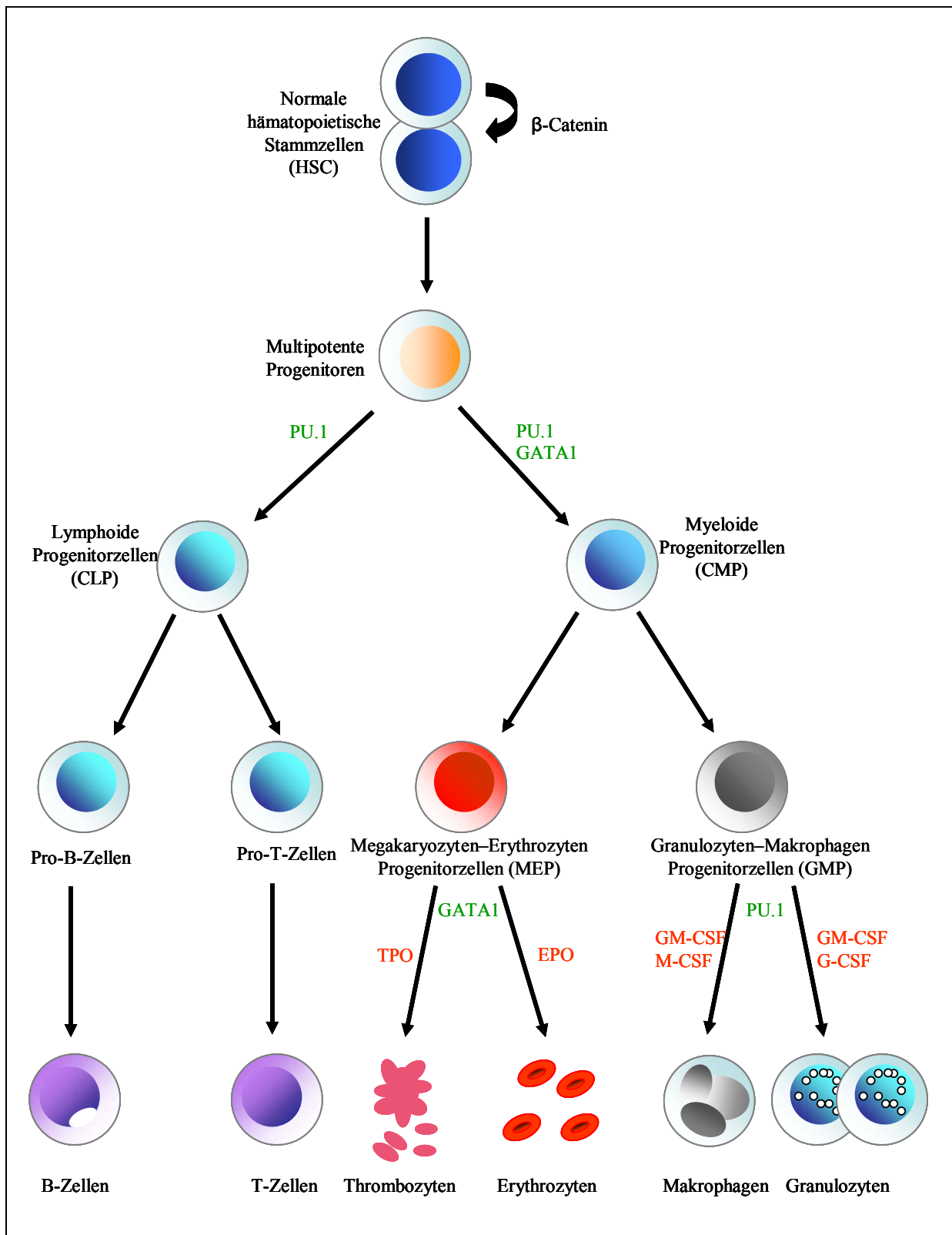


Abbildung 1.1 Vereinfachter Überblick über die Zelldifferenzierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen. Abkürzungen: CMP: *common myeloid progenitors*, CLP: *common lymphoid progenitors*, GMP: *granulocyte-macrophage progenitors*, MEP: *myeloid-erythroid progenitors*, EPO: *erythropoietin*, G-CSF: *colony-stimulating factor 3* (granulocyte), GM-CSF: *granulocyte-macrophage stimulating factor*, M-CSF: *colony stimulating factor 1* (macrophage), GATA1: *GATA binding protein 1* (globin transcription factor 1), PU.1: *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1* (Modifiziert nach Clarke, 2004 und Haas & Kronenwett, 2005).

1.2. Chronische myeloische Leukämie

1.2.1. Definition und Epidemiologie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne, hämatologische Erkrankung, die sich durch eine hohe Anzahl myeloider Zellen, sowie Thrombozyten im peripheren Blut und eine starke Vermehrung myeloider Zellen im Knochenmark auszeichnet (Sawyers, 1999). Hierbei sind vor allem die Leukozyten, d. h. Granulozyten und ihre Vorläuferstufen, die zur myeloiden Reihe gehören, vermehrt. Ursächlich für die Entstehung der CML ist ein maligner hämatopoietischer Stammzellklon, der die für das Krankheitsbild ursächliche Tyrosinkinase BCR-ABL in sich trägt. Der Klon verdrängt die normale Stammzellpopulation und verursacht einen Anstieg der myeloiden Reihe, welche die Quelle der abnormalen Proliferation in den intra- und extramedullären Räumen darstellt (Fialkow *et al.*, 1967). Die CML wird von der Weltgesundheitsorganisation den myeloiden Neoplasien zugeordnet (Tefferi and Vardiman, 2007). Sie tritt in allen Altersgruppen auf, dabei beträgt die Inzidenz bei Patienten unter 40 Jahren etwa 1:100.000, steigt auf 5:100.000 bei Patienten im Alter von 65 Jahren und auf 11:100.000 bei Patienten mit einem Alter 80 Jahren an (Hochhaus *et al.*, 2004). Dies resultiert in einer jährlichen Inzidenz von 1-2 pro 100.000 Personen (Deininger and Druker, 2003). Es sind etwa 1,4mal so viele Männer wie Frauen betroffen (Savage *et al.*, 1997). Die CML stellt 15-20% aller Fälle von adulter Leukämie dar und repräsentiert 2-3% der Leukämien bei Kindern (Faderl *et al.*, 1999).

1.2.2. Historischer Überblick

Die CML wurde erstmals im Jahr 1845 von Rudolf Virchow als „weißes Blut“ beschrieben (Virchow, 1845). Ebenfalls im Jahre 1845 beschrieb John Hughes Bennett in einer Autopsie eines Patienten mit einer solchen Erkrankung eine vergrößerte Milz, Leber und Lymphknoten (Bennett, 1845). 1847 schlug Virchow den bis heute gültigen Namen „Leukämie“ für die Krankheit vor, der zunächst mit dem von Bennett geprägten Begriff „Leukozythämie“ konkurrierte (Bennett, 1852). Virchow fand im Jahr 1847 bei 4 von 9 Patienten einen Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Bluts und einer vergrößerten Milz (Virchow, 1847): er erkannte, dass es je nach Milzveränderung unterschiedliche Arten von weißen Zellen gab. In Leukämiefällen mit auffallender Milzvergrößerung waren die Zellen granulär und hatten unregelmäßige oder geteilte Zellkerne, wohingegen nichtgranuläre Zellen mit einem glatten Zellkern vor allem dann auftraten, wenn die Patienten eine Erkrankung der Lymphknoten aufwiesen. Auch der Schriftsteller und Arzt Dr. Arthur C. Doyle reihte sich

1882 in die Reihe der Ärzte ein, die Patienten mit CML beschrieben. Er beschrieb einen „gut gebauten“ 29-jährigen Mann mit massiver Milzvergrößerung und enorm vermehrten Leukozyten. Das Verhältnis von weißen zu roten Blutzellen beschrieb er als 1:7 (Doyle and Edin, 1882). Es dauerte bis in das nächste Jahrhundert, um von der rein morphischen Betrachtung der Organe und Zellen den Weg in Richtung Gene einzuschlagen.

Im Jahr 1960 beschrieben Nowell und Hungerford die für die CML charakteristische Chromosomenaberration, die sie als Philadelphiachromosom bezeichneten (Nowell and Hungerford, 1960). Jane Rowley beobachtete im Jahr 1973, dass diese chromosomale Aberration aus einer reziproken chromosomalen Translokation der Chromosomen 9 und 22 resultierte (Rowley, 1973). Durch diese Translokation wird das *BCR-ABL* Onkogen gebildet. Dieses spielt durch eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität eine essentielle Rolle in der leukämischen Transformation (Daley *et al.*, 1990). Im Jahre 1999 beschrieb Sawyers die „breakpoint cluster“ Regionen auf dem Chromosom 22 und charakterisierte das *BCR-ABL* Fusionsgen näher, welches für die Bildung des abnormalen Proteins verantwortlich ist, das sich wie eine konstitutiv aktive zytoplasmatische Tyrosinkinase verhält (Sawyers, 1999).

1.2.3. Charakterisierung der Phasen und klinische Merkmale

Die CML verläuft unbehandelt in drei Phasen, deren Einteilung gemäß den Baccarani-Richtlinien erfolgt (Baccarani *et al.*, 2006):

1. die chronische Phase: Bei etwa 85% der Patienten erfolgt die Diagnose der CML in chronischer Phase im Rahmen einer Routinediagnostik (Faderl *et al.*, 1999). Häufige Symptome bei der Erstdiagnose der Erkrankung sind eine Splenomegalie (ca. 72%), allgemeiner Leistungsabfall (ca. 60%), Hepatomegalie (ca. 49%), Gewichtsverlust (ca. 33%) und Fieber (ca. 6%) (Hehlmann *et al.*, 1994). Im peripheren Blut kommt es häufig zu einer Leukozytose sowie einer typischen pathologischen Linksverschiebung im Differentialblutbild. Diese zeichnet sich durch reife Granulozyten, unreife Vorstufen der myeloiden Reihe bis hin zu vereinzelt Myeloblasten (< 15%) aus.

2. akzelerierte Phase: Der natürliche Krankheitsverlauf ist eine Progression der Krankheit aus der chronischen Phase, die etwa 3-5 Jahre dauern kann, hin zur akzelerierten Phase. Diese hat eine Dauer von wenigen Wochen bis zu zwölf Monaten und ist durch ein schlechtes Therapieansprechen sowie einer Verschlechterung der Anämie und einem Anstieg der peripheren Basophilen und Blasten gekennzeichnet (Kantarjian *et al.*, 1988). Der Blastenanteil im Blut bzw. Knochenmark liegt bei 15-29%, der Anteil der Basophilen im Blut bei mindestens 20% und es tritt eine Therapie-unabhängige persistierende Thrombozytopenie ($<100 \times 10^6$ Thrombozyten/ml) auf.

3. Blastenkrise: Die letzte Phase der CML ist die so genannte Blastenkrise, welche durch eine hohe Blastenzahl ($\geq 30\%$) und multiplen Komplikationen wie Blutung oder Sepsis gekennzeichnet ist. Klinisch betrachtet verhält sich diese Krankheitsphase wie eine akute myeloische Leukämie mit schneller Progression und kurzer Überlebenszeit (Sokal *et al.*, 1988).

1.2.4. Molekularbiologie

Die CML war die erste Krankheit, die mit einer distinkten zytogenetischen Aberration verbunden wurde. Etwa 95% der CML-Patienten weisen diese zytogenetische Aberration, das von Nowell und Hungerford beschriebene Philadelphia Chromosom (Ph) auf, welches in hämatopoetischen Vorläuferzellen und im Knochenmark nachweisbar ist (Faderl *et al.*, 1999).

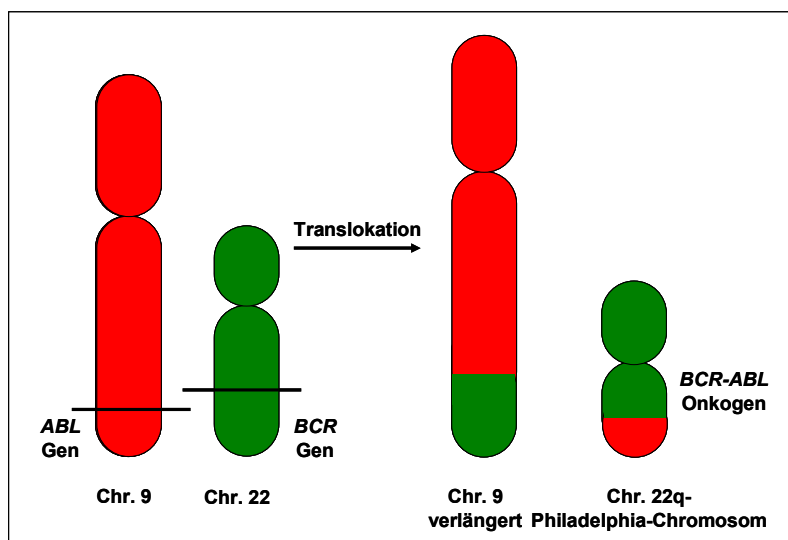


Abbildung 1. 2 Philadelphia-Chromosom. Ein chromosomaler Defekt, der als Philadelphia-Chromosom bezeichnet wird, ist für die Pathophysiologie der CML verantwortlich. Teile der beiden Chromosomen 9 und 22 tauschen ihre Plätze. Teile des BCR Gens von Chromosom 22 (Region q11) fusionieren mit dem ABL Gen auf Chromosom 9 (Region q34). Das Ergebnis dieser Translokation ist das p210 BCR-ABL Protein, welches adhäsive Anomalien und Zytoskelettveränderungen hervorruft, welche in Deregulation von Proliferation, Apoptose sowie Ausschwemmung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark resultieren.

Hierbei wird das Chromosom 22 am langen Arm verkürzt (22q11) und das *BCR* (*breakpoint cluster region*) Gen reziprok an das *ABL* (*Abelson* (murines Leukämie-Virus)) Gen auf dem langen Arm des Chromosoms 9 (9q34) transloziert. Dadurch entsteht das hybride *BCR-ABL* Onkogen, welches auf dem verkürzten Chromosom 22 liegt (Groffen *et al.*, 1984) (Abbildung 1.2). Es treten verschiedene Bruchpunktvarianten auf, von denen die am häufigsten auftretenden die b3a2 und die b2a2 Bruchpunktvariante sind, die für p210^{BCR-ABL} codieren. Daneben gibt es auch die Bruchpunktvarianten b3a3, b2a3, die ebenfalls in die p210^{BCR-ABL} translatieren, e19a2, das die p230^{BCR-ABL} Variante bildet und das für die p190^{BCR-ABL} Variante codierende e1a2 (Goldman and Melo, 2003). Bei den Bruchpunktvarianten b2a3, b3a2 oder e19a2 konnte keine prognostische Relevanz nachgewiesen werden, Patienten mit der Variante e1a2 haben hingegen eine schlechtere Prognose (Goldman and Melo, 2003; Verma *et al.*, 2009).

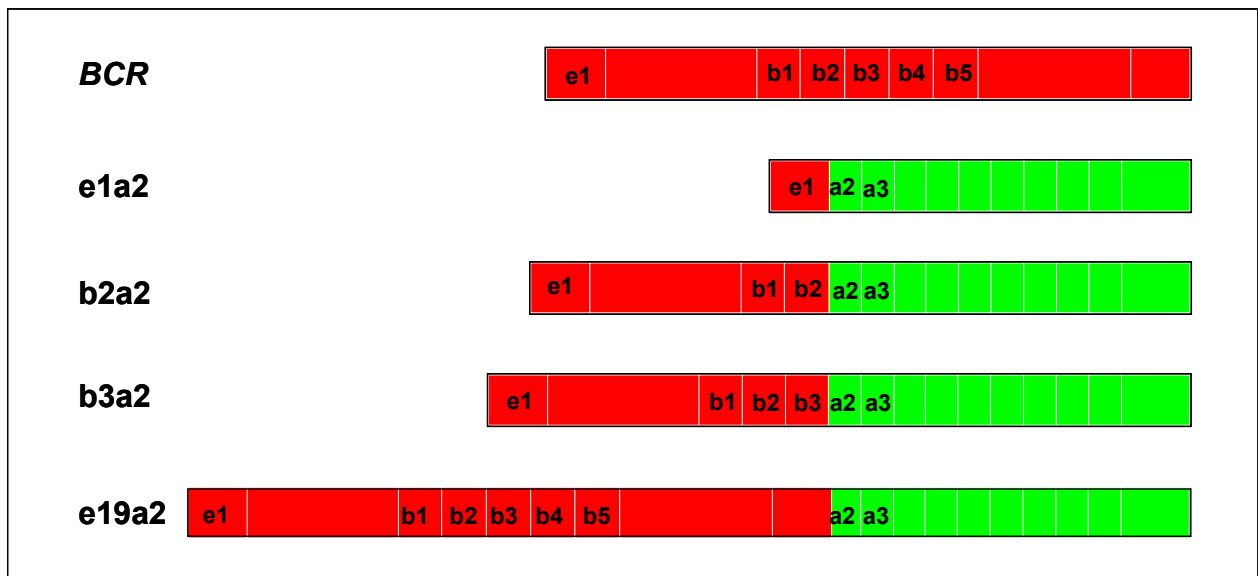


Abbildung 1.3 Bruchpunktvarianten bei der CML. Gezeigt werden neben *BCR* die Bruchpunktvarianten e1a2, b2a2, b3a2, und e19a2. Dabei sind die Exone von *BCR* rot und die von *ABL* grün gekennzeichnet.

Das Protein ABL ist an zellulären Prozessen wie Zellmigration, Adhäsion, Zelldifferenzierung und Apoptose beteiligt (Raitano *et al.*, 1997). Daneben ist vom Protein BCR bekannt, dass es über eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität verfügt und ein GTPase-aktivierendes Protein ist (Cho *et al.*, 2007). Wenn die Gene *BCR* und *ABL* aufgrund einer reziproken Translokation fusionieren, wird das *BCR-ABL* Onkogen gebildet. Dieses führt durch die Translation zur Bildung eines abnormalen Proteins, das BCR-ABL Onkoprotein. Es handelt sich hierbei um eine Serin-Threonin-Kinase, die direkt die maligne Proliferation der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen beeinflusst. Nach der Translokation wird die Tyrosinkinase-Aktivität des ABL Proteins konstitutiv im BCR-ABL Protein aktiviert und es

bedarf beispielsweise keiner Aktivierung durch andere zelluläre *Messenger*-Proteine (Goldman and Melo, 2003).

Zahlreiche Mechanismen sind in die maligne Transformation, die vom BCR-ABL Onkoprotein orchestriert wird, involviert. So wird durch BCR-ABL eine Reihe von Zellzyklus-kontrollierenden Proteinen und Enzymen aktiviert, was zu einer schnelleren Zellteilung führt. Das BCR-ABL Onkogen aktiviert die *Mitogen-Signaling* Signalwege wie den Januskinase - *signal transducer and activator of transcription 3* (JAK/STAT) Signalweg, den *Phosphoinositide-3-Kinase* (PI3K) / *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT) Signalweg, den *RAS-mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg sowie den *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)* (MYC) Signalweg (Deininger *et al.*, 2000). Außerdem schützt BCR-ABL die CML-Zellen vor Apoptose (Bedi *et al.*, 1994) und induziert adhäsive Anomalien sowie Veränderungen im Zytoskelett, welche möglicherweise die Ausschwemmung der Progenitoren aus dem Knochenmark verstärken (Gordon *et al.*, 1987; Salesse and Verfaillie, 2002). Überdies inhibiert das BCR-ABL die DNA Reparatur, was zu genomischer Instabilität führt, und macht die Zellen anfälliger für weitere genetische Anomalien, die möglicherweise die Blastenkrise in der CML auslösen (Deininger *et al.*, 2000).

1.2.5. Diagnostik

Die Diagnose der CML erfolgt zunächst hämatologisch durch ein Differentialblutbild. Im Anschluss erfolgt der Nachweis des Philadelphia-Chromosoms (Ph⁺) oder des BCR-ABL Fusionsskriptes. Dazu werden Methoden wie die Karyotypisierung mittels zytogenetischer Analyse, die Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH) oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

Für die Beurteilung des Ansprechens von Patienten mit CML auf eine Therapie mit Imatinib ist die zytogenetische Untersuchung von Knochenmark mittels konventioneller Bänderungstechnik bis heute das Standardverfahren. Dabei werden mindestens 25 Metaphasen analysiert und der Prozentsatz der Ph⁺ Zellen bestimmt (Schoch *et al.*, 2002). Überdies lassen sich mit dieser Methode weitere chromosomale Anomalien im Sinne eines

komplex aberranten Karyotyps erfassen. Chromosomenuntersuchungen werden analog den Baccarani Richtlinien in sechsmonatigen Abständen empfohlen (Baccarani *et al.*, 2006).

Alternativ bzw. ergänzend steht seit ca. 10 Jahren eine weitaus sensitivere Technik, bei der als Untersuchungsmaterial lediglich peripheres Blut benötigt wird zur Verfügung. Bei dieser Technik handelt es sich um die quantitative Untersuchung von *BCR-ABL* mRNA mittels quantitativer real-time PCR (qPCR). Diese basiert auf der Verwendung von LightCycler oder Taqman Technologien und hat eine Sensitivität von einer Leukämiezelle in 10^5 - 10^6 gesunden Zellen (Branford *et al.*, 1999; Elmaagacli *et al.*, 2000; Emig *et al.*, 1999; Kreuzer *et al.*, 1999; Menskin *et al.*, 1998; Preudhomme *et al.*, 1999). Die an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf etablierte *BCR-ABL* Diagnostik weist für die qPCR eine Sensitivität von $1:10^5$ auf, eine qualitative nested PCR, in der das PCR-Produkt über eine 2. PCR noch weiter hoch amplifiziert wird, erhöht die Sensitivität der PCR um den Faktor 10 (Neumann *et al.*, 2003).

1.2.6. Geschichte der Therapie der CML

Im 19. Jahrhundert versuchte man, die CML mit Arsenderivaten zu behandeln, dies war unbefriedigend, obwohl gelegentlich eine gewisse symptomatische Kontrolle der Krankheit erreicht werden konnte (Goldman, 2007). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die CML mit ionisierender Strahlung behandelt, womit zwar keine Verbesserung des Überlebens erreicht wurde, aber subjektive Symptome wie z. B. Splenomegalie-bedingte Beschwerden gelindert werden konnten (*Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia*, 1968). Ab 1950 erfolgten die ersten Monochemotherapien mit Busulfan. Dieses wurde in der Folge zunächst durch Hydroxyharnstoff und später durch Interferon (IFN) ergänzt bzw. abgelöst. Mit IFN konnten erstmalig zytogenetische Remissionen erzielt werden. Der bisher einzige kurative therapeutische Ansatz ist jedoch Anfang der 1980er Jahre mit der Einführung der allogenen Blutstammzelltransplantation (PBSZT) gelegt worden. Diese war trotz der Risiken bis zum Jahr 2000 die therapeutische Empfehlung für Patienten unter 50 Jahren mit einem passenden humanen Leukozytenantigen-System (HLA) identischen Spender (Goldman, 2007). Das Wirkprinzip der allogenen PBSZT basiert auf der Tatsache, dass es sich bei der zugrunde liegenden Ursache der CML um einen Stammzelldefekt handelt. Das Verfahren ist ein Hochrisikoeingriff, der sich zum einen durch die akute Toxizität der Chemotherapie sowie der Bestrahlung auszeichnet. Zum anderen birgt dieses

Therapieverfahren ein nicht unerhebliches, teilweise lebensbedrohliches Risiko: Die Abstoßungsreaktion des Spendermarkes gegenüber dem Empfänger, die so genannte GvHD (Graft versus Host Disease). Mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde in der CML-Therapie 1998 eine neue Ära eingeleitet, die die Stammzelltherapie und ihre Risiken zunehmend in den Hintergrund rückt. Über das Wirkprinzip wird im folgenden Kapitel eingegangen.

1.3. Tyrosinkinase-Inhibitoren

Der Begriff Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) bezeichnet eine neuartige Klasse von Wirkstoffen, die bei Tumorerkrankungen und hämatologischen Neoplasien zum Einsatz kommen. Bei der Entstehung dieser malignen Erkrankungen spielen dysregulierte Tyrosinkinasen eine Schlüsselrolle. Therapeutisch werden die Tyrosinkinasen mit spezifischen Inhibitoren gehemmt. Wesentliche Vorteile der Therapie mit den spezifischen TKIs sind zum einen die höhere Spezifität und zum anderen die geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu herkömmlichen Zytostatika.

1.3.1. Wirkmechanismus des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib

Imatinib (Wirkstoff STI571, Handelsname Glivec®, Novartis, Basel, Schweiz), war der erste TKI zur Behandlung der CML, der seit 1998 in ersten Studien getestet wurde (Druker *et al.*, 2001a; Druker *et al.*, 2001b). Der Wirkmechanismus von Imatinib besteht im Wesentlichen in einer kompetitiven Blockade der ATP-Bindestellen der Tyrosinkinasen BCR-ABL in der inaktiven Form (Abbildung 1.4), *platelet derived growth factor -receptor* (PDGFR), c-KIT, des *abl related gene* (ARG) sowie von der *abelson* Gene c-ABL und v-ABL. Die Folgen der selektiven Hemmung sind zahlreiche *downstream*-Veränderungen von intrazellulären Wachstumskaskaden. Während die Bindung von ATP an BCR-ABL die Phosphorylierung von Substraten ermöglicht, blockiert der TKI Imatinib diese. Dadurch kann das Substrat keine Konformationsänderung durchführen, die es ermöglichen würde, mit seinem nachgeschalteten Effektorprotein zu interagieren. Damit werden die Phosphorylierungskaskaden unterbrochen (Goldman and Melo, 2003), was zu einem verminderten Proliferationsreiz und Apoptoseschutz führt (Apperley *et al.*, 2002; Buchdunger *et al.*, 2000; Buchdunger *et al.*, 1996; Druker *et al.*, 1996; Heinrich *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2001; Schindler *et al.*, 2000). Resistenzen gegen Imatinib treten bei etwa 15-20% der Patienten auf, diese sind teilweise auf *BCR-ABL* Überexpression und teilweise auf Resistenzmutationen zurück zu führen, die die Bindungseigenschaften ändern (Aguilera and Tsimberidou, 2009; Cortes *et al.*, 2007; Quintás-

Cardama *et al.*, 2009). Eine Umstellung auf einen anderen TKI, der spezifischer wirkt, stellt eine Therapieoption dar.

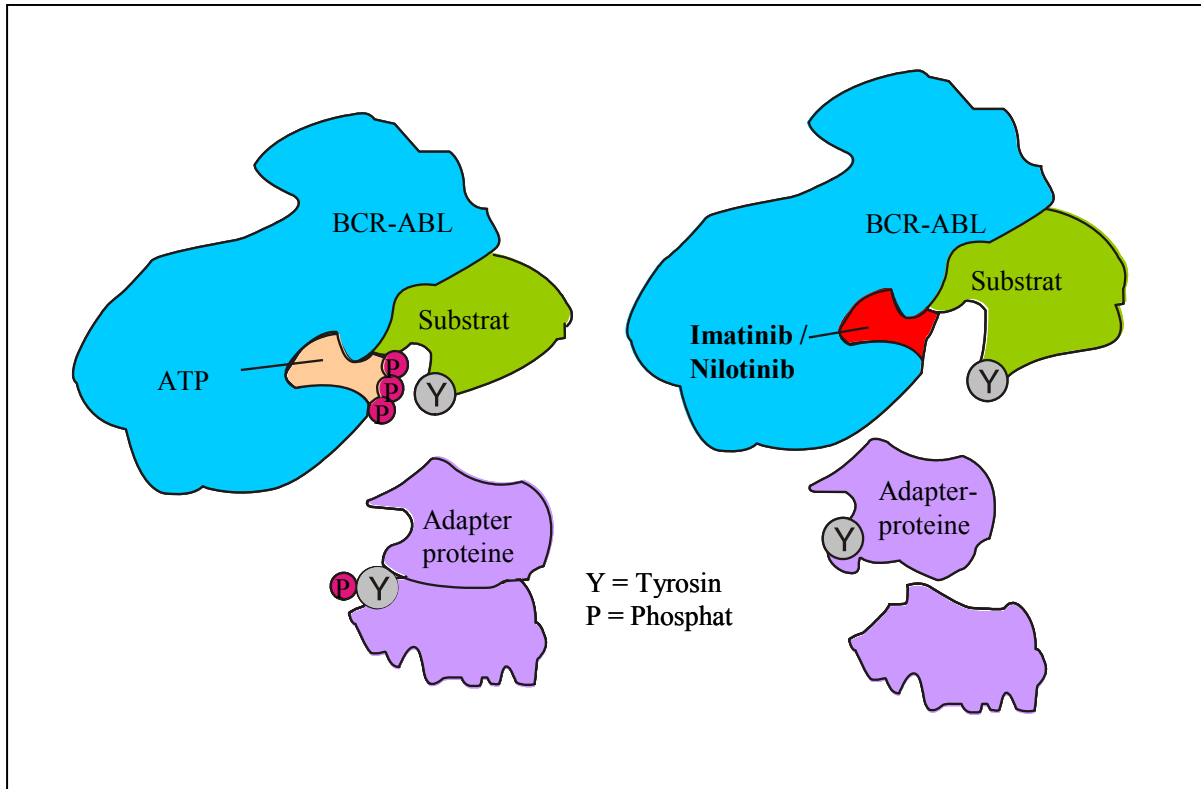


Abbildung 1.4 Wirkmechanismus von Imatinib und Nilotinib. Imatinib bzw. Nilotinib bindet selektiv an der ATP Bindestelle des BCR-ABL Proteins und verhindert so die Phosphorylierung in den nachfolgenden Signalkaskaden, die im phosphorylierten Zustand zu einer gesteigerten Proliferation, erniedrigten Apoptose und verringerten Adhäsion der CML Zelle führen (modifiziert nach Goldman, 2000).

1.3.2. Wirkmechanismus von Nilotinib

Der Wirkmechanismus von Nilotinib (Wirkstoff AMN107, Handelsname Tasigna, Novartis) ist dem von Imatinib sehr ähnlich, auch Nilotinib hemmt die inaktive Form von BCR-ABL spezifisch, aber *in vitro* 30-mal effektiver (O'Hare *et al.*, 2005). Während die IC_{50} -Konzentration, bei der die Proliferation um 50% inhibiert wird, in transfizierten Zellen der Ba/F3 Zelllinie bei Imatinib bei 527 nM liegt, liegt sie bei Nilotinib bei 17,69 nM. Weiterhin blockiert Nilotinib die ATP-Bindestellen von c-KIT bei einer IC_{50} -Konzentration von 90 nM sowie von PDGFR bei 72 nM und inhibiert die *ABL*-zugehörigen Gene ARG (*ABL related genes*), *discoidin domain receptor tyrosine kinase 1* (DDR1) Kinase sowie die *Oxidoreduktase NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2* (NQO2) (Manley *et al.*, 2005; Verstovsek *et al.*, 2006; Weisberg *et al.*, 2005). Der TKI Nilotinib ist ein Imatinib-Derivat, bei dem die N-Methylpiperazinyl-Gruppe durch einen Amid-Pharmakophor ersetzt wurde (Abbildung 1.5). Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass ein Großteil der Bindeenergie von Imatinib durch die beiden energetisch ungünstigen Wasserstoffbindungen zwischen der

N-Methylpiperazinyl-Gruppe und den Aminosäuren Ile360 (Interleukin) und His361 (Histidin) von ABL verbraucht wird. Der Austausch der N-Methylpiperazinyl-Gruppe durch einen Amid-Pharmakophor entfernt diese beiden Wasserstoffbrückenbindungen (Deininger, 2008). Dieses gewährleistet die Aufrechterhaltung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Aminosäuren Glu286 (Glutaminsäure) und Asp381 (Asparaginsäure) in der ABL-Kinase und sorgt für eine effektivere Inhibierung der Kinaseaktivität, die auf die etwa 20 bis 30-fach höhere Bindungsaffinität an das native BCR-ABL zurückzuführen ist (O'Hare *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2005). Dabei bindet Nilotinib an 32 bekannten Mutationen, die zu einer Imatinibresistenz führen im *BCR-ABL* Onkogen (Weisberg *et al.*, 2006), während es bei T315I Mutation, bei der Threonin gegen Isoleucin ausgetauscht wurde, keinerlei Aktivität aufweist (O'Hare *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2001; Weisberg *et al.*, 2005).

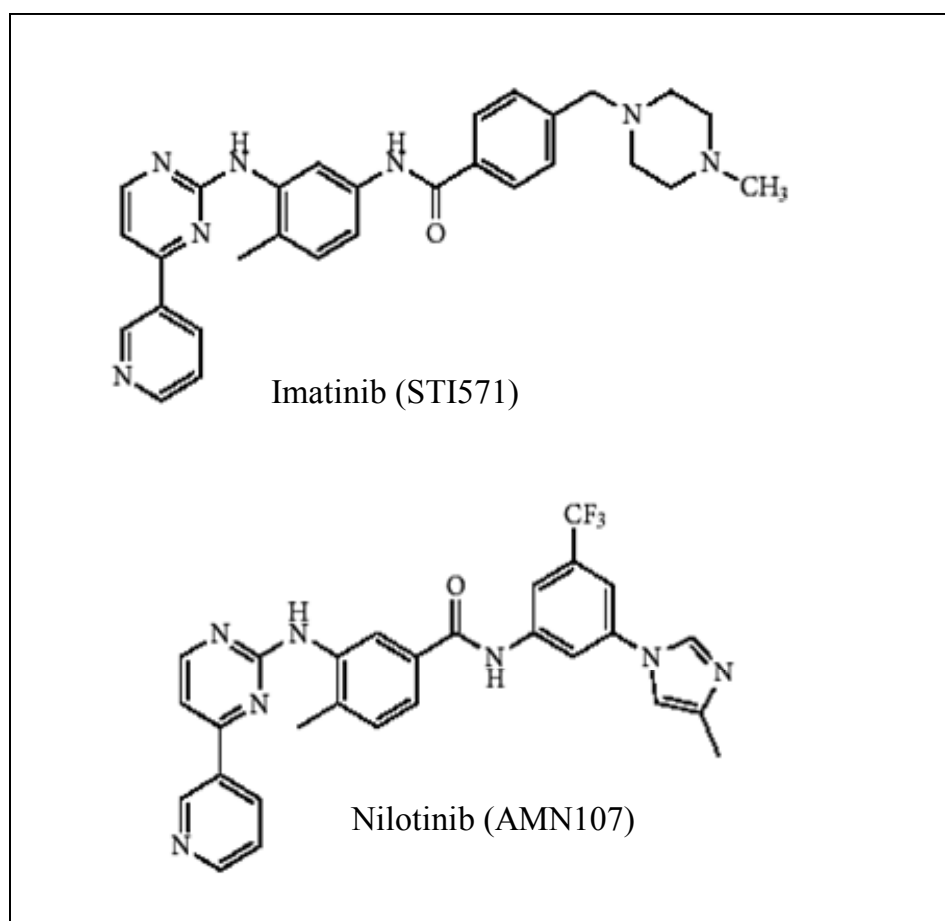


Abbildung 1.5 Strukturformeln von Imatinib und Nilotinib (aus Weisberg *et al.*, 2005).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Während die direkt durch Imatinib blockierten Proteine vielfach untersucht sind, finden sich in der Literatur wenige Angaben über Untersuchungen bezüglich der dadurch induzierten intrazellulären Veränderungen von Signalkaskaden. Es konnte an *BCR-ABL* positiven murinen pro B-Zellen (BA/F3 Zellen) gezeigt werden, dass der proapoptotische *BCL-2-interacting mediator* (BIM) eine Rolle als Tumorsuppressor in *BCR-ABL* positiven Zellen spielt. Dadurch exprimieren diese Zellen nur eine geringe Menge von diesem „Zelltod-Aktivator“. Außerdem wird die BIM Expression intrazellulär *in vitro* durch die Therapie mit Imatinib gesteigert. Mit funktionellen Tests und Westernblotanalysen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Behandlung von CD34+ Zellen von Patienten mit CML mit Imatinib *in vitro* zu einer gesteigerten Aktivität der p42/44 Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) und zu einer verringerten Aktivität des Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitor (PI3K) führt. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen über Imatinib-induzierte genomweite transkriptionelle Veränderungen in Ph+ CD34+ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen *in vivo*.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten transkriptionelle Veränderungen untersucht werden, die während der ersten Therapie-Woche mit Imatinib in CD34 positiven hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML in chronischer Phase *in vivo* induziert werden. Ziel war hierbei die weitere Aufklärung der molekularen Wirkungsweise des Tyrosinkinase-Inhibitors in Philadelphia-Chromosom-positiven Stamm- und Vorläuferzellen. Hierzu sollten mit Hilfe von Microarrays und quantitativer real-time RT-PCR Veränderungen der Genexpression in CD34 positiven Zellen von Patienten während der ersten Woche einer Therapie mit Imatinib zu untersuchen, um damit weitere Aussagen über die molekulare Wirkungsweise und über den Einfluss auf bestimmte Signalwege machen zu können.

Das zweite Ziel der Arbeit bestand in einer Beschreibung der molekularen Ursachen für die höhere Wirksamkeit des TKIs Nilotinib gegenüber Imatinib im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf am CML-Zellmodell (K562 Zelllinie). Auf transkriptioneller Ebene wurden die Affymetrix Genchiptechnologie zur Aufdeckung von Unterschieden im Expressionsmuster sowie die qRT-PCR zur Verifizierung ausgewählter Gene verwendet. Für eine funktionelle Bestätigung der Genexpressionsdaten sollten Proliferation-, Apoptose- sowie Zellzyklusexperimente durchgeführt werden. Auf Proteinebene sollte eine Untersuchung

ausgewählter BCR-ABL *downstream* Proteine mittels Western Blots durchgeführt werden, um zu klären, ob neben transkriptionellen Unterschieden auf Proteinebene Effekte auftreten, die die höhere Potenz von Nilotinib gegenüber Imatinib widerspiegeln.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tabelle 2.1 Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Waldbronn
Agilent GeneArray Scanner 2500A	Agilent Technologies	Waldbronn
Brutschrank Heraeus 6000	Heraeus	Osterode
Cryobox Cryo 1 freezing container	Nalgene	Neerijse, Belgien
Cycler Mastercycler gradient	Eppendorf	Hamburg
Geldokumentationssystem GelDoc 2000 mit Digitaler Fluorchem Imaging Kamera	BioRad	München
Gelelektrophorese-Kammer Sub-Cell GT	BioRad	München
GeneChip Fluidics Station 400	Affymetrix	Santa Clara, USA
GeneChip Hybridization Oven 640	Affymetrix	Santa Clara, USA
LightCycler-System mit LightCycler Software 3.5	Roche	Mannheim
MicroArray Suite 5.0 Software	Affymetrix	Santa Clara, USA
Mini Protean II™	Biorad	München
Nanodrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Thermorührer MR3302	Heidolph	Schwabach
Thermoschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
Zellzählgerät Casy TT Cell Counter & Analyser	Innovatis AG	Bielefeld
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus	Osterode
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus	Osterode
Zytometer FACScan und Cellquest Software	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Objektträger Küvetten	Roth	Karlsruhe
Mikroskop: Zeiss Axioplan	Carl Zeiss	Göttingen
Mikroskop: Zeiss Axiovert 100	Carl Zeiss	Göttingen
Wallac Multilabel Counter 1420	Victor Wallac, Perkin Elmer	Boston, USA
Wasserbad Modell WNE	Memmert	Schwabach

2.2. Software

2.2.1. Programme

Tabelle 2.2 Auflistung der verwendeten Software.

