Hemmung von Bcr/Abl durch Imatinib führt zu einer Cisplatin-Sensitivierung und zu einer modulierten p53-Funktion bei Bcr/Abl-positiven Zellen

Von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Ioanna Skorta

aus Hagen

Hauptberichter:	Prof. Dr. P. Scheurich
Mitberichter:	Prof. Dr. W.E. Aulitzky
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Oktober 2009

Institut für Zellbiologie und Immunologie
der Universität Stuttgart
und
Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut
für Klinische Pharmakologie Stuttgart und Universität Tübingen
2009

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Zürich, den 12. Januar 2010

Ioanna Skorta

für meine Eltern

meinen Bruder

meine Schwester

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 13

2 SUMMARY 16

3 ZUSAMMENFASSUNG 20

4 EINLEITUNG 24

4.1 Chronisch myeloische Leukämie 24

4.1.1 Klinische Grundlagen der CML 24

4.1.2 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML 25

4.1.3 Imatinib Mesylat (Glivec®; Gleevec™; STI571) 25

4.1.4 Aktivierung von Signalwegen durch Bcr/Abl 26

4.2 Effekte von Bcr/Abl infolge von DNA-Schädigung 29

4.3 p53 30

4.3.1 p53 als Transkriptionsfaktor im Zellkern 32

4.3.2 p53 als proapoptotischer Faktor im Zytoplasma 33

4.4 Zielsetzung der Arbeit 36

5 MATERIAL UND METHODEN 37

5.1 Zellkultur 37

5.1.1 Kulturmedium und Zusätze 37

5.1.2 Verwendete Zelllinien 38

5.1.3 Kultivierung der Zellen 39

5.1.4 Trypan-Blau Ausschluss-Färbung 39

5.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen 40

5.2 Kultur von primärem Zellmaterial 40

5.2.1 Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation 40

5.2.2 Isolation hämatopoetischer CD34-exprimierender MNC 41

5.2.3 Kultivierung von primärem Zellmaterial 41

5.2.4 Colony Forming Unit (CFU)-Assay 42

5.3 Behandlung der Zellen 42

5.3.1 Ausüben von genotoxischem Stress 42

5.3.2 Inhibition der Bcr/Abl-Tyrosinkinase 43

5.3.3 Inhibition des PI3K-Signalwegs 43

5.3.4 Inhibition der ATM-Aktivität 43

5.3.5 Inhibition von Calpain 44

5.3.6 Calcium-Hemmung 44

5.3.7 Induktion von p53 44

5.4 Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers 45

5.4.1 Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung 45

5.4.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über PI-Färbung 46

5.4.3 Nachweis von Zelltod mittels TMRM 46

5.4.4 Nachweis von Zellviabilität mittels Calcein-AM 47

5.4.5 Zellzyklus-Analyse 47

5.4.6 CFSE-Proliferationsanalyse 48

5.4.7 BrdU-Proliferationsanalyse 48

5.4.8 Zellvitalitätsnachweis mittels des MTT-Assays 49

5.5 Protein-Analyse 50

5.5.1 Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien 50

5.5.2 Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE 50

5.5.3 Western-Blot Analyse 51

5.6 Immunfluoreszenz-Analysen 54

5.7 Präparation der Plasmide für Transfektionsexperimente 55

5.7.1 Transformation kompetenter Bakterien 55

5.7.2 Transfektionsexperimente 56

5.8 RNA-Interferenz 57

5.8.1 Übertragung von siRNA-Molekülen 57

5.9 Molekularbiologische Methoden 58

5.9.1 Isolation von Gesamt-RNA 58

5.9.2 Quantifizierung p53-abhängiger Zielgene über qRT-PCR 58

6 ERGEBNISSE 60

6.1 Imatinib führt zu einer Hypersensitivität von CML-Zellen gegenüber Cisplatin 60

6.2 Einfluss von Bcr/Abl auf murine BaF3-Zellen 62

6.2.1 Externe Wachstumsfaktoren verhindern Imatinib-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen 62

6.3 Einfluss von Imatinib und Cisplatin auf Bcr/Abl-positive und –negative BaF3-Zellen 63

6.3.1 Imatinib führt zur Hypersensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen als Antwort auf Cisplatin 63

6.3.2 Erreichte Sensitivität durch Imatinib bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist vergleichbar mit der von Hodenkarzinomzellen 65

6.4 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib und Cisplatin auf den Zellzyklus bei murinen Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen 66

6.4.1 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib und Cisplatin auf den Zellzyklus bei

Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen 66

6.4.2 Imatinib induziert einen schnellen, mitochondrialen Zelltod als Antwort auf Cisplatin bei Bcr/Abl-positiven Zellen 70

6.4.3 Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt zur Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern 74

6.5 Die Hypersensitivität ist abhängig von p53 77

6.6 Molekularer Einfluss von Imatinib auf die p53-Akkumulation und -Aktivität als Antwort auf Cisplatin 82

6.6.1 Aktivierung des p53-Systems durch die Expression von Bcr/Abl 82

6.6.2 Selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen verursacht Imatinib eine verminderte ATM-Aktivierung und eine reduzierte p53-Aktivität infolge von Cisplatin 83

6.6.3 Imatinib verursacht eine verminderte transkriptionelle Aktivität von p53 und führt somit zu einer reduzierten p21- und Mdm2-Induktion infolge von Cisplatin selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen 85

6.6.4 Fehlende p53-Phosphorylierung führt zum Verlust der p53-Transaktivität infolge von Cisplatin bei Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen 88

6.7 Verminderte p53-Transaktivität bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist abhängig von Bcr/Abl 89

6.8 Hemmung von ATM allein reicht nicht aus, um einen hypersensitiven Phänotyp zu induzieren 91

6.9 Einfluss von Imatinib und Cisplatin auf die p53-Translokation bei Bcr/Abl-positiven Zellen 94

6.9.1 Aktivierung von FoxO3a führt zur Translokation von p53 aus dem Zellkern ins Zytoplasma 94

6.10 Imatinib führt zu einer verminderten Expression von Bcl-x_L als Antwort auf Cisplatin bei Bcr/Abl-positiven Zellen 97

6.10.1 Exogene Expression von Bcl-x_L verhindert AIF-Translokation und somit die Hypersensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen 98

6.11 Hemmung von ATM und gleichzeitige Reduktion der Bcl-x_L-Expression führen zum hypersensitiven Phänotyp 100

6.12 Eine Imatinib-Behandlung führt auch in Anwesenheit von Etoposid zur Hypersensitivität 101

7 DISKUSSION 104

7.1 Verwendetes Zellsystem 105

7.2 Einfluss von Imatinib auf die zelluläre Antwort Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen infolge von Cisplatin 107

7.3 Charakterisierung des Zelltods 109

7.4 Zelltod ist abhängig von p53 111

7.5 Einfluss der aktiven Bcr/Abl-Tyrosinkinase auf das p53-System 112

7.6 Effekt der Bcr/Abl-Hemmung auf das p53-System 114

7.7 In Anwesenheit von Imatinib kommt es in Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer Hemmung der p53-Aktivität als Transkriptionsfaktor infolge einer Cisplatin-Behandlung 116

7.8 In Anwesenheit von Imatinib kommt es in Bcr/Abl-positiven Zellen zur p53-Translokation nach einer Cisplatin-Behandlung 118

7.9 Rolle von Bcl-x_L bei der Induktion von Zelltod 119

7.10 Hypersensitiver Phänotyp ist abhängig von ATM-Hemmung und reduzierter Bcl-x_L-Expression 121

7.11 Fazit und Ausblick 122

8 LITERATURVERZEICHNIS 125

9 DANKSAGUNG 139

10 LEBENSLAUF 140

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
as	“antisense”
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATR	Ataxia Telangiecstasia and Rad-3 related
BAF	*Bcr/Abl* Fusionsstelle
Bcr	breakpoint cluster region
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c-Abl	cellular-Abelson leukemia virus
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
Cisplatin, cis	*cis*-Diaminodichloroplatinum (II)
CML	Chronisch Myeloischen Leukämie
C-terminal	Carboxy-terminal
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	“fluorescence activated cell sorter“
FCS	Foetal Bovine Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	forwardscatter
g	Erdbeschleunigung
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GI_{50}	growth inhibition, Konzentration, die zu einer 50%-igen Hemmung der Zellproliferation führt
GM-CFU	granulocyte/macrophage-colony forming unit
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
h	Stunde

HEPES	(2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanolsulfonsäure
hIL3	humanes Interleukin 3
I	Isoleucin
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
LC	LightCycler
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
Mdm2	murine double minute 2
mIL3	murines Interleukin 3
MNC	mononukleäre Zellen
MNNG	N-Methyl-N´-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	messemger RNA
µ	Micro-
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI	Propidiumiodid
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
s	“sense”
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
SEM	Mittelabweichung (*standard error of means*)
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
SSC	sidescatter
T	Threonin
TBST	tris buffered saline plus Tween
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylethylendiamin

TGCT	testicular germ cell line tumor
TMRM	Tetramethylrhodaminmethylester Perchlorat
U	Uridin
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
vgl.	Vergleiche
vs.	versus
w/v	Masse/Volumen
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

2 SUMMARY

Chronic myeloid leukemia (CML) is induced by the Bcr/Abl fusion protein. The Bcr/Abl tyrosine kinase is the critical pathogenetic event in CML and therefore an ideal target for therapy. Since 2001 Imatinib mesylate (Glivec®; Gleevec™; STI571) is used as a therapeutic and provides a method to treat CML patients, which is highly effective in inducing remissions in chronic phase CML. However, complete eradication of the malignant clone by Imatinib is rare. Therefore it is necessary to find new strategies that allow a complete elimination of the malignant Bcr/Abl positive clone. One strategy to achieve this aim could be the combination of Imatinib with chemotherapeutic agents such as Cisplatin.

The results of the present work show that Imatinib enhances sensitivity to Cisplatin selectively in Bcr/Abl positive cells. Pulse-treatment of primary progenitor cells with 3 µM Imatinib for 16 hours had no significant effect on GM-CFU colony formation of Philadelphia positive or negative myeloid progenitors. This is also true for treatment of these cells with low dose Cisplatin (1 µM) for 16 hours alone. Cisplatin caused a minimal non-significant decrease in total number of colonies developed from Philadelphia positive and Philadelphia negative progenitors, respectively. Co-treatment with Imatinib and Cisplatin had no further effect on normal myeloid progenitors. In contrast, pulse-treatment of $CD34^+$ cells from CML patients with the combination of the 2 compounds for 16 hours produced a significant decrease in the overall number of colonies. Furthermore, this Imatinib mediated sensitivity in Bcr/Abl positive cells could be further augmented by pre-treatment with the Mdm2-antagonist Nutlin.

To characterize the extent of sensitivity to Cisplatin reached by pre-treatment with Imatinib, the Cisplatin concentrations necessary for 50 % growth inhibition (GI_{50} values) of Bcr/Abl positive cells pre-incubated with Imatinib were compared with those observed in a panel of 28 different cancer cell lines, including 3 testicular germ cell tumor (TGCT) cell lines which are known to be highly sensitive to Cisplatin. Remarkably, pre-treatment of Bcr/Abl positive BaF3 cells with Imatinib resulted in a GI_{50} value comparable to that obtained for the most sensitive TGCT cell line in our panel, N-TERA. Hence, treatment of Bcr/Abl positive cells with Imatinib renders them exquisitely sensitive to the cytotoxic effects of Cisplatin.

Furthermore, the results of the present work show that Imatinib treatment shifts the DNA damage response upon Cisplatin from cell cycle arrest to rapid induction of mitochondrial cell death. In the absence of Imatinib, Bcr/Abl positive BaF3 cells responded to Cisplatin treatment with a G2/M arrest. In contrast, pre-incubation with Imatinib led to a significant decrease of the percentage of cells in G2/M phase after addition of Cisplatin at each time point investigated.

Tracking of cell divisions by the membrane dye CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) demonstrated that Imatinib-mediated inhibition of Bcr/Abl led to a rapid onset of mitochondrial outer membrane permeability (MOMP) as displayed by a loss in TMRM fluorescence already after a single cell division. This is in sharp contrast to control cells treated with Cisplatin alone. These cells accomplished the first cell division and went into cell cycle arrest in G2/M phase in the second division without significant induction of MOMP. In the absence of Imatinib, a small percentage of the cells was even able to start the third cell division already after 24 hours, again without induction of MOMP. These results indicate that combined treatment of Bcr/Abl positive cells with Imatinib and Cisplatin leads to the induction of a rapid cell death after one single cell cycle division instead of arresting in G2/M phase. MOMP commonly results in cytochrome c release and apoptosome-dependent caspase activation, i.e in the induction of apoptosis. Interestingly, however, the rapid cell death observed in Bcr/Abl positive cells treated with Imatinib and Cisplatin seems to be completely independent of caspase activity, as the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk had no effect in these cells. It has been reported that in addition to the apoptosome-dependent pathway, mitochondrial cell death can also proceed independently of caspase activation via release of factors tethered to the inner mitochondrial membrane (IMM) such as apoptosis-inducing factor (AIF). In the present work it could be demonstrated that treatment of Bcr/Abl positive cells with Imatinib and Cisplatin led to a translocation of AIF from mitochondria to the nucleus within 16 hours where it acts as a potent inducer of cell death.

One reason for the phenomenon that Imatinib treated Bcr/Abl positive cells were not able to arrest in G2/M phase may be an impaired ATM activation upon Cisplatin. Imatinib significantly reduced ATM autophosphorylation upon Cisplatin treatment selectively in Bcr/Abl positive cells. This was mirrored by the observation that in Bcr/Abl positive, but not Bcr/Abl negative cells, Imatinib strongly impeded Cisplatin-induced phosphorylation of p53 on serine 15, a site which is directly phosphorylated by ATM following DNA damage. Importantly, pre-treatment with Imatinib had only a minor effect on p53 protein stabilization upon Cisplatin in these cells.

Active Bcr/Abl kinase led to an enhanced activation of p53 as a transcription factor when compared to the corresponding Bcr/Abl negative counterparts as shown by a forced induction of the p53 downstream targets *Mdm2* and *p21* mRNA and protein upon Cisplatin treatment. However, inhibition of Bcr/Abl by Imatinib led to a significant reduction of p53 transcriptional activity. Both *Mdm2* and *p21* mRNA and protein-levels were significantly reduced upon Cisplatin treatment in Bcr/Abl positive cells in the presence of Imatinib, whereas the same treatment had no effect on p53 transcriptional activity in the Bcr/Abl negative cells. In contrast to Mdm2 and p21, the proapoptotic p53 targets *BAX*, *PUMA*, and *NOXA* were constitutively

highly expressed in non stressed Bcr/Abl positive and negative BaF3 cells. In addition, these genes were not further induced by Cisplatin treatment demonstrating that p53 had no effect on these genes. Furthermore, Imatinib did not alter the expression of these genes neither in the presence nor in the absence of Cisplatin in Bcr/Abl positive cells. These results indicate that the extensive cell death induction observed in Bcr/Abl positive cells treated with Imatinib and Cisplatin is not due to a selective induction of proapoptotic genes by p53.

Despite of the reduced activity of p53 as a transcription factor mediated by Imatinib, the data of the present work demonstrate that p53 has an important role for induction of hypersensitivity to Cisplatin. p53 regulates cell death not only as a transcription factor of many genes involved in apoptosis but also acts as a proapoptotic protein in the cytoplasm independent of its transcriptional activity by binding to the anti-apoptotic proteins Bcl-x_L and Bcl-2 and promoting BAX activation. A prerequisite for this function of p53 is the localization in the cytoplasm, which is mediated by loss of p53 phosphorylation on serine 15, low Mdm2 levels, and FoxO3a activation. All three mechanisms could be verified in the present work. Therefore, these mechanisms may contribute to the observed predominant accumulation of p53 in the cytoplasm upon treatment with Imatinib and Cisplatin.

In the cytoplasm the anti-apoptotic protein Bcl-x_L interacts with p53 and thereby prevents p53 from activating BAX and inducing MOMP. In addition, it is a common finding that malignant cells with constitutively active tyrosine kinases have high levels of Bcl-x_L and concomitantly are resistant to many DNA damaging agents. Treatment of Bcr/Abl positive BaF3 cells with Imatinib and Cisplatin led to reduced Bcl-x_L levels. The role of Bcl-x_L was demonstrated by the finding that exogenous expression of Bcl-x_L significantly attenuated the induction of MOMP in Bcr/Abl positive cells treated with Imatinib and Cisplatin. As a result, AIF translocation was completely abrogated in cells expressing exogenous Bcl-x_L. Consistent with the above observations, transfection with Bcl-x_L almost completely abrogated the induction of apoptosis in Bcr/Abl positive cells exposed to Cisplatin after Imatinib pre-treatment. Together, these findings suggest that the downregulation of Bcl-x_L may contribute to Cisplatin hypersensitive phenotype.

Inhibition of ATM alone was sufficient to prevent G2/M arrest. However, ATM inhibition did not induce a hypersensitive phenotype comparable to that observed with Imatinib. Therefore, dual inhibition of the ATM/p53 axis and reduction of Bcl-x_L seems to be required for induction of a hypersensitive phenotype.

The findings of this work may also be of great importance for other malignant diseases. Deficiency of one or more signaling pathways involved in DNA damage response mechanisms is

a common finding in many tumor entities. Therefore, pharmacological inhibition of one further pathway may lead to a hypersensitive phenotype selectively in the tumor compartment which is comparable to that observed in the present work by inhibiting ATM/p53-axis and Bcl-x_L expression.

3 ZUSAMMENFASSUNG

Für die Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie (CML) ist die onkogene Kinaseaktivität von Bcr/Abl essentiell. Aufgrund der Tatsache, dass Bcr/Abl selektiv in malignen Zellen exprimiert wird und diese onkogene Tyrosinkinase kausal für die CML ist, stellt dieses Fusionsprotein einen hervorragenden Angriffspunkt für eine zielgerichtete Behandlung der Krankheit dar. Seit der Einführung im Jahr 2001 hat sich der Bcr/Abl-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib Mesylat (Glivec®; Gleevec™; STI571) zum Goldstandard in der Primärtherapie der CML etabliert. Obwohl bisher große therapeutische Erfolge mit Imatinib bei Patienten mit CML in chronischer Phase erzielt werden konnten, ist nach aktuellem Erkenntnisstand keine Eliminierung aller leukämischen Zellen durch eine Imatinib-Monotherapie in Patienten möglich. Die Entwicklung neuer Behandlungs-Strategien, die eine vollständige Heilung der CML erzielt, ist nach wie vor von großer Bedeutung. Erfolgversprechend könnte die Kombination aus Imatinib und anderen Medikamenten, wie zum Beispiel Chemotherapeutika, sein.

In der vorliegenden Dissertation gelang erstmalig der Nachweis, dass eine Behandlung mit Imatinib zu einer Hypersensitivität gegenüber Cisplatin führt sowohl bei murinen Bcr/Abl-positiven Zellen als auch in primären Philadelphia-positiven Progenitor-Zellen aus CML-Patienten, die in diesem Ausmaß bisher nicht beschrieben wurde. Die Kombination aus Imatinib und Cisplatin führte bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer extrem verstärken Induktion von Zelltod, während dieselbe Behandlung keine zusätzlichen Effekte bei Bcr/Abl-negativen Zellen hatte. Darüber hinaus konnte der durch eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung vermittelte Viabilitätsverlust durch eine zusätzliche Inkubation mit dem Mdm2-Antagonisten Nutlin weiter verstärkt werden, sodass im Zellliniensystem ein fast 100 %-iger Zelltod und bei primären Zellen eine fast komplette Hemmung der Koloniebildung erreicht wurde. Interessanterweise ergab ein Vergleich der Cisplatin-Sensitivität der Bcr/Abl-positiven Zelllinie BaF3p185 in Anwesenheit von Imatinib mit der von anderen Tumorzelllinien, dass durch Imatinib in Bcr/Abl-positiven Zellen eine Sensitivität erreicht wurde, die vergleichbar mit der extrem sensitiven Hodenzelllinie N-TERA war.

Zur Charakterisierung möglicher Ursachen dieser Hypersensitivität Imatinib-behandelter CML-Zellen gegenüber Cisplatin, wurden zunächst mögliche Alterationen der Regulation des Zellzyklusarrests nach Cisplatin-Behandlung untersucht. Cisplatin induzierte sowohl bei Bcr/Abl-positiven als auch bei Bcr/Abl-negativen Zellen einen G2/M-Arrest. Durch die Behandlung mit Imatinib kam es zu einem Verlust des G2/M-Arrests und zu einer schnellen

Induktion von Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen, während dieselbe Behandlung keinen Effekt auf den Cisplatin-induzierten G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-negativen Zellen hatte. Darüber hinaus konnte mittels einer Analyse der einzelnen Zellgenerationen 24 h nach Cisplatin-Behandlung gezeigt werden, dass Bcr/Abl-positive Zellen bereits nach der ersten Zellteilung in der G2/M-Phase arretierten und eine kleine Zellpopulation, vermutlich nach erfolgter Reparatur des DNA-Schadens, ohne signifikanten Verlust der mitochondrialen Integrität, eine dritte Zellteilung vollendet hatte. In Anwesenheit von Imatinib hingegen waren die Zellen nicht in der Lage in G2/M zu arretieren. Vielmehr kam es bereits nach der ersten Zellteilung zum Verlust der mitochondrialen Integrität infolge von Cisplatin.

Es ist bekannt, dass es durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und damit zu einem Caspase-abhängigen Todesmechanismus kommt. Interessanterweise verlief der Imatinib/Cisplatin-induzierte Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen unabhängig von Caspasen. Neben Cytochrom C wird auch AIF aus dem Mitochondrium freigesetzt, das in der Lage ist einen Caspase-unabhängigen Todesmechanismus zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Bcr/Abl-positiven Zellen infolge einer Behandlung mit Imatinib und Cisplatin zu einer AIF-Translokation in den Zellkern und somit zur Induktion von Zelltod kam.

Als mögliche Ursache für den Verlust des G2/M-Arrests konnte eine verminderte ATM-Aktivierung infolge einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen identifiziert werden. Die verminderte Aktivierung von ATM führte zu einer Reduktion der p53-Phosphorylierung an Serin 15 und zu einer leichten Reduktion der p53-Induktion nach Cisplatin-Behandlung.

Die verminderte p53-Phosphorylierung an Serin 15 hatte Konsequenzen auf die durch zellulären Stress hervorgerufene p53-Antwort, wobei es zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität von p53 kam. Dies konnte durch die reduzierte Expression der p53-Zielstukturen, Mdm2 und p21, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, gezeigt werden. Im Gegensatz zu Mdm2 und p21 waren die proapoptotischen p53-abhängigen Gene wie *BAX*, *PUMA* und *NOXA* bereits in Abwesenheit von zellulärem Stress hoch exprimiert und wurden durch eine Behandlung mit Cisplatin nicht weiter induziert. Auch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Imatinib hatte keine Auswirkungen auf die Expression von *BAX*, *PUMA* und *NOXA*. Demnach hat p53 auch keine transaktivierende Wirkung auf diese proapoptotischen Gene in diesem Zellsystem nach einer Behandlung mit Cisplatin. Dies bedeutet, dass die Funktion von p53 als

Transkriptionsfaktor durch eine Behandlung mit Imatinib in Bcr/Abl-positiven Zellen gestört war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dennoch gezeigt werden, dass p53 für den hypersensitiven Phänotyp, der bei Bcr/Abl-positiven Zellen durch eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung induziert wird, eine entscheidende Rolle spielt. p53 hat neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern auch im Zytoplasma eine wichtige Zelltod-induzierende Funktion. Im Zytoplasma ist p53 in der Lage durch die Bindung an pro- und antiapoptotische Proteine, unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität, BAX zu aktivieren und somit Zelltod zu induzieren. Voraussetzung für die Ausübung dieser Funktion ist eine Lokalisation von p53 im Zytoplasma. In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass p53 nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen größtenteils im Zytoplasma akkumuliert. Der p53-Export aus dem Zellkern wird vermittelt durch eine verminderte p53-Phosphorylierung am Serin-Rest an Stelle 15, durch eine niedrige Mdm2-Proteinmenge und durch die Aktivierung von FoxO3a. Alle drei Mechanismen konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Demnach wird die rasche Induktion von Zelltod durch zytoplasmatisches p53 vermittelt.

Im Zytoplasma interagiert p53 mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-x_L, wodurch eine Aktivierung von BAX durch p53 und somit die Induktion von Zelltod verhindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass es selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Behandlung mit Imatinib und Cisplatin zu einer signifikanten Reduktion der Bcl-x_L-Expression kam. Diese verminderte Expression von Bcl-x_L führte wahrscheinlich zu einem Ungleichgewicht zwischen Bcl-x_L und p53 zugunsten von p53, sodass vermehrt “freies“ p53 im Zytoplasma vorlag, das dann in der Lage war, BAX zu aktivieren und einen mitochondrialen Zelltod zu induzieren. Die entscheidende Rolle der verminderten Bcl-x_L Expression für den hypersensitiven Phänotyp konnte dadurch belegt werden, dass eine exogene Expression von Bcl-x_L, die das Gleichgewicht mit p53 wiederherstellte, ausreichend war, um den Verlust der mitochondrialen Membranintegrität und die Translokation von AIF zu verhindern. Die Induktion von Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung konnte dadurch signifikant reduziert werden.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für die Induktion einer Tumor-selektiven Hypersensitivität gegenüber Cisplatin zwei Signalwege von entscheidender Bedeutung sind. Durch die Hemmung des ATM/p53-Signalwegs sind Bcr/Abl-positive Zellen nicht mehr in der Lage, in der G2/M-Phase zu arretieren. Darüber hinaus vermittelt eine

Cisplatin-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib die Akkumulation von p53 im Zytoplasma und eine gleichzeitige Reduktion der Bcl-x_L-Expression, was zu einer massiven Induktion von Zelltod führt.

Die Befunde dieser Arbeit könnten auch für andere maligne Erkrankungen bedeutend sein. Aufgrund der Tatsache, dass bei vielen Tumoren Signalwege der DNA-Schadensprozessierung per se dereguliert sind, könnte die pharmakologische Hemmung eines weiteren Wegs zu einer vergleichbaren Hypersensitivität führen, wie sie in vorliegender Dissertation nach Hemmung der ATM/p53-Achse und der Bcl-x_L-Expression beobachtet wurde. Da bei normalen Zellen durch diesen pharmakologischen Eingriff lediglich ein Weg gehemmt würde, der andere jedoch weiterhin intakt wäre, wäre diese Hypersensitivität tumorselektiv.

4 Einleitung

4.1 Chronisch myeloische Leukämie

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine bösartige Bluterkrankung. Mit einer jährlichen Inzidenz von ein bis zwei Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner kommt die Krankheit in allen Altersgruppen vor, tritt jedoch im Median zwischen dem 45. bis 55. Lebensjahr auf. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen. Weltweit ist die Häufigkeit weitgehend ähnlich ohne wesentliche regionale oder ethnische Unterschiede (Schiffer *et al.*, 2007).

4.1.1 Klinische Grundlagen der CML

Die chronisch myeloische Leukämie ist eine myeloproliferative Erkrankung, die durch eine klonale Veränderung der Hämatopoese charakterisiert ist. Bei der CML kommt es zu einer peripheren Leukozytose mit einer Ausschwemmung myeloischer Zellen aller Reifungsstadien und zu einer gesteigerten Myelopoese im Knochenmark. Der dreiphasige Krankheitsverlauf beginnt mit der chronischen Phase und verläuft ohne Behandlung regelhaft über die akzelerierte Phase in die Blastenkrise. Während der meist mehrjährigen chronischen Phase ist das klinische Bild durch unspezifische Allgemeinsymptome, wie Müdigkeit, Gewichtsverlust oder Leistungsabfall gekennzeichnet (Hochhaus *et al.*, 2004). Die Diagnose während dieser Phase wird bei mehr als der Hälfte der Patienten im Rahmen von Routineuntersuchungen gestellt. Zu den wichtigsten Diagnosekriterien gehört die Leukozytose mit gehäuftem Auftreten myeloischer Vorstufen im peripheren Blut, Splenomegalie, Auftreten des Philadelphia-Chromosoms oder des *Bcr/Abl*-Transkripts, sowie ein hyperzelluläres Knochenmark. Ein erhöhter Anteil unreifer Vorstufen im Blut und im Knochenmark ist charakteristisch für die akzelerierte Phase. Dabei kommt es zu einer Verschlechterung der Leukozytose, die häufig von einer Thrombozytopenie begleitet wird. Der plötzliche Übergang in die Blastenkrise ist durch einen Anteil von ≥30% Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark, sowie durch blastäre Infiltrate außerhalb von Lymphknoten oder Milz gekennzeichnet (Hochhaus *et al.*, 2004). Das mediane Überleben unter Therapie beträgt in der Blastenkrise 3-9 Monate (Sacchi *et al.*, 1999; Sawyers *et al.*, 2002).

4.1.2 Zytogenetische und molekularbiologische Grundlagen der CML

Das zytogenetische Charakteristikum der CML ist das Philadelphia-Chromosom, das aus einer reziproken Translokation der langen Arme der Chromosomen 9 und 22, t(9; 22)(q34; q11), resultiert. Die Bruchstelle liegt auf beiden Chromosomen im Bereich der Gene *c-Abl* (*cellular-Abelson leukemia virus*) und *Bcr* (*breakpoint cluster region*). Aus dem auf Chromosom 9 lokalisierten Protoonkogen *c-Abl* (Westbrook *et al.*, 1985), welches für eine Tyrosinkinase kodiert, und dem *Bcr*-Gen auf Chromosom 22 (Heisterkamp *et al.*, 1985) resultiert nach der Translokation das *Bcr/Abl*-Fusionsgen (Groffen *et al.*, 1984; Ben Neriah *et al.*, 1986a;). Auf Chromosom 9 liegt der Bruchpunkt stets oberhalb des Abl-Exons a2 (Rowley *et al.*, 1973), während die Lage des Chromosomenbruchs auf Chromosom 22 variiert. Unabhängig von der Lage des Bruchpunktes bilden die Gene *Bcr* und *c-Abl* nach Chromosomentranslokation immer eine transkriptionelle Einheit, die durch den *Bcr*-Promotor reguliert wird (Shah *et al.*, 1991). Das Resultat der Translation der 8,5 kb-mRNA ist immer ein chimäres Bcr/Abl-Fusionsprotein mit dysregulierter Tyrosinkinaseaktivität (Melo, 1996a).
Die Assoziation der Krankheit mit einer definierten zytogenetischen Translokation t(9; 22)(q34; q11) und die Aufklärung der molekularen Pathogenese führten schließlich zur Entwicklung von Imatinib.

4.1.3 Imatinib Mesylat (Glivec®; Gleevec™; STI571)

Essentiell für die Induktion der CML ist die konstitutive aktive Bcr/Abl-Tyrosinkinase (Druker *et al.*, 2002). Das onkogene Fusionsprotein bildet daher einen guten Angriffspunkt für eine zielgerichtete Behandlung der CML. Mit dem chemischen Inhibitor Imatinib ist eine gezielte Hemmung der Bcr/Abl-Tyrosinkinase-Aktivität möglich. Die Substanz erhielt die Zulassung der FDA (Food and Drug Administration) im Mai 2001 in den Vereinigten Staaten von Amerika und der EMEA (European Medicines Evaluation Agency) in Europa im November 2001 für die Behandlung der CML (Deiniger *et al.*, 2000; Druker *et al.*, 2001). Die Einführung von Imatinib führte zu einer grundlegenden Veränderung der CML-Behandlung (Deininger *et al.*, 2004; Guilhot *et al.*, 2004). Heute wird Imatinib als Erstlinientherapie bei CML-Patienten empfohlen (Peggs *et al.*, 2003).

Imatinib ist ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat, das irreversibel an die ATP-Bindedomäne von Bcr/Abl bindet, wobei es zur Inaktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität kommt. Imatinib bindet an die inaktive Form der Kinasedomäne, und induziert damit eine Stabilisierung der inaktiven

Konformation von Bcr/Abl (Schindler *et al.*, 2000). *In vitro* führt Imatinib in Bcr/Abl-positiven Zellen zur Inhibition der Proliferation, zur Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle, zur Induktion des Zelltods und zur Erhöhung der genetischen Stabilität Bcr/Abl-positiver Zellen (Gambacorti-Passerini *et al.*, 1997; Jonuleit *et al.*, 1998; Oetzel *et al.*, 2000; Jonuleit *et al.*, 2000; van der Kuip *et al.*, 2004). Der therapeutische Einsatz von Imatinib in der chronischen Phase der CML führt zu einer signifikanten Verlängerung der hämatologischen und zytogenetischen Remissionen und der mittleren Überlebenszeit (Lugo *et al.*, 1990; Schindler *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2006).

In der Phase III IRIS-Studie (International Randomised Study of Interferon and STI571) wurde die Wirksamkeit von Imatinib (tägliche Dosis von 400 mg) mit der von konventionellen CML-Therapieformen, wie Interferon-α kombiniert mit Cytarabin bei Patienten mit neu diagnostizierter CML in chronischer Phase verglichen. Je nach Risikogruppe erreichten insgesamt 76 – 90 % der Patienten komplette zytogenetische Remissionen unter Imatinib-Therapie, während bei der früheren Erstlinientherapie mit IFN-α/Cytarabin nur 14 % der Patienten komplette zytogenetische Remissionen erreichten (O'brien *et al.*, 2003; Hehlmann *et al.*, 2007).

Imatinib wird als einer der wichtigsten Fortschritte in der Krebstherapie der letzten Jahre bezeichnet. Jedoch ist nach derzeitigem Kenntnisstand mit Imatinib keine Heilung der CML möglich, da der maligne Klon durch Imatinib allein nicht eliminiert werden kann. Den Patienten steht daher vermutlich eine lebenslange Therapie bevor, die nicht nur extrem kostspielig ist, sondernd möglicherweise auch mit Langzeitkomplikationen verbunden ist. So führt beispielsweise eine Langzeit-Behandlung mit Imatinib in Bcr/Abl-negativen Zellen durch die Hemmung des physiologischen c-Abl zu einer verzögerten DNA-Einzelstrangreparatur und zu genetischer Instabilität (Fanta *et al.*, 2008).

4.1.4 Aktivierung von Signalwegen durch Bcr/Abl

Die Expression des onkogenen Fusionsproteins Bcr/Abl führt zu verstärkter Proliferation und zu einer Transformation Bcr/Abl-positiver Zellen (Daley *et al.*, 1988; Nieborowska-Skorska *et al.*, 1999; Sirard *et al.*, 1994). Die Veränderung zellulärer Prozesse beruht auf der konstitutiv aktiven Bcr/Abl-Tyrosinkinase, die eine Vielzahl molekularer Zielstrukturen durch Phosphorylierung aktiviert. Durch die Aktivierung von Signalwegen kommt es zu einer verminderten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, zu einer erhöhten Proliferation und gleichzeitig zu einer verminderten

Induktion von Zelltod. Dazu gehören Wege, die in der normalen Zelle, durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren, aktiviert werden, wie der Ras- (Sawyers *et al.*, 1995), PI3K/Akt- (Varticovski *et al.*, 1991; Skorski *et al.*, 1997), JAK/STAT- (Carlesso *et al.*, 1996; Shuai *et al.*, 1996; Ilaria *et al.*, 1996) und der NF-κB (Reuther *et al.*, 1998) Signalweg. Konsequenzen der konstitutiven Aktivierung der aufgeführten Signalwege sind u.a. Veränderungen der Aktivität und der Genexpression von Schlüsselmolekülen, die einen direkten Einfluss auf Überleben, Wachstum und Verhalten der Zellen haben. Während Bcr/Abl-negative hämatopoetische Zellen *in vitro* einen Entzug von Wachstumsfaktoren nicht überleben, vermittelt die Bcr/Abl-Aktivität in Bcr/Abl-positiven Zelllinien das Überleben und die Proliferation der Zellen auch in Abwesenheit exogener Wachstumsfaktoren. Weiterhin ist bekannt, dass eine Inhibition der Expression von *Bcr/Abl* mittels *antisense*-Oligonukleotiden in diesen Wachstumsfaktor-unabhängigen transformierten Zellen zum Zelltod führt, ohne dabei den Zellzyklus zu alterieren (Bedi *et al.*, 1994). Weitere Daten zeigen, dass *in vitro* in Abwesenheit exogener Wachstumsfaktoren die Hemmung der Bcr/Abl-Kinaseaktivität durch Imatinib für die Induktion des Zelltods in Bcr/Abl-transformierten Zellen ausreicht (Druker *et al.*, 1996; Gambacorti-Passerini *et al.*, 1997).

Aktivierung von STAT durch Bcr/Abl

Bei der Entstehung der CML spielen die STAT (signal transduction and activators of transcription) -Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle. Sie sind in vielen zellulären Prozessen involviert, wie Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Immunantwort. Die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von STAT führt zur Dimerisierung und schließlich zur Translokation in den Zellkern. STAT-Transkriptionsfaktoren haben antiapoptotische Funktionen (Sternberg *et al.*, 2004). Charakteristisch für Bcr/Abl-positive Zellen ist die konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung von STAT1 und STAT5, wobei nur STAT5 die Hochregulierung antiapoptotischer Gene der Bcl-2-Familie induziert, u.a. Bcl-x_L (BH3 interacting domain death antagonist) und A1 (Gesbert *et al.*, 2000; Horita *et al.*, 2000; Nieborowska-Skorska *et al.*, 2002).

Aktivierung von NF-κB durch Bcr/Abl

Dem Transkriptionsfaktor NF-κB (nuclear factor–κB) werden Funktionen zugeordnet, die bei der Regulation von Zellzyklus, Zelltod und der Immunantwort von großer Bedeutung sind

(Karin *et al.*, 1996). Die Aktivierung von NF-κB erfolgt über Zytokine und Wachstumsfaktoren, virale und bakterielle Antigene, aber auch durch oxidativen Stress. Eine konstitutive Aktivierung von NF-κB wurde in vielen Tumoren beobachtet und korreliert mit der Apoptose-Resistenz von Tumorzellen. Die Aktivierung von NF-κB durch Phosphorylierung führt zu dessen Translokation in den Zellkern, wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben kann. Antiapoptotische Zielgene von NF-κB sind u.a. Bcl-x_L, und die Proteine IAP1 (inhibitor of apoptosis 1), IAP2 (inhibitor of apoptosis 2) und XIAP (inhibitors of apoptosis) (Karin *et al.*, 2002). Die Aktivierung von NF-κB scheint bei Bcr/Abl-transformierten Zellen für die Tumorbildung in Mäusen und für die Transformation primärer Knochenmarkzellen notwendig zu sein (Reuther *et al.*, 1998). Der genaue Mechanismus der NF-κB-Aktivierung in Bcr/Abl-positiven Zellen ist bislang nicht vollständig geklärt.

Aktivierung von Ras durch Bcr/Abl

Die meisten Tumore weisen Veränderungen im Ras-Signalweg auf, der ein wichtiger Regulator des Zellwachstums ist (Khosravi-Far *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1998; Khosravi-Far *et al.*, 1998). Dies hat eine erhöhte zelluläre Proliferation und verstärktes Überleben von Tumorzellen zur Folge (Downward *et al.*, 2003). In Bcr/Abl-positiven Zellen ist der Ras-Signalweg konstitutiv aktiv. Eine Inhibition dieses Signalweges verhindert die Transformation muriner Knochenmarkzellen durch Bcr/Abl (Sawyers *et al.*, 1995). Die Verbindung zwischen Bcr/Abl und dem Ras-Signalweg wird durch das Adapterprotein Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) vermittelt. Grb2 bindet an Sos (son of sevenless), bildet dadurch eine Bindungsstelle für Ras und induziert somit dessen Aktivierung. Grb2 bindet gleichzeitig an den phosphorylierten Tyrosinrest von Bcr/Abl an Aminosäure 177. Mutationen an dieser Stelle verhindern die Bindung von Grb2 und somit die Aktivierung von Ras (Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994).

Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalwegs durch Bcr/Abl

Auch der PI3K/Akt-Signalweg ist bei vielen Tumoren konstitutiv aktiv (Vivanco *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003). Der PI3K (Phopsphatidyl-inositol-3-Kinase)-Signalweg reguliert eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Dazu gehören Überleben, Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Metabolismus und Motilität (Fruman *et al.*, 1998) der Zellen. Die Aktivität dieses Signalwegs ist für die Bcr/Abl-vermittelte Transformation von großer Bedeutung (Varticovski *et al.*, 1991).

Der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren (LY294002 und Wortmannin) des PI3K-Wegs kombiniert mit Imatinib in Bcr/Abl-positiven Zellen führt zur Induktion von Apoptose (Klejman *et al.*, 2002). Bei der Aktivierung des PI3K/Akt-Wegs ist der Tyrosinrest an Position 177 von Bcr/Abl involviert. Durch die Rekrutierung des Grb2/Gab2-Komplexes an Bcr/Abl Tyrosin 177 kommt es zur Bindung von PI3K an Gab2 (GRB2-associated binding protein 2) und somit zur Aktivierung von PI3K. Unter den vielen Substraten der PI3K spielt die Serin/Threonin-Kinase Akt eine wichtige Rolle. Aktiviertes Akt reguliert eine Reihe von Substraten, was sich wiederum auf Zellwachstum, Überleben und Suppression von Apoptose auswirkt (Datta SR *et al.*, 1999). Zu den Substraten von Akt gehört u.a. die FoxO-Unterklasse der forkhead transcription factors (FoxO1, FoxO3a und FoxO4) (Brunet *et al.*, 1999; Burgering *et al.*, 2003). Akt-vermittelte Phosphorylierung führt zur Relokalisierung von FoxO ins Zytoplasma und damit zu deren Inaktivierung als Transkriptionsfaktoren.

Weitere Studien haben gezeigt, dass die FoxO-Proteine bei der CML eine wichtige Rolle spielen. Durch die Bcr/Abl-Transformation kommt es durch die konstitutiv aktive PI3K zur Inhibition der FoxO3a-Aktivität und somit zur Retention von FoxO3a im Zytoplasma (Ghaffari *et al.*, 2003; Komatsu *et al.*, 2003). Durch die dauerhafte Aktivität der PI3K/Akt via Bcr/Abl kommt es sowohl in murinen Bcr/Abl-positiven Zellen als auch in primären CML $CD34^+$-Zellen zu einer erhöhten *Skp2*-Expression, was wiederum zu einer verstärkten proteasomalen Degradation und somit zu einem verminderten FoxO-Proteinlevel führt (Andreu *et al.*, 2005).

4.2 Effekte von Bcr/Abl infolge von DNA-Schädigung

In der CML kommt es durch die Expression des onkogenen Fusionsproteins Bcr/Abl zur Deregulation zellulärer Prozesse. Lokalisiert im Zytoplasma, führt die konstitutiv aktive Tyrosinkinase zu einer erhöhten Proliferation und zur Hemmung von Zelltod Bcr/Abl-positiver Zellen. Die onkogene Tyrosinkinase ist in der Lage, die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung infolge von Bestrahlung und Therapeutika zu modulieren, und damit CML-Zellen resistent gegenüber genotoxischem Stress zu machen (Penserga *et al.*, 2007). Durch die Inhibition proapoptotischer Proteine (BAX (Bcl-2–associated X protein) und BAD (Bcl-2-Antagonist of Cell Death)) und gleichzeitiger Induktion antiapoptotischer Proteine, wie Bcl-x_L and Mcl-1 (Myeloid cell leukemia sequence 1), schützt Bcr/Abl maligne Zellen vor dem Zelltod. Infolge von zellulärem Stress sind CML-Zellen demnach durch die aktive Tyrosinkinase vor der Induktion von Zelltod geschützt (Oetzel *et al.*, 2000; Skorski, 2002). Bcr/Abl stimuliert

Reparatur-Signalwege wie HRR (homologous recombinational repair), NHEJ (non-homologous end joining) und NER (nucleotide excision repair) indem es die Expression und damit die Aktivität von DNA-Reparaturgenen (DNA-PK, Pol-beta, and Rad51) moduliert (Deutsch *et al.*, 2001; Skorski, 2002). Genotoxischer Stress führt in Bcr/Abl-positiven Zellen zu einem verlängerten S- and G2/M-Arrest (Bedi *et al.*, 1995; Niebrowska-Skorska *et al.*, 2006), aufgrund einer verstärkten Stimulierung der ATR (Ataxia Telangiecstasia and Rad-3 related)/CHK1(Checkpoint-Kinase 1)-Achse (Goldberg *et al.*, 2004; Niebrowska-Skorska *et al.*, 2006) und Phosphorylierung von cdc2 (cell division cycle 2) (Bedi *et al.*, 1995).

Um die Mechanismen zu verstehen, die Bcr/Abl infolge von zellulärem Stress moduliert, ist das Wissen über c-Abl, das physiologische Homolog von Bcr/Abl, hilfreich. c-Abl ist eine nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokaliert ist. Infolge von DNA-Stress kommt es zur Aktivierung von c-Abl, wobei es zu einer Translokation in den Zellkern und dort zur Interaktion mit nukleären Proteinen kommt, die bei der Erkennung von DNA-Schäden, Regulation von Zelltod, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur involviert sind. Bekannt ist, dass es zu einer direkten Interaktion zwischen c-Abl und ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-Abl durch ATM nach DNA-Stress kommt (Shafman *et al.*, 1997, Baskaran *et al.*, 1997). Weiterhin wurde demonstriert, dass c-Abl mit p53 interagiert und dabei die Tetramerisierung und somit die DNA-Bindungskapazität von p53 stimuliert (Nie *et al.*, 2000). c-Abl ist auch indirekt an der Aktivierung von p53 beteiligt, indem es die p53-Antagonisten Mdm2 (murine double minute 2) und MdmX (murine double minute X) phosphoryliert und somit deren inhibitorische Wirkung auf p53 hemmt (Sionov *et al.*, 2001; Zuckerman *et al.*, 2008). Aufgrund der Beobachtungen, dass auch Bcr/Abl nach einer Behandlung mit Etoposid (Dierov *et al.*, 2004) und nach einer Behandlung mit Imatinib (Vigneri *et al.*, 2001) in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren, ist es sehr naheliegend, dass c-Abl und Bcr/Abl, vermittelt durch ihre überlappende Homologie, auch im Zellkern mit den selben Proteinen interagieren.

4.3 p53

Der Tumorsuppressor p53 wurde im Jahr 1979 entdeckt (Lane & Crawford 1979; Linzer & Levine 1979; DeLeo *et al.*, 1979). Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Tumore Defekte im p53-Signalweg aufweisen, gehört p53 heute zu den meist untersuchten Genen in der Krebsforschung. p53 ist ein Schlüsselprotein mit enormer Bedeutung bei der Regulation der

zellulären Reaktion auf DNA-Schädigung, wie Zellzykluskontrolle, Induktion von DNA-Reparatur (Morris *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2002) und Zelltod (Lane, 1992; Hartwell & Kastan 1994). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion des p53-Systems in allen Tumoren gestört ist. Bei über 50 % aller Tumore führen somatische Mutationen zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressors (Pietsch *et al.*, 2006). In anderen Tumoren ist der p53-Weg durch die veränderte Expression von Co-Faktoren oder p53-Antagonisten gestört. Beispielsweise führt eine erhöhte Akkumulation des p53-Antagonisten Mdm2 zu einem verstärkten p53-Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma und somit zur Degradation von p53 (Haupt *et al.*, 1997). Eine reduzierte Expression der p53-Co-Faktoren ASPP1 und ASPP2 ist eine weitere Ursache für eine reduzierte proapoptotische Funktion von p53 (Samuels-Lev *et al.*, 2001).

In der chronischen Phase der CML treten p53-Mutationen sehr selten auf (Ahuja *et al.*, 1991; Feinstein *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1995), sodass diese Erkrankung charakterisiert ist durch die Expression von Wildtyp-p53. Allerdings ist das p53-System auch bei der CML verändert. Der p53-Antagonist Mdm2 wird in CML-Zellen in Abhängigkeit der Bcr/Abl-Kinaseaktivität erhöht exprimiert (Götz *et al*, 2001). Der Grund für eine verstärkte Mdm2-Expression in Bcr/Abl-positiven Zellen ist eine erhöhte Expression des Antigens La. Dabei spielt La als Mdm2-Regulator bei der Translation von Mdm2 eine positive Rolle (Trotta *et al.*, 2003). Mdm2 reguliert über einen negativen Rückkopplungsmechanismus den Tumorsuppresor p53. Mdm2 bindet p53 im N-terminalen Bereich direkt in der Transaktivierungs-Domäne (Momand *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996; Haupt *et al.*, 1996) und beeinflusst demnach seine transkriptionelle Aktivität (Oliner *et al.*, 1993; Wadgaonkar & Collins, 1999; Thut *et al.* 1997). p53 führt zur transkriptionellen Aktivierung des *Mdm2*-Gens und damit zu einer Mdm2-Akkumulation (Barak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). Gleichzeit ist Mdm2 am Abbau von p53 beteiligt. Mdm2 ist eine E3-Ligase und führt durch die Übertragung von Ubiquitinresten an p53 zu dessen Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Kubbutat *et al.*, 1997; Haupt *et al.*, 1997). Interessanterweise wird in CML-Zellen gleichzeitig p53 selbst vermehrt rekrutiert (Stoklosa *et al.*, 2004; Goldberg *et al.*, 2004), vermutlich vermittelt durch die konstitutive Aktivierung des PI3K-Wegs durch Bcr/Abl (Bar *et al.*, 2005). Somit kommt es in Bcr/Abl-exprimierenden Zellen, trotz der erhöhten Menge an Mdm2, letztlich Netto zu einer gesteigerten p53-Akkumulation.

4.3.1 p53 als Transkriptionsfaktor im Zellkern

Während die Akkumulation von p53 im Zellkern und somit seine transkriptionelle Aktivität in Abwesenheit von zellulärem Stress durch den p53-Antagonisten Mdm2 reguliert wird, führt eine Vielzahl von Stresssignalen zur Aktivierung des p53-Transkriptionsfaktors (Vogelstein *et al.*, 2000; Sengupta *et al.*, 2005; Levine *et al.*, 2006). Infolge von DNA-Stress kommt es zur Aktivierung von zahlreichen Kinasen, wie ATM, ATR und DNA-abhängiger Proteinkinase. Diese Kinasen aktivieren p53 durch Phosphorylierung im N-terminalen Bereich, wobei Serin 15, Serin 20 und Threonin 18 hier von besonderem Interesse sind, da sich diese Reste in oder nahe der Mdm2-Bindungsstelle befinden (Shieh *et al.*, 1997; Unger, 1997). Die Phosphorylierung von Serin 15 vermindert beispielsweise die Mdm2-Bindung an p53, sodass eine Ubiquitinierung und somit Degradation von p53 infolge von genotoxischem Stress verhindert wird. Die p53-Ubiquitinierung ist wohl für dessen Abbau eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen. Dabei spielen vor allem die Lysinreste 370, 372, 373, 381, 382 und 386 im C-terminalen Bereich eine große Rolle (Rodriguez *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2001). Neben Phosphorylierung und Ubiquitinierung wird p53 auch durch Acetylierungen und Sumoylierung als Folge von genotoxischem Stress posttranskriptionell modifiziert, wodurch Stabilität, Lokalisation, DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von p53 moduliert werden (Gu und Roeder, 1997; Meek, 1999; Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999).
Histonacetyltransferasen, wie CBP/p300 und PCAF binden p53 im N-terminalen Bereich und führen zur Übertragen von Acetylgruppen (Liu *et al.*, 1999). Die Bindung der Acetyltransferasen wird dabei begünstigt durch Phosphorylierungen von p53 im N-terminalen Bereich (Sakaguchi *et al.*, 1998). Ähnlich wie Ubiquitin wird SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier 1) übertragen (Appella & Anderson, 2001).

Nach Induktion von p53 nach DNA-Schädigung bindet der Transkriptionsfaktor direkt an die Promotoren p53-abhängiger Gene, wobei es sowohl zur Aktivierung als auch zur Repression der Transkription dieser Gene kommen kann. Bisher konnten bereits mehrere Hundert p53-abhängige Gene identifiziert werden (Cawley *et al.*, 2004). Die p53-Antwort auf zellulären Stress ist von der Art der Schädigung und vom Zelltyp abhängig. Während Stimulus X p53-abhängigen Zelltod induziert, kann Stimulus Y zu p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest führen. Stimulus Z kann wiederum in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit von p53 auslösen (Tovar *et al.*, 2006). Eine plausible Erklärung für Stimulus- und Zelltyp-spezifische p53-abhängige Reaktionen ist, dass p53 verschiedene Gruppen von Target-

Genen, abhängig vom Stimulus reguliert, und somit die zelluläre Antwort unterschiedlich ausfällt (Übersicht in Murray-Zmijewski *et al.*, 2008).

Die Bindung an Response-Elemente seiner Zielgene, und somit seine Transaktivität, ist abhängig von der Struktur und Konformation von p53, und wird von vielen Faktoren beeinflusst (Xu *et al.*, 2003). Posttranslationale Modifikationen an p53 wie Phophorylierung, Methylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung alterieren nicht nur die Stabilität, sondern auch die DNA-Bindungsaffinität von p53 (Appella *et al.*, 2001; Vousden, 2002; Luo *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2004; Chuikov *et al.*, 2004; Bode *et al.*, 2004; Kruse *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008).

Neben posttranslationalen Modifikationen an p53 haben auch p53-Co-Faktoren Einfluss auf die Transaktivität von p53 und somit auf die Expression p53-abhängiger Gene. Dazu gehören die Proteine ASPP1 (Ankrin repeats SH3 domains and a Poly Proline 1) und ASPP2 (Ankrin repeats SH3 domains and a Poly Proline 2) der ASPP-Familie, die die p53-Bindung an die DNA durch direkte Interaktion mit dem N-Terminus von p53 erleichtern, und somit die Transkription apoptotischer Gene induzieren (Samuels-Lev *et al.*, 2001). Eine Inhibition dieser Proteine durch iASPP, einem weiteren Mitglied dieser Familie, führt folglich zur Hemmung der Apoptose (Bergamaschi *et al.*, 2004).

4.3.2 p53 als proapoptotischer Faktor im Zytoplasma

Noch vor einigen Jahren glaubte man, dass die Induktion von Zellzyklus-Arrest und Zelltod durch p53 nur aufgrund der Transaktivierung Zellzyklus-regulatorischer bzw. proapoptotischer Gene stattfindet. Interessanterweise findet in manchen Zellen p53-abhängiger Zelltod statt, der aber von der p53-Transaktivität unabhängig ist (Hirsch *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1997; Sarin *et al.*, 1997). Damit p53 seine proapoptotische Funktion im Zytoplasma ausüben kann, muss es zunächst aus dem Zellkern ins Zytoplasma translozieren, wo es durch Protein-Protein-Interaktionen den mitochondrialen Zelltod moduliert. Vermittelt wird die p53-Translokation von verschiedenen Signalen. So erfolgt die Regulation der p53-Lokalisation durch Mdm2. Niedrige Mdm2-Level führen zu einer Mono-Ubiquitinierung von p53 und somit zur p53-Translokation ins Zytoplasma, während höhere Mdm2-Level p53 poly-ubiquitinieren, was zur Degradation von p53 führt (Li *et al.*, 2003). Zusätzlich wird die Lokalisation durch die p53-Phosphorylierung des Serin-Restes an Stelle 15 reguliert (Zhang & Xiong, 2001). Da diese Phosphorylierungsstelle innerhalb des nukleären Export Signals (NES) von p53 liegt, führt eine Phosphorylierung zu einem verminderten Export und folglich zu einer p53-Akkumulation im Zellkern. Die Translokation von p53 kann zusätzlich von FoxO3a vermittelt werden. Durch direkte Bindung

von FoxO3a an p53 wird die Tetramerisierung von p53 verhindert. Dies führt dazu, dass die NES von p53 nicht verdeckt ist, wodurch es zu einer verstärkten p53-Akkumulation im Zytoplasma kommt (You *et al.*, 2006).

Reguliert wird die Induktion von Zelltod durch p53 im Zytoplasma vor allem durch Interaktionen zwischen p53 und anti- und proapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Die Einteilung der Bcl-2-Familienproteine leitet sich aus der Anzahl der Bcl-2-homologen Domänen (BH) ab, aus denen sie bestehen. Insgesamt existieren 4 BH-Domänen, BH1-4 (Kuwana *et al.*, 2003). Generell gilt, dass in Anwesenheit aller 4 BH-Domänen, die Proteine antiapoptotische Funktionen aufweisen. Dazu gehören die Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Mcl-1. Proteine mit weniger als vier BH-Domänen sind proapoptotisch. Proapoptotische Proteine können weiter eingeteilt werden in BH123-Proteine, wie BAX und BAK, und in BH-only Proteine, wie Bid (BH3 interacting domain death antagonist), Bim (mature B cell), BAD und PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis). Die Aufgabe der BH-only Proteine, die nur eine BH-Domäne tragen, ist die Aktivierung der BH123-Proteine. Diese aktivieren nach zellulärem Stress BAX und BAK und es kommt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MOMP = mitochondrial outer membrane permeabilization) (Leita *et al.*, 2002; Kuwana *et al.*, 2002).
Momentan existieren zwei Hypothesen, wie zytoplasmatisches p53 komplett unabhängig von seiner Transaktivität zum Zelltod führen kann. Eine der Hypothesen wird von Douglas Green (San Diego, USA) vertreten. In seinem Modell werden die proapoptotischen Proteine BAX und BAK konstitutiv im Zytoplasma exprimiert. Die Aktivierung von BAX und BAK, d.h. Formation von BAX/BAX-Homodimeren oder BAX/BAK-Heterodimeren, kann auf unterschiedliche Weise ablaufen. tBid (truncated Bid) ist in der Lage, durch direkte Bindung, BAX und BAK zu aktivieren, während Bim und BAD indirekt zur Aktivierung führen, indem BAD das Bcl-x_L-gebundene Bim „befreit“ und dieses dann BAX und BAK aktivieren kann. Ein weiterer direkter Aktivator von BAX ist aber auch p53. p53 wird im Zytoplasma durch die Bindung an zytoplasmatisches Bcl-x_L inaktiviert. Infolge von DNA-Schädigung akkumuliert auch PUMA im Zytoplasma und „befreit“ p53 von Bcl-x_L, indem es aufgrund seiner höheren Affinität statt p53 an Bcl-x_L bindet. Freies p53 ist dann in der Lage BAX und BAK zu aktivieren. Nach deren Aktivierung inserieren die Oligomere in die äußere mitochondriale Membran, wobei es zur Bildung von transmembranen Poren kommt. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials infolge der Porenbildung führt schließlich zur Freisetzung mitochondrialer Proteine.

Dass p53 proapoptotische Funktionen im Zytoplasma ausübt, wird von Moll *et al.* (1998) bestätigt. Diese Hypothese besagt jedoch, dass mitochondriales Bcl-x_L- oder Bcl-2 p53 direkt an

die äußere Mitochondrienmembran rekrutiert, wo es als potentes „BH3-only“-Protein wirkt und so Zelltod induziert. Dieser p53-abhängige Zelltod auch kann interessanterweise auch unabhängig von BAX und PUMA ablaufen (Wolff *et al.*, 2008). Dabei führt p53 selbst zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Die Tatsache, dass nur Wildtyp-p53 in der Lage ist an Bcl-x_L zu binden, erklärt, dass p53-Mutanten nicht in der Lage sind, mitochondrialen Zelltod zu induzieren.

4.4 Zielsetzung der Arbeit

Es ist seit langem bekannt, dass die Aktivität des für die CML verantwortlichen Onkogens Bcr/Abl eine Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen verursacht. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die Imatinib-induzierte Hemmung von Bcr/Abl einen Einfluss auf die Sensitivität von CML-Zellen auf genotoxischen Stress hat. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Kombination aus Imatinib mit geringen Mengen des zytotoxisch wirkenden Zytostatikums Cisplatin eine effizientere Strategie zur Behandlung der CML darstellen könnte als die momentan in der Klinik favorisierte Imatinib-Monotherapie. Da eine Heilung der CML mit Imatinib allein nicht möglich ist, müsste die Therapie wahrscheinlich lebenslang fortgeführt werden. Da Imatinib nicht nur die onkogene Tyrosinkinase Bcr/Abl, sondern auch das bei der zellulären Antwort auf genotoxischen Stress wichtigen c-Abl hemmt, sollten die Effekte von Imatinib vergleichend jeweils in Bcr/Abl-positiven und –negativen Zellen untersucht werden. Fokussiert wurde dabei in erster Linie auf mögliche Einflüsse der Imatinib-induzierten c-Abl bzw. Bcr/Abl-Hemmung auf die Funktion des p53-Systems und der p53-abhängigen Regulation von Zellzyklus-Arrest bzw. Zelltod nach Cisplatin-Behandlung.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Welchen Einfluss hat Imatinib auf das Langzeitüberleben von primären Philadelphia-positiven und –negativen hämatopoetischen Stammzellen, die für kurze Zeit mit geringen Dosen Cisplatin behandelt wurden?
- Welche Konsequenzen hat die Hemmung der Bcr/Abl- bzw. c-Abl-Aktivität durch Imatinib auf die Regulation des Zellzyklusarrests nach Cisplatin-Behandlung in Bcr/Abl-positiven und –negativen Zellen?
- Welchen Einfluss hat Imatinib auf die Induktion von Zelltod nach Cisplatinbehandlung bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen?
- Welche molekularen Auswirkungen hat die Hemmung von Bcr/Abl auf die p53-Antwort nach Cisplatin-induziertem zellulärem Stress?
- Welche Mechanismen des Cisplatin-induzierten Zelltods werden eingeleitet bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen in An- und Abwesenheit von Imatinib?

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Zellkultur

5.1.1 Kulturmedium und Zusätze

Für die Kultivierung aller eukaryotischer Zelllinien wurde RPMI 1640 Medium mit den unten aufgeführten Supplementen verwendet.

RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
500 ml wurden supplementiert mit:	
10% (v/v) FCS (‚Foetal Bovine Serum‘)	Gibco, Karlsruhe
0,1 g/l Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
10 mM HEPES (2-(4-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanolsulfonsäure), pH 7,4	Merck, Darmstadt
2 mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
0,13 mM L-Asparagin Serva,	Heidelberg
0,05 mM β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
3 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin

Der Zusatz des Wachstumsfaktors mIL3 (rekombinantes murines Interleukin-3) zum Kulturmedium erfolgte bei der Kultivierung der *Bcr/Abl*-negativen murinen Zelllinie BaF3 in einer Konzentration von 1 ng/ml. Außerdem wurde mIL3 (1 ng/ml) Bcr/Abl-positiven und Bcr/Abl-negativen Zellen bei Versuchsansätzen immer zugesetzt.

Verwendete Zytokine	
Recombinant Murine Interleukin-3 (mIL3)	Strathmann Biotech AG, Hannover

5.1.2 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Zelllinien verwendet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung, Herkunft	Bcr/Abl Status
BaF3	murine-Prä-B-Lymphozytenlinie[a]	-
BaF3p185	durch Transfektion der BaF3- Zellen mit dem Vektor pSLX*Bcr/Abl*[a] (McWhirter *et al*., 1993) entstandene Linie	+
BaF3p185 STI-R 6-2-T315I	durch Selektion der Zelllinie BaF3p185 mit Imatinib in Abwesenheit von mIL3 entstandene Zelllinie	+
32Dp210-wt	durch Transfektion von 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-wta hergestellt	+
BV173	humane CML-Blasten, DSMZ-Nr.: ACC 20	Ph^+
K562	humane CML-Blasten, DSMZ-Nr.: ACC 10	Ph^+

[a] Dr. J. Duyster, Technische Universität München

Die Cisplatin-Sensitivität der Zelllinien BaF3 und BaF3p185 wurde in An- und Abwesenheit von Imatinib getestet und mit einem Panel von 28 Tumorzelllinien verglichen. Das Referenz-Zelllinienpanel bestand aus folgenden Zelllinien:
MCF7, MDA MB 361, MDA MB 157, MDA MB 134, MDA MB 175, MDA MB 330, OVCAR8, UACC 893, OVCAR5, SKOV3, H12.5, ADR RES, IGROV1, OVCAR4, OVCAR3, A2780, 210EP, MDA MB 436, N-TERA-2 cl.D1, K562, LAMA84, BT20, Meg01, A549, H1299, NCI-H460, NCI-H23 und A427.

5.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO_2. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen an einer sterilen Werkbank und unter Verwendung steriler Gerätschaften subkultiviert. Semiadhärente Zellen mussten zunächst mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden.

Zellkulturflaschen	Corning, USA
Sterile Pipetten	Corning, USA
6-, 96-well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml Polypropylenröhrchen, konisch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
50 ml Polypropylenröhrchen, konisch, FALCON	Becton Dickinson, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Sterilbank *LaminAir HB2472*	Heraeus, Hanau
CO_2-Inkubator	Heraeus, Hanau
GM-CSF *Leukomax*	Novartis Pharma, Nürnberg

5.1.4 Trypan-Blau Ausschluss-Färbung

Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Dabei wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypan-Blau-Färbelösung (Trypan-Blau 1:10 in PBS) vermischt. Trypan-Blau ist ein Vitalfarbstoff, der nur tote Zellen anfärbt, da er über einen aktiven Transport aus dem Zellinneren lebender Zellen ausgeschlossen wird. Die Zahl der ungefärbten Zellen wurde dann zur Bestimmung der Lebendzellzahl herangezogen.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquatrate}} \text{ X Verdünnung x } 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Trypan Blau 0,5% (w/v)	Biochrom AG, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Zeiss, Jena

5.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden durchschnittlich nach zwei Monaten durch kryokonservierte Zellen ersetzt, um das Auftreten genetischer Veränderungen durch Selektionsprozesse während der Kultur zu minimieren. Die Konservierung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Für die Lagerung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1-2 x 10^6/ml in einer eiskalten Lösung aus DMSO:FCS (1:10) aufgenommen und sofort in Kryo-Röhrchen überführt, um die Vitalität der Zellen nach dem Einfriervorgang zu erhalten. Eine spezielle Einfrierbox gewährleistete eine graduelle Abkühlung auf -80°C über Nacht. Anschließend wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen konservierter Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C und durch sofortiges Überführen der angetauten Suspension in 10 ml RPMI 1640 Medium. Direkt im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) pelletiert und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert und am darauf folgenden Tag noch einmal mit frischem Medium versorgt.

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
1,8 ml CryoTube™	Nalgene Nunc International
5100 Cryo 1°C Einfrierbox ‚Mr. Frosty‘	Nalgene Nunc International

5.2 Kultur von primärem Zellmaterial

Das für die Versuche verwendete primäre Zellmaterial war von der Ethik-Komission der Landesärztekammer Baden-Württemberg unter dem Aktenzeichen 035-06-f genehmigt worden.

5.2.1 Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation

Knochenmark- oder Blut-Proben, frisch aus Patienten entnommen, wurde zunächst mit sterilem PBS verdünnt. Diese Zellsuspension wurde vorsichtig in ein 50 ml Polypropylene Röhrchen (FALCON) pipettiert, das bereits 25 ml Ficoll-Separierlösung enthielt. Die Trennung der mononukleären Zellen (MNC) von den roten Blutzellen und den polynukleären Zellen mit einer Dichte von > 1,077 g/cm^3 gelang durch 25-minütige Zentrifugation bei 300 g (RT, ohne Bremse). Die MNC sammeln sich als Interphase direkt über der Ficoll-Schicht an. Diese

Interphase wurde abgenommen, in ein frisches 50 ml Polypropylene Röhrchen überführt und mit PBS verdünnt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 300 g, RT), anschließend gezählt und dann für weitere Anwendungen herangezogen.

‚BIOCOLL Separating Solution' (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin
50 ml Polypropylen Röhrchen, konisch; BLUE MAXTM; FALCON	Becton Dickinson, USA
Rottana/S Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
PBS (0,27M NaCl, 0,005 M KCl, 0,015 M Na_2HPO_4 x H_2O, 0,003M KH_2PO_4)	Biochrom AG, Berlin

5.2.2 Isolation hämatopoetischer CD34-exprimierender MNC

Mit Hilfe des ‚MACSCell Isolation Kit' wurden CD34-exprimierende ($CD34^+$)-Zellen aus aufgereinigten MNC isoliert. Dies schloss sich direkt an die Ficoll-Dichtegradienten Zentrifugation an. Das System beruht auf einer positiven Selektion von $CD34^+$- Zellen. Diese werden über einen Hapten-konjugierten Primärantikörper und einen mit ‚Micro-Beats' gekoppelten Anti-Hapten Antikörper indirekt magnetisch markiert und können dadurch über ein magnetisches Feld von den übrigen Zellen getrennt werden. Die Separation wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

‚MACS CD34 Progenitor Cell Isolation Kit'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
‚Magnetic Cell Separator VarioMACS'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
‚MACS positive selection columns'	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

5.2.3 Kultivierung von primärem Zellmaterial

Die aus Patientenmaterial isolierten hämatopoetischen $CD34^+$-MNC wurden in einer Dichte von 0,5 x 10^6 / ml in StemPro-34 SFM Complete Medium mit StemPro-34 Nutrient Supplement in Anwesenheit von hIL3 (10 ng/ml), G-CSF (200 ng/ml), FLT3 (5 ng/ml), 2 mM L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin kultiviert.

StemPro-34 SFM Complete Medium	Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD
StemPro-34 Nutrient Supplement	Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD

Verwendete Zytokine	
Humanes GM-CSF (‚Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor'), LEUCOMAX® 150	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Humanes G-CSF (‚Granulocyte Colony Stimulating Factor'), Neupogen	Roche, Mannheim
Humanes Interleukin-3	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
FLT3-Ligand	RDI Research Diagnostics, Inc., USA

5.2.4 Colony Forming Unit (CFU)-Assay

Der CFU-Assay bietet die Möglichkeiten der Kultivierung hämatopoetischer Zellen *in vitro*. Das Prinzip beruht darin, das Wachstum des angestrebten Kolonietyps durch den Zusatz der erforderlichen Wachstumsfaktoren zum Grundmedium zu fördern. Mittels dieses Assays wurde das Differenzierungspotential hämatopoetischer Progenitor-Zellen quantitativ bestimmt.

Nach der Behandlung wurden Philadelphia-positive Zellen und normale myeloische Progenitor-Zellen in 250 µl Medium, das 0,3 % Agar enthielt, aufgenommen und in einer 6-well Platte ausplattiert. Überschichtet wurde diese Agarschicht mit Medium, das die humanen Wachstumsfaktoren G-CSF (200 ng/ml) und IL3 (10 ng/ml) enthielt. Die einzelnen Versuche wurden als Dreifachbestimmung und steril durchgeführt. Nach einer Inkubation von 14 Tagen bei 37 °C wurde die Anzahl der Kolonien unter dem Mikroskop ermittelt.

Mikroskop	Zeiss, Jena

5.3 Behandlung der Zellen

5.3.1 Ausüben von genotoxischem Stress

Die Induktion von genotoxischem Stress erfolgte durch die Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (*cis*-Diaminodichloroplatinum (II)). Direkt nach Aufnahme in die Zelle kommt es zur Aktivierung von Cisplatin, das erst dann in der Lage ist Quervernetzungen mit der DNA und Proteinen auszubilden. Cisplatin wurde wenn nicht anders angegeben in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt.

Neben Cisplatin wurde auch Etoposid zur Induktion von zellulärem Stress verwendet. Dabei wurden die Zellen mit einer Konzentration von 2 µM Etoposid behandelt.

Cisplatin (1 mg/ml)	Apotheke Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart
Etoposid (10 mg/ml)	Apotheke Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

5.3.2 Inhibition der Bcr/Abl-Tyrosinkinase

Um den Einfluss der Kinaseaktivität von Bcr/Abl auf das p53-System und die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor nach genotoxischem Stress zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der selektive Inhibitor Imatinib verwendet. Imatinib wurde in einer Konzentration von 3 µM verwendet und immer 2 h vor Cisplatin-Behandlung zugegeben. Gelöst wurde Imatinib in DMSO:H_2O (1:1) und als Stammlösung (10 mg/ml) bei -20°C gelagert.

Imatinib (Imatinib Mesylat, STI571, *Gleevec, Gleevec)*	Novartis, Schweiz

5.3.3 Inhibition des PI3K-Signalwegs

Der Inhibitor LY294002 (2-(4 Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) wurde zur Inhibition des PI3K-Signalwegs eingesetzt. Bei LY294002 handelt es sich um einen synthetischen Inhibitor, der auf Basis des Bioflavonoids Quercetin entwickelt wurde (Vlahos *et al.*, 1994). Die Stammlösung (50 mM) wurde durch Lösen der Substanz in DMSO hergestellt. Eingesetzt wurde LY294002 in einer Konzentration von 25 µM.

LY 294002	Calbiochem, USA

5.3.4 Inhibition der ATM-Aktivität

Der Inhibitor KU-55933 wurde zur Hemmung der Aktivität von ATM eingesetzt. KU-55933 ist nur in der Lage Wildtyp-ATM zu hemmen, während mutiertes ATM nicht gehemmt wird. ATM spielt bei der DNA-Schadenserkennung eine wichtige Rolle und wird in Folge von DNA-Schädigung durch Autophosphorylierung aktiviert. Die Substanz wurde in DMSO gelöst und eine Stammlösung von 4 mg/ml hergestellt. 2 h vor Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen mit einer Konzentration von 10 µM KU-55933 behandelt.

KU-55933	Calbiochem, USA

5.3.5 Inhibition von Calpain

Eine mögliche Abhängigkeit des Zelltods von Calcium wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Inhibitor PD 150606 analysiert. Bei PD 150606 handelt es sich um einen spezifischen Calpain-Inhibitor, der gegen Calcium-Bindungsstellen von Calpain gerichtet ist. Calpain ist eine Protease, die in Anwesenheit von Calcium in ihre beiden Untereinheiten zerfällt, und somit aktiviert wird. PD 150606 wurde zur Herstellung einer Stammlösung (20 mM) in DMSO gelöst. Eingesetzt wurde die Substanz in einer Konzentration von 20 µM.

PD 150606	Calbiochem, USA

5.3.6 Calcium-Hemmung

Mittels eines spezifischen Calcium-Antagonisten (BAPTA-AM) wurde zusätzlich untersucht ob die Induktion des Zelltods durch Calcium vermittelt wird. Hierfür wurden die Zellen mit BAPTA-AM behandelt. Die Substanz wurde in DMSO gelöst (Stammlösung 10 mM) und in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt.

BAPTA-AM	Biomol, USA

5.3.7 Induktion von p53

Der Mdm2-Antagonist Nutlin-3 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse p53-abhängiger Einflüsse auf die Zellen in An- und Abwesenheit von genotoxischem Stress eingesetzt. Nutlin-3 induziert die Akkumulation von p53, indem es die Mdm2-p53 Interaktion hemmt (Vassilev *et al.*, 2004). Die Bindung von Mdm2 an p53 führt zu einer Inhibition der transkriptionellen Aktivität von p53 und p53-Stabilität. Somit verursacht eine Nutlin-3-vermittelte Inhibition der Mdm2-p53 Interaktion eine Akkumulation von p53. Die Behandlung der Zellen mit Nutlin-3 erfolgte in einer Konzentration von 10 µM. Für die Herstellung der Stammlösung (20mM) wurde die Substanz in DMSO gelöst.

Nutlin-3	Cayman Chemical, USA

5.4 Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Durchflusszytometer kann 5 optische Parameter gleichzeitig messen: Vorwärtsstreulicht (forwardscatter, FSC), Seitwärtsstreulicht (sidescatter, SSC) und drei verschiedene Fluoreszenzspektralbereiche (FL 1-3). Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest.

Fluorescense Activated Cell Analyzer ‚FACScan'	Becton Dickinson, USA
Laser:	
15 mW, 488 nm, luftgekühlter Argon-Ionen Laser	
Detektoren/Filter:	
530 nm (FITC)	
585 nm (PE/PI)	
650 nm (dunkelrote Fluoreszenz)	
CELLQuest™ Software	Becton Dickinson, USA

5.4.1 Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung

Apoptotische Zellen weisen bereits im frühen Stadium charakteristische Veränderungen der Zellmembran auf. Es kommt unter anderem zur Exposition des Membranphospholipids Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, das in gesunden Zellen nur an der Innenseite der Zellmembran vorkommt. Diese Eigenschaft apoptotischer Zellen wird bei der Annexin V-Färbung genutzt. Annexin V, ein ~ 35 kD großes Ca^{2+}-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, stellt daher in fluoreszenzmarkierter Form (z.B. Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)) eine geeignete Sonde für apoptotische Zellen dar. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der zu untersuchenden Population kann dann durchflusszytometrisch über die Bestimmung der FITC-positiven Zellen ermittelt werden. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Pro Probe wurden etwa 5 x 10^5 Zellen für die Annexin V-Färbung verwendet. Zunächst wurden die Zellen pelletiert, einmal in kaltem PBS und einmal in Annexin V-Bindepuffer gewaschen, und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Färbelösung (5% (v/v) Annexin V-FITC, 2,5% (v/v) Propidiumiodid (PI)-Lösung (Stammlösung: 20 µg/ml) bzw. 2,5% (v/v) Annexin V-Alexa) resuspendiert, für mindestens 10 min im Dunkeln inkubiert und mit Annexin V-Bindepuffer auf 500 µl aufgefüllt. Die Zellen konnten direkt am Durchflusszytometer analysiert werden.

Annexin V-FITC	BD PharMingen, USA
Annexin V-Alexa	Roche, Mannheim
Annexin V Bindepuffer (10 x)	BD PharMingen, USA
PBS	Biochrom AG, Berlin

5.4.2 Nachweis später Apoptose/Nekrose über PI-Färbung

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde in Kombination mit der Annexin V-FITC-Färbung zusätzlich eine Färbung mit dem Vitalfarbstoff PI (pro Test: 2,5 µl einer 50 µg/ml PI-Färbelösung) durchgeführt. PI dringt in Zellen mit stark geschädigten Membranen ein und färbt somit spät-apoptotische oder nekrotische Zellen an. Diese können dann über die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer von den vitalen Zellen bzw. von Zellen im frühen Apoptosestadium unterschieden werden.

Propidiumiodid Stammlösung (1 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen

5.4.3 Nachweis von Zelltod mittels TMRM

TMRM ist ein nicht-toxischer Farbstoff, der dem Nachweis von Veränderungen des Membranpotentials von Mitochondrien dient. Aufgrund seiner positiven Ladung akkumuliert TMRM in negativ geladene Mitochondrien mit intaktem Membranpotential. Beim Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials kommt es zur Freisetzung von gespeicherten Anionen und somit auch zur Freisetzung von TMRM (Elmore *et al.*, 2004). Lebende Zellen können so von nicht-vitalen Zellen unterschieden werden. Die Zellen wurden mit TMRM (50 nm) versetzt und für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in PBS aufgenommen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers.

TMRM (Tetramethylrhodaminmethylester Perchlorat)	Molecular Probes, USA

5.4.4 Nachweis von Zellviabilität mittels Calcein-AM

Um genaue Untersuchungen des Zelltods durchzuführen, wurden die Zellen mit Calcein-AM behandelt. Es handelt sich dabei um eine Zellviabilitätsanalyse, die den Nachweis der Calcium-Abhängigkeit bei der Induktion von Zelltod ermöglicht. Calcein-AM ist, nach Aufnahme in die Zelle, in der Lage, Calciumionen im Zytoplasma zu binden, und damit die Induktion von Zelltod zu verhindern. Die resultierende Grünfluoreszenz spiegelt die Vitalität der Zellen wieder, sodass eine durchflusszytometrische Ermittlung toter Zellen möglich ist. Für die Herstellung der Calcein-AM-Stammlösung (1,6 mM) wurde die Substanz in DMSO gelöst, und in einer Konzentration von 1,6 µM für die Zellviabilitätsanalyse eingesetzt.

Calcein-AM	Molecular Probes, USA

5.4.5 Zellzyklus-Analyse

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte durch Messung des DNA-Gehalts. Im Verlauf der Apoptose findet internukleosomale DNA-Fragmentierung statt und die Zelle verliert nach Permeabilisierung der Zellmembran die DNA Fragmente durch Diffusion. So können apoptotische Zellen von normalen Zellen durch ihren verminderten DNA-Gehalt unterschieden werden. Durch Färbung der DNA mit PI wurde der DNA-Gehalt bestimmt. Dabei lagern apoptotische Zellen weniger Farbstoff ein als nicht-apoptotische Zellen in der G1-Phase. Man spricht deshalb von Sub-G1-Zellen.
Die Zellen wurden zunächst pelletiert und in kaltem (-20°C) 70%-igem Ethanol unter vortexen fixiert, und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig abzentrifugiert (1000 g, 5 min) und mit 1 ml PI-Färbelösung versetzt. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 50 µl PI (Stammlösung: 1 mg/ml), 10 µl RNase A und 950 µl 1% Glucose in PBS. Der DNA-Gehalt der Zellen konnte am Durchflusszytometer nach einer 10-minütigen Inkubation im Dunkeln gemessen werden.

Ethanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
Glucose	Sigma, Steinheim
RNase A	Qiagen, Hilden

5.4.6 CFSE-Proliferationsanalyse

Die Proliferation der Zellen wurde mittels einer CFSE-Färbung analysiert. CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) ist eine membrangängige Substanz, die intrazellulär fluoreszierend wird und über die Estergruppe kovalent an zytoplasmatische Proteine bindet. Die Zellfunktion wird dabei nicht wesentlich beeinträchtigt (Lyons, 2000). Bei einer Zellteilung wird das CFSE gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, sodass eine präzise Charakterisierung der einzelnen Zellgenerationen möglich ist. Für eine zusätzliche Viabilitätsanalyse wurden die Zellen mit TMRM gefärbt.

Die Zellen wurden für 45 min mit CFSE bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nach CFSE-positiven Zellen sortiert. Diese Zellpopulation wurde dann für 24 h mit 5 µM Cisplatin in An- und Abwesenheit von Imatinib behandelt. Die Zellsuspension wurde nach der Inkubation für 20 min mit TMRM gefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)	Calbiochem, USA

5.4.7 BrdU-Proliferationsanalyse

Mittels der BrdU-Proliferationsanalyse wurden proliferierende Zellen nachgewiesen. Das 2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU) ist ein Analogon des Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. BrdU kann mit spezifischen Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen werden. Zusätzlich können weitere Verfahren, wie PI-Färbung, durchgeführt werden, um parallel den DNA-Gehalt zu analysieren. Für die BrdU-Proliferationsanalyse wurden die Zellen mit BrdU gepulst. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C wurden die Zellen mit Ethanol fixiert, und ü. N. bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch die Zugabe von HCl denaturiert. Dieser Denaturierungsschritt ist für die Bindung des Antikörpers an BrdU notwendig. Zur Neutralisierung wurde den Zellen 1 ml Boraxlösung zugegeben, dann mit 1 ml PBS/BSA/Tween gewaschen und anschließend mit dem anti-BrdU-Antikörper 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation mit anti-BrdU folgte erneut ein Waschschritt mit 1 ml PBS/BSA/Tween. Die darauffolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper GAM-FITC erfolgte für 30 min bei 4 °C. Die Zellen wurden dann mit 1 ml Glucose/PBS gewaschen, bevor sie schließlich in 1000 µl PI-Färbelösung (50 µL PI, 10 µl RNase A (=1 mg), 950 µl Glucose in PBS) aufgenommen wurden.

Der Nachweis des BrdU-Einbaus in die DNA erfolgte mittels einer FACS-Analyse.

BrdU	Sigma, Steinheim
Anti-BrdU	Becton Dickinson, USA
GAM-FITC	Dianova, Hamburg
Tween 20	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, Steinheim
Glucose	Sigma, Steinheim
RNase A	Qiagen, Hilden

5.4.8 Zellvitalitätsnachweis mittels des MTT-Assays

Der Nachweis der Zellvitalität erfolgte mittels eines MTT-Assays (Mosmann *et al.*, 1983), der lebende Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Dieser Assay beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT, wobei es durch Spaltung des Tetrazoliumrings zur Bildung eines violetten Formazan-Produktes (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl-) 3,5 diphenylformazan) kommt. Diese Reduktion erfolgt durch eine in den Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen vorkommende Dehydrogenase. Eine Färbung ist also ein Zeichen für vitale Zellen.

Für diesen Versuch wurden 7 x 10^3 Zellen 48 h in einer 96-well Platte kultiviert. Dabei wurden 10 µl einer MTT-Gebrauchslösung (10 mg/ml MTT in PBS) pro well zugegeben, für zwei h bei 37°C inkubiert, und anschließend je 90 µl eines MTT-Lysepuffers (15% SDS in DMF-Wasser (1:1) gelöst; pH 4,5 mit HCl) zugegeben. Über Nacht wurde die 96-well Platte im Dunkeln bei Raumtemperatur geschüttelt. Die photometrische Quantifizierung der Färbung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm. Ausgewertet wurde mit Hilfe des Statistik Programms ‚GraphPad Prism 3.0‘.

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid))	Sigma, Taufkirchen
ELISA-Reader ‚Wallac‘	SLT Labinstruments, Crailsheim
GraphPad Prism 3.0 Software	GraphPad Software, USA

5.5 Protein-Analyse

5.5.1 Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien

Bei der Extraktion nukleärer und cytoplasmatischer Proteine wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4°C) pelletiert und anschließend mit kaltem PBS gewaschen. Bei diesem Waschschritt wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt, und die Zellpellets nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Die noch gefrorenen Zellpellets wurden in 200 bis 500 µl 1 x Lämmlipuffer (62,5 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 1% Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen und sofort für fünf min bei 95°C aufgekocht. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Ultraschallgeräts homogenisiert und für 20 min abzentrifugiert (8000g, 4°C). Für die Auftrennung per SDS-PAGE wurden jeweils gleiche Volumina der Proben (üblicherweise 30 – 50 µl) verwendet. Durch das im Lämmlipuffer enthaltene SDS ist eine Proteinbestimmung bei dieser Methode nicht möglich, es wurden deshalb bei zu vergleichenden Proben die gleichen Zellmengen verwendet.

Ultraschall Homogenisator *Sonopuls HD200*; *MS72* Mikrospitze aus Titan	Bandelin Elektronik, Berlin

5.5.2 Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE

Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach gewünschtem Molekulargewichtsbereich der zu trennenden Proteine wurden unterschiedliche Anteile von Acrylamid und N,N'-Methylen-bis Acrylamid verwendet (siehe Tabelle 2). Aufgetragen wurden Probenvolumina von 40 µl, wobei für jedes Gel ein Molekulargewicht-Marker mitgeführt wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-Base, 0,2 M Glycin, 1% SDS) gefüllten Vertikalelektrophoresekammer bei einer konstanten Stromstärke von 7 mA pro Gel über Nacht.

Tabelle 2: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	4%-Sammelgel	5%-Trenngel	7,5%-Trenngel	10%-Trenngel
30% Acrylamid/Bis-Lösung	1,35 ml	4,2 ml	6,25 ml	8,3 ml
H_2O	6,1 ml	14,1 ml	12 ml	9,95 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	6,22 ml	6,22 ml	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-	-	-
10% SDS	100 µl	250 µl	250 µl	250 µl
Temed	10 µl	25 µl	25 µl	25 µl
10% APS	100 µl	250 µl	250 µl	250 µl

Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Vertikal-Elektrophoresekammer, Protean® II xi Cell‘	Bio-Rad, München
30% Acrylamid/Bis-Lösung (37, 5:1)	Bio-Rad, München
Molekulargewicht-Marker	cell signaling, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg

5.5.3 Western-Blot Analyse

Mit Hilfe einer Trans-Blot® Semi-Dry Transferkammer wurden die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde auf die nach Angaben des Herstellers vorbehandelte Membran das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Gel und Membran wurden dabei zwischen je drei Lagen mit Transferpuffer (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 20% (v/v) Methanol, 1% (w/v) SDS) getränktem Filterpapier platziert. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 15 V für 1,5 h. Die Membran wurde nach dem Transfer in 1 x TBS (40 g NaCl, 1 g KCl, 15 g Tris, pH 7,4; ad. 5000 ml Aqua dest.) gewaschen, um überschüssiges Methanol zu entfernen. Anschließend wurde die Membran durch eine einstündige Inkubation in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST (1 x TBS mit 0,1% Tween-20) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers (siehe Tabelle 3) erfolgte nach Angaben des Herstellers, entweder in 5% BSA in TBST oder in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST bei 4°C über Nacht.

Tabelle 3: verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
p21	Maus, IgG1, Klon SX118	BD, Pharmingen	1:1000
Mdm2	Maus, IgG1, Klon 2A10	zur Verfügung gestellt von A.J. Levine	1:10000
p53	Maus, IgG1, Klon Pab 240	Santa Cruz, Heidelberg	1:250
phospho-p53 (Ser15)	Maus, IgG1, Klon 16G8	Santa Cruz, Heidelberg	1:500
AIF	Maus IgG_{2b}, Klon Pab 240	Santa Cruz, Heidelberg	1:250
ATM	Kaninchen IgG, Klon D2E2	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
phospho-ATM (Ser1981)	Maus, IgG1, Klon 10.H11.E12	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
Bcl-x_L	Maus IgG_{2a}, Klon 2H12	BD, Pharmingen	1:1000
BAX	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
Abl	Maus, IgG1, Klon 8E9	BD, Pharmingen	1:1000
Puma	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
FoxO3a	Kaninchen, monoklonal, Klon 75D8	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
Phospho-FoxO3a (Ser318/321)	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
anti-GAPDH	Maus, IgG, 6C5	Biodesign, USA	1:30000
anti-β-Aktin	Maus, Klon AC-15	Sigma, Steinheim	1:5000

Die Membran wurde im Anschluss 3 x 5 min in TBST gewaschen. Abhängig vom Herkunftsorganismus des eingesetzten primären Antikörpers (Maus, Kaninchen, etc.) wurde nun ein entsprechender Peroxidase (POD)-konjugierter Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 4) zugegeben. Die Inkubation des sekundären Antikörpers wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST durchgeführt.

Tabelle 4: verwendete Sekundär-Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
anti-Kaninchen-IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000
anti-Maus-IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000

Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min in TBST gewaschen.

Die Detektion der Antikörper erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Hierfür wurde ‚SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate' nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde über eine Exposition der Membran gegen einen speziellen Röntgenfilm und die nachfolgende Entwicklung des belichteten Films sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software AIDA (*advanced image data analyzer*), Version 2.31, wurden densitometrische Auswertungen durchgeführt.

PVDF Membran	Boehringer Mannheim, Mannheim
Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Filterpapier ‚Gel-Blotting Papier'	Schleicher & Schuell, Dassel
‚Western Blocking Reagent'	Roche, Mannheim
Autoradiographie Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg
‚Lumi-Film', Chemiluminescent Detection Film	Roche, Mannheim
‚SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate'	Pierce Biotechnology, USA
‚LAS-1000', Luminescent imager Analyzer with electronically cooled CCD camera System	Fujifilm, Medical Systems, USA
Advanced image data analyzer (AIDA 2.31)	Raytest, Straubenhardt

Um bei Bedarf die Membran wieder von primärem und sekundärem Antikörper zu befreien, wurde diese 20 min in einer SDS-Mercaptoethanol-Strippinglösung (62,5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 100 mM Mercaptoethanol; pH 6,7) bei 52°C inkubiert. So konnte die Membran für die Untersuchung weiterer Proteine wie zum Beispiel Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder ß-Aktin, so genannte Haushaltsgene, als Beladungskontrolle herangezogen werden.

5.6 Immunfluoreszenz-Analysen

Die Lokalisation von Proteinen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Immunfluoreszenz-Analysen bestimmt. Hierfür wurden die Zellen, nach einer Behandlung mit Imatinib und Cisplatin, mit eiskaltem Methanol (100 %) fixiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 4 °C wurde das Pellet zentrifugiert (1400 rpm, 5 min, RT), zwei Mal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit primärem Antikörper 30 min bei 37 °C inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper GAM-FITC (30 min bei 37 °C) wurde das Pellet mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert. Zur Färbung des Zellkerns wurde zusätzlich bei RT 10 min mit TOPRO (TOPRO in PBS 1:1000) gefärbt. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in 20 µl aufgenommen und auf einen Objektträger übertragen.

eingesetzte Antikörper	
AIF (1:100)	santa cruz, Heidelberg
p53 (1:100)	santa cruz, Heidelberg
GAM-FITC (1:20)	Dianova, Hamburg
TOPRO (1:1000)	Invitrogen, Karlsruhe

Im Anschluss erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Proben.

Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heidelberg

5.7 Präparation der Plasmide für Transfektionsexperimente

5.7.1 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter Bakterien (*E. coli* Inv α one shot) wurden die Bakterien und Plasmid-DNA langsam auf Eis aufgetaut. Für die hier durchgeführte Transfektion wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Plasmide verwendet. Die Transformation erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989). Nach Zugabe von 1-2 µl Plasmid-DNA zu der Bakteriensuspension erfolgte eine 30-minütige Inkubation des Gemisches auf Eis. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 90 Sekunden. Das Gemisch wurde dann sofort 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2 % w/v Bacto trypton, 0,5 % w/v Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose) wurden die Bakterien 45 min bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt und anschließend auf LB-Agarplatten (1 % w/v Bacto Trypton, 0,1 % w/v Hefeextrakt, 0,2 mM NaCl, 1,2 % w/v Bacto Agar; pH 7,0) mit Ampicillin (50 µg/ml) zur Selektion ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Überleben und wachsen können nur Bakterien, die über das Ampicillin-Resistenzgen des eingeschleusten Plasmids verfügen. In flüssigem LB-Medium (1 % w/v Bacto Trypton, 0,1 % w/v Hefeextrakt, 0,2 mM NaCl, 50 µg/ml Ampicillin; pH 7,0) wurde eine Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm expandiert. Anschließend wurde, aus den daraus gewonnenen Pellets, mittels des QIAGEN Plasmid Midi Kit die Plasmid-DNA isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Tabelle 5: Beschreibung der verwendeten Plasmide

Plasmid	Sequenz
p53-shRNA	AGAGTATTTCACCCTCAAGAT
Kontroll-Vektor	GGAATCTCATTCGATGCATAC

E. coli Inv α one shot	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

5.7.2 Transfektionsexperimente

Um funktionelle Charakteristika von p53 zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Bcr/Abl-positive Zellen transient mit shRNA-Konstrukten gegen p53 transfiziert. Für die Elektroporation wurden 3 Mio. Zellen in 800 µl Medium (RPMI 1640 + 10% FCS) in einer 4 mm Elektroporationsküvette mit 30 µg des entsprechenden Plasmids vermischt und eine Minute bei RT stehengelassen. Es folgte eine Elektroporation von 2 x 0,005 Sekunden mit 400 V.

Analyse der funktionellen Auswirkungen der translationellen Inhibierung von p53

Um mögliche Auswirkungen der p53-Herunterregulierung zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Elektroporation in 20 ml Medium (RPMI 1640 + 10% FCS + mIL3 (1 ng/ml)) aufgenommen und 24 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden nach zwei Kriterien (GFP-Expression und Zellviabilität) sortiert. Die am FACS sortierten GFP-positiven, viablen Zellen konnten noch am selben Tag mit Cisplatin und Imatinib behandelt werden. Nach Inkubation der Zellen mit Cisplatin und Imatinib wurden die Viabilität der Zellen mittels Annexin-Färbung ermittelt.

Analyse der p53-Induktion nach sh-RNA-Behandlung

Für die Analyse der Transfektionseffizienz wurden die Zellen nach der Elektroporation ü. N. bei 37 °C kultiviert bevor sie mit Imatinib (3 µM) und Cisplatin (5 µM) behandelt wurden. Nach der 6-stündigen Cisplatin-Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl 1% BSA/PBS aufgenommen. Die Fixierung der Zellen erfolgte 15 min bei RT durch Zugabe von 100 µl Puffer A (Fixationspuffer). Die Proben wurden anschließend mit 1 ml 1% BSA/PBS gewaschen, in Antikörperlösung (1% BSA/PBS + 10 µl anti-p53-FITC) aufgenommen und mit Puffer B (Permeabilitätspuffer) versetzt. Nach der Antikörper-Inkubation von 45 min bei 4 °C erfolgte ein weiterer Waschschritt mit 1% BSA/PBS. Im Anschluss wurden die Zellen 45 min bei 4 °C mit anti-FITC dye-light gefärbt (pro Ansatz: 100 µl 1% BSA/PBS + 2 µl anti-FITC dye-light). Nach der Inkubation wurden die Proben erneut mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert und schließlich am FACS gemessen.

„fix and perm“-permeabilization-kit	ADG, Kaumberg

5.8 RNA-Interferenz

Mittles der RNA-Interferenz (RNAi) wurde durch dsRNA die Stilllegung von Genen ausgelöst. Die Übertragung oder Expression von „short interfering RNA“-Molekülen (siRNA) erlaubt eine gezielte Inaktivierung von Genen (Mittal *et al.*, 2004).

5.8.1 Übertragung von siRNA-Molekülen

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNA-Molekülen handelt es sich um 21-23 nt lange asymmetrische dsRNA Moleküle, die von der Alnylam Europe AG (Kulmbach) zur Verfügung gestellt wurden. Durch einen zwei Basen langen 3‘-Überhang des ‚antisense‘-Strangs entsteht eine Asymmetrie, die sich als sehr effizient erwiesen hat. Die siRNA (20-100 µM) wurde in einem speziellen ‚Annealing‘-Puffer (20 mM NaPO4, 100 mM NaCl; pH 6,9) geliefert und unverdünnt für die Transfektion eingesetzt.
Für die spezifische Hemmung der *Bcr/Abl-p210*-Expression mittels RNAi wurde als Zielsequenz ein Bereich am Fusionspunkt des jeweiligen *Bcr/Abl*-Transkripts verwendet. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer entsprechenden ‚mismatch‘-siRNA elektroporiert. Die verwendeten siRNAs sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten siRNA-Moleküle

Name	Sequenz		Beschreibung
BAF9	*S*	5‘-AGAGUUCAA|AAGCCCUUCAGC-3‘	sequenzhomolog zu *Bcr/Abl*[a]*-e14a2*
	as	3‘-CGUCUCAAGUU|UUCGGGAAGUCG-5‘	
BAF14	*S*	5’-AGA*C*UUCAA|*U*AGCCC*A*UCAGC-3‘	3 x ‚mismatch’[b]-Kontrolle zu BAF9
	as	3‘-CGUCU*G*AAGUU|*A*UCGGG*U*AGUCG-5‘	

[a] genaue Fusionsstelle der Bcr- und c-Abl-Sequenz mit Querstrich gekennzeichnet
[b] ‚mismatch‘-Basen kursiv und unterstrichen

Die siRNA-Übertragung in Bcr/Abl-positiven Zellen (32Dp210wt) erfolgte mittels Elektroporation. 2,5-5 x 10^6 Zellen wurden dabei in 800 µl RPMI 1640 Medium in einer 4 mm-Elektroporationsküvette mit der jeweiligen siRNA (200 - 800 nM) gemischt und 30 sec inkubiert. Für die Elektroporation wurde ein Einzelpuls-Programm (250 V, 1800 µF, ∞ Ω) verwendet. Zellen, die mit einer entsprechenden ‚mismatch‘-siRNA behandelt wurden, dienten als Kontrolle. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in frisches Medium überführt.

Die Transfektion wurde 3-fach, im Abstand von 24 h, durchgeführt, um eine maximale Herunterregulierung des stabilen Onkoproteins Bcr/Abl zu erzielen. Da Bcr/Abl-positive Zellen in ihrem Wachstum vollständig abhängig sind von Bcr/Abl, und dessen Verlust daher zum Zelltod führt, wurden die Zellen in Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) für die gesamte Dauer der Behandlung kultiviert. Im Anschluss wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt.

5.9 Molekularbiologische Methoden

5.9.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus murinen hämatopoetischen Zelllinien erfolgte unter Verwendung des RNeasy®-Minikits nach Anleitung des Herstellers.

RNeasy®-Minikit	Quiagen, Hilden

5.9.2 Quantifizierung p53-abhängiger Zielgene über qRT-PCR

Die quantitative Bestimmung p53-abhängiger Zielgene in Bcr/Abl-positiven Zellen erfolgte unter der Verwendung der LightCycler-Methode. Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde hierfür unter Verwendung des SuperScript III kits in cDNA umgeschrieben (Durchführung nach Anleitung des Herstellers).

Für die quantitative Bestimmung einer DNA-Probe wurden Primer eingesetzt, die an die zu detektierende DNA hybridisieren (siehe Tabelle 7). Die Primer für die Gene *p21* und *Mdm2* wurden mittels des Programms Primer 3 Input selbst designt, während die Primerpaare für *BAX*, *NOXA* und *PUMA* käuflich erworben wurden (SABioscience, Frederick (USA)). Jeweils 2 µl (500 ng) Standard-DNA oder unbekannte DNA wurden zum PCR-Ansatz (siehe Tabelle 8) pipettiert und anschließend in die LightCycler-Kapillare eingefüllt. Die gefüllten Kapillaren wurden vorsichtig in einem LC-Karussel zentrifugiert (3000 rpm, 5 sec). Das LC-Karussel wurde anschließend in den LightCycler gestellt und das Programm gestartet.

Tabelle 7: verwendete Primer

Primer	Sequenz	
p21	*s*	5'- ATC CTG GTC TGG ACT GTC TAC CCT TA -3'
	as	5'- TGC AAG CAC CTC ACA GAT TC -3'
Mdm2	*s*	5'- TGC AAG CAC CTC ACA GAT TC -3'
	as	5'- ACA CAA TGT GCT GCT GCT TC -3'
PUMA	Sequenz nicht bekannt	
NOXA		
BAX		

Tabelle 8: PCR-Reaktionsmix

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1 Ansatz [µl]
5x PCR-Puffer		1 x	2
dNTPs	2,5 mM	250 µM	1
Primer *sense*	10 µM	0,5 µM	0,5
Primer *anti sense*	10 µM	0,5 µM	0,5
$MgCl_2$	55 mM	30 mM	0,6
BSA	0,1 %	0,01 %	1
SYBR Green	1:2000		0,5
Tag Pol	5 U/µl	0,75 U	0,15
H_2O			Add. 8µl

LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim

6 ERGEBNISSE

In der Pathogenese der CML spielt das Fusionsprotein Bcr/Abl eine zentrale Rolle. Basierend auf dieser Erkenntnis, wurde Ende der 90er Jahre mit der Entwicklung von Imatinib ein Wirkstoff konzipiert, der spezifisch die Tyrosinkinase-Aktivität des Onkoproteins hemmt. Vor allem in der frühen Phase der CML, der sogenannten chronischen Phase, stellt die Behandlung mit Imatinib eine sehr attraktive und wirksame Behandlungsmöglichkeit dar. Allerdings ist eine medikamentöse Heilung der CML nach aktuellem Erkenntnisstand durch eine Imatinib-Monotherapie nicht möglich. Auch die bei einigen Patienten beobachtete Entwicklung einer Imatinib-Resistenz, die sehr häufig bei fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auftritt, erfordert alternative CML-Therapieformen.
In der vorliegenden Arbeit wird daher untersucht, inwieweit eine Kombination aus Imatinib mit zytotoxischer Therapie erfolgversprechend sein könnte. Im Zentrum steht dabei die Frage, welche Einflüsse die Hemmung von Bcr/Abl durch Imatinib auf die Reaktion der Zelle nach genotoxischem Stress hat.

6.1 Imatinib führt zu einer Hypersensitivität von CML-Zellen gegenüber Cisplatin

Um den Einfluss von Imatinib auf die Viabilität von primären CML-Zellen zu analysieren, wurden Philadelphia-positive Zellen von CML-Patienten und normale myeloische Progenitor-Zellen auf ihre Fähigkeit GM-CFUs zu bilden getestet. Dabei wurden die Zellen für 16 h mit Cisplatin allein, Imatinib allein und mit der Kombination aus Cisplatin und Imatinib behandelt und anschließend für den CFU-Assay in Abwesenheit von Imatinib und Cisplatin ausplattiert. Die Dosierung von Cisplatin wurde so gewählt, dass Cisplatin allein nicht zu einer signifikanten Reduktion des Überlebens der Zellen führt. Nach einer 14-tätigen Inkubation wurden die Kolonien mit mehr als 50 Zellen der jeweiligen Ansätze ausgezählt.
Wie in Abbildung 1 dargestellt, hat die 16-stündige Behandlung mit 3 µM Imatinib keine signifikante Wirkung auf die Bildung von GM-CFUs Philadephia-positiver (89,4 % - 120,9 % bezogen auf nicht-behandelte Zellen) und negativer (87,5 % - 128,1 % bezogen auf nicht-behandelte Zellen) Progenitor-Zellen. Die Behandlung mit 1 µM Cisplatin für 16 h führt zu einer Reduktion der Kolonienanzahl von 12,8 ± 5,1 % bei Philadelphia-positiven und 16,5 % ± 2,8 % bei normalen Progenitoren. Die Kombination aus Imatinib und Cisplatin hat bei normalen myeloischen Progenitoren keinen zusätzlichen Effekt. Im Gegensatz dazu kommt es durch die

Hemmung von Bcr/Abl durch Imatinib bei Philadelphia-positiven Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin. Die Kombination beider Substanzen führt zu einer signifikanten Reduktion der Zahl von GM-CFUs Philadelphia-positiver Zellen um 57,8 % ± 5,9 %.

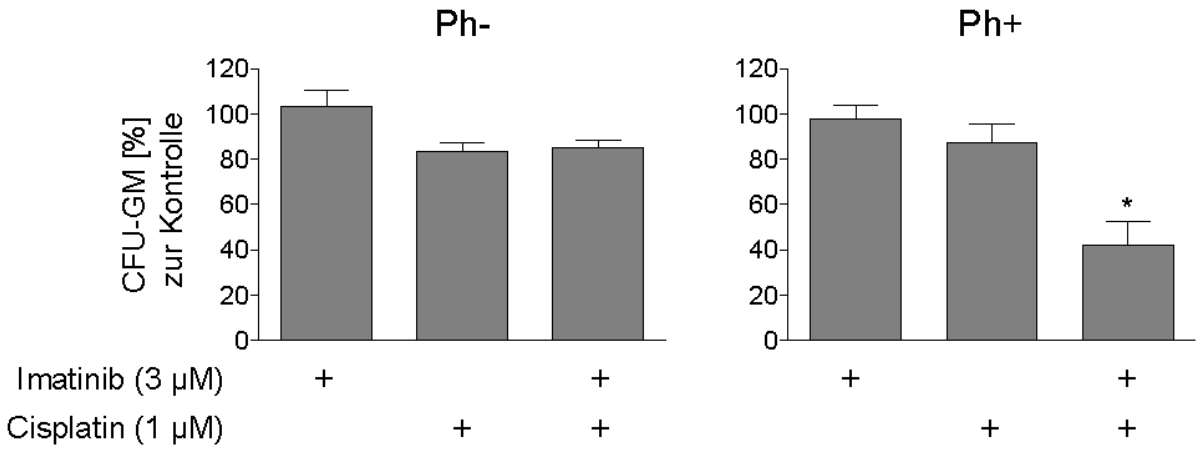

Abb. 1: Philadelphia-positive Zellen werden hypersensitiv gegenüber Cisplatin in Anwesenheit von Imatinib. Je 5000 Philadelphia-positive Zellen aus CML-Patienten und normale Progenitor-Zellen wurden einer 16-stündigen Behandlung mit Imatinib (3 µM) allein, Cisplatin (1µM) allein und der Kombination aus Cisplatin und Imatinib in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren hIL3 (1 ng/ml) + GCSF unterzogen. Kontrollzellen wurden dabei unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 24-well Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation von 14 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt sind die normierten gemittelten Werte einer 3-fach-Bestimmung und die Standard-Abweichung vom Mittelwert (SEM). n=5

6.2 Einfluss von Bcr/Abl auf murine BaF3-Zellen

Aufgrund der geringen Zahl primärer Progenitor-Zellen und der schnellen Differenzierung unreifer Stammzellen zu Monozyten und Granulozyten, wurden molekulare und funktionelle Mechanismen der Hypersensitivität gegenüber Cisplatin in einem murinen Zelllinenmodell untersucht.

6.2.1 Externe Wachstumsfaktoren verhindern Imatinib-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Zellsystem basiert auf der murinen prä-B-Lymphozytenlinie BaF3. Diese Zellen sind in ihrem Überleben abhängig von externen Wachstumsfaktoren. Durch die stabile Transfektion dieser Zellen mit einem Bcr/Abl-Chimär, dessen Bcr-Anteil human und Abl-Anteil murin ist, entstand die Bcr/Abl-positive Zelllinie BaF3p185. Ein Vorteil dieses Konstrukts ist, dass durch den murinen Abl-Anteil keine Speziesbarriere zwischen Kinase und Substrat besteht. Im Gegensatz zur Bcr/Abl-negativen Ausgangszelllinie sind Bcr/Abl-positive Zellen aufgrund der transformierenden Eigenschaften von Bcr/Abl in ihrem Überleben und ihrer Proliferation unabhängig von Wachstumsfaktoren. Die Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit Imatinib führt zu einer vollständigen Hemmung der Bcr/Abl-Kinase, wobei es in Abwesenheit von externen Wachstumsfaktoren zur Induktion von Zelltod kommt (vgl. Abb. 2). Behandelt man die Zellen zusätzlich mit dem Wachstumsfaktor mIL3, kann der Imatinib-induzierte Zelltod vollständig verhindert werden (vgl. Abb. 2). Durch den Zusatz exogener Wachstumsfaktoren können somit sowohl Bcr/Abl-positive mit Bcr/Abl-negativen Zellen, aber auch Bcr/Abl-positive Zellen mit aktiver bzw. gehemmter Bcr/Abl-Kinase innerhalb eines Zellsystems verglichen werden. Ein solcher direkter Vergleich mit der entsprechenden Bcr/Abl-negativen Ausgangslinie ist sowohl mit primären Philadelphia-positiven Zellen von CML-Patienten, als auch mit humanen Zelllinien, die aus CML-Patienten gewonnen wurden, wie beispielsweise K562 und BV173, nicht möglich. Da es sich bei den Linien K562 und BV173 um Zellen aus Blastenkrisen handelt, sind bei diesen Zellen neben Bcr/Abl weitere Mutationen typisch, was eine Interpretation der Rolle von Bcr/Abl zusätzlich erschwert (Drexler *et al.*, 1999).

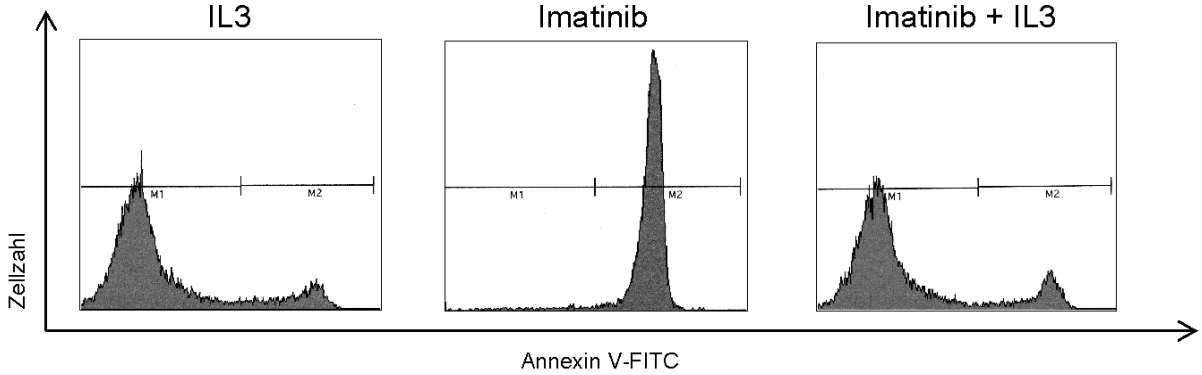

Abb. 2: mIL3 verhindert den Imatinib-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen. Bcr/Abl-positive Zellen wurden mit mIL3 (1 ng/ml) allein und mit Imatinib (3µM) in Ab- und Anwesenheit von mIL3 behandelt. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen mit Annexin V-FITC gefärbt. Anschließend wurde am Durchflusszytometer die Rate der Annexin V-FITC-gebundenen Zellen analysiert.

6.3 Einfluss von Imatinib und Cisplatin auf Bcr/Abl-positive und –negative BaF3-Zellen

Im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität muriner Bcr/Abl-positiver und –negativer Zellen gegenüber Cisplatin in An- und Abwesenheit von Imatinib untersucht.

6.3.1 Imatinib führt zur Hypersensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen als Antwort auf Cisplatin

Der Effekt von Imatinib und Cisplatin auf die Viabilität muriner Zellen wurde mittels einer Annexin V-FITC Analyse untersucht. Hierfür wurden Bcr/Abl-positive und Bcr/Abl-negative Zellen mit Cisplatin allein, Imatinib allein und der Kombination aus Cisplatin und Imatinib behandelt. Die Analyse der Zelltodesrate erfolgte nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation am Durchflusszytometer. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, hat Bcr/Abl einen protektiven Effekt bei einer Behandlung der Zellen mit Cisplatin (10,2 ± 0,9% bei Bcr/Abl-positiven Zellen vs. 18,8 ± 3,8 % bei Bcr/Abl-negativen Zellen). Die Behandlung mit Imatinib allein hat keine

negative Wirkung auf die Viabilität beider Zelllinien. Bei Bcr/Abl-negativen Zellen hat eine zusätzliche Behandlung mit Imatinib keinen weiteren Effekt auf die Induktion des Zelltods durch Cisplatin (17,83 ± 1,7 % mit Imatinib vs. 18,8 ± 3,8 % ohne Imatinib). Analog zu der Beobachtung in primären Zellen, führt auch in diesem Zellmodell eine Imatinib-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen zu einer deutlichen Sensitivierung gegenüber Cisplatin. Durch die Kombination aus Imatinib und Cisplatin kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Todesrate im Vergleich zu der, die durch Cisplatin allein erreicht wird (47 ± 2,6 % in Anwesenheit von Imatinib vs. 10,2 ± 0,9% ohne Imatinib).

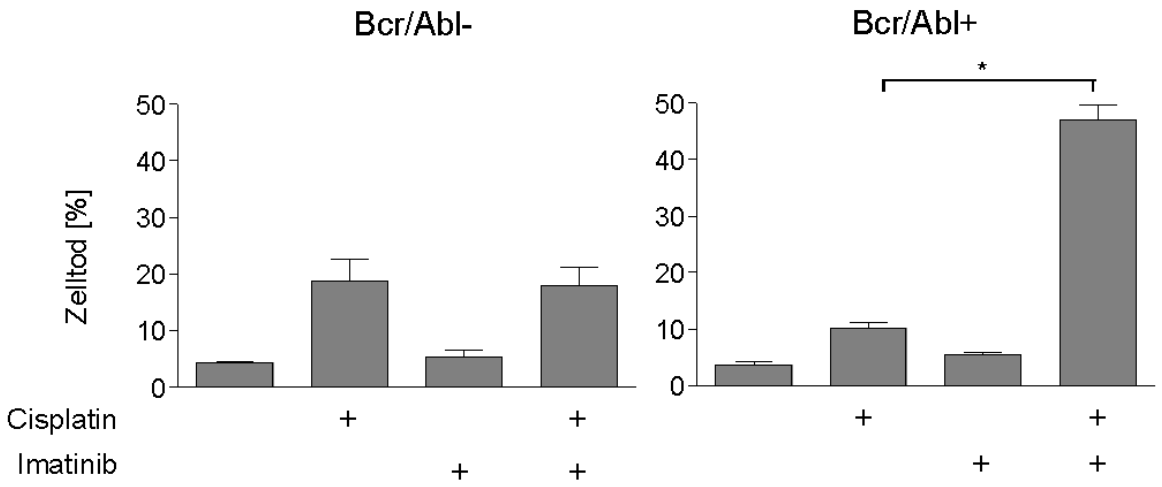

Abb. 3: Imatinib führt zur einer Hypersensitivität bei Bcr/Abl-positiven Zellen als Antwort auf Cisplatin. Bcr/Abl-negative und Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) jeweils mit Imatinib (3 µM) allein und Cisplatin (5 µM) allein und mit der Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Nach einer Inkubation von 16 h wurde der Anteil toter Zellen bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit Annexin V-FITC gefärbt und anschließend die Zelltodrate am Durchflusszytometer analysiert. Kontrollzellen wurden dabei weder mit Imatinib noch mit Cisplatin behandelt. n=5

6.3.2 Erreichte Sensitivität durch Imatinib bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist vergleichbar mit der von Hodenkarzinomzellen

Um die Effizienz der Steigerung der Cisplatin-Sensitivität durch Imatinib zu bewerten, wurden die GI_{50}-Werte Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen mit den Werten von 28 Tumorzelllinien verglichen. Dieses Zelllinienpanel beinhaltet drei Cisplatin-hochsensitive Hodenkarzinomlinien. Hodenkarzinome sind durch ihre hohe Sensitivität gegenüber Cisplatin charakterisiert und durch platinhaltige Therapie häufig heilbar (di Pietro *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurden Bcr/Abl-positive und -negative Zellen in einer 96-well Platte ausgesät. Behandelt wurden die Zellen mit Imatinib allein, Cisplatin allein und mit der Kombination aus Imatinib und Cisplatin und anschließend für 48 h bei 37 °C in einer 96-well Platte kultiviert. Ausgewertet wurde mit Hilfe des Statistik Programms ‚GraphPad Prism 3.0'. Aus den Resultaten wird ersichtlich, dass die murine Bcr/Abl-positive Zelllinie BaF3p185 in Anwesenheit von Imatinib im selben Sensitivitätsbereich wie die hochsensitive Hodenzelllinie N-TERA liegt (siehe Abb. 4).

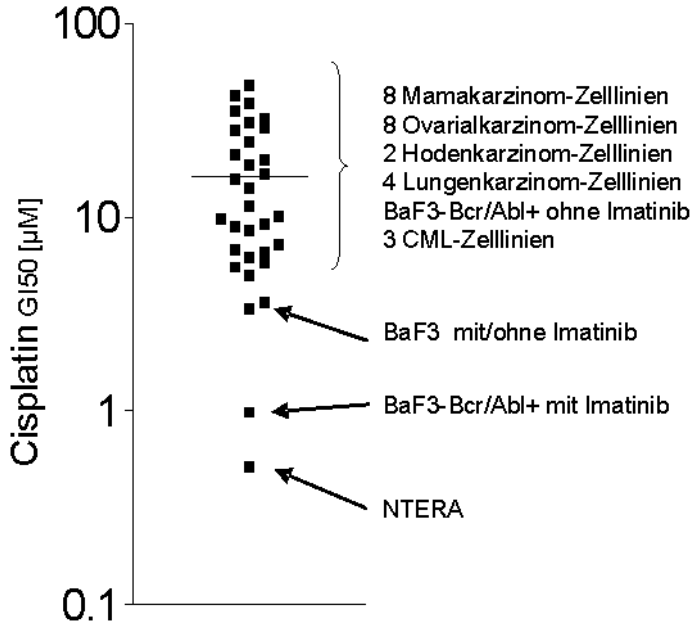

Abb. 4: Imatinib-behandelte Bcr/Abl-positive Zellen erreichen eine mit Hodenkarzinomzellen vergleichbare Sensitivität gegenüber Cisplatin. Die Zelllinien wurden mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen (0 bis 30 µM) für 48 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität über die MTT-Analyse bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Cisplatin-Konzentration, die zu einer 50 %-igen Wachstumsinhibition führt (GI_{50}).

6.4 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib und Cisplatin auf den Zellzyklus bei murinen Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen

Die Beobachtung, dass Imatinib die Cisplatin-Sensitivität in Bcr/Abl-positiven Zellen steigert, führte zur Frage inwieweit Imatinib die Induktion des Zellzyklusarrests durch Cisplatin in Bcr/Abl-negativen und -positiven Zellen beeinflusst.

6.4.1 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib und Cisplatin auf den Zellzyklus bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen

Mittels einer Doppelfärbung mit BrdU und PI wurden funktionelle Auswirkungen einer Cisplatin- und Imatinib-Behandlung auf den Zellzyklus Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen untersucht. Durchflusszytometrisch konnten dabei parallel DNA-Synthese und -Gehalt analysiert werden. Die Zellzyklusanalyse erfolgte nach einer Cisplatin-Inkubation von 24 h. Wie in Abbildung 5 dargestellt, ist sowohl bei unbehandelten als auch bei Imatinib-behandelten Bcr/Abl-negativen Zellen eine normale Zellzyklusverteilung zu sehen. Die Behandlung mit Cisplatin führt zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit Imatinib hat bei Bcr/Abl-negativen Zellen keine Auswirkung auf die Proliferation oder die Zellzyklusverteilung.

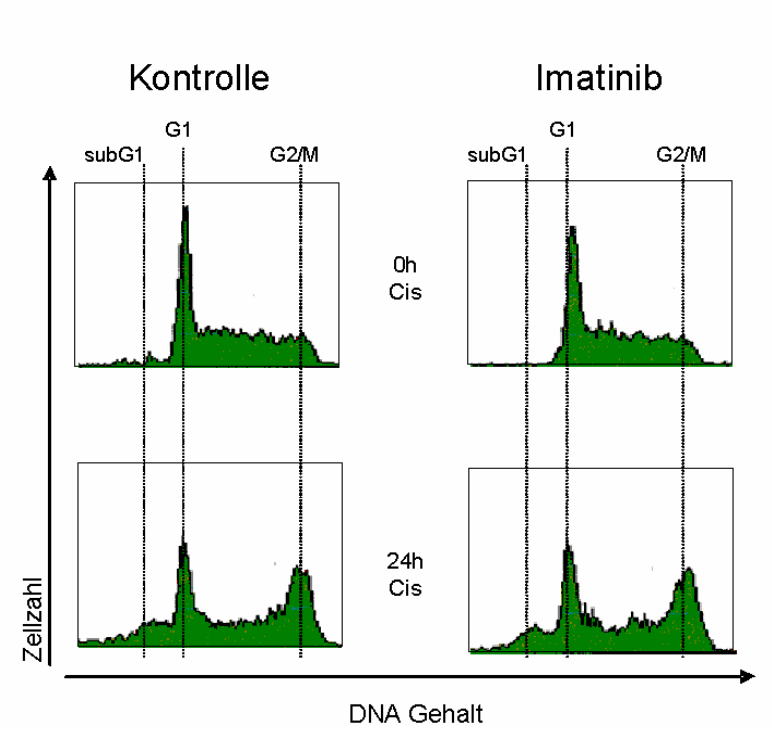

Abb. 5: Bcr/Abl-negative Zellen arretieren in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach Cisplatin-Behandlung. Die Analyse des Zellzyklus Bcr/Abl-negativer Zellen wurden mittels PI und BrdU Analyse untersucht. Die Zellen wurden dabei in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) in An- und in Abwesenheit von Imatinib (3 µM) behandelt. Als Kontrolle dienten Cisplatin-unbehandelte Zellen. Nach einer 24-stündigen Cisplatin-Inkubation wurde der Zellzyklus am Durchflusszytometer analysiert.

Wie aus Abbildung 6-A ersichtlich, ist der Cisplatin-abhängige Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase bei Bcr/Abl-positiven Zellen in Abwesenheit von Imatinib stärker ausgeprägt im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen. Während Bcr/Abl-positive Zellen in Abwesenheit von Imatinib auf Cisplatin mit einem G2/M-Arrest reagieren, sind die Zellen in Anwesenheit von Imatinib nicht mehr in der Lage zu arretieren. Nach einer 24-stündigen Behandlung mit Cisplatin akkumulieren 27,2 % Bcr/Abl-positive Zellen in G2/M, während der Anteil der Zellen in G2/M durch die zusätzliche Behandlung mit Imatinib deutlich reduziert ist (2,9 %) (vgl. Abb. 6-B). Durch die Imatinib/Cisplatin-Kombination kommt es vielmehr zu einer Akkumulation der Zellen in der subG1-Phase und somit zu einer Induktion des Zelltods (vgl. Abb. 6-B).

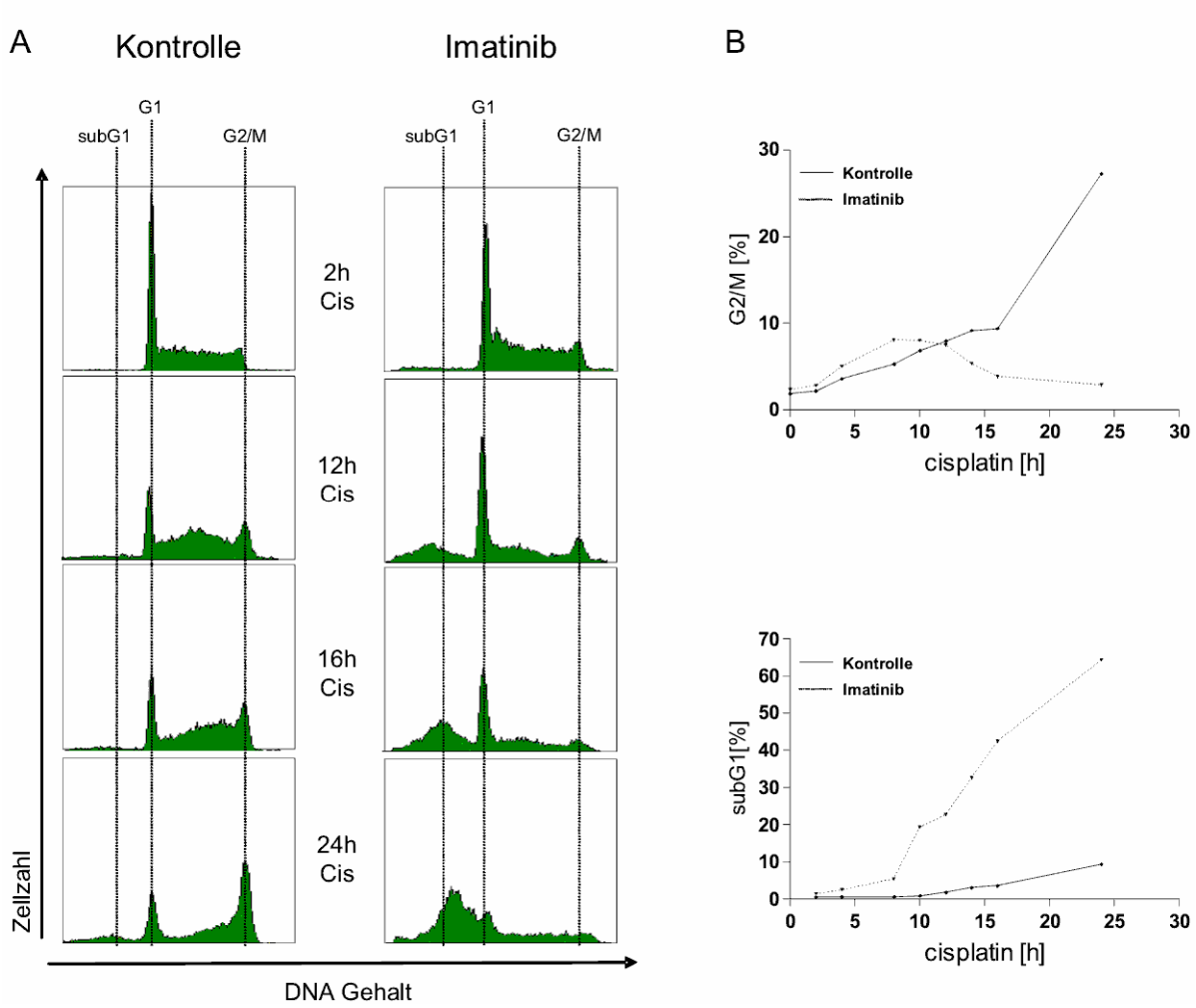

Abb. 6: Bcr/Abl-positive Zellen reagieren auf Cisplatin in Kombination mit Imatinib mit einem Verlust des G2/M-Arrest und einer Induktion von Zelltod. (A) Die Analyse des Zellzyklus Bcr/Abl-positiver Zellen wurde mittels PI-Färbung der DNA und Nachweis des BrdU-Einbaus untersucht. Die Zellen wurden mit Cisplatin (5 µM) allein oder in Kombination mit Imatinib (3µM) behandelt. Das Experiment wurde in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) durchgeführt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde am Durchflusszytometer der Zellzyklus analysiert. In (B) ist der zeitliche Verlauf des Anteils der Zellen in G2/M bzw. in subG1 nach Cisplatingabe gezeigt. Bcr/Abl-positive Zellen wurden mit Cisplatin (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Cisplatin wurden die Zellen mit PI gefärbt und anschließend fixiert. Die Analyse der Zellen in G2/M und subG1 erfolgte am Durchflusszytometer.

Die Beobachtung, dass Bcr/Abl-positive Zellen nicht in der Lage sind nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung in der G2/M-Phase zu arretieren, führte zur Untersuchung eines wichtigen Zellzyklus-Schlüsselenzyms. Die Ser/Thr-Kinase cdc2 (*cell division cycle 2*) reguliert vor allem den G2/M-Übergang (King *et al.*, 1994; Nurse, 1997). Für eine cdc2-Aktivierung ist

die Synthese und die Bindung von Cyclin B1 an cdc2 notwendig. Während der G2-Phase wird cdc2 durch die Kinasen wee1 und myk1 an den Seitenketten des Threonins 14 und des Tyrosins 15 phosphoryliert und somit inaktiviert (Lundgren *et al.*, 1991; Mueller, 1995; Booher *et al.*, 1997). Erst die Bildung eines cdc2/Cyclin B1-Komplexes, die durch Dephosphorylierung von cdc2 durch die Phosphatase Cdc25C ermöglicht wird, führt zur Initiation des G2/M-Übergangs (Strausfeld *et al.*, 1991). Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass es bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer verminderten cdc2-Phosphorylierung und damit Aktivierung infolge einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung kommt. Cyclin B1, dessen Proteinmenge durch dieselbe Behandlung kaum beeinflusst wird, ist dann in der Lage an nicht-phosphoryliertes cdc2 zu binden. Durch die Formation eines cdc2/Cyclin B1-Komplexes arretieren die Zellen nicht in der G2/M-Phase des Zellzyklus, stattdessen kommt es zur Progression der Zellen im Zellzyklus. Diese Daten erklären möglicherweise die fehlende Fähigkeit Bcr/Abl-positiver Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung in der G2/M-Phase zu arretieren.

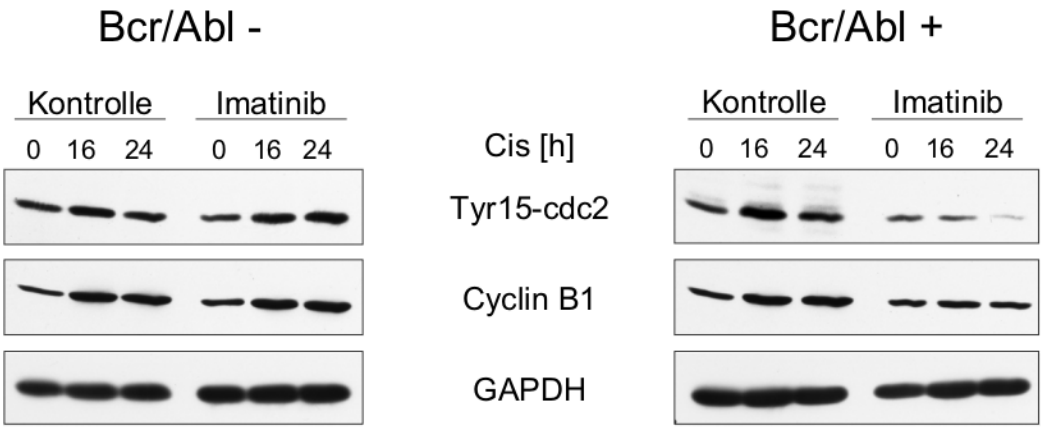

Abb. 7: Cisplatin in Kombination mit Imatinib führt in Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer Aktivierung von cdc2. Bcr/Abl-negative und Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) allein, Imatinib (3 µM) allein und mit der Kombination beider Substanzen behandelt. Das Gesamtlysat wurde nach einer Cisplatin-Behandlung von 16 bzw. 24 h isoliert. Mittels SDS-PAGE wurden die Lysate aufgetrennt und durch eine Western-Blot Analyse untersucht. Dabei wurden die Proteinmengen von Tyr15-cdc2 und Cyclin B1 analysiert. Die Beladung des Polyacrylamidgels wurde durch Detektion von GAPDH kontrolliert.

6.4.2 Imatinib induziert einen schnellen, mitochondrialen Zelltod als Antwort auf Cisplatin bei Bcr/Abl-positiven Zellen

Da bei Bcr/Abl-positiven Zellen die Kombination aus Cisplatin und Hemmung der Bcr/Abl-Kinase durch Imatinib einen verstärkten Zelltod induziert, wurde im nächsten Schritt getestet, ob der beobachtete Zelltod mitochondrial vermittelt wird. Wie in Abbildung 8 dargestellt, führt eine Behandlung mit Cisplatin kombiniert mit Imatinib zu einem sehr schnellen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Es kommt also zur Depolarisation der äußeren mitochondrialen Membran und somit zur Induktion von Zelltod.

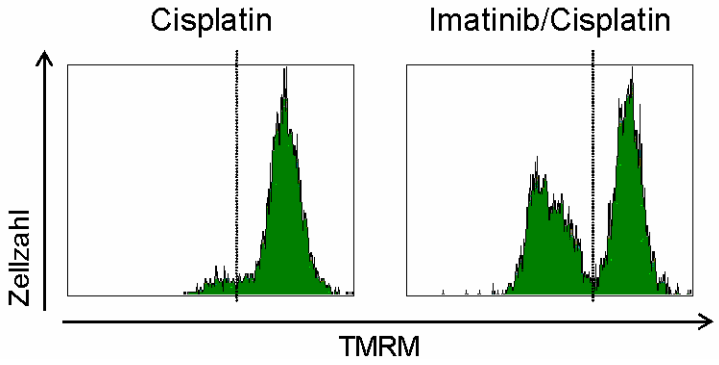

Abb. 8: Verlust der mitochondrialen Integrität bei Bcr/Abl-positiven Zellen spielt beim Cisplatin/Imatinib-induzierten Zelltod eine wichtige Rolle. Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) unterzogen. Als Marker für die mitochondriale Integrität wurden die Zellen nach Cisplatin-Inkubation mit TMRM gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen.

Aufgrund der Beobachtung, dass Bcr/Abl-positive Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib nicht mehr fähig sind im Zellzyklus zu arretieren, wurde im Folgenden untersucht, ob dies der Grund für den beobachteten Zelltod ist. Hierfür wurden die Zellen mit dem Zellfarbstoff CFSE gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zellen mit TMRM inkubiert, um parallel deren mitochondriale Integrität zu untersuchen. Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, arretieren Cisplatin-

behandelte Zellen in Abwesenheit von Imatinib nach der ersten auf die Cisplatingabe erfolgten Zellteilung in der G2/M-Phase. Ohne ihre Viabilität zu verlieren, sind die Zellen dann in der Lage in einen weiteren Zyklus zu gehen. Im Gegensatz dazu, führt die Behandlung der Zellen mit Imatinib bereits nach einer Zellteilung zum Verlust von TMRM aus den Mitochondrien und somit zur Induktion von Zelltod. Die Zellen sind nicht mehr fähig eine zweite Teilung einzuleiten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Imatinib-behandelte Bcr/Abl-positive Zellen infolge von Cisplatin nicht in der Lage sind im Zellzyklus zu arretieren und stattdessen einen sehr schnellen mitochondrialen Zelltod einleiten.

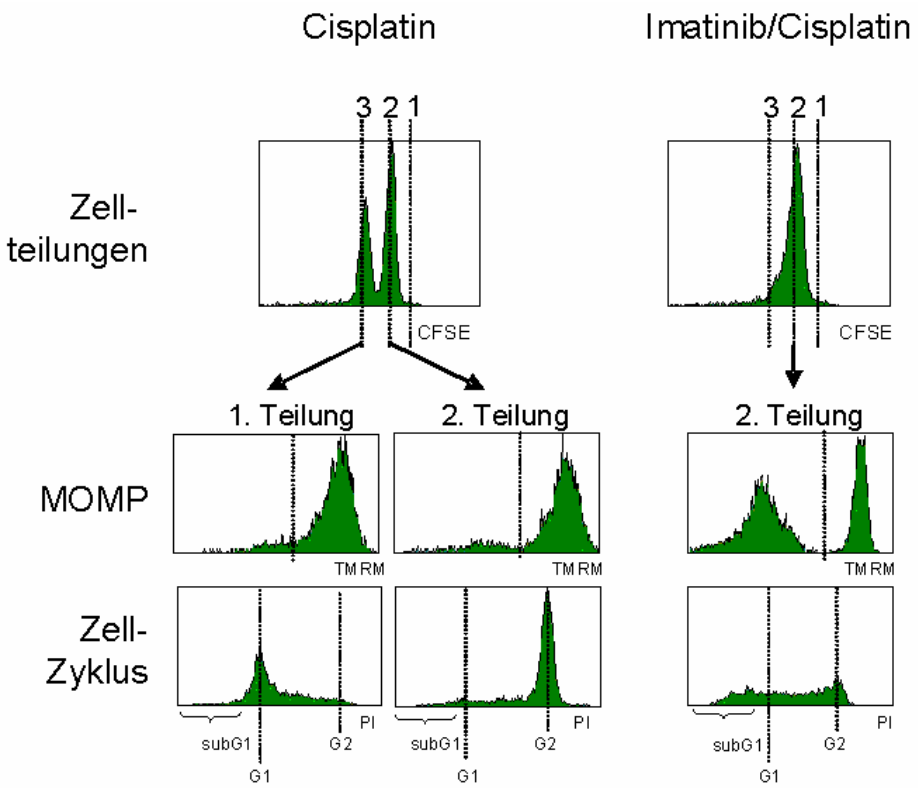

Abb. 9: Bei Cisplatin-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen tritt in Anwesenheit von Imatinib der Cisplatin-induzierte Zelltod anstelle des G2/M-Arrests ein. Die Abbildung zeigt die Anzahl der Zellteilungen. Für die Zelltodanalyse wurden die Zellen mit TMRM und für die Zellzyklusanalyse mit PI gefärbt. Dabei wurden Bcr/Abl-positive Zellen mit Cisplatin (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) behandelt. Das Experiment wurde in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich um einen mitochondrial-vermittelten Zelltod handelt, wurde in einer weiteren Zelltodanalyse mittels Annexin V-FITC Färbung ein möglicher Einfluss von Caspasen untersucht. Hierfür wurden Bcr/Abl-positive Zellen mit Cisplatin und Imatinib behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Wie erwartet, kommt es durch die Behandlung mit Cisplatin kombiniert mit Imatinib zur Induktion von Zelltod. Dieser Zelltod lässt sich durch den Zusatz des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk nicht verhindern (vgl. Abb. 10), was darauf hindeutet, dass der Zelltod unabhängig von Caspasen abläuft. Dass dieser Inhibitor wirksam ist, wird in einem anderen Cisplatin-hypersensitiven Zellsystem gezeigt, indem zVAD-fmk in der Lage ist den Cisplatin-induzierten Zelltod komplett zu verhindern (vgl. Abb. 10).

Die aus Abbildung 10 hervorgehenden Beobachtungen zeigen, dass der Zelltod, der in Bcr/Abl-positiven Zellen durch die Behandlung mit Imatinib und Cisplatin verursacht wird, unabhängig von Caspasen abläuft, die mitochondriale Integrität dennoch eine wichtige Rolle spielt.

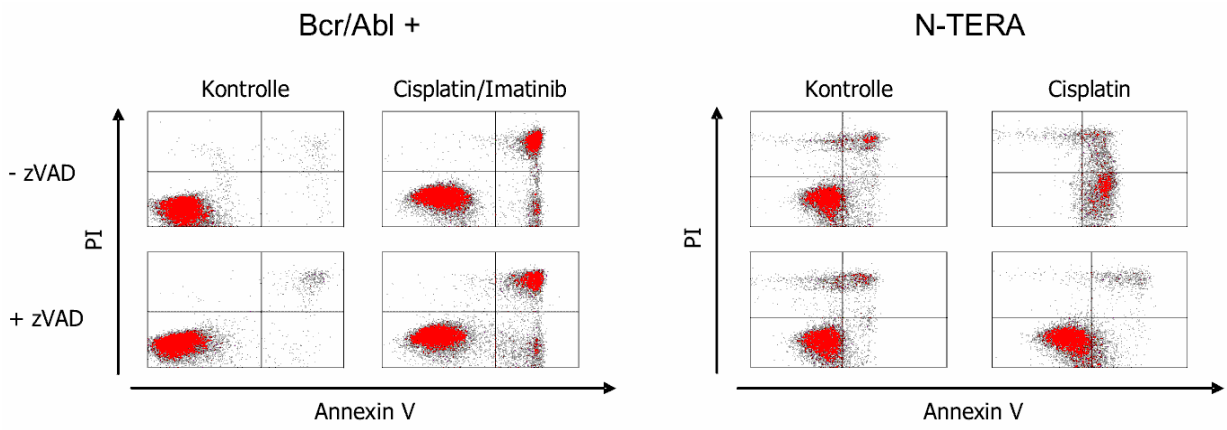

Abb. 10: Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist Caspase-unabhängig. Durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils toter Zellen nach Annexin V-FITC-Färbung. Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) in Kombination mit Imatinib (3 µM) behandelt oder unbehandelt gelassen. Eine Inkubation mit zVAD-fmk erfolgte 30 min vor Imatinib-Zugabe. Die Hodenkarzinom-Zelllinie N-TERA wurde mit in An- und Abwesenheit von zVAD-fmk 30 min vor Cisplatin-Behandlung inkubiert. Eine durchflusszytometrische Analyse des Zelltods erfolgte nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation mittels Annexin V-FITC-Färbung.

Durch die Behandlung der Zellen mit Calcein-AM wurde zusätzlich untersucht, ob neben der äußeren auch die innere mitochondriale Membran beeinflusst wird. Dabei kam der Fluoreszenz-Farbstoff Calcein-AM zum Einsatz, bei dem es sich um einen selektiven Marker für die Integrität der inneren mitochondrialen Membran handelt. Die Zellen wurden dabei mit Cisplatin allein und mit Imatinib kombiniert behandelt. Zusätzlich wurden die Ansätze mit Calcein-AM inkubiert und nach 16 h eine Zellviabilitätsanalyse durchgeführt. Eine Freisetzung des Calcein-AM aus den Mitochondrien bedeutet eine Zerstörung der inneren mitochondrialen Membran. Wie in Abbildung 11 zu sehen, kommt es zur Freisetzung von Calcein-AM. Somit ist bei Bcr/Abl-positiven Zellen sowohl die innere als auch die äußere mitochondriale Membran nach einer Behandlung mit Cisplatin und Imatinib zerstört.

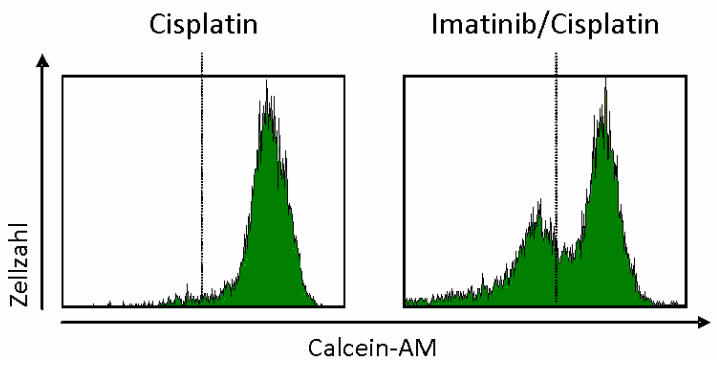

Abb. 11: Eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung führt bei Bcr/Abl-positiven Zellen zur Zerstörung der inneren mitochondrialen Membran. Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) unterzogen. Als Marker für die Integrität der inneren mitochondrialen Membran wurden die Zellen nach Cisplatin-Inkubation mit Calcein-AM gefärbt und anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

6.4.3 Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt zur Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern

Bei der Induktion von Zelltod spielen die Mitochondrien eine wichtige Rolle. Durch die Schädigung kommt es zur Freisetzung mitochondrialer Proteine und zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Susin *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). Dabei werden unter anderem Cytochrom c und AIF aus den Mitochondrien ins Zytoplasma freigesetzt. Aufgrund der Beobachtung, dass bei Bcr/Abl-positiven Zellen der Zelltod unabhängig von Caspasen abläuft, wurde im nächsten Schritt die Lokalisierung von AIF untersucht. Nach einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung ist AIF ausschließlich im Zytoplasma, also in den Mitochondrien lokalisiert. Aus Abbildung 12 wird ersichtlich, dass es durch eine zusätzliche Behandlung mit Imatinib zur AIF-Freisetzung aus dem Mitochondrium und zu dessen Translokation in den Zellkern kommt, wodurch es schließlich zum Zelltod kommen könnte.

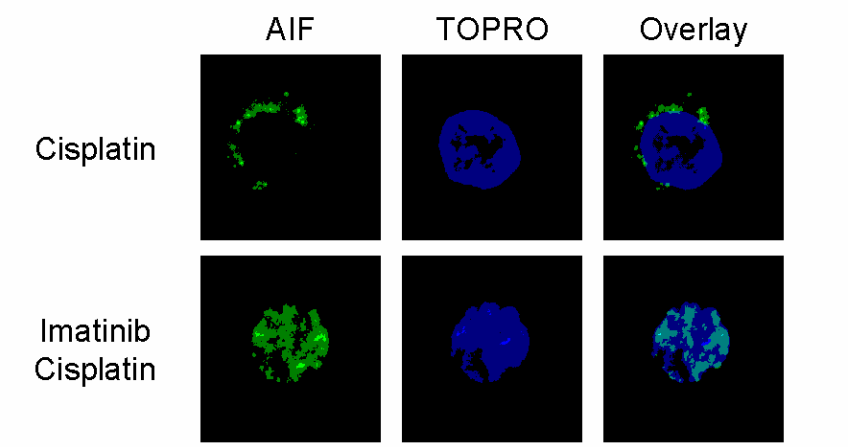

Abb. 12: Bei Bcr/Abl-positiven Zellen kommt es nach einer Cisplatin-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib zur Translokation von AIF in den Zellkern. Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3µM) behandelt. 16 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen fixiert, mit einem AIF-spezifischen Antikörper und dem Kernmarker TOPRO gefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben anschließend aufgenommen. Links: Aufnahme von AIF. Mitte: Aufnahme von TOPRO. Rechts: Die Überlagerung von AIF und TOPRO.

Bei Caspase-unabhängigen Todeswegen spielt AIF eine Schlüsselrolle (Susin *et al.*, 1999). AIF ist eine NADH-Oxidase und unter normalen Bedingungen im Mitochondrium lokalisiert, wo es seine antiapoptotische Rolle ausübt (Susin *et al.*, 1999; Vahsen *et al.*, 2004). Infolge von zellulärem Stress kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und damit verbunden zur Zerstörung der mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von AIF. Dabei ist die AIF-Freisetzung von mehreren Faktoren abhängig.

Aufgrund der Tatsache, dass die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium abhängig von Calcium ablaufen kann (Norberg *et al.*, 2008), wurden im folgenden Teil der Arbeit die Zellen mit einem spezifischen Calcium-Chelator, dem sogenannten BAPTA-AM, behandelt. Damit wurde ein möglicher Einfluss von Calcium auf die AIF-Translokation nach einer Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit Imatinib und Cisplatin untersucht. BAPTA-AM ist in der Lage die intrazelluläre Calcium-Konzentration durch Komplexierung zu verringern (Mondragon & Frixione, 1996). Inkubiert wurden dabei Bcr/Abl-positive Zellen mit Cisplatin allein und kombiniert mit Imatinib in Anwesenheit von BAPTA-AM. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Cisplatin und BAPTA-AM behandelt wurden. Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigt (siehe Abb. 13), dass die verringerte Calcium-Konzentration keinen Effekt auf den Zelltod hat. Somit ist der Cisplatin-induzierte Imatinib-verstärkte Zelltod unabhängig von Calcium.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass der Imatinib/Cisplatin-verursachte Zelltod unabhängig von Calcium ist, zeigen die Experimente mit dem Calpain-Inhibitor PD 150606. PD 150606 hemmt die Bindung und somit die Aktivierung von Calpain, indem es an die Calcium-Bindungsstellen von Calpain bindet. Calpain ist eine Protease, die in Anwesenheit von Calcium in ihre beiden Untereinheiten zerfällt und somit aktiviert wird. Die Aktivierung von Calpain führt schließlich zur Prozessierung von AIF zu tAIF, wobei Calpain AIF am N-Terminus schneidet. Diese Prozessierung ist für die AIF-Freisetzung von der intakten inneren Mitochondrienmembran notwendig (Otera *et al.*, 2005; Polster *et al.*, 2005; Yuste *et al.*, 2005).
Um eine mögliche Rolle von Calpain bei der Freisetzung von AIF zu untersuchen, wurden Bcr/Abl-positive Zellen 16 h mit Cisplatin und Cisplatin/Imatinib in Anwesenheit von PD 150606 inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Wirkung des Calpain-Inhibitors am Durchflusszytometer analysiert. Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, hat der Inhibitor keinen Einfluss auf den Zelltod. Daher scheint die AIF-Freisetzung aus dem Mitochondrium unabhängig von der Prozessierung durch Calpain abzulaufen.

Yu *et al.* konnte im Jahr 2002 eine direkte Verbindung zwischen AIF-Freisetzung und PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase)-Aktivierung demonstrieren. Infolge von zellulärem Stress kommt es zur Aktivierung von PARP und damit zur Induktion von Caspase-unabhängigem Zelltod (Wsierska-Gadek *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Tatsache wurde im Folgenden eine mögliche Abhängigkeit der AIF-Freisetzung durch die Aktivität von PARP untersucht. Nach einer Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit dem PARP-Inhibitor PJ34 und einer gleichzeitigen Inkubation mit Cisplatin in An- und Abwesenheit von Imatinib für 16 h konnte am Durchflusszytometer die Zellviabilität analysiert werden. Aus Abbildung 13 wird ersichtlich, dass die Freisetzung von AIF unabhängig von PARP abläuft, da eine Hemmung von PARP keine Wirkung auf den Zelltod hat.

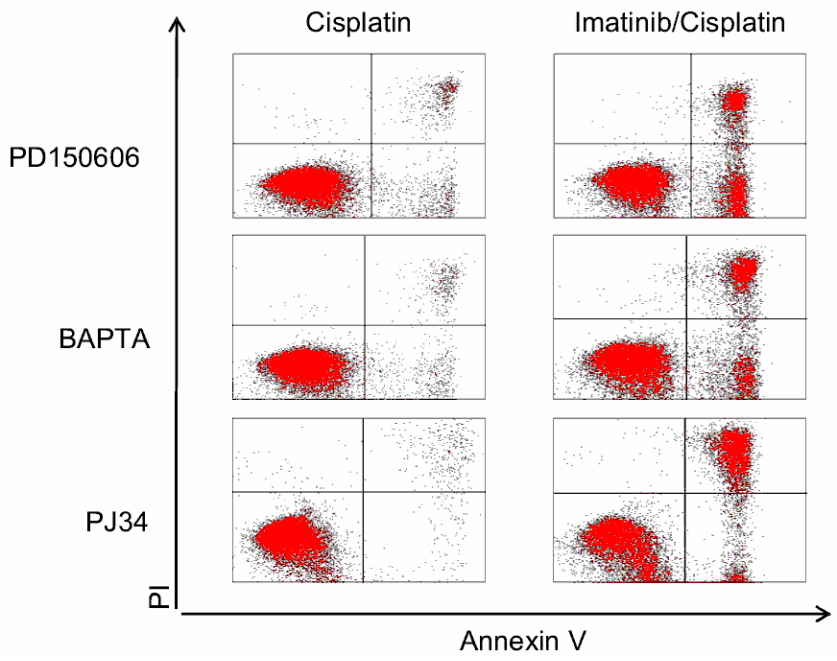

Abb. 13: Der Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin ist unabhängig von Calpain, Calcium und PARP. Die Abbildung zeigt eine durchflusszytometrische Untersuchung des Anteils toter Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung. Bcr/Abl-positive Zellen wurden mit den Substanzen PD150606, BAPTA und PJ34 in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) mit Cisplatin (5 µM) behandelt. Das Experiment wurde in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) durchgeführt. Nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation wurde der Zelltod durchflusszytometrisch analysiert.

6.5 Die Hypersensitivität ist abhängig von p53

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde überprüft, ob der bei Bcr/Abl-positiven Zellen beobachtete hypersensitive Phänotyp von p53 abhängig ist.

Hinweise für eine p53-Abhängigkeit lieferten Zelltodanalysen der humanen CML-Zelