

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

des Universitätsklinikums Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Rainer Haas

Vergleichende Genexpressionsanalysen an
normalen und leukämischen CD34+
hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen –
Identifikation pathophysiologisch relevanter Gene
bei der chronischen myeloischen Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulf Butterweck

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Ralf Kronenwett
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Christopher Poremba

Die wahren Abenteuer sind im Kopf.

André Heller

Wesentliche Teile dieser Dissertation wurden im August 2005 im Oncogene-Magazin veröffentlicht: R. Kronenwett, U. Butterweck et al. Distinct molecular phenotype of malignant CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2005; 24: 5313-5324.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	8
II. Zusammenfassung	10
III. Einleitung	12
III.a Epidemiologie und Klinik der chronischen myeloischen Leukämie	12
III.b Maligne hämatopoetische Stammzellen bei der CML	14
III.c Molekularbiologie der CML	17
III.d Therapie und Prognose der CML	21
III.e Aktuelle Ergebnisse aus der Stammzellforschung im Kontext dieser Arbeit	24
III.f Allgemeine Anmerkungen zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	26
III.g Ziele dieser Arbeit	27
IV. Material und Methoden	29
IV.a Universell eingesetzte Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	29
IV.b Untersuchungsmaterial	31
IV.c Dichtegradientenzentrifugation	33
IV.d Immunmagnetische Anreicherung	34
IV.e Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz	36
IV.f Zellkultur: Koloniebildungstest	38
IV.g RNA-Extraktion mit dem Stratagene®-Kit	41

IV.h RNA-Extraktion mit dem Qiagen®-Kit	43
IV.i Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für cDNA-Arrays, Hybridisierung und statistische Auswertung	45
IV.j Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für PCR	47
IV.k RT-PCR mit der LightCycler®SYBR-Green®-Technik	48
IV.l TaqMan®-RT-PCR mit der ABI PRISM 7900 HT®-Technik	51
IV.m Agarosegelelektrophorese	53
IV.n Erstellung, Darstellung, statistische Auswertung	54
V. Ergebnisse	56
V.a Genexpressionsprofil maligner CD34 ⁺ Zellen bei CML	56
V.b Vergleich von CD34 ⁺ Zellen bei CML aus Knochenmark und Blut und hierarchische Clusteranalyse	60
V.c Bestätigungsexperimente durch „real-time“-RT-PCR	63
V.d Nachweis G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34 ⁺ Zellen bei CML	65
V.e G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind auf CD34 ⁺ hämato- poetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML in chronischer Phase hochreguliert	68
V.f Funktionelle Bedeutung der Überexpression des Opioidre- zeptors $\mu 1$, des GABA-B-Rezeptors und des Adenosin-A1- Rezeptors	71
V.f1. Kein Einfluss der Opioid $\mu 1$ -Rezeptor- modulation auf das klonogene Wachstum	71
V.f2. Kein spezieller Einfluss der GABA-B-Rezeptor- modulation auf das klonogene Wachstum	72

Vf3. Signifikante Hemmung des klonogenen Zell- Wachstums durch Blockade des Adenosin- rezeptors A1	73
VI. Diskussion	77
VII. Curriculum vitae	90
VIII. Danksagung	94
IX. Tabellenverzeichnis	96
X. Abbildungsverzeichnis	97
XI. Literaturverzeichnis	99

I. Abkürzungsverzeichnis

CMPE	Chronische myeloproliferative Erkrankungen
CML	Chronische myeloische Leukämie
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
DNAse	Desoxyribonuklease
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte / macrophage-colony-stimulating factor
Epo	Erythropoetin
IL	Interleukin
MACS	Magnetism-activated cell sorter
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
RT	Reverse Transkriptase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
IgG	Immunglobulin G
CFU-GM	Colony-forming unit granulocyte / macrophage
BFU-E	Burst-forming unit erythrocyte
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
CD	Cluster of differentiation
CD34 ⁺	CD34 positiv
CD38 ^{dim/bright}	Geringe / hohe CD38 Immunfluoreszenz
GABA	Gammaaminobutyric acid
rh	Rekombinant human
z.B.	zum Beispiel
s.o/s.u.	siehe oben / siehe unten
z.T.	zum Teil
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung

bp	Basenpaare
CP	Crossing point
C _T	Threshold cycle
PBS	Phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
5HT ₃	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
MAPKinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
CHO-Zellen	Ovarzellen des chinesischen Hamsters

II. Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, die durch das bcr-abl-Onkogen charakterisiert ist. Wir erstellten Genexpressionsprofile von hochangereicherten CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase, wobei wir cDNA-Arrays mit 1185 Genen verwendeten. Im Vergleich zu gesunden CD34⁺ Zellen fanden wir 158 signifikant differentiell exprimierte Gene. Die Ergebnisse spiegelten bcr-abl-typische funktionelle Veränderungen, wie erhöhte Zellzyklus- und Proteasomaktivität, wider. DNA-Reparaturenzyme und Enzyme zur Entgiftung von Fremdstoffen waren herunterreguliert und könnten zur genetischen Instabilität beitragen.

Außerdem fanden wir die Deregulation von Genen, deren Beteiligung in der CML bisher nicht bekannt war. Es handelt sich hierbei um das Protoonkogen SKI und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Neuropeptide und -transmitter, wie den CRH-Rezeptor, den Opioidrezeptor $\mu 1$, den GABA-B-Rezeptor, die Orexinrezeptorsubtypen 1 und 2, den Serotoninrezeptorsubtyp 1F und den Adenosinrezeptor A1.

Zur Untersuchung des Einflusses auf das klonogene Wachstum verwendeten wir in Zellkulturexperimenten selektive Liganden des A1-Rezeptors. Die Zugabe

des selektiven Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX) zum Kulturmedium führte zu einer dosisabhängigen Wachstumshemmung myelomonozytärer und erythroider Kolonien von bis zu 47% bei Konzentrationen von 10^{-4} M ($p > 0,05$), die durch Zugabe des selektiven Agonisten 2-Chloro-N⁶-Cyclopentyladenosin (CCPA) aufgehoben werden konnte.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie erstmals Genexpressionsprofile maligner CD34⁺ Zellen bei CML erstellt. Die untersuchte Zellpopulation hat einen distinkten molekularen Phänotyp im Vergleich zu ihrem gesunden Pendant. Neben Genen aus verschiedensten funktionellen Gruppen sind in diesen Zellen insbesondere die Gene ausgewählter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hochreguliert, wobei das klonogene Wachstum der Zellen durch Modulation des Adenosin-A₁-Rezeptors gehemmt werden kann.

III. Einleitung

III.a Epidemiologie und Klinik der chronischen myeloischen Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle ¹. Sie wird in die Gruppe der chronischen myeloproliferativen Erkrankungen eingeteilt ². Andere Krankheiten aus dieser Gruppe sind die Polycythaemia vera, die essentielle Thrombozythaemie, die Osteomyelofibrose und verschiedene, seltene Formen. Bei der CML sind alle drei Zellreihen der Myelopoese (Leukopoese, Erythropoese und Thrombopoese) betroffen, wobei die Leukopoese hervorsteht ¹. Die CML hat eine Inzidenz von 1-2:100000 ³, eine Geschlechtspräferenz findet sich nicht. Auch wenn die CML als Erkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters gilt, kann sie doch in allen Phasen der Adoleszenz und auch im Kindesalter auftreten.

Der typische Verlauf der CML ist durch drei Phasen gekennzeichnet, die chronische Phase, die akzelerierte Phase und die Blastenkrise. Unterschieden werden diese anhand von klinischen und labordiagnostischen Parametern. In der chronischen Phase sind es vor allem Laborparameter (hauptsächlich Blutbildveränderungen), die den Patienten auffällig werden lassen, hier seien Leukozytose (95% der Fälle), pathologische Linksverschiebung bis hin zum

Myeloblasten und ein sogenanntes „buntes Bild“ mit Baso- und Eosinophilie genannt. In 95% der Fälle wird durch Zytogenetik das sogenannte Philadelphia-Chromosom gefunden^{4 5} (nähere Details weiter unten). Typische klinische Symptome sind in der chronischen Phase eher unspezifisch: Druckgefühl im Oberbauch (Splenomegalie), Abgeschlagenheit und erhöhte Infektanfälligkeit.

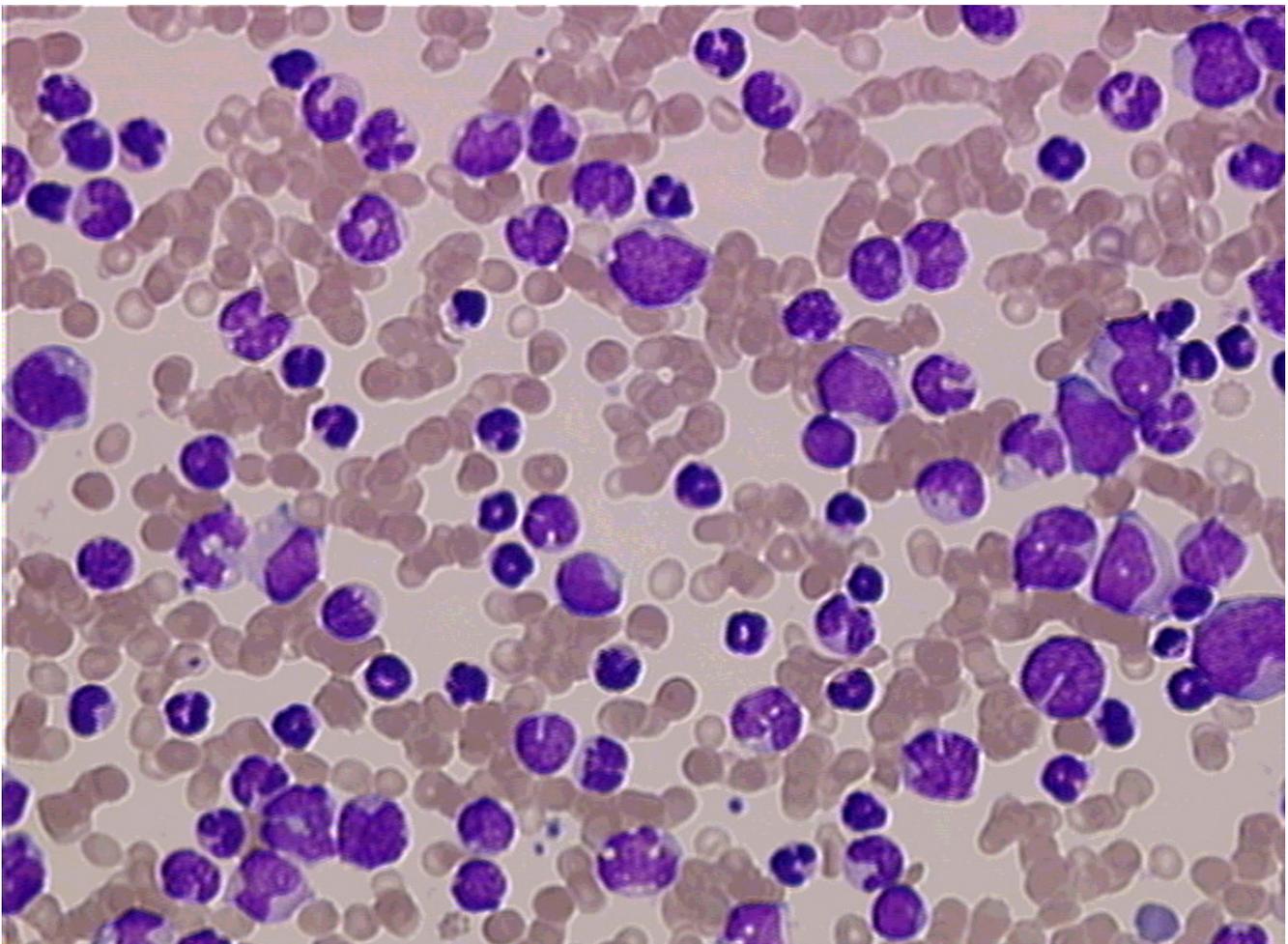


Abb. 1: Blutausstrich bei chronischer myeloischer Leukämie. Man sieht eine Leukozytose (Vergrößerung 400-fach!) mit pathologischer Linksverschiebung: Stabkernige, Myelozyten, Promyelozyten und auch Blasten sind erkennbar. Außerdem Dysplasie der Erythropoese mit Anisozytose und vereinzelt kernhaltigen erythrozytären Vorstufen.

Nach 3 bis 5 Jahren tritt die Krankheit dann in die akzelerierte Phase ein. Hierbei fallen im Blutbild eine zunehmende Zahl von Blasten (bis zu 30%) und eine starke Basophilie (bis zu 20%) auf ⁶. Die Splenomegalie nimmt zu, hinzu kommen Fieber, Anämie und Thrombozytopenie.

Das Endstadium ist dann die sogenannte Blastenkrise. Hier kommt der Differenzierungsblock hinzu und damit hat die CML in Blastenkrise alle Kriterien einer akuten Leukämie mit einem Blastenanteil von über 30% im peripheren Blut und Knochenmark ^{7 8}.

III.b Maligne hämatopoetische Stammzellen bei der CML

Hämatopoetische Stammzellen sind eine intensiv beforschte Zellpopulation. Damit eine Zelle die Definition einer Stammzelle erfüllt, muss sie über zwei wesentliche Eigenschaften verfügen: Die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in reife Zellen. Für die Blutstammzelle bedeutet dies, dass sie eine lebenslange Versorgung mit Blutzellen ermöglicht ^{9 10}. Ein Oberflächenmarker für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen ist das CD34-Antigen ^{11 12}. Die Funktion des CD34-Moleküls ist zwar bis heute nicht geklärt, allerdings macht es Stammzellen für Forschung und Therapie zugriffsfähig, denn über immunmagnetische Verfahren kann man CD34⁺ Zellen in hoher Reinheit gewinnen. CD34⁺ Zellen sind allerdings keine homogene Population. Die Expression von CD34 lässt sich von der frühen,

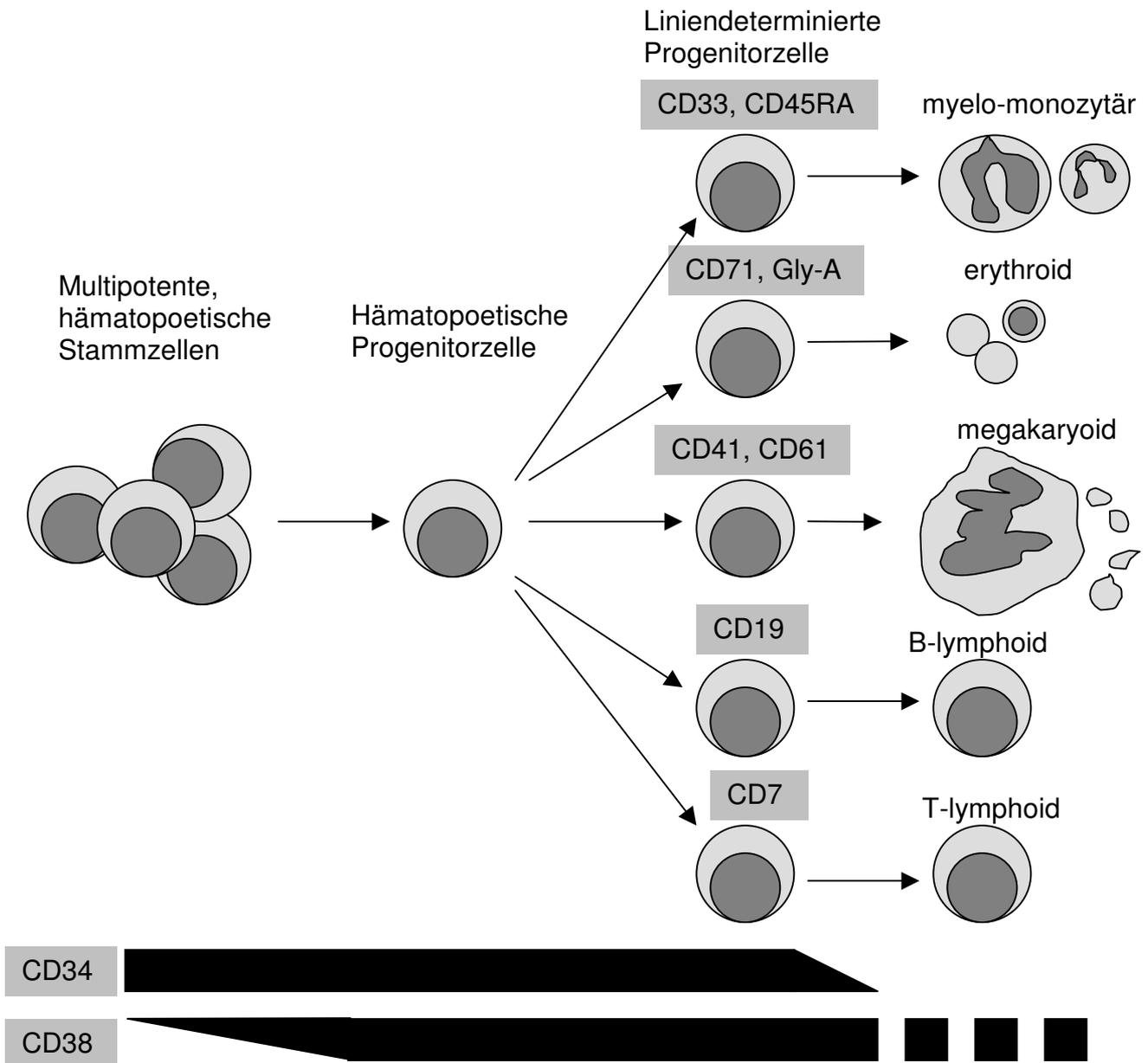


Abb. 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese mit immunologischen Markern einzelner Zellpopulationen, modifiziert nach U. Steidl¹⁰.

naiven Stammzelle verfolgen, bis hin zu den bereits in ihrer Entwicklung liniendeterminierten Progenitorzellen (Abbildung 2). Um ausdrücken zu

können, wie weit eine CD34⁺ Zelle in ihrer Entwicklung fortgeschritten ist, verwendet man andere Marker: CD38 fehlt den frühen Zellen mit besonders hohem Rekonstitutionspotential und wird erst später exprimiert¹³. Linien-spezifische Marker im Zuge der folgenden Reifung der Blutzellen (Abbildung 2) kommen noch hinzu.

Stammzellen dienen als gutes Modell für die Tumorforschung im Allgemeinen, da ihnen Eigenschaften zuzurechnen sind, die sich auch im Tumorgewebe wiederfinden. Solche Eigenschaften sind zum Beispiel die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Fähigkeit zu migrieren und reduzierte Alterung durch Expression von Telomerase¹⁴. Im Speziellen gibt es einige maligne Erkrankungen, für die gezeigt wurde, dass es sich um Erkrankungen der entsprechenden, gewebsspezifischen Stammzellen handelt. Ein Paradebeispiel hierfür ist die CML. Bei dieser Leukämie handelt es sich um eine Erkrankung der CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle. Daher sind alle Blutzellreihen Teil des malignen Klon, auch wenn klinisch die Granulo- und Thrombopoese im Vordergrund stehen. Bei der Transformation in die Blastenkrise kommt es dann zu einer Expansion der granulozytären und monozytären Progenitorzellen. Diese gewinnen somit ein „Stammzellpotential“, das die nativen Progenitorzellen nicht haben¹⁵, sodass man sie heute als Kandidaten für die Population der „leukämischen Stammzellen“ bei der CML-Blastenkrise bezeichnet. Die Aufklärung der

„leukämischen Stammzellen“ auch anderer leukämischer Erkrankungen ist momentan ein reges Forschungsgebiet.

Die Stammzellen bei CML zeichnen sich prinzipiell durch die gleichen Eigenschaften wie die normalen Stammzellen aus, grundlegende Unterschiede finden sich aber in der verzögerten Ausreifung der Zellen und der gesteigerten Proliferationsaktivität. Interessant ist, dass die malignen Stammzellen vom gesunden Pendant nicht grundverschieden sind, wie die Gruppe um Deininger in ihrer Übersichtsarbeit darlegte ¹⁶. Vielmehr sind die Abläufe sehr ähnlich und relativ nah an der Physiologie, verglichen mit anderen malignen Erkrankungen. Diese Abläufe der malignen Transformation sollen im nächsten Kapitel etwas näher erklärt werden.

III.c Molekularbiologie der CML

Das molekularbiologische Korrelat des zytogenetischen Nachweises des Philadelphia-Chromosoms ⁴, einer Robertson'schen Translokation t(9;22) ¹⁷ ist die Fusion der beiden Gene bcr ¹⁸ und abl ¹⁹. Es entsteht das bcr-abl-Fusionsonkogen. Dieses kann in verschiedenen Spleißvarianten vorliegen, die zu einem 190 kD, einem 210 kD oder einem 230 kD schweren Protein führen können. Am häufigsten kommt die 210 kD schwere Variante, das p210^{bcr-abl} vor ²⁰. Um die daraus resultierenden funktionellen Veränderungen in der Zelle nachzuvollziehen, muss man sich insbesondere die Funktion von Wildtyp-abl

vor Augen halten. Abl ist eine nukleäre Nichtrezeptor-Tyrosinkinase^{21 22}. Viele Studien zur Funktion kommen von Fibroblasten und zeigen, dass abl ein Adaptermolekül ist, welches von verschiedenen intra- und extrazellulären Partnern Signale erhält (als Beispiel seien hier Integrine²³ und p73²⁴ genannt) und dann die Zelle in Richtung Zellzyklus oder Apoptose beeinflusst²⁵. Über bcr ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es handelt sich um eine Serin-Threoninkinase. Es ist umstritten, ob bcr überhaupt etwas zur Pathogenese der CML hinzusteuert, denn bcr-abl positive Leukämien können auch in bcr -/- Mäusen ausgelöst werden²⁶. Bcr selbst scheint also folglich kein onkogenes Potential zu haben.

Die Fusion der beiden Gene führt nun zu deutlichen Veränderungen in der Zelle. Einerseits führt die veränderte Signalsequenz des Proteins zu einer anderen Lokalisierung: Das nukleäre Protein abl wird durch die Fusion mit bcr ins Zytosol transloziert und kann so auf völlig andere Signaltransduktionswege als das native Protein abl einwirken. Außerdem kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität, was für die Pathogenese den wichtigsten Einflussfaktor darstellt²⁷. Deregulierte Tyrosinkinaseaktivität scheint ein gemeinsamer Mechanismus bei den myeloproliferativen Störungen zu sein, Mutationen anderer Tyrosinkinasen konnten bereits als pathogenetisches Prinzip für einzelne Erkrankungen dieser Gruppe gezeigt werden. Eine Genfusion von ZNF198 mit dem "fibroblast growth factor receptor 1" führt zum 8p11-positiven myeloproliferativen Syndrom²⁸, die des tel-Onkogens mit dem

„platelet-derived growth factor β receptor“ zur t(5;12)-positiven chronischen myelomonozytären Leukämie ¹⁹.

Das bcr-abl-Protein wirkt an verschiedenen Stellen auf die physiologischen Signalkaskaden ein. Dies führt zu den drei pathogenetischen „Säulen“ der malignen Transformation bei der CML.

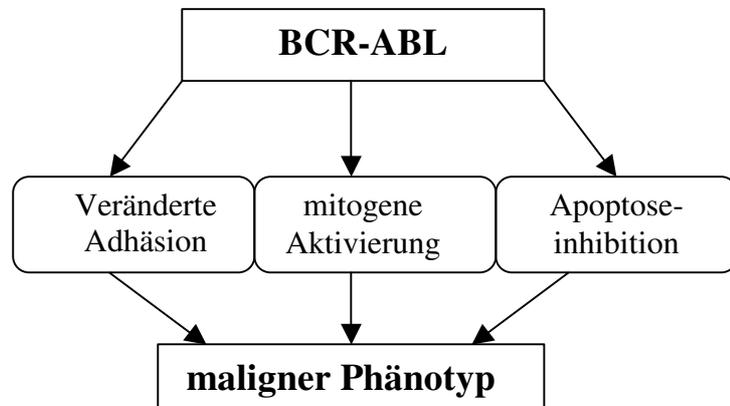


Abb. 3: Vermutete Pathomechanismen in der CML, modifiziert nach M. Deininger ¹⁶.

Diese sind: Veränderte Adhäsions-

Eigenschaften am Knochenmarkstroma ³⁰, Aktivierung mitogener Signalwege ³¹ und Apoptoseinhibition ³². Die veränderten Adhäsionseigenschaften erklären sich aus der Interaktion mit dem abl-Anteil des bcr-abl-Proteins: Wie oben erwähnt, stellt abl für Adhäsionsproteine ein Adaptermolekül dar ²³. Hohe zytosolische Konzentrationen von bcr-abl führen nun dazu, dass eine β 1-Integrinvariante exprimiert wird, die auf normalen Progenitorzellen nicht vorkommt ³³. Diese Variante wirkt inhibitorisch auf die Adhäsion. Die durch bcr-abl ausgelösten Veränderungen in der Signaltransduktion sind insgesamt recht komplex und zeichnen sich durch verschiedene Querverknüpfungen und Redundanzen aus. Die Signale haben sowohl anti-apoptotische als auch proliferative Anteile und sind nur schwer trennbar. Sie können hier nur stark

vereinfacht dargestellt werden. Wichtige beteiligte Gene sind ras, die MAPKinase-Familie und die PI-3-Kinase mit der Serin-Threoninkinase akt.

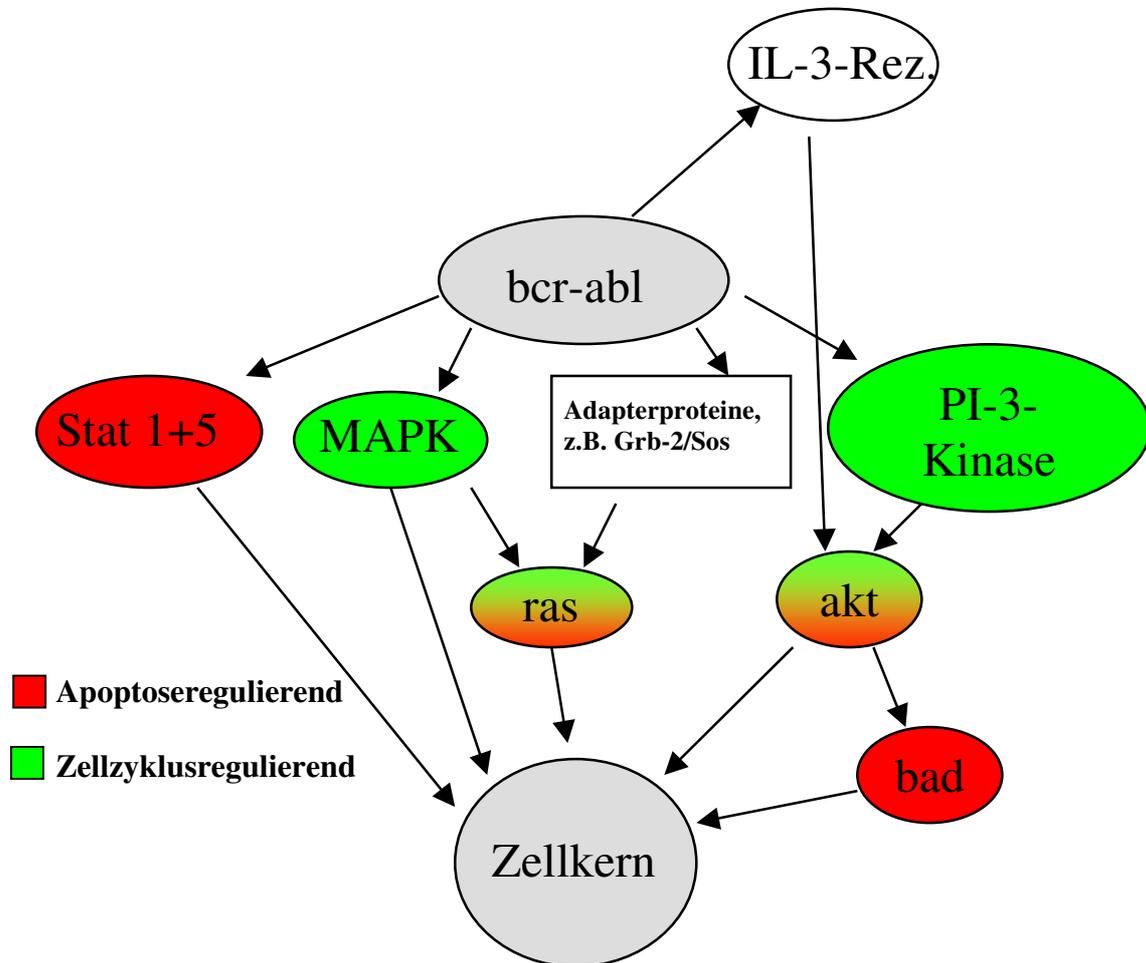


Abb. 4: Schematische, vereinfachte Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege des bcr-abl-Onkoproteins.

Partner von bcr-abl sind die Gene des ras-Signalweges und der MAPKinase-Familie: bcr-abl selbst und verschiedene seiner Adapterproteine, z.B. Grb-2/Sos³⁴ aktivieren diese Kaskade konstitutiv. Interessanterweise sind dafür aktivierende Mutationen nicht notwendig³⁵. Ras spielt auch eine wichtige Rolle für die Apoptose in der CML, indem es die Expression von bcl-2 reguliert

³⁶. Bcr-abl kann zudem an die β c-Untereinheit des IL-3-Rezeptors binden ³⁷, dieser Rezeptor ist für die Hämatopoese generell wichtig und kann bcr-abl-positiven Zellen eine partielle Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren sichern ³⁸.

Aus der Großfamilie der „Signal transducers and activators of transcription“ (STATS) spielen STAT 1 und besonders STAT 5 durch ihre anti-apoptotischen Effekte eine Rolle ^{39 40}.

Weiterhin erwähnenswert sind die Gene des PI3-Kinase-Weges ⁴¹. Ein wichtiger Partner der bcr-abl-Adapterproteine ist die Serin-Threoninkinase akt als nachgeschalteter Partner der PI3-Kinase ⁴². Akt ist in der Hämatopoese normalerweise in den Signalweg des IL-3-Rezeptors eingebunden (s.o.) ^{43 44}. Außerdem ist das pro-apoptotische bad ein Schlüsselsubstrat von akt. Phosphoryliertes bad ist inaktiv, denn phosphoryliert kann es nicht mehr an antiapoptotische Proteine binden ^{45 46}.

III d. Therapie und Prognose der CML

Die einzige, bisher gesichert kurative Therapie ist die allogene Stammzelltransplantation mit einer Heilungsrate von bis zu 70% ^{47 48 49}. Aufgrund ihrer hohen Systemtoxizität kommt diese allerdings nur für jüngere Patienten in Frage. Zum Zwecke der Reduktion dieser Toxizität wurden in den

letzten Jahren nicht-myeloablative Blutstammzelltransplantationsprotokolle entwickelt^{50 51}.

Außerdem werden als rein medikamentöse Therapien die Zytostatika Hydroxyurea oder Cytarabin verwendet. Diese kommen als Therapeutikum aber nur dann dauerhaft in Frage, wenn Kontraindikationen gegen die anderen Therapien bestehen. Über viele Jahre wurde als Standardtherapeutikum das Interferon- α ^{52 53} verwendet. Hierbei werden in immerhin 15 % der Fälle komplette zytogenetische Remissionen erreicht.

Seit kurzer Zeit steht nun der neue Tyrosinkinasehemmer Imatinib (Glivec®)^{54 55}⁵⁶ zur Verfügung, der seit 2003 als Standardtherapeutikum bei CML in chronischer Phase in Deutschland zugelassen ist. Imatinib stellt ein völlig neues Therapieprinzip dar, da es die Tyrosinkinaseaktivität des bcr-abl-Onkoproteins hemmt und so spezifisch in die maligne Signaltransduktion eingreift^{57 58 59}. Dies führt zu einer drastischen Wachstumsreduktion der malignen Zellen in vitro und in vivo. Die Einführung dieser neuen Substanz führte in kürzester Zeit zu einer Revolution der Therapie⁵⁴. In 85% der Fälle kommt es zu kompletten zytogenetischen Remissionen, das progressionsfreie Überleben beträgt nach 3 Jahren 95 % (vgl. 70% bei Interferon- α).

Hinzu kommt, dass Imatinib heute die Modellsubstanz für eine völlig neue Klasse von Therapeutika bei malignen Erkrankungen darstellt, die „small molecule inhibitors“, eine zur Zeit schnell wachsende Therapeutikafamilie. Ein anderer, neuer Vertreter dieser Klasse ist der Antagonist des epidermalen

Wachstumsfaktorrezeptors Elortinib (Tarceva®) ⁶⁰. Man hofft, dass diese „small molecule inhibitors“ - aufgrund ihrer spezifischen Wirkungsweise - verglichen mit konventionellen Zytostatika bei günstigerem Nebenwirkungsprofil deutlich wirksamer sein könnten.

Allerdings kommen aufgrund der immer breiteren Anwendung von Imatinib nun zunehmend neue Probleme zum Vorschein. Denn das in-vitro-Wachstum der malignen Zellen wird durch Imatinib zwar stark reduziert, aber nicht gänzlich aufgehalten ⁵⁷. Ähnlich sieht es mit den Verhältnissen in vivo aus, denn ein fehlender Nachweis von bcr-abl mRNA während der Therapie mit Imatinib kann zwar erreicht werden (sog. molekulare Remission), diese Erfolge sind allerdings nicht regelmäßig. So findet die minimale Resterkrankung (MRD, „minimal residual disease“), ein Begriff, der erst durch die moderne Molekularbiologie Bedeutung erreichte, heute zunehmend Aufmerksamkeit.

Eine zur MRD gängige Theorie ist, dass es sich hierbei um Residuen sehr früher, „ruhender“ Blutstammzellen handelt, die eine so geringe Proliferationsrate haben, dass Imatinib seine Toxizität nicht entfalten kann ^{61 62}. Ein weiteres therapeutisches Problem ist die Resistenzbildung des bcr-abl-Onkoproteins gegenüber Imatinib. Diese Resistenzursachen sind in jüngerer Zeit intensiv beforscht worden und einige Fälle erklären sich durch Mutationen des bcr-abl-Gens, die im Protein zu einer räumlichen Konformationsänderung des aktiven Zentrums der Tyrosinkinaseuntereinheit führen und Imatinib nicht wirksam werden lassen ^{63 64 65}. Andere Fälle erklären sich zum Beispiel über

Genamplifikationen des bcr-abl-Gens. Diese neuen Problematiken rechtfertigen die Frage nach neuen Agenzien, die in Mono- oder Kombinationstherapie mit Imatinib eingesetzt werden können. Dennoch hat sich Imatinib heute zur medikamentösen Standardtherapie der CML entwickelt.

Die mediane Überlebenszeit der CML beträgt im Allgemeinen 3,5 Jahre.

III.e Aktuelle Ergebnisse aus der Stammzellforschung im Kontext dieser Arbeit

Stammzellforschung sowohl an der benignen, als auch der malignen Hämatopoese ist ein Terrain reger Aktivität. Ein in den letzten Jahren als neues Forschungswerkzeug zur Genexpressionsanalyse etabliertes Verfahren ist die sogenannte cDNA-Array-Technik. Spezielles Ziel unserer Arbeitsgruppe ist die molekulare Charakterisierung normaler und maligner hämatopoetischer Stammzellen durch Genexpressionsanalysen. Hier wurden bereits eingehende Genexpressionsanalysen der gesunden CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen vorgenommen. So konnten Steidl et al. interessante Unterschiede in der Genexpression zwischen den knochenmarksständigen und den durch G-CSF mobilisierten Stammzellen zeigen ⁶⁶. Goolsby et al. konnten kürzlich an den hämatopoetischen Progenitorzellen der Maus die Expression neuraler Gene nachweisen ⁶⁷. Dies deckt sich mit ähnlichen genetischen Programmen hämatopoetischer und neuropoetischer Progenitoren, die von einer anderen

Arbeitsgruppe demonstriert werden konnten ⁶⁸. Zudem konnten Steidl et al. durch Verwendung von cDNA-Arrays, PCR und Immunfluoreszenz die Expression von Ionenkanälen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und hiermit assoziierten Genen auf RNA- und Proteinebene zeigen. Funktionelle Testreihen unserer Arbeitsgruppe bewiesen eine intakte intrazelluläre Weiterleitung des Rezeptorsignals für die Peptide CRH und Orexin ⁶⁹.

Blickt man nun wieder zurück zur CML und der Suche nach neuen therapeutischen Zielen, bieten sich die o.g. cDNA-Arrays an, um eine Suche nach pathophysiologisch möglicherweise relevanten Genen zu betreiben. Solche Analysen an CML-Zellen wurden in der Vergangenheit bereits durchgeführt, jedoch mit anderen Fragestellungen. So gab es eine Analyse, die an den mononukleären Zellen als Gesamtpopulation bei CML stattfand ⁷⁰. Dadurch, dass mononukleäre Zellen eine sehr heterogene Zellpopulation sind, gibt es hierbei aber wahrscheinlich Überstrahlungseffekte durch die verschiedenen Zellpopulationen, zumal die Anteile der einzelnen Zellen im Gemisch der MNC interindividuell hochvariabel sind. Ohmine et al. verwendeten angereicherte CD133⁺ Stammzellen. Ihre Intention lag jedoch vielmehr in der weiteren Aufklärung von molekularen Mechanismen der Krankheitsprogression ⁷¹. Wir entschlossen uns ebenfalls zur Verwendung von angereicherten hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für unsere Experimente. Allerdings verwendeten wir Zellen mit dem Oberflächenmarker CD34, eine nach wie vor sehr heterogene Zellpopulation, die allerdings

deutlich näher am leukämischen Ursprungsclon ist als die der mononukleären Zellen. Aus früheren Arbeiten, aber insbesondere einer neueren Arbeit lässt sich mutmaßen, dass auch die „leukämischen Stammzellen“ bei CML der Population der CD34⁺ Zellen entstammen ^{1 15}.

III.f Allgemeine Anmerkungen zu G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren handelt es sich um eine sehr große Proteinfamilie, die prinzipiell alle gleich aufgebaut sind: Es sind Proteine mit sieben Transmembran-Domänen und nachgeschalteten Proteinen. Diese nachgeschalteten Proteine geben ihnen den Namen: Es handelt sich um guanosinnukleotidbindende Proteine, die die Informationsverarbeitung von extra- nach intrazellulär übernehmen. Generell ist mittlerweile eine nur schwer überschaubare Anzahl an Rezeptoren bekannt. Man geht davon aus, dass über 1% des humanen Genoms und über 1000 Proteine zu dieser Großfamilie zu rechnen sind ⁷². Außerdem ist eine große Vielfalt an Liganden bekannt, die chemisch und funktionell nicht unterschiedlicher sein könnten. So gibt es Liganden auf Aminosäure-, Peptid-, Eikosanoid-, Cholin- und Purinbasis. Weiterhin gibt es von den Rezeptoren noch eine unterschiedlich große Zahl von Subtypen, die die Nomenklatur noch komplizierter machen – man kennt heute bereits 15 verschiedene Serotoninrezeptorsubtypen ⁷³. Trotz dieser Vielfalt ist der endgültige intrazelluläre Signalweg wiederum einfach, denn es

gibt primär nur zwei wichtige „second messenger“, das cAMP und Calcium. Deren Spiegel können, abhängig vom Signal des G-Proteins, steigen oder sinken, je nachdem, ob es sich um ein aktivierendes oder ein hemmendes G-Protein handelt. Neben den klassischen „second messengers“ werden in neuerer Zeit immer mehr Funktionen bekannt, die nicht auf diese zurückzuführen sind, sondern „im Nebenschluss“ Effekte bewirken (s.u.) ⁷⁴. So vielfältig wie die Rezeptoren sind auch Ihre Funktionen: G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind an der zentralnervösen Signalverarbeitung beteiligt, z.B. durch präsynaptische GABA-B-Rezeptoren ⁷⁵, die auch das Ziel verschiedener Antiepileptika wie Baclofen (Lioresal®) sind, oder α 2-Adrenozeptoren, die im ZNS bei der Regulation von Schlaf, Hunger und für andere vegetative Funktionen wichtig sind ⁷⁶. Im Herz-Kreislauf-System spielen wiederum die Adrenozeptoren, aber auch Adenosinrezeptoren eine wichtige Rolle ⁷⁷. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren regulieren gastrointestinale Funktionen, hierzu sei an das enteroendokrine System mit seinen verschiedenen Rezeptoren erinnert, die Abwehr und auch das Zellwachstum im physiologischen und pathologischen Fall.

III.g Ziele dieser Arbeit

Erstes Ziel war es, eine umfassende Genexpressionsanalyse von hochangereicherten CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

bei CML in chronischer Phase zu erstellen. Hierfür kamen cDNA-Arrays, quantitative „real-time“-RT-PCR und quantitative Immunfluoreszenz zum Einsatz. Desweiteren stand ein Vergleich dieser Profile mit solchen vom gesunden Pendant mit der Fragestellung an, welche Gene in der CML differentiell reguliert sind. Danach sollten funktionelle Untersuchungen dreier in der CML hochregulierter G-Protein-gekoppelter Oberflächenrezeptoren durchgeführt werden. Hierbei handelte es sich um den μ -Opioidrezeptor, den Adenosin-A1-Rezeptor und den GABA-B-Rezeptor. Durch die Verwendung von selektiven Agonisten und Antagonisten dieser Rezeptoren sollte die Bedeutung der Rezeptoren für das klonogene Wachstum von CML-Progenitorzellen untersucht werden.

IV. Material und Methoden

IV.a Universell eingesetzte Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Geräte		
Typ	Bezeichnung	Hersteller und Ort
Kühlschrank -20°C	Liebherr comfort®	Liebherr international®, Bulle, CH
Tiefkälteschrank -80°C	Heraeus Herafreeze HFU586 basic®	Heraeus®, Hanau, D
Eismaschine	Scotsman AF100®	Scotsman ice systems®, Mailand, I
Waage	Mettler PL200®	Mettler-Toledo®, Giessen, D
Tischzentrifuge	Heraeus Multifuge 1 S-R®	Heraeus®, Hanau, D
Mikrozentrifuge	Biofuge fresco®	Kendro laboratory products®, Langenselbold, D
Vortex	Vortexmixer neolab®	neolab®, Heidelberg, D
Kolbenhubpipetten für 1-10, 10-100 und 100-1000 µl	Eppendorf reference®	Eppendorf®, Hamburg, D
Elektrische Motorpipette	Accu-Jet®	Brand®, Wertheim, D
Sicherheitswerkbank	Gelaire BSB4A®	Gelaire Flow Laboratories®, Opera, I
Automatisches Zellzählgerät	MicroDiffII®	BeckmannCoulter®, Krefeld, D

Tab. 1: Typ, Bezeichnung, Hersteller und Ort der in dieser Arbeit verwendeten Groß- und Kleingeräte

Verbrauchsmaterial		
Typ	Bezeichnung	Hersteller und Ort
Schutzhandschuhe aus Latex	SafeSkin Satin plus®	Kimberley-Clark®, Zaventem, B
Schutzhandschuhe aus Nitrilkautschuk	Nitratex®	Ansell®, München, D
Pipettenspitzen, steril, gestopft, 10, 100, 1000 µl für Kolbenhubpipetten	Biozym Pipette®	Biozym®, Hessisch-Oldendorf, D
Pipettenspitzen, steril, RNase/DNAse-frei gestopft, 10, 100, 1000 µl für Kolbenhubpipetten	EpTips®	Eppendorf®, Hamburg, D
Pipettenspitzen, steril, gestopft, 5, 10, 25 ml für Motorpipetten	Costar stripette®	Corning Inc®, Corning, USA
Mikrolitergefäße, steril 500µl, 1,5, 2 ml	Safe-Lock-Tubes®	Eppendorf®, Hamburg, D
Polypropylengefäße steril 15, 30 und 50 ml	Falcon Tube®	Greiner bio-one®, Kremsmünster, AU
Insulinspritze steril, Luer-Konus, 1 ml	BD-PlastiPak®	BectonDickinson®, Heidelberg, D
Spritze, steril, Luer-Konus 2, 5, 10 ml	BD Discard-IT II®	BectonDickinson®, Heidelberg, D
Perfusorspritze, steril für bis zu 50 ml	OPS®	B.Braun®, Melsungen, D
Kanülen, steril, Luer-Konus 21Gx11/2	BD Lance®	BectonDickinson®, Heidelberg, D
Blutentnahmeröhrchen, EDTA-Zusatz, 4, 8 ml	BD Vacutainer®	BectonDickinson®, Heidelberg, D

Tab. 2: Typ, Bezeichnung, Hersteller und Ort des in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterials.

Chemikalien	
Bezeichnung und ggf. Name	Hersteller und Ort
Heparin (Liquemin N®)	Roche Pharma®, Grenzach, D
Humanes Serum-Albumin (Humalbin®)	Aventis-Behring®, Marburg, D
DMSO (CryoSure DMSO®)	WAK-Chemie®, Steinbach, D

Bezeichnung und ggf. Name	Hersteller und Ort
Tris	Amersham Pharmacia Biotech®, Uppsala, S
Borsäure	Sigma-Aldrich®, Seelze, D
EDTA	Sigma-Aldrich®, Seelze, D
PBS-Puffer (PBS-Dulbecco®)	Biochrom®, Berlin, D

Tab. 3: Bezeichnung, Hersteller und Ort der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

IV.b Untersuchungsmaterial

Zur Untersuchung diente frisch gewonnenes, mit EDTA ungerinnbar gemachtes Blut oder durch Punktion des Beckenkammes gewonnenes, mit Heparin ungerinnbar gemachtes Knochenmarkspirat von Patienten mit erstmalig diagnostizierter, unbehandelter, bcr-abl-positiver, chronischer myeloischer Leukämie in chronischer Phase (n=16). Der Altersmedian lag bei 47 Jahren (wichtige Charakteristiken siehe Tabelle 4). Außerdem verwendeten wir durch Punktion des Beckenkammes gewonnenes, ungerinnbar gemachtes Knochenmarkspirat von n=5 gesunden Probanden und zum Zwecke der allogenen Stammzelltransplantation durch Leukapherese gewonnene mononukleäre Zellen gesunder Probanden nach Stimulation mit G-CSF (n=3). Die Spender erhielten 12 µg G-CSF pro Kilogramm Körpergewicht für 4 bis 5 Tage. Die Zellen wurden mittels des Apheresesystems CobeSpectra® (Gambro BCT®, Planegg-Martinsried, Deutschland) gewonnen.

Nr.	Alter bei Diagnose	Leukozyten/ μ l	Thrombozyten/ μ l	Hb (g/dl)	BCR-ABL/G6PDH in %	Reinheit in %
Proben für Genexpressionsanalysen						
1	70	33000	725000	14,2	33,8	99,9
2	25	126000	200000	12,6	18,4	96,2
3	61	78000	620000	12,9	10,8	97,0
4	43	58000	557000	12,5	7,4	99,4
5	60	33000	1169000	13,2	22,0	94,0
Proben für 2-Farben-Fluoreszenz						
6	39	129000	261000	9,4	9,5	98,9
7	58	48000	491000	13,3	14,7	98,6
8	27	164000	842000	12,1	11,2	99,6
9	40	180000	476000	12,1	5,4	99,6
Proben für Koloniebildungstest						
12	41	180000	476000	12,1	5,4	n.d.
13	51	28000	362000	12,4	4,4	n.d.
14	54	206000	331000	10,1	25,8	n.d.
15	39	395000	344000	9,8	2,1	n.d.
16	52	116000	1013000	11,6	14,9	n.d.

Tab. 4: Charakteristiken und Laborparameter der Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme des Untersuchungsmaterials. Für die Zellkultur wurden MNC verwendet (s.u.)

IV.c Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient der Gewinnung der mononukleären Zellen (MNC) aus dem gewonnenen Knochenmark oder peripherem Blut. Wo notwendig, das heißt im Falle geplanter Zellkulturexperimente, wurden die Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Das Knochenmark oder Blut wurde mit PBS-Puffer 1:1 verdünnt und etwaige größere Rückstände durch einen sterilen Filter (Becton Dickinson®, Heidelberg, Deutschland) zurückgehalten. Aufbewahrungsgefäße zu 50 ml wurden mit 20 ml Lymphoprep® (AxisShield®, Oslo, Norwegen) befüllt. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial vorsichtig auf das Lymphoprep® aufgeschichtet und die verschlossenen Gefäße in einer Zentrifuge 30 Minuten lang bei 700 g zentrifugiert.

Nach Zentrifugation wurden die Gefäße der Zentrifuge entnommen, die Interphaseringe mit den MNC mittels einer Pasteurpipette abgenommen und diese in ein neues Gefäß überführt. Diese Suspension wurde mit PBS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und bei 700 g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 20 ml PBS-Puffer resuspendiert, diese Prozedur wurde wiederholt. Hiernach wurden die gewonnenen MNC in einem definierten, angemessenen Volumen resuspendiert und in einem automatischen Zellzählgerät gezählt.

Die gewonnenen MNCs wurden dann für weitergehende Untersuchungsschritte verwendet.

IV.d Immunmagnetische Anreicherung

Die immunmagnetische Anreicherung von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen diente dem Zwecke der Aufreinigung dieser Zellpopulation für diverse, weitergehende Experimente. Die Anreicherung erfolgte unter Verwendung des Direct CD34⁺ Progenitor Cell Isolation Kits® (Miltenyi Biotech®, Bergisch Gladbach, Deutschland). Alle nachfolgend genannten Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil dieses Kits bzw. erforderliches Zubehör. Die Anreicherung erfolgte gemäß Angaben des Herstellers. Das Selektionsprinzip basiert hierbei auf der Verwendung von monoklonalen Eisenkonjugatantikörpern gegen das CD34-Oberflächenantigen. Nach Inkubation werden die Zellen mit dem gebundenen Antikörper in einem starken Magnetfeld zurückgehalten.

Eine definierte Anzahl MNC wurde der o.g. Suspension entnommen und 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl pro 10⁸ Gesamtzellen MACS-Puffer mit 500 ml PBS-Puffer, 0,2 % humanem Serum-Albumin und 2 mM EDTA resuspendiert. Zusätzlich wurde der Suspension 100 µl pro 10⁸ Gesamtzellen „FcR-Blocking Reagent“ und 100 µl pro 10⁸ Gesamtzellen der CD34-MicroBeads®-Suspension (Klon

QBend10) hinzugefügt. Diese Suspension wurde dann für 30 Minuten bei Dunkelheit und 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Suspension mit 20 ml MACS-Puffer verdünnt und 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem gleichen Volumen, welches die Ausgangssuspension hatte, resuspendiert.

Zur immunmagnetischen Anreicherung wurden die Trennsäulen (MACS „MS Separation Columns“ für bis zu 2×10^8 Gesamtzellen und MACS „LS Separation Columns“ für bis zu 2×10^9 Gesamtzellen, Miltenyi Biotech®, Bergisch Gladbach, Deutschland) in ein Magnetfeld gebracht und mit 500 µl bzw. 3 ml MACS-Puffer äquibriert. Nach Durchlauf des Puffers wurde die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen und nach deren Durchlauf folgten drei Waschschriffe mit 500 µl bzw. 3 ml MACS-Puffer. Nach Abschluss der Waschschriffe wurde die Säule dem Magnetfeld entnommen und mit 1 ml bzw. 5 ml MACS-Puffer befüllt und unter Verwendung eines Stempels schnell und unter Druck in ein Gefäß entleert. Die Reinigung an der Säule wurde an der Positivfraktion mit einer neuen Säule nochmals wiederholt, die Negativfraktion wurde verworfen, wobei zur Entleerung der Säule nur das halbe Volumen an o.g. MACS-Puffer zum Einsatz kam.

Hiernach folgte die Zählung der Zellen der Positivfraktion in dem oben genannten, automatischen Zellzählgerät.

IV.e Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz⁶⁹

Die Durchflusszytometrie diente als 1-Farben-Fluoreszenz der Qualitätskontrolle der Anreicherung der CD34⁺ Zellen. Außerdem, unter Verwendung von 2-Farben-Fluoreszenz, diente sie der Quantifizierung der Proteinexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf selbigen Zellen.

Zur Qualitätskontrolle wurden jeweils 10^5 Zellen des Eluats in einem Gesamtvolumen von 50 μ l und zusätzlich 10 μ l einer FITC-gekoppelten Antikörperlösung in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Zur Verwendung kamen ein Isotypen-identischer Maus-IgG₁-Antikörper (Becton Dickinson®, Heidelberg, Deutschland) und ein monoklonaler Anti-CD34-Antikörper (Klon 8G12, Becton Dickinson®, Heidelberg, Deutschland).

Diese Suspension wurde 20 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Hiernach wurden die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen, 5 Minuten bei 700 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 μ l PBS-Puffer resuspendiert.

Anschließend erfolgte die Messung an einem Becton Dickinson® FACScan® mit einem 2 Watt Argonionenlaser und der CellQuest®-Software (Becton Dickinson®, Heidelberg, Deutschland).

Zur Messung der Proteinexpression wurden wiederum jeweils ca. 10^5 Zellen des Eluats in einem Gesamtvolumen von 50 μ l und zusätzlich 10 μ l einer Antikörperlösung in je ein FACS-Röhrchen pipettiert. Es handelte sich um

polyklonale Antikörper der Ziege, spezifisch für die Neuropeptidrezeptoren für CRH, sowie den κ - und μ -Opioid-Rezeptor und die beiden Orexin/Hypokretinrezeptorsubtypen 1 und 2. Zudem wurden Antikörper gegen Neurotransmitterrezeptoren verwendet, namentlich solche gegen den Adenosin A1- und A2B-Rezeptorsubtyp, den Serotonin-1F- und den GABA-B-Rezeptor (alle 9 Santa Cruz Biotech®, Heidelberg, Deutschland). Als Kontrolle diente polyklonales IgG der Ziege (Santa Cruz Biotech®, Heidelberg, Deutschland). Nach Inkubation über 20 Minuten bei 4°C und Dunkelheit wurden die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen, bei 700 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Einsatz kamen nun wiederum die bereits oben genannten FITC-Antikörper gegen IgG₁ als Isokontrolle und der Anti-CD34-FITC-Antikörper. Zur Messung der Reifungs-assoziierten Expression der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde, anstelle des CD34-Antikörpers, ein CD38-FITC-Antikörper (Klon HB-7, Becton Dickinson®, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde als Sekundärantikörper ein gegen IgG der Ziege gerichteter Antikörper vom Esel mit Kopplung an Rhodamin verwendet (Santa Cruz Biotech®, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden wiederum bei 4°C und Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewaschen und in 300 μ l PBS-Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am oben genannten Gerät. Gemessen wurde einerseits die prozentuale Positivität der CD34⁺ Zellen für die oben

genannten Rezeptoren und außerdem das durchschnittliche Expressionsniveau der einzelnen CD34⁺ Zelle.

Die prozentuale Positivität wurde wie folgt gemessen: Anhand der Isotypenkontrolle wurde die Empfindlichkeit für den entsprechenden Fluoreszenzkanal so eingestellt, dass alle Zellen der Isotypenkontrolle als Population mit niedriger Fluoreszenz erfasst werden konnten. Die am stärksten fluoreszierenden Zellen galten hierbei als untere Positivitätsgrenze. Alle Zellen, deren Fluoreszenz in den Ansätzen mit spezifischem Antikörper höher lag, wurden als positiv für das jeweilige Oberflächenantigen (CD34, CD38 oder Rezeptor) angesehen. Für das durchschnittliche Expressionsniveau aller Zellen ("Mean-Fluorescence-Intensity", MFI) wurde der Quotient aus MFI für den spezifischen Antikörper, geteilt durch die MFI der Isotypenkontrolle, gebildet.

IV.f Zellkultur: Koloniebildungstest

Nach Dichtegradientenzentrifugation und Waschen der Zellen an einer Sicherheitswerkbank wurde ein Aufbewahrungsgefäß mit Zellkulturmedium (RPMI-1640, Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland) und den MNCs befüllt. Volumen und Zellen wurden so bemessen, dass eine Zellzahl von 6×10^5 Zellen pro ml Medium vorlag und die vorbereitete Suspension für die Messreihe ausreichte.

In Kryotubes®, 5 ml (Greiner bio-one®, Kremsmünster, Österreich) wurden 2,5 ml Methocult SF^{BIT} H4436® (Stem Cell Technologies®, Vancouver, Kanada) mit folgenden Zytokinen vorgelegt: rh eisenbeladenes Transferrin, rh Insulin, rh c-kit-Ligand, rh G-CSF, rh GM-CSF, rh IL-3, rh IL-6, rh Epo. Zur Austestung der Beeinflussung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Adenosin A1-Rezeptor, Opioidrezeptor $\mu 1$ und GABA-B-Rezeptor wurden geeignete Agonisten und Antagonisten (siehe Tabelle 5) zum Medium hinzugegeben. Die Endkonzentrationen der Liganden betragen 10^{-5} M und 10^{-6} M. Für die Liganden des A1-Rezeptors wurde zudem eine Konzentration von 10^{-4} M verwendet. Als Kontrolle wurde je ein Ansatz mit Agonist und Antagonist in beiden Konzentrationen, einer mit einer entsprechenden Menge Wasser und für den Adenosin-A1-Rezeptor einer entsprechenden Menge DMSO geführt.

Nach gründlichem Mischen wurden 500 μ l der o.g. Zellsuspension zu der Methylzellulose hinzugefügt und nochmals gründlich vermischt. In Petrischalen mit 96 mm Durchmesser (Greiner bio-one®, Kremsmünster, Österreich) wurden drei kleinere Petrischalen mit 35 mm Durchmesser (Corning® Inc., Corning, USA) gestellt. Eine der kleinen Petrischalen wurde zur Schaffung eines feuchten Milieus mit PBS-Puffer befüllt, die anderen beiden mit je 1 ml der Methylzellulose-Zell-Liganden-Suspension. Der Rest hiervon wurde verworfen. Alle Ansätze wurden 14 Tage bei 37°C, Dunkelheit und 5 % Kohlendioxid in einem Zellkulturschrank (Heraeus BB16®, Heraeus®, Hanau, Deutschland) inkubiert.

Name	Stoff	Hersteller	Lösungs- mittel	Rezeptor	Agonist/ Antagonist
CCPA	2-Chloro-N6-Cyclopentyladenosin	Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland	DMSO	Adenosin A1	Agonist
DPCPX	1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin	Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland	DMSO	Adenosin A1	Antagonist
DAMGO	Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol	Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland	Wasser	Opioid- μ 1	Agonist
Naloxon/ Narcanti®	Naloxonhydrochlorid	DuPont-Pharma®, Bad Homburg, Deutschland	Wasser	Opioid- μ 1	Antagonist
SKF 97541	3-Aminopropyl(methyl)- phosphorsäure	Tocris-Cookson®, Ellisville, USA	Wasser	GABA-B	Agonist
CGP52432	3-(((3,4-Dichlorphenyl)methyl)amino)- propyl)diethoxymethyl)phosphorsäure	Tocris-Cookson®, Ellisville, USA	Wasser	GABA-B	Antagonist

Tab. 5: Name, chemische Bezeichnung, Hersteller, Lösungsmittel und Zielrezeptor der in Zellkultur verwendeten Liganden

Zur Auszählung wurde ein Inversmikroskop (Leica Diavert®, Leica®, Bensheim, Deutschland) mit 40-facher und 100-facher Vergrößerung verwendet. Hierbei wurden CFU-GM und BFU-E aufgrund der Koloniemorphologie unterschieden. Um das Verhältnis der Wachstumsbeeinflussung durch den jeweiligen Liganden auszudrücken, wurde der Mittelwert aus den beiden gleichen Ansätzen gebildet. Dieser wurde mit der jeweils geeigneten Kontrolle (Wasser oder DMSO) verglichen, der Einfluss des Liganden auf das Zellwachstum wurde in Prozent ausgedrückt.

Zur fotografischen Dokumentation diente eine am Inversmikroskop montierte, handelsübliche Spiegelreflexkamera (Nikon F 301®, Nikon®, Düsseldorf, Deutschland) und ein handelsüblicher Kleinbilddfilm 135 der Firma Agfa® (Köln, Deutschland).

IV.g RNA-Extraktion mit dem Stratagene®-Kit

Für die RNA-Extraktion wurde das STRATAPREP®TotalRNA Microprep Kit (Stratagene®, LaJolla, USA) verwendet. Alle nachfolgend genannten Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil dieses Kits. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die durch immunmagnetische Anreicherung gewonnenen Zellen wurden in ein Mikrolitergefäß überführt, zentrifugiert, der Überstand an Puffer wurde abpipettiert. In einem anderen Gefäß wurden je nach vorliegender Zellzahl pro 10^5 Zellen 100 µl Lysepuffer aus dem Kit mit 0,7 µl β-Mercaptoethanol aus dem Kit gemischt und zu dem Zellpellet hinzupipettiert. Dies wurde auf einem Vortex gründlich homogenisiert und entweder bei -80°C zwischengelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Das Zelllysat wurde dann zuerst mit gleicher Menge 70%igem Ethanol verdünnt und gründlich gemischt.

Eine Säule mit RNA-bindender Matrix wurde in ein 2 ml-Sammelgefäß gestellt und das Lysat aufgetragen. Hiernach wurde dieses in einer Mikrozentrifuge 60 Sekunden lang bei 10000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Die Säule wurde mit 600 µl „Low-salt-wash-buffer“ befüllt und wiederum in einer Mikrozentrifuge 60 Sekunden lang bei 10000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Zum Trocknen der Säulenmatrix wurde diese anschließend nochmals 120 Sekunden lang bei 10000 g zentrifugiert.

Um genomische DNA zu verdauen, wurde pro Ansatz ein Gemisch aus 5 µl RNase-freier DNAase und 25 µl Puffer („DNAse Digestion Buffer“) erstellt und auf die Säulenmatrix aufpipettiert, anschließend wurden die Säulen 15 Minuten lang bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Säulen dem Wasserbad entnommen und 500 µl „High-salt-wash-buffer“ aufgetragen, die Säulen wurden 60 Sekunden bei 10000 g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert und das Eluat verworfen. Gleiches wurde einmal mit 600 µl und einmal mit 300 µl „Low-salt-wash-buffer“ durchgeführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000 g über 120 Sekunden.

Die Säulen wurden dann auf 1,5 ml Sammelgefäße gesetzt, 30 µl Elutionspuffer wurden aufgetragen, dann wurde die Säule 60 Sekunden bei 10000 g zentrifugiert, dieser Schritt wurde wiederholt.

Die Ausbeute an RNA wurde photometrisch bestimmt. In einem Photometer (Biophotometer®, Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) wurden geeignete

Küvetten (UVette®, Eppendorf®, Hamburg, Deutschland) mit Trispuffer befüllt, der Messwert des Trispuffers wurde als Leerwert verwendet und dann die RNA in Trispuffer gegen den Leerwert gemessen. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert oder sofort revers transkribiert.

IV.h RNA-Extraktion mit dem Qiagen®-Kit

Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasy® Mini-Kit (Qiagen®, Hilden, Deutschland) verwendet. Alle nachfolgend genannten Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil dieses Kits. Die RNA-Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die durch immunmagnetische Anreicherung gewonnenen Zellen wurden in ein Gefäß verbracht, zentrifugiert, der Überstand an Puffer wurde abpipettiert. Den Zellen wurde, je nach Zellzahl, eine den Herstellerangaben entsprechende Menge RLT-Puffer, 1:100 versetzt mit β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland), hinzugefügt. Dies wurde auf einem Vortex gründlich homogenisiert und entweder bei -80°C zwischengelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Das Lysat wurde auf eine QiaShredder®-Säule aufgetragen, bei 10000 g 120 Sekunden zentrifugiert, das Eluat wurde gesammelt. Zum Eluat wurde eine dem Ausgangsvolumen entsprechende Menge 70%iges Ethanol gegeben und vermischt. Das Eluat-Ethanol-Gemisch wurde auf eine Rneasy-Spin®-

Säule aufgetragen und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Rneasy-Spin®-Säule aufgetragen und 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Hiernach wurde das Enzym für die DNase-Verdauung vorbereitet: Je Ansatz wurden 10 µl „DNase-Stock-Solution“ mit 70 µl RDD-Puffer gemischt. Je 80 µl des entstehenden DNase-Mix wurden auf die Säulenmembran aufpipettiert. Die Säulen wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben, 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Die Spin-Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gesetzt und 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule aufgetragen, 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. 500 µl RPE-Puffer wurden nochmals auf die Säule aufgetragen und 2 Minuten bei 10000 g zentrifugiert, das Eluat wurde wiederum verworfen. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10000 g zum Trocknen der Säulenmatrix über eine Minute. Die Spin-Säule wurde auf ein 1,5 ml fassendes Sammelgefäß gesetzt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation über eine Minute eluiert.

Die Ausbeute an RNA wurde, wie oben erklärt, photometrisch bestimmt. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert oder sofort revers transkribiert.

IV.i Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für cDNA-Arrays, Hybridisierung und statistische Auswertung ⁶⁶

Die Hybridisierung der cDNA-Arrays wurde in einem "Core-Laboratorium" für cDNA-Arrays durch Frau Bärbel Junge und Herrn Dr. med. Ulrich Steidl durchgeführt, die bioinformatische Auswertung durch Herrn Dipl.-Math. Slawomir Kliszewski.

Nach RNA-Extraktion wurden die Proben in 2 ml RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Hybridisierung wurden Atlas human 1.2 I Arrays (BD Biosciences Clontech®, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die RNA wurde gemäß eines modifizierten Protokolls des Herstellers unter Verwendung eines Gen-spezifischen Primergemisches (CDS Primer Mix®) revers transkribiert und mit ³²P radioaktiv markiert. Verwendet wurden 35 mCi (1,295 MBq) des α -³²P-dATP und 1,5 ml CDS-Primergemisch anstelle 1 ml zur Erhöhung der Sensitivität. Das Primergemisch wurde vom Hersteller bezogen und enthielt spezifische Primer für Atlas human 1.2 I Arrays, damit nur die cDNA der Gene, die auch auf dem Array waren, synthetisiert wurde. Durch Säulenchromatographie wurde, um die markierte cDNA aufzureinigen, ungebundenes α -³²P-dATP entfernt.

Die Proben wurden durch 0,1 M Natronlauge über 20 Minuten bei 68°C denaturiert und dann mit 0,5 M Natriumdiphosphorsäure neutralisiert. Um unspezifische cDNA-Bindung zu verhindern, wurde humane C0t-1-cDNA (Qiagen®, Hilden, Deutschland) hinzugefügt. Desweiteren wurden die cDNA-

Arrays über 30 Minuten mit 0,5 mg Lachssperma-DNA (BD Clontech®, Heidelberg, Deutschland) prähybridisiert, um unspezifische DNA-Bindung an die Nylonmembran zu reduzieren. Die radioaktiv markierten cDNA-Proben wurden mit den Nylon cDNA-Arrays bei 68°C und konstanter Rotation in einem Hybridisierungsöfen (ThermoHybaid®, Heidelberg, Deutschland) über 20 Stunden hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Arrays nach Herstellerangabe unter hochstringenten Waschbedingungen gewaschen.

Die gewaschenen Arrays wurden in Plastikfolie eingeschlagen und für 24 bis 96 Stunden auf „Phosphorimager-Platten“ (FujiFilm®, Düsseldorf, Deutschland) gelegt, abhängig von der Menge an Radioaktivität in der Probe. Erfolgreiche Hybridisierungen gelangen bei Einsatz von wenigstens 600 ng Gesamt-RNA.

Hiernach wurden die Platten mit einem „Phosphorimager“ (Fuji FLA-3000®, FujiFilm®, Düsseldorf, Deutschland) gescannt und mit der BAS-Reader-Software in der Version 3.01 (Raytest®, Straubenhard, Deutschland) ausgewertet. Die Intensitäten der einzelnen Punkte wurden mit der AIDA Image Analyzer Software (Raytest®, Straubenhard, Deutschland) gemessen. Nach Subtraktion der Hintergrundstrahlung wurde die mediane Intensität der 20% der am stärksten exprimierten Gene berechnet. Die Rohdaten wurden dann anhand dieser medianen Intensität normalisiert und die Expressionsrate als Verhältnis Punktintensität/mediane Intensität ausgedrückt. Um die Proben der CML-Patienten mit denen der gesunden Spender zu vergleichen, wurden die Mediane für die Gruppe der CML-Patienten und der gesunden Spender

pro Gen berechnet und durcheinander dividiert, um das Verhältnis CML/Gesund zu erhalten. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney'sche u-Test verwendet. Ein Signifikanzniveau von 99% ($p < 0,01$) wurde als signifikant differentielle Genexpression angesehen. Zur hierarchischen Clusteranalyse wurde die „hclust“-Funktion der Statistik-Software „R“ verwendet. Diese ist Teil des Bioconductor Projekts (<http://www.bioconductor.org>) und basiert auf einem „average linkage clustering“-Algorithmus.

IV.j Reverse Transkription (cDNA-Synthese) für PCR ⁷⁸

Zuerst wurde eine Stammlösung für die cDNA-Synthese erstellt, hierzu wurden pro Ansatz gemischt: 9,3 µl RNase-freies Wasser, 9,5 µl M-MLV-Puffer (Gibco BRL/Invitrogen®, Karlsruhe, Deutschland), 1,9 µl eines 25 mM Desoxyribonukleosidtriphosphat-Gemisches (Amersham Biosciences®, Freiburg, Deutschland), 1,0 µl eines Primergemisches aus zufällig synthetisierten Hexameren (5 mg/ml), (Amersham Biosciences®, Freiburg, Deutschland) und 0,475 µl einer 0,1 mM Lösung Gibco DTT (Gibco BRL/Invitrogen®, Karlsruhe, Deutschland). Pro zu fertigendem Ansatz wurden dann 19 µl der Stammlösung entnommen und in ein neues Gefäß überführt.

Je 19 µl der RNA-Lösung wurden in ein 0,5 ml fassendes Reaktionsgefäß überführt, 5 Minuten bei 65°C inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit sofort 7 Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde je Reaktionsansatz der

Reaktionslösung 260 U M-MLV reverse Transkriptase (Gibco BRL/Invitrogen®, Karlsruhe, Deutschland) und 25 U rekombinanter RNase-Inhibitor (RNAsin®, Promega®, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt, sodass sich pro Reaktionsansatz ein Gesamtvolumen des Stamm-Reaktionsgemisches von 21 µl ergab. Nach Ablauf der Abkühlungszeit wurden dann die 21 µl des Reaktionsgemisches zu den 19 µl RNA-Lösung hinzugefügt und 2 Stunden bei 37°C und danach 10 Minuten bei 65°C inkubiert, dem Inkubator entnommen und die fertige cDNA bei -20°C gelagert.

IV.k RT-PCR mit der LightCycler®-SYBR-Green®-Technik ⁷⁹

Die quantitative „real-time“-RT-PCR erfolgte unter Verwendung des Fast Start DNA Master SYBRGreen® 1 Kits der Firma Roche Diagnostics® (Mannheim, Deutschland). Alle nachfolgend genannten Komponenten, sofern nicht anderweitig aufgeführt, waren Bestandteil dieses Kits bzw. erforderliches Zubehör.

Zuerst wurde eine Stammlösung für jedes einzelne zu untersuchende Gen erstellt. Pro Reaktionsansatz wurden in diesem „Master-Mix“ 11,6 µl PCR-geeignetes Wasser, 2,4 µl einer Magnesiumchlorid-Lösung mit einer 4 mM Gesamtkonzentration, jeweils 1 µl beider Primerlösungen (TIBMolBiol®, Berlin, Deutschland) mit einer 10 µM Gesamtkonzentration und 2,0 µl des „SYBR-Green-Reaction-Mix“, hergestellt nach Herstellerangabe, miteinander

vermischt. Die Stammlösung wurde unter Lichtschutz und auf Eis gehalten. Die Primer wurden mit Hilfe der LightCycler Probe Design®-Software, Version 1.0, (Roche applied science®, Mannheim, Deutschland) ausgewählt. Daten zu den Primern siehe Tabelle 6.

Hiernach wurden die Reaktionsgefäße vorbereitet (LightCycler Capillaries®, Roche Diagnostics®, Mannheim, Deutschland): In einem Kühlblock/Zentrifugenadapter (LightCycler Sample Adapter®, Roche applied science®, Mannheim, Deutschland) wurden 2 Reaktionsgefäße pro zu untersuchendem Gen bereitgestellt und in jedes 18 µl des oben genannten Reaktionsansatzes pipettiert. Hierzu kamen 2 µl der vorbereiteten cDNA-Lösung, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Als Kontrolle wurden je zwei Ansätze mit Wasser und einer RNA-Probe mitgeführt.

Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert, dem LightCycler Sample Adapter® entnommen, in das LightCycler Sample Carousel® (Roche applied science®, Mannheim, Deutschland) gestellt und mit den bereitgestellten Stopfen verschlossen. Das LightCycler Sample Carousel® wurde in den LightCycler® (Roche applied science®, Mannheim, Deutschland) gestellt und das PCR-Programm gestartet. Das PCR-Programms lief folgendermaßen ab: 8 Minuten Präinkubation bei 95°C, die Amplifikationsphase mit 5 Sekunden Primerbindung bei variabler Temperatur (s.u.), 15 Sekunden Synthese bei 72°C und Denaturieren der DNA bei 95°C über 15 Sekunden für insgesamt 45

Zyklen. Anschließend folgte die Schmelzkurvenanalyse durch langsames Aufheizen bis 97°C und hiernach Abkühlen auf 40°C.

Die Zunahme der SYBR-Green-Fluoreszenz (entspricht der zu gegebenem Zeitpunkt in der Probe vorhandenen Menge doppelsträngiger DNA) wurde mit der LightCycler 3.5-Software® (Roche applied science®, Mannheim, Deutschland) als „crossing point“ (CP) gemessen. Der „crossing point“ ist der Zyklus in der PCR, in dem die 2. Ableitung der Reaktionskurve ihr Maximum erreicht. Durch Subtraktion der CP-Werte (Δ CP) zwischen Prüfgem und einem Referenzgem, als solches diente die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH), erhält man den Δ CP-Wert. Durch Subtraktion der Δ CP-Werte von Gesund und Krank erhält man die Expressionsdifferenz, welche, um den Bedingungen der PCR gerecht zu werden, als Exponent für die Basis 1,9 verwendet wird. Das Ergebnis dieser Berechnung ist das relative Expressionsverhältnis Gesund/Krank.

Weiterhin wurde mit o.g. Software die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Bei Etablierung einer neuen PCR wurde die Spezifität des entstandenen PCR-Produkts nachfolgend durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden die Reaktionsgefäße geöffnet und mit der Öffnung nach unten in eine Mikrozentrifuge gestellt. Die Lösung wurde durch kurze Zentrifugation in einem Mikrolitergefäß aufgefangen. Die PCR-Produkte wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert. Konnte hierbei ein spezifisches Produkt nachgewiesen werden, so wurde in weiteren Versuchen

bei gleichen Bedingungen ein gleiches Aussehen der Schmelzkurve als hinreichender Beweis für ein spezifisches PCR-Produkt angesehen.

Genname	Abkürzung	Primer-Sequenzen	Bindungs- temperatur bei der PCR	Amplikon- Größe
Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	GAPDH	5'-TCCATGACAACCTTTGGTATCG-3' 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGA-3'	variabel	376 bp
Junction Plakoglobin	JUP	5'-GTCAAGGCAACCATC-3' 5'-CTCCTCCATCCTCACA-3'	63°C	183 bp
Tripeptidyl-Peptidase	CLN 2	5'-TTCATACCAGGAGGAAGC-3' 5'-CCTTGGGTTTGAGAAAGC-3'	62°C	262 bp
Defender against cell death 1	DAD 1	5'-TAGCGGTTTGCCTGAG-3' 5'-GTTGTTCTGACACACAGT-3'	62°C	325 bp
c-SKI Protoonkogen	SKI	5'-CTTCCAATAAGAGCCTG-3' 5'-ATGAGGTAAAGGACGG-3'	60°C	435 bp
14-3-3-beta-Protein	YWHAB	5'-GACAACAAACAAACCAC-3' 5'-GTCCCTAAGTAACTGC-3'	58°C	264 bp

Tab. 6: Genname, Abkürzung und wichtige Eigenschaften der für die einzelnen Gene verwendeten Primer

IV.1 TaqMan®-RT-PCR mit der ABI PRISM 7900®-Technik

Zur ABI PRISM®-PCR wurde als Reaktionsgefäß ein MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate® (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden in jedem einzelnen Reaktionsansatz 12,5 µl 2xTaqMan® Universal PCR

Master Mix (Applera®, Darmstadt, Deutschland), 1,25 µl Assay-on-demand Gene Expression Product (Applera®, Darmstadt, Deutschland) und 11,25 µl einer cDNA-Lösung miteinander gemischt, sodass ein Gesamtvolumen von 25 µl in jedem Reaktionsansatz entstand. Zur PCR wurde ein ABI PRISM 7900HT Sequence Detector® (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die PCR beinhaltete zuerst einen 120 Sekunden dauernden AmpErase UNG-Aktivierungsschritt bei 50°C, anschließend eine 10 Minuten dauernde Präinkubation bei 95°C, nachfolgend 40 Zyklen mit DNA-Denaturierung bei 95°C über 15 Sekunden und Primerbindung / DNA-Synthese bei 60°C über 60 Sekunden.

Die Fluoreszenzzunahme wurde mit der ABI PRISM®-Enterprise Software 2.2.1 (Applied Biosystems®, Darmstadt, Deutschland) als C_T oder auch „threshold cycle“ gemessen. Der „threshold cycle“ ist der PCR-Zyklus im PCR-Verlauf, an dem es zum statistisch signifikanten Fluoreszenzanstieg kommt. Die relative Expressionsstärke wurde ausgedrückt als Differenz der C_T -Werte (ΔC_T) zwischen dem Prüfgemisch und einem Referenzgemisch. Als Referenzgemisch diente die Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase. Zur Berechnung siehe vorhergehender Abschnitt.

Verwendet wurden die folgenden Assay-on-demand Gene Expression Products®: GAPDH (Hs99999905_m1), Proteasome subunit α -Type 3 (PSMA3) (Hs00160558_m1), und splicing factor 1 (SF162) (Hs00190309_m1), alle Applera®, Darmstadt, Deutschland.

IV.m Agarosegelelektrophorese

In einem Gefäß wurden 1,25 g Agarose (Gibco BRL/Invitrogen®, Karlsruhe, Deutschland) mit 100 ml TBE-Puffer, enthaltend 0,1 M Trispuffer, 0,1 M Borsäure, 2,5 mM EDTA in destilliertem Wasser gemischt und in einer handelsüblichen Mikrowelle (Moulinex-Samou®, Radolfzell, Deutschland) bis zum Siedepunkt erhitzt und so lange gerührt, bis sich eine homogene Lösung ergab. Dieses Gemisch wurde vorsichtig und ohne Blasenbildung in eine Elektrophoresekammer (EasyCast®, Owl Separation Systems®, Portsmouth, USA) gegossen, anschließend wurde bis zur Aushärtung abgewartet. Durch Platzhalter entstanden im Gel Taschen zur Aufnahme der Nukleinsäurelösungen. Nach Aushärtung wurde die Agarosegelkammer mit TBE-Puffer aufgefüllt.

Die Nukleinsäurelösung wurde im Verhältnis 1:5 mit einem Ladepuffer (Promega®, Madison, USA) vermischt und in die Taschen pipettiert. Zum Größenvergleich diente ein externer Größenstandard im Bereich 100 – 1000 Basenpaare mit Abständen von je 100 Basenpaaren (Smart Ladder SF®, Eurogentech®, Seraing, Belgien). Die Gele wurden wie folgt befüllt: Eine Tasche mit dem Größenstandard, zwei mit amplifizierten cDNA-Patientenproben, eine mit RNA- und eine mit Wasserkontrolle.

Nach Befüllung der Geltaschen wurde die Kammer an einen Stromkreis angeschlossen (135 V, 400 mA)(Power-Pac 300®, Bio-Rad Laboratories®,

München, Deutschland) und für ca. 90 Minuten im elektrischen Feld gehalten. Hiernach wurde das Agarosegel unter Ergreifen geeigneter Sicherheitsmaßnahmen in eine 1-prozentige Ethidiumbromidlösung (Sigma-Aldrich®, Seelze, Deutschland) gelegt. Zur Dokumentation diente ein Agarosegeldokumentationssystem (Gel Doc 200®, Bio-Rad Laboratories®, München, Deutschland). Hiermit wurde das Gel betrachtet, fotografiert und dokumentiert. Hierzu diente die mit dem System zu verwendende Software QuantityOne® (Bio-Rad Laboratories®, München, Deutschland) in der Version 4.0.3.

IV.n Erstellung, Darstellung, statistische Auswertung

Zur Erstellung dieser Arbeit, der enthaltenen Abbildungen, Tabellen, etc. wurde, neben der bereits oben genannten Software, die Office 2000®-Software mit den Programmen Word 2000®, Excel 2000® und PowerPoint 2000® (Microsoft®, Unterschleißheim, Deutschland) und den darin enthaltenen Funktionen zur Erstellung von Text, Tabellen, Abbildungen und mathematischen Berechnung verwendet.

Die Bildbearbeitung erfolgte z.T. mit dem Programm PicturePublisher 8.0 (Micrografx®, Unterschleißheim, Deutschland), die Bearbeitung der FACS-Datenplots mit dem Freeware-Programm WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA).

Sofern nicht anders angemerkt, wurde zur statistischen Signifikanzanalyse, wo sinnvoll, der t-Test nach Student verwendet. Je nach Verwendungszweck wurde dieser in der Variante für ungepaarte bzw. gepaarte Stichproben verwendet. Ein Signifikanzniveau von 95% ($p < 0,05$) wurde hierbei als signifikant angesehen.

V. Ergebnisse

V.a Genexpressionsprofil maligner CD34⁺ Zellen bei CML

Mit den verwendeten cDNA-Arrays war es möglich, 1185 ausgewählte Gene auf ihre Expressionsstärke hin zu untersuchen. Zur Untersuchung kamen 5 hochangereicherte Proben von CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit CML in chronischer Phase. Zum Vergleich dienten Daten, die an Zellen gleichen Typs von 10 gesunden Spendern erhoben worden waren.

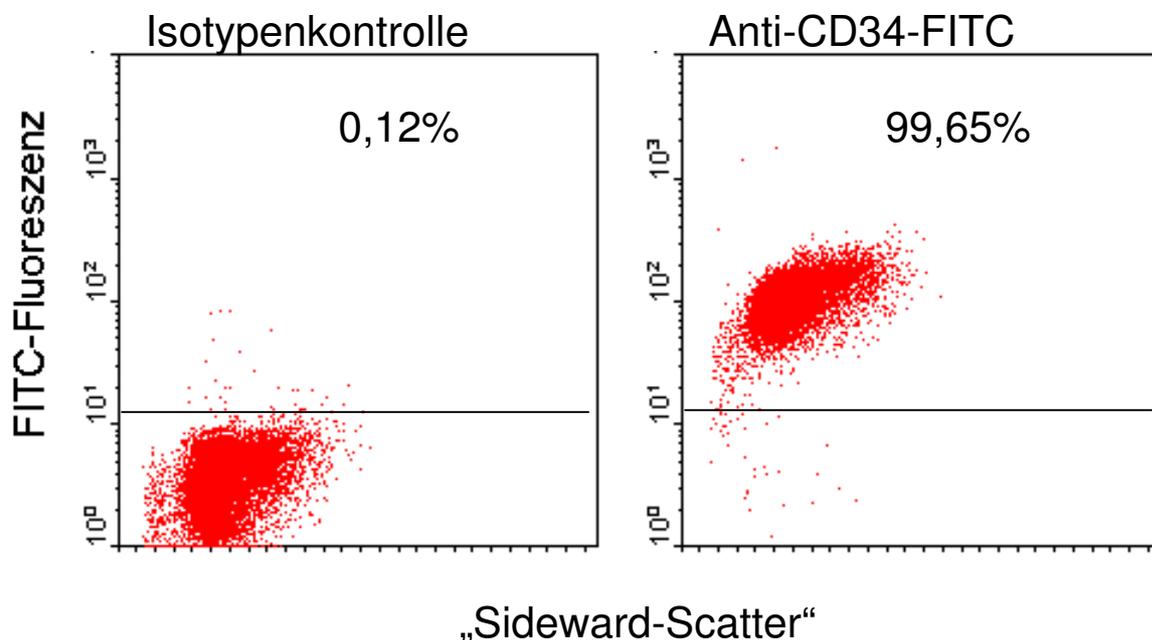


Abb. 5: Qualitätskontrolle der immunmagnetischen Anreicherung durch Durchflusszytometrie. Als Antikörper wurden ein isotypenspezifischer FITC- und ein Anti-CD34-FITC-Antikörper verwendet. Eine Linie markiert die Positivitätsgrenze. Prozentualer Anteil CD34⁺ Zellen ist angegeben. Gezeigt wird eine repräsentative Probe.

Die Reinheit der CD34⁺ Zellen betrug nach Selektion zwischen 94,0 und 99,9 % (Abb. 5 und Tab. 4).

Insgesamt waren 158 Gene verschiedener funktioneller Gruppen signifikant differentiell exprimiert ($p < 0,01$). 58 Gene waren hoch- und 100 Gene herunterreguliert. Abb. 6 gibt eine Übersicht der 158 signifikant differentiell exprimierten Gene, die kompletten Expressionsdaten können auf der Homepage des Oncogene-Magazins eingesehen werden (<http://www.nature.com/onc/journal/v24/n34/supinfo/1208596s1.html>).

Verschiedene Gene, die bcr-abl nachgeschaltet sind, waren hochreguliert. Zum Beispiel waren Gene der ras-Familie und JAK2 2- bis 7-fach überexprimiert. Hingegen war akt aus dem PI3-Kinase-Weg herunterreguliert (2,4-fach). Die in der Einleitung angesprochenen, grundsätzlichen Mechanismen der malignen Transformation der leukämischen Vorläuferzelle bei der CML lassen sich an den Genexpressionsdaten gut nachvollziehen. So zeigt sich eine 1,4- bis 10-fache Hochregulation von verschiedenen Genen, die den Zellzyklus induzieren, wie beispielsweise Prefoldin 4, diverse Zykline und zyklin-abhängige Kinase 4, „cell division cycle 25C“, interferon-induzierbare, RNA-abhängige Proteinkinase und 14-3-3-beta-Protein. Andererseits wurden auch zellzyklusinhibierende Gene hochreguliert, wie die zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren 1A und 2D, die in der CML 2- bis 3-fach überexprimiert sind.

GeneBank	Gene symbol	Gene name	Med.	Ratio										Med.	p					
				CML1	CML2	CML3	CML4	CML5	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5			HD6	HD7	HD8	HD9	HD10
adhesion																				
X07979	ITGB1	integrin, beta 1 (CD29)	0.38														3.12		0.12	0.002
L12002	ITGA4	integrin, alpha 4 (CD49D)	0.78														2.83		0.28	0.005
J04536	SPN	sialophorin (CD43)	0.68														0.58		1.17	0.005
J02703	ITGB3	integrin, beta 3 (CD61)	0.07														0.23		0.30	0.01
J03132	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	0.08														0.37		0.21	0.002
M23410	JUP	junction plakoglobin	0.14														0.45		0.30	0.011
apoptosis																				
D15057	DAD1	defender against cell death 1	2.60														2.64		0.99	0.005
X76104	DAPK1	death-associated protein kinase 1	0.17														0.56		0.30	0.002
U13021	CASP2	caspase 2	0.15														0.43		0.34	0.002
BCR-ABL signaling																				
M54968	KRAS2	K-RAS	0.90														6.67		0.13	0.002
M28215	RAB5A	RAS-related protein RAB5A	0.72														6.12		0.12	0.002
AF005216	JAK2	Janus kinase 2	0.61														4.28		0.14	0.002
M28213	RAB2	RAS-related protein RAB2	0.67														3.10		0.22	0.002
M28212	RAB6	RAS-related protein RAB6A	0.15														2.44		0.06	0.005
X02751	NRAS	N-RAS	0.39														2.34		0.17	0.002
M63167	AKT1	AKT1	0.16														0.41		0.39	0.002
X93499	RAB7	RAS-related protein RAB-7	0.12														0.28		0.42	0.003
cell cycle																				
U41816	PFND4	prefoldin 4	1.69														10.07		0.17	0.002
M35663	PRKR	interferon-inducible protein kinase	0.75														4.68		0.16	0.002
U40705	TERF1	telomeric repeat binding factor 1	0.53														4.27		0.12	0.002
U47413	CCNG1	cyclin G1	0.16														3.63		0.04	0.008
M25753	CCNB1	cyclin B1	0.49														3.04		0.16	0.007
X06745	POLA	polymerase (DNA directed), alpha	0.30														2.73		0.11	0.005
X57347	YWHAH	14-3-3 protein beta	1.27														2.56		0.50	0.002
M34065	CDC25C	cell division cycle 25C	0.60														2.26		0.27	0.01
U11791	CCNH	cyclin H	0.47														1.98		0.24	0.004
X51688	CCNA2	cyclin A2	0.24														1.89		0.12	0.008
M14505	CDK4	cyclin-dependent kinase 4	0.33														1.37		0.24	0.003
U09579	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	0.06														0.45		0.13	0.008
U40343	CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	0.09														0.29		0.29	0.002
detoxification, DNA repair																				
M13194	ERCC1	DNA excision repair protein ERCC1	0.41														0.60		0.68	0.002
L20046	ERCC5	DNA excision repair protein ERCC5	0.21														0.58		0.36	0.003
M31899	ERCC3	DNA excision repair protein ERCC3	0.25														0.52		0.28	0.002
M36067	LIG1	DNA ligase I	0.15														0.50		0.50	0.002
X15722	GSR	glutathione reductase	0.09														0.48		0.19	0.002
M13267	SOD1	cytosolic superoxide dismutase 1	0.18														0.42		0.44	0.004
Y00433	GPX1	glutathione peroxidase 1	0.14														0.33		0.42	0.002
X15480	GSTP1	glutathione S-transferase pi	1.95														0.29		5.37	0.002
J03746	MGST1	microsomal glutathione S-transferase	0.53														0.28		1.87	0.002
U07418	MLH1	mutL (E. coli) homolog 1	0.87														0.23		3.80	0.002
D21235	RAD23A	RAD23A	0.19														0.36		0.53	0.002
growth factors, receptors																				
U10117	SCYE1	small inducible cytokine subfamily E1	0.79														3.55		0.22	0.002
M57627	IL10	interleukin 10	0.16														0.50		0.32	0.002
D10924	CXCR4	CXC chemokine receptor 4	0.30														0.45		0.68	0.005
X06374	PDGFA	platelet-derived growth factor alpha	0.06														0.40		0.14	0.003
M73482	NMBR	neuromedin B receptor	0.18														0.43		0.42	0.002
M59818	CSF3R	G-CSF receptor	0.42														0.30		1.42	0.002
M37435	CSF1	M-CSF	0.32														0.40		0.81	0.01
neurobiological genes																				
X91788	CLNS1A	chloride channel 1A	0.59														6.72		0.09	0.002
X53655	NTF3	neurotrophin 3	2.76														0.53		5.16	0.01
S56143	ADORA1	adenosine A1 receptor	0.12														2.76		0.04	0.140
L25119	OPRM1	opioid receptor, mu 1	0.25														4.36		0.06	0.002
oncogenes, tumor suppressors																				
X15218	SKI	C-SKI	0.32														9.20		0.04	0.003
V00568	MYC	C-MYC	15.70														1.83		8.57	0.086
U11732	ETV6	ETS variant gene 6 (TEL oncogene)	0.24														0.47		0.51	0.002
K00650	FOS	C-FOS	0.13														0.40		0.33	0.003
X56681	JUND	JUN-D	0.09														0.40		0.23	0.004
L16785	NME2	non-metastatic cells 2 protein	0.77														0.35		2.24	0.002
X13293	MYBL2	MYB-related protein B	0.04														0.16		0.24	0.002
proteases, inhibitors																				
D00759	PSMA1	proteasome subunit alpha 1	0.37														4.47		0.08	0.005
D00761	PSMB1	proteasome subunit beta 1	0.58														2.59		0.22	0.003
D00762	PSMA3	proteasome subunit alpha 3	0.59														2.49		0.24	0.002
D68376	PSMF1	proteasome inhibitor subunit 1	0.24														0.71		0.33	0.01
X87212	CTSC	cathepsin C	0.19														0.54		0.34	0.005
M11233	CTSD	cathepsin D	0.17														0.42		0.42	0.003
AF017456	CLN2	tripeptidyl-peptidase 1	0.04														0.22		0.17	0.002
M29142	PRTN3	proteinase 3	0.04														0.06		0.71	0.002
transcription																				
D26120	ZNF162	zinc finger protein 162	0.55														6.68		0.08	0.002
U12979	PC4	positive cofactor 4	4.73														3.33		1.42	0.002
U22431	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1 alpha	0.32														2.48		0.13	0.002
M28372	ZNF9	zinc finger protein 9	1.41														2.29		0.62	0.003
L04282	ZNF148	zinc finger protein 148	0.53														1.86		0.29	0.005
M66891	GATA2	GATA-binding protein 2	2.27														1.84		1.24	0.027
U34070	CEBPA	CEBP ALPHA	0.07														1.11		0.07	0.452
M21535	ERG	transcriptional regulator ERG	0.16														0.59		0.26	0.008
X55122	GATA3	GATA-binding protein 3	0.07														0.58		0.12	0.157
X14454	IRF1	interferon regulatory factor 1	0.11														0.47		0.23	0.002
M96577	E2F1	E2F transcription factor 1	0.07														0.46		0.15	0.002
D28466	DBP	DNA-binding protein TAXREB302	0.13														0.33		0.40	0.002
M92843	ZFP36	homologous to Zfp-36 in mouse	0.06														0.25		0.24	0.002
M62831	ETR101	immediate early protein	0.20														0.23		0.88	0.004
M81750	MNDA	myeloid cell nuclear different. antigen	0.06														0.08		0.72	0.002



Abb. 6: Darstellung differentiell exprimierter Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen. 5 Proben von Patienten mit CML (1-5) und 10 Proben von gesunden Probanden (HD 1-10) werden hier gezeigt. Die relative Expressionsstärke ist farbkodiert. Die Mediane der relativen Expressionsstärke der CML- und der Gesundenproben, deren Verhältnis (CML/gesund) und der p -Wert des u-Tests werden mit angegeben. Die Bezeichnung der Gene folgt der HUGO-Nomenklatur⁸⁰.

Schaut man auf die Adhäsionsmoleküle, findet sich eine 3-fache Überexpression der beiden Untereinheiten des VLA-4, während die β 3-Integrinuntereinheit, das „intercellular adhesion molecule 1“, Sialophorin und „Junction Plakoglobin“ 1,7- bis 4,3-fach herabreguliert waren.

Aus der Gruppe der apoptoseinhibierenden Gene war das Gen „defender against cell death 1“ 2,6-fach hochreguliert.

Gegenwärtig ist nicht sicher, welche Mechanismen der Krankheitsprogression von chronischer Phase zur Blastenkrise zugrunde liegen. Aus unseren Daten lässt sich als mögliche Ursache eine genetische Instabilität ableiten: Wir sehen eine 2- bis 4,4-fache Herabregulation von Genen, die zur Detoxifikation von Fremdstoffen und DNA-Reparatur benötigt werden, wie die der Glutathion-S-Transferase, Glutathionperoxidase 1 und -reduktase, zytosolischen Superoxid-dismutase, „mutL homologue 1“, RAD23A und ERCC5.

Außerdem fanden wir die differentielle Expression von Genen, deren Produkte als Ziel für eine spezifische Therapie dienen könnten. So waren drei Proteasomuntereinheiten 3- bis 4-fach überexprimiert, zudem war eine Untereinheit des Proteasominhibitors 1 1,4-fach herabreguliert.

Außerdem konnten wir, verglichen mit gesunden CD34⁺ Zellen, ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren und Zytokinen

finden. Nur eines war hochreguliert („small inducible cytokine subfamily E1“, 3,6-fach) und 17 andere waren herabreguliert, unter anderem „macrophage colony-stimulating factor“, „platelet-derived growth factor“ und Interleukin-10, zudem der Rezeptor für Neuromedin B, der G-CSF-Rezeptor und der CXC-Chemokin 4-Rezeptor (CXCR4).

Bei den in die Transkriptionsregulation eingebundenen Genen waren insbesondere die Gene für die Zinkfingerproteine 9, 148 und 162, positiver Cofaktor 4, hypoxie-induzierbarer Faktor 1 und GATA-2 hochreguliert. Herabreguliert zeigten sich „immediate early protein“, „DNA-binding protein TAXREB302“, der Transkriptionsfaktor E2F-1, „interferon regulatory factor“ und das myeloide, nukleäre Differenzierungsantigen.

Die meisten Protoonkogene waren interessanterweise herabreguliert, mit der Ausnahme des SKI-Protoonkogens, welches 9-fach überexprimiert war. 2,1- bis 6-fach herabreguliert waren MYB-verwandtes Protein 2, JUN-D, FOS, ETS-variantes Gen 6 (TEL Protoonkogen) und „non-metastatic cells 2 protein“.

V.b Vergleich von CD34⁺ Zellen bei CML aus Knochenmark und Blut und hierarchische Clusteranalyse

In früheren Arbeiten unserer Gruppe fanden vergleichende Genexpressionsanalysen gesunder CD34⁺ Zellen aus Blut und Knochenmark signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen, welche auf funktionelle

Unterschiede zwischen ortsständigen und zirkulierenden CD34⁺ Zellen hinwiesen ⁶⁶. Wir fragten uns, ob dies auch für die CML gilt, und verglichen drei Proben CD34⁺ Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit CML mit den o.g. fünf Proben aus dem Knochenmark. Jeweils drei Proben waren gepaart und wurden zu gleichem Zeitpunkt bei den Patienten aus Knochenmark und Blut entnommen. Bei dieser Analyse zeigte sich kein Gen differentiell exprimiert, was damit in deutlichem Gegensatz zu den CD34⁺ Zellen beim Gesunden steht.

Um das Ausmaß der Heterogenität der Proben abschätzen zu können und um der Frage nachzugehen, ob die CD34⁺ Zellen bei CML ein charakteristisches Expressionsmuster haben, führten wir eine hierarchische Clusteranalyse mit einem „average-linkage“-Algorithmus durch. In diese Analyse gingen 5 Proben von CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark von CML-Patienten, 3 Proben aus dem peripheren Blut von CML-Patienten, 10 Proben aus gesundem Knochenmark und 12 Proben aus dem Blut gesunder Probanden ein. Dadurch konnten drei voneinander abgrenzbare Gruppen identifiziert werden: Die Gruppe der CML-CD34⁺ Zellen, unabhängig ob aus Knochenmark oder Blut, die CD34⁺ Zellen aus dem Knochenmark Gesunder und die aus dem Blut Gesunder (Abb. 7). Aus dem Dendrogramm lässt sich ersehen, dass die CD34⁺ Zellen bei CML bezüglich des Genexpressionsprofils funktionell näher mit den gesunden Pendants aus dem Knochenmark „verwandt“ sind, als mit den gesunden CD34⁺ Zellen aus dem Blut.

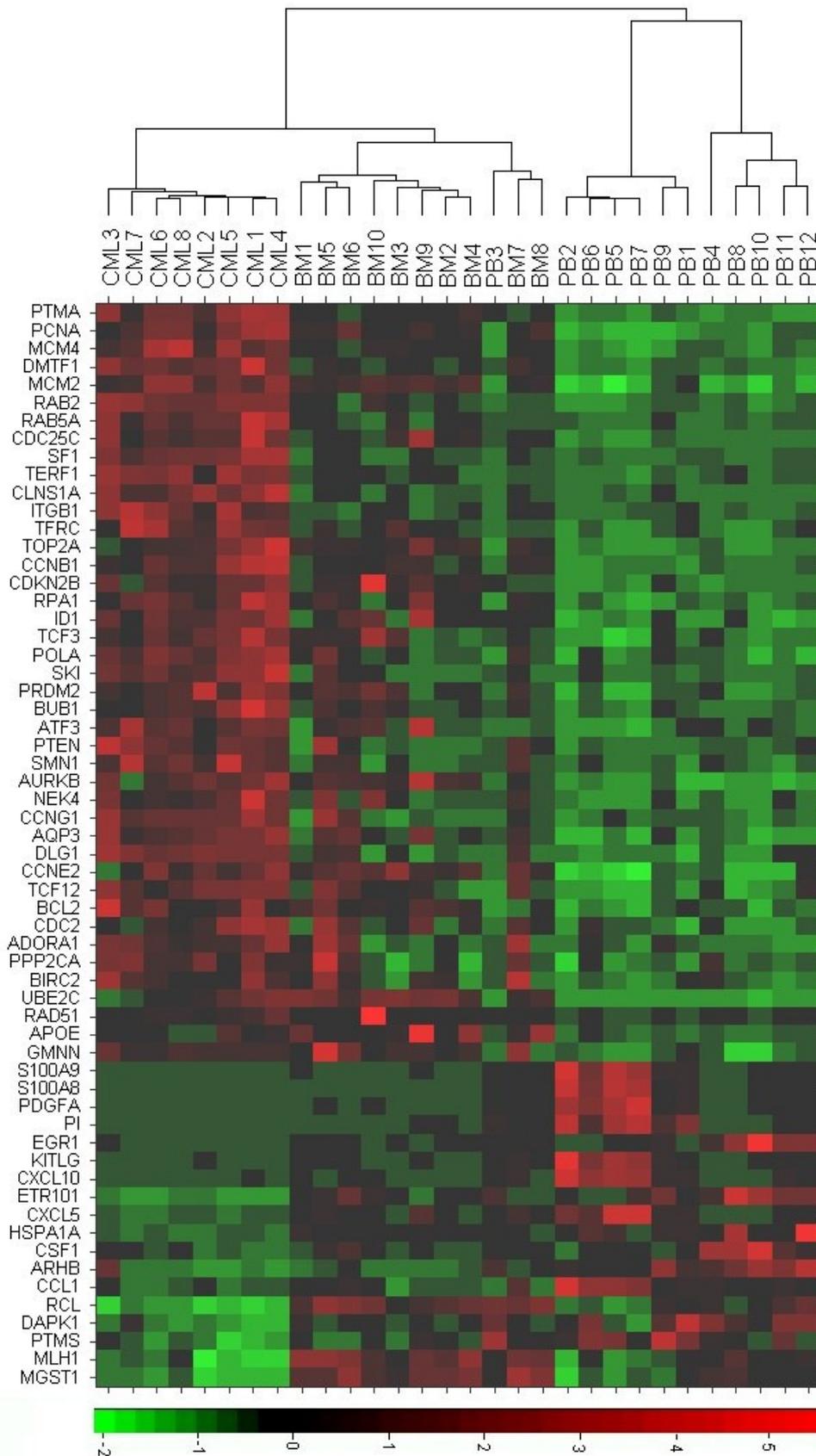


Abb. 7: Hierarchische Clusteranalyse auf der Basis von 60, wenigstens 1,4-fach differentiell exprimierten Genen. Die Bezeichnung der Gene folgt der HUGO-Nomenklatur⁸⁰. Rote Felder zeigen höhere Expression als der Gesamtmedian, grüne eine niedrigere Expression. Das Dendrogramm zeigt den Grad der Ähnlichkeit der einzelnen Proben.

V.c Bestätigungsexperimente durch „real-time“-RT-PCR

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den cDNA-array-Experimenten wurde die mRNA-Expression ausgewählter Gene in CML- und normalen CD34⁺ Zellen durch quantitative „real-time“ RT-PCR untersucht. Hierfür verwendeten wir zwei verschiedene Plattformen, die LightCycler®-Technologie und das ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System®. Untersucht wurde die revers transkribierte mRNA von hochangereicherten CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von 3 gesunden Probanden und 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML.

Zur Untersuchung mit dem LightCycler® wurden die folgenden Gene ausgewählt: „Junction Plakoglobin“ (JUP), Tripeptidyl-peptidase (CLN 2), „defender against cell death 1“ (DAD 1), das 14-3-3-beta Protein (YWHAB) und das Protoonkogen c-SKI (SKI) (Abb. 8).

Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese zeigten, dass bei jeder Reaktion ein einziges PCR-Produkt mit der erwarteten Länge entstanden ist.

Auf der Plattform ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System® untersuchten wir die folgenden Gene: Proteasomuntereinheit Typ α -3 (PSMA3) und „splicing factor 1“ (SF162)(Abb. 9). Als Referenzgen nutzten wir in allen Fällen die Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase. Wir konnten für alle untersuchten Gene die Ergebnisse aus den vorher durchgeführten cDNA-

Array-Experimenten, und damit die signifikant differentielle Expression, bestätigen (Abb. 10).

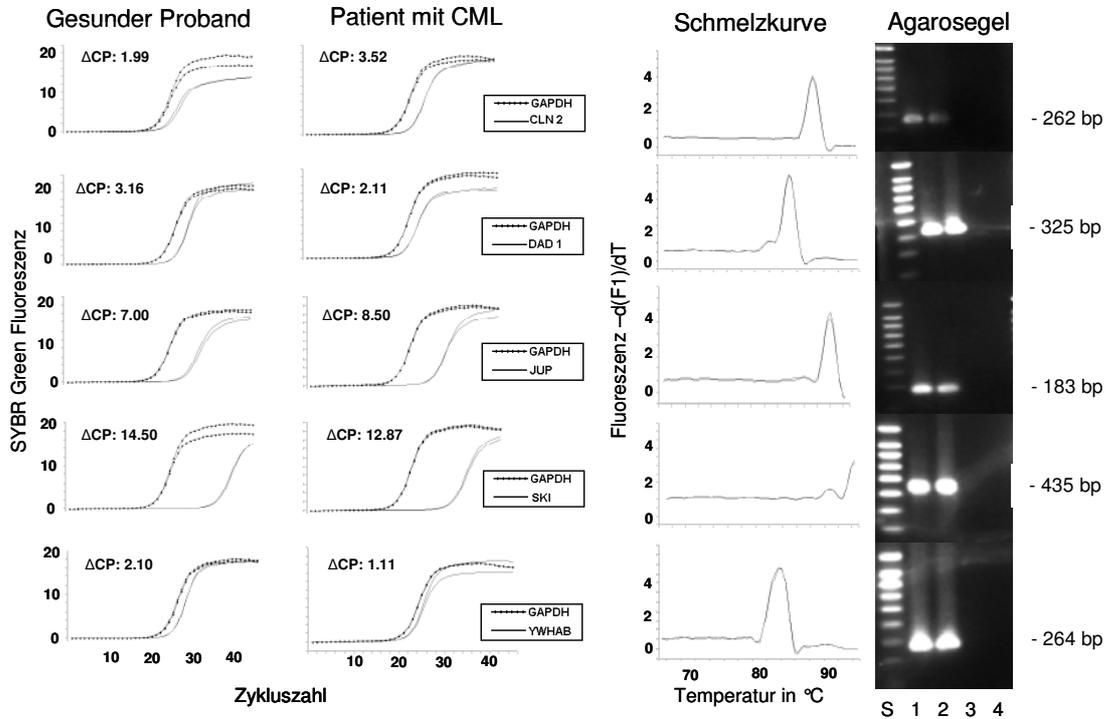
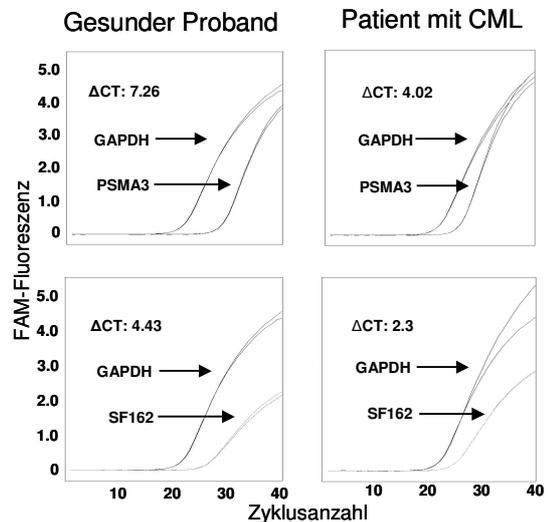


Abb. 8: Quantitative „real-time“-RT-PCR mit der LightCycler®-Technologie. Verglichen wurden CD34⁺ Zellen von einem gesunden Probanden und einem Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase. Angegeben sind hier die Differenzen der beiden „crossing points“ von Prüf- und Referenzgen (Δ CP). Außerdem sind die Schmelzkurvenanalyse und Agarosegelelektrophorese zur Qualitätskontrolle abgebildet. Bei der Agarosegelelektrophorese stellen die Banden dar: Größenstandard (S), Gesundprobe (1), Krankprobe (2), RNA-Kontrolle (3), Wasserkontrolle (4). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Abb. 9: Quantitative „real-time“-RT-PCR mit der ABIPrism 7900 HT®-Technik. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, bei dem CD34⁺ Zellen von einem gesunden Probanden und einem Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase verglichen werden. Angegeben sind hier die Differenzen der beiden „threshold cycles“ von Prüf- und Referenzgen (C_T).



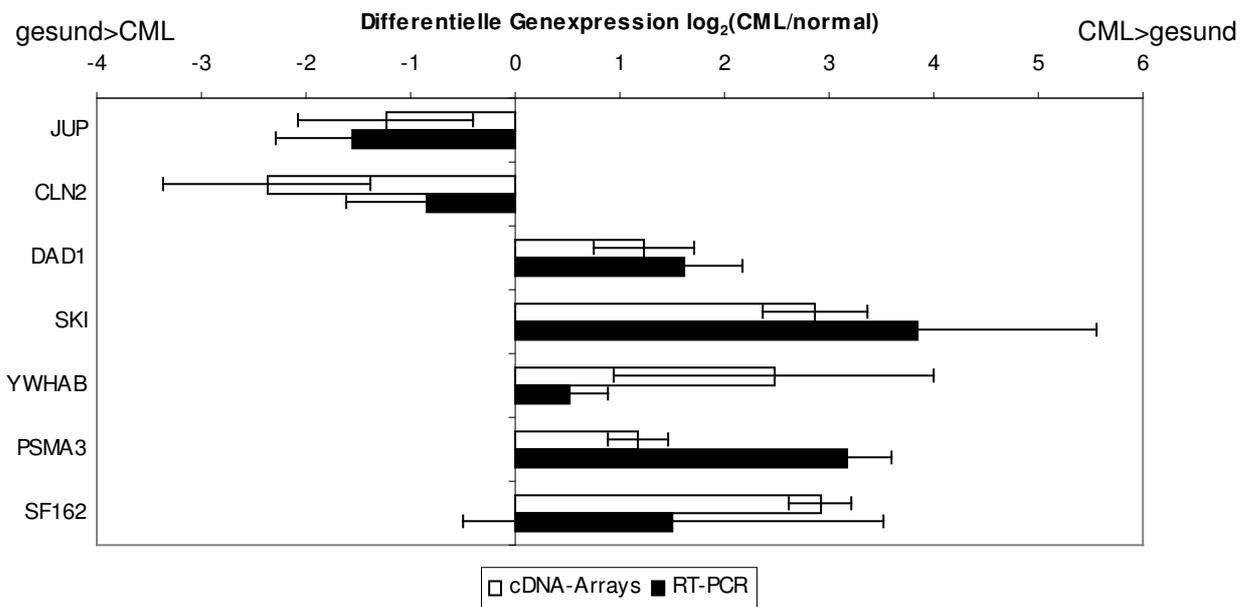


Abb. 10: Ergebnisse der quantitativen „real-time“-RT-PCR im Vergleich zu den cDNA-array-Ergebnissen. Verglichen wurde die Expression von 7 Genen bei CD34⁺ Zellen von 3 gesunden Probanden und 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase, gemessen mit cDNA-Arrays (weiß) und „real-time“-RT-PCR (schwarz). Angegeben sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Expressionsverhältnisses im 2er Logarithmus.

V.d Nachweis G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen bei CML

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich durch cDNA-Arrays und Immunfluoreszenz nachweisen, dass CD34⁺ hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen bei gesunden Probanden funktionell aktive G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Neuropeptide und -transmitter exprimieren⁶⁹. Wir fragten uns, ob dies auch für CD34⁺ Zellen bei der CML gilt. Bereits die Ergebnisse der cDNA-Array-Experimente deuteten darauf hin: Von 56 neurobiologisch assoziierten Genen waren der Opioidrezeptor $\mu 1$, der Adenosinrezeptor A1 und der Chloridkanal 1A auch in CD34⁺ Zellen bei CML

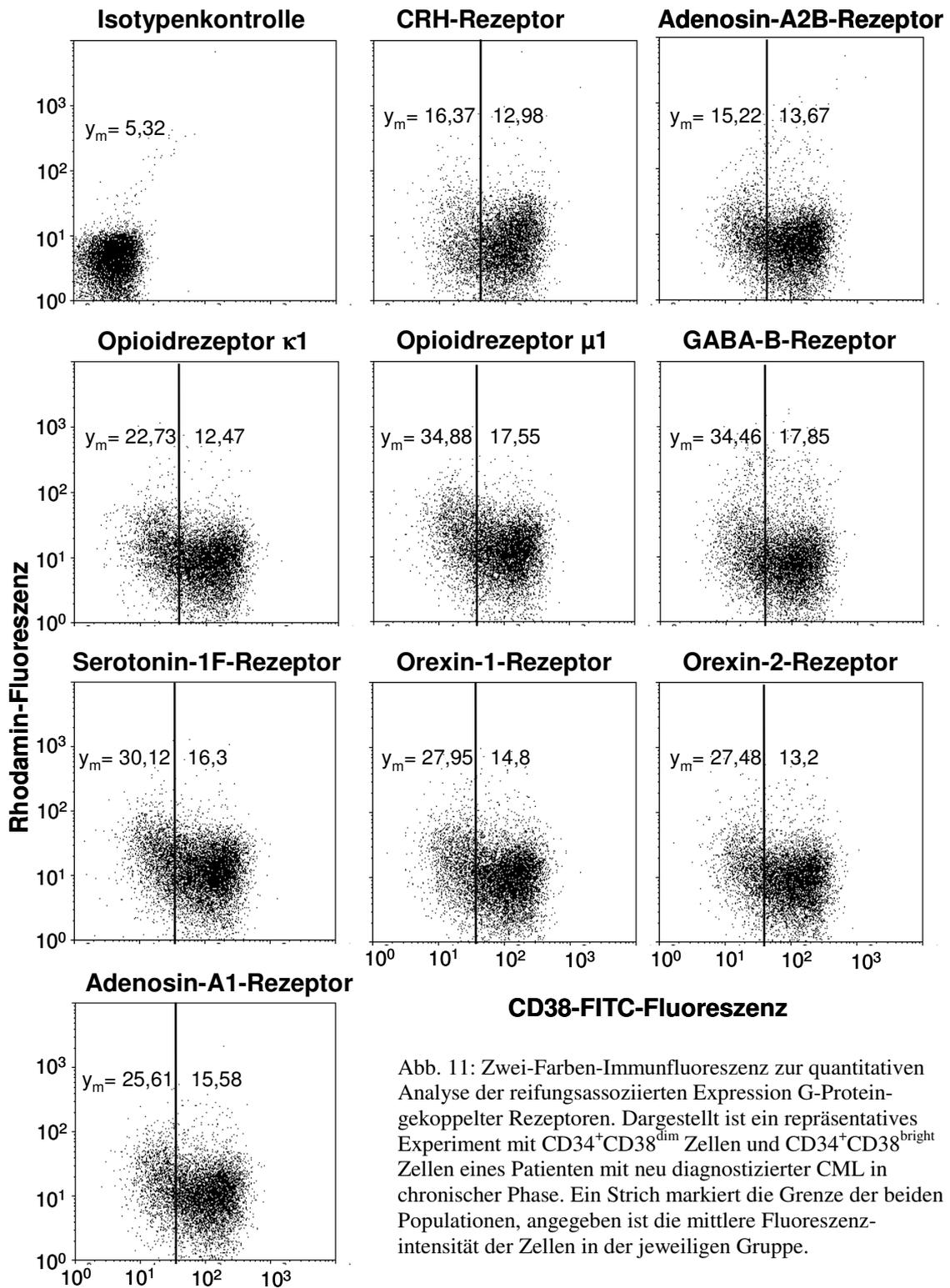


Abb. 11: Zwei-Farben-Immunfluoreszenz zur quantitativen Analyse der reifungsassoziierten Expression G-Proteingekoppelter Rezeptoren. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit CD34⁺CD38^{dim} Zellen und CD34⁺CD38^{bright} Zellen eines Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase. Ein Strich markiert die Grenze der beiden Populationen, angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen in der jeweiligen Gruppe.

exprimiert. Daher untersuchten wir die Expression von 9 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf CML CD34⁺ Zellen mittels indirekter Zwei-Farben-Immunfluoreszenz. Uns interessierte einerseits der Nachweis der Rezeptoren auf diesen Zellen und andererseits, ob quantitative Unterschiede in der Expression zwischen den unreifen CD34⁺CD38^{dim} und den reiferen CD34⁺CD38^{bright} Zellen bestehen. Die untersuchten Rezeptoren waren die für die Neuropeptide CRH, Orexin/Hypocretin 1 und 2 und die Opioidrezeptoren μ und κ , zudem die Rezeptoren für Neurotransmitter GABA-B, Adenosin A1 und A2B und Serotonin 1F.

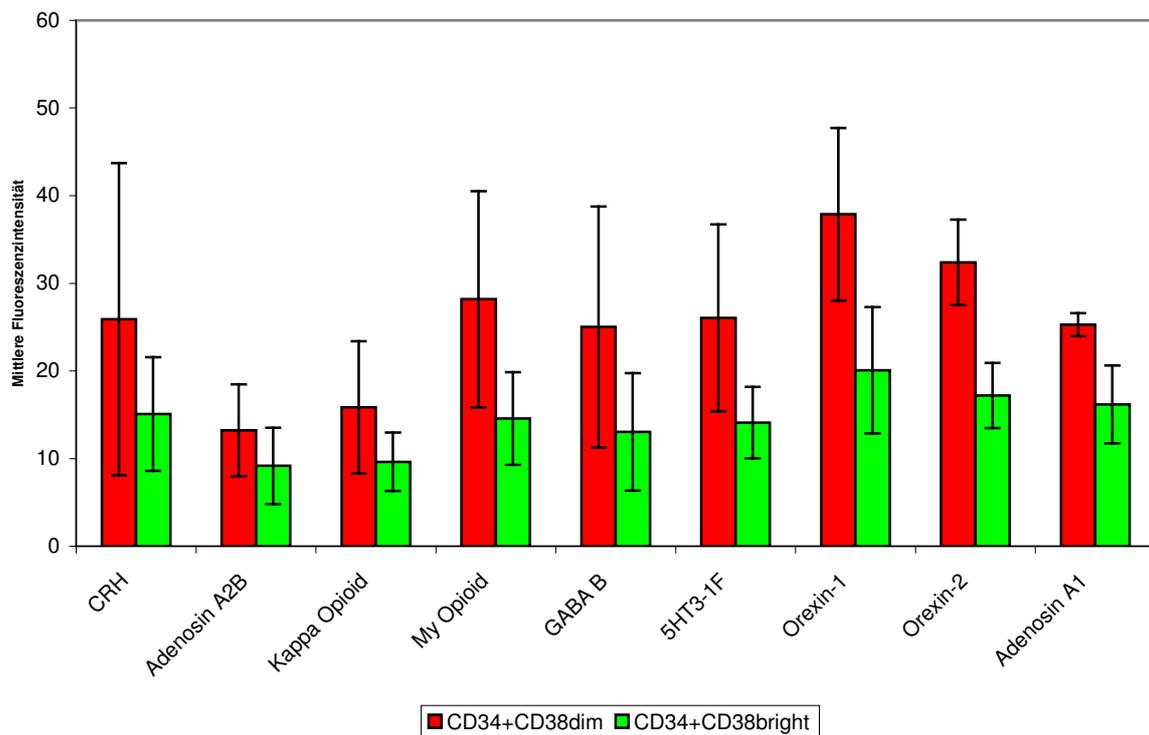


Abb. 12: Zwei-Farben-Immunfluoreszenz zur quantitativen Analyse der reifungsassoziierten Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Verglichen wurden CD34⁺CD38^{dim} Zellen mit CD34⁺CD38^{bright} Zellen von 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase. Gemessen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der jeweiligen Gruppe, mitangegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen.

Wir untersuchten 3 Proben von Patienten mit neu diagnostizierter CML. Es zeigte sich, dass die Rezeptoren, genau wie beim gesunden Pendant, exprimiert werden, zudem fanden wir eine höhere Expression der Rezeptoren auf CD34⁺CD38^{dim} Zellen im Vergleich zu den „reiferen“ CD34⁺CD38^{bright} Zellen (Abb. 11). Dieses unterschiedliche Expressionsniveau schwankte, je nach Rezeptor um den Faktor 1,5 bis zu einer fast 2-fach höheren Expression in den „unreiferen“ Stammzellen (Abb. 12).

V.e G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind auf CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML in chronischer Phase hochreguliert

Es stellte sich nun die Frage, ob die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in der CD34⁺ Zelle bei CML differentiell exprimiert sind. Daher wurden die oben genannten Rezeptoren mittels indirekter 2-Farben-Immunfluoreszenz auf ihre quantitative Expression bei 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase untersucht und diese quantitativen Daten mit den CD34⁺ Zellen von 3 gesunden Probanden verglichen. Die Messmethode erlaubte einerseits einen Vergleich auf Einzelzellebene, d.h. ein gemittelttes Expressionsniveau aller CD34⁺ Zellen, sowie eine Aussage über die prozentuale Rezeptorpositivität in der Fraktion der CD34⁺ Zellen.

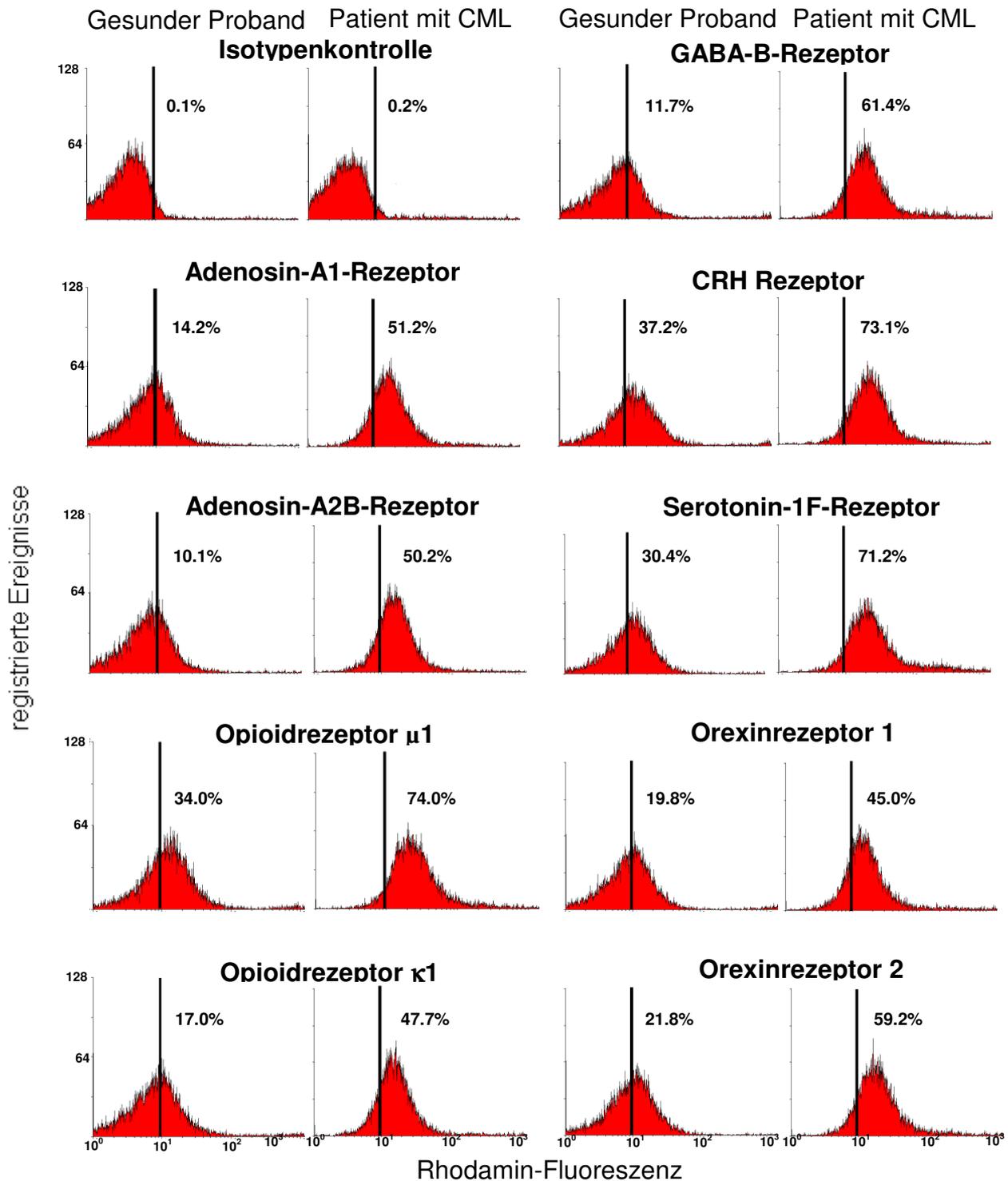


Abb. 13: Repräsentatives Experiment zur Zwei-Farben-Immunfluoreszenzanalyse von G-Proteingekoppelten Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen bei CML im Vergleich mit einer gesunden Probe. Eine Linie markiert die Positivitätsgrenze. Prozentuale Positivität der Zellen für den jeweiligen Rezeptor ist angegeben.

Beim Vergleich der CML-Proben mit den Kontrollproben konnten wir zeigen, dass der Anteil rezeptorpositiver Zellen bei allen untersuchten Rezeptoren in der CML höher ist (Abb. 13). Außerdem fanden wir, dass die genannten Rezeptoren in den CML CD34⁺ Zellen zwischen 1,8- und 2,2-fach höher exprimiert waren, als in den gesunden CD34⁺ Zellen (Abb. 14). Im t-Test für unverbundene Stichproben waren die gemessenen Unterschiede signifikant ($p < 0,05$) für alle untersuchten Rezeptoren, außer dem Adenosin A2B- und dem Opioidrezeptor $\kappa 1$.

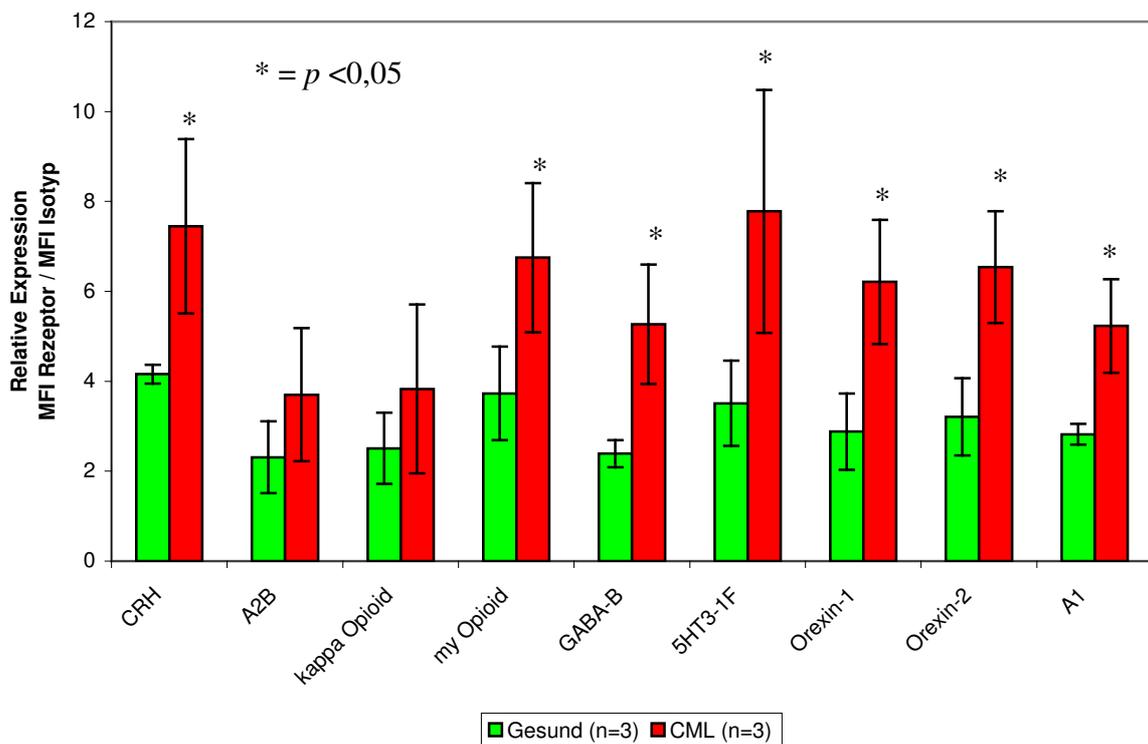


Abb. 14: Ergebnisse der Zwei-Farben-Immunfluoreszenz zur quantitativen Analyse der Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Verglichen wurden CD34⁺ Zellen von 3 gesunden Probanden und 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase, gemessen wurde die mittlere Fluoreszenz pro Zelle.

V.f Funktionelle Bedeutung der Überexpression des Opioidrezeptors $\mu 1$, des GABA-B-Rezeptors und des Adenosin-A1-Rezeptors

Es stellte sich nun die Frage nach der pathophysiologischen Relevanz der überexprimierten Rezeptoren bei der CML. Daher wurde der Einfluss der Stimulation oder Blockade von ausgewählten Rezeptoren auf das klonogene Wachstum der CML-Progenitorzellen untersucht.

Untersucht wurden drei Rezeptoren: Der Opioidrezeptor $\mu 1$, der GABA-B-Rezeptor und der Adenosinrezeptor A1. Wir verwendeten für die einzelnen Rezeptoren spezifische Agonisten und Antagonisten in 2 bzw. 3 Konzentrationen, führten eine Wasser- und, wo geboten, eine DMSO-Kontrolle mit, außerdem einen Ansatz mit Koinkubation von Agonist und Antagonist (siehe oben) .

Nach mikroskopischen Kriterien unterschieden wir zwischen den „weiß“ determinierten CFU-GM und den „rot“ determinierten BFU-E.

V.f1. Kein Einfluss der Opioid $\mu 1$ -Rezeptormodulation auf das klonogene Wachstum

Wir inkubierten mononukleäre Zellen von 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase mit dem für den Opioidrezeptor $\mu 1$ spezifischen Agonisten DAMGO und dem Antagonisten Naloxon. Bezogen auf die Wasserkontrolle zeigten sich hier keine Veränderungen des klonogenen Wachstums (Abbildung 15).

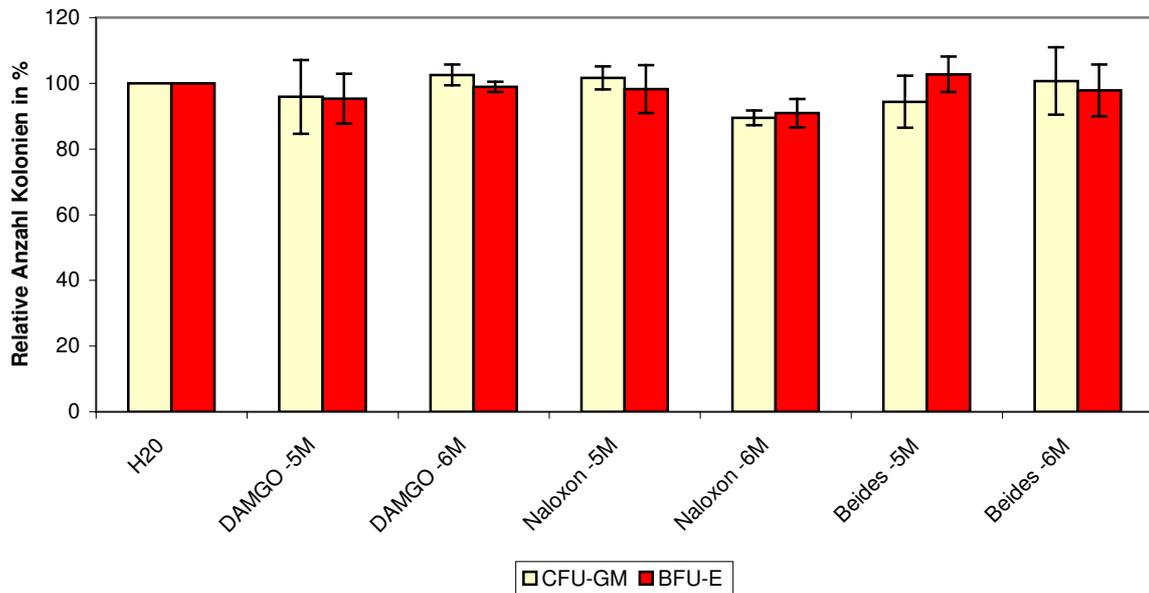


Abbildung 15: Einfluss der Modulation des Opioidrezeptors $\mu 1$ auf das klonogene Wachstum. Untersucht wurden mononukleäre Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase (n=3). Werte wurden durch Zählen ermittelt und prozentual auf die Kontrolle (Wasser) bezogen.

V.f2. Kein spezifischer Einfluss der GABA-B-Rezeptormodulation auf das klonogene Wachstum

Wir inkubierten mononukleäre Zellen von 3 Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase mit dem für den GABA-B-Rezeptor spezifischen Agonisten SKF97541 und dem spezifischen Antagonisten CGP52432. Bezogen auf die Wasserkontrolle konnte in allen Ansätzen mit Agonist, Antagonist oder beidem konzentrationsunabhängig das klonogene Wachstum zwischen 25 und 40% gehemmt werden. Somit liegt vermutlich ein unspezifischer Effekt der Modulation vor (Abbildung 16).

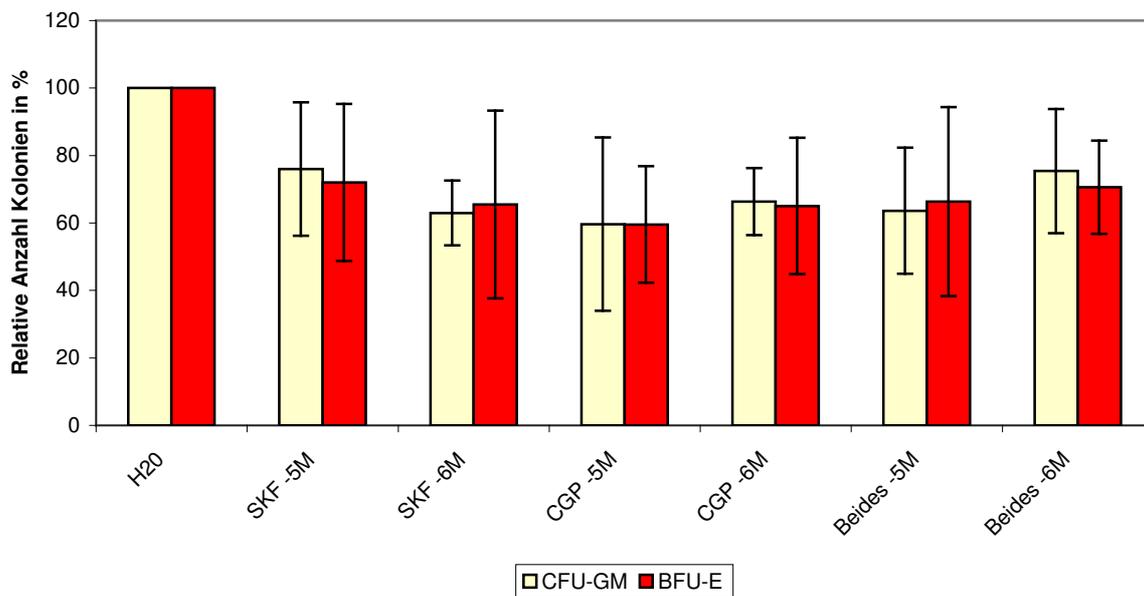


Abbildung 16: Einfluss der Modulation des GABA-B-Rezeptors auf das klonogene Wachstum. Untersucht wurden mononukleäre Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase (n=3). Werte wurden durch Zählen ermittelt und prozentual auf die Kontrolle (Wasser) bezogen.

V.f3. Signifikante Hemmung des klonogenen Zellwachstums durch Blockade des Adenosinrezeptors A1

Wir inkubierten mononukleäre Zellen von 5 Patienten mit neu diagnostizierter CML mit dem für den Adenosinrezeptor A1 spezifischen Agonisten CCPA und

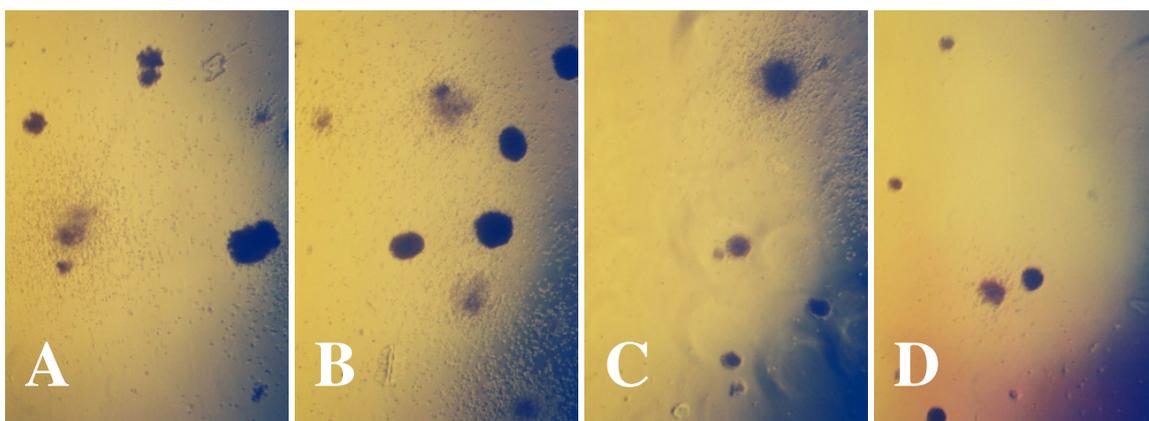


Abbildung 17: Fotografische Darstellung der Inhibition des klonogenen Wachstums von CML-Progenitorzellen durch einen selektiven Adenosin-A1-Rezeptorantagonisten in 40-facher Vergrößerung. A: DMSO-Kontrolle B:Wasserkontrolle C: DPCPX 10^{-6} M D: DPCPX 10^{-5} M

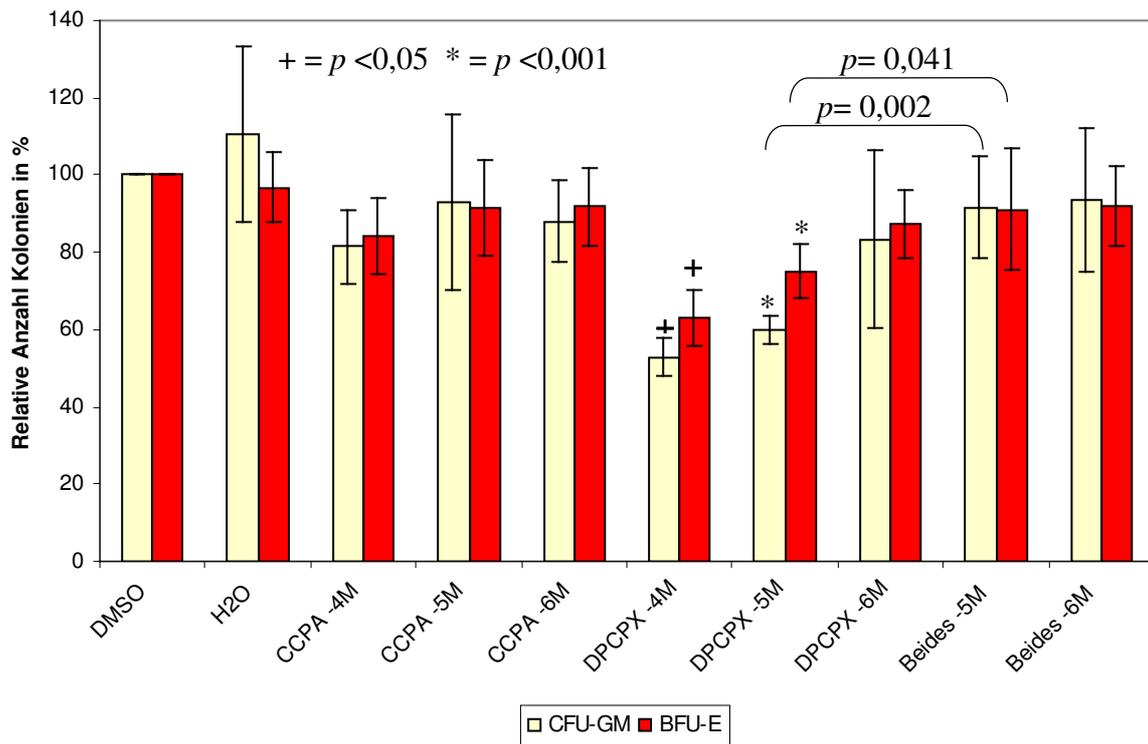


Abbildung 18: Veränderung des klonogenen Wachstums von CML-Progenitorzellen durch Modulation des Adenosin-A1-Rezeptors. Untersucht wurden mononukleäre Zellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase (n=5 bzw. in 10^{-4} M Konzentration n=2). Werte wurden durch Zählen ermittelt und prozentual auf die Kontrolle (DMSO) bezogen. Kombination von CCPA und DPCPX in 10^{-4} M Konzentration führte zur kompletten Wachstumsinhibition aufgrund der hohen Konzentration an DMSO.

dem spezifischen Antagonisten DPCPX. Da beide Liganden in DMSO gelöst waren, führten wir eine DMSO-Kontrolle mit und bezogen das prozentuale Ergebnis nicht, wie oben, auf die Wasser-, sondern auf die DMSO-Kontrolle.

Es zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige Hemmung des klonogenen Wachstums der CFU-GM und der BFU-E durch den Antagonisten DPCPX (Abbildung 18). Die Hemmung betrug bei den CFU-GM 40 % bzw. 47 % ($p < 0,001$) und bei den BFU-E 25 % bzw. 37 % ($p < 0,05$) bei einer Konzentration von DPCPX von 10^{-5} M bzw. 10^{-4} M. Die Wachstumsinhibition konnte durch die

Zugabe des spezifischen Agonisten CCPA in äquimolarer Konzentration aufgehoben werden.

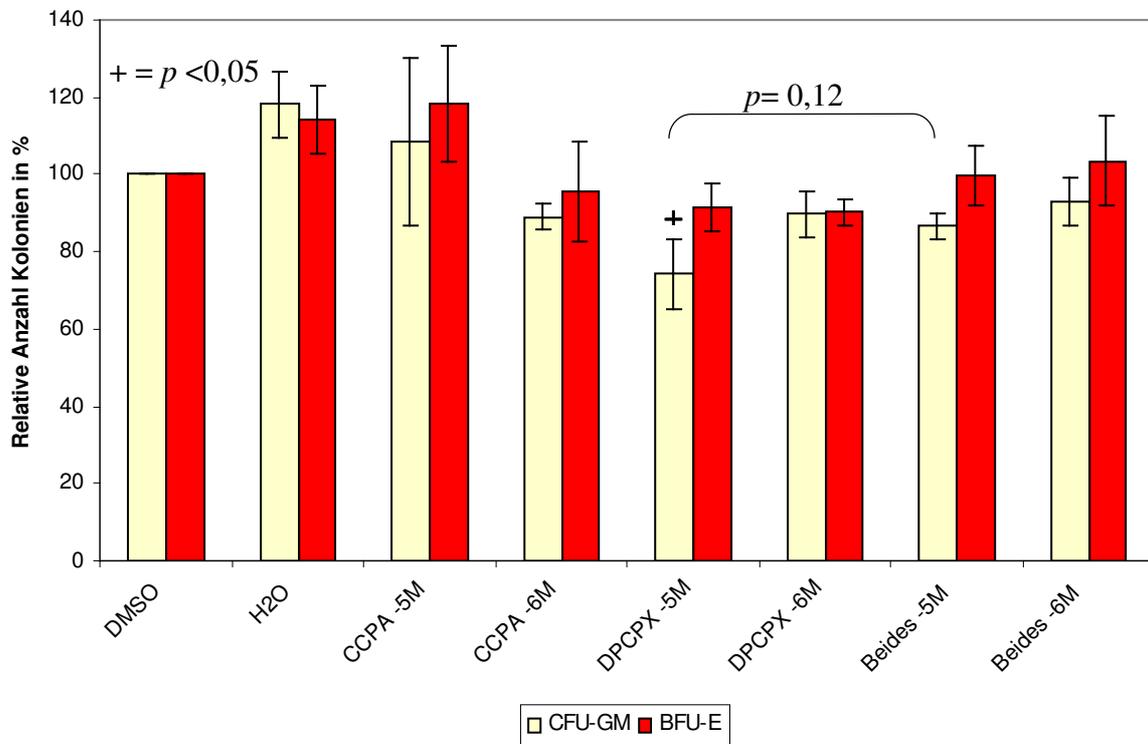


Abbildung 19: Zellkulturexperimente mit spezifischen Liganden für den Adenosin-A1-Rezeptor. Untersucht wurden mononukleäre Zellen von gesunden Probanden (n=3). Werte wurden durch Zählen ermittelt und prozentual auf die Kontrolle (DMSO) bezogen.

Da im Vergleich zu gesunden CD34⁺ Zellen die CML CD34⁺ Zellen eine höhere Expression des Adenosin-A1-Rezeptors aufweisen, stellte sich die Frage, ob sich die differentielle Expression auch in einer unterschiedlichen Hemmung des klonogenen Wachstums nach Rezeptorblockade widerspiegeln. Deshalb verwendeten wir den gleichen experimentellen Ansatz für eine weitere Messreihe mit gesunden Progenitorzellen von 3 Probanden. Hierbei zeigte sich ebenso eine Beeinflussbarkeit des Zellwachstums durch die o.g. Liganden

beim Gesunden, jedoch war diese in allen Experimenten weniger ausgeprägt, sodass die Hemmung des Zellwachstums der CFU-GM durch DPCPX in 10^{-5} M Konzentration nur durchschnittlich 26 % im Vergleich zu den 40 % bei den CML-Patienten betrug (Abb. 19). Bei den BFU-E kam es zu keiner Änderung des Wachstums.

VI. Diskussion

In dieser experimentellen Studie wurden Genexpressionsprofile von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit CML in chronischer Phase erstellt und mit solchen vergleichbarer Zellen von gesunden Probanden verglichen. Diese Untersuchung liefert erstmals ein Genexpressionsprofil maligner CD34⁺ Zellen bei der CML. Bisher fanden Analysen einerseits an mononukleären Zellen des Blutes ⁷⁰, einer sehr heterogenen Zellpopulation, und andererseits an CD133⁺ hämatopoetischen Stammzellen statt ⁷¹. Die Arbeit von Ohmine et al. fokussierte allerdings auf die Frage nach der genetischen Instabilität in den Stammzellen im Zuge der Krankheitsprogression. Die Intention unserer Studien lag vielmehr in der näheren molekularen Charakterisierung der CD34⁺ Zellen im Vergleich zu denen gesunder Probanden.

Nun sind CD34⁺ Zellen nach wie vor eine sehr heterogene Zellpopulation, die nicht nur aus Stamm- sondern auch aus bereits liniendeterminierten Progenitorzellen besteht. Dennoch sind diese Zellen für die CML-Forschung besonders attraktiv. Mit hochangereicherten CD34⁺ Zellen gelingt zumindest eine Annäherung an die maligne Stammzelle.

Außerdem konnten wir 158 Gene im Vergleich zu normalen CD34⁺ Zellen als signifikant differentiell exprimiert nachweisen. Die Genexpressionsdaten spiegeln die pathogenetischen „Säulen“ der CML gut wieder: Es lassen sich in

den gewonnenen Daten Hinweise auf eine erhöhte mitogene Aktivität durch Hochregulation von Zellzyklusgenen ⁸¹ und auf eine reduzierte Apoptoseaktivität ⁸² finden, beides wichtige Mechanismen bei der CML ^{83 84}. Dass Apoptoseinhibition in CML-Zellen zur malignen Transformation beiträgt, konnte an Zelllinien gezeigt werden ⁸⁵. Auch wenn ein einzelnes Gen Apoptoseresistenz nicht erklärt, so könnte die Überexpression des „defender against cell death 1“ zumindest eine partielle Erklärung bieten. Das Gen ist der NFκB-Kaskade nachgeschaltet ⁸⁶, eine Überexpression wurde kürzlich auch in Prostatakarzinomen im Rahmen der Perineuralscheideninvasion beschrieben ⁸⁷. Diese war interessanterweise durch Genistein, einen Hemmstoff des NFκB ⁸⁸ und BAY 11-7085, einen IκB-Phosphorylierungshemmstoff ⁸⁹, hemmbar. Da physiologische Signalkaskaden der Apoptose in der CML prinzipiell funktionell sind ^{83 90}, ist es nicht unwahrscheinlich, dass eine Blockade auf einer Fehlregulation einzelner Gene beruht. Ein attraktiver Ansatz wäre demnach die experimentelle Stilllegung des „defender against cell death 1“ durch RNA-Interferenz ⁹¹, beziehungsweise Hemmung der NFκB-Kaskade ähnlich dem o.g. experimentellen Design.

Zwei weitere wichtige Aspekte betreffen die Adhäsionseigenschaften der Zellen und das Proteasom. So wird beispielsweise die Interaktion zwischen den leukämischen Zellen und dem Knochenmarkstroma durch veränderte Expressionsmuster von Integrinen ^{33 92} beeinflusst, was die Ursache für die

hämatologisch im Vordergrund stehende Linksverschiebung sein könnte. Im Zusammenhang hiermit untersuchten wir die mRNA-Expression des „Junction Plakoglobins“ (γ -Catenin) ^{93 94}, ein als Bestandteil der Desmosomen in der Dermatologie wichtiges Protein. Wir konnten eine Herabregulation des Gens zeigen. Solche differentiellen Regulationen sind von diesem Gen in mehreren soliden Tumoren bekannt, dies gilt insbesondere für Prozesse der Metastasierung ⁹⁵. Blickt man in den Bereich hämatologischer Malignome, wird die Datenlage dünner, dennoch gibt es auch hier Daten: Die AML-Translokationsgene PML/RAR alpha, X-RAR alpha, und AML-1/ETO blockieren die Differenzierung in der Leukämie. Diese Translokationsgene regulieren den Wnt-Pfad durch γ -Catenin-Hochregulation ^{96 97}. Man sieht also hier sehr variable Funktionen des Gens: Adhäsion und Signalvermittlung.

Außerdem hat das Proteasom in der letzten Zeit eine zunehmende Beachtung gefunden und das gilt auch im Hinblick auf die CML: Die zwei inhibitorischen Abl-interagierenden Proteine abi-1 und abi-2 werden gezielt durch das Proteasom degradiert ⁹⁸. Es handelt sich hierbei um einen erst kürzlich entdeckten Mechanismus der malignen Transformation. Bemerkenswert ist er besonders unter dem Gesichtspunkt, dass heute ein spezifischer Inhibitor des Proteasoms, Bortezomib (Velcade®), verfügbar ist. Ursprünglich für das multiple Myelom entwickelt und dort auch mit zunehmendem Erfolg eingesetzt ⁹⁹, wirkt Bortezomib bei verschiedensten hämatologischen Malignomen ¹⁰⁰. In vitro konnte zudem eine Wirksamkeit auf bcr-abl positive

Zellen nachgewiesen werden ¹⁰¹. Unsere Daten zeigen eine Hochregulation verschiedener Untereinheiten des Proteasoms, somit fügen sich unsere Daten im Kontext zu bisher Bekanntem gut ein.

Eine sehr interessante Gruppe von Genen sind die der Onkogene und Tumorsuppressorgene. Aufmerksamkeit verdient hierbei die Überexpression des c-SKI Onkogens ¹⁰², ein bis dato für die CML nicht bekannter Sachverhalt, den wir auch durch die „real-time“-PCR bestätigen konnten.

Man weiß, dass das c-SKI physiologisch unter anderem eine wichtige Rolle in der Differenzierung der Skelett- und Herzmuskulatur ^{103 104} und der Proliferation und Myelinbildung der Schwann-Zellen spielt ¹⁰⁵. Aber auch in der Hämatopoese ist das Vorkommen bzw. die Bedeutung beschrieben worden ^{106 107}, scheinbar hat es Einflüsse auf die Megakaryopoese und Erythropoese. Das virale Homolog des c-SKI stimuliert die Proliferation von Progenitorzellen im Knochenmark von Hühnern ¹⁰⁸.

Das Interessante an der Überexpression ist, dass c-SKI beim Menschen bisher nur in hämatopoetischen Progenitorzellen, die bereits die megakaryozytäre und / oder erythrozytäre Differenzierung eingeschlagen hatten, beschrieben wurde, nicht jedoch, und diese machen ja einen großen Teil der CD34⁺ Zellen aus, in den multipotenten, nicht linien-determinierten Progenitorzellen. Das Gen hat interessante Wechselwirkungen im zellulären Signalnetzwerk: Es scheint einen wechselseitigen Antagonismus der Signalwege des transformierenden Wachstumsfaktors beta (TGF- β) und c-SKI über die smad-

Adapterproteine zu geben ^{109 110}. Weiterhin blockiert eine Überexpression des c-SKI den Signalweg des Retinsäurerezeptors alpha (RAR- α) ¹⁰⁸. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Störung von Differenzierung und Proliferation in der CML: Das natürliche, konstitutive Signal endogener Retinoide kann aufgrund der SKI-Überexpression nicht aktiv werden und kann so unkontrolliertes Wachstum und mangelnde Differenzierung nicht supprimieren. Gerade deshalb wäre auch c-SKI ein interessanter Kandidat für RNA-Interferenz-Experimente mit diesem Gen als Ziel. Außerdem steht mit all-trans-Retinsäure (ATRA) ein synthetischer Ligand des Retinsäurerezeptors zur therapeutischen Verfügung ¹¹¹, der ebenfalls bei der CML Verwendung finden könnte.

Ein weiterer wesentlicher Untersuchungsbefund war eine Überexpression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für Neurotransmitter und -mediatoren mit Anzeichen einer pathophysiologischen Relevanz in Zellkulturexperimenten. Eine Einflussnahme auf das Zellwachstum durch o.g. Rezeptoren ist allgemein bekannt. Auch hier werden gut bekannte Signalwege genutzt, genannt seien hier das ras ¹¹², aber auch Rezeptor- und Nicht-Rezeptortyrosinkinasen ^{113 114}. Die Beteiligung diverser gleicher oder ähnlicher Reaktionspartner im Signalnetzwerk der CML-Zellen einerseits und der G-Proteine andererseits macht auffallende Parallelen beider deutlich. Potente Mitogene wie Thrombin, Lysophosphatidsäure, Bombesin, Vasopressin, Bradykinin, Substanz K und Angiotensin II vermitteln ihr Signal durch G-Proteine ^{115 116}. Auch in Tumorgewebe spielen sie eine Rolle: Mutationen des TSH-Rezeptors können zu

autonomen Adenomen und auch Schilddrüsenkarzinomen führen ¹¹⁷, somit ist die Brücke zur Beteiligung in Malignomen geschlagen. Es gibt aber auch andere, wesentlich subtilere Effekte: Kleinzellige Bronchialkarzinome können autokrin beispielsweise Neuromedin B, Bradykinin und andere Peptide sezernieren. Da sie den passenden Rezeptor selbst exprimieren, stimulieren sie autokrin ihr eigenes Wachstum ¹¹⁸. Außerdem gibt es auch virale Onkogene auf G-Protein-gekoppelter Rezeptorbasis, wenn auch nicht beim Menschen: Das Herpesvirus Saimiri (HVS), ein naher Verwandter des humanen Epstein-Barr-Virus, kann in Primaten Leukämien und Lymphome verursachen. In seinem Genom finden sich Abschnitte, die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kodieren ¹¹⁹.

Für mehr Informationen über den Zusammenhang von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Signaltransduktion und mitotischer Aktivität von Zellen wird auf die Übersichtsarbeit von Marinissen und Gutkind aus 2001 verwiesen ⁷⁴.

Steidl et al. wiesen nun bereits auf Proteinebene das Vorhandensein von G-Protein-gekoppelten neurobiologischen Rezeptoren nach ⁶⁹, ebenso zeigten sie eine Entwicklungsabhängigkeit der Expressionsstärke, messbar an der Koexpression von CD38 insoweit, als dass o.g. Rezeptoren besonders auf den unreiferen Zellen vorhanden sind. Unsere Ergebnisse mit CD34⁺CD38^{dim} Zellen bei CML sind zu diesen analog.

Zur neuralen Regulation der Hämatopoese gab es in der Vergangenheit mehrere Studien mit zum Teil sehr heterogenen Ergebnissen. Fasst man all dies

zusammen, sind schon vor Jahrzehnten Nervenfasern im Knochenmark nachgewiesen worden ¹²⁰, deren Funktion im Hinblick auf die Hämatopoese, speziell regulatorische Effekte, gilt jedoch als umstritten ^{121 122 123}. Zwei auffällige Befunde in der Literatur, und im folgenden Kontext zu beachten, sind jedoch die herabgesetzte zelluläre Immunität und Reduktion von hämatopoetischen Progenitoren in wegen Rückenmarksverletzung denervierten Knochenmarkarealen ¹²⁴ und die Hyperplasie der Hämatopoese in μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäusen ¹²⁵.

Bei der Durchführung von Zellkulturexperimenten mit CML-Zellen ergeben sich spezifische methodische Probleme. Will man hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen experimentell analysieren, so gibt es grundsätzlich mehrere Ansatzpunkte. Zuallererst muss man sich für ein humanes oder murines Modell entscheiden. Murine Modelle haben für viele Untersuchungen eine ausreichende Analogie zum Menschen und dennoch gibt es im Detail entscheidende Unterschiede, die uns von der Verwendung eines Mausmodells Abstand nehmen ließen. CD34 ist bei der Maus kein so etablierter Stammzellmarker wie beim Menschen, hierfür wird häufig c-kit in Kombination mit sca-1 verwendet ¹²⁶. Weiterhin unterscheidet sich die Hämatopoese von Maus und Mensch darin, dass die Maus eine physiologische extramedulläre Hämatopoese der Milz besitzt ¹²⁷. Großer Vorteil eines Mausmodells ist wiederum der eines kompletten Organismus. Viele wertvolle Informationen über die Chemo- und Radiosensibilität des

hämatopoetischen Systems und die Stammzelltransplantation wurden schon vor Jahren an der Maus gewonnen, die valide auf den Menschen übertragbar sind ^{128 129}. Fokussiert auf die Erzeugung einer CML im Tier gab es Versuche, humane, bcr-abl-positive Zelllinien im Tier zu implantieren ¹³⁰, native, humane CML-Zellen in SCID-Mäuse zu implantieren ^{131 132} und diverse weitere Versuche. Eine Schwäche dieser Modelle ist, dass sie nur die Blastenkrise modellgetreu abbilden. Der gegenwärtig brauchbarste Ansatz nutzt bcr-abl-Retroviren und kann eine humane CML in chronischer Phase annähernd naturgetreu abbilden ¹³³. Auch hier gibt es Schwächen, so sterben die Mäuse an einer pulmonalen Hämorrhagie. Dies ist für die humane CML zwar nicht typisch, aber dennoch stellt dieses Modell einen echten Fortschritt dar.

Als humanes Modell eignen sich aus ersichtlichen Gründen nur Zelllinien und einzelne Zellen von Blut und Knochenmark. Ein großer Vorteil liegt hier in der einfachen Zugänglichkeit dieser Zellen und deren direktem Modellcharakter.

Zu Zelllinien ist zu sagen, dass es auch hier bis zum heutigen Tage kein befriedigendes Modell der chronischen Phase, die vom therapeutischen Aspekt her die interessanteste Krankheitsphase darstellt, gibt. Etablierte Zelllinien sind die K562, die in experimentellen Studien am häufigsten verwendet wird und einer erythroiden Blastenkrise entspricht und die BV173 mit lymphoidem Phänotyp ¹³⁴. Speziell fokussiert auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eignet sich die K562 nicht, denn auf K562-Zellen werden die zu untersuchenden Rezeptoren überhaupt nicht exprimiert.

Somit blieb für experimentelle Zwecke nur die Nutzung nativ gewonnener Patientenzellen. Als Zellkulturverfahren sind insbesondere der Koloniebildungstest und Knochenmarklangzeitkulturen etablierte Methoden. Die Knochenmarklangzeitkultur hat gerade bei der CML eine entscheidende Schwäche: Nach einer gewissen Zeit setzt sich der bcr-abl negative Klon durch ¹³⁵. Wir verwendeten den Koloniebildungstest als international gängigen Assay ¹³⁶, wobei wir Liganden für die jeweils zu untersuchenden Rezeptoren zusetzten. Eine Schwäche des Tests ist die Dauer von 14 Tagen, bis man zu einem auswertbaren Ergebnis kommt. Der große Vorteil ist, dass man zu einem gegebenen Zeitpunkt, dem Ansetzen des Tests, alle CD34⁺ Zellen und nur diese erreicht, denn alle anderen Zellen können in dem Medium nicht wachsen.

Wir untersuchten drei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren näher, mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Bei der Verwendung von Liganden für den μ -Opioidrezeptor fanden wir keine wesentliche Beeinflussung. Dies steht im Widerspruch zu vorbestehenden Untersuchungen an μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäusen, denn diese zeigten eine verstärkte Proliferationstendenz von multipotenten, erythroiden und granulo-monozytär determinierten Progenitorzellen ¹²⁵. Eine mögliche Erklärung für dieses abweichende Ergebnis liegt in der langen Dauer des Assays von 14 Tagen. Bei den Liganden handelte es sich um ein Peptid ¹³⁷ bzw. den auch als Therapeutikum eingesetzten Antagonisten Naloxon (Narcanti®). Die kurze Halbwertszeit des

Naloxons ist allgemein bekannt und stellt auch ein therapeutisches Problem in der Behandlung der Opiatintoxikation dar. Vielleicht sind die Liganden einfach nicht lang genug stabil. Die Vermutung, der μ -Opioidrezeptor könnte dennoch Einfluss auf das Zellwachstum nehmen, wird zudem durch Analysen zur MAP-Kinase-Aktivierung des μ -Opioidrezeptors in CD34⁺CD38⁻ Nabelschnurblutstammzellen gestützt ¹³⁸. Generell muss man zu den in-vivo-Bedingungen in einem Individuum sagen, dass endogene Opiode wie β -Endorphin im Serum vorkommen ¹³⁹ und Veränderungen des Blutspiegels bei verschiedensten Erkrankungen eine Rolle spielen können wie etwa bei der Polymyositis ¹⁴⁰. Als gesichert gilt dieser Zusammenhang für psychische Erkrankungen wie die Depression ¹⁴¹. Somit ist es nachvollziehbar, dass in vivo ausreichend Liganden für eine eventuelle Stimulation vorhanden wären.

Anders verhält es sich mit der Situation beim Adenosin-A1-Rezeptor, hier fiel ein signifikanter Effekt auf. Adenosin ist ein ubiquitärer Stoff, der normalerweise im gesamten Körper in annähernd gleichen Konzentrationen vorhanden ist ¹⁴². Der Abbau des Adenosins im Körper läuft über das ebenfalls ubiquitäre Enzym Adenosindesaminase, endogenes Adenosin hat lediglich eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Generell ist die Beeinflussung des Zellwachstums durch den A1-Rezeptor bisher gut erforscht und viel darüber bekannt. Beispielsweise konnte in transfizierten CHO-Zellen gezeigt werden, dass passende Liganden die MAP-Kinase aktivieren ¹⁴³.

Der selektive Antagonist 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin, früher auch PD 116,948 genannt ¹⁴⁴, vermag eine Wachstumshemmung um bis zu fast 50% zu bewirken. Nach unseren Daten handelt es sich um den ersten direkten Beweis einer Beeinflussbarkeit der Leukämogenese durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beim Menschen. Der selektive Agonist 2-Chloro-N⁶-Cyclopentyladenosin ¹⁴⁵ hatte im Gegensatz dazu keinen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum. Allerdings beschrieben Pospisil et al. ¹⁴⁶ bereits durch Verwendung des Thrombozytenaggregationshemmers Dipyridamol, welcher den Transport von Adenosin nach intrazellulär senkt, in Koinkubation mit Adenosinmonophosphat als „prodrug“ für Adenosin, eine relative Erhöhung des Wachstums in der Hämatopoese der Maus.

Wie bereits erwähnt, hat das gegenwärtige Standardtherapeutikum für die CML, Imatinib, einen Schwachpunkt: Es erreicht die besonders frühen Stammzellen nicht oder nicht ausreichend ^{61 62}. Vermutet wird hier, dass sich diese Zellen zu langsam durch den Zellzyklus bewegen, um Imatinib zu einer ausreichenden Toxizität zu verhelfen. Eine Kombination mit einem A1-Antagonisten könnte hierbei eine attraktive Ergänzung der Therapie darstellen, insbesondere wenn man bedenkt, dass gerade die frühen Stammzellen den Rezeptor verstärkt exprimieren. Die Wachstumsinhibition durch DPCPX konnte durch Zugabe des spezifischen Agonisten CCPA aufgehoben werden.

Unklare Ergebnisse liefert hier unsere Analyse der Bedeutung des GABA-B-Rezeptors. Die Zellkulturergebnisse mit den selektiven Liganden SKF 97541 ¹⁴⁷ und CGP 52432 ¹⁴⁸ zeigten hierbei keine signifikante Inhibition vergleichbar dem A1 Rezeptor. Dennoch stellt sich hier die Frage nach einer Bedeutung des GABA-B-Rezeptors. Die Ergebnisse sahen wie folgt aus: Gegenüber der Kontrolle konnten wir in allen Ansätzen mit Agonist oder Antagonist, unabhängig von der Konzentration, eine Inhibition des Wachstums zeigen. Die Ursache dieses Untersuchungsergebnisses bleibt unklar.

Auch GABA kann nicht nur im zentralen Nervensystem, sondern auch peripher nachgewiesen werden. Funktionelle Rezeptoren konnte man bis dato in verschiedensten Geweben nachweisen wie beispielsweise im Gastrointestinaltrakt ¹⁴⁹, in Spermatozoen ¹⁵⁰ und verschiedensten Tumorgeweben ¹⁵¹ ¹⁵². Interessant ist, dass GABA im Tumorgewebe kumulieren kann: Verschiedene Tumoren regulieren die Enzyme der GABA-Synthese hoch ¹⁵³. Zudem konnte gezeigt werden, dass GABA das Tumorstadium negativ beeinflusst ¹⁵⁴. Eine potentielle Bedeutung im Hinblick auf die CML wäre also denkbar. Problematisch bleibt jedoch die Unabhängigkeit von Konzentration und einzelner Ansatz, die wiederum nur Raum für Spekulationen zulässt. Eine mögliche Erklärung liegt wiederum in der Stabilität der Liganden, ähnlich wie beim Opioidrezeptor. Die Kumulation zytotoxischer und damit unspezifisch hemmender Metaboliten scheint möglich. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Regulation des Proliferationsstoffwechsels durch GABA in der CML in

einem sehr diffizilen Gleichgewicht steht und dieses nur sehr wenig nach oben als auch nach unten verändert werden darf, doch dann müssten sich die Effekte in der Koinkubation zumindest partiell aufheben. Somit müssen wir diese Fragestellung leider offen lassen, was aus therapeutischer Sicht schade ist, denn Modulation des GABA-Stoffwechsels ist ein gängiges Prinzip in der Therapie der Epilepsie und ein Agens, das hierbei zur Anwendung kommen könnte, wäre der GABA-B-Agonist Baclofen (Lioresal®).

Trägt man alles zusammen, kann man die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend zusammenfassen, dass Genexpressionsanalysen ein probates Mittel darstellen, um sogenannte Kandidatengene zu identifizieren und wir im Hinblick auf die CML als solche Kandidatengene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifizieren konnten. Wir konnten zeigen, dass der Adenosin-A1-Rezeptor eine Rolle in der Pathophysiologie spielt und ein potentiell attraktives Ziel für künftige, therapeutische Ansätze darstellen könnte. Insgesamt handelt es sich nach unseren Daten um den ersten Beweis für die Beeinflussbarkeit von Leukämiewachstum durch Neurotransmitter. Somit konnten wir einen neuen, sehr interessanten Aspekt der CML aufdecken.

VII. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Ulf Butterweck

Wohnort: Hospitalstrasse 3
42553 Velbert

E-Mail: ulf.butterweck@web.de

Geburtstag und -ort: 15. März 1978 in Wuppertal-Elberfeld

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: Deutschland

Vater: Udo Butterweck, Beamter i.R.

Mutter: Margit Butterweck, Verwaltungsangestellte i.R.

Schulbildung

August 1984 - Juli 1988: Besuch der städtischen evangelischen
Grundschule Velbert-Nevigis

August 1988- Juli 1997: Besuch des städtischen Gymnasiums an der
Bayreuther Strasse in Wuppertal, Erwerb der
allgemeinen Hochschulreife
Durchschnittsnote: befriedigend (3,0)

Geringfügige Beschäftigung

Februar 1995 – März 2006: Tätigkeit als Aushilfe in der Verwaltung der
Kliniken St. Antonius, Wuppertal

Mai 2004 – Juli 2004: Studentische Hilfskraft am Institut für Patho-
logie des Universitätsklinikums Düsseldorf,
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut-Erich Gabbert

Beruflicher Werdegang

- August 1997 - August 1998: Zivildienst bei der Feuerwehr Velbert, parallel Erwerb der Ausbildung als Rettungsassistent
- Januar 1999 – Dezember 1999: Schulische und praktische Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Rettungsassistentenschule am Klinikum Niederberg, Bethesda-Krankenhaus Wuppertal und Feuerwehr Erkrath
Gesamtnote: Sehr gut (1,33)
- Januar 2000 – März 2000: Arbeit als Rettungsassistent im Krankentransportdienst der Feuerwehr Mettmann

Akademischer Werdegang

15. April 2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
21. April 2002: Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf, Gesamtnote: Gut (1,66)
25. April 2003: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Düsseldorf, Gesamtnote: Gut (2,00)
2. September 2005: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Düsseldorf, Gesamtnote: Gut (1,66)
14. November 2006: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Mülheim, Gesamtnote: Gut (2,00)

Famulaturen

01. – 30. September 2003: Famulatur am Institut für medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Pfeffer

09. Februar – 09. März 2004: Famulatur an der Klinik für Allgemein-, Unfall-, und Visceralchirurgie des Klinikums Niederberg, Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Werner-Krawzak
02. – 31. August 2004: Famulatur an der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Stimm- und Sprachstörungen, plastische Operationen des Alfried-Krupp-Krankenhauses Essen, Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Lamprecht
07. Februar – 08. März 2005: Famulatur am Zentrum für Innere Medizin der Kliniken Essen-Süd, Essen, Direktor: Prof. Dr. med. Werner Heit

Praktisches Jahr

- Ausbildende Stätte: Evangelisches Krankenhaus Mülheim, Wertgasse 30, 45468 Mülheim an der Ruhr
17. Okt. 2005 – 03. Feb. 2006: 1. Tertial - Chirurgie, ausbildende Chefärzte: Prof. Dr. med. Klaus Balzer, Prof. Dr. med. Heinz-Jochen Gassel, Dr. med. Willy Izbicki
06. Februar – 26. Mai 2006: 2. Tertial - Anästhesiologie und Intensivmedizin, ausbildender Chefarzt: Prof. Dr. med. Jörg-Hans Vettermann
29. Mai – 15. September 2006: 3. Tertial - Innere Medizin / Kardiologie, ausbildender Chefarzt: Prof. Dr. med. Feraydoon Niroomand

Sonstige Praktika

- September – Dezember 1998: Praktische Tätigkeit im Zentralinstitut für Anästhesie der Kliniken St. Antonius, Wuppertal, Chefärztin Dr. med. Rita-Renate Hesslenberg

22. März – 2. April 2004: Praktische Tätigkeit im Rahmen des Unterrichtsabschnittes „Gynäkologie und Geburtshilfe“ in der Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe des evangelischen Krankenhauses Mettmann, Chefarzt Dr. med. Gerald Bürkle
6. – 17. September 2004: Praktische Tätigkeit im Rahmen des Unterrichtsabschnittes „Allgemeinmedizin“ in der allgemeinmedizinischen Praxis Dr. med. Gerda-Maria Schwantes, Wuppertal

Wissenschaftliche Tätigkeit

- August 2002 -Juni 2005 Experimentelle Studien zur Genexpression maligner, CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen bei chronisch-myeloischer Leukämie an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

Veröffentlichung

- August 2005 : R. Kronenwett, U. Butterweck et al. Distinct molecular phenotype of malignant CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. Oncogene. 2005; 24: 5313-5324.

Sonstiges

Fremdsprachliche Kenntnisse: Englisch, Latein

Softwarekenntnisse: Microsoft® Word®, Excel® und Powerpoint®, ITB AG® ITBmed®

VIII. Danksagung

Allen nachfolgend Genannten danke ich dafür, dass sie dazu beigetragen haben, die Arbeiten zu dieser Dissertation zu einem einmaligen Erlebnis zu machen. Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater und Betreuer, Privatdozent Dr. med. Ralf Kronenwett, für die Einführung in die Molekularbiologie der CML, für die Vergabe des eigentlichen Themas und dafür, dass er mir während der Arbeit im Labor, der Auswertung der Daten und der Erstellung der Dissertation stets hilfreich und freundschaftlich zur Seite stand.

Weiterhin gilt mein Dank dem gesamten Team der Labors der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie für Ihre Anleitung und Hilfe während der experimentellen Arbeit, insbesondere den Dres. med. Neumann et Gräf, meinen Mitdoktoranden, Frau cand. med. Nicole Roes und Herrn cand. med. Thomas Schröder, Frau Dipl.-Biol. Simone Bork, Frau Elke Rosenbaum-König, Frau Hildegard Gaussmann und Frau Anke Boeckmann. Selbstverständlich gilt dieser Dank auch allen, die ich hier vergessen haben sollte.

Besonderer Dank geht an Frau Bärbel Junge und Herrn Dr. med. Ulrich Steidl für die Erstellung der cDNA-Arrays, deren Ergebnisse die Grundlage für alle nachfolgenden Arbeiten darstellte und Herrn Dipl.-Math. Slawomir Kliszewski für die Auswertung selbiger und seine Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Ich danke außerdem Frau cand. med. Anna Christina Küpper für das Korrekturlesen.

An dieser Stelle sei auch Herrn Professor Dr. med. Christopher Poremba für die Übernahme des Koreferates und Herrn Privatdozent Dr. med. Colin MacKenzie für die Prüfung im dritten Fach mein herzlichster Dank ausgesprochen.

Zuletzt danke ich dem Direktor der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, Herrn Professor Dr. med. Rainer Haas, für seine bereitwillige Aufnahme in der Klinik und sein fortwährendes Interesse am Fortgang der Arbeit und meinen Eltern und Freunden für ihre ständige Unterstützung im Studium und bei der Erstellung dieser Arbeit.

IX. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u>	<u>Typ, Bezeichnung, Hersteller und Ort der in dieser Arbeit verwendeten Groß- und Kleingeräte</u>	<u>29</u>
<u>Tabelle 2:</u>	<u>Typ, Bezeichnung, Hersteller und Ort des in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterials</u>	<u>30</u>
<u>Tabelle 3:</u>	<u>Bezeichnung, Hersteller und Ort der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien</u>	<u>30</u>
<u>Tabelle 4:</u>	<u>Charakteristiken und Laborparameter der Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme des Untersuchungsmaterials</u>	<u>32</u>
<u>Tabelle 5:</u>	<u>Name, chemische Bezeichnung, Hersteller, Lösungsmittel und Zielrezeptor der in Zellkultur verwendeten Liganden</u>	<u>40</u>
<u>Tabelle 6:</u>	<u>Genname, Abkürzung und wichtige Eigenschaften der für die einzelnen Gene verwendeten Primer</u>	<u>51</u>

X. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u>	<u>Blutausstrich bei chronischer myeloischer Leukämie</u>	<u>13</u>
<u>Abbildung 2:</u>	<u>Schematische Darstellung der Hämatopoese</u>	<u>15</u>
<u>Abbildung 3:</u>	<u>Vermutete Pathomechanismen in der CML</u>	<u>19</u>
<u>Abbildung 4:</u>	<u>Schematische, vereinfachte Darstellung wichtiger Signaltransduktionswege des bcr-abl Onkoproteins</u>	<u>20</u>
<u>Abbildung 5:</u>	<u>Qualitätskontrolle der immunmagnetischen An- reicherung durch Durchflusszytometrie</u>	<u>56</u>
<u>Abbildung 6:</u>	<u>Darstellung signifikant differentiell exprimierter Gene in CML-CD34⁺ Zellen</u>	<u>58</u>
<u>Abbildung 7:</u>	<u>Hierarchische Clusteranalyse der verschiedenen Zellpopulationen</u>	<u>62</u>
<u>Abbildung 8:</u>	<u>Quantitative "real-time" RT-PCR mit der LightCycler®- Technik</u>	<u>64</u>
<u>Abbildung 9:</u>	<u>Quantitative "real-time" RT-PCR mit der ABIPrism 7900 HT®-Technik</u>	<u>64</u>
<u>Abbildung 10:</u>	<u>Ergebnisse der quantitativen „real-time“ RT-PCR</u>	<u>65</u>
<u>Abbildung 11:</u>	<u>Repräsentatives Experiment der 2-Farben-Fluoreszenz zur Analyse der reifungsassoziierten Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen bei CML</u>	<u>66</u>
<u>Abbildung 12:</u>	<u>Ergebnisse der 2-Farben-Fluoreszenz zur Analyse der reifungsassoziierten Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen bei CML</u>	<u>67</u>
<u>Abbildung 13:</u>	<u>Repräsentatives Experiment der 2-Farben-Fluoreszenz der Expression G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34⁺ Zellen bei CML im Vergleich zum Gesunden</u>	<u>69</u>

<u>Abbildung 14: Ergebnisse der 2-Farben-Fluoreszenz zur Expression</u>	<u>70</u>
G-Protein-gekoppelter Rezeptoren auf CD34 ⁺ Zellen bei CML im Vergleich zu Gesunden	
<u>Abbildung 15: Einfluss der Modulation des Opioidrezeptors μ1 auf</u>	<u>72</u>
das klonogene Wachstum	
<u>Abbildung 16: Einfluss der Modulation des GABA-B-Rezeptors auf</u>	<u>73</u>
das klonogene Wachstum	
<u>Abbildung 17: Fotografische Darstellung der Inhibition des klono-</u>	<u>73</u>
genen Wachstums von CML-Progenitorzellen durch einen A1-Antagonisten	
<u>Abbildung 18: Veränderung des klonogenen Wachstums von CML-</u>	<u>74</u>
Progenitorzellen durch Modulation des Adenosin-A1- Rezeptors	
<u>Abbildung 19: Veränderung des klonogenen Wachstums von</u>	<u>75</u>
gesunden Progenitorzellen durch Modulation des Adenosin-A1-Rezeptors	

XI. Literaturverzeichnis

- ¹ Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med.* 1977; 63: 125-130.
- ² Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood.* 2002; 100: 2292-2302. Review.
- ³ Faderl S, Talpaz M, Kantarjian HM et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 341: 164-172. Review.
- ⁴ Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132: 1497.
- ⁵ Lange T, Bumm T, Otto S, Niederwieser D, Deininger MW et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy. *Haematologica.* 2004; 89: 49-57.
- ⁶ Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Freireich EJ et al. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 1988; 61: 1441-1446
- ⁷ Sokal JE, Baccarani M, Russo D, Tura S. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol.* 1988; 25: 49-61. Review.
- ⁸ Griffin JD, Todd RF, Ritz J, Schlossmann SF et al. Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1983; 61: 85-91.
- ⁹ Civin CI, Trischmann T, Gee A et al. Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol.* 1996; 14: 2224-2233.
- ¹⁰ Steidl U, Kronenwett R, Martin S, Haas R. Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitam Horm.* 2003; 66: 1-28. Review.
- ¹¹ Civin CI, Strauss LC, Shaper JH et al. Antigenic analysis of hematopoiesis III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984; 133: 157-165.

- ¹² Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 2804-2808.
- ¹³ Terstappen LW, Huang S Analysis of bone marrow stem cell. *Blood cells*. 1994; 20: 45-61.
- ¹⁴ Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100 Suppl 1:11842-11849. Review.
- ¹⁵ Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Sawyers CL, Weissman IL et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004; 351: 657-667.
- ¹⁶ Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96: 3343-3356. Review.
- ¹⁷ Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973; 243: 290-293.
- ¹⁸ Groffen J, Stephenson JR, Grosveld G. et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984; 36: 93-99.
- ¹⁹ Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983; 306: 277-280.
- ²⁰ Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996; 88: 2375-2384.
- ²¹ van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell*. 1989; 58: 669-678.
- ²² Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol*. 1995; 7: 255-266. Review.

- ²³ Lewis JM, Schwartz MA. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem*. 1998; 273: 14225-14230.
- ²⁴ Yuan ZM, Shioya H, Weichselbaum R, Kufe D et al. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*. 1999; 399: 814-817. Erratum in: *Nature* 1999; 400: 792.
- ²⁵ van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol*. 1999; 5: 179-186. Review.
- ²⁶ Voncken JW, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N. Bcr/Abl associated leukemogenesis in bcr null mutant mice. *Oncogene*. 1998; 16: 2029-2032.
- ²⁷ Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*. 1990; 247: 1079-1082.
- ²⁸ Reiter A, Sohal J, Kulkarni S, Goldman JM, Cross NC et al. Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the 1(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome. *Blood*. 1998; 92: 1735-1742.
- ²⁹ Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994; 77: 307-316.
- ³⁰ Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987; 328: 342-344.
- ³¹ Puil L, Liu J, Gish G, Pawson T et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J*. 1994; 13: 764-773.
- ³² Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1994; 83: 2038-2044.
- ³³ Zhao RC, Tarone G, Verfaillie CM. Presence of the adhesion inhibitory $\beta 1 B$ integrin isoform on CML but not normal progenitors is at least in part responsible for the decreased CML progenitor adhesion. *Blood*. 1997; 90: 393a (Abstract).
- ³⁴ Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Dai Z, Schlessinger J et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993; 75: 175-185.

- ³⁵ Watzinger F, Gaiger A, Lion T et al. Absence of N-ras mutations in myeloid and lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 1994; 54: 3934-3938.
- ³⁶ Sanchez-Garcia I, Martin-Zanca D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol.* 1997; 267: 225-228.
- ³⁷ Wilson-Rawls J, Xie S, Liu J, Laneuville P, Arlinghaus RB. P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta(c) subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. *Cancer Res.* 1996; 56: 3426-3430.
- ³⁸ Jonuleit T, Peschel C, Buchdunger E, Aulitzky WE et al. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol.* 1998; 100: 295-303.
- ³⁹ Chai SK, Nichols GL, Rothman P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 1997; 159: 4720-4728.
- ⁴⁰ de Groot RP, Raaijmakers JA, Koenderman L et al. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood.* 1999; 94: 1108-1112
- ⁴¹ Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Calabretta B et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood.* 1995; 86: 726-736.
- ⁴² Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Calabretta B et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997; 16: 6151-6161.
- ⁴³ Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.* 1997; 88: 435-437. Review.
- ⁴⁴ del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Nunez G et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of bad through the protein kinase akt. *Science.* 1997; 278: 687-689.
- ⁴⁵ Neshat MS, Raitano AB, Sawyers CL et al. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 1179-1186.

- ⁴⁶ Majewski M, Nieborowska-Skorska M, Salomoni P, Skorski T et al. Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res.* 1999; 59: 2815-2819.
- ⁴⁷ Horowitz MM, Rowlings PA, Passweg JR. Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17 Suppl 3: S5-S6.
- ⁴⁸ van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J et al. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20: 553-560.
- ⁴⁹ Cliff RA, Anasetti C. Allografting for chronic myeloid leukemia. *Bailleres Clin Hematol.* 1997; 10: 319-336. Review.
- ⁵⁰ Slavin S, Aker M, Shapira MY, Or R et al. Reduced-intensity conditioning for the treatment of malignant and life-threatening non-malignant disorders. *Clin Transpl.* 2003;:275-282. Review.
- ⁵¹ Lee MY, Chiou TJ, Yang MH, Chen PM et al. Relatively favorable outcomes of post-transplant pulmonary function in patients with chronic myeloid leukemia receiving non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2005; 74: 152-157.
- ⁵² Talpaz M, Kantarjian HM, Gutterman J et al. Clinical Investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1987; 69: 1280-1288.
- ⁵³ Hehlmann R, Berger U, Hochhaus A et al. (German CML study group) Randomized comparison of interferon alpha and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon alpha and hydroxyurea. *Leukemia.* 2003; 17: 1529-1537.
- ⁵⁴ Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C et al. (International ST1571 CML study group) Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002; 346: 645-652. Erratum in: *N Engl J Med.* 2002; 346: 1923.

- ⁵⁵ Muller MC, Gattermann N, Hehlmann R, Hochhaus A et al. Dynamics of Bcr-abl mRNA Expression in first-line-therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon α /ara-C. *Leukemia*. 2003; 17: 2392-2400.
- ⁵⁶ Deininger MW, O'Brien SG, Ford JM, Druker BJ. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1637–1647. Review.
- ⁵⁷ Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Lydon NB et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-abl positive cells. *Nat Med*. 1996; 2: 561-566.
- ⁵⁸ Deininger M, Goldman JM Lydon NB, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL positive cells. *Blood*. 1997; 90: 3691-3698.
- ⁵⁹ Druker BJ, Talpaz M, Resta D et al. Clinical efficiency and safety of an ABL-specific tyrosine kinase inhibitor as targeted therapy for chronic myeloid leukemia (abstract). *Blood*. 1999; 94: 368.
- ⁶⁰ Herbst RS, Sandler AB. Overview of the current status of human epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2004; 6 Suppl 1: S7-S19.
- ⁶¹ Holyoake TL, Jiang X, Eaves C, Eaves A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1999; 94: 2056-2064.
- ⁶² Graham SM, Jørgensen HG, Holyoake TL et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002; 99: 319-325.
- ⁶³ Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Sawyers CL et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002; 2: 117–125.
- ⁶⁴ Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Hughes TP et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002; 99: 3472–3475.

- ⁶⁵ Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, Hehlmann R et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–2196.
- ⁶⁶ Steidl U, Kronenwett R, Haas R et al. Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002; 99: 2037-2044.
- ⁶⁷ Goolsby J, Marty MC, Trisler D et al. Hematopoietic progenitors express neural genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 14926-14931.
- ⁶⁸ Terskikh AV, Easterday MC, Li L, Weissmann IL et al. From hematopoiesis to neurogenesis: evidence of overlapping genetic programs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 7934-7939.
- ⁶⁹ Steidl U, Bork S, Schaub S, Kronenwett R, Haas R et al. Primary human CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells express functionally active receptors of neuromediators. *Blood*. 2004; 104: 81-88.
- ⁷⁰ Nowicki MO, Skorski T et al. Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene*. 2003; 22: 3952-3963.
- ⁷¹ Ohmine K, Ota J, Ueda M, Mano H et al. Characterization of stage progression in chronic myeloid leukemia by DNA microarray with purified hematopoietic stem cells. *Oncogene*. 2001; 20: 8249-8257.
- ⁷² Flower DR. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1422: 207-234. Review.
- ⁷³ Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol*. 1999; 38: 1083-1152. Review.
- ⁷⁴ Marinissen MJ, Gutkind JS. G-Protein-coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 368-376. Review.
- ⁷⁵ Couve A, Calver AR, Fairfax B, Moss SJ, Pangalos MN. Unravelling the unusual signalling properties of the GABA(B) receptor. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68: 1527-1536. Review.
- ⁷⁶ Pupo AS, Minneman KP. Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system. *CNS Spectr*. 2001; 6: 656-662.

- 77 Hein TW, Wang W, Zoghi B, Muthuchamy M, Kuo L. Functional and molecular characterization of receptor subtypes mediating coronary microvascular dilation to adenosine. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 271-282.
- 78 Cross NC, Melo JV, Feng L, Goldman JM. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in haematological disorders. *Leukemia.* 1994; 1: 186-189.
- 79 Kronenwett R, Graf T, Nedbal W, Haas R. et al. Inhibition of angiogenesis in vitro by alphav integrin-directed antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther.* 2002; 7: 587-596.
- 80 Wain HM, Bruford EA, Povey S et al. Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics.* 2002; 79: 464-470.
- 81 Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene.* 1997; 15: 2333-2342.
- 82 Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994; 83: 2038-2044.
- 83 Gora-Tybor J, Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The susceptibility of Philadelphia chromosome positive cells to FAS-mediated apoptosis is not linked to the tyrosine kinase activity of BCR-ABL. *Br J Haematol.* 1998; 103: 716-720.
- 84 Traycoff CM, Halstead B, Rice S, Cornetta K et al. Chronic myelogenous leukaemia CD34+ cells exit G0/G1 phases of cell cycle more rapidly than normal marrow CD34+ cells. *Br J Haematol.* 1998; 102: 759-767.
- 85 Bedi A, Barber JP, Bedi GC Jones RJ et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood.* 1995; 86: 1148-1158.
- 86 Patel NM, Nozaki S, Shortle NH, Nakshatri H et al. Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells with constitutively active NF-kappaB is enhanced by IkappaBalpha super-repressor and parthenolide. *Oncogene.* 2000; 19: 4159-4169.
- 87 Ayala GE, Dai H, Rowley D et al. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. *Cancer Res.* 2004; 64: 6082-6090.

- ⁸⁸ Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Jaquot T et al. Genistein inhibits constitutive and inducible NF-kappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 473–481.
- ⁸⁹ Ni H, Ergin M, Huang Q, Alkan S et al. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol*. 2001; 115: 279–286.
- ⁹⁰ Roger R, Issaad C, Pallardy M, Breard J et al. BCR-ABL does not prevent apoptotic death induced by human natural killer or lymphokine-activated killer cells. *Blood*. 1996; 87: 1113-1122.
- ⁹¹ Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002; 418: 244-251. Review.
- ⁹² Deininger MW, Vieira S, Melo JV et al. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2000; 60: 2049-2055.
- ⁹³ Ben-Ze'ev A, Geiger B. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10: 629-639. Review.
- ⁹⁴ Korman NJ, Eyre RW, Klaus-Kovtun V, Stanley JR Demonstration of an adhering-junction molecule (plakoglobin) in the autoantigens of pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris. *N Engl J Med*. 1989; 321: 631-635.
- ⁹⁵ Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Riethmuller G et al. Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. *Ciba Found Symp*. 1995; 189: 157-170. Discussion: 170-173, 174-176. Review.
- ⁹⁶ Muller-Tidow C, Steffen B, Berdel WE, Serve H et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 2890-2904.
- ⁹⁷ Zheng X, Beissert T, Henschler R, Ruthardt M et al. Gamma-catenin contributes to leukemogenesis induced by AML-associated translocation products by increasing the self-renewal of very primitive progenitor cells. *Blood*. 2004; 103: 3535-3543.
- ⁹⁸ Dai Z, Quackenbush RC, Pendergast AM et al. Oncogenic abl and src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a ras-independent pathway. *Genes Dev*. 1998; 12: 1415-1424.

- ⁹⁹ Reddy GK. New developments with bortezomib in treating multiple myeloma. *Clin Lymphoma*. 2004; 4: 215-216.
- ¹⁰⁰ Richardson PG, Hideshima T, Mitsiades C, Anderson K. Proteasome inhibition in hematologic malignancies. *Ann Med*. 2004; 36: 304-314. Review.
- ¹⁰¹ Yu C, Rahmani M, Grant S et al. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to ST1571. *Blood*. 2003; 102: 3765-3774.
- ¹⁰² Chaganti RS, Balazs I, Stavnezer E et al. The cellular homologue of the transforming gene of SKV avian retrovirus maps to human chromosome region 1q22---q24. *Cytogenet Cell Genet*. 1986; 43: 181-186.
- ¹⁰³ Namciu S, Lyons GE, Stavnezer E et al. Enhanced expression of mouse c-ski accompanies terminal skeletal muscle differentiation in vivo and in vitro. *Dev Dyn*. 1995; 204: 291-300.
- ¹⁰⁴ Claycomb WC, Lanson NA. Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. *Biochem J*. 1987; 247: 701-706.
- ¹⁰⁵ Atanasoski S, Notterpek L, Stavnezer E, Suter U et al. The protooncogene Ski controls Schwann cell proliferation and myelination. *Neuron*. 2004; 43: 499-511.
- ¹⁰⁶ Namciu S, Lieberman MA, Stavnezer E. Induction of the c-ski proto-oncogene by phorbol ester correlates with induction of megakaryocyte differentiation. *Oncogene*. 1994; 9: 1407-1416.
- ¹⁰⁷ Pearson-White S, Deacon D, Quesenberry PJ et al. The ski/sno protooncogene family in hematopoietic development. *Blood*. 1995; 86: 2146-2155.
- ¹⁰⁸ Dahl R, Kieslinger M, Beug H, Hayman MJ. Transformation of hematopoietic cells by the Ski oncoprotein involves repression of retinoic acid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 11187-11192.
- ¹⁰⁹ Luo K, Stroschein SL, Zhou Q et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev*. 1999; 13: 2196-2206.
- ¹¹⁰ Sun Y, Liu X, Eaton EN, Lodish HF, Weinberg RA. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 12442-12447.

- ¹¹¹ Estey E, Koller C, Lopez-Berestein G, Kantarjian H et al. Potential curability of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia without use of chemotherapy: the example of liposomal all-trans retinoic acid. *Blood*. 2005; 105: 1366-1367.
- ¹¹² Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS et al. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ -subunits. *Nature*. 1994; 369: 418-420.
- ¹¹³ Daub H, Wallasch C, Ullrich A et al. Signal characteristics of G-Protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J*. 1997; 16: 7032-7044.
- ¹¹⁴ Luttrell LM, della Rocca GJ, Lefkowitz RJ et al. G $\beta\gamma$ subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*. 1997; 272: 4637-4644.
- ¹¹⁵ Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science*. 1986; 234: 161-166. Review.
- ¹¹⁶ Gutkind JS. Cell growth control by G-protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*. 1998; 17: 1331-1342. Review.
- ¹¹⁷ Parma J, Duprez L, Vassart G et al. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. 1993; 365: 649-651.
- ¹¹⁸ Heasley LE. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*. 2001; 20: 1563-1569. Review.
- ¹¹⁹ Nicholas J, Cameron KR, Honess RW. Herpesvirus saimiri encodes homologues of G-Protein-coupled receptors and cyclins. *Nature*. 1992; 355: 362-365.
- ¹²⁰ Calvo W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am J Anat*. 1968; 123: 315-328.
- ¹²¹ Maestroni GJ. Catecholaminergic regulation of hematopoiesis in mice. *Blood*. 1998; 92: 2971-2973.
- ¹²² Benestad HB, Strom-Gundersen I, Nja A et al. No neuronal regulation of murine bone marrow function. *Blood*. 1998; 91: 1280-1287.

- ¹²³ Miyan JA, Broome CS, Whetton AD. Neural regulation of bone marrow. *Blood*. 1998; 92: 2971-2973.
- ¹²⁴ Iversen PO, Hjeltnes N, Holm B, Benestad HB et al. Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood*. 2000; 96: 2081-2083.
- ¹²⁵ Tian M, Broxmeyer HE, Fan Y, Yu L et al. Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1997; 185: 1517-1522.
- ¹²⁶ Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000; 404: 193-197
- ¹²⁷ Rapp JP, Christian JJ. Splenic extramedullary hematopoiesis in grouped male mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1963; 114: 26-28.
- ¹²⁸ Brady LW, Markoe AM, Ruggieri S, Brodsky I. The effect of sublethal x-irradiation on erythropoiesis in the mouse. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1976; 1: 471-479.
- ¹²⁹ Jacobsen N, Fauerholdt L. Human granulocytopoietic colonies in diffusion chambers in mice: growth of colonies and the effect of host irradiation. *Scand J Haematol*. 1976; 16: 101-111.
- ¹³⁰ Ilaria RL, van Etten RA. The SH2 domain of P210BCR/ABL is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood*. 1995; 86: 3897-3904.
- ¹³¹ Sawyers CL, Witte ON et al. Propagation of human blastic myeloid leukemias in the SCID mouse. *Blood*. 1992; 79: 2089-2098.
- ¹³² Dazzi T, Capelli D, Hasserjian R, Goldman JM, Gordon MY et al. The kinetics and extent of engraftment of chronic myelogenous leukemia cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice reflect the phase of the donor's disease: an in vivo model of chronic myelogenous leukemia biology. *Blood*. 1998; 92: 1390-1396.
- ¹³³ Zhang X, Ren R. Bcr-abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1998; 92: 3829-3840.

- ¹³⁴ Drexler HG, MacLeod RA, Uphoff CC. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leuk Res.* 1999; 23: 207-215. Review.
- ¹³⁵ Coulombel L, Eaves AC et al. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 1983; 308: 1493-1498.
- ¹³⁶ Miller CL, Lai B. Human and mouse hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol.* 2005; 290: 71-89.
- ¹³⁷ Zajac JM, Roques BP. Differential properties of mu and delta opiate binding sites studied with highly selective ligands. *Life Sci.* 1983; 33 Suppl 1: 155-158.
- ¹³⁸ Rozenfeld-Granot G, Toren A, Rechavi G et al. MAP kinase activation by mu opioid receptor in cord blood CD34(+)CD38(-) cells. *Exp Hematol.* 2002; 30: 473-480.
- ¹³⁹ Nakao K, Nakai Y, Oki S, Horii K, Imura H. Presence of immunoreactive beta-endorphin in normal human plasma: a concomitant release of beta-endorphin with adrenocorticotropin after metyrapone administration. *J Clin Invest.* 1978; 62: 1395-1398.
- ¹⁴⁰ Liu J, Li J, Zhai N, Geng L, Song F. Detection of the levels of neuropeptides, ACTH and cortisol in the blood of patients with polymyositis/dermatomyositis and their significance. *J Dermatol.* 2004; 31: 392-397.
- ¹⁴¹ Goodwin GM, Austin MP, Dick H et al. The elevation of plasma beta-endorphin levels in major depression. *J Affect Disord.* 1993; 29: 281-289.
- ¹⁴² Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 2003; 15: 813-827 Review.
- ¹⁴³ Dickenson JM, Blank JL, Hill SJ. Human adenosine A1 receptor and P2Y2-purinoceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 1491-1499.
- ¹⁴⁴ Haleen SJ, Steffen RP, Hamilton HW. PD 116,948, a highly selective A1 adenosine receptor antagonist. *Life Sci.* 1987; 40: 555-561.

- ¹⁴⁵ Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U, Grifantini M et al. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988; 337:687-689.
- ¹⁴⁶ Pospisil M, Hofer M, Weiterova L et al. Drugs elevating extracellular adenosine enhance cell cycling of hematopoietic progenitor cells as inferred from the cytotoxic effects of 5-fluorouracil. *Exp Hematol.* 2001; 29: 557-562.
- ¹⁴⁷ Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *Br J Pharmacol.* 1990; 101: 949-957.
- ¹⁴⁸ Lanza M, Fassio A, Gemignani A, Bonanno G, Raiteri M. CGP 52432: a novel potent and selective GABAB autoreceptor antagonist in rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol.* 1993; 237: 191-195.
- ¹⁴⁹ Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol.* 2002; 213: 1-47. Review.
- ¹⁵⁰ He XB, Hu JH, Wu Q, Yan YC, Koide SS. Identification of GABA(B) receptor in rat testis and sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 283: 243-247.
- ¹⁵¹ Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit.* 2001; 7: 377-381.
- ¹⁵² Minuk GY. GABA and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2000; 207: 105-108. Review.
- ¹⁵³ Nicholson-Guthrie CS, Guthrie GD, Sutton GP, Baenziger JC. Urine GABA levels in ovarian cancer patients: elevated GABA in malignancy. *Cancer Lett.* 2001; 162: 27-30.
- ¹⁵⁴ Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Taniguchi H et al. Attenuation by the GABA receptor agonist baclofen of experimental carcinogenesis in rat colon by azoxymethane. *Oncology.* 1992; 49: 241-245.

Zusammenfassung (Abstract)

Die chronische myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung der hämatopoetischen Stammzelle, die durch das bcr-abl-Onkogen charakterisiert ist. Wir erstellten Genexpressionsprofile von hochangereicherten CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen von Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase, wobei wir cDNA-Arrays mit 1185 Genen verwendeten. Im Vergleich zu gesunden CD34⁺ Zellen fanden wir 158 signifikant differentiell exprimierte Gene. Die Ergebnisse spiegelten bcr-abl-typische funktionelle Veränderungen, wie erhöhte Zellzyklus- und Proteasomaktivität, wider. DNA-Reparaturenzyme und Enzyme zur Entgiftung von Fremdstoffen waren herunterreguliert und könnten zur genetischen Instabilität beitragen.

Außerdem fanden wir die Deregulation von Genen, deren Beteiligung in der CML bisher nicht bekannt war. Es handelt sich hierbei um das Protoonkogen SKI und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für Neuropeptide und -transmitter, wie den CRH-Rezeptor, den Opioidrezeptor $\mu 1$, den GABA-B-Rezeptor, die Orexinrezeptorsubtypen 1 und 2, den Serotoninrezeptorsubtyp 1F und den Adenosinrezeptor A1.

Zur Untersuchung des Einflusses auf das klonogene Wachstum verwendeten wir in Zellkulturexperimenten selektive Liganden des A1-Rezeptors. Die Zugabe des selektiven Antagonisten 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX) zum Kulturmedium führte zu einer dosisabhängigen Wachstumshemmung myelomonozytärer und erythroider Kolonien von bis zu 47% bei Konzentrationen von 10^{-4} M ($p > 0,05$), die durch Zugabe des selektiven Agonisten 2-Chloro-N6-Cyclopentyladenosin (CCPA) aufgehoben werden konnte.

Zusammenfassend wurden in dieser Studie erstmals Genexpressionsprofile maligner CD34⁺ Zellen bei CML erstellt. Die untersuchte Zellpopulation hat einen distinkten molekularen Phänotyp im Vergleich zu ihrem gesunden Pendant. Neben Genen aus verschiedensten funktionellen Gruppen sind in diesen Zellen insbesondere die Gene ausgewählter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren hochreguliert, wobei das klonogene Wachstum der Zellen durch Modulation des Adenosin-A1-Rezeptors gehemmt werden kann.