Name Software	Hersteller
affy Paket der „R“ Software	Bioconductor (http://www.bioconductor.org/)
Alpha Ease FC Software	Biozym
Axioplan 2 imaging	Zeiss
CELL Quest Software 3.0	BD

Name Software	Hersteller
CloneManager Version 5	Sci-Ed Software
dChip Software	Cheng Li Lab for Computational Cancer Genomics, Harvard Medical School (www.dchip.org)
Excel Software	Microsoft
Nanodrop 1000 V3.7 Software	PeqLab
NormFinder software	Dept. of Molecular Medicine (MOMA) Molecular Diagnostic Laboratory http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm
Photoshop CS3 Software	Adobe
SAM Software v1.21 (<i>Significance Analysis of Microarrays</i>)	Stanford University Labs http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/
Zeiss Axioplan 2 Imaging Software	Zeiss

2.2.2. Datenbanken

Folgende Datenbanken wurden verwendet (Stand Dezember 2009):

Affymetrix Netaffx™ Analysis Center [<https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>]

Charting pathways of life [<http://www.biocarta.com/>]

Human Genome Server - The Sanger Centre [<http://www.ensembl.org>]

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [<http://www.genome.jp/kegg/>]

PubMed, Gene, Nucleotide, BLASTN, OMIM [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

2.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.3 Überblick über das Verbrauchsmaterial.

Bezeichnung	Hersteller	Stadt
0,5 ml & 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
14 ml Falcon Reaktionsgefäße mit rundem Boden	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
15 ml & 50 ml Falcon Reaktionsgefäße	Greiner Bio One	Frickenhausen
2-Well adhäsive diagnostische Objektträger	Thermo Scientific	Braunschweig
6-Well-Platten, suspension	Greiner Bio One	Frickenhausen
96-Well-Platten mit flachem Boden	Corning	NY, USA
Cryo-Reaktionsgefäße	Biozym	Hessisch Oldendorf
Deckgläser, 22x22 mm	Marienfeld	Lauda-Königshofen
FACS-Röhrchen	BD Falcon	Franklin Lakes, USA
<i>Human Genome 133A 2.0 Genchip</i>	Affymetrix	High Wycombe, GB
<i>LightCycler</i> -Kapillaren	Roche	Mannheim
Neolus Kanüle, 26 G 0,45 mm	Terumo	Eschborn
Omnifix 40 Solo U-40 Insulin Spritzen	Braun	Melsungen
Pipettenspitzen 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Biozym	Hessisch Oldendorf
Zellkulturflaschen 25 cm ² & 75 cm ²	Greiner Bio One	Frickenhausen

2.4. Chemikalien

Tabelle 2.4 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma	Ort
6x Ladepuffer für Agarosegele	Fermentas	St. Leon-Rot
Acrylamid Rothiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe
37,5:1, 30% (für Westernblot)		
Agarose	Gibco BRL	Paislay, Schottland
Amido schwarz	USB	Cleveland, Ohio
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma	Deisenhofen
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun	Melsungen
β-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt
Borsäure für Elektrophorese	Sigma	Deisenhofen
Bovines Serum Albumin	Invitrogen	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma	Deisenhofen
dATP, 100 mM Solution	GE Healthcare	Freiburg
dCTP, 100 mM Solution	GE Healthcare	Freiburg
dGTP, 100 mM Solution	GE Healthcare	Freiburg
dTTP, 100 mM Solution	GE Healthcare	Freiburg
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs	Frankfurt (Main)
Dapi Mounting Medium	Roche	Mannheim
DTT [0,1 M]	Invitrogen	Karlsruhe
EDTA	Sigma	Deisenhofen
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma	Deisenhofen
FACS-Flow	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom	Berlin
Formaldehyd	Merck	Darmstadt
Fragmentierungspuffer	Affymetrix UK Ltd	High Wycombe, UK
Fixogum	Marabu & Co Kg	Bietigheim-Bissingen
Immersoil™ 518 N	Zeiss	Jena
L-Glutamin	Sigma	Deisenhofen
<i>LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion</i>	Vysis Abbott Molecular	Wiesbaden
<i>Translocation Probe Set</i>		
LSI/WCP Hybridisierungspuffer	Vysis Abbott Molecular	Wiesbaden
Lymphoprep™	Axis Shield	Oslo, Norwegen
<i>10x Lysis Buffer</i>	Cell Signaling Technology	Danvers, MA
Methanol	Merck	Darmstadt
<i>M-MLV RT First Strand Buffer [5X]</i>	Invitrogen	Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen	Karlsruhe
Magermilchpulver	BioRad	München
<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine (TEMED)</i>	Sigma	Deisenhofen

Chemikalie	Firma	Ort
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ D8537	Sigma-Aldrich	Deisenhofen
<i>pd(N)6 Random Hexamer-Primer</i>	GE Healthcare	Freiburg
Penicillin/Streptomycin	Gibco	Paislay, Schottland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS)	Fluka (Sigma-Aldrich)	Deisenhofen
Protein-Größenstandard <i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas	St. Leon-Rot
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega	Mannheim
Robosep® Puffer	Stemcell Technologies	Vancouver, Kanada
Natriumdodecylsulfat für die Elektrophorese (SDS)	Merck	Darmstadt
20x SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA)	BioWhittaker	Walkersville
TRIS-Base	Sigma	Deisenhofen
Triton X 100	Sigma	Deisenhofen
Trypan Blau	Biochrom	Berlin
Tween 20	Serva	Heidelberg
20x SSC-solution (3M NaCl, 0,3M NaCitrat, pH 7,0)	Vysis Abbott Molecular	Wiesbaden
Vektashield	Vector Laboratories	Peterborough

Die für die Zellkultur-Experimente benötigten Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib sowie Nilotinib wurden von der Firma Novartis (Nürnberg) zur Verfügung gestellt.

2.5. Antikörper

Tabelle 2.5 Übersicht über die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Firma	Ort
Goat-Anti-Rabbit IgG, HRP-linked # 7074	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
CD34 FITC Ref 345801	Becton Dickinson	Heidelberg
CDC25C (5H9) # 4688	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
GAPDH (FL-335) sc-25778 rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg
Phospho-CDC25C (Ser216) (63F9) # 4901S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
PIM1 # 2907S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
PIM2 # 4723S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Phospho-STAT5 (Tyr694) (C11C5) # 9359S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Simultest™ $\gamma 1/\gamma 2a$ FITC/PE Ref 342409	Becton Dickinson	Heidelberg
STAT5 (3H7) Rabbit # 9358	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA

2.6. Molekularbiologische Kits

Tabelle 2.6 Überblick über die eingesetzten molekularbiologischen Kits.

Kit	Firma	Ort
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo Scientific Pierce	Bonn
CellTiter 96 AQueous® One Solution Cell Proliferation Assay	Promega	Mannheim
ECL Western blotting detection reagent	GE Healthcare, Amersham	München
ELISA apoptosis assay	Roche	Mannheim
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen	Heidelberg
Human CD34 Selection Kit	StemcellTechnologies	Vancouver, Kanada
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche	Mannheim
MesageAmp™ II-Biotin Enhanced Single Round aRNA Amplification Kit	Ambion	Austin, Texas, USA
RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent Technologies	Waldbronn
RNase-free DNase Set	Qiagen	Hilden
RNeasy Kit	Qiagen	Hilden

2.7. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert.

Tabelle 2.7 Oligonukleotide für die quantitative *real-time* PCR.

Genname	Forward Sequenz (5'-3')	Reverse Sequenz (5'-3')
18s rRNA	ATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGAGC	CGTCCCTCTTAATCATGGCCTCAGTTC
BIRC5 (survivin)	AGAGTCCCTGGCTCCTCT A	CCCGTTTCCCAATGACTTA
BTG2	TCCATCTGCGTCTTGACGA	GTTGTCACGGCAGCATGAG
BUB1B	TAGGTATATCAGCTGGACAGA	CGCCCTAATTTAAGCCAGAG
CDC2	GGAGAAGGTACCTATGGAGT	ATAAGCACATCCTGAAGACTG
CDK2	GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG	AGCTCGGTACCACAGGGTCA
GATA2	AGCCGGCACCTGTTGTGCAA	TGACTTCTCCTGCATGCACT
HBB	GCTTCTGACACAACCTGTGTTC	CTGAAGTTCTCAGGATCCACG
HOXA10	GAGAGCAGCAAAGCCTCGC	CCAGTGTCTGGTGCTTCGTG
HSPA8	CCTTGGAAGACTGTTACCA	GTTTCTTTCTGCTCCAACCTT
ICAM4	AATTGCAGCAACAGCTGTCC	CTGGTAAGACACCCAACCC
LEPR	ACAAATAGATGCAAACCTGGAAC	TTCTAACACTTCAGGCAGAAC
LYN	GGAGGAGCCCATTACATA	CAGCACTTTGCCACCTTCATC
MCM4	CTTTCAGAGATTCTTCAGCG	TCACCAATAACATTAATCTCCC
MELK	TTCTTGAGTACTGCCCTGGA	TCTGGCTTGAGGTCCCTGT
METAP1	CACGCTGTACACTTAGCATG	TATCCACATTAACAATGTCACC
MYC	CAGCTGCTTAGACGCTGGATT	GTAGAAATACGGCTGCACCGA
ORC5L	ATTACAAGAATTGGCTGACAG	TCTTTTGAAGGTTGCCTATGC

Genname	Forward Sequenz (5'-3')	Reverse Sequenz (5'-3')
PIM1	ACTTCGATGGGACCCGAGT	AGATGCTGACATTCTGAAGAG
PIM2	CTTTGATGGGACAAGGGTGT	TTAGGGCACAGCAGTCTG
RHAMM	AGCTGAAAGGGAAGGAGGC	AGCTTTCAAATTGAGCAGTAAC
RHOB	ACCGACGTCATTCTCATGTG	ATGATGGGCACATTGGGACA

2.8. Patientencharakteristika und Ansprechen auf Imatinib

Um einen Einblick in Imatinib-induzierte Veränderungen von Ph⁺ CD34⁺ Zellen auf Transkriptom-Ebene zu gewinnen, wurden 6 Patienten (5 Männer, 1 Frau) mit einer unbehandelten neu diagnostizierten CML in chronischer Phase untersucht. Die Patienten hatten ein medianes Alter von 61 Jahren (32–79 Jahre). Vier der sechs Patienten wiesen die b3a2 Bruchpunktvariante auf, während zwei Patienten die b2a3 Bruchpunktvariante des *BCR-ABL* Onkogens hatten. Die Patienten erreichten im Schnitt nach 0,9 Monaten (0,9–3 Monate) eine komplette hämatologische Remission und zeigten auf molekularer Ebene alle ein Ansprechen. Sie erreichten im Schnitt nach 10 Monaten (6–13 Monate) eine Reduktion der *BCR-ABL* Transkripte um im Median 3 log-Stufen (1,5–3). Dabei vertrugen die Patienten Imatinib gut und ohne signifikante Nebenwirkungen. Eine Bestimmung der *BCR-ABL* Bruchpunktvariante sowie das molekulare Monitoring der Patienten erfolgten an Blutproben gemäß der von Neumann et al. etablierten Methode im Routinelabor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Neumann *et al.*, 2003; Neumann *et al.*, 2008). Zum Zeitpunkt der Neudiagnose der CML mit *BCR-ABL* Transkript sowie nach 7 Tagen Therapie mit 400 mg Imatinib wurde ihnen jeweils 20 ml peripheres Blut entnommen, aus dem CD34⁺ Zellen angereichert wurden.

2.9. Die K562 Zelllinie als Modell für die chronische myeloische Leukämie

Die K562 Zelllinie (K562 Acc10) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Zellen stammen von einer 53jährigen Frau mit einer CML in Blastenkrise und wurden 1970 aus der Pleura entnommen. Sie tragen die b3a2 Transkriptionsvariante des für die CML charakteristischen *BCR-ABL* Fusionsgens und weisen einen komplexen Karyotyp aus, der bereits wenige Jahre nach der Zellgewinnung in der Literatur beschrieben wurde (Klein *et al.*, 1976; Lozzio and Lozzio, 1975).

Die in Suspensionskultur wachsenden Zellen wurden in 20 ml RPMI-1640 Medium (RPMI Medium) mit 10% fötalem Kälberserum (FBS) sowie 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (P/S) und 2 mM L-Glutamin (L-Glu) in 75 cm² großen Suspensionskulturflaschen in einem mit Wasserdampf gesättigtem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:4 passagiert. Dazu wurde ein Viertel der Zellen (5 ml) in 15 ml frisches, auf 37°C vortemperiertes RPMI Medium mit 10% FBS sowie P/S und L-Glu überführt.

Zur Kryolagerung wurden 1×10^7 Zellen sedimentiert, der Überstand verworfen und in Einfriermedium (90% FBS; 10% DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei -80°C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen und Kultivieren der Zellen wurden zunächst 10 ml RPMI Medium mit 20% FBS sowie P/S und L-Glu auf 37°C erwärmt. 500 µl des vorgewärmten Mediums wurden dann in das Kryotube gegeben, um das Einfriermedium aufzutauen. Die so entstandene Zellsuspension wurde danach in das ursprünglich vorbereitete Medium gegeben, um das für die Zellen toxische DMSO zunächst zu verdünnen und mit Hilfe einer Zentrifugation zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml vorgewärmten RPMI Medium mit 20% FBS sowie P/S und L-Glu aufgenommen und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Nach einem Tag wurden sie abzentrifugiert und in ein RPMI Medium mit 10% FBS sowie P/S und L-Glu überführt. Sämtliche Zentrifugationen erfolgten in einer Heraeus Zentrifuge bei 350 g für eine Dauer von 5 Minuten bei 20°C.

2.10. Isolierung von CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aus dem peripheren Blut

Die Isolierung von CD34+ Stamm- und Progenitorzellen erfolgte aus 20 ml frischem peripheren EDTA-Blut, von Patienten mit einer CML zum Zeitpunkt der Neudiagnose sowie nach 7 Tagen Therapie mit Imatinib. Das EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat) diente dabei als Antikoaganzmittel. Das Blut wurde innerhalb von 2 Stunden nach der Entnahme verarbeitet. Zunächst wurden die Mononukleären Zellen (MNCs) mit Hilfe der Dichtezentrifugation unter Verwendung von LymphoprepTM (Axis Shield, Oslo, Norwegen) mit einer Dichte von $1,077 \pm 0,001$ g/ml gewonnen.

Für die Dichtezentrifugation wurden 20 ml EDTA-Blut zunächst im Verhältnis von etwa 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und anschließend auf 15 ml LymphoprepTM aufgeschichtet. Die anschließende Dichtezentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 535 g ohne Bremse. Die im Interphasering befindlichen MNCs wurden komplett abgenommen und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, indem sie bei 535 g für 10 Minuten zentrifugiert und in PBS resuspendiert wurden. Anschließend wurden sie in einem adäquaten Volumen (max. 1×10^6 Zellen / ml PBS) aufgenommen, um die Zellzahl mittels des automatischen Zellzählgeräts Casy Modell TT zu bestimmen. Danach wurden die MNCs in einem Volumen von 2×10^8 Zellen / ml in Robosep[®] Puffer für die Selektionierung der CD34+ Stamm- und Progenitorzellen aufgenommen. Die Selektionierung erfolgte mit Hilfe des Robosep, der die weiteren Schritte automatisiert durchführte. Die eingesetzten Konzentrationen betrugen dabei 100 µl EasySep[®] magnetic Nanoparticles und 100 µl EasySep[®] selection Cocktail pro ml Zellsuspension. Das erforderliche Volumen des EasySep[®] selection Cocktails wird zunächst auf die Zellen gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend werden die EasySep[®] magnetic Nanoparticles zugegeben, um die CD34+ Zellen magnetisch zu labelen, und für 10 Minuten inkubiert. Danach werden die Zellen zwei Mal mit dem Robosep[®] Puffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Durch die Selektion entstehen zwei Fraktionen, zum einen die Negativfraktion, in der sich die CD34 negativen Zellen befinden und die Positivfraktion, in der sich die magnetisch gelabelten CD34 positiven Zellen an der Wand des Falcon Reaktionsgefäße befinden. Letztere wurden mit 1 ml Robosep[®] Puffer manuell von der Wand des Falcon Reaktionsgefäßes gespült und aufgenommen, um damit weitere Experimente durchzuführen.

Für die durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung wurden aus der selektionierten CD34+ Zellfraktion 1×10^5 Zellen entnommen. Bei 3 Patienten wurden 5.000 Zellen vor bzw. nach 7 Tagen Therapie für eine FISH-Analyse auf beschichtete Objektträger gegeben. Die restlichen selektionierten Zellen wurden abhängig von ihrer Zellzahl in RLT-Puffer weggefroren, der in einem Verhältnis von 1:100 mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde. Für bis zu 1×10^6 Zellen wurden 350 µl und zwischen 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen 600 µl RLT-Puffer verwendet.

2.11. Reinheitsbestimmung der CD34+ selektionierten Zellen

Die Reinheitsbestimmung der CD34+ selektionierten Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dies ist ein Verfahren, bei dem man Zellen mit Hilfe von Streulicht

und Fluoreszenzeigenschaften analysiert. Es können dabei parallel die Zellgröße und Granularität sowie beim FACS Calibur von Becton Dickinson bis zu vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden. Die zu analysierenden Zellen werden zunächst mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene inkubiert. Um Oberflächenantigen-positive und -negative Zellen unterscheiden zu können, markiert man zur Kontrolle in einem Parallelansatz Zellen mit unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps. Die markierten Zellen werden dann im Gerät mit Hilfe von Überdruck in die Messküvette geleitet. Durch diese Beschleunigung kommt es zur Auflösung kleinerer Zellaggregate. Damit passieren die Zellen nacheinander die Messeinheit des Gerätes. Am Analysepunkt trifft monochromatisches Licht ($\lambda=488\text{ nm}$) eines Argon-Lasers auf die hindurch fliegenden Zellen, die zum einen das einfallende Licht streuen und zum anderen durch die Fluorochrome an den Antikörpern Fluoreszenzlicht emittieren. Eine Detektionseinheit erfasst diese Signale und wandelt sie in elektrische Signale um. Die Abschwächung des Laserlichts in ihrem geraden Verlauf wird dabei als *forward scatter* (FSC) bezeichnet. Sie stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Mit dem *side scatter* (SSC) hingegen wird die Streuung des Lasers beim Auftreffen auf die Zellen aufgrund von granulären Bestandteilen gemessen. Sie ist somit ein Maß für die Dichte und Granularität der Zellen. Das emittierte Licht der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wird in verschiedenen Kanälen gemessen (FL1; $\lambda=530\text{ nm}$, FL2; $\lambda=585\text{ nm}$, FL3; $\lambda=650\text{ nm}$). Es dient zum einen der Unterscheidung, ob ein Oberflächenantigen vorhanden ist und zum anderen, in welchem Maße. Dies liegt daran, dass die emittierte Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Zahl der gebundenen Antikörper ist.

Je 1×10^5 selektionierte Zellen wurden für 5 Minuten bei 1600 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 μl PBS aufgenommen. Davon wurden je 5×10^4 Zellen mit 10 μl spezifisch bindendem FITC-konjugierte Antikörper gegen CD34 bzw. 10 μl unspezifischem FITC-konjugierte Iso-Antikörper des gleichen Isotyps für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1 ml PBS aufgefüllt und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 535 g für 5 Minuten, um überschüssigen Antikörper heraus zu waschen. Danach wurden die Zellen in 350 μl PBS-Puffer aufgenommen und der Reinheitsgehalt der CD34+ selektierten Zellen bestimmt. Für die Messung am Durchflusszytometer (FACScan, BD) wurden jeweils 10.000 Ereignisse aquiriert, was bedeutet, dass 10.000 Zellen gezählt wurden. Die Auswertung erfolgte über so genannte Punktwolkendiagramme (Dotplots), bei denen der SSC-Parameter auf der Y-Achse und die

FITC-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse dargestellt werden. Um eine Aussage über die Reinheit der selektierten Zellen treffen zu können, wurde zunächst der Grenzwert der Fluoreszenzintensität der Isotyp-Kontrolle festgelegt. Alle Ereignisse, bei denen die Fluoreszenzintensität über diesem Schwellenwert der Isotyp-Kontrolle lag, wurden als positiv gewertet. Abbildung 2.1 zeigt ein Beispiel für eine durchflusszytometrische Reinheitsbestimmung.

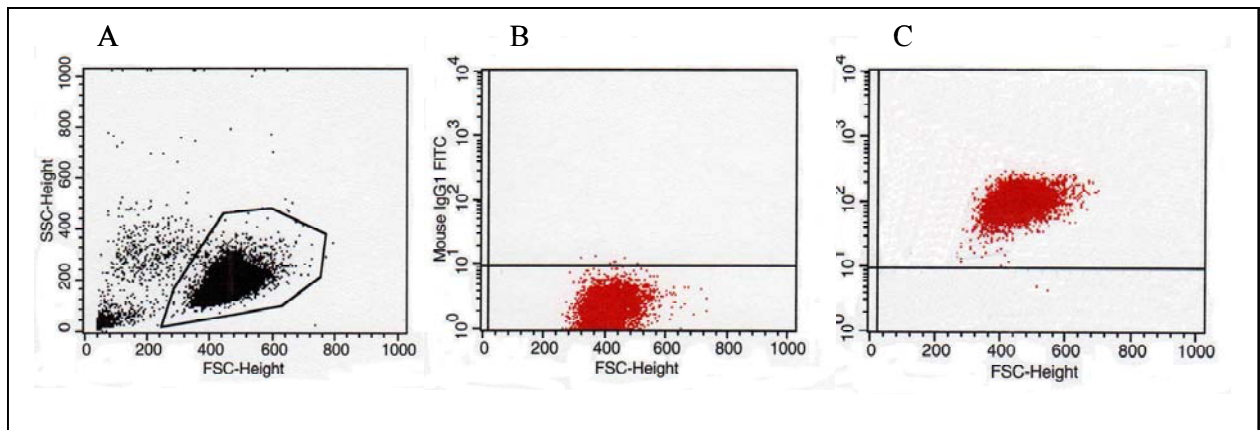


Abbildung 2.1 Exemplarisches Ergebnis einer Reinheitsbestimmung von selektierten CD34+ Zellen. A. Punktwolkendiagramm (Dot Plot) einer CD34+ selektierten Probe. Auf der X-Achse ist der FSC-Height aufgetragen, hier wird die Größe der Zellen abgebildet, auf der Y-Achse der SSC-Height, bei dem die Granularität der Zellen abgebildet wird. Die Hauptpopulation wird durch ein Gate markiert, die weitere Analyse erfolgt für diese Population. B. Punktwolkendiagramm zur Messung der Isotypkontrolle. Die mit dem unkonjugierten Isotypkontroll-Antikörper markierten Zellen zeigen eine geringe Eigenfluoreszenz. Hiermit wird der Schwellenwert festgelegt. C. Messung der CD34+ Zellen. Durch die Bindung des CD34-FITC-konjugierten Antikörpers an freie CD34-Antigene der selektierten Zellen steigt die Fluoreszenzintensität weit über den Schwellenwert und liefert somit Informationen über die Menge sowie die Reinheit der selektierten Zellpopulation in Bezug auf die Isotyp-Kontrolle.

2.12. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl wurde automatisiert mit Hilfe eines Zellzählgeräts (Casy Cell Counter, Modell TT) bestimmt, hierbei konnten lebende und tote Zellen für verschiedene Zellarten (Zelllinien, Primärzellen) aufgrund ihrer Größe unterschieden werden. Dazu wurde für jede Zellart ein spezifisches Programm erstellt. Die Unterscheidung, ob die Zellen tot oder lebendig waren, erfolgte aufgrund der Zellgröße. Gemessen wurde hierbei nach dem Prinzip der elektronischen Pulsflächenanalyse. Dabei wird das elektrische Signal, das beim Durchtritt einer Zelle durch die Messspore entsteht, über ein gepulstes Niederspannungsfeld und ein hoch standardisiertes digitales *Puls Processing* ausgewertet. Durch dieses Verfahrensprinzip werden Zellzahl, Zellvolumen, Zellgrößenverteilung und Zellaggregation sowie die Vitalität der Zellen mit großer Genauigkeit gemessen.

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der Vitalität der Zellen war eine Anfärbung der Zellen mit einer 0,5%igen (v/w) Trypanblau-Lösung in einem Mischungsverhältnis von 1:1 mit Zellen, die in PBS aufgenommen waren. Hierbei werden tote Zellen aufgrund von Membranschädigungen komplett blau angefärbt, während lebende Zellen weiß bleiben. Die Auswertung erfolgte unterm Lichtmikroskop unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Die Gesamtzellzahl wurde durch die Auszählung der 4 Eckquadrate (Quadrate), die ihrerseits in 16 Kleinquadrate unterteilt waren, ermittelt und über folgende Formel berechnet:

$$[\text{Zellkonz.} / \mu\text{l}] = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 10 \times \text{Verd. - faktor Trypanblau}}{\text{Anzahl Quadrate}}$$

Dabei ergibt sich der Faktor 10 aus dem Volumen ($0,1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$) = $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$ eines jeden Quadrates. Die Zellzahl pro Quadrat wird durch das Volumen von $0,1 \mu\text{l}$ geteilt bzw. mit dem Kehrwert multipliziert.

2.13. Fluoreszenz In Situ Hybridisierung

2.13.1. Allgemeines

Die Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH) ist eine Methode zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen im Zellkern. Die Technik der FISH beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung von DNA-Sonden, welche spezifische chromosomale Strukturen identifizieren. Prinzipiell können Sonden verwendet werden, die entweder spezifisch die Zentromer-Region von einzelnen Chromosomen, Gene oder ganze Chromosomen markieren. Es erfolgt eine Denaturierung der zu untersuchenden DNA sowie der eingesetzten Sonden-DNA. Damit werden die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix getrennt, was durch Hitze und / oder einer Behandlung mit alkalischer Lösung geschehen kann. Bei der anschließenden Hybridisierung lagern sich im Zuge der Renaturierung die DNA-Sonden an die komplementären Abschnitte der Patienten-DNA an. Dabei sind die DNA-Sonden entweder direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert oder sie werden mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Damit ist es möglich, die zu analysierenden Chromosomenstrukturen als Fluoreszenz-Signale auszuwerten (Abbildung 2.2). Bei der verwendeten *LSI BCR/ABL Dual Color, Dual Fusion* Sonde (Vysis) ist das *ABL* mit SpectrumGreen und *BCR* mit SpectrumOrange Farbstoff markiert. Prinzipiell sind dabei sowohl FISH-Untersuchungen an Interphase-Kernen als auch an Metaphase-Chromosomen möglich (Schoch *et al.*, 2005). Die *BCR*-Sonden hat eine Größe von ca. 650 kb, während die *ABL*-Sonde eine genomische Distanz von etwa 1,5 Mb umfasst. Aufgrund der Sondengröße

ist es damit möglich, neben der *BCR-ABL* Translokation auf Chromosom 22 (Ph Chromosom) auch auf Chromosom 9 die chromosomale Anomalie *ABL-BCR* nachzuweisen.

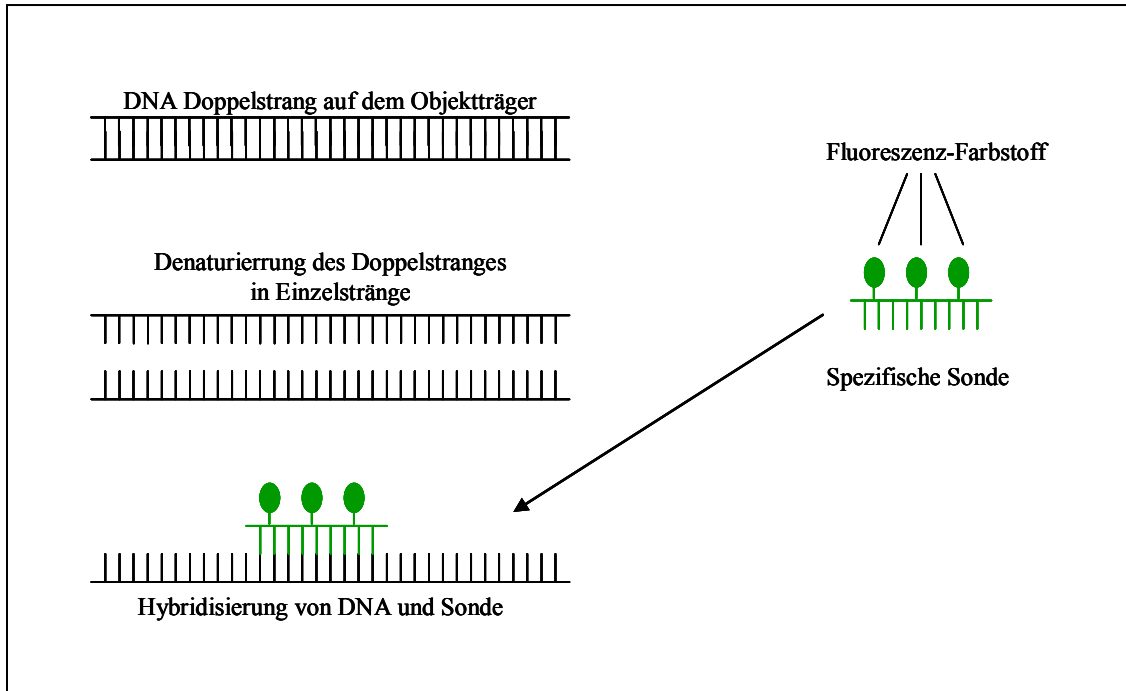


Abbildung 2.2 Prinzip der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung. Der DNA-Doppelstrang wird zunächst in zwei Einzelstränge denaturiert, damit im Hybridisierungsschritt eine spezifische Fluoreszenz-Farbstoff-markierte Sonde an die DNA binden kann.

2.13.2. Herstellung der Präparate

Für die FISH wurden zunächst 5.000 CD34+ Zellen von 3 CML-Patienten vor Therapie bzw. nach 7 Tagen Imatinib Therapie, K562 Zellen und als Negativkontrolle 5.000 PB MNCs einer Gesundkontrolle in 500 µl PBS aufgenommen und auf ein Well des adhäsiven Objektträgers (Thermo Fisher Scientific) pipettiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit waren die Zellen abgesunken und am Objektträger adheriert. Danach wurde das PBS vorsichtig abgeklopft und die Objektträger trockneten über Nacht, bevor sie bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C weggefroren wurden.

20x SSC Stammlösung

3M NaCl, 0,3M NaCitrat, pH 5,3

Als Fixierlösung für die CD34+ Zellen diente eine Mischung aus 94 ml reinstem Methanol sowie 6 ml 37%igem Formaldehyd. In diesem wurden die Objektträger für 10 Minuten bei

-20°C fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 2x für 5 Minuten in 2x SSC-Puffer gewaschen. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils für 3 Minuten in 70%igem, 85%igem sowie 100%igem Ethanol dehydriert und anschließend getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger für 2 Minuten bei 73°C in einer Formamidlösung aus Formamid, 20x SSC-Lösung sowie destilliertem Wasser (Verhältnis 7:1:2) mit einem pH-Wert von 7,0 eingelegt, um die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix zu trennen. Dann wurden die Formamidlösungsreste entfernt und die Objektträger wiederum wie oben beschrieben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und danach wiederum getrocknet. In der Zwischenzeit wurde eine Lösung aus 7 µl LSI/WPC Hybridisierungspuffer / 1 µl Sonde sowie 2 µl Wasser pro Objektträger hergestellt, für 3 Minuten bei 73°C denaturiert und danach bis zur weiteren Verarbeitung bei 42°C gelagert. Pro Objektträger wurden davon 9 µl aufgetragen. Anschließend wurden die Objektträger mit einem Deckglas eingedeckelt, mit Fixogum luftdicht abgeschlossen und für 20 Stunden in einer feuchten Hybridisierungskammer in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Waschlösung 1

0,4x SSC
0,3% NP40
ad H₂O
pH 7,0-7,5

Waschlösung 2

2x SSC
0,1% NP40
ad H₂O
pH 7,0±0,2

Das Fixogum wurde nach der Inkubation entfernt, dabei wurde zunächst das Deckglas auf dem Objektträger gelassen. Der Objektträger wurde in einer 4x SSC-Lösung, die mit 0,2% Tween versetzt war, geschwenkt und danach das Deckglas entfernt. Unmittelbar daran anschließend wurden die Objektträger in die auf 73°C erhitzte Waschlösung 1 gegeben und kurz geschwenkt. Sie verblieben für 2 Minuten in der Lösung, um anschließend in der bei Raumtemperatur befindlichen Waschlösung 2 für 1 Minute gewaschen zu werden. Nach den beiden Waschschritten wurden die Objektträger getrocknet und anschließend mit DAPI gefärbt. Dazu wurde die 5 mg/ml DAPI-Stammlösung 1:80 verdünnt und davon 0,5 µl in 10 ml 4x SSC mit 0,2% Tween gegeben, um eine Gebrauchslösung herzustellen. Je 1 ml dieser Gebrauchslösung wurde auf jeden Objektträger gegeben und für 2 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die DAPI-Lösung mit destilliertem Wasser abgespült und der

Objektträger wurde im Dunkeln getrocknet. Final erfolgte eine Eindeckelung mittels eines Tropfens Vektashield.

2.13.3. Fluoreszenz-mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Fluoreszenz-Signale der FISH-Analysen erfolgte am Zeiss Axiovert 100 Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung einer 100 W Quecksilberdampflampe sowie der ISIS-Software (MetaSystems). Dabei wurden Einzelfilter für die einzelnen Fluorochrome (DAPI, SpectrumGreen und SpectrumOrange) verwendet. Das Fluoreszenz-Mikroskop war mit einer Filterkombination ausgestattet, bei der die Anregungsfilter von Strahlenteiler und Sperrfilter unabhängig wählbar sind. Hierbei können die für die jeweiligen Fluorochrome benötigten Anregungswellen (-Filter) gewechselt werden, während Strahlenteiler und Sperrfilter in Position bleiben.

In die Auswertung wurde jede Zelle einbezogen, bei der der gesamte Kern ohne Überlappung mit anderen Zellkernen oder Artefakten sichtbar war. Für jeden Kern wurde die Anzahl der unterschiedlich-farbigen, eindeutigen Hybridisierungssignale ermittelt und deren Kombination miteinander dokumentiert. Anhand dieser Hybridisierungssignale konnte bewertet werden, ob eine Kolo-kalisation (Fusion) von *BCR* und *ABL* vorlag, wenn durch komplette oder teilweise Überlagerung der FITC und Texas Red-Signale ein gelbes Fusionssignal aufleuchtete. Es wurden pro Präparat 100 Zellkerne ausgezählt. Ein Zellkern galt als *BCR-ABL* positiv, wenn neben 2 *BCR-ABL*-Fusionssignalen, die auf dem Ph⁺ Chromosom und dem abnormalen Chromosom 9 liegen, noch mindestens ein *BCR*- sowie ein *ABL*-Signal detektiert werden konnten.

2.14. Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus CD34⁺ Zellen und K562 Zellen

Für die RNA-Extraktion wurden zunächst 5×10^6 mit DMSO-, Imatinib- oder Nilotinib behandelte K562 Zellen bzw. 2×10^5 - 1×10^7 CD34⁺ Zellen für 5 Minuten bei 2.400 rpm in einem Reaktionsgefäß pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden anschließend in 350 µl bzw. ab 1×10^6 Zellen in 600 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Zur Isolierung der RNA wurde das RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen in Verbindung mit dem RNase-freien DNase Set (Qiagen) verwendet. Die auf Eis aufgetauten RLT-Zelllysate wurden zunächst in eine Qia-Shredder-Säule gegeben und für 2 Minuten bei 13.000 rpm

homogenisiert. Dieser Prozess bewirkte eine Fragmentierung von hochmolekularen Substanzen wie DNA in dem Säulenfilter. Außerdem setzt es die Viskosität der Lösung herab. Die weitere Extraktion mit einem Zwischenschritt des DNA-Verdaues durch Verwendung von RNase freier DNase wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die isolierte RNA wurde in einem Volumen von 30 µl nukleasefreiem H₂O eluiert. Vor der weiteren Verwendung der RNA wurde sie einer Qualitätsbestimmung mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (siehe Kapitel 2.16) unterzogen.

2.15. Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte von 1 µl Nukleinsäurelösung bei 260 nm sowie 280 nm im NanoDrop® ND-1000. Die Extinktion von 1,0 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/µl. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist nach einer Bestimmung des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} ein Verhältnis von 1,8-2,0 auf.

2.16. RNA-Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bioanalyzers Agilent 2100

Eine Grundvoraussetzung für die Detektion von geringen Genexpressionsveränderungen mit Microarrays ist, dass die präparierte Total-RNA aus den RLT-Lysaten bzw. der enthaltenen *antisense* RNA nach der Amplifikation und Biotinylierung intakt ist. Deswegen wurde die RNA nach der Präparation am Biologisch-Medizinischem Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf unter Verwendung des Agilent 2100, eines RNA 6000 Nano Chips und RNA 6000 Nano Chip Kit auf Degradationen hin untersucht. Mit diesem Chip können 50-500 ng/µl an gesamter RNA hinsichtlich ihrer Qualität und RNA Konzentration analysiert werden. Die RNA-Analyse erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Die Analyse basiert auf einer Kapillargelelektrophorese, welche in den für die Untersuchung verwendeten Analyse-Chips stattfindet. Die zu analysierenden RNA-Proben migrieren in einem elektrischen Feld von der Kathode zur Anode und werden dabei ihrer Größe nach aufgetrennt. Während der Wanderung interkaliert der in der Gelmatrix enthaltene Fluoreszenzfarbstoff Cy5 in die Nukleinsäuren. Damit können die Fragmente mit Hilfe von Laser-induzierter Fluoreszenz registriert und mit Hilfe der *Agilent Bioanalyzer Software* ausgewertet werden. Das Ergebnis der etwa 40-minütigen Analyse wird schließlich in Form

eines Elektropherogramms dargestellt, in dem wird die gemessene Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird. Eine Total-RNA von guter Qualität zeichnet sich hierbei durch das Vorhanden sein von zwei scharf abgegrenzten Banden der ribosomalen 18S und 28S ribosomalen RNA aus, die im Elektropherogramm als zwei scharfe Peaks auf der sonst flachen Basislinie zu erkennen sind. Bei degradiert RNA fehlt ein Peak, während der verbleibende Peak meist durch eine Verschiebung zu kürzeren Migrationszeiten und durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität gekennzeichnet ist. Abbildung 2.3 zeigt isolierte Total-RNA und amplifizierte RNA von guter Qualität.

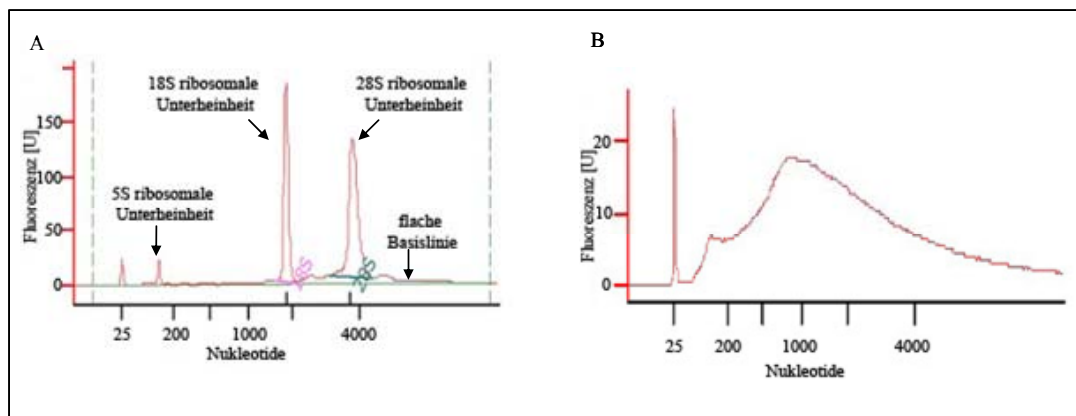


Abbildung 2.3 Qualitätsüberprüfung isolierter RNA A. Die Hauptbestandteile der isolierten Gesamt-RNA sind die ribosomalen RNA (18S- und 28S rRNA), die als diskrete und deutlich voneinander abgrenzbare Peaks zu erkennen sind und sich vom Hintergrundsignal klar trennen lassen. Die 18S rRNA liefert eine höhere Signalintensität wie die 28S rRNA. B. Die amplifizierte antisense RNA (aRNA) weist eine homogene Verteilung unterschiedlich langer RNA-Fragmente auf, deren Größe variiert und im Mittel bei etwa 1500 Basen liegt.

2.17. Genexpressionsanalysen mit Affymetrix Genechips

2.17.1. Theoretischer Hintergrund

Für die Analyse der differentiellen Genexpression von unbehandelten und 7 Tage mit Imatinib behandelten primären CD34+ Zellen sowie DMSO als Kontrolle / für 24 h mit Imatinib bzw. Nilotinib behandelten K562 Zellen wurden mRNA Präparationen unter Verwendung der RNA Microarray Technologie verwendet. Mit dieser Technik ist es möglich, die aktuelle Genexpressionsstärke von zahlreichen Genen gleichzeitig zu ermitteln und auf diese Weise Genexpressionsprofile zu erstellen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Microarrays handelt es sich um die „Human Genome Focus Oligonukleotide-Arrays“ (HG-Focus Arrays) der Firma Affymetrix, auf denen 22.215 Transkripte präsentiert sind, die für etwa 14.500 Gene codieren. Diese Arrays enthalten ein ca. 1,7 cm² großes, mit Silan beschichtetes Quarzplättchen. Durch eine Kombination aus Verfahren der Photolithografie sowie der kombinatorischen Chemie sind cDNA Nucleotid-Ketten mit einer Länge von 25 Basen (25-mer Oligonukleotid) auf diese Silan-Matrix synthetisiert. Ein Array enthält bis zu

500.000 verschiedene Areale (sog. *Tiles*) mit einer Fläche von jeweils 20 x 20 µm, auf denen jeweils 1×10^6 - 1×10^7 Kopien einer spezifischen Oligonukleotid-Sequenz (Sonde) liegen. Diese dienen der quantitativen Detektion der aRNAs (antisense RNA) mit komplementärer Sequenz. Die Expression spezifischer Gene kann durch die Hybridisierung der mit Streptavidin-Phycoerythrin konjugierten spezifischen Gentranskripte an die Sonden auf der Arrayoberfläche nachgewiesen werden.

Zu jeder exakten cDNA Oligonukleotidsequenz, die perfekt mit der komplementären Sequenz der Ziel-mRNA übereinstimmt (Perfect-Match-Sonde), gibt es auch eine Mismatch-Sonde, die bis auf einen 1-Basen-Mismatch im zentralen Bereich der Sonde die identische Sequenz aufweist. Über die Mismatch-Sonden erfolgt eine Quantifizierung von störenden Hintergrundsignalen, unspezifischen Hybridisierungen oder Kreuzhybridisierungen sowie eine Eliminierung selbiger über die Verrechnung der Signalintensitäten von Perfect-Match- und Mismatch-Sonde. Die Unterschiede in der Hybridisierungsintensität zwischen den Perfect-Match und den Mismatch-Sondenpaaren dienen als Indikator für die spezifische Bindung an die Zielsequenz.

Von den 22.215 repräsentierten Genen enthalten ca. 14.500 Gensequenzen von humanen Genen. Um verschiedene Chipanalysen miteinander vergleichen zu können, enthält jeder Array zusätzlich die Housekeeping-Gene GAPDH, β -Actin und STAT1. Informationen über die Hybridisierungseffizienz geben zusätzliche prokaryotische Kontrollsequenzen von Genen des bakteriellen Biosyntheseweges von *E. coli* (BioB, BioC und BioD) sowie des CRE-Rekombinasegens des Bakteriophagen P1. Weiterhin befinden sich an allen vier Ecken des Arrays zusätzliche so genannte B2-Oligonukleotide, die ein Ausrichten des Gitters gewährleisten und die Zuordnung der Oligonukleotide erleichtern.

Nach Vorinkubation des Arrays mit einem *Pre-Hybridization Mix* für 10 min bei 45°C unter Rotation der Chips erfolgt die Hybridisierung der aRNA an die Oligonukleotidsequenzen auf dem Chip. Nach Wasch- und Färbeschritten verbleiben nur noch die in der Probe befindlichen Nukleinsäuresequenzen, welche aufgrund von Basenkomplementarität an die entsprechenden Oligonukleotidsequenzen gebunden haben. Die hybridisierten Nukleinsäuresequenzen können aufgrund der durch die Färbeprozedur stattfindenden Bindung des Streptavidin-Phycoerythrin-Komplexes an die biotinylierte aRNA bei einer Emissionswellenlänge von

$\lambda=488$ nm detektiert werden. Anschließend folgt eine bioinformatische Auswertung der gemessenen Signalintensitäten.

2.17.2. aDNA-Synthese und *in vitro* Transkription von isolierter Total-RNA

Für die Erstellung der Genexpressionsprofile wurde zunächst aus Zelllysaten, die aus $3,5 \times 10^5$ – 1×10^7 unbehandelten bzw. behandelten Primärzellen bzw. 5×10^6 K562 Zellen hervorgingen, die gesamte RNA extrahiert (siehe Kapitel 2.14) und vor ihrer weiteren Prozessierung auf ihre Integrität hin überprüft (siehe Kapitel 2.16), da für die Arrayanalysen nur vollkommen intakte RNA verwendet werden sollte.

Die Aufarbeitung von isolierter Total-RNA zu amplifizierter und biotinylierter aRNA erfolgte mit Hilfe des MessageAmpTM aRNA Kits der Firma Ambion. Die Methode basiert auf dem RNA-Amplifikationsprotokoll, das in James H. Eberwines Labor etabliert wurde (Van Gelder *et al.*, 1990) und gliedert sich in die beiden Hauptschritte „cDNA-Synthese des Erst- und Zweitstranges“ und „*in vitro* Transkription“, denen jeweils ein Aufreinigungsschritt folgt. Die Verwendung des Kits erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Für die cDNA Synthese wurden 500 ng isolierter RNA der behandelten K562 Zellen oder 120 ng isolierter RNA der primären CD34+ Zellen eingesetzt und unter Zugabe von 1 μ l Spike-RNA (1:25.000 mit dH₂O verdünnt), die der Kalibrierung des Chips dient mit Hilfe von Oligo-(dt)-Primern revers transkribiert. Die Primer enthielten eine 5'-angehängte T7 Promotersequenz, welche als Ansatzstelle für die spätere *in vitro* Transkription diente. Nach erfolgter Zweitstrangsynthese schloss sich als nächster Schritt, ausgehend von dieser cDNA, die 14-stündige *in vitro* Transkription zur Synthese der biotinylierten cRNA (*complementary* RNA) an. Dazu wurden biotinylierte dNTPs (Enzo; Farmingdale, NY) verwendet. Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifikation wurde die fertig biotinylierte und amplifizierte aRNA erneut mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers 2100 auf ihre Qualität hin getestet.

2.17.3. Fragmentierung der aRNA

Für eine optimale Hybridisierung der biotinylierten aRNA mit den komplementären Oligonukleotidsequenzen musste diese vorher fragmentiert werden. Für die Fragmentierung wurden 5 μ g aRNA verwendet, die in 24 μ l eluiert waren. Anschließend wurde die Probe mit 6 μ l Fragmentierungspuffer (200 mM TRIS-Acetat, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc,

pH 8,2; Affymetrix) versetzt und bei einer Temperatur von 94°C für 35 Minuten inkubiert. Um ein Kondensieren der Probe an der Deckelinnenseite des Reaktionsgefäßes zu vermeiden, wurden die Proben mehrmals kurz abzentrifugiert.

2.17.4. Hybridisierung der fragmentierten cRNA auf Affymetrix Microarrays

Die Hybridisierung der Arrays wurde in der Affymetrix Core Lab Facility am Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine Prähybridisierung der Arrays für 10 Minuten mit 140 µl 1xMES-Hybridisierungspuffer bei 45°C und 60 rpm im Gen Chip® Hybridisierungs-Ofen 640 (Affymetrix). In dieser Zeit wurden 200 µl des Hybridisierungscocktails einschließlich der fragmentierten aRNA zusammen pipettiert, für 5 Minuten bei 99°C denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf 45°C abgekühlt und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Prähybridisierungslösung wurde der Array mit der Hybridisierungslösung befüllt und für 16 h bei 45°C und 60 rpm hybridisiert. Die Hybridisierungslösung wurde anschließend entfernt und der Array mit 280 µl Waschlösung A befüllt. Anschließend wurden die Arrays in die Waschstation (Gene Chips® Fluidics Station; Affymetrix) eingelegt. Nach Befüllung der Waschstation mit Waschpuffer A und Waschpuffer B wurden die Arrays mit dem jeweiligen Arraytyp entsprechenden Programm (Midi-euk2v3) gewaschen. Unmittelbar nach der Waschprozedur wurden 600 µl der Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung zu dem Array gegeben und 40 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 600 µl der Antikörperlösung. Nach einer 10minütigen Inkubation wurde die Antikörperlösung entfernt und zur Signalverstärkung durch weitere 600 µl Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung ausgetauscht, mit welcher der Array für ebenfalls 10 Minuten inkubiert wurde. Um sämtliche Reste der Färbelösung sowie überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde der Array erneut gewaschen.

12x MES (2-[N-Morpholino] Ethanolsulfonsäure)-Puffer

1,22 M MES; 0,89 M [Na⁺]; pH 6,5-6,7

2x Hybridization Buffer

100 mM MES; 1 M [Na⁺]; 0,01% Tween 20

1x MES Stain Buffer

100 mM MES; 1 M [Na⁺]; 0,05% Tween 20

Hybridisierungscocktail (200 µl, für einen Array)

Fragmentierte aRNA (4,8 µg)	30 µl
Kontroll Oligonukleotid B2 (3 nM)	3,3 µl
20x Eukaryotische Hybridisierungskontrolle (bioB, bioC, bioD, cre)	10 µl
Heringssperma DNA (10 mg/ml)	2 µl
acetyliertes BSA (50 mg/ml)	100 µl
dH ₂ O	52,7 µl

Antikörperlösung (600 µl, für einen Array)

2x MES Stain Buffer	300 µl
acetyliertes BSA (50 mg/ml)	24 µl
Normal Goat IgG-Antikörper (10 mg/ml)	6 µl
Biotin Anti-Streptavidin (0,5 mg/ml)	6 µl
ddH ₂ O	264 µl

Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (600 µl, für einen Array)

2x MES Stain Buffer	300 µl
acetyliertes BSA (50 mg/ml)	24 µl
Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml)	6 µl
ddH ₂ O	270 µl

Waschpuffer A: nicht stringenter Waschpuffer

6x SSPE, 0,01% Tween 20

Waschpuffer B: stringenter Waschpuffer

100 mM MES, 0,1 M [Na⁺], 0,01% Tween 20

2.17.5. Scannen der hybridisierten Arrays und Datenanalyse

Die hybridisierten Arrays wurden in einem GenArray® 2500 Scanner von Agilent bei der Anregungswellenlänge des Phycoerythrins von $\lambda=488$ nm gescannt. Dabei betrug die Pixelauflösung 3 µm und die emittierte Wellenlänge $\lambda=570$ nm. Die Quantifizierung jedes Scans erfolgte, indem die mittlere Signalintensität auf eine Zielintensität von 100 gesetzt

wurde. Im Anschluss erfolgte eine bioinformatische sowie statistische Auswertung der Daten (siehe Kapitel 2.18).

2.18. Statistische Analysen und Ermittlung von differenziell hoch- oder herunterregulierten Genen

2.18.1. Analyse der Genexpressionsdaten von CML-Patienten vor und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie

Die Auswertung der Chips erfolgte durch Herrn Dr. Akos Czibere, Mitarbeiter an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinischen Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Die Array-Daten wurden mit Hilfe der Software dChip analysiert. Dazu wurde eine smoothing spline Normalisierung durchgeführt und die Expressionswerte mit Hilfe des *perfect match-mismatch difference model algorithm* (dChip) berechnet. Gene wurden als differenziell exprimiert angesehen, wenn das Transkriptionslevel als Vielfaches der Kontrolle $>1,5$ war und zugleich $p < 0,05$ war. Als weiteres einschränkendes Kriterium musste der *lower confidence bound* (LCB) $>1,2$ sein, um die Gene als differenziell exprimiert anzusehen. Der LCB ist dabei eine stringente Abschätzung in der Expressionsänderung als ein Vielfaches der Kontrolle. Es wurde gezeigt, dass er eine ausreichend hohe statistische Genauigkeit hat (Li and Wong, 2001). Die Verwendung des LCB bietet eine 90%ige Sicherheit, dass die Veränderung in der Expressionsstärke, die ein Vielfaches der Kontrolle ist, ein Wert über dem ausgewiesenen LCB liegt. Der Fold Change ist dabei bis zu 300% größer als der LCB (Li and Wong, 2001). Eine hierarchische Clusteranalyse wurde mit Hilfe des *correlation-based centroid-linkage Algorithmus* (dChip) erstellt. Außerdem wurde ein Punktwolkendiagramm erstellt, um die Veränderungen in der Genexpressionsanalyse grafisch darzustellen.

2.18.2. Analyse der Genexpressionsdaten der K562 Zelllinie

Die Auswertung der Daten erfolgte durch den Informatiker der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Michael Roskopf. Zum Zeitpunkt der Datenanalyse war die Auswertung mit Hilfe des dChip noch nicht etabliert.

Für die Durchführung der Qualitätskontrolle, Normalisierung sowie Datenanalyse wurde ein Paket von statistischen Funktionen mit der Programmiersprache „R“, die im Bioconductor Projekt (<http://www.bioconductor.org>) integriert sind, verwendet. Für die Qualitätskontrolle der einzelnen Proben und Hybridisierungen wurden Histogramme der *Perfect-Match*-Intensitätsverteilungen, 5' nach 3' RNA Degradationsplots, Boxplots sowie *Scatter*-Plots verwendet. Die Rohdaten der Arrays wurden mit Hilfe der VSN-Methode (*variance stabilization normalization*) normalisiert. Bei dieser Methode werden experimentell bedingte Unterschiede in den relativen Fluoreszenzintensitäten untereinander ausgeglichen. Die Intensitäten werden bei dieser Methode logarithmisch aufgetragen, wodurch die Varianz der Proben unabhängig voneinander sehr gering ausfällt. Um Proben von DMSO-behandelten und mit dem Medikament Imatinib bzw. Nilotinib behandelten K562 Zellen miteinander vergleichen und somit differenziell exprimierte Gene identifizieren zu können, wurde auf die normalisierten Daten der SAM-Algorithmus (*Significance Analysis of Microarrays*; <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>) für gepaarte Proben angewendet. Der Algorithmus enthält eine stufenlos einstellbare Skala für die *false discovery rate* (FDR) für signifikant hoch- bzw. herunterregulierte Gene. Bei der Methode erfolgte eine Permutation aller Daten mit Hilfe eines Zwei-Klassen-Moduls für ungepaarte Proben über 1000 Zyklen. Die FDR bezeichnet die Anzahl von falsch positiven Genen innerhalb einer Gruppe von signifikanten Genen. Sie wurde auf einen Wert von 5% festgelegt. Die Auswertung, ob ein Gen als differenziell exprimiert angesehen wurde, erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen *students t*-Tests. Als weiteres einschränkendes Kriterium wurden Gene betrachtet, deren *fold change* Werte >1,5 aufwiesen. Bei der Ermittlung der *fold changes* wurden die Fluoreszenzintensitäten der normalisierten und miteinander korrespondierenden Proben gemittelt und relativ zu den mit DMSO und den Medikamenten behandelten Proben berechnet.

2.19. Verifizierung ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen „real-time“ PCR

2.19.1. Reverse Transkription

Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reversen Transkriptase nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden in einem 20 µl Ansatz 100 ng zelluläre RNA aus K562 Zellen sowie 25 ng zelluläre RNA aus CD34+ Zellen mit RNase-freiem Wasser für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis

gestellt. Nach Zugabe eines Reaktionsmixes bestehend aus 8 µl Transkriptase Puffer [5x], 0,4 µl DTT [0,1 M], 4 µl dNTPs [10 mM], 1,2 µl N6-Random Primer [100 ng], 4,5 µl RNase freiem Wasser, 1,25 µl M-MLV Reverse Transkriptase [250 U] sowie 0,65 µl RNase Inhibitor [26 U] wurden die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die M-MLV-RT für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.19.2. Primer Design

Die Primer wurden selbst konstruiert und sind der Tabelle 2.8 zu entnehmen. Für das Primerdesign wurde von jedem Gen die *coding sequence* (CDS) des jeweiligen Gens von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ermittelt. Die Primer wurden unter Verwendung der Software CloneManager Version 5 Exon-übergreifend konstruiert, um sicher zu stellen, dass sie spezifisch für die mRNA sind. Dabei wurde die Schmelztemperatur der Primer näherungsweise mit Hilfe der „Oligonucleotide Data Calculation“ (www.jenabioscience.com/) unter dem nach der 4+2-Regel berechnet. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich der Schmelzpunkt pro Adenin oder Thymin um 2°C bzw. pro Cytosin oder Guanin um 4°C erhöht. Außerdem wurde ein *Nukleotid Blast* der Primer durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), um die Spezifität der Primer für das gewünschte Gen sicher zu stellen. Die Primeretablierung erfolgte am Light Cycler 1.2 (Roche), wo die exakte Annealing-Temperatur ausgetestet wurde. Synthetisiert wurden die Primer bei der Firma TIB MOLBIOL, welche die nötige Reinheit der Primer über Gelfiltration garantiert. Die Spezifität der Primer wurde zum einen über die Schmelzkurvenanalyse überprüft, zum anderen wurden Proben auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen, um die DNA-Fragmentgröße zu bestimmen. Dabei diente eine 100 bp Leiter als Standard und das Gel wurde mit einem 1x TBE Puffer sowie 2% Agarose hergestellt und mit 1x TBE Puffer überschichtet. Die 5x TBE Puffer Stammlösung bestand aus 450 mM Trisborat sowie 10 mM EDTA.

2.19.3. Quantitative „real time“ PCR

Die quantitative „real-time“ PCR (qRT-PCR) diente der Verifizierung der Genexpressionsdaten, die aus den Microarrays gewonnen wurden. Sie wurde am Roche Light Cycler 1.2 durchgeführt. Zur statistischen Absicherung wurde die PCR für jedes Gen mehrfach durchgeführt, für die Zelllinienexperimente 4x, bei dem Patientenmaterial für jeden Patienten. Eine Reaktion bestand aus 2 µl cDNA, 11,6 µl H₂O, 2,4 µl MgCl₂ [4 mM], 1 µl *Forward-Primer* [10 pM], 1 µl *Reverse-Primer* [10 pM] sowie 2 µl Sybr Green. Für die Experimente mit Patientenmaterial sowie die Nilotinib-behandelten versus DMSO-behandelten K562

Zellen diente die 18S rRNA als Referenzgen, da für beide Genexpressionsanalysen kein geeignetes Referenzgen gefunden werden konnte. Für die Zellkulturexperimente beim Vergleich Imatinib-behandelte Zellen versus DMSO-behandelte K562 Zellen wurde METAP1 als Referenzgen verwendet. Getestet wurden ausgewählte Zielgene. Das PCR-Programm für die qRT-PCR ist Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8 qRT-PCR Programm

Programm-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95°C	5 min	1
Amplifikation	95°C	30 sek	40
	60°C	30 sek	
	72°C	30 sek	
Schmelzkurvenanalyse	72°C	5 min	1
	40°C	5 sec	
	96°C	0 sek	
Kühlung	40°C	30 sek	1

Die Daten für jedes Zielgen, die aus der PCR generiert wurden, wurden von der *Roche Lightcycler Software Version 3.5* als C_t -Wert (*threshold cycle*) ausgegeben. Zur Normalisierung wurde zunächst für jede Probe die Differenz jedes Zielgens und Referenzgens berechnet (ΔC_t). Anschließend erfolgte die Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Werts. Hierzu wurde der Wert der unbehandelten Kontrollprobe von der behandelten Probe abgezogen. Die entlogarithmierten Werte dieser Differenz beschreiben die *fold changes*. Folgende Formel veranschaulicht die Berechnung eines *fold changes*:

$$\text{Fold Change} = 2^{[C_t \text{ Targetgen} - C_t \text{ Referenzgen}]_{\text{unbehandelte Probe}} - [C_t \text{ Targetgen} - C_t \text{ Referenzgen}]_{\text{behandelte Probe}}}$$

Dabei ist zu beachten, dass bei der Verwendung der Formel vorausgesetzt bzw. angenommen wird, dass die Effizienz der PC bei einem Wert von 2 liegt. Zur Kontrolle wurden die Amplifikationsprodukte in einem ethidiumbromidgefärbten 2%-igen Agarosegel visualisiert.

2.19.4. Berechnung der Signifikanz

Die Berechnung, ob ein Gen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant differenziell exprimiert ist, wurde mit Hilfe des zweiseitigen gepaarten *students t*-Test durchgeführt, wobei die aus den PCR-Reaktionen ermittelten ΔC_t -Werte die Grundlage für die Berechnungen bildeten. Die Gene wurden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen

als signifikant differenziell exprimiert angesehen, wenn die Signifikanz bei einem Wert von $p < 0,05$ und als hoch signifikant angesehen, wenn der Wert $p < 0,001$ betrug.

2.19.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden ebenso wie ein geeigneter Längenstandard mit 4 Teilen Ladepuffer versetzt und in einem 2%igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei 140 V aufgetrennt. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte mittels einer Ethidiumbromid, das dem Gel direkt zugegeben wurde (3 μ l in 100 ml Agarosegel). Die Betrachtung und Fotografie des Gels erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm.

2.20. Untersuchung zur Proliferation

Für den Nachweis, in welcher Weise die K562 Zellen durch die Medikamente Imatinib bzw. Nilotinib beeinflusst werden, wurde ein MTS-Proliferationsassay (*Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*) der Firma Promega verwendet. Dabei handelt es sich um eine colorimetrische Methode, mit der man Aussagen über die Zellproliferation treffen kann. Hierzu werden das Reagenz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) sowie das Elektronen koppelnde Phenazin Ethosulfat (PES) verwendet.

Das MTS-Tetrazolium Reagens (Owen's Reagens) erfährt eine Bio reduktion durch die Zellen, wodurch ein farbiges Formazan-Produkt entsteht (Barltrop *et al.*, 1991). Die Umwandlung wird vermutlich durch NADPH bzw. NADH, welches durch Dehydrogenase-Enzyme in metabolisch aktiven Zellen gebildet wird, erreicht (Berridge and Tan, 1993). Die Zellen werden für 1-4 Stunden mit der MTS-Lösung inkubiert und anschließend mit einem ELISA-Reader (Victor Wallac 4200) bei einer Absorption von 490 nm gemessen (Cory *et al.*, 1991; Riss and Moravec, 1992). Die vorher gelbe MTS-Substanz wird braun, bis sie abgesättigt ist und keine weitere Farbreaktion mehr erfolgen kann.

Für diesen Proliferationsassay wurden zunächst je 1×10^6 mit DMSO behandelte K562 Zellen, mit 0,5 μ M Imatinib sowie mit 0,05 μ M Nilotinib behandelte K562 Zellen in Doppelansätzen für 24 Stunden in RPMI mit 10% Fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml

Streptomycin sowie 2 mM L-Glu inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und in Doppelansätzen in eine 96-Wellplatte mit flachem Boden gegeben. Je 100 µl H₂O und unbehandeltes Medium als Doppelansätze dienten als Leerwert bzw. Referenz. Zu jeder Probe wurden 20 µl MTS-Substrat gegeben und die Platte bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt für 2 bzw. 4 Stunden inkubiert und danach photometrisch ausgewertet.

2.21. Apoptose-Assay

Zur Bestimmung der Veränderung der Apoptoserate der Zellen durch den Einfluss der verschiedenen TKIs wurden 2 verschiedene Assays verwendet, zum einen ein Sandwich-ELISA (*enzyme linked immunosorbant assay*), zum anderen ein Annexin-5 Assay.

2.21.1. Sandwich-ELISA

Um frühe apoptotische Effekte von Imatinib bzw. Nilotinib nachweisen zu können, wurde der Cell Death Detection ELISA^{PLUS} Assay von Roche verwendet. Dieser Assay basiert auf einem Sandwich-ELISA, bei dem monoklonale Mausantikörper gegen DNA und Histone verwendet werden, was eine spezifische Determination der Mono- und Oligonucleosomen in der Zytoplasmafraktion der Zell-Lysate ermöglicht.

Die endogene Endonuklease ist Ca²⁺ und Mg²⁺ abhängig und spaltet doppelsträngige DNA an der internucleosomalen Linker-Region, und generiert dabei Mono- und Oligonukleotide. Im Gegensatz dazu ist die DNA der Nucleosomen ein fester Komplex mit den Kernhistonen H2A, H2B, H3 und H4, was sie vor der Spaltung durch die Endonuklease schützt (Burgoyne *et al.*, 1974; Stach *et al.*, 1979). Der hier verwendete ELISA zeigt das frühe Stadium der Apoptose basierend auf der Tatsache, dass sich bereits Stunden vor dem Zusammenbruch der Plasmamembran Mono- und Oligonucleosomen im Zytoplasma der apoptotischen Zellen anreichern (Bonfoco *et al.*, 1995; Duke and Cohen, 1986; Terui *et al.*, 1995).

Für den Assay wurde zunächst das Zelllysate auf eine Streptavidin-beschichtete Mikroplatte gegeben. Diese wurde mit einem Mix aus Anti-Histon-Biotin-AK und Anti-DNA-POD-AK (Peroxidase-konjugiert) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der Nucleosomen sowie an den

Immunokomplex der Streptavidin-beschichteten Mikroplatte. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD-AK mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Ungebundener Antikörper wird durch Waschschriffe entfernt. Eine Determination des Nucleosomen-Gehalts im Immunokomplex erfolgt über das POD, welches photometrisch über einen Farbumschlag des zugegebenen ABTS-Substrats bestimmt wird.

Das experimentelle Setup entsprach dem von Kapitel 2.20. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden 10.000 Zellen bei 2.500 rpm zentrifugiert, in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert und 20 µl des Überstands auf die Streptavidin-beschichtete Mikroplatte pipettiert. Als Positiv-Kontrolle diente der mitgelieferte DNA-Histon-Komplex, als Negativkontrolle Wasser. Zu den 20 µl Proteinlysate wurden 80 µl des Immunreagenz bestehend aus 72 µl *Incubation Buffer*, 4 µl Anti-Histon-Biotin sowie 4 µl Anti-DNA-POD gegeben und für 2 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung abpipettiert und die Wells wurden drei Mal mit 250 µl *Incubation Buffer* gespült. Anschließend wurden 100 µl ABTS-Lösung in jedes Well gegeben und die Platte für etwa 10-15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert, bis die Farbreaktion abgeschlossen war. Danach wurde die Platte bei einer Wellenlänge von $\lambda=405$ nm ausgelesen und es erfolgte eine relative Quantifizierung der Apoptose.

2.21.2. Annexin-5-Assay

Die Methode zur Untersuchung von späten apoptotischen Effekten wurde mit Hilfe des *Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit 1* durchgeführt. Apoptotische Merkmale sind die Kondensation des Zytoplasmas sowie des Zellkerns und der innernukleosomalen Spaltung der DNA. Daneben tritt ein Verlust der Plasmamembran-Integrität auf, welche ein frühes Ereignis ist. In apoptotischen Zellen transloziert das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) aus der inneren Membranschicht und wird auf der äußeren Seite exponiert.

Bei Annexin V handelt es sich um ein 35-36 kDa schweres Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, welches sich durch eine hohe Affinität für PS auszeichnet und an Zellen mit exponiertem PS bindet. Diese Bindung des Annexins bildet die Basis der Apoptosemessung mittels Annexin V. Um frühe apoptotische Zellen nachzuweisen, wird ein Lebendfarbstoff

wie 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) zugegeben. Lebende Zellen mit intakter Membran verhindern ein Eindringen von 7-AAD, während tote und beschädigte Zellen für 7-AAD durchlässig sind. Annexin V-PE positive und zugleich 7-AAD negative Zellen befinden sich in einer frühen Apoptose-Phase, während Zellen, die für beide Komponenten positiv gefärbt sind, sich in der Endphase der Apoptose befinden, nekrotisch oder tot sind. Annexin V-PE negative 7-AAD negative Zellen hingegen sind viabel.

Zur Bestimmung der Apoptoserate der K562 Zellen mittels Annexin-V-Tests wurden diese zunächst für 24 h mit DMSO, 0,5 μ M Imatinib bzw. 0,05 μ M Nilotinib inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1x Bindepuffer aufgenommen, dabei betrug die Zellkonzentration 1×10^6 / ml. Die Färbung von 1×10^5 Zellen mit 5 μ l Annexin-V-PE sowie 5 μ l 7-AAD erfolgte für 15 min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurde die Inkubation durch Zugabe von 400 μ l 1x Bindepuffer gestoppt und die Auswertung erfolgte innerhalb von einer Stunde am FACS Calibur.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden maximal 25.000 Zellen gezählt. Dabei wurden Annexin V-PE gefärbte Zellen im FL2 Kanal bei einer Wellenlänge von $\lambda=585$ nm sowie 7-AAD gefärbte Zellen im FL3 Kanal bei einer Wellenlänge von $\lambda=650$ nm registriert. Die Spezifität sowie die Fluoreszenzintensitäten wurden grafisch als zweidimensionale Dotplots dargestellt. Dabei wurden die Fluoreszenzintensität des Annexins auf der X-Achse und die des 7-AADs auf der Y-Achse dargestellt.

2.22. Zellzyklus-Analysen

Die Zellzyklus-Analysen von unbehandelten sowie mit den TKIs behandelten K562 Zellen erfolgten durchflusszytometrisch unter Verwendung des Thymidinanalogs *Bromdesoxyuridin* (BrdU). Man kann mit dieser Methode für einzelne Zellen den Eintritt in die S-Phase detektieren. Das *BrdU*, das zugegeben wird, tritt dabei in Konkurrenz zum intrazellulär synthetisierten Thymin während der Replikation und wird anstatt diesem in die neu synthetisierte DNA von denjenigen Zellen eingebaut, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Das inkorporierte *BrdU* kann anschließend mit Hilfe entsprechender BrdU-spezifischer Antikörper (*Anti-BrdU-FITC*) im Durchflusszytometer detektiert werden. In einer Gegenfärbung wurden außerdem die Zellen mit dem Lebendfarbstoff 7-AAD

behandelt. Dieser Lebendfarbstoff ist in der Lage, komplette DNA zu färben. Mit dieser Kombination ist es unter Verwendung einer Zweifarben-FACS-Analyse möglich, die Anzahl der Zellen zu bestimmen und sie hinsichtlich der einzelnen Zellzyklusphasen, die durch die Intensitäten des Farbstoffs *7-AAD* definiert sind, zu bestimmen. Die Zellzyklusanalysen wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

Je 3×10^6 mit DMSO, mit 0,5 μM Imatinib bzw. 0,05 μM Nilotinib behandelte Zellen wurden mit 10 μl BrdU-Lösung pro ml Medium bei 37°C für 6 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst in PBS-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 μl Cytofix/Cytoperm Puffer resuspendiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Perm/Waschpuffer erfolgte eine 5minütige Pelletierung der Zellen, das Zellpellet wurde in 100 μl Cytofix/Cytoperm Puffer aufgenommen und für 25 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und über Nacht in 1 ml *Staining Buffer* bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Sie wurden am nächsten Tag wieder zentrifugiert und mit 1 ml Cytofix/Cytoperm Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μl Cytoperm Plus Puffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, bevor sie wieder pelletiert und mit dem Perm/Waschpuffer zentrifugiert wurden. Die Refixierung der Zellen erfolgte in 100 μl Cytofix/Cytoperm Puffer für 5 Minuten auf Eis. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift. Danach wurden die Zellen mit 100 μl DNase (300 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und für 1 h bei 37°C inkubiert, bevor der nächste Waschschrift erfolgte. Danach wurden die Zellen in 50 μl Perm/Waschpuffer, mit dem fluoreszierenden Anti-BrdU-Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gewaschen. Schließlich erfolgte eine Resuspendierung in 20 μl 7-AAD-Antikörper und die Zellen wurden in 1 ml *Staining Buffer* aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Für eine Auswertung wurden max. 20.000 Events akquiriert. Die Auswertungen wurden als Dotplots dargestellt, dabei wurden die *BrdU*-FITC-Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse und die *7-AAD*-Fluoreszenzintensität auf der X-Achse aufgetragen.

2.23. Western Blot Analysen

2.23.1. Herstellung von Zelllysaten für die Proteinanalyse

Zur Proteinextraktion wurden 150 µl Lysepuffer, der aus einer 1:10 Verdünnung des *10X Lysis Buffer* (Cell Signaling) mit destilliertem H₂O sowie Zugabe von 1 mM PMFS (Phenylmethylsulfonylfluorid) hergestellt wurde, auf ein für 5 Minuten bei 1300 rpm mit kaltem PBS gewaschenes Zellpellet von 4x10⁶ K562 Zellen gegeben. Die Zellen wurden während einer 10minütigen Inkubation auf Eis 2x durch eine 26 G (Gauge) Nadel gepresst, um noch vorhandene DNA zu fragmentieren und die Viskosität zu erhöhen. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und einer Temperatur von 4°C.

2.23.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *BCA Protein Assay Reagent Kits* in einer 96 Well Platte mit Hilfe von Bicinchoninsäure (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Dazu wurden 25 µl des 1:10 verdünnten Proteinlysats mit je 200 µl der im Kit enthaltenen Lösungen B (4% Kupfersulfat) und A (Bicinchonin-Lösung) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion am Fluostar Optima ELISA-Reader gemessen. Dabei diente eine BSA Verdünnungsreihe als Proteinstandard, worüber im Nachhinein der Proteingehalt der Proben berechnet wurde.

2.23.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4x Laemmli-Puffer

Tris, pH 6,8	0,25 M
SDS	8%
Glycerol	40%
Bromphenolblau	0,04%
β-Mercaptoethanol	4%

5x Laufpuffer

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1%
ad dH ₂ O	

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Laemmli mittels einer Mini Protean IITM-Kammer mit einer Laufstrecke von 7,2 cm. Es wurden jeweils 45 µg Proteinlösung pro 25 µl Zelllysate mit 10 µl 4x Laemmli-Puffer vermischt, 7 Minuten bei 97°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel unter Verwendung von 10% bzw. 12% Acrylamid, 1,5 M TRIS pH 8,8, 10% SDS, 10% APS als Radikalenstarter und TEMED als Polymerisierungskatalysator gegossen und mit Ethanol überschichtet. SDS unterbricht nichtkovalente Bindungen bei Proteinen und zerstört die Quartär- und Tertiärstrukturen. Nach einer 40-minütigen Polymerisierung des Trenngels und der Reinigung des zuvor mit Ethanol überschichteten Gelrands wurde das Sammelgel gegossen. Nach einer erneuten 40-minütigen Polymerisation wurden die Proben sowie 10 µl des Proteingrößenstandards (*SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas*) in die mit 1x Laufpuffer ausgespülten Taschen pipettiert und die Proteintrennung in 1x Laufpuffer bei 180 V durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als der Blaumarker sich ca. 3 mm oberhalb des unteren Gelrands befand.

Polyacrylamidgel

a) Trenngel (Ansatz für 2 Gele à 5,5 cm x 8,5 cm)

Gel	10%	12 %
dH ₂ O	4,0 ml	3,3 ml
Acrylamid	3,3 ml	4,0 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

b) Sammelgel (Ansatz für 2 Gele à 5,5 cm x 8,5 cm)

dH ₂ O	3,43 ml
Acrylamid	0,83 ml
1 M Tris, pH 6,8	0,63 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	5 µl

2.23.4. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurde das Trenngel zusammen mit Whatman Blotting-Papier und der zuvor mit Methanol angefeuchteten Membran für 10 Minuten im Blotting-Transfer-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde auf 2 Lagen feuchtes Blotting-Papier gelegt, darauf kam das Trenngel und zwei weitere Lagen Blotting-Papier. Das Sandwich wurde mit der Gelseite zur Kathode gerichtet in die Blotkammer gelegt und je nach Proteingröße für 30-40 Minuten bei 15 V geblottet, damit die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern konnten. Dabei wurde der Proteingrößenstandard mit auf die Membran geblottet und war als 4farbige Leiter gut sichtbar. Die Membran wurde anschließend feucht bei 4°C gelagert. Abbildung 2.4 zeigt den Aufbau des Blotsystems.

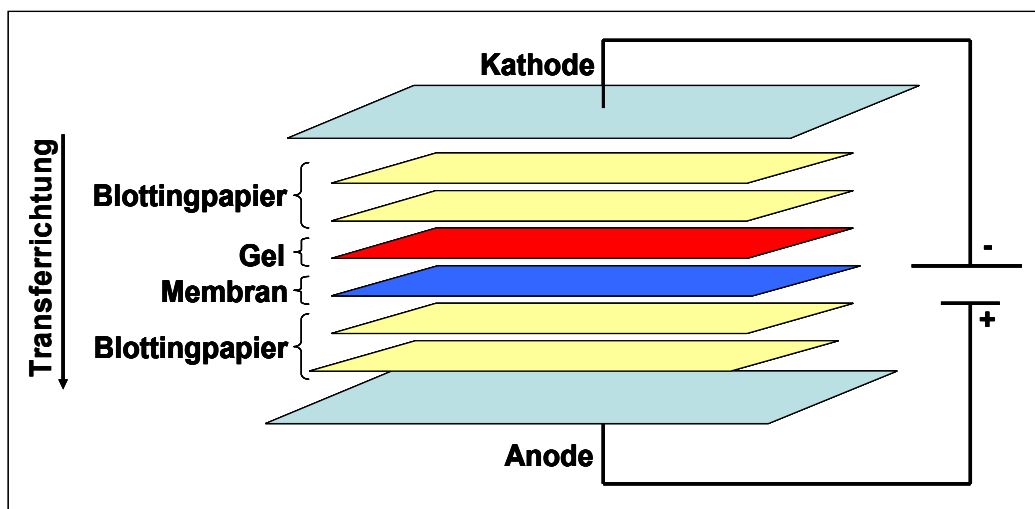


Abbildung 2.4 Schematischer Aufbau des Western Blots. Die im Gel aufgetrennten Proteine wandern durch die angelegte elektrische Spannung von der Kathode zur Anode und werden dadurch auf die Membran transferiert.

Blotting-Transfer-Puffer (Bjerrum-Puffer pH 9,2)

Tris-Base	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20%
SDS	0,0375%
ad H ₂ O	

2.23.5. Immundetektion zum Nachweis von Proteinen

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit TBS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran für 1 Stunde im Blockingpuffer auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für 5 Minuten gewaschen und

anschließend für 1,5 Stunden mit dem jeweiligen Primär-AK (1:1000 in TBST / 5% BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere dreimalige Waschung der Membran mit TBST für je 5 Minuten sowie eine 1stündige Inkubation mit dem Sekundär-AK (1:2000 in TBST / 5% Milchpulver). Nach einer finalen 3-fachen Waschung mit TBST für je 5 Minuten wurden je der 500 µl ECL-Lösungen 1 und 2 vermischt und für eine Minute auf die abgetropfte Membran aufgebracht. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte über die Gel Doc 2000 Geldokumentationseinheit der Fluor Chem Kamera (Biozym) unter Verwendung der Alpha Ease Software. Die Expositionszeit betrug je nach AK zwischen 2 und 7 Minuten. Als primäre AKs wurden PIM1, PIM2; STAT5, pSTAT5 (Ser694), CDC25C, pCDC25C (Ser216) und GAPDH verwendet.

10x TBS

18,5 mM Tris

137 mM NaCl

pH 7,6

Waschpuffer (TBS/T)

TBS	1x
-----	----

Tween-20	0,1%
----------	------

3. Ergebnisse

Es wurden mit Hilfe der Microarray-Technologie Genexpressionsprofile von 6 CML-Patienten vor und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie durchgeführt, um genauere Erkenntnisse über die molekulare Wirkungsweise des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib zu erhalten. Dabei sollte die Frage geklärt werden, welches „frühe Gene“ sind, die durch die Gabe von Imatinib in ihrer Expression verändert werden. Der Zeitraum von 7 Tagen wurde so gewählt, dass die Patienten ein stabiles Plasmalevel des Medikaments erreicht, aber noch keine hämatologische Remission, eine Normalisierung des Blutbilds, erzielt hatten, die im Schnitt nach 28 Tagen erreicht wird (Druker *et al.*, 2001b).

Weiterhin sollten Ursachen für die höhere Potenz von Nilotinib gegenüber Imatinib untersucht werden. Dazu wurden Genexpressionsanalysen von mit Imatinib und Nilotinib behandelten K562 Zellen als Modell für eine fortgeschrittene Krankheit sowie funktionelle Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Experimente unter Verwendung der jeweiligen IC₅₀ Konzentration durchgeführt. Als Inkubationszeitraum wurde für die TKIs 24 h mit der jeweiligen IC₅₀ Konzentration gewählt, um Genexpressionsprofile von lebenden Zellen zu erhalten, da nach 48 h Behandlung mit den TKIs die Zellen absterben (siehe Kapitel 3.4.1) und für Imatinib der toxische Effekt von Imatinib in der Literatur nach 48 h, nicht aber nach 24 h beschrieben ist (Mow *et al.*, 2002; Wilda *et al.*, 2002).

3.1. Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

3.1.1. Untersuchung der CD34+ Zellen von Patienten vor und nach 7 Tagen Therapie

Das für die CML charakteristische Philadelphia-Chromosom (Ph), das durch das *BCR-ABL* Onkogen entsteht, wurde mit Hilfe der Fluoreszenz *in Situ* Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, wie hoch der prozentuale Anteil der Ph+ CD34+ selektierten Stamm- und Progenitorzellen des peripheren Blutes vor und nach 7 Tagen Therapie mit Imatinib war. Dazu wurde von den selektierten CD34+ Stammzellen von 3 Patienten vor und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie eine FISH-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass vor Therapie im Schnitt 87% (Variationsbereich 85-89%) der CD34+ Zellen das Philadelphia-Chromosom trugen. Nach 7 Tagen Imatinib-Therapie wurde ein ähnliches Verhältnis von 85% (Variationsbereich 84-87%) Ph+ CD34+ Zellen beobachtet. In Abbildung 3.1A ist exemplarisch eine FISH-Analyse einer Ph+ CD34+ eines Patienten vor

Therapie, in Abbildung 3.1B nach 7 Tagen Imatinib-Therapie gezeigt. Bei Ph+ Zellen finden sich 2 *BCR-ABL* Signale, zum einen das Ph+, zum anderen das abnormale Chromosom 9 sowie mindestens ein *BRC*- und ein *ABL*-Signal. Abbildung 3.1C zeigt eine *BCR-ABL* negative mononukleäre Zelle einer Gesundkontrolle. Die K562 Zelllinie diente als Positivkontrolle, bei ihr konnten zwei amplifizierte *BCR-ABL* Signale pro Interphase nachgewiesen werden. Zusätzlich gab es pro Interphase zwei *BCR*- und drei *ABL*-Signale (Abbildung 3.1D).

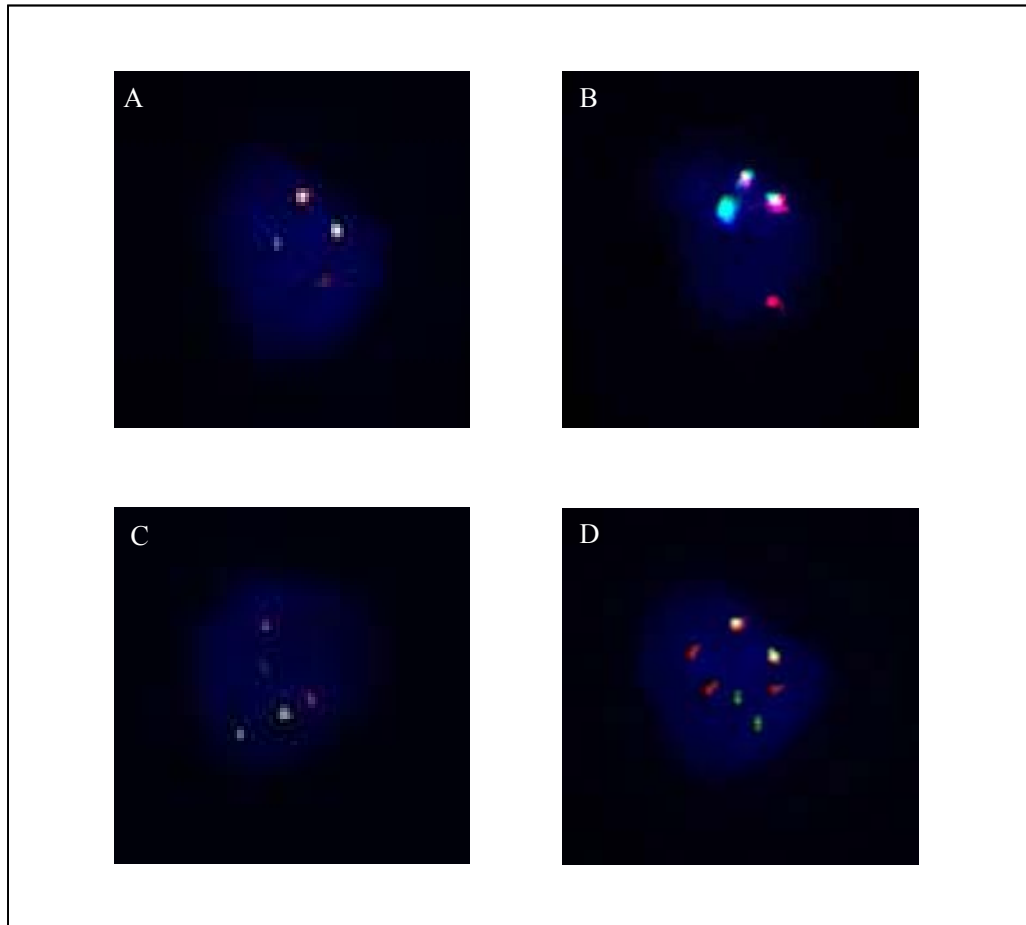


Abbildung 3.1 FISH-Analyse. A) eines CML-Patienten vor Therapiebeginn B) eines weiteren Patienten nach 7 Tagen Imatinib-Therapie. C) einer Gesundkontrolle D) K562 Zelllinie. A-C sind Interphase-Analysen. Die roten Signale zeigen die *ABL*-Signale, die grünen Signale *BCR*-Signale. Die *BCR-ABL* Fusionssignale sind weiß-gelb.

3.2. Genexpressionsdaten

3.2.1. Genexpressionsdaten der CML-Patienten

Eine hierarchische Cluster-Analyse der 14.500 Gene, die in 22.215 Probe Sets auf den Chips vertreten sind, ergab, dass es zwei distinkte Gruppen gibt, die sich in ihrem Genexpressionsprofil unterscheiden. Diese sind zum einen die Gruppe der Ph+ CD34+ Zellen von CML-Patienten vor Therapiebeginn und zum anderen die Zellen derselben Patienten nach

7 Tagen Therapie. Insgesamt zeigten sich 303 Gene bei einem *Lower Bound* von mindestens 1,2-fach signifikant differenziell exprimiert, von denen 183 Gene bei CD34+ Zellen der Patienten nach 7 Tagen Behandlung mit Imatinib im Vergleich zu vor Therapiestart signifikant herunter reguliert und 120 Gene signifikant hochreguliert waren (Abbildung 3.2A & B).

Gene des *BCR-ABL* Signalings, des Zellzyklus, der DNA-Replikation sowie Reparatur, der Zelladhäsion und -motilität und Apoptose-assoziierte Gene waren betroffen. Adhäsions-assoziierte Gene waren hochreguliert, Gene des BCR-ABL Signalings zeigten ein heterogenes Bild und Gene der anderen drei funktionellen Gruppen waren herunter reguliert. Ausgewählte Gene sind in Tabelle 3.1 fett gedruckt und in Abbildung 3.3 dargestellt. Die kompletten Genexpressionsanalysen sind in der GEO DataSets Datenbank zu finden [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo] (*Accession No*: GSE12211).

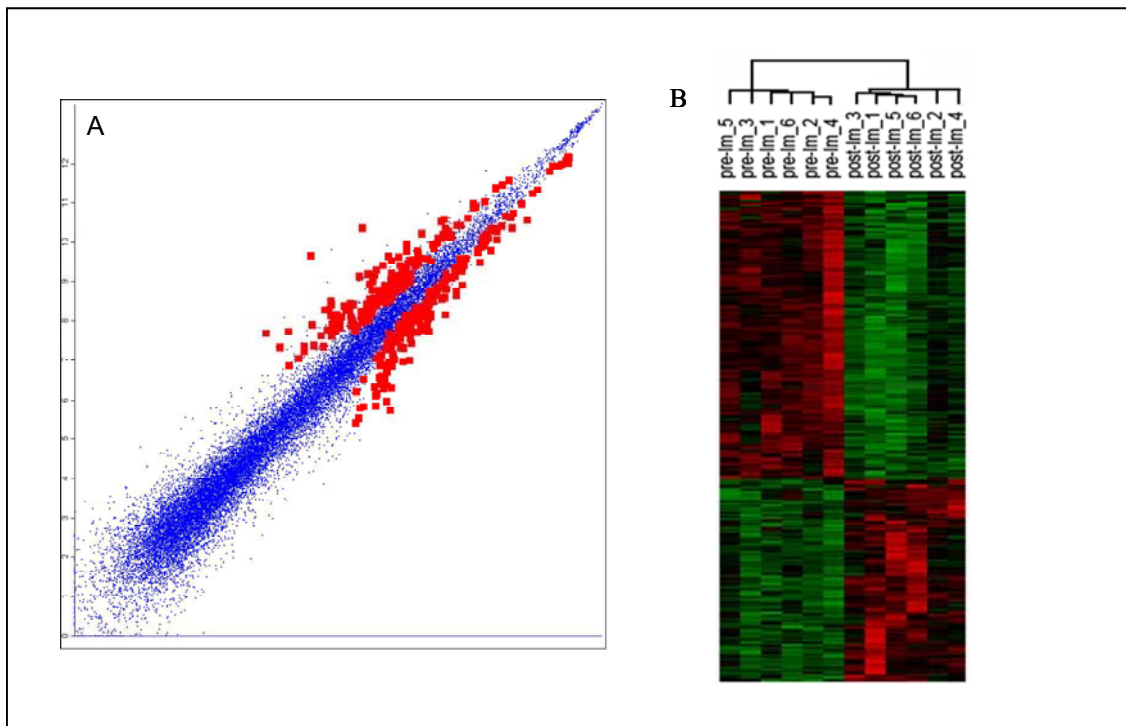


Abbildung 3.2 Genexpressionsanalyse von CML-Patienten vor und nach 7 Tagen Therapie mit Imatinib.
A) *Scatter Plot* der 22.215 Probe Sets. Signifikant differenziell exprimierte Gene sind rot dargestellt. B) *Cluster Tree*. Differenziell exprimierte Gene bei Ph+ CD34+ Zellen von CML-Patienten vor Imatinib-Therapie (pre-Im) und nach 7 Tagen Therapie (post-Im). Die verwendeten Proben sind hierbei horizontal, die regulierten Gene vertikal sortiert. Rot = höherer Expressionswert, grün = niedrigerer Expressionswert als der Mittelwert des jeweils betrachteten Gens.

3.2.1.1. *BCR-ABL Signaling*

Da die Tyrosinkinase BCR-ABL durch ihre *downstream* Phosphorylierungskaskaden ursächlich für den Krankheitsverlauf der CML ist, ist ein Blick auf die Signalwege, die *downstream* von BCR-ABL liegen, von Interesse. Hierbei sind der RAS/ RAF/MEK/ERK Signalweg, der PI3K/AKT Signalweg und der STAT/RAD51 Signalweg zu nennen, die ihrerseits für die Steuerung des Zellzyklus, der DNA-Replikation sowie Reparatur verantwortlich sind. Die signifikant differenziell exprimierten Gene sind in Tabelle 3.1 unter *BCR-ABL Signaling* zu finden.

3.2.1.2. *Zellzyklus und Proliferation*

Die Proliferation von Zellen wird durch den Zellzyklus kontrolliert. Dieser Zellzyklus wird in G1-, S-, G2- und M-Phase unterteilt. Sich nicht teilende Zellen befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus, der Ruhephase der G1-Phase. Der Eintritt in jede neue Phase des Zellzyklus erfolgt durch externe Signale und wird durch zyklisch auftretende Proteine, Cycline sowie durch Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases*; CDKs) reguliert. Komplexe aus Cyclinen und spezifischen CDKs phosphorylieren die Substratproteine der jeweiligen Zellzyklusphase und regulieren damit die Transition durch die einzelnen *Checkpoints* des Zellzyklus. Die Aktivitätsregulation der Cyclin-abhängigen Kinasen erfolgt über Inhibitorproteine (*cyclin dependent kinase inhibitors*; CKIs) wie P21_{KIP1}, P27_{KIP1}, P57_{KIP2}, P16_{INK4a} und P15_{INK4b}. Viele relevante CDKs wurden zunächst in der Hefe, vor allem in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt und dort als CDC-Gene (*cell division cycle*) bezeichnet, die mit einer zugehörigen Identifizierungsnummer versehen wurden (z. B. *cdc25*). Signifikant differenziell exprimierte Gene sind in Tabelle 3.1 unter *Zellzyklus* aufgelistet.

3.2.1.3. *DNA Replikation und DNA Reparatur*

Die DNA wird während der Replikation semi-konservativ verdoppelt. Diese Replikation, in der ein neuer DNA-Strang synthetisiert wird, findet in der S-Phase statt. In den Ph⁺ CD34⁺ Zellen der CML-Patienten waren nach 7 Tagen Imatinib-Behandlung Gene dieser Phase herunter reguliert, was auf eine Inhibierung der Replikation hinweisen könnte. Betroffene Gene der DNA Replikation sind in Tabelle 3.1 unter *DNA Replikation, DNA Reparatur* erfasst.

Durch Einwirkung von mutagenen Substanzen, extremer Wärme, ionisierende Strahlen oder spontane Schäden im Verlauf der DNA Replikation entstehen DNA-Schäden. Diese bewirken schadhafte Veränderungen in der DNA Struktur. Mögliche Konsequenzen aus DNA-Schäden können eine falsche DNA-Replikation für die Mitose sein, eine falsche oder gar nicht vorhandene Synthese von Proteinen oder eine Abspaltung wichtiger Chromosomenbereiche nach Doppelstrangbrüchen. Zellen besitzen durch DNA-Reparatur Mechanismen, mit denen sie schadhafte Veränderungen in der DNA-Struktur beseitigen können. In Tabelle 3.1 sind unter *DNA Replikation*, *DNA Reparatur* differenziell exprimierte Gene gelistet.

3.2.1.4. Zelladhäsion und –motilität

Die Adhäsion spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Hämatopoese, da die Reifung der hämatopoetischer Zellen im adulten Organismus fast ausschließlich im Knochenmark stattfindet. Nach der Reifung der hämatopoetischen Zellen können diese zu ihrem Wirkort wandern, indem sie ihre Adhäsions- und Motilitätseigenschaften verändern. In Tabelle 3.1 sind signifikant differenziell exprimierte Gene unter *Adhäsion*, *Zytoskelett* zu finden.

3.2.1.5. Apoptose

Der programmierte Zelltod wird als Apoptose bezeichnet. Dieser Mechanismus kann durch externe Stimuli wie Entzündungen, aber auch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, durch bestimmte chemische Substanzen oder aber durch ionisierende Strahlung induziert werden. Signifikant differenziell exprimierte Gene sind in Tabelle 3.1 unter *Apoptose* erfasst.

Tabelle 3.1 Differenz iell exprimierte Ge ne in P h+ CD34+ Zellen von mit Im atinib behandel ten CML-Patienten (im Text beschriebene Gene sind fett und kursiv dargestellt).

Gensymbol	Genname	Lower Bound	Fold change
BCR-ABL Signaling			
BLM	Bloom Syndrome	-1,33	-1,77
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	-1,75	-2,41
RAN	RAN, member RAS oncogene family	1,21	-1,41
RANBP1	RAN binding protein 1	1,34	-1,60
RANBP5	RAN binding protein 5	-1,23	-1,53
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	1,33	1,67
Proliferation und Zellzyklus			
AURKB	aurora kinase B	-1,68	-2,38
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	-2,29	-3,25
BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	1,66	2,09
BTG2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	2,09	4,79
BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	-1,84	-2,72
CCNB1	cyclin B1	-1,98	-2,75
CCNB2	cyclin B2	-1,81	2,44
CCNG2	cyclin G2	1,55	2,57
CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	-2,19	-3,50
CDC20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	-2,23	-3,36
CDC25A	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-1,39	-2,35
CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	-1,76	-2,37
CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	1,22	2,49
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	-1,79	-2,42
CENPM	centromere protein M	-2,06	-2,72
CLK1	CDC-like kinase 1	1,66	2,51
DTL	denticleless homolog (Drosophila)	-1,56	-1,99
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	-1,56	-1,97
GSPT1	G1 to S phase transition 1	-1,31	-1,62
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	-1,35	-1,68
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	-1,23	-1,60
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	-1,72	-2,28
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	-1,42	-1,76
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	-1,23	-1,44
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	-1,57	-1,94
PIM1	pim-1 oncogene	-1,80	-2,55
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-1,63	-2,07
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	-1,58	-2,18
RHOB	ras homolog gene family, member B	1,70	2,93
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-2,03	-3,46
ZWINT	ZW10 interactor	-1,79	-1,79
DNA Replikation, DNA Reparatur			
BLM	Bloom syndrome	-1,33	-1,72
CDC45L	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	-1,76	-2,37
CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	-1,28	-1,62
DUT	dUTP pyrophosphatase	-1,31	-1,65
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	-1,80	-2,44
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-1,73	-2,17

Gensymbol	Genname	Lower Bound	Fold change
DNA Replikation, DNA Reparatur			
<i>GIN1</i>	<i>GIN5 complex subunit 1 (Psf1/2 homolog)</i>	-1,69	-2,41
<i>GIN2</i>	<i>GIN5 complex subunit 2 (Psf1/2 homolog)</i>	-1,69	-2,26
<i>GMNN</i>	<i>geminin, DNA replication inhibitor</i>	-1,56	-1,97
<i>MCM2</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 2</i>	-1,35	-1,68
<i>MCM3</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 3</i>	-1,23	-1,60
<i>MCM4</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 4</i>	-1,72	-2,28
<i>MCM6</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 6</i>	-1,42	-1,76
<i>MCM7</i>	<i>minichromosome maintenance complex component 7</i>	-1,23	-1,44
<i>NASP</i>	<i>nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)</i>	-1,28	-1,43
<i>NUSAP1</i>	<i>nucleolar and spindle associated protein 1</i>	-1,45	-1,96
<i>PCNA</i>	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>	-1,32	-1,70
<i>PHB</i>	<i>Prohibitin</i>	-1,26	-1,40
<i>POLE2</i>	<i>polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)</i>	-1,63	-1,63
<i>PTTG1</i>	<i>pituitary tumor-transforming 1</i>	-1,45	-1,84
<i>RAD51</i>	<i>RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)</i>	-1,75	-2,41
<i>RFC3</i>	<i>replication factor C (activator 1) 3, 38kDa</i>	-1,30	-1,71
<i>RFC4</i>	<i>replication factor C (activator 1) 4, 37kDa</i>	-1,32	-1,58
<i>RPA3</i>	<i>replication protein A3, 14kDa</i>	-1,44	-1,75
<i>RRM1</i>	<i>ribonucleotide reductase M1 polypeptide</i>	-1,46	-1,81
<i>RRM2</i>	<i>ribonucleotide reductase M2 polypeptide</i>	-2,52	-3,85
<i>TIMELESS</i>	<i>timeless homolog (Drosophila)</i>	-1,49	-1,88
<i>TIPIN</i>	<i>TIMELESS interacting protein</i>	-1,44	-1,80
<i>TK1</i>	<i>thymidine kinase 1, soluble</i>	-1,51	-2,07
<i>TOP2A</i>	<i>topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa</i>	-2,03	-3,46
<i>TYMS</i>	<i>thymidylate synthetase</i>	-1,41	-1,70
Adhäsion, Zytoskelett			
<i>ADAM8</i>	<i>ADAM metalloproteinase domain 8</i>	1,31	1,96
<i>CCT5</i>	<i>chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)</i>	-1,35	-1,51
<i>CCT7</i>	<i>chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)</i>	-1,25	-1,40
<i>CD44</i>	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>	1,26	1,94
<i>CFL1</i>	<i>cofilin 1 (non-muscle)</i>	-1,22	-1,30
<i>CSF3R</i>	<i>colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)</i>	1,36	2,07
<i>ELMO1</i>	<i>engulfment and cell motility 1</i>	1,24	1,45
<i>FXD5</i>	<i>FXD domain containing ion transport regulator 5</i>	1,47	1,63
<i>RHAMM</i>	<i>hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)</i>	-1,98	-3,13
<i>IL18</i>	<i>interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i>	1,43	1,77
<i>JUP</i>	<i>junction plakoglobin</i>	1,40	1,76
<i>MCAM</i>	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>	-1,37	-2,03
<i>MDK</i>	<i>midkine (neurite growth-promoting factor 2)</i>	1,25	2,67
<i>OIP5</i>	<i>Opa interacting protein 5</i>	-1,57	-2,13
<i>PPM1F</i>	<i>protein phosphatase 1F (PP2C domain containing)</i>	1,25	1,50
<i>RHOB</i>	<i>ras homolog gene family, member B</i>	1,70	2,93
<i>SELL</i>	<i>selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1)</i>	1,57	2,14
<i>STAT3</i>	<i>signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)</i>	1,33	1,67
<i>TUBA1B</i>	<i>tubulin, alpha 1b</i>	-1,26	-1,41
<i>TUBA1C</i>	<i>tubulin, alpha 1c</i>	-1,20	-1,36
<i>TUBB2C</i>	<i>tubulin, beta 2C</i>	-1,22	-1,48
<i>TUBB3</i>	<i>tubulin, beta 3</i>	-1,23	-1,47
<i>TUBB6</i>	<i>tubulin, beta 6</i>	-1,27	-1,45

Gensymbol	Genname	Lower Bound	Fold change
Apoptose			
<i>MCL1</i>	<i>myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)</i>	1,29	1,70
<i>NUP62</i>	<i>nucleoporin 62kDa</i>	-1,26	-1,57
<i>PIM1</i>	<i>pim-1 oncogene</i>	-1,80	-2,55
<i>YWHAE</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (14-3-3ε)</i>	-1,23	-1,45

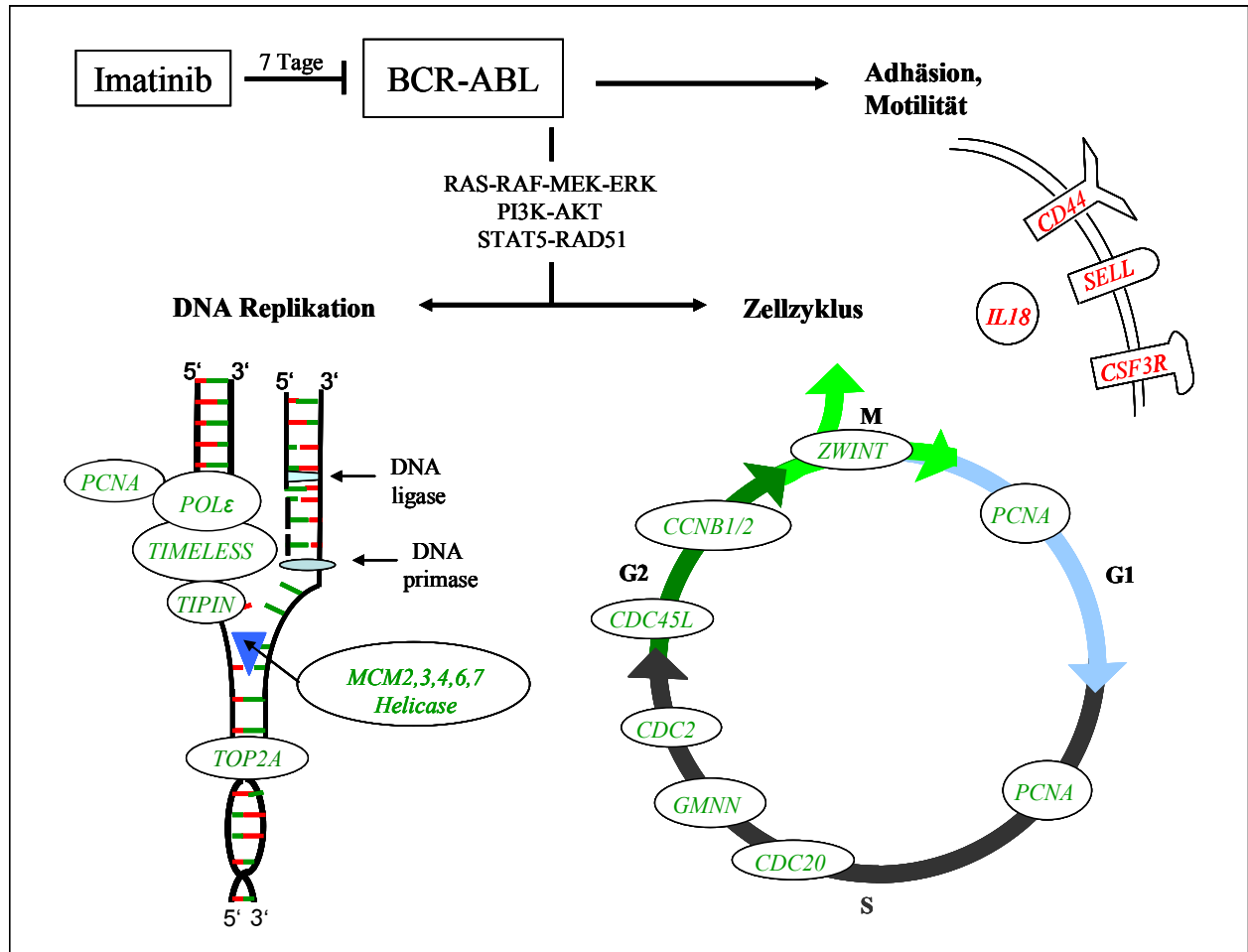


Abbildung 3.3 Wichtige funktionelle Signalwege, die sich durch die Therapie mit Imatinib in den ersten sieben Tagen ändern. Grün dargestellte Gene werden schwächer und rote stärker exprimiert.

3.2.2. Vergleich Imatinib-, Nilotinib- und DMSO-behandelter K562 Zellen

Der TKI Nilotinib wirkt in *in vitro* Experimenten potenter als Imatinib (O'Hare *et al.*, 2005; Weisberg *et al.*, 2005). Dabei beschreiben Weisberg *et al.*, dass die IC_{50} Konzentration von Nilotinib für die K562 Zelllinie bei 43 ± 15 nM liegt, während sie bei Imatinib 470 ± 59 nM beträgt. Um zu untersuchen, worin diese höhere Potenz begründet ist, wurden von je vier Ansätzen an K562 Zellen, welche für 24 h mit $0,5 \mu M$ Imatinib bzw. $0,05 \mu M$ Nilotinib (jeweils IC_{50} Konzentration) bzw. DMSO als Kontrolle behandelt wurden, Genexpressionsanalysen durchgeführt.

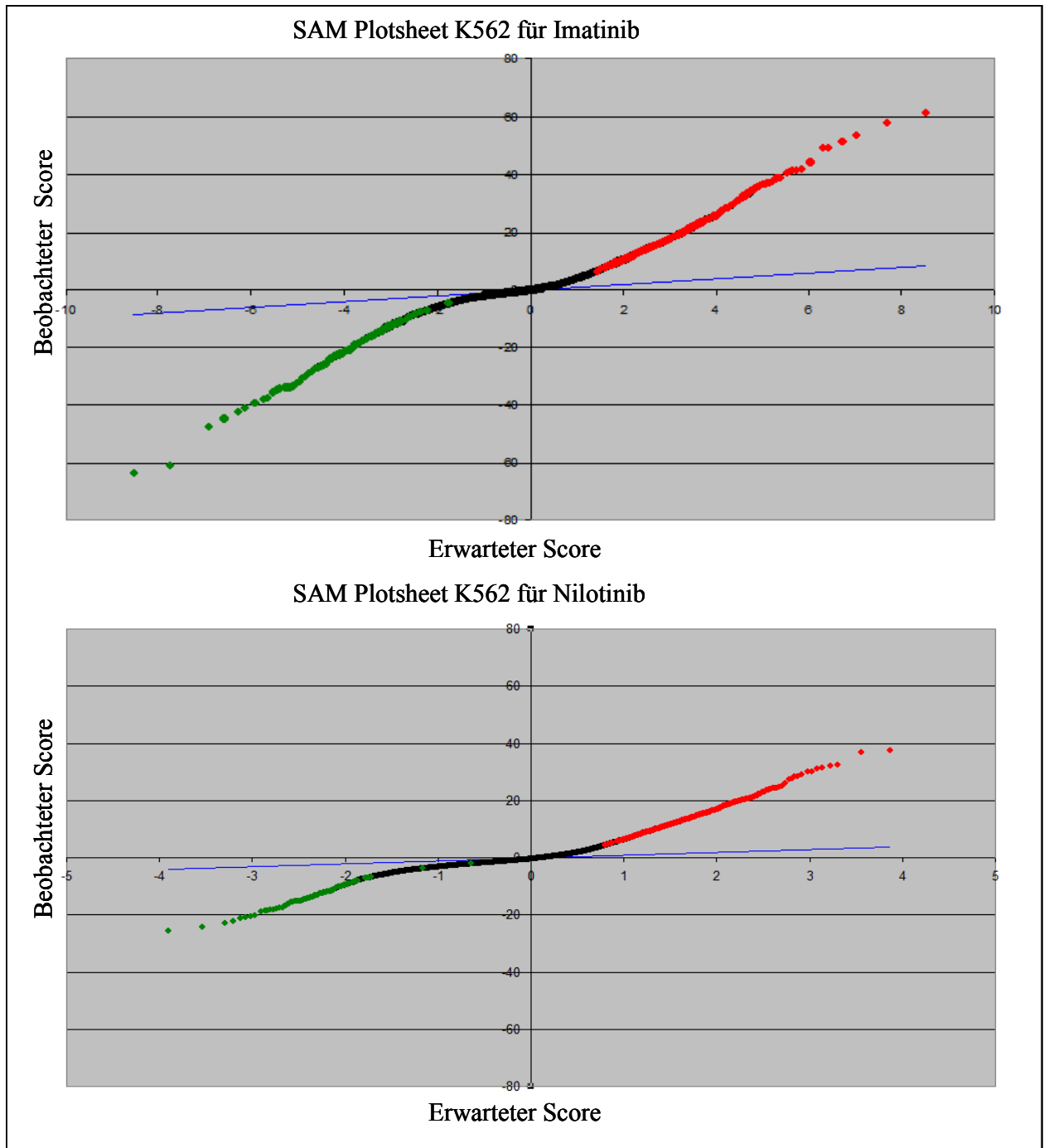


Abbildung 3.4 Identifizierung von signifikant differenziell exprimierten Genen. *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) Algorithmus von A) DMSO behandelten K562 Zellen gegen mit 0,5 μ M Imatinib behandelten K562 Zellen B) DMSO behandelten K562 Zellen gegen mit 0,05 μ M Nilotinib behandelten K562 Zellen. X-Achse: *Expected Score*, Y-Achse: *Observed Score*. Signifikant hoch- und herunterregulierte Gene sind rot bzw. grün gekennzeichnet.

Abbildung 3.4 zeigt die durch die SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) generierten Ausdrücke der Genexpressionsanalysen für A) DMSO gegen mit 0,5 μ M Imatinib behandelte K562 Zellen sowie für B) DMSO gegen mit 0,05 μ M Nilotinib behandelte K562 Zellen. Gene, die mit einem Fold Change $>1,5$ signifikant hoch reguliert waren, sind rot gekennzeichnet, signifikant herunter regulierte Gene grün.

Tabelle 3.2 Differenziell exprimierte Gene der K562 Zellen nach Behandlung mit Imatinib oder Nilotinib versus DMSO. Stärker exprimierte Gene sind rot dargestellt, schwächer exprimierte grün.

K562 Zellen	+ 0,5 µM Imatinib		+ 0,05 µM Nilotinib	
Signifikant differenziell exprimierte Gene, fold change >1,5	233 ↑	944 ↓	275 ↑	2298 ↓
Genexpressionsänderung	1,5-12,2-fach	1,5-12,7-fach	1,5-11,0-fach	1,5-15,9-fach
Mediane Expressionsänderung der Gene, deren Expression durch beide TKIs signifikant verändert wurde	191 Gene: 1,81-fach	918 Gene: 1,72-fach	191 Gene: 1,82-fach	918 Gene: 2,23-fach

Dabei waren beim Vergleich Imatinib versus DMSO behandelte K562 Zellen 1177 Gene signifikant differenziell exprimiert (944 Gene herunter-; 233 Gene hochreguliert, Fold Change >1,5). Beim Vergleich Nilotinib versus DMSO behandelte K562 Zellen waren 2573 Gene signifikant differenziell exprimiert (2298 Gene herunter-; 275 Gene hochreguliert; Fold Change >1,5). Von den Genen, die bei beiden TKIs im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant verändert waren, waren 1109 Gene differenziell exprimiert (918 Gene herunter-; 191 Gene hochreguliert; Fold Change >1,5). Dabei war die mediane Genexpressionsänderung bei mit Nilotinib behandelten Zellen in den herunterregulierten Genen größer als bei mit Imatinib behandelten K562 Zellen, während es in den hochregulierten Genen im Median keinen Unterschied gab (Tabelle 3.2). Daneben waren in Nilotinib versus DMSO behandelten K562 Zellen im Vergleich zu Imatinib versus DMSO behandelten K562 Zellen weitere 1464 Gene signifikant differenziell exprimiert.

Bei einer Fokussierung auf eine Genomweite Genexpressionssignatur von hochangereicherten CD34+ Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit einer Neudiagnose CML in chronischer Phase verglichen mit Gesundspendern, die von Diaz-Blanco et al. 2007 publiziert wurden, konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung mit den TKIs zu einer gegensätzlichen Genexpression dieser führt. Hierbei zeigte Nilotinib einen stärkeren Effekt als Imatinib. Die Gene mit der gegensätzlichen Genexpression konnten den Gruppen *BCR-ABL* Signaling, Proliferation und Zellzyklus sowie Krankheitsprogress und Imatinib-Resistenz zugeordnet werden. Zum besseren Verständnis sind die Gene in Abbildung 3.5 dargestellt. Daneben waren aber auch speziell bei Nilotinib behandelten K562 Zellen Gene zu finden, die DNA Reparatur und DNA Replikation zuzuordnen waren, welche eine Bedeutung während der ersten 7 Tage Imatinib-Therapie aufwiesen (Kap. 3.2.1.3). In Tabelle 3.3 ist eine Auswahl von differenziell exprimierten Genen zu finden, die verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden können. In Abbildung 3.6 ist ein Vergleich der Genexpressionsstärken

Imatinib bzw. Nilotinib behandelter K562 Zellen ausgewählter Gene verschiedener funktionellen Gruppen dargestellt. Die kompletten Genexpressionsanalysen sind in der GEO DataSets Datenbank hinterlegt [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo] (Accession No: GSE19567).

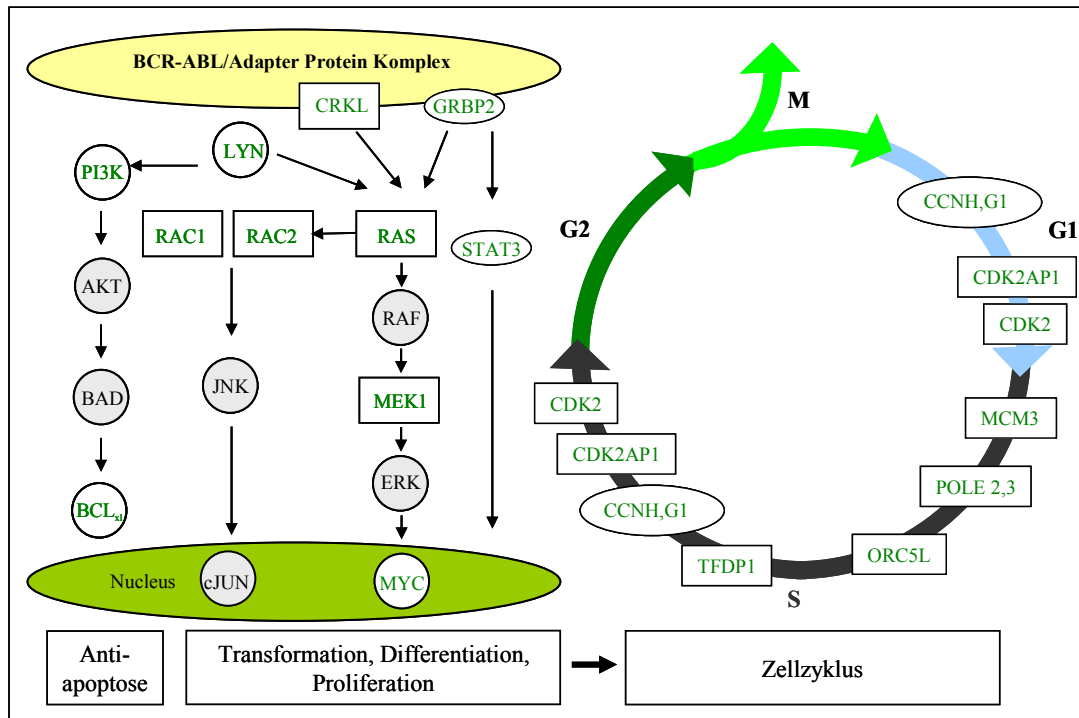


Abbildung 3.5 Wichtige funktionelle Signalwege, die durch die TKIs Imatinib und Nilotinib beeinflusst werden. Die Beschriftung der schwächer exprimierten Gene ist grün, eine Kennzeichnung mit einem Kreis bedeutet eine signifikant schwächere Expression von K562 Zellen nach Behandlung mit beiden TKIs, mit einem Rechteck nach Behandlung mit Nilotinib. Grau hinterlegte Gene waren in ihrer Expression nicht verändert.

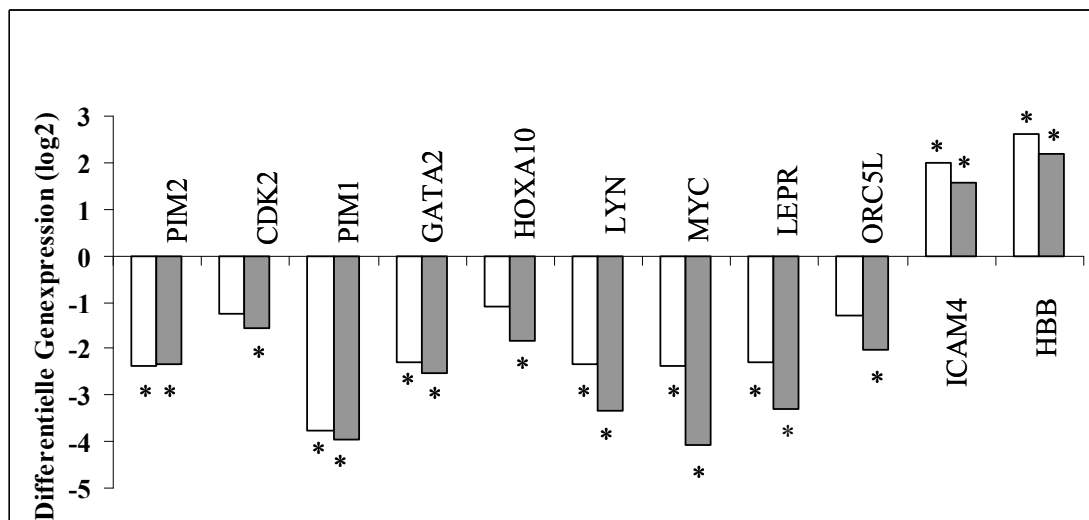


Abbildung 3.6 Vergleich der Affymetrix-Microarray-Genexpressionen von mit 0,5 µM Imatinib behandelte K562 Zellen (weiß) und mit 0,05 µM Nilotinib behandelte K562 Zellen (grau). Betrachtung von Genen verschiedener funktioneller Gruppen, deren differentielle Expression mit quantitativer *real-time* PCR bestätigt wurde. Auf der X-Achse befinden sich jeweils die untersuchten Targetgene; die fold change-Werte auf der Y-Achse sind logarithmisch dargestellt. Signifikant differentiell exprimierte Gene sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.2.2.1. *BCR-ABL Signaling*

Eine wichtige Gengruppe, die bei der K562 Zelllinie aufgrund der BCR-ABL Inhibition durch Imatinib bzw. Nilotinib signifikant herunter reguliert wurde, war die Gruppe des *BCR-ABL Signaling* Signalwegs. Dabei zeigten Nilotinib behandelte K562 Zellen einen höheren Grad an differenzieller Expression als Imatinib behandelte K562 Zellen. Daneben gab es zusätzliche Gene, die ausschließlich bei Nilotinib behandelten K562 Zellen herunter reguliert waren (Tabelle 3.3 *BCR-ABL Signaling*).

3.2.2.2. *Proliferation und Zellzyklus*

Eine weitere relevante Gengruppe, die bei Behandlung der K562 Zellen mit Imatinib bzw. Nilotinib signifikant herunter reguliert war, ist Proliferations- und Zellzyklus-assoziiert. Dabei zeigten die mit Nilotinib behandelten Gene eine stärkere Herunterregulierung als Imatinib behandelte Zellen. Außerdem waren weitere Gene exklusiv nach Nilotinib-Behandlung herunter reguliert. Wichtige Gene sind in Tabelle 3.3 unter *Proliferation und Zellzyklus* zu finden.

3.2.2.3. *Apoptose*

Daneben bildeten Apoptose-assoziierte Gene eine weitere funktionelle Gruppe, die sich aufgrund der Behandlung mit den beiden TKIs in ihrer Expression unterschieden. Diese waren teils stärker, teils schwächer exprimiert und es waren sowohl pro- als auch antiapoptotische Gene zu finden. In Nilotinib behandelten K562 Zellen waren zusätzliche Gene, die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden, signifikant differenziell exprimiert. Ausgewählte Gene aus dem Bereich Apoptose, die nach Behandlung durch die TKIs differenziell exprimiert waren, sind in Tabelle 3.3 unter *Apoptose* hinterlegt.

3.2.2.4. *Krankheitsprogress und Imatinibresistenz-assoziierte Gene*

Für die CML-Therapie spielt Krankheitsprogress eine Rolle, da die Behandlungsstrategie dem Krankheitsverlauf angepasst werden muss. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es zum einen allgemeine Krankheitsprogress-assoziierte Gene gibt (Radich *et al.*, 2006), zum anderen Gene, die speziell mit Imatinibresistenz assoziiert sind. Das Expressionsprofil der K562 Zellen nach Behandlung mit den TKIs Imatinib und Nilotinib wurde hinsichtlich der

Frage untersucht, welche dieser Gene signifikant differenziell exprimiert waren. Sie wurden in Tabelle 3.3 unter *Krankheitsprogress und Imatinibresistenz* erfasst.

3.2.2.5. *DNA Replikation und DNA Reparatur*

Eine 24-stündige Inkubation von K562 Zellen mit Imatinib bzw. Nilotinib führte zu Veränderungen im Genexpressionsprofil, die die DNA Replikation und Reparatur betrafen. Weiterhin gab es ausschließlich durch Nilotinib herunter regulierte Gene. In Tabelle 3.3 sind ausgewählte differenziell exprimierte Gene nach Imatinib- bzw. Nilotinib Behandlung unter *DNA Replikation und DNA Reparatur* aufgelistet.

3.2.2.6. *Adhäsion*

Eine letzte Gruppe von Genen, die nach Imatinib- bzw. Nilotinib-Behandlung der K562 Zellen signifikant differenziell reguliert war, ist der funktionellen Gruppe der Adhäsion zuzuordnen. Hierbei zeigte sich im Genexpressionsmuster ein heterogenes Bild, da es sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene gab. Durch die Behandlung der K562 Zellen mit Nilotinib zusätzliche Gene signifikant schwächer exprimiert. Ausgewählte differenziell exprimierte Gene nach Imatinib- bzw. Nilotinib Behandlung sind in Tabelle 3.3 unter *Adhäsion* zu finden.

Tabelle 3.3 Auswahl differenziell exprimierter Gene, die relevanten Signalwegen zugeordnet wurden, nach Behandlung der K562 Zellen mit Imatinib bzw. Nilotinib. Kursiv markierte Gene hatten einen Fold Change von >1,5; im Text diskutierte Gene wurden zusätzlich fett markiert.

Gensymbol	Genname	Fold Change	
		Imatinib	Nilotinib
BCR-ABL Signaling			
BCL2	B-cll CLL/lymphoma 2	-1,78	-2,01
BCL2L1	BCL2-like 1	-1,90	-2,19
CRKL	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	1,08	-1,62
EIF4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	-2,73	-3,22
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	-1,50	-1,97
G3BP2	Ras GTPase activatin protein SH3domain binding protein 2	-1,65	-2,17
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-2,33	-3,35
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1)	-1,31	-1,54
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	-2,37	-4,06
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	-1,31	-1,64
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	-1,92	-2,24
RAC 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	-1,35	-1,71
RAC 2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	-1,49	-1,84
RAN	RAN, member RAS oncogene family	-1,54	-2,42
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	-1,59	-1,66
Proliferation und Zellzyklus			
CCND2	cyclin D2	-3,90	-5,56
CCND3	cyclin D3	1,80	1,61
CCNG1	cyclin G1	-1,51	-1,79
CCNH	cyclin H	-1,64	-2,30
CDC45L	Cell division cycle 45-like	-1,14	-1,96
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	-1,12	-1,55
CDK2AP1	CDK2-associated protein 1	-1,13	-1,86
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	1,03	-1,58
MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	-1,13	-1,63
MCM5	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)	-1,09	-1,73
MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	-1,11	-1,73
MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	-1,16	-1,68
ORC5L	Origin recognition complex, subunit 5-like	-1,05	-2,01
PIM1	Pim-1 oncogene	-3,77	-3,97
PIM2	Pim-2 oncogene	-2,38	-2,32
POLE2	DNA polymerase, epsilon 2 (p59 subunit)	-1,05	-1,56
POLE3	DNA polymerase, epsilon 3(p59 subunit)	-1,49	-2,28
TFDP1	transcription factor Dp-1	-1,34	-1,87
Apoptose			
BAG1	BCL2-associated athanogene	-1,42	-1,80
BAG2	BCL2-associated athanogene 2	-1,48	-2,06
BAG5	BCL2-associated athanogene 5	-1,40	-1,93
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-1,78	-2,01
BCL2L1	BCL2-like 1	-1,90	-2,19
BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4	-1,40	-1,58
BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	1,24	-2,10
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	-1,13	-1,77

Gensymbol	Genname	Fold Change	
		Imatinib	Nilotinib
Apoptose			
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	-1,53	-1,48
FOXO3A	forkhead box O3A	1,18	1,59
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	-1,90	-2,57
MKNK2	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2	-1,38	-1,63
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-6,22	-8,74
TP53BP2	tumor protein p53 binding protein, 2	1,54	1,45
VEGF	vascular endothelial growth factor	-2,83	-2,96
Krankheitsprogress und Imatinibresistenz			
BIRC5	Survivin	1,24	-2,10
BTG2	BTG family, member 2	2,20	2,10
GAS2	growth arrest-specific 2	-1,32	-1,58
LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	-2,33	-3,35
RRAS2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	-2,42	-2,95
SAT	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	1,60	1,67
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-6,22	-8,74
WT1	Wilms Tumor 1	-3,46	-4,44
DNA Replikation, DNA Reparatur			
BTG2	BTG family, member 2	2,20	2,10
CCNH	cyclin H	-1,64	-2,30
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	-1,19	-1,87
GTF2H2	general transcription factor IIH, polypeptide 2, 44kDa	-1,67	-2,56
MCM3	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae)	-1,13	-1,63
MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (S. cerevisiae)	-1,11	-1,73
MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	-1,16	-1,68
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint 1	-1,20	-1,50
RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)	-1,51	-1,93
RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	-1,35	-2,28
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-1,02	-1,81
TYMS	thymidylate synthetase	-1,09	-1,83
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-1,05	-1,56
Adhäsion			
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10	-1,57	-1,88
ADAM8	ADAM metallopeptidase domain 8	1,50	1,75
AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	-5,72	-6,70
CD164	CD164 antigen, sialomucin	-1,50	-2,17
CD33	CD33 antigen	-2,21	-2,51
CD9	CD9 antigen (p24)	1,87	1,72
CD99	CD99 antigen	-1,35	-1,86
FN1	fibronectin 1	-1,97	-2,76
ICAM4	intercellular adhesion molecule 4, Landsteiner-Wiener blood group	2,00	1,56
IL8	interleukin 8	-1,31	-1,92
ITGAE	integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)	-1,49	-2,00
VCL	Vinculin	-1,67	-2,38

3.3. **Bestätigung ausgewählter Gene durch quantitative real-time PCR**

Zur Validierung der Ergebnisse der Arraydaten mit einer unabhängigen Methode wurden für ausgewählte Gene mittels quantitativer *real-time* PCR, basierend auf der Light Cycler Technologie das mRNA-Level der behandelten Zellen gegenüber dem der unbehandelten untersucht. Diese Daten wurden anschließend mit den Affymetrix Genchip-Daten verglichen. Dabei wurden die Gene zufällig aus verschiedenen funktionellen Gruppen ausgewählt. Aufgrund der sich unterscheidenden Genexpressionsprofile der Zelllinienexperimente und der CML-Patienten wurden unterschiedliche Gene zur Validierung verwendet.

3.3.1. **Quantitative *real-time* PCR der CD34+ Zellen von CML-Patienten**

Für die CD34+ Zellen der 6 CML-Patienten wurden die zufällig ausgewählten 8 Targetgene MELK, CDC2, BIRC5, BUB1B, HSPA8, MCM4, RHOB und BTG2 hinsichtlich ihrer Expression vor und nach 7 Tagen Imatinib untersucht. Die Gene sind den vorher angesprochenen Bereichen Adhäsion, Zellzyklus, DNA-Replikation und Reparatur, sowie genereller und CML-assoziierter Carzinogenese zuzuordnen. Jedes der ausgewählten Gene wurde im Doppelansatz bei allen 6 Patienten gemessen und bei jeder Messung das Housekeeping-Gen 18S rRNA als internes Referenzgen mitgeführt. Die in jedem Lauf gemessenen Werte der Targetgene wurden auf die als Standard definierte Expression der 18S rRNA bezogen. Anschließend wurde die Differenz der ΔC_t -Werte der unbehandelten CD34+ Zellen und der CD34+ Zellen nach 7 Tagen Imatinib-Therapie ermittelt ($\Delta\Delta C_t$ -Werte) und entlogarithmiert, so dass als Endergebnis die Expressionsänderungen (*fold changes*) vorlagen. Abbildung 3.7 zeigt die hierbei ermittelten *fold changes* (weiße Säulen) im direkten Vergleich zu den Genexpressionsänderungen der Affymetrix-Analyse (schwarze Säulen). Die durch die Imatinib-Gabe induzierte differenzielle Expression der getesteten Gene konnte bei allen Genen und Patienten bestätigt werden (Abbildung 3.7).

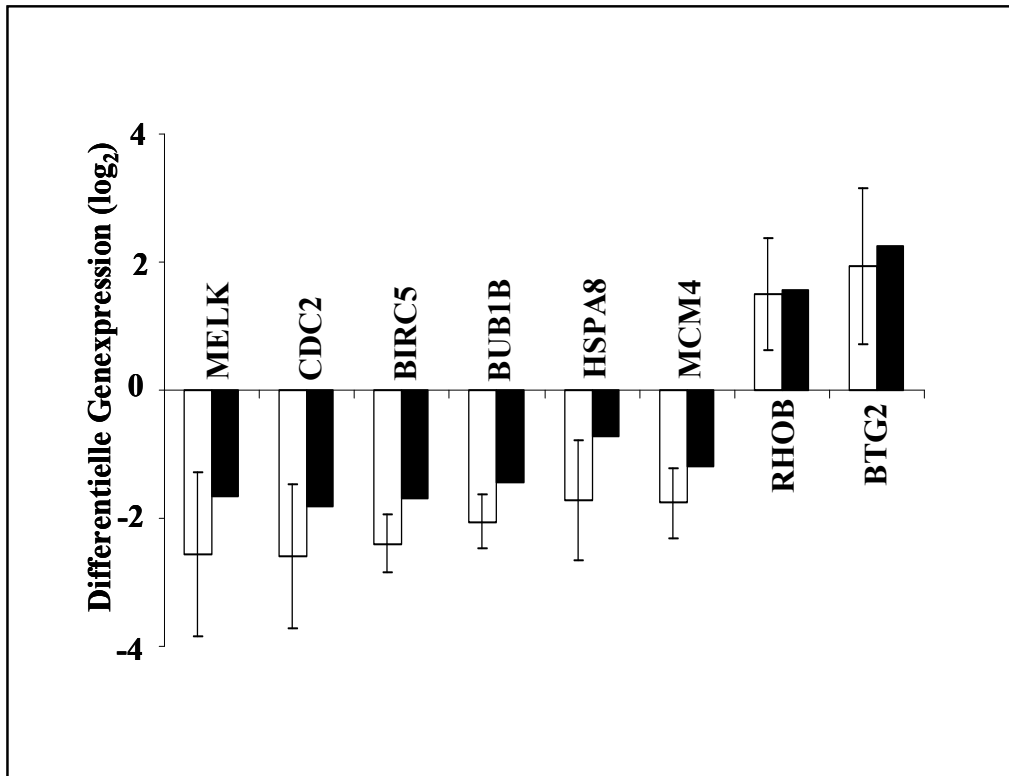


Abbildung 3.7 Bestätigung der Microarray-Daten durch die quantitative *real-time* PCR. Die Expressionsänderungen, die durch die qRT-PCR ermittelt wurden, sind in weißen Säulen dargestellt, die der Affymetrix Daten in schwarzen Säulen. *Fold changes* >0 bedeuten eine höhere Expression in Ph+ CD34+ CML Zellen nach 7 Tagen Imatinib-Therapie, *fold changes* <0 kennzeichnen eine höhere Expression in unbehandelten Ph+ CD34+ CML Zellen. Die Y-Achse ist logarithmisch. Die Expression sämtlicher Gene, die durch qRT-PCR beurteilt wurde, war bei allen Genen signifikant differenziell ($p < 0,01$). Die Ergebnisse der qRT-PCR sowie der Affymetrix Genchipanalyse wurde bei 6 Patienten vor und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie durchgeführt.

3.3.2. Quantitative *real-time* PCR für die K562 Zelllinie

Auch die Genexpressionsdaten der K562 Zelllinie nach Behandlung mit Imatinib bzw. Nilotinib wurden bei zufällig ausgewählten Genen verschiedener funktioneller Gruppen mittels quantitativer *real-time* PCR bestätigt. Die Analyse wurde bei folgenden 11 Genen durchgeführt: *CDK2*, *HBB*, *ICAM4*, *LYN*, *MYC*, *LEPR*, *GATA2*, *PIM1*, *PIM2*, *ORC5L* sowie *HOXA10*. Die qRT-PCR bestätigte auch hier die Genexpressionsdaten der Affymetrix Genexpressionsanalysen, dass diese nach Nilotinib-Behandlung alle 11 Gene und nach Imatinib-Behandlung nur 7 der 11 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert waren ($p < 0,05$, Abbildung 3.8). Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch einen LightCycler Lauf in dem DMSO-behandelte K562 Zellen mit Imatinib behandelten K562 Zellen verglichen wurden. Als Referenzgen für den Vergleich Imatinib versus DMSO behandelte K562 Zellen diente *METAP1* und die 18SrRNA für Nilotinib versus DMSO behandelte K562 Zellen, als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet, das den reversen Transkriptionsmix enthielt. Die so genannten *Crossing Points* (CT), anhand derer die differenzielle Expression wie in Kapitel

2.19.3 beschrieben berechnet wurde, wurden automatisch von der LightCycler Software mittels der *Second Derivative Maximum Method* berechnet.

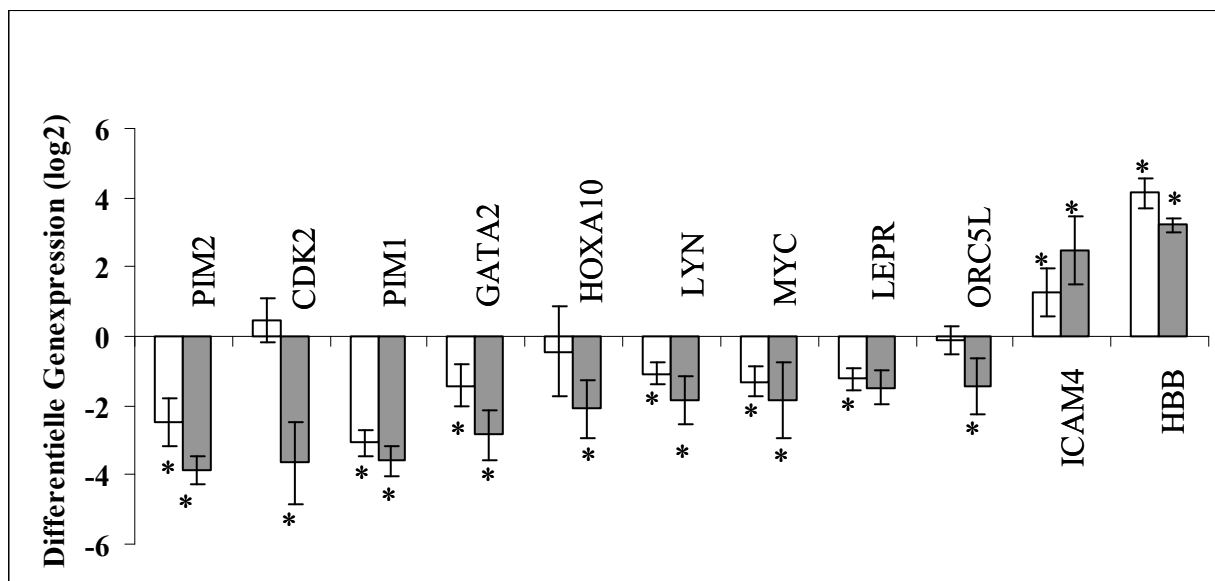


Abbildung 3.8 Bestätigung der Microarray-Daten durch die quantitative real-time PCR. Die Expressionsunterschiede der Imatinib-behandelten K562 Zellen sind in weißen Säulen dargestellt, die der Nilotinib-behandelten K562 Zellen in grauen Säulen. *Fold changes* >0 bedeuten eine höhere Expression in Imatinib- bzw. Nilotinib-behandelten K562 Zellen, *fold changes* <0 kennzeichnen eine höhere Expression in DMSO behandelten K562 Zellen. Die Y-Achse ist logarithmiert. Die Expression sämtlicher Gene, die durch qRT-PCR beurteilt wurde, war bei allen Genen signifikant differenziell ($p < 0,05$).

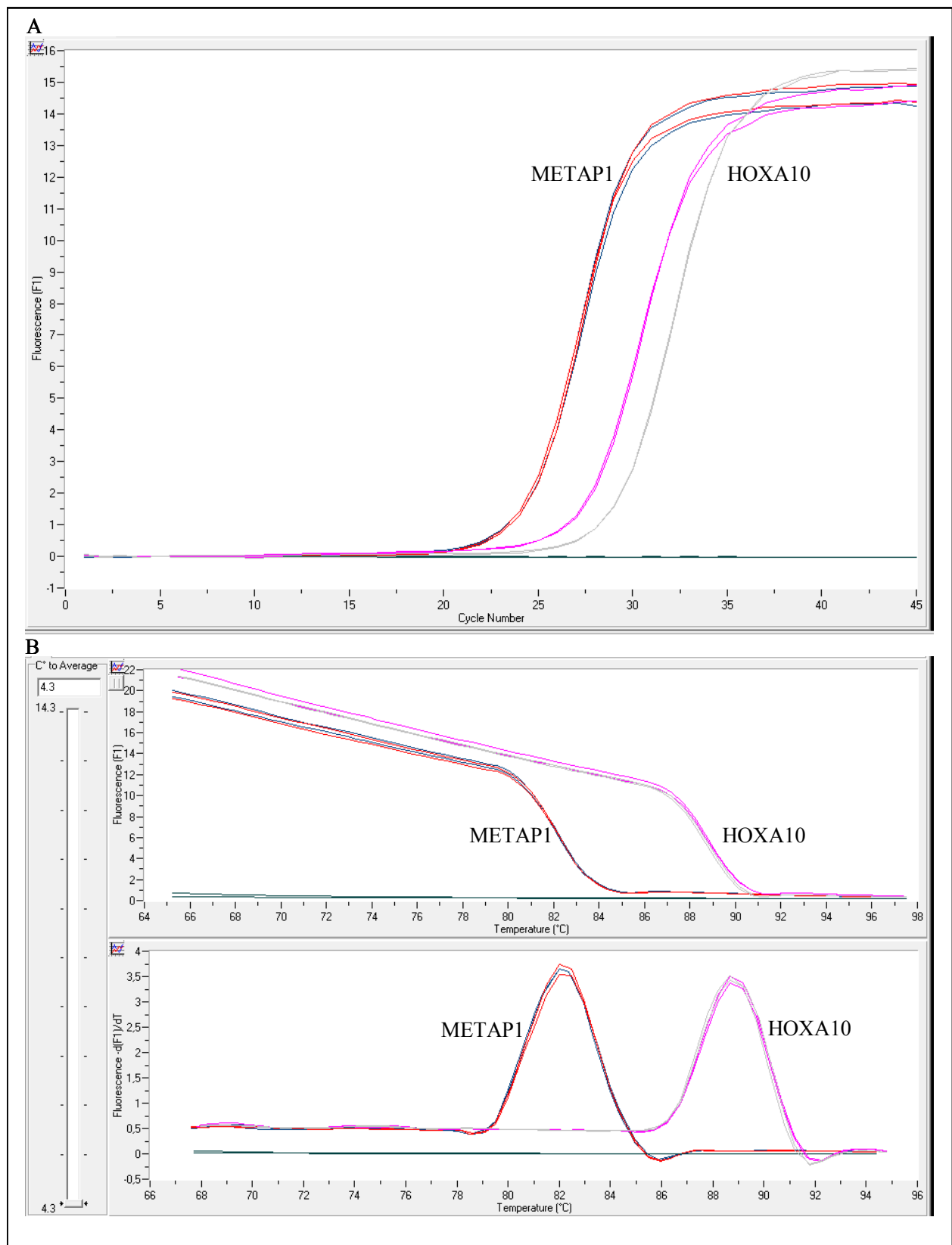


Abbildung 3.9 Beispiel für eine quantitative real-time PCR. A) Quantifizierung. Es sind jeweils die Amplifikationskurven des Referenzgens METAP1 sowie des Gens HOXA10 dargestellt. Während sich die Expression für METAP1 nicht zwischen der DMSO-Kontrolle (blau) und mit Imatinib behandelten K562 Zellen (rot) unterscheidet, sieht man einen, dass HOXA10 bei DMSO-behandelten Zellen (rosa) stärker exprimiert wird als bei Imatinib behandelten Zellen (grau). Die Wasserkontrolle ist schwarz. B) Schmelzkurvenanalyse. Die Schmelzkurven sind für jedes Gen spezifisch und liegen bei gleichen Genen / unterschiedlichen Proben übereinander.

3.4. Funktionelle Analysen

3.4.1. Untersuchungen zur Proliferation der K562 Zellen

Nachdem sich in der Auswertung der Genexpressionsanalysen einige herunter regulierte Proliferations-assoziierte Gene fanden, wurde die Proliferationsfähigkeit der K562 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit den TKIs Imatinib bzw. Nilotinib mit Hilfe des MTS-Assays untersucht. Dieser Versuch basiert auf einem Farbumschlag der MTS-Lösung, sobald das Substrat MTS unter NADH/NADPH-Verbrauch in ein gefärbtes Formazan-Produkt umgewandelt wird. Das NADH/NADPH entstammt dabei dem Citratzyklus in der inneren Mitochondrienmembran und wird zur ATP-Synthese benötigt. Der Versuch liefert Informationen zur Proliferation der Zellen, da die gemessene Absorption direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in Kultur ist. Diese hängt von der Proliferationsfähigkeit der Zellen ab.

Dabei zeigte sich, dass die Zugabe der beiden TKIs zu einer signifikanten Herabregulierung der Proliferation führte. Dabei verursachte 0,5 μM Imatinib eine Abnahme um $51\pm7\%$, während 0,05 μM Nilotinib zu einer Verringerung um $54\pm4\%$ führte (Abbildung 3.10). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden TKIs.

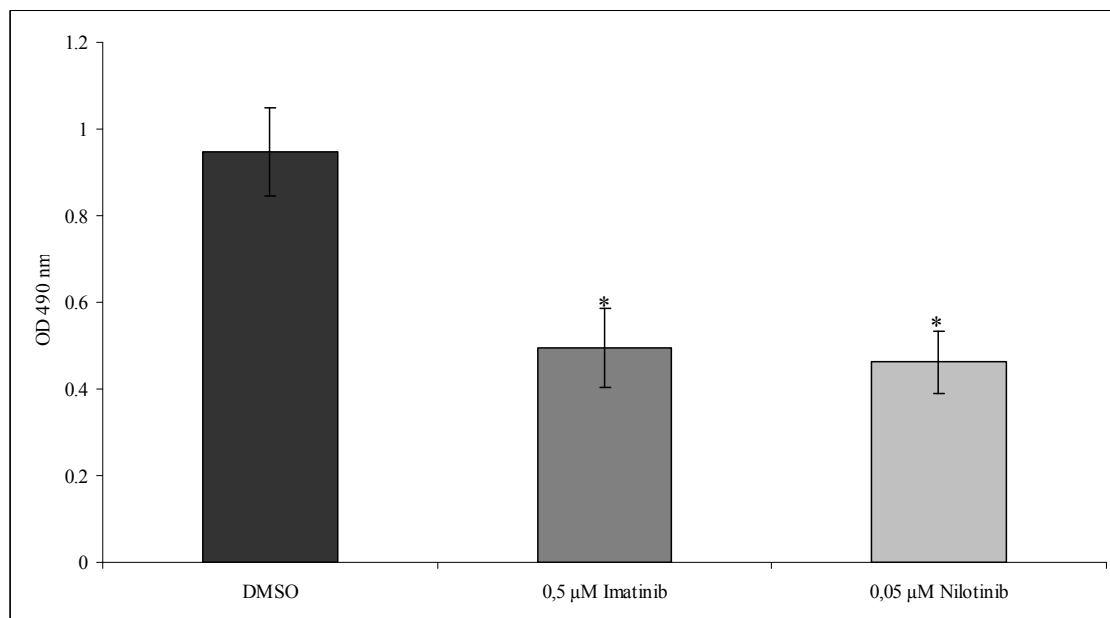


Abbildung 3.10 Proliferationsassay. Die K562-Zelllinie wurde mit DMSO, 0,5 μM Imatinib oder 0,05 μM Nilotinib für 24 Stunden inkubiert. Mit Hilfe der MTS-Lösung wurde die Proliferation der Zellen bestimmt (N=9). Durch beide Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Nilotinib wurde eine signifikante Reduktion der Proliferation erreicht ($p<0,05$, zweiseitiger gepaarter t-Test).

Bei der Zellzählung nach einer Trypanblau-Färbung in der Neubauerkammer gab es nach 24 h keinen signifikanten Unterschied in den Zellzahlen, die gegenüber der DMSO-Kontrolle um $50 \pm 1\%$ reduziert waren, die Viabilität der Zellen betrug jeweils $97 \pm 1\%$. Nach 48 h waren die Zellen unter dem Einfluss beider TKIs geschrumpft, unter Imatinib-Behandlung waren die Zellen zu $24 \pm 1\%$ tot, unter Nilotinib-Behandlung zu $54 \pm 2\%$. Unter Imatinib-Behandlung war die Anzahl lebender Zellen um $22 \pm 1\%$ höher als nach Nilotinib-Behandlung. Eine Auswertung der Zahl lebender / toter Zellen nach 72 h bzw. 96 h konnte nicht erfolgen, da die Zellen nicht nur abgestorben, sondern zu nicht quantifizierbarem Zellschrott zerfallen waren.

3.4.2. Untersuchungen zur Apoptose der K562 Zellen

Da sich in den Genexpressionsanalysen Gene, die die Apoptose regulieren, als differenziell exprimiert zeigten, wurde ein ELISA-basierter Apoptose-Assay durchgeführt. Dieser Assay detektiert frühe Apoptose in den Zellen basierend auf dem Nachweis von DNA-Degradation sowie Histon-Freisetzung. Dabei induzierte $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib einen 1,3-fachen Anstieg der Apoptoserate, während $0,05 \mu\text{M}$ Nilotinib einen 5-fachen Anstieg selbiger erzielte (Abbildung 3.11). Für beide experimentellen Setups war der Anstieg des Apoptose-Levels signifikant. Die höhere Potenz von Nilotinib gegenüber Imatinib spiegelt sich dabei in einer höheren Apoptose-Rate wider.

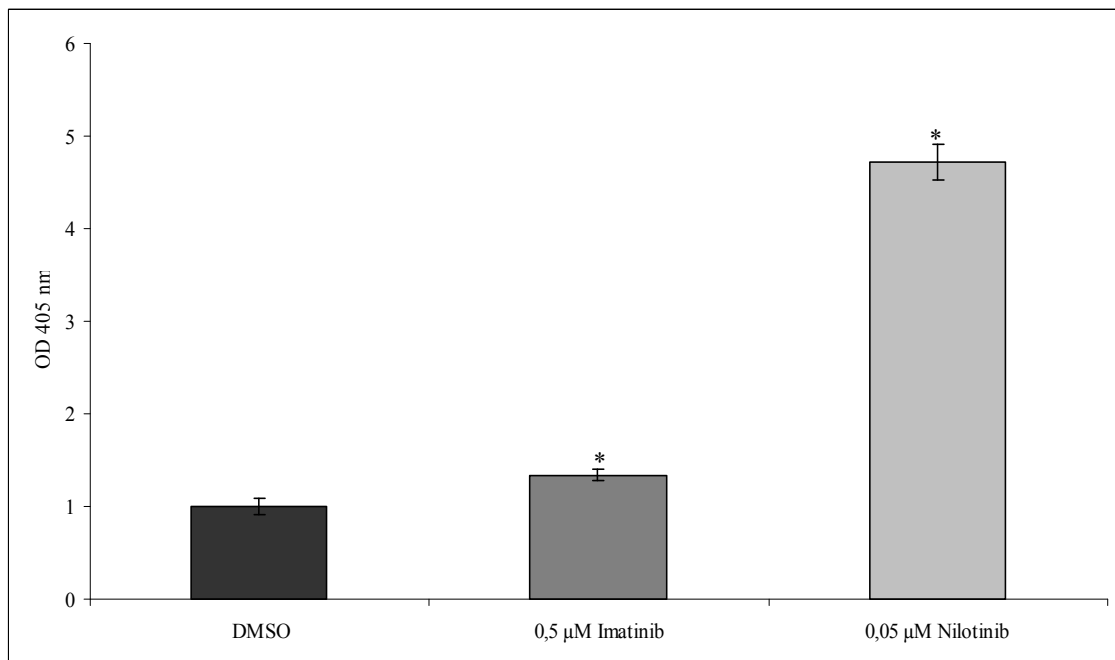


Abbildung 3.11 Apoptose ELISA. Die K562 Zellen wurden für 24 Stunden mit DMSO, $0,5 \mu\text{M}$ Imatinib oder $0,05 \mu\text{M}$ Nilotinib inkubiert. Mit Hilfe des *Cell Death Detection ELISApplus Kits* wurde anschließend die Apoptoserate bestimmt. Bei beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde eine signifikante Erhöhung der Apopterate detektiert ($p < 0,05$, gepaarter zweiseitiger T-Test) ($N=5$).

Als weiteres Experiment zur Untersuchung später Apoptosesignale kam ein Annexin V basierter Apoptose-Assay zum Einsatz. Dieser Test detektiert die Membranstülpung der Zellen, bei der das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) freigesetzt wird. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den DMSO-behandelten K562 Zellen und den mit Imatinib bzw. Nilotinib behandelten K562 Zellen mit diesem Assay detektiert werden (Abbildung 3.12). Die beiden TKIs wirkten innerhalb der 24-stündigen Behandlungszeit keine Membranstülpung der Zellen.

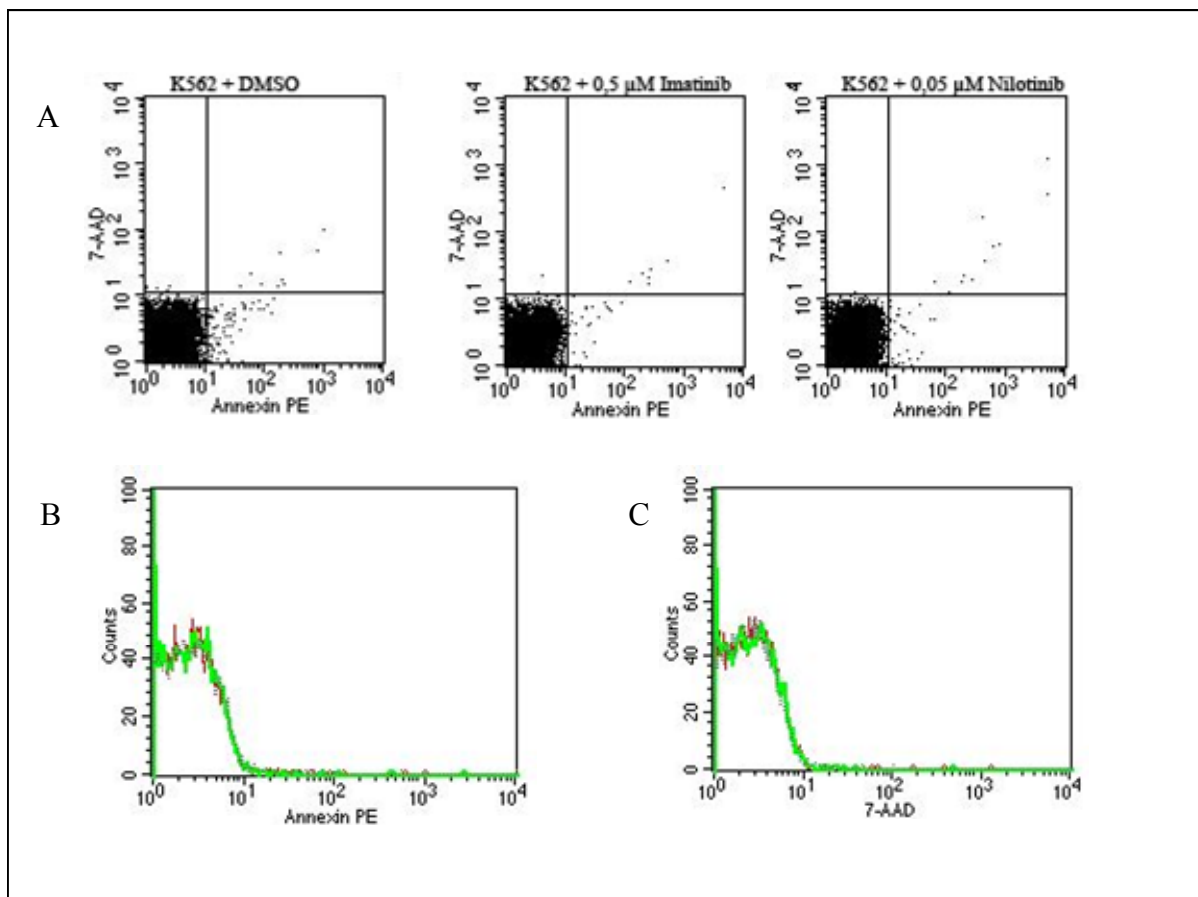


Abbildung 3.12 Annexin V-basierter Apoptose-Assay. K562 Zellen wurden für 24 h mit DMSO, 0,5 µM Imatinib oder 0,05 µM Nilotinib inkubiert und anschließend die Apoptoserate durchflusszytometrisch über Annexin V und 7-AAD bestimmt. Zellen, die für Annexin V und 7-AAD negativ sind (Werte <10¹), sind lebend, positive Zellen sind tote Zellen A) Punktwolkendiagramm Annexin V-PE gegen 7-AAD B) Overlay der Counts für Annexin V und C) für 7-AAD (grün: Imatinib, rot: Nilotinib; grau: DMSO).

3.4.3. Zellzyklusanalyse der K562 Zellen

Da die Genexpressionsdaten Veränderungen in Genen zeigten, die mit dem Zellzyklus assoziiert sind, wurde eine FACS-basierte Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) sowie der DNA-bindenden Farbstoff 7-AAD verwendet. Extern zugegebenes BrdU kann von Zellen im Zuge der DNA-Replikation

konkurrierend mit intrazellulär synthetisiertem Thymin in die DNA eingebaut werden, wenn diese den Eintritt in die S-Phase vollziehen bzw. sich in der S-Phase befinden. Anschließend wird das Basenalogon durch fluoreszenzmarkierte Antikörper durchflusszytometrisch detektiert, wodurch sich die neu synthetisierte DNA von der kompletten, mit 7-AAD gefärbten Gesamt-DNA unterscheiden lässt. Dabei ist die G0/G1-Phase für BrdU und 7-AAD negativ, die S-Phase für BrdU und 7-AAD positiv und die G2/M-Phase für BrdU negativ und für 7-AAD positiv. Die Zellzyklus-Analysen wurden mit unbehandelten sowie mit den TKIs behandelten K562 Zellen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 3 h, 6 h und 40 h, um zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Unterschiede im Zellzyklus zu analysieren. Dabei sind 3 h und 6 h willkürlich gewählt, die 40-stündige Inkubation wurde gewählt, weil die Verdopplungszeit von 30-40 Stunden hat und damit sichergestellt werden sollte, dass jede Zelle einen kompletten Zellzyklus betrieben hat. Nach 3 h Inkubation mit BrdU befanden sich nur noch 8,72% der mit Imatinib behandelten K562 Zellen bzw. 4,38% der mit Nilotinib behandelten K562 Zellen in der S- oder Synthese-Phase des Zellzyklus, während der Anteil an Zellen in dieser Phase bei der mit DMSO behandelten Kontrolle bei 21,38% lag. Eine 6- bzw. 40-stündige Inkubation mit BrdU erbrachte ähnliche Ergebnisse (Tabelle 3.4). Die Ergebnisse dieser Zellzyklus-Analysen zeigen somit eine Reduktion des Anteils der sich in der S-Phase befindlichen K562 Zellen und Verschiebung zur G0/G1-Phase unter Behandlung mit den TKIs. Damit wird die Synthese der Zellen reduziert und mehr Zellen in der Ruhephase (G0-Phase) befinden, in der keine Zellteilung stattfindet. Auch hier zeigt sich die effektivere Wirkung von Nilotinib gegenüber Imatinib.

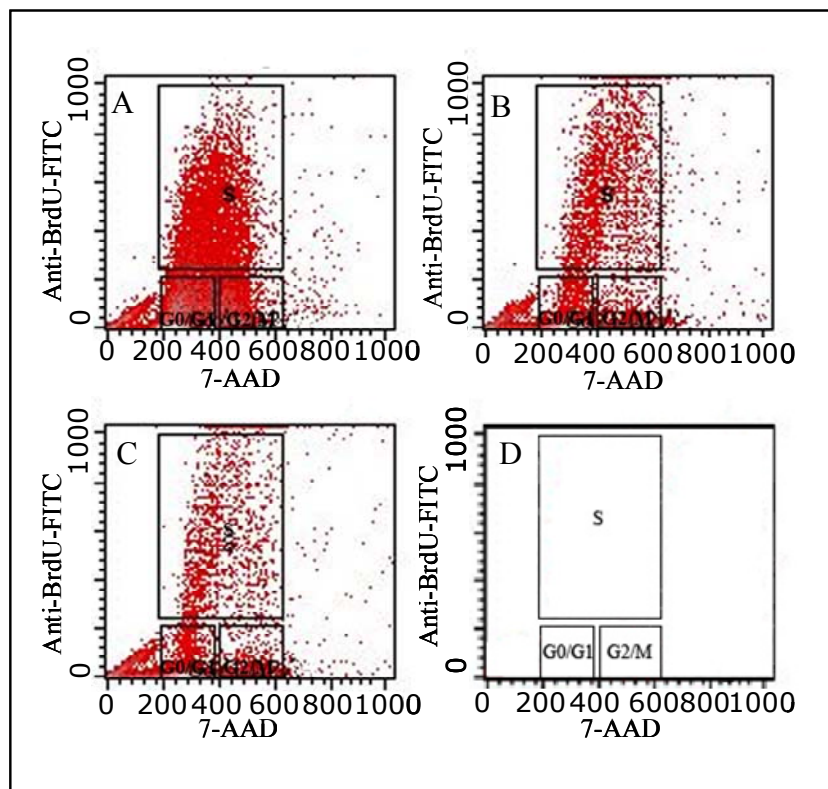


Abbildung 3.13 Zellzyklusanalyse von A) mit DMSO behandelten B) mit 0,5 µM Imatinib behandelten C) mit 0,05 µM Nilotinib behandelten K562 Zellen und D) Einteilung der einzelnen Phasen. X-Achse: 7-AAD-Signal, Y-Achse: Anti-BrdU-FITC-Signal. Entsprechend der Lage der Zellen im Plot werden sie in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G0/G1-, S- und G2/M- Phase) eingeteilt.

Tabelle 3.4 Auswertung g des BrdU-Assays. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der unbehandelten und der mit DMSO, Imatinib bzw. Nilotinib behandelten K562 Zellen, die sich in der G0/G1-, S- bzw. G2/M-Phase befinden. Die Messungen erfolgten nach 24-stündiger Inkubation mit DMSO, Imatinib bzw. Nilotinib und anschließender 3, 6 bzw. 40stündiger Inkubation mit BrdU.

	K562 + DMSO	K562 + 0,5 µM Imatinib	K562 + 0,05 µM Nilotinib
3h BrdU			
G0/G1	54.50	69.11	60.82
S 21	.38	8.72	4.38
G2/M	10.06	8.18	6.38
6h BrdU			
G0/G1	54.04	62.65	64.98
S 23	.82	10.65	4.52
G2/M	11.24	9.95	4.02
40 h BrdU			
G0/G1	22.98	37.8	19.23
S 51	.00	18.92	9.26
G2/M	5.30	11.37	7.06

3.5. Proteinexpression

3.5.1. Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von STAT5

Die für die CML charakteristische konstitutiv aktive Tyrosinkinase BCR-ABL führt zu einer ständigen Phosphorylierung des JAK/STAT und des PI3K/AKT-Signalwegs. Die TKIs unterbinden diese ständige Phosphorylierung durch Bindung an die ATP-Bindestelle des BCR-ABL. So wird diese Bindestelle belegt und für andere Proteine nicht mehr nutzbar und downstream gelegene von BCR-ABL ausgelöste Phosphorylierungskaskaden werden unterbrochen. Eine dieser unterbrochenen Kaskaden führt über den JAK/STAT-Signalweg. Ein zentrales Protein dieses Signalweges ist *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5), dessen Expression und Phosphorylierungslevel mit Hilfe von Western Blots untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass die TKIs Imatinib sowie Nilotinib keinerlei Einfluss auf die Expression des Proteins STAT5 in K562 Zellen nahmen, welches nach 24-stündiger Behandlung mit den TKIs genauso stark exprimiert war wie die DMSO-Kontrolle. Die Phosphorylierung von STAT5 an der Tyrosin 694-Stelle (Tyr694) hingegen wurde, wie die spezifische Bande bei 90 kDa in Abbildung 3.14B zeigt, sowohl durch die Behandlung der K562 Zellen mit Imatinib als auch mit Nilotinib vollständig inhibiert. Als Referenzprotein wurde GAPDH verwendet, welches mit und ohne TKI-Behandlung gleichmäßig stark exprimiert wurde und eine starke Bande bei ca. 38 kDa sowie eine schwache Bande bei 34 kDa lieferte (Abbildung 3.14A).

3.5.2. Proteinexpression von CDC25C und Phosphorylierungsstatus

Da sich in der Zellzyklusanalyse gezeigt hat, dass die TKIs Veränderungen im Zellzyklus hervorrufen die Nilotinib behandelten K562 Zellen die niedrigste prozentuale Verteilung von Zellen in der G2/M-Phase aufwiesen und mit CCNB2 ein Gen des G2/M-Arrests sowohl in den Genexpressionsdaten der CML-Patienten als auch in den Genexpressionsdaten der mit den TKIs behandelten K562 Zelllinie differenziell exprimiert war, wurde die Proteinexpression von CDC25C sowie der Phosphorylierungsstatus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proteinexpression von CDC25C durch die TKIs nicht beeinflusst wurde, während Imatinib für eine schwächere Expression der Phosphorylierung an der Serin216-Stelle (Ser216) bewirkte. Die schwächste Proteinexpression wurde nach einer Behandlung der K562 Zellen mit Nilotinib erzielt (Abbildung 3.14C).

3.5.3. Proteinexpression der Protoonkogene PIM-1 und PIM-2

In den Genexpressionsdaten der K562 Zellen zeigten sich die Serin-Threonin-Kinasen PIM-1 und PIM-2, bei denen es sich um Protoonkogene handelt, die regulatorische Funktionen im Bereich Proliferation, Zellzyklus und Apoptose aufweisen, herunter reguliert. Weiterhin fand sich PIM-1 auch in den Genexpressionsanalysen der CML-Patienten unter den durch Therapie herunter regulierten Genen. Deshalb wurde auf Proteinebene untersucht, inwieweit sich die Proteinexpression dieser beiden Proteine mit und ohne TKI-Behandlung unterscheidet. Es zeigte sich, dass die Proteinexpression nach 24-stündiger Inkubation mit den TKIs bei PIM-1 und PIM-2 geringer war als ohne Behandlung und dass hierbei Nilotinib einen stärkeren Effekt auf die Proteinexpression hat (Abbildung 3.14D, E).

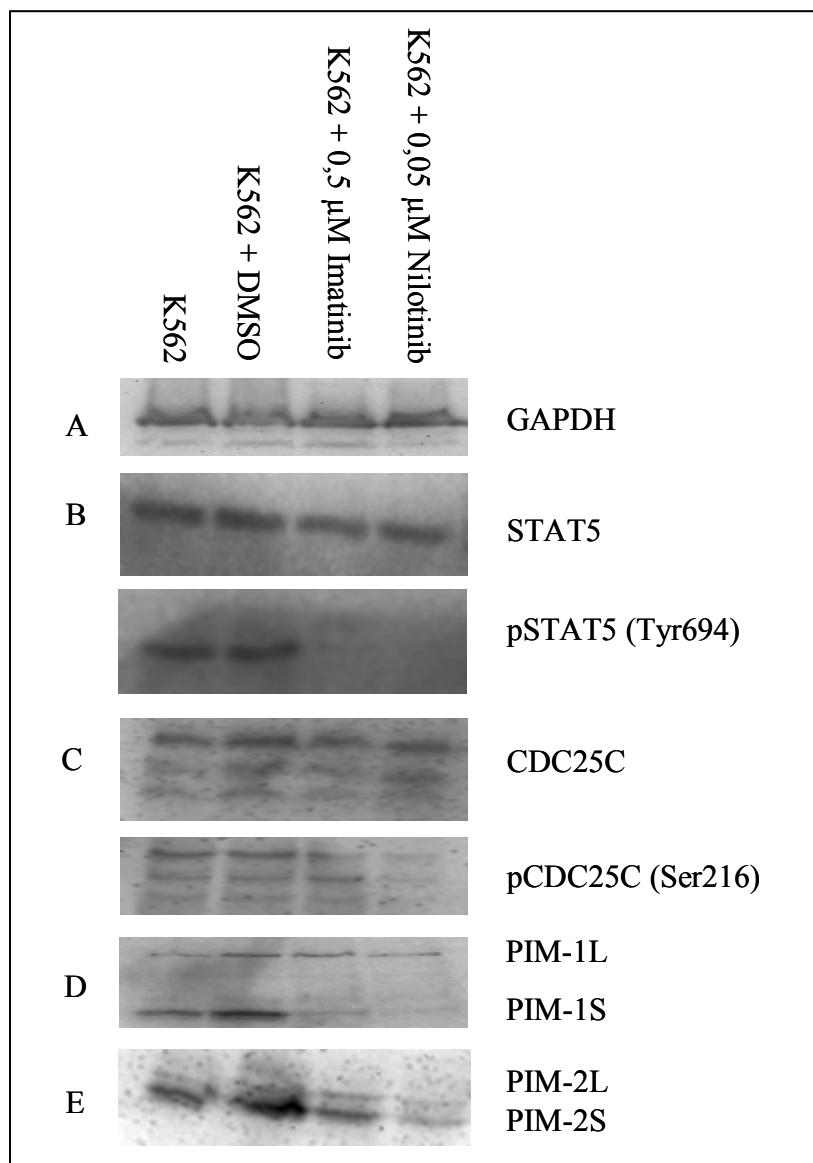


Abbildung 3.14 Western Blots von unbehandelten, mit DMSO, 0,5 µM Imatinib und 0,05 µM Nilotinib behandelten K562 Zellen. A) Referenzprotein GAPDH B) STAT5 und pSTAT5 (Tyr694) C) CDC25C und pCDC25C (Ser216) D) PIM-1 E) PIM-2.

4. Diskussion

Mit der Entwicklung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib begann eine neue Ära in der Therapie der CML-Behandlung. Die Entwicklung von selektiveren TKIs wie Nilotinib war eine Konsequenz aus der Tatsache, dass bei etwa 18% der Patienten eine BCR-ABL abhängige oder BCR-ABL unabhängige primäre oder sekundäre Resistenz gegen Imatinib entsteht (Goldman, 2004; Kantarjian *et al.*, 2007a; Shah, 2005). Diese Patienten reagieren dementsprechend wenig bis gar nicht auf die Imatinib-Therapie an oder es kommt zu einem Progress der Krankheit trotz primären Ansprechens auf Imatinib (Goldman and Melo, 2008). Der Wirkmechanismus auf Proteinebene, das Binden des jeweiligen TKIs an die ATP-Bindestelle von BCR-ABL und die damit resultierende Inhibierung der Phosphorylierungskaskaden des STAT5-RAD51 Signalwegs, des RAS/RAF/MEK/ERK Signalwegs sowie des PI3K/AKT Signalwegs ist bekannt und in der Literatur beschrieben (Goldman and Melo, 2003). Hierbei regulieren der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg direkt sowie der PI3K/AKT-Signalweg über das p27(KIP-1) (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)*) Protein die Zellproliferation und Transformation (Kantarjian *et al.*, 2006). Zusätzlich wird über den PI3K/AKT Signalweg die Apoptose gehemmt, indem das Protein BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*) inhibiert wird, welches seinerseits BCL-X_L hemmt. Daneben aktiviert AKT das Protein NF-κB (*nuclear factor kappa-B*), ebenfalls ein Apoptose-Inhibitor. Der STAT5-RAD51 Signalweg reguliert DNA Reparatur und spielt bei Imatinib-Resistenz eine Rolle (Skorski, 2002). Weiterhin wird BCL-X_L durch STAT5 gehemmt (Kantarjian *et al.*, 2006). Außerdem reguliert STAT5 über PIM1 zum einen Apoptose, zum anderen über seine Zellzyklus-Regulatorfunktion Proliferation (Skorski, 2002).

Es ist nicht bekannt oder beschrieben, welches frühe Gene sind, die bei CML-Patienten auf eine Behandlung mit Imatinib mit Veränderungen der Expressionsstärke reagieren. Es ist bisher nicht geklärt, welche Gene dafür verantwortlich sind, dass die Patienten bei einem Ansprechen auf die Therapie im weiteren Verlauf eine hämatologische sowie zytogenetische Remission erreichen, und sich auf molekularbiologischer Ebene eine „*major molecular response*“, d. h. eine Reduzierung des BCR-ABL Wertes um mindestens 3 log-Stufen abspielt.

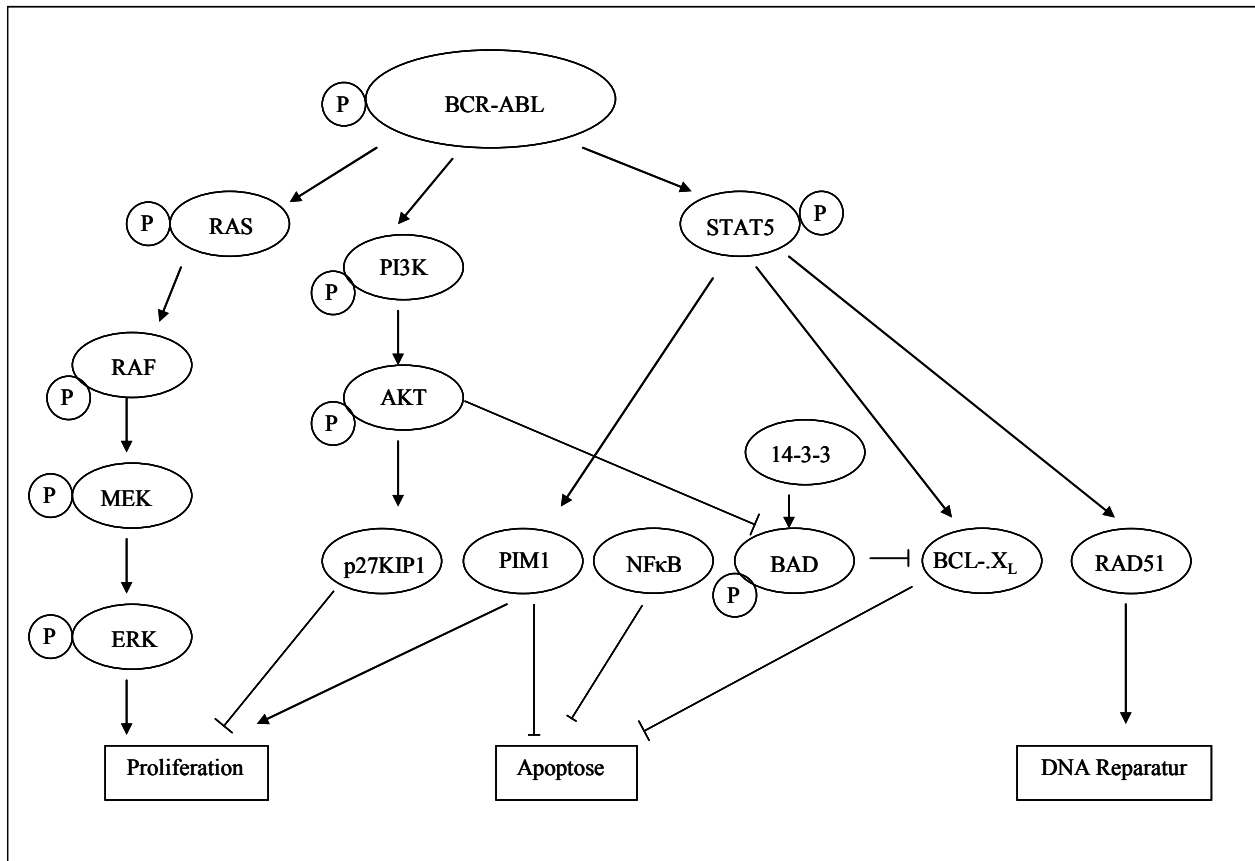


Abbildung 4.1 Wichtige Signalwege downstream von BCR-ABL.

Eine weitere Frage ist, worin neben der höheren spezifischen Bindung in der ATP Bindungstasche die höhere Potenz von Nilotinib gegenüber Imatinib begründet liegt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Genexpressionsanalysen sowie funktionelle Assays mit der K562 Zelllinie durchgeführt. Diese spiegelt den Typus einer fortschreitenden Krankheit wider, da sie 1970 von einer Frau in Blastenkrise gewonnen wurde (Lozzio and Lozzio, 1975). Sie ist ein in der Wissenschaft anerkanntes Modell, das auch heute noch verwendet wird, um CML-relevante Fragenstellungen zu beantworten (Snead *et al.*, 2009). Die Verwendung der Zelllinie hat den Vorteil einer leichten Verfügbarkeit der für die Experimente benötigten Zellen, aber den Nachteil einer kulturbedingten Evolution im Vergleich zu CD34+ Stammzellen. Diese Evolution äußert sich in einem komplexen Karyotyp mit diversen zusätzlichen Mutationen sowie Karyotyp-Anomalien, die neben dem Ph Chromosom auftreten. Um dem Rechnung zu tragen, dass es sich bei der K562 Zelllinie um ein Modell handelt, lag ein Fokus bei der Genexpressionsdaten-Auswertung auf Genen, die bei CD34+ Stammzellen von CML-Patienten differenziell exprimiert waren.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalysen konnte ein Einblick in die transkriptionellen Veränderungen der CML-Zelllinie K562 nach 24-stündiger Behandlung mit den Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib oder Nilotinib sowie von immunmagnetisch selektionierten, primären Ph⁺ CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen nach 7-tägiger Behandlung von CML-Patienten mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib gewonnen werden. Während sich in den CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen mit 303 Genen relativ wenige Gene in ihrer Expressionsstärke veränderten, war die Wirkungsweise der TKIs auf die Gene der K562 Zelllinie deutlich stärker, was zu einer Änderung der Genexpressionsstärke bei 1182 Genen im Falle einer Behandlung mit Imatinib bzw. von 2539 Genen im Falle einer Behandlung mit Nilotinib führte. Betrachtet man die einzelnen differenziell exprimierten Gene genauer, ergibt sich für Imatinib ein antiproliferativer Effekt, während der Effekt von Nilotinib nicht nur antiproliferativ, sondern auch frühapoptotisch ist.

4.1. FISH-Analyse und Patientencharakteristika

Die FISH-Analyse zeigte einen medianen Anteil von 87% (85-89%) CD34⁺ Zellen mit einem typischen *BCR-ABL* positiven Signalmuster bei Patienten mit einer neu diagnostizierten CML. Erwähnenswert erscheint hier die Tatsache, dass offensichtlich eine nicht unerhebliche Zahl an *BCR-ABL* negativen Zellen vorlag, d.h. normale hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen vorhanden sind, die bei unbehandelten Patienten im peripheren Blut zirkulieren. Betrachtet man die isolierten CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut nach sieben Tagen Therapie mit Imatinib in einer Dosierung von 400 mg täglich, zeigt sich ein ähnliches Verhältnis von 85% (84-87%). Dies bedeutet, dass der Behandlungszeitraum von einer Woche offensichtlich zu kurz war, als dass die Zahl der zirkulierenden Ph⁺ CD34⁺ Zellen signifikant reduziert werden konnte. Außerdem ist mit dem ähnlichen Verhältnis an Ph⁺ CD34⁺ Zellen eine Vergleichbarkeit der Daten gegeben, da derselbe Zelltypus mit den Genexpressionsanalysen verglichen wird.

Die Mehrheit der CD34⁺ Zellen ist Philadelphia-Chromosom positiv, aber es gibt eine signifikante Anzahl an Ph⁺ negativen CD34⁺ Zellen im Blut. Das bedeutet, dass es neben malignen Zellen auch gesunde Stamm- und Progenitorzellen im Blut zu geben scheint, die mit dem malignen Klon konkurrieren. Diese werden nicht komplett vom malignen Klon verdrängt. Weiterhin ist festzustellen, dass die Zahl der Ph⁺ CD34⁺ Zellen nur minimal während der ersten Therapiewoche abnimmt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass in

der ersten Woche die molekularen Weichen dafür gestellt werden, die eine Umwandlung einer überwiegend aus Ph⁺ CD34⁺ Progenitorzellen bestehenden Hämatopoese in eine normale Blutbildung bewirken. Deren funktionelle Umsetzung, die zu einer Normalisierung des Blutbilds führt, nimmt im Median 0,9 Monate Zeit in Anspruch.

4.2. Genexpressionsanalysen

4.2.1. Genexpressionsanalysen der CML-Patienten

4.2.1.1. Im BCR-ABL Signaling wird wenig verändert

Ein für die Krankheit wichtiger Signalweg betrifft das *BCR-ABL* Signaling, bei dem sechs Gene der Ph⁺ CD34⁺ Zellen der Patienten nach 7 Tagen Imatinib-Therapie im Vergleich zu vor der Therapie, signifikant differenziell exprimiert waren. Ein Grund dafür, dass von den etwa 50 am Signalweg beteiligten Proteinen nur diese wenigen Gene Veränderungen in ihrer Expression aufwiesen, könnte sein, dass *downstream* von BCR-ABL Phosphorylierungskaskaden für die Proteinaktivierung sorgen. Bei diesen handelt es sich um posttranskriptionelle Veränderungen. Es ist möglich, dass Genexpressionsänderungen des *BCR-ABL* Signalings zu diesem Stadium der Therapie nicht erforderlich sind.

Zwei nach 7-tägiger Behandlung mit Imatinib schwächer exprimierte Gene sind *Bloom Syndrome (BLM)* (Slupianek *et al.*, 2005) sowie *RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (RAD51)*, welches *downstream* von BCR-ABL auf dem STAT5 Signalweg liegt (Slupianek *et al.*, 2001). Dies sind beides Gene, die an der DNA Reparatur beteiligt sind. Die Expression von BCR-ABL erhöht die RAD51-Expression (Slupianek *et al.*, 2001), welches als Protein entscheidend an einer Homologie-abhängigen Rekombinations-Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Slupianek *et al.*, 2002) und außerdem mit der ebenfalls schwächer exprimierten Helicase BLM interagiert. Die Interaktion von RAD51 und BLM wird durch BCR-ABL forciert (Slupianek *et al.*, 2005). Daneben war der *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)*, ein weiteres Gen des BCR-ABL/STAT Signalwegs, hochreguliert. Dieses wurde in Genexpressionsanalysen bei unbehandelter CML ebenfalls als verstärkt exprimiert beschrieben (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Dies könnte daraus resultieren, dass die Erhöhung des Genexpressionslevels möglicherweise keinen Einfluss auf den BCR-ABL/STAT-Signalweg hat, weil der entscheidende Mechanismus von Imatinib posttranskriptionell die Blockierung der ATP-Bindetasche von BCR-ABL ist und damit die

Phosphorylierung von STAT3 inhibiert wird. Außerdem ist bekannt, dass *RAN*, member *RAS oncogene family* (*RAN*) in BCR-ABL positiven Zellen überexprimiert ist und durch Behandlung der Zellen mit Imatinib in seiner Expression eingebremst wird (Salesse and Verfaillie, 2003). Es bildet zusammen mit den Genen *RAN binding protein 1 und 5* (*RANBP1*; *RANBP5*) zusammen einen trimeren Komplex (Deane *et al.*, 1997), der eine Rolle in der Mitose spielt (Seewald *et al.*, 2003). Die schwächere Expression dieser Gene während Imatinib und ihr Einfluss auf die Mitose haben möglicherweise eine die Zellteilung verlangsamende Wirkung auf die Zellen, denn Gene, die weiter *downstream* in diesem Signalweg differenziell exprimiert werden, steuern wichtige Prozesse wie Proliferation und Zellzyklus, DNA Reparatur, aber auch Apoptose.

4.2.1.2. Zellzyklus und Proliferation werden durch Imatinib gebremst

Ein weiteres Augenmerk in der Auswertung der Daten lag auf dem Prozess der Zellproliferation, der über den Zellzyklus reguliert wird. Diese wird durch Imatinib an verschiedenen Stellen durch bestimmte Schlüsselgene des Zellzyklus herunter reguliert, die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktiv sind. In den während dieser Arbeit angefertigten Genexpressionsanalysen zeigten sich Gene der S-Phase wie *cell division cycle 2 und 20* (*CDC2*) (Doree and Galas, 1994) und (*CDC20*) (Goh *et al.*, 2000), *Geminin* (*GMNN*) (Seo and Kroll, 2006) sowie *minichromosomal maintenance complex, subunit 4* (*MCM4*) (Zhou *et al.*, 2001) nach 7 Tagen Imatinib Therapie herunter reguliert. Dabei wurde der größte Genexpressionsunterschied für *CDC2* beobachtet, der 3,5-fach war. Für die weitere Progression in die G2-Phase werden weitere Proteine benötigt, wie z. B. *CDC2* und *cell division cycle 45 like* (*CDC45L*) (Bauerschmidt *et al.*, 2007), welche auf Genexpressionsebene nach 7 Tagen Imatinib-Therapie ebenfalls herunter reguliert sind. Weiterhin sind *Cyclin B1* und *B1* (*CCNB1*; *CCNB2*), die ebenso auf Genexpressionsebene herunter reguliert waren, am G2/M-Arrest beteiligt (Bellanger *et al.*, 2007), während andere Gene, deren Proteine den Arrest kontrollieren, wie *CDS1*, *WEE1* oder *MIK1* nicht betroffen waren (Zhao *et al.*, 2005). Der *ZW10 interactor* (*ZWINT*), der ebenfalls inhibiert wurde, ist ein Zellzyklus-Kontrollgen (Le *et al.*, 2005), das eine Rolle in der Kinetochoren-Bildung spielt. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Zellzyklus gebremst, aber nicht vollständig inhibiert wird.

Die Verlangsamung der Mitose auf dem Level von Genexpression stimmt mit der Literatur überein, die auf BCR-ABL Zielproteine abzielt. So wird z. B. c-MYB für Proliferation und Überleben von myeloiden Progenitoren sowie leukämischen Blastenzellen in der CML benötigt (Lidonici *et al.*, 2008) und es ist bekannt, dass es von Imatinib beeinflusst wird (Kohmura *et al.*, 2004). Eines der Zielgene von c-MYB ist das Cyclin B1, welches in der Analyse herunter reguliert war. Überdies ist der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg oder MAP Kinase Signalweg als intrazelluläre Signalkaskade bekannt, die eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Zellzyklus und Proliferation in der CML Zelle spielt (Steelman *et al.*, 2004). Da die Mitglieder dieser Signalkaskade durch Imatinib nicht mehr phosphoryliert werden, ist die Herunterregulation des Zellzyklus eine Folge der Imatinib-Therapie (Chang *et al.*, 2003a; Chang *et al.*, 2003b; Chang *et al.*, 2003c). So aktivieren die RAF-Proteine das zyklische *AMP-responsive element binding Protein* (CREB), welches wiederum Cyclin A aktiviert, das in der S- und G2-Phase aktiv ist (Bottazzi *et al.*, 2001). Das Cyclin A bildet einen Komplex mit CDC2, das auf Genexpressionsebene in dieser Analyse ebenfalls herunter reguliert war. Das Ergebnis der verminderten Expression des RRM2 Gens nach Imatinib-Therapie spiegelt sich auch auf dem Proteinlevel wider. Heidel *et al.* konnten 2007 zeigen, dass das Ausschalten von RRM2 über NF- κ B (Duxbury and Whang, 2007), welches in der späten G1 und S-Phase aktiv ist (Engstrom *et al.*, 1985), die Proliferationsrate in leukämischen Zellen inhibiert (Heidel *et al.*, 2007).

4.2.1.3. DNA Replikation und Reparatur werden in Imatinib-behandelten Zellen vermindert

Ein weiterer relevanter Aspekt der Auswertung betraf die DNA Replikation, die in der S- oder Synthesephase des Zellzyklus stattfindet. Hier fand sich in der Genexpressionsanalyse eine hohe Anzahl an Genen, die bei den CML Patienten nach 7 Tagen Therapie herunterreguliert waren. Im einzelnen waren dies die Prozesse der Entspiralisierung des DNA-Doppelstrangs, für das zum einen *TOP2A* (Wang, 1991), zum anderen aber auch der MCM-Helicase-Komplex verantwortlich sind (Davey *et al.*, 2003). Hierbei wiesen die Gene *MCM2*, 3, 4, 6 und 7 in der Untersuchung vor Therapiebeginn einen höheren Expressionsgrad in den CD34+ Zellen auf. Eine signifikante Veränderung konnte auch für die Gene *TIMELESS* und *TIMELESS interacting protein (TIPIN)* festgestellt werden, die für Proteine entlang der Replikationsgabel kodieren (Gotter *et al.*, 2007). Dieser Zusammenhang spiegelt sich in den Genexpressionsdaten wider. So ist beispielsweise mit dem Replikationsprotein RPA3 (Lin *et al.*, 1996) eines dieser Replikationsproteine auf Genexpressionsebene ebenfalls nach 7 Tagen Therapie herunter reguliert. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für die Replikationsfaktor-

Aktivatoren RFC3 und RFC4 (Venclovas *et al.*, 2002) sowie für die Polymerase ϵ 2 (POLE2), welche für die Neusynthese der DNA am Folgestrang nötig ist (Fuss and Linn, 2002). Schließlich ist auch das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) Gen, ein Cofaktor der Polymerase δ (Travali *et al.*, 1989), das zweite Enzym der DNA-Strang-Synthese (Gotter *et al.*, 2007), herunter reguliert. Dies wurde auch auf Proteinebene für ein *downstream* Ziel des PI3K/AKT-Signalwegs, dem p21^{Cip1} Protein (p21^{Cip1}), ein Mitglied der CDK Inhibitoren (CKI) gefunden. Von diesem Protein ist bekannt, dass es direkt an PCNA bindet (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994). Eine Phosphorylierung von p21^{Cip1} mittels AKT löst PCNA vom PCNA- p21^{Cip1}-CDK-Cyclin Komplex, wobei es einen Komplex mit der DNA Polymerase δ und dem Aktivator-Protein AP-1 eingeht, welches die DNA-Synthese induziert (Rössig *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Die Inhibierung dieses Prozesses sowie die Herunterregulierung von PCNA auf molekularem Level infolge der Imatinib-Gabe hemmt somit die DNA Synthese konstitutiv.

Die Proteine PCNA, RFC3, RFC4, RPA3 und POLE2, deren Genexpressionslevel durch Imatinib reduziert wurde, sind nicht nur an der DNA Replikation, sondern auch an ihrer Reparatur beteiligt (Venclovas *et al.*, 2002). Dabei scheint das Protein RFC am Basenaustausch bzw. Nukleotidaustausch Signalwegen beteiligt zu sein (McAlear *et al.*, 1996). RFC lädt PCNA zur Schadenserkennung auf die DNA, damit dieses als DNA Polymerase Klammer agieren kann (Sancar *et al.*, 2004). Das Protein APE1 erzeugt eine 5' Inzision in die DNA, damit anschließend eine Kombination aus den DAP Polymerasen δ und ϵ (Pol δ/ϵ), PCNA sowie FEN1 der 3' Strang an der Stelle entfernt werden kann. Anschließend synthetisieren die Pol δ/ϵ mit Hilfe von PCNA ein neues passendes DNA Stück, welches durch die Ligase 1 ligiert wird (Sancar *et al.*, 2004).

Durch die verminderte Proliferation, die infolge eines verringerten Zellzyklus und verminderter Replikation auftritt, könnte insgesamt weniger reparaturbedürftige DNA Schädigung auftreten, so dass für Reparaturmechanismen codierende Gene, schwächer exprimiert werden.

4.2.1.4. *Imatinib führt zu erhöhter Zelladhäsion und verringerter Motilität*

In der Gruppe der für die Zelladhäsion und -motilität verantwortlichen Gene waren verschiedene Gene nach 7 Tagen Therapie mit Imatinib hochreguliert. Dies betraf z. B. das für CD44 kodierende Gen, welches die Hyaluronsäure-Bindungsstelle von CD34+ Zellen darstellt und eine Komponente der Matrix des Knochenmarks ist (Götte and Yip, 2006). Durch die Bindung von CD44 an die Hyaluronsäure wird die Zelladhäsion erhöht, weswegen eine Hochregulation von CD44 möglicherweise für eine erhöhte Adhäsion der CD34+ Zellen im Knochenmark bewirkt. Weiterhin ist auch für L-Selektin, ein Lymphozyten-Adhäsionsmolekül, welches bei Patienten mit neu diagnostizierter CML ohne Vortherapie herunter reguliert ist (Diaz-Blanco *et al.*, 2007), eine Hochregulation nach 7 Tagen Imatinib-Therapie zu beobachten. Andere Adhäsions- und Motilitäts-assoziierte Gene mit einem signifikant höheren Genexpressionslevel sind *IL18* (Morel *et al.*, 2001), *RHOB* (Hall, 1998) sowie der *Colony stimulating factor 3 receptor (CSF3R)* (Jilma *et al.*, 2000). In der Summe führt die Hochregulation der Adhäsions-assoziierten Gene wahrscheinlich zu einer verringerten Motilität, die mit einer gesteigerten Adhäsion der CD34+ Zellen einhergeht, was zu einer verminderten Migration aus dem Knochenmark und einer Verringerung der Zirkulation im peripheren Blut führt.

Weiterhin ist bekannt, dass in der CML neben einer veränderten Adhäsion auch Proteine des Zytoskeletts modifiziert werden. Dies schließt das Beta-Tubulin ein, das in der CML reaktiv ist (Zou *et al.*, 2005). Auf Genexpressionsebene waren 3 Untereinheiten des Beta-Tubulins nach Imatinib-Therapie schwächer exprimiert, ebenso 2 Alpha-Tubulin-Untereinheiten. Diese könnten mit ursächlich für Veränderungen des Zytoskeletts sein, die bei einer Dauerbehandlung zu Knochenformationen führt (Fitter *et al.*, 2008).

4.2.1.5. *Imatinib hat wenig apoptotische Wirkung*

Eine letzte relevante Gruppe von betroffenen Genen betraf die der Apoptose. In dieser Gruppe waren nach 7 Tagen Imatinib-Therapie vier Apoptose-assoziierte Gene der CD34+ Zellen signifikant herunter reguliert. Dabei gehört das Gen *myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related (MCL1))*, welches durch Imatinib herunter reguliert war, neben *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)* und *BCL2-like 1 (BCL2L1)* zur antiapoptotischen Gruppe der *BCL-2* Genfamilie (Kroemer, 1997). Die Herunterregulierung von *MCL1* könnte zu einem Anstieg der Apoptose führen. Ein weiteres herunter reguliertes Gen ist das *tyrosine 3-*

monooxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide (14-3-3ε) (YWHAE), ein Interaktionspartner des proapoptotischen Gens *BAD* (Gross *et al.*, 1999). Da YWHAE mit dem phosphorylierten BAD interagiert, hat eine Herunterregulation möglicherweise eine antiapoptotische Wirkung auf die Zellen. Bei dem schwächer exprimierten *PIM-1* handelt es sich um einen transkriptionell regulierten Apoptose-Inhibitor (Fox *et al.*, 2003), der die Inaktivierung des proapoptotischen Proteins BAD durch Phosphorylierung begünstigt (Aho *et al.*, 2004). Außerdem war das Gen *NUP62* nach 7-tägiger Imatinib-Therapie schwächer exprimiert, welches mit den Proteinen *prostate apoptosis response-4* (PAR-4) sowie *protein kinase Czeta* (PRKCZ) einen ternären Komplex eingeht und dessen Expression Zellen normalerweise vor Apoptose schützt (Chang *et al.*, 2002). Durch eine schwächere Expression dieser Gene ist zu vermuten, dass die Zellen nach 7 Tagen Imatinib-Therapie anfälliger für Apoptose sind als Gene ohne Therapie. Insgesamt finden sich allerdings nur wenige Apoptose-assoziierte Gene, was die Vermutung zulässt, dass die Wirkungsweise von Imatinib vor allem antiproliferativ und wenig apoptotisch ist.

4.2.2. Analyse der Genexpressionsdaten und ihre funktionelle Bedeutung bei der K562 Zelllinie

In der Literatur ist beschrieben, dass Nilotinib 10-30-fach potenter wirkt als Imatinib, was mit einer besseren Bindung von Nilotinib an der ATP-Bindetasche von BCR-ABL aufgrund einer modifizierten Struktur gegenüber Imatinib begründet wird, bei der die N-Methylpiperazinyl-Gruppe durch einen Amid-Pharmakophor ersetzt wurde. (Kantarjian *et al.*, 2007b; Weisberg *et al.*, 2005). Für die TKIs wurde die IC₅₀ Konzentration verwendet, diese liegt bei in der Literatur vergleichbaren Werten (Weisberg *et al.*, 2005). Dabei sollten transkriptionelle Ursachen für die höhere Potenz Nilotinibs an der K562 Zelllinie analysiert werden. Gründe für die Wahl der Zelllinie als Modellorganismus für die CML waren neben der langjährigen weltweiten Etablierung der Zelllinie als CML Modellzelllinie die schnelle und dauerhafte Verfügbarkeit der Zellen. Außerdem sollten die Untersuchungen im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit durchgeführt werden, wenn Imatinib nicht mehr optimal wirkt. Diesbezüglich bietet sich die K562 Zelllinie an, weil sie 1970 von einer Frau mit CML in Blastenkrise gewonnen wurde.

Die Analyse der transkriptionellen Ursachen für die höhere Potenz wurde sowohl auf Genexpressionslevel als auch auf Proteinlevel sowie in funktionellen Analysen der K562 Zelllinie durchgeführt.

Auf Genexpressionsebene wurde festgestellt, dass 2,18-mal so viele Gene nach einer 24-stündigen Inkubation von K562 Zellen mit 0,05 μ M Nilotinib versus DMSO K562 behandelten Zellen im Vergleich 0,5 μ M Imatinib versus DMSO behandelten K562 Zellen signifikant differenziell exprimiert waren. Der Vergleich mit DMSO behandelten K562 Zellen wurde durchgeführt, weil DMSO das Lösungsmittel für Imatinib und Nilotinib war. Aber nicht nur die Zahl der differenziell exprimierten Gene lag bei Nilotinib höher, sondern auch deren veränderter Expressionsgrad bei herunter regulierten Genen. So waren 918 Gene, die nach der Inkubation mit den jeweiligen TKIs herunterreguliert waren, bei Imatinib im Median 1,72-fach, bei Nilotinib hingegen 2,23-fach herunter reguliert und 191 höher exprimierte Gene bei Imatinib 1,81-fach versus 1,82-fach bei Nilotinib hochreguliert. Dies könnte daraus resultieren, dass beide TKIs grundsätzlich auf die gleichen Tyrosinkinasen wirken und bei diesen die ATP-Bindung blockieren, sich aber in der Effektivität der Inhibierung dieser unterscheiden.

Für einen Vergleich der Wirkungsweise der TKIs Imatinib und Nilotinib am Modell der K562 Zelllinie sind neben den Genen, die dem *BCR-ABL* Signaling zuzuordnen sind und somit für die Krankheit an sich eine große Rolle spielen, insbesondere Veränderungen in Proliferation und Zellzyklus von essentieller Bedeutung. Weiterhin sind auch Krankheitsprogress und Imatinibresistenz-assoziierte Gene von Bedeutung, da beide TKIs dem Krankheitsprogress entgegen wirken sollten und Nilotinib im Falle einer Imatinibresistenz zum Einsatz kommt. Daneben spielen auch DNA Replikation und DNA Reparatur, Adhäsion sowie Apoptose eine Rolle. Dies resultiert unter anderem daraus, dass bei einem Krankheitsprogress hin zur Blastenkrise funktionelle Veränderungen in Form einer veränderten Proliferation, Apoptose und Adhäsion auftreten (Calabretta and Perrotti, 2004; Shet *et al.*, 2002). Durch die Therapie soll zum einen der Krankheitsprogress selbst verhindert werden, zum anderen sollen die Zellen durch die Behandlung mit den TKIs eine funktionelle Veränderung zu einem Zustand, der dem von gesunder hämatopoetischer Stammzellen entspricht, gebracht werden. Ein Fokus dieser Arbeit lag auf Genen, die im genomweite Genexpressionsprofil CD34+ Stamm- und Progenitorzellen bei unbehandelter CML in chronischer Phase im Vergleich zu

Gesundkontrollen verändert waren. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Gene des *BCR-ABL* Signalings, Proliferation und Zellzyklus sowie Progression und Imatinib-Resistenz in die gegenteilige Richtung differentiell exprimiert wurden. Dabei war der Effekt von Nilotinib auf die Zellen stärker als der von Imatinib.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei einem Ansprechen von CML-Patienten auf die Therapie mit Imatinib „frühe Gene“, die den Prozessen der Proliferation, DNA-Replikation und DNA Reparatur zuzuordnen sind, herunter- und Adhäsions-assoziierte Gene hochreguliert waren (Kapitel 3.2.1). Aufgrund der Wirkungsweise der beiden Medikamente Imatinib und Nilotinib, deren Wirkungsspektrum im Wesentlichen trotz unterschiedlicher Wirkkonzentration der beiden TKIs identisch ist (Bantscheff *et al.*, 2007; Hantschel *et al.*, 2007; Rix *et al.*, 2007), war zu erwarten, dass die gleichen funktionellen Gengruppen betroffen sind. Dies konnte in den Genexpressionsanalysen bestätigt werden, da nicht nur Gene der vorher genannten Gruppen in beiden experimentellen Ansätzen betroffen waren, sondern sich 1109 Gene, die sich nach Imatinib-Behandlung bei den K562 Zellen als signifikant differentiell exprimiert zeigten, auch bei Nilotinib-Behandlung der K562 Zellen signifikant differentiell exprimiert waren. Damit konnte diese Vermutung bestätigt werden, dass des gleichen Wirkmechanismus, nämlich, die selektiven Blockierung der ATP-Bindestelle der BCR-ABL Tyrosinkinase ursächlich dafür ist.

4.2.2.1. Das BCR-ABL Signaling ist gegensätzlich zur unbehandelten CML reguliert

Ein wichtiger Signalweg der chronischen myeloischen Leukämie betrifft das *BCR-ABL* Signaling, da dieses ursächlich für die Krankheit ist. Hier konnten nach Behandlung der Zellen mit den TKIs transkriptionelle Veränderungen mittels Affymetrix Genchip Analysen nachgewiesen werden. Die betroffenen Gene waren dabei nach TKI-Gabe schwächer exprimiert als in den Kontrollzellen. Weiterhin zeigten Nilotinib behandelte Zellen einen höheren Grad an Expressionsänderung als Imatinib behandelte Zellen (Tabelle 3.3). Von speziellem Interesse Dabei wurden folgende Gene herunter reguliert, die in *in vivo* Daten bei CD34+ Knochenmarks-Zellen von CML-Neudiagnose versus Gesundspender hochreguliert waren: *BCL2L1*, *G3BP2*, *LYN*, *MYC* und *STAT3*, *PIK3CB*.

Hierbei ist *MYC* ein transkriptionelles Target der MAP Kinase, welches für die Regulation für Proliferation und Zellzyklus verantwortlich ist (Notari *et al.*, 2006). Es zeigte die höchsten differentiellen Expressionwerte für Nilotinib-behandelte K562 Zellen, die 4,06-fach sowie in Imatinib behandelten K562 Zellen 2,37-fach herunter reguliert waren. *MYC* aktiviert die cyclinE/CDK2 Kinase, welche an einer Interaktion mit RAS involviert ist (Leone *et al.*, 1997). RAS wird seinerseits in der CML funktionell überexprimiert, weil der C-Terminus von BCR an das *growth factor receptor-bound protein* (GRB) und *son of sevenless* (SOS) bindet und der resultierende Komplex über eine RAS-GAP Aktivität verfügt, welche vom BCR-ABL Fusionsprotein beeinflusst wird (Clark, 2000). Außerdem kooperieren *MYC* und BCR-ABL über die Induktion von *BCL-2*. Dieses ist ebenfalls in den Genexpressionsdaten beider TKIs herunter reguliert. Es wirkt antiapoptotisch und fördert das Tumorwachstum (Sánchez-García and Grütz, 1995). Damit ist *BCL-2* ein Schlüsselen für Prozesse, die ursächlich für das Krankheitsbild der CML sind. Das Gen *BCL2L1* codiert für *BCL_{XL}*, ein *downstream* Zielgen des PI3K - AKT Signalwegs, das aufgrund der konstitutiven Aktivierung von STAT5 durch BCR-ABL exprimiert wird (Fernandez-Luna, 2000) und ebenso wie *BCL2* antiapoptotisch wirkt (Kantarjian *et al.*, 2006). Dadurch, dass sowohl *BCL2* als auch *BCL2L1* schwächer exprimiert werden, setzt möglicherweise ein apoptotischer Effekt für die Zellen ein. Außerdem wurden die beiden Signalmoleküle *STAT3* und *G3BP2* nach Behandlung der K562 Zellen mit den TKIs schwächer exprimiert. Hierbei dient *STAT3* wiederum als Proliferationsregulator, der durch BCR-ABL phosphoryliert wird (Coppo *et al.*, 2003). Das Protein *G3BP2* hingegen agiert als negativer Regulator von p53 und ist somit in Apoptoseprozessen involviert (Kim *et al.*, 2007). Ein letztes Gen, das durch beide TKIs schwächer exprimiert wurde, war *v-src Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog* (*LYN*), das zur Familie der Src Tyrosinkinasen gehört. Es wird davon ausgegangen, dass es an der Regulation von Zellüberleben und Proliferation beteiligt ist (Donato *et al.*, 2003). Überdies wurde eine Überexpression sowie Aktivierung von *LYN* in Imatinib-resistenten CML Zelllinien nachgewiesen. Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass *LYN* transformationsregulatorische Stellen von BCR-ABL phosphoryliert (Wu *et al.*, 2008). Daneben codiert das herunter regulierte Gen *Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide* (*PIK3CB*) für eine Untereinheit des Proteins PI3K, welches durch BCR-ABL phosphoryliert wird und ein Proliferations- und Apoptoseregulator ist (Kantarjian *et al.*, 2006). Die Herunterregulation des Gens könnte damit zusammen hängen, dass durch die Blockierung der Phosphorylierung das PI3K inaktiviert wird. Für *MYC* konnte ebenso wie für

LYN die transkriptionelle Veränderung zusätzlich mittels quantitativer *real-time* PCR bestätigt werden.

Daneben gab es Gene des klassischen *mitogen-activated protein* (MAP) Kinase Signalwegs, die nur durch Nilotinib, und nicht durch Imatinib signifikant herunter reguliert wurden. Hierzu gehörte das *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog* (*NRAS*), ein Gen des klassischen RAS/MAPK Signalwegs, welcher Proliferations-regulierend ist. RAS reguliert die Mitglieder dieses Signalwegs *RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 & 2* (*RAC1*, *RAC2*), Gene des klassischen MAP-Kinase Signalwegs (Diaz-Blanco *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Literatur beschriebene Substrate von BCR-ABL sowie Proteine der BCR-ABL Signaling Signalwege, die in CML Stammzellen signifikant hochreguliert waren (Diaz-Blanco *et al.*, 2007), durch die TKIs in der Zelllinie herunter reguliert wurden. Außerdem gab es BCR-ABL-assoziierte Gene, die ausschließlich nach Behandlung der K562 Zellen herunter reguliert waren, was einen Hinweis für die Überlegenheit von Nilotinib gegenüber Imatinib liefert.

4.2.2.2. Proliferation und Zellzyklus werden durch Imatinib und Nilotinib gebremst

Als nächstes wurden Proliferations- und Zellzyklus-assoziierte Gene hinsichtlich ihres Expressionsmusters analysiert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass diese Gene herunter reguliert waren und somit Proliferations- und Zellzyklus-inhibierend wirken. Dabei spielen die Gene *MYC* und *PIM-1* eine synergistische Rolle in der Zellproliferation (Shirogane *et al.*, 1999). Genauer gesagt, ist *PIM-1* ein positiver Regulator der G2/M Transition des Zellzyklus (Bachmann *et al.*, 2004). Xie *et al.* konnten zeigen, dass die 33 kDa Einheit von PIM-1 für Zellzyklus-Regulation verantwortlich ist (Xie *et al.*, 2005). Diese war in der Western Blot Analyse durch beide TKIs schwächer ausgeprägt, und ihre Ausprägung war nach Nilotinib-Behandlung der Zellen am schwächsten. Daneben war *PIM-1* nicht nur in den Affymetrix Genchip-Daten, sondern auch in Light Cycler Läufen nach Behandlung der Zellen mit den TKIs schwächer exprimiert. Bei PIM-2 handelt es sich um eine weitere Serin-Threonin-Kinase, die neben PIM-1 ebenfalls in der Zellproliferation eine Rolle spielt (Baytel *et al.*, 1998). Sie wird ebenso wie PIM-1 nicht nur auf transkriptioneller Ebene durch die TKIs schwächer exprimiert, sondern auch auf Proteinebene. Die stärkste Herunterregulierung der

Genexpression zeigte sich bei *Cyclin D2 (CCND2)*, einem G1/S Phase Transitionspromotor *downstream* von STAT5 (Walz *et al.*, 2006), durch den die Transition von der G1- in die S-Phase gebremst werden könnte. Daneben wurden zwei Gene, die direkt an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind und die bei unbehandelter CML hochreguliert sind (Diaz-Blanco *et al.*, 2007), *in vitro* durch beide TKIs schwächer exprimiert. Bei den Genen handelte es sich um *Cyclin C1 (CCNG1)*, das am G2/M Zellzyklus-Arrest beteiligt ist (Seo *et al.*, 2005) und *Cyclin H (CCNH)*. Letzteres ist neben *cyclin dependent kinase 7 (CDK7)* und *menage a trois homolog 1, cyclin H assembly factor (MAT1)* Teil der trimeren *CDK activating kinase (CAK)*. Diese reguliert durch ihre Aktivierung über CDKs den G1 Zellzyklusaustritt (Wang *et al.*, 2006).

Die Mehrheit der Proliferations- und Zellzyklus-assoziierten Gene wurde nur durch Nilotinib, nicht aber durch Imatinib, signifikant herunter reguliert. Relevante Gene sind in Tabelle 3.3 zu finden. Ein Gen ist hierbei die *cyclin dependent kinase 2 (CDK2)*, von der 2005 gezeigt werden konnte, dass Imatinib die Proteinexpression durch die nukleäre Akkumulation von p27(Kip1) und die Herunterregulierung der Cycline D und E reduziert (Andreu *et al.*, 2005). Die Inaktivierung von CDK2 führt zu einem Wachstumsarrest (Mancini *et al.*, 2007). Auf transkriptioneller Ebene wurde *CDK2* allerdings von Imatinib nicht signifikant beeinflusst. Dieses Gen war in unbehandelter CML verstärkt exprimiert (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Daneben war *GMNN*, welche die S-Phase des Zellzyklus steuert, durch Nilotinib in ihrer Expressionsstärke herunter reguliert (Goh *et al.*, 2000; Seo and Kroll, 2006). Die war auch für *CDC45L*, ein Gen, das für den Übergang in die G2 Phase sorgt und dabei mit den ebenfalls betroffenen Genen *MCM3*, 5, 6 und 7 interagiert (Bauerschmidt *et al.*, 2007), der Fall. Diese Gene waren bei CML-Patienten nach 7 Tagen Imatinib-Therapie ebenfalls herunter reguliert. Sie gehören zu „frühen Gene“, die auf die Therapie reagieren (Kapitel 3.2.1.2). Zudem ist *MCM3* in der unbehandelten CML verstärkt exprimiert (Diaz-Blanco *et al.*, 2007).

In ergänzenden Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass durch beide TKIs die Proliferationsrate um 51% bei Imatinib- bzw. 54% bei Nilotinib-Gabe abnimmt, dabei konnten zwischen den Medikamenten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Weiterhin nahm die Zahl aktiv Zellzyklus betreibender Zellen nach 24-stündiger Inkubation der K562 Zellen mit Nilotinib um 80±1% ab, während sie bei Inkubation mit Imatinib um 60±3% verringert wurde. Dieser Effekt der Abnahme der S-Phase durch die 24-stündige

Inkubation der K562 Zellen mit Imatinib bzw. Nilotinib konnte bereits nach einer anschließenden 3-stündigen Inkubation mit BrdU gezeigt werden. Damit zeigte die Behandlung mit den TKIs neben einer verringerten Expression von Proliferations- und Zellzyklus-relevanten Genen einen funktionellen Effekt. Dieser war dabei für Nilotinib stärker als für Imatinib, was das Genexpressionslevel sowie bei der Anzahl der Zellzyklus-betreibenden Zellen betraf.

Zusammengefasst führt das Zusammenspiel Proliferations- und Zellzyklus-assoziierter Gene, deren Expression durch die TKIs herunter reguliert war, in der Zellkultur zu einer verringerten Proliferation sowie zu inhibitorischen Effekten bei den Zellzyklus-Experimenten. Hierbei zeigten sich durch Nilotinib einen stärkeren Effekte, sowohl, was die Anzahl der regulierten Gene als auch deren Expressionsgrad anbelangt, was sich im niedrigsten Anteil aktiv Zellzyklus betreibender Zellen in der Zellzyklus-Analyse widerspiegelt. Dies spricht für eine höhere Potenz von Nilotinib im Vergleich zu Imatinib. Es konnte somit auch hier eine Überlegenheit von Nilotinib gegenüber Imatinib gezeigt werden, die funktionell in der Zellzyklus-Analyse bestätigt wurde.

4.2.2.3. Geringe apoptotische Effekte auf die Zellen nach 24-stündiger Inkubation der TKIs

Eine weitere Gruppe von Genen, deren Expression untersucht wurde, ist der Apoptose zuzuordnen. In den Genexpressionsanalysen fanden sich bei Imatinib behandelten K562 Zellen nur wenige Apoptose-assozierte Gene signifikant differenziell exprimiert. Der erniedrigte Expressionsgrad von *VEGF* ist von besonderem Interesse, da Ruan et al. beschrieben, dass ein Knockdown von *VEGF* zu einer niedrigeren Proliferation sowie höheren Apoptoserate von mit Interferon alpha behandelten K562 Zellen führte (Ruan *et al.*, 2004). Bei den Imatinib behandelten K562 Zellen war die Herunterregulation 2,83-fach, während sie bei den Nilotinib behandelten K562 Zellen 2,95-fach war. Weiterhin waren die beiden antiapoptotischen Gene *BCL2* und *BCL2L1* in Busulfan-resistenten CML-Patienten hochreguliert, bei denen der programmierte Zelltod verhindert werden soll (Valdez *et al.*, 2008). Diese waren in Nilotinib behandelten K562 Zellen stärker verändert als in den Imatinib behandelten K562 Zellen, was zur Apoptose der K562 Zellen führen könnte. Ein weiteres herunterreguliertes antiapoptotisches Gen der BCL2 Familie ist das *MCL1*. Krajewski et al. konnten zeigen, dass die Proteinüberexpression von MCL1 den Zelltod in humanen Zelllinien

weniger effektiv inhibiert als BCL2 (Krajewski *et al.*, 1995). Auch dieses könnte Apoptose induzieren.

Daneben waren in mit Nilotinib behandelten K562 Zellen weitere Gene, die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden, signifikant differenziell exprimiert. Darunter fand sich das proapoptotische *CASP2* Gen, das eine essentielle Rolle in apoptotischen Prozessen spielt. So kann eine Aktivierung der Caspase 2 im Nukleus zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen (Paroni *et al.*, 2002). In apoptotischen Prozessen agieren CASP2 auf der einen Seite und BCL2, BCL2L1 oder MCL1 auf der anderen Seite als Antagonisten. Caspase 2-induzierter Zelltod kann durch die Gene BCL und BCL-X_L blockiert werden, und es gibt Hinweise darauf, dass dieses Protein als direkter Effektor des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs fungiert (Guo *et al.*, 2002; Paroni *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005). Andere Mitglieder der Caspase-Familie wie CASP3, 6, oder 10, die bei unbehandelter CML hochreguliert waren (Diaz-Blanco *et al.*, 2007), veränderten nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit Nilotinib hingegen ihre Genexpression nicht. Dies stimmt mit Literatur überein, in der gezeigt wurde, dass der Apoptosemarker Caspase 3 durch Nilotinib nicht beeinflusst wird (Jorgensen *et al.*, 2007). Weitere herunter regulierte Apoptoseregulatoren sind *X-linked inhibitor of apoptosis (BIRC4; XIAP)* und *baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5; survivin)*. Dabei ist XIAP als ein potenter ApoptosSuppressor beschrieben, der selektiv an die Caspasen 3, 7 und 9 bindet und diese inhibiert (Bruno *et al.*, 2007). Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Behandlung von K562 Zellen mit 0,25 µM bzw. 0,5 µM Imatinib unter anderem das Protein XIAP, aber auch BCL-X_L herunter reguliert und das Protein BCL-2 gar nicht exprimiert wird (Fang *et al.*, 2000). Die Inhibition von XIAP erfolgte nach 24 h, während apoptotische Effekte nach 48 Stunden nachgewiesen werden konnten (Mow *et al.*, 2002). Diese konnten auch in dieser Arbeit erst nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Das Gen *survivin* ist ebenfalls ein antiapoptotisches Gen, welches in CML-Patienten in hohem Maße gebildet und mit Krankheitsprogress in Verbindung gebracht wird (Hernandez-Boluda *et al.*, 2005). In K562 Zellen konnte durch die BCR-ABL Inhibierung durch Nilotinib eine Reduktion der Expression von *survivin* erzielt werden. Es stellt möglicherweise ein therapeutisches Target für Imatinib-resistente und -sensitive Patienten dar (Carter *et al.*, 2006). Das Gen *FOXO3A* ist ein Mitglied der *Forkhead Box, class O* Superfamilie und tritt *downstream* von BCR-ABL als phosphorylierte inaktive Form auf. Eine BCR-ABL-abhängige Dephosphorylierung durch Imatinib aktiviert FOXO3A, was zunächst zu einem Zellzyklusarrest und im weiteren Verlauf zur Apoptose führt (Kikuchi *et al.*, 2007). Die

Dephosphorylierung durch BCR-ABL Blockierung wird durch Imatinib und Nilotinib induziert, signifikante Auswirkungen in der Genexpression sind allerdings nur nach Nilotinib-Behandlung der Zellen zu sehen.

Funktionell konnten die Genexpressionsdaten sowie Literaturhinweise bestätigt werden, dass eine 24-stündige Inkubation mit Imatinib in einem Annexin-V-basierendem Apoptosetest keine Apoptotische Wirkung zeigte. Das Prinzip dieses Experiments beruht auf dem Nachweis der Umstülpung des PS der Membran. Auch Nilotinib behandelte K562 Zellen zeigten mit diesem Test keinerlei Apoptose. Dies stimmt mit Trypanblau-Färbungen überein, bei denen nach 24-stündiger Inkubation mit den TKIs Imatinib und Nilotinib $3\pm 1\%$ Apoptose detektiert wurde, nach 48 Stunden $24\pm 1\%$ (Imatinib) bzw. $54\pm 2\%$ (Nilotinib). Damit wurden Literaturdaten bestätigt, dass Imatinib erst nach 48 h, nicht aber nach 24 h Apoptose induziert (Mow *et al.*, 2002; Wilda *et al.*, 2002). Bei Nilotinib behandelten Zellen trat derselbe Effekt auf, hierbei reagierten die Zellen nach 48 h auf Nilotinib mit einer 60% höheren Apoptoserate wie bei Imatinib. Dass es zu einem Absterben der Zellen nach 48 h kommt, deutet sich nach 24 h im ELISA-basierten Apoptoseassay, der auf der Histonfreisetzung aufgrund von DNA-Degradation basiert, an. Es trat eine 1,3-fach erhöhte Apoptoserate der Imatinib-behandelten sowie eine 5-fach erhöhte Apoptoserate der Nilotinib-behandelten K562 Zellen jeweils im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle auf. Unterschiede im Nachweis von Apoptose mit den verschiedenen Methoden könnten damit zusammen hängen, dass die DNA-Degradation sowie Histonfreisetzung mehrere Stunden vor der Plasmamembran-Umstülpung statt findet (Bonfoco *et al.*, 1995; Duke and Cohen, 1986; Terui *et al.*, 1995). Der Annexin-V-Test detektiert somit eine späte Phase der Apoptose. Mit Trypanblau wird ebenfalls nachgewiesen, ob die Zellmembran intakt ist, auch hier wird eine späte Apoptose-Phase analysiert.

Die Genexpressionsdaten der K562 Zelllinie zeigen somit während des Einflusses der TKIs Imatinib und Nilotinib zum einen ein mit der Literatur konformes Bild, dass sich die Genexpression in gleicher Weise verändert, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben. Es gibt bei Imatinib behandelten K562 Zellen Apoptose-regulierende Gene, die für die 1,3-fache Erhöhung der Apoptoserate gegenüber unbehandelten K562 Zellen ursächlich sind, während die 5-fache Erhöhung der Apoptoserate bei Nilotinib behandelten K562 Zellen vermutlich

durch die zusätzlich differentiell regulierten Gene induziert wird. Hierdurch wird die höhere Potenz Nilotinibs in Bezug auf apoptotische Effekte verdeutlicht.

4.2.2.4. Beide TKIs wirken Krankheitsprogress entgegen

Ein weiterer Fokus lag auf Krankheitsprogress und damit assoziierten Genen, da es für eine Therapie fatal wäre, wenn durch Behandlung der Patienten mit Medikamenten Progress-assoziierte Gene in die gleiche Richtung reguliert wären, wie bei einem Fortschreiten der Krankheit. Die gefundenen Gene waren gegensätzlich zu einem Krankheitsprogress reguliert. So ist beispielsweise das Gen *suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2)* bei CML Patienten mit Blastenkrise überexprimiert, während es bei einem Ansprechen mit Imatinib 2- bis 11-fach herunter reguliert wird (Schultheis *et al.*, 2002). Es ist in unbehandelter CML hoch reguliert (Diaz-Blanco *et al.*, 2007), während Imatinib zu einer 6,2-fachen und Nilotinib zu einer 8,7-fachen Herunterregulierung führte. Die Gene *Wilms Tumor 1 (WT1)* und *related RAS viral (r-ras) oncogene homolog (RRAS2)* zeigten sich bei Krankheitsprogress ebenfalls hochreguliert (Radich *et al.*, 2006), während sie bei mit Imatinib und Nilotinib behandelten K562 Zellen gegensätzlich reguliert waren. Dabei ist die Expression des Proteins WT1 für die Proliferation der K562 Zelllinie notwendig, ein Knockout resultiert in Apoptose, reduzierter Zellviabilität sowie DNA Fragmentierung (Algar *et al.*, 1996). Weiterhin war die *spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT)*, die bei Patienten mit Blastenkrise schwach exprimiert wird, hoch reguliert (Zheng *et al.*, 2006). Ein weiteres ebenfalls bei Krankheitsprogress herunter reguliertes Gen war *BTG family, member 2 (BTG2)* (Radich *et al.*, 2006). Dies wurde bei Behandlung der K562 Zellen mit beiden TKIs hoch reguliert. Auch *LYN*, das bei Überexpression mit einer Imatinib-Resistenz sowie Krankheitsprogress in Verbindung gebracht wird und zu erhöhter Proliferation der Zellen führt (Donato *et al.*, 2003; Radich *et al.*, 2006), wurde von beiden TKIs herunter reguliert. Bei sämtlichen genannten Genen war der Grad der differentiellen Expression durch die Behandlung der K562 Zellen mit Nilotinib stärker durch die Behandlung mit Imatinib.

Daneben war das Gen *growth arrest-specific 2 (GAS2)*, das bei Krankheitsprogress hoch reguliert war, nur bei Nilotinib behandelten K562 Zellen schwächer exprimiert (Radich *et al.*, 2006). Bei dem gebildeten Protein handelt es sich um ein Caspase-3 Substrat, das eine Rolle in der Regulation der Mikrofilamente und in der Veränderung der Zellform während der Apoptose spielt (Janssen *et al.*, 2005). Das Imatinib-Resistenz-assoziierte Gen *survivin*

(BIRC5) (Carter *et al.*, 2006) war ebenfalls nur bei Nilotinib behandelten K562 Zellen herunter reguliert. Es gehört BIRC5 zur Familie der Apoptoseinhibitor-Proteine, die Hochregulation wird mit Krankheitsprogress von der chronischen Phase in die Blastenkrise beschrieben, bei dem die Zellen sich unkontrolliert vermehren, aber nicht mehr sterben (Badran *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide TKIs einem Krankheitsprogress entgegen wirken. Die Regulation von Progress-assoziierten Genen ging in die gegensätzliche Richtung. Dabei wirkte Nilotinib potenter als Imatinib, was sich in einer stärkeren differenziellen Expression der Gene bemerkbar machte. Außerdem wurden durch die Behandlung von K562 Zellen mit Nilotinib Imatinib-Resistenz assoziierte Gene differenziell exprimiert, die durch Imatinib nicht signifikant beeinflusst werden. Dies deutet darauf hin, dass Nilotinib wirksam sein könnte, wenn Imatinib nicht mehr wirkt.

4.2.2.5. *Es tritt weniger DNA Reparatur und Replikation auf*

Die DNA Reparatur spielt für die CML eine Rolle, da BCR-ABL DNA Schädigung fördert, die durch endogene reaktive Sauerstoffverbindungen und exogene Genotoxische Behandlung erzeugt wird (Skorski, 2008). Um diese Schädigung zu beseitigen, sind Reparatur-mechanismen erforderlich. Diese werden über Gene reguliert, von denen durch Behandlung der Zellen mit Imatinib bzw. Nilotinib lediglich *BTG2*, welches eine Antwort auf DNA Schäden induziert (Rouault *et al.*, 1996), ebenso wie in CD34+ Stammzellen von Patienten nach 7-tägiger Imatinib-Therapie (Kap 3.2.1.3) verstärkt gebildet wurde. Der *general transcription factor II (TFIIH)* mit den Untereinheiten *Cyclin H* und *general transcription factor IIH, polypeptide 2, 44 kDa (GTF2H2)* war hingegen schwächer exprimiert. Er reguliert Zellzyklus-Progression, Transkription und DNA Reparatur (Eki *et al.*, 1998; Lindahl and Wood, 1999), eine geringere Expression könnte zu verringerter DNA Reparatur führen. Auch *RAD50*, ein Teil des MRE11/RAD50/NBS1 Doppelstrang-Reparaturkomplexes, der möglicherweise als Sensor für DNA Schäden fungiert (Carney *et al.*, 1998), wurde herunter reguliert. Die schwächere Expression dieser Gene könnte damit zusammen hängen, dass weniger DNA Schädigung auftritt, die detektiert und in Folge korrigiert werden muss.

In Nilotinib behandelten K562 Zellen waren weitere DNA Reparatur-assoziierte Gene herunter reguliert. Das betraf beispielsweise die Gene *FEN1*, *TOP2A*, *TYMS* und *RFC4*, die nicht nur in die Kontrolle von DNA Replikation sowie DNA Reparatur involviert sind (Le *et al.*, 2005), sondern auch in CD34+ Zellen von CML Patienten nach 7 Tagen Imatinib-Therapie beeinflusst waren (Kap. 4.2.1.3). Daneben sind auch die Gene *MCM3*, 6 und 7 sowie *POLE2* nicht nur an der DNA Replikation beteiligt (Forsburg, 2008), sondern vermitteln über Interaktionen mit Reparaturproteinen die Reparatur bei DNA Schädigungen (Bailis and Forsburg, 2004). Sie waren ebenfalls bei CD34+ Zellen bei CML-Patienten nach 7 Tagen Imatinib-Therapie herunter reguliert (Kap. 3.2.1.3). Diese niedrigere Expression dieser Gene könnte ursächlich für die geringere Replikation sein, deren Konsequenz eine verminderte Proliferation ist.

Zusammengefasst deuten die Genexpressionsanalysen an, dass möglicherweise die DNA Reparatur reduziert wird und dass Nilotinib auch hier wieder einen stärkeren Einfluss ausübt als Imatinib. Dies könnte daraus resultieren, dass durch die verringerte Proliferation infolge geringerer DNA Replikation und geringeren Zahl Zellzyklus-betreibender Zellen weniger DNA neu synthetisiert wird. Bei einer gleich bleibenden Fehlerhäufigkeit während einer DNA Replikation tritt in den Zellen insgesamt weniger DNA Schädigung auf, die durch Reparaturmechanismen behoben werden muss. Infolge dessen werden weniger an der DNA Reparatur beteiligte Proteine benötigt, weswegen möglicherweise eine schwächere Genexpression beteiligter Gene auftrat. Auch hier zeigte Nilotinib eine Überlegenheit gegenüber Imatinib.

4.2.2.6. *Imatinib und Nilotinib erzeugen ein heterogenes Bild bei der Zelladhäsion*

Eine letzte untersuchte Gengruppe beschäftigte sich mit Zelladhäsion, da bei CML-Patienten eine veränderte Adhäsion auftritt. Es konnten weder bei der Behandlung der K562 Zellen mit Imatinib noch mit Nilotinib klare Tendenzen bezüglich der Genregulation, die die Adhäsion betrifft, festgestellt werden, denn ein Teil der Gene war schwächer exprimiert, während ein anderer Teil stärker exprimiert war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Gene, welche nach 24-stündiger Behandlung mit beiden TKIs eine differenzielle Expression aufwiesen, bei Nilotinib stärker differenziell reguliert waren als bei Imatinib, was wiederum die höhere Potenz von Nilotinib unterstreicht.

Zum einen waren Adhäsions-assoziierte Gene nach 24-stündiger Behandlung mit beiden TKIs niedriger exprimiert. Dies betraf *Vinculin (VCL)*, einen Regulator für Zelladhäsions-Dynamik und Zellmigration (Critchley, 2004), sowie das an Adhäsionsprozessen beteiligte *CD164* (Kurosawa *et al.*, 1999). Beide Gene waren in den HSCs der CD34+ Zellen neu diagnostizierter CML in chronischer Phase ebenfalls herunter reguliert, was funktionell zu einer verringerten Migration sowie Adhäsion führte, den Zellen damit sowohl die Fähigkeit zu migrieren als auch zu adhären eingeschränkt wurde (Bruns *et al.*, 2009). Bei dem ebenso herunter regulierten *CD33* Gen handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, dessen Expression den adhäsiven Charakter von Zellen erhöhen kann (Freeman *et al.*, 1995). Die *ADAM metalloproteinase domain 10 (ADAM10)* hingegen ist ein negativer Adhäsions-Regulator (Hundhausen *et al.*, 2003), dessen schwächere Expression in einem verstärkten adhärenen Effekt für die K562 Zelllinie resultieren könnte. Bei dem ebenfalls schwächer exprimierten *Fibronectin 1 (FNI)* handelt es sich um ein extrazelluläres Glycoprotein, das eine wichtige Rolle in der Zellmigration und Adhäsion spielt. Da CML-Zellen nachgewiesenermaßen eine veränderte Adhäsion zu Stromazellen des Knochenmarks sowie zu extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin haben (Bhatia *et al.*, 1994; Gordon *et al.*, 1987), steht das Ergebnis der niedrigeren Expression des für Fibronectin kodierenden Gens im Einklang mit der Literatur. Insgesamt könnten diese Gene zu einer geringeren Adhäsion der Zelllinie führen.

Auf der anderen Seite war *Intercellular adhesion molecule 4 (ICAM4)*, welches in den Genexpressionsanalysen der Chipdaten sowie in den Light Cycler Läufen nach TKI-Gabe hochreguliert war, ebenfalls in CD34+ Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML hochreguliert (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Hierbei handelt es sich um ein 42 kDa großes Blutgruppen-Antigen, welches als Landsteiner Wiener (LW) Glycoprotein bekannt ist (Bailly *et al.*, 1994) und von dem gezeigt werden konnte, dass es an die CD11/CD18 Leukozyten-Integrine bindet und spezifisch auf Erythrozyten exprimiert wird (Bailly *et al.*, 1995). Außerdem wurde das Gen *ADAM metalloproteinase domain 8 (ADAM8)* ebenso wie in Ph+ CD34+ Stammzellen von CML-Patienten nach 7tägiger Imatinib-Therapie hoch reguliert (Kap. 3.2.1.4). Die Hochregulation dieser Gene könnte in Folge konträr zu den niedriger exprimierten Genen zu einer verstärkten Adhäsion führen.

Die zusätzlich differenziell exprimierten Gene bei mit Nilotinib behandelten K562 Zellen waren herunter reguliert. Dies traf für *Integrin, alpha E (ITGAE)* zu, welches in CD34+ hämatopoetischen Stammzellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML im Vergleich zu Gesundkontrollen ebenfalls schwächer exprimiert war (Diaz-Blanco *et al.*, 2007). Daneben wird der Marker für unreife Zellen *CD99* auf Proteinlevel bei T-Zellblasten von CML-Patienten exprimiert (Akiko *et al.*, 2005). Ein letztes relevantes herunter reguliertes Gen war *Interleukin 8 (IL8)*, welches bei CML-Patienten vor allem in der späten chronischen Phase hochreguliert ist. Es ist als Gen beschrieben, welches möglicherweise an der Krankheitstransformation bei Krankheitsprogress beteiligt ist (Janssen *et al.*, 2005). Eine Herunterregulierung könnte somit den Krankheitsprogress stoppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nilotinib mehr Adhäsions-assoziierte Gene differenziell und diese Gene stärker reguliert als Imatinib, was für eine höhere Wirksamkeit des TKIs spricht, dass es aber keine klare Tendenz hin zu mehr oder weniger Adhäsion gibt. Die zusätzlichen differenziell exprimierten Gene sind herunter reguliert, was für eine mögliche Abnahme der Adhäsion sprechen könnte. Dem gegenüber stehen die hochregulierten Gene, so dass das Bild insgesamt heterogen ist. Dies könnte mit der Zelllinie zusammen hängen, die gegenüber Stammzellen eine kulturbedingte Evolution aufweist und für die aufgrund ihrer Zelllinieneigenschaft Adhäsion eine untergeordnete Rolle spielt. Damit lässt sich keine klare Aussage treffen, wie die Adhäsionseigenschaft der Zellen durch die TKIs beeinflusst wird.

4.3. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, welches Gene sind, die nach einer 7-tägigen Imatinib-Therapie von CML Patienten in Ph+ CD34+ Stamm- und Progenitorzellen beeinflusst werden. Aus den Untersuchungsergebnissen ist ableitbar, dass die initiale bessere Adhäsion der Ph+ CD34+ Zellen an den verschiedenen Komponenten der Knochenmarkmatrix mit einem verminderten Zellzyklus inklusive einer verminderten DNA Replikation und mitotischer Aktivität einhergeht. Dies wiederum zieht eine verminderte Proliferation, Expansion und Produktion leukämischer Stammzellen nach sich.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Imatinib und Nilotinib bei der K562 Zelllinie ein nahezu identisches Wirkungsspektrum haben. Dabei wies Nilotinib als mögliche Erklärung der verstärkten Wirkung einerseits ein erweitertes Spektrum an Genen auf, die durch die Behandlung signifikant differenziell exprimiert wurden. Andererseits zeigte sich durch Nilotinib ein verstärkter Einfluss auf Gene, die auch durch Imatinib beeinflusst werden. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen spiegelten sich funktionell in einer erhöhten Apoptoserate, erniedrigten Proliferation und einer verminderten Zahl an aktiv Zellzyklus-betreibenden Zellen. Die höhere Potenz, die sich auf Genexpressionsebene sowie in funktionellen Experimenten zeigt, ist möglicherweise für ein schnelleres Erreichen einer hämatologischen sowie zytogenetischen Remission und einem Erreichen einer *major molecular remission* verantwortlich.

4.4. Ausblick

Die gefundenen „frühen Antwortgene“ sollten hinsichtlich ihres prädiktiven Potentials in Bezug auf das Ansprechen auf eine Imatinib-Therapie mit Hilfe eines Microarrays im Rahmen eines Folgeprojektes validiert werden.

Außerdem sollte das Ansprechen auf die verschiedenen neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren anhand von Analysen typischer Veränderungen der Genexpressionsprofile während der Therapie im Vergleich zur unbehandelten Krankheit untersucht werden. Dies sollten mit dem molekularen Ansprechen korreliert werden, um die neuen Tyrosinkinase-Inhibitoren weiter zu optimieren.

Weiterhin ist das Phänomen persistierender *BCR-ABL* positiver Stammzellen im Knochenmark von Patienten mit CML während der Therapie mit Imatinib ein ungelöstes Problemfeld. Dies zeigt sich darin, dass nur 5% aller Patienten, die in der IRIS Studie mit Imatinib behandelt wurden, eine komplette molekulare Remission erreicht haben. Es war mit Techniken, die eine Leukämiezelle in 1×10^6 gesunden Zellen detektieren können, keine *BCR-ABL* positive Zelle mehr nachweisbar (Druker *et al.*, 2006). Die Persistenz dieser Zellen bzw. der konstante Nachweis von geringsten Mengen an *BCR-ABL* mRNA ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht von prognostischer Relevanz. Ungeachtet dessen besteht allerdings Konsens, dass nach Absetzen der Therapie mit Imatinib ein Rezidiv der CML wahrscheinlich ist, so dass die Therapie derzeit lebenslang fortgeführt werden muss.

Ziel zukünftiger Projekte muss daher die Aufklärung des Mechanismus sein, der die ruhende *BCR-ABL* positive Stammzelle in Ihrer hämatopoetischen Knochenmarknische verankert, sie vor zielgerichteten molekularen Therapien schützt und die Basis für ein Wiederaufkeimen der Erkrankung schafft. Die Blockierung dieser Mechanismen, wie z.B. eine verminderte Adhäsion der Zellen in der Nische durch Blockade von Selektin oder CD44, könnte eine effiziente Therapie der dann zirkulierenden Ph positiven Stammzellen bewirken, die ein Absetzen der Therapie ermöglicht und damit einer Heilung der CML entspricht.

5. Zusammenfassung

Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) handelt es sich um eine maligne Stammzellerkrankung, deren charakteristisches Merkmal eine reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22 (Philadelphia-Chromosom) ist, die zur Bildung des BCR-ABL Onkoproteins führt. Dieses spielt durch eine gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität eine essentielle Rolle in der leukämischen Zelltransformation. In der Therapie der CML werden seit 2000 hoch potente und nebenwirkungsarme Tyrosinkinase-Inhibitoren eingesetzt.

In dieser Arbeit werden frühe transkriptionelle Veränderungen bei Patienten aufgezeigt, die durch Imatinib-Therapie induziert werden. Eine hierarchische Clusteranalyse zeigte bei den vor Therapie und nach 7 Tagen Imatinib-Therapie gewonnenen CD34+ Stammzellen eine klare Differenzierung zwischen beiden Gruppen. Von den etwa 14.500 auf dem Genchip gespotteten Genen waren 183 Gene mit einem Lower Confidence Bound von mindestens 1,2-fach signifikant herunter sowie 120 Gene signifikant hoch reguliert. Die Gene ließen sich dabei verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen. Dabei waren in der pathophysiologisch relevante Gruppe der Adhäsion nach 7 Tagen Imatinib-Therapie Gene hoch reguliert, während Zellzyklus-assoziierte Gene ebenso wie DNA Replikations- und Reparatur-assoziierte Gene herunter reguliert waren. Betrachtet man die differenziell exprimierten Gene, lässt sich schlussfolgern, dass eine initiale bessere Adhäsion der Ph⁺ CD34⁺ Zellen an den verschiedenen Komponenten der Knochenmarkmatrix mit einem verminderten Zellzyklus inklusive einer verminderten DNA Replikation und mitotischer Aktivität einhergeht. Dies wiederum zieht eine verminderte Proliferation, Expansion und Produktion leukämischer Stammzellen nach sich.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zu Ursachen für die Überlegenheit des TKIs Nilotinib gegenüber Imatinib am Modell der K562 Zelllinie. Der Vergleich der Genexpressionsprofile von mit 0,5 µM Imatinib versus DMSO behandelten K562 Zellen mit 0,05 µM Nilotinib versus DMSO behandelten K562 Zellen zeigte, dass durch die Behandlung durch Nilotinib 2,18-mal so viele Gene differenziell exprimiert waren. Auch ihr differenzieller Expressionsgrad war stärker als in Imatinib behandelten Zellen. Dabei waren Gene des *BCR-ABL* Signalings, Proliferation und Zellzyklus sowie Resistenz-assoziierte Gene in die gegensätzliche Richtung differenziell exprimiert wie in der CML Pathologie. Funktionell konnten die Genexpressionsdaten für Proliferation, Apoptose sowie

Zellzyklus validiert werden. Die Untersuchungsergebnisse geben einen molekularen Einblick in die stärkere Effizienz von Nilotinib gegenüber Imatinib.

5.1. Summary

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a malignant stem cell disorder characterized by a characteristic reciprocal translocation of chromosomes 9 and 22 creating an aberrant fusion gene called Philadelphia chromosome resulting in the formation of the BCR-ABL oncogene. This oncogene has an essential role in the leukemic cell transformation through an increased tyrosine-kinase activity. For therapy of CML highly potent tyrosine-kinase inhibitors with low side effects are used since 2000.

In this work, early transcriptional changes induced by Imatinib-therapy in CML patients are depicted. A supervised hierarchical cluster analysis of the CD34⁺ cells obtained before and 7 days after starting Imatinib provides a distinct set of genes permitting a clear discrimination between the two sets of samples. Looking at the 14.500 genes spotted on the array, we found that 183 genes were downregulated, whereas 120 genes were upregulated with a lower bound of at least 1.2-fold. These differentially expressed genes were related to the different functional groups. Genes involved in adhesive interactions showed an increased expression following the treatment with Imatinib while genes governing cell cycle and DNA replication generally had a reduced level of expression. Looking on the differentially expressed genes a conclusion is that improved adhesion of Ph⁺ CD34⁺ cells to the matrix components of bone marrow goes along with decelerated cell cycle, including decreased DNA replication and mitotic cell activity. This would be translated into decreased proliferation, expansion and production of leukemic stem cells.

In the second part of this work investigations concerning reasoning of superiority of Nilotinib over Imatinib were performed on a K562 cell line. The comparison of the gene expression profile of 0.5 μ M Imatinib versus DMSO treated K562 cells with 0.05 μ M versus DMSO treated K562 cells revealed that a treatment of Nilotinib resulted in a 2.18fold number of differentially expressed genes. Furthermore changes in their expression degree were stronger different in Nilotinib than in Imatinib treated cells. Thereby genes concerning *BCR-ABL* signalling, proliferation and cell cycle as well as resistance and disease progression associated

genes were expressed opposite to those induced by CML pathology. Functional, gene expression data could be validated for proliferation, apoptosis and cell cycle. The results give a molecular insight in the stronger efficacy of Nilotinib compared to Imatinib.

6. Literaturverzeichnis

Aguilera DG, Tsimberidou AM (2009). Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag* **5**: 281-289.

Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ (2004). Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* **571**: 43-49.

Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, Weissman IL (2000a). Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* **12**: 144-150.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000b). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197.

Akiko YA, Takashi S, Toru A, Yusei A, Shugo K, Shigeki I, Yoji I, Hitomi F, Chihaya M, Tomoyuki M (2005). Distinguishing between proliferating nodal lymphoid blasts in chronic myelogenous leukemia and non-Hodgkin lymphoma: Report of three cases and detection of a *bcr/abl* fusion signal by single-cell analysis. *Pathol Int* **55**: 273-279.

Algar EM, Khromykh T, Smith SI, Blackburn DM, Bryson GJ, Smith PJ (1996). A WT1 antisense oligonucleotide inhibits proliferation and induces apoptosis in myeloid leukaemia cell lines. *Oncogene* **12**: 1005-1014.

Andreu EJ, Lledo E, Poch E, Ivorra C, Albero MP, Martinez-Climent JA, Montiel-Duarte C, Rifon J, Perez-Calvo J, Arbona C, Prosper F, Perez-Roger I (2005). BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* **65**: 3264-3272.

Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, Russell-Jones R, Bain BJ, Baxter EJ, Chase A, Chessells JM, Colombat M, Dearden CE, Dimitrijevic S, Mahon FX, Marin D, Nikolova Z, Olavarria E, Silberman S, Schultheis B, Cross NCP, Goldman JM (2002). Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* **347**: 481-487.

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

Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I, Moroy T (2004). The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem* **279**: 48319-48328.

Badran A, Yoshida A, Wano Y, Imamura S, Kawai Y, Tsutani H, Inuzuka M, Ueda T (2003). Expression of the antiapoptotic gene survivin in chronic myeloid leukemia. *Anticancer Res* **23**: 589-592.

- Bailis JM, Forsburg SL (2004). MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 17-21.
- Bailly P, Hermand P, Callebaut I, Sonneborn HH, Khamlichi S, Mornon JP, Cartron JP (1994). The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Am Assoc Cancer Res* **91**: 5306-5310.
- Bailly P, Tontti E, Hermand P, Cartron JP, Gahmberg CG (1995). The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* **25**: 3316-3320.
- Bantscheff M, Eberhard D, Abraham Y, Bastuck S, Boesche M, Hobson S, Mathieson T, Perrin J, Raida M, Rau C, Reader V, Sweetman G, Bauer A, Bouwmeester T, Hopf C, Kruse U, Neubauer G, Ramsden N, Rick J, Kuster B, Drewes G (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotech* **25**: 1035-1044.
- Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG (1991). 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett* **1**: 611-614.
- Bauerschmidt C, Pollok S, Kremmer E, Nasheuer HP, Grosse F (2007). Interactions of human Cdc45 with the Mcm2-7 complex, the GINS complex, and DNA polymerases delta and epsilon and during S phase. *Genes to Cells* **12**: 745-758.
- Baytel D, Shalom S, Madgar I, Weissenberg R, Don J (1998). The human Pim-2 proto-oncogene and its testicular expression. *Biochim Biophys Acta* **1442**: 274-285.
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* **83**: 2038-2044.
- Bellanger S, de Gramont A, Sobczak-Thépot J (2007). Cyclin B2 suppresses mitotic failure and DNA re-replication in human somatic cells knocked down for both cyclins B1 and B2. *Oncogene* **26**: 7175-7184.
- Bennett JH (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J* **64**: 413-423.
- Bennett JH. (1852). *Leucocythaemia, or white cell blood in relation to the physiology and pathology of the lymphatic glandular system*. Sutherland and Knox: Edinburgh.
- Berridge MV, Tan AS (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* **303**: 474-482.
- Bhatia R, Wayner EA, McGlave PB, Verfaillie CM (1994). Interferon-alpha restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired beta 1 integrin receptor function. *J Clin Invest* **94**: 384-391.

- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7162-7166.
- Bottazzi ME, Buzzai M, Zhu X, Desdouets C, Brechot C, Assoian RK (2001). Distinct effects of mitogens and the actin cytoskeleton on CREB and pocket protein phosphorylation control the extent and timing of cyclin A promoter activity. *Mol Cell Biol* **21**: 7607-7616.
- Branford S, Hughes TP, Rudzki Z (1999). Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol* **107**: 587-599.
- Bruno T, Iezzi S, De Nicola F, Di Padova M, Desantis A, Scarsella M, Di Certo MG, Leonetti C, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2007). Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **15**: 515-520.
- Bruns I, Czibere A, Fischer JC, Roels F, Cadeddu RP, Buest S, Bruennert D, Huenerlituerkoglu AN, Stoecklein NH, Singh R, Zerbini LF, Jager M, Kobbe G, Gattermann N, Kronenwett R, Brors B, Haas R (2009). The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia* **23**: 892-899.
- Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-Kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **295**: 139-145.
- Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* **56**: 100-104.
- Burgoyne LA, Hewish DR, Mobbs J (1974). Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* **143**: 67-72.
- Calabretta B, Perrotti D (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood* **103**: 4010-4022.
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, Hays L, Morgan WF, Petrini JHJ (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**: 477-486.
- Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Cabreira-Hansen M, Beran M, McQueen T, Chen W, Andreeff M (2006). Regulation of survivin expression through Bcr-Abl/MAPK cascade: targeting survivin overcomes imatinib resistance and increases imatinib sensitivity in imatinib-responsive CML cells. *Blood* **107**: 1555-1563.
- Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003a). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **17**: 590-603.

- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003b). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**: 1263-1293.
- Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin R, McCubrey JA (2003c). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol* **22**: 469-480.
- Chang S, Kim JH, Shin J (2002). p62 forms a ternary complex with PKCzeta and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Letters* **510**: 57-61.
- Cho YJ, Cunnick JM, Yi SJ, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N (2007). Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. *Mol Cell Biol* **27**: 899-911.
- Clark RE (2000). Antisense therapeutics in chronic myeloid leukaemia: the promise, the progress and the problems. *Leukemia* **14**: 347-355.
- Clarke MF (2004). Chronic myelogenous leukemia - identifying the hydra's heads. *N Engl J Med* **351**: 634-636.
- Coppo P, Dusanter-Fourt I, Millot G, Nogueira MM, Dugray A, Bonnet ML, Mitjavila-Garcia MT, Le Pesteur D, Guilhot F, Vainchenker W, Sainteny F, Turhan AG (2003). Constitutive and specific activation of STAT3 by BCR-ABL in embryonic stem cells. *Oncogene* **22**: 4102-4110.
- Cortes J, Jabbour E, Kantarjian H, Yin CC, Shan J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Giles F, Breeden M, Reeves N, Wierda WG, Jones D (2007). Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **110**: 4005-4011.
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm* **3**: 207-212.
- Critchley DR (2004). Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans* **32**: 831-836.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**: 824-830.
- Davey MJ, Indiani C, O'Donnell M (2003). Reconstitution of the Mcm2-7p heterohexamer, subunit arrangement, and ATP site architecture. *J Biol Chem* **278**: 4491-4499.
- Deane R, Schafer W, Zimmermann HP, Mueller L, Gorlich D, Prehn S, Ponstingl H, Bischoff FR (1997). Ran-binding protein 5 (RanBP5) is related to the nuclear transport factor importin-beta but interacts differently with RanBP1. *Mol Cell Biol* **17**: 5087-5096.
- Deininger MW (2008). Nilotinib. *Clin Cancer Res* **14**: 4027-4031.

- Deininger MW, Druker BJ (2003). Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol Rev* **55**: 401-423.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**: 3343-3356.
- Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, Fischer JC, Graef T, Roskopf M, Brors B, Pechtel S, Bork S, Koch A, Baer A, Rohr UP, Kobbe G, Haeseler Av, Gattermann N, Haas R, Kronenwett R (2007). Molecular signature of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia* **21**: 494-504.
- Donato NJ, Wu JY, Stapley J, Gallick G, Lin H, Arlinghaus R, Talpaz M (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* **101**: 690-698.
- Doree M, Galas S (1994). The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J* **8**: 1114-1121.
- Doyle AC, Edin CM (1882). Notes on a case of leucocythaemia. *Lancet* **119**: 490.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA, the IRIS Investigators (2006). Five-year follow-up of patients receiving Imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**: 2408-2417.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001a). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* **344**: 1038-1042.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001b). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**: 1031-1037.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**: 561-566.
- Duke R, Cohen J (1986). IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* **5**: 289-299.
- Duxbury MS, Whang EE (2007). RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* **354**: 190-196.
- Eki T, Okumura K, Abe M, Kagotani K, Taguchi H, Murakami Y, Pan ZQ, Hanaoka F (1998). Mapping of the human genes encoding cyclin H (CCNH) and the CDK-activating kinase (CAK) assembly factor MAT1 (MNAT1) to chromosome bands 5q13.3-q14 and 14q23, respectively. *Genomics* **47**: 115-120.

- Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, Seeber S, Schaefer UW (2000). The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Ann Hematol* **79**: 424-431.
- Emig M, Saussele S, Wittor H, Weissner A, Reiter A, Willer A, Berger U, Hehlmann R, Cross NC, Hochhaus A (1999). Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* **13**: 1825-1832.
- Engstrom Y, Eriksson S, Jildevik I, Skog S, Thelander L, Tribukait B (1985). Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* **260**: 9114-9116.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**: 164-172.
- Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, Bhalla KN (2000). CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* **96**: 2246-2253.
- Fernandez-Luna JL (2000). Bcr-Abl and inhibition of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells. *Apoptosis* **5**: 315-318.
- Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A (1967). Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Nat Acad Sci U S A* **58**: 1468-1471.
- Fitter S, Dewar AL, Kostakis P, To LB, Hughes TP, Roberts MM, Lynch K, Vernon-Roberts B, Zannettino ACW (2008). Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. *Blood* **111**: 2538-2547.
- Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan Z, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Nat Acad Sci U S A* **91**: 8655-8659.
- Forsburg SL (2008). The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochem Soc Trans* **36**: 114-119.
- Fox CJ, Hammerman PS, Cinalli RM, Master SR, Chodosh LA, Thompson CB (2003). The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev* **17**: 1841-1854.
- Freeman SD, Kelm S, Barber EK, Crocker PR (1995). Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. *Blood* **85**: 2005-2012.
- Fuss J, Linn S (2002). Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J Biol Chem* **277**: 8658-8666.

- Giebel B, Zhang T, Beckmann J, Spanholtz J, Wernet P, Ho AD, Punzel M (2006). Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division. *Blood* **107**: 2146-2152.
- Goh PY, Lim HH, Surana U (2000). Cdc20 protein contains a destruction-box but, unlike Clb2, its proteolysis is not acutely dependent on the activity of anaphase-promoting complex. *Eur J Biochem* **267**: 434-449.
- Goldman JM (2004). Chronic myeloid leukemia - still a few questions. *Exp Hematol* **32**: 2-10.
- Goldman JM (2007). How I treat chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Blood* **110**: 2828-2837.
- Goldman JM, Melo JV (2003). Chronic myeloid leukemia - advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* **349**: 1451-1464.
- Goldman JM, Melo JV (2008). BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia - how does it work? *Acta Haematol* **119**: 212-217.
- Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF (1987). Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **328**: 342-344.
- Götte M, Yip GW (2006). Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* **66**: 10233-10237.
- Gotter AL, Suppa C, Emanuel BS (2007). Mammalian TIMELESS and Tipin are evolutionarily conserved replication fork-associated factors. *J Mol Biol* **366**: 36-52.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**: 93-99.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**: 1899-1911.
- Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* **277**: 13430-13437.
- Haas R, Kronenwett R (2005). *Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle: Grundlagen, Indikationen, therapeutischer Nutzen*. Deutscher Ärzte Verlag: Köln.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.
- Hantschel O, Rix U, Schmidt U, Bürckstümmer T, Kneidinger M, Schütze G, Colinge J, Bennett KL, Ellmeier W, Valent P, Superti-Furga G (2007). The Btk tyrosine kinase is a major target of the Bcr-Abl inhibitor dasatinib. *Proc Am Assoc Cancer Res* **104**: 13283-13288.

- Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Löffler H, Hochhaus A, Heinze B (1994). Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* **84**: 4064-4077.
- Heidel JD, Liu JY, Yen Y, Zhou B, Heale BS, Rossi JJ, Bartlett DW, Davis ME (2007). Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Clin Cancer Res* **13**: 2207-2215.
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**: 925-932.
- Hernandez-Boluda JC, Bellosillo B, Vela MC, Colomer D, Alvarez-Larran A, Cervantes F (2005). Survivin expression in the progression of chronic myeloid leukemia: a sequential study in 16 patients. *Leuk Lymphoma* **46**: 717-722.
- Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R (2004). *Chronische myeloische Leukämie. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie*. UNI-MED Verlag AG: Bremen, 158pp.
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **102**: 1186-1195.
- Janssen JJ, Klaver SM, Waisfisz Q, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Schuurhuis GJ, Ossenkoppele GJ (2005). Identification of genes potentially involved in disease transformation of CML. *Leukemia* **19**: 998-1004.
- Jilma B, Hergovich N, Homoncik M, Jilma-Stohlawetz P, Kreuzer C, Eichler H-G, Zellner M, Pugin J (2000). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) downregulates its receptor (CD114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol* **111**: 314-320.
- Jorgensen HG, Allan EK, Jordanides NE, Mountford JC, Holyoake TL (2007). Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* **109**: 4016-4019.
- Kantarjian H, O'Brien S, Talpaz M, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Beth M, Jianqin R, Giles SF, Cortes J (2007a). Outcome of patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia post-imatinib mesylate failure. *Cancer* **109**: 1556-1560.
- Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, McCredie KB, Freireich EJ (1988). Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* **61**: 1441-1446.

- Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, Ossenkoppele GJ, Nicolini FE, O'Brien SG, Litzow M, Bhatia R, Cervantes F, Haque A, Shou Y, Resta DJ, Weitzman A, Hochhaus A, le Coutre P (2007b). Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* **110**: 3540-3546.
- Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J (2006). New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and Imatinib resistance. *Ann Intern Med* **145**: 913-923.
- Kikuchi S, Nagai T, Kunitama M, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N (2007). Active FKHRL1 overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia-derived cell lines via the production of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Sci* **98**: 1949-1958.
- Kim MM, Wiederschain D, Kennedy D, Hansen E, Yuan ZM (2007). Modulation of p53 and MDM2 activity by novel interaction with Ras-GAP binding proteins (G3BP). *Oncogene* **26**: 4209-4215.
- Kirchstein R, Skirboll L (2001). *Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions*.
- Klein E, Vánky F, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, Polliack A (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* **18**: 421-431.
- Kohmura K, Miyakawa Y, Kawai Y, Ikeda Y, Kizaki M (2004). Different roles of p38 MAPK and ERK in STI571-induced multi-lineage differentiation of K562 cells. *J Cell Physiol* **198**: 370-376.
- Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, Shabaik A, Gascoyne R, Berean K, Reed JC (1995). Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo. *Am J Pathol* **146**: 1309-1319.
- Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA (1999). LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res* **59**: 3171-3174.
- Kroemer G (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**: 614-620.
- Kurosawa N, Kanemitsu Y, Matsui T, Shimada K, Ishihama H, Muramatsu T (1999). Genomic analysis of a murine cell-surface sialomucin, MGC-24/CD164. *Eur J Biochem* **265**: 466-472.
- Le XF, Lammayot A, Gold D, Lu Y, Mao W, Chang T, Patel A, Mills GB, Bast RC, Jr. (2005). Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem* **280**: 2092-2104.

- Leone G, DeGregori J, Sears R, Jakoi L, Nevins JR (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* **387**: 422-426.
- Li C, Wong WH (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**: research0032.1-0032.11.
- Lidonnici MR, Corradini F, Waldron T, Bender TP, Calabretta B (2008). Requirement of c-Myb for p210BCR/ABL-dependent transformation of hematopoietic progenitors and leukemogenesis. *Blood* **111**: 4771-4779.
- Lin YL, Chen C, Keshav KF, Winchester E, Dutta A (1996). Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A. *J Biol Chem* **271**: 17190-17198.
- Lindahl T, Wood RD (1999). Quality control by DNA repair. *Science* **286**: 1897-1905.
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-334.
- Mancini M, Brusa G, Zuffa E, Corrado P, Martinelli G, Grafone T, Barbieri E, Santucci MA (2007). Persistent Cdk2 inactivation drives growth arrest of BCR-ABL-expressing cells in response to dual inhibitor of SRC and ABL kinases SKI606. *Leuk Res* **31**: 979-987.
- Manley PW, Cowan-Jacob SW, Mestan J (2005). Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 3-13.
- McAlear MA, Tuffo KM, Holm C (1996). The large subunit of replication factor C (Rfc1p/Cdc44p) is required for DNA replication and DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**: 65-78.
- Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia* (1968). Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. *Br Med J* **1**: 201-208.
- Menskin E, van de Locht A, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts van Kessel A, De Witte T (1998). Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Haematol* **102**: 768-774.
- Morel JC, Park CC, Woods JM, Koch AE (2001). A novel role for Interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem* **276**: 37069-37075.
- Mow BM, Chandra J, Svingen PA, Hallgren CG, Weisberg E, Kottke TJ, Narayanan VL, Litzow MR, Griffin JD, Sausville EA, Tefferi A, Kaufmann SH (2002). Effects of the Bcr/abl kinase inhibitors STI571 and adaphostin (NSC 680410) on chronic myelogenous leukemia cells in vitro. *Blood* **99**: 664-671.

- Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, Kobbe G, Aivado M, Rong A, Free M, Rossig R, Fenk R, Schneider P, Gattermann N, Royer-Pokora B, Haas R, Kronenwett R (2003). Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Haematol* **70**: 1-10.
- Neumann F, Markett J, Fenk R, Pooten M, Koch A, Bruennert D, Schimkus N, Wulfert M, Royer-Pokora B, Kronenwett R, Haas R, Gattermann N (2008). Therapy adapted to molecular response in patients with chronic myelogenous leukaemia in first chronic phase: results of the Duesseldorf study. *Hematol Oncol* **26**: 213-218.
- Notari M, Neviani P, Santhanam R, Blaser BW, Chang JS, Galietta A, Willis AE, Roy DC, Caligiuri MA, Marcucci G, Perrotti D (2006). A MAPK/HNRPK pathway controls BCR/ABL oncogenic potential by regulating MYC mRNA translation. *Blood* **107**: 2507-2516.
- Nowell P, Hungerford D (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**: 1497.
- O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ (2005). *In vitro* activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* **65**: 4500-4505.
- Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD (2001). ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* **97**: 2440-2448.
- Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C (2002). Caspase-2 can trigger cytochrome C release and apoptosis from the nucleus. *J Biol Chem* **277**: 15147-15161.
- Preudhomme C, Révillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, Jouet JP, Cosson A, Peyrat JP, Fenaux P (1999). Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* **13**: 957-964.
- Quintás-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* **16**: 133-131.
- Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL, Friend S, Linsley PS (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2794-2799.
- Raitano AB, Whang YE, Sawyers CL (1997). Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* **1333**: F201-F216.
- Riss TL, Moravec RA (1992). Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol Biol Cell (Suppl)* **3**: 184a.
- Rix U, Hantschel O, Durnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV, Kaupe I, Bennett KL, Valent P, Colinge J, Kocher T, Superti-Furga G (2007). Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* **110**: 4055-4063.

- Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S (2001). AKT-dependent phosphorylation of p21^{Cip1} regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol* **21**: 5644-5657.
- Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C, Puisieux A (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* **14**: 482-486.
- Rowley JD (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293.
- Ruan GR, Liu YR, Chen SS, Fu JY, Chang Y, Qin YZ, Li JL, Yu H, Wang H (2004). Effect of antisense VEGF cDNA transfection on the growth of chronic myeloid leukemia K562 cells *in vitro* and in nude mice. *Leuk Res* **28**: 763-769.
- Salesse S, Verfaillie CM (2002). Mechanisms underlying abnormal trafficking and expansion of malignant progenitors in CML: BCR/ABL-induced defects in integrin function in CML. *Oncogene* **21**: 8605-8611.
- Salesse S, Verfaillie CM (2003). BCR/ABL-mediated increased expression of multiple known and novel genes that may contribute to the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Ther* **2**: 173-182.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.
- Sánchez-García I, Grütz G (1995). Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Am Assoc Cancer Res* **92**: 5287-5291.
- Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* **96**: 111-116.
- Sawyers CL (1999). Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **340**: 1330-1340.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**: 1938-1942.
- Schoch C, Kern W, Schnittger S, Haferlach T (2005). FISH-Diagnostik bei hämatologischen Neoplasien. *LaboratoriumsMedizin* **29**: 335-342.
- Schoch C, Schnittger S, Bursch S, Gerstner D, Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T (2002). Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases. *Leukemia* **16**: 53-59.
- Schultheis B, Carapeti-Marootian M, Hochhaus A, Weissner A, Goldman JM, Melo JV (2002). Overexpression of SOCS-2 in advanced stages of chronic myeloid leukemia: possible inadequacy of a negative feedback mechanism. *Blood* **99**: 1766-1775.

- Seewald MJ, Kraemer A, Farkasovsky M, Korner C, Wittinghofer A, Vetter IR (2003). Biochemical characterization of the Ran-RanBP1-RanGAP system: are RanBP proteins and the acidic tail of RanGAP required for the Ran-RanGAP GTPase reaction? *Mol Cell Biol* **23**: 8124-8136.
- Seo HR, Lee DH, Lee HJ, Baek M, Bae S, Soh JW, Lee SJ, Kim J, Lee YS (2005). Cyclin G1 overcomes radiation-induced G2 arrest and increases cell death through transcriptional activation of cyclin B1. *Cell Death Differ* **13**: 1475-1484.
- Seo S, Kroll KL (2006). Geminin's double life: chromatin connections that regulate transcription at the transition from proliferation to differentiation. *Cell Cycle* **5**: 374-379.
- Shah NP (2005). Loss of response to Imatinib: mechanisms and management. *Hematol* **2005**: 183-187.
- Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM (2002). Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* **16**: 1402-1411.
- Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T (1999). Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* **11**: 709-719.
- Skorski T (2002). BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* **21**: 8591-8604.
- Skorski T (2008). BCR/ABL, DNA damage and DNA repair: Implications for new treatment concepts. *Leuk Lymphoma* **49**: 610 - 614.
- Slupianek A, Gurdek E, Koptyra M, Nowicki MO, Siddiqui KM, Groden J, Skorski T (2005). BLM helicase is activated in BCR/ABL leukemia cells to modulate responses to cisplatin. *Oncogene* **24**: 3914-3922.
- Slupianek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Blasiak J, Fishel R, Skorski T (2002). Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**: 4189-4201.
- Slupianek A, Schmutte C, Tomblin G, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Nowicki MO, Pierce AJ, Fishel R, Skorski T (2001). BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* **8**: 795-806.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Snead JL, O'Hare T, Adrian LT, Eide CA, Lange T, Druker BJ, Deininger MW (2009). Acute dasatinib exposure commits Bcr-Abl-dependent cells to apoptosis. *Blood* **114**: 3459-3463.
- Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S (1988). Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* **25**: 49-61.

- Stach RW, Garian N, Olender EJ (1979). Biological activity of the beta nerve growth factor: the effects of various added proteins. *J Neurochem* **33**: 257-261.
- Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**: 189-218.
- Tefferi A, Vardiman JW (2007). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**: 14-22.
- Terui Y, Furukawa Y, Kikuchi J, Saito M (1995). Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* **164**: 74-84.
- Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B (1989). Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* **264**: 7466-7472.
- Valdez BC, Murray D, Ramdas L, de Lima M, Jones R, Kornblau S, Betancourt D, Li Y, Champlin RE, Andersson BS (2008). Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia. *Leuk Res* **32**: 1684-1697.
- Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Am Assoc Cancer Res* **87**: 1663-1667.
- Venclovas C, Colvin ME, Thelen MP (2002). Molecular modeling-based analysis of interactions in the RFC-dependent clamp-loading process. *Protein Sci* **11**: 2403-2416.
- Verma D, Kantarjian HM, Jones D, Luthra R, Borthakur G, Verstovsek S, Rios MB, Cortes J (2009). Chronic myeloid leukemia (CML) with P190BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood* **114**: 2232-2235.
- Verstovsek S, Akin C, Manshouri T, Quintás-Cardama A, Huynh L, Manley P, Tefferi A, Cortes J, Giles FJ, Kantarjian H (2006). Effects of AMN107, a novel aminopyrimidine tyrosine kinase inhibitor, on human mast cells bearing wild-type or mutated codon 816 c-kit. *Leuk Res* **30**: 1365-1370.
- Virchow R (1845). Weisses Blut. *Frorieps Notizen* **36**: 151-156.
- Virchow R (1847). Weisses Blut und Milztumoren. *Medicale Zeitung* **16**.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.
- Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberg DS, Podar K, Griffin JD, Sattler M (2006). Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem* **281**: 18177-18183.
- Wang JC (1991). DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* **266**: 6659-6662.

- Wang JG, Barsky LW, Davicioni E, Weinberg KI, Triche TJ, Zhang XK, Wu L (2006). Retinoic acid induces leukemia cell G1 arrest and transition into differentiation by inhibiting cyclin-dependent kinase-activating kinase binding and phosphorylation of PML/RAR alpha. *FASEB J* **20**: 2142-2144.
- Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD (2006). AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer* **94**: 1765-1769.
- Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, Huntly B, Fabbro D, Fendrich G, Hall-Meyers E, Kung AL, Mestan J, Daley GQ, Callahan L, Catley L, Cavazza C, Mohammed A, Neuberg D, Wright RD, Gilliland DG, Griffin JD (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**: 129-141.
- Weissman IL (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**: 157-168.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**: 231-237.
- Wilda M, Fuchs U, Wössmann W, Borkhardt A (2002). Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* **21**: 5716-5724.
- Wu J, Meng F, Lu H, Kong L, Bornmann W, Peng Z, Talpaz M, Donato NJ (2008). Lyn regulates BCR-ABL and Gab2 tyrosine phosphorylation and c-Cbl protein stability in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* **111**: 3821-3829.
- Xie Y, Xu K, Dai B, Guo Z, Jiang T, Chen H, Qiu Y (2005). The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **25**: 70-78.
- Zhao RY, Bukrinsky M, Elder RT (2005). HIV-1 viral protein R (Vpr) & host cellular responses. *Indian J Med Res* **121**: 270-286.
- Zheng C, Li L, Haak M, Brors B, Frank O, Giehl M, Fabarius A, Schatz M, Weisser A, Lorentz C, Gretz N, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W (2006). Gene expression profiling of CD34+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia* **20**: 1028-1034.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC (2001). Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**: 245-252.
- Zhu Y, Ishimi Y, Tanudji M, Lees E (2005). Human CDK2 inhibition modifies the dynamics of chromatin-bound minichromosome maintenance complex and replication protein A. *Cell Cycle* **4**: 1254-1263.
- Zou L, Wu Y, Pei L, Zhong D, Gen M, Zhao T, Wu J, Ni B, Mou Z, Han J, Chen Y, Zhi Y (2005). Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. *Leuk Res* **29**: 1387-1391.

Danksagung

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Rainer Haas herzlich für die gute Zusammenarbeit, die aufmerksame Unterstützung meiner Arbeit, die vielseitigen wissenschaftlichen und kritischen Anregungen sowie die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich an PD Dr. Frank Neumann für die Themenstellung, die anregende und geduldige Betreuung meiner Arbeit richten.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu betreuen und zu begutachten.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Akos Czibere und Dr. Ingmar Bruns für ihre Unterstützung im Labor sowie bei den bioinformatischen Auswertungen und den statistischen Analysen der Genexpressionsdaten.

Ein großer Dank gilt den Mitarbeitern des Forschungslabors sowie der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Julia Fröbel und Michael Wulfert für ihre sehr hilfreichen Korrekturen der Doktorarbeit. Außerdem möchte ich Dr. Nona Shayegi, Ron-Patrick Cadeddu, Sebastian Büst, Raminder Singh, Matthias Wilk, Sebastian Dietrich, Nils Jansen, Anne Koch, Sabrina Pechtel, Caro Brings und Bärbel Junge danken. Es hat riesigen Spaß gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern und Brüdern bedanken, die mich nach besten Kräften unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich allen Freunden danken, die an mich geglaubt haben und in den letzten drei Jahren vielleicht ein wenig kurz gekommen sind.

Eidesstattliche Versicherung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Daniela Brännert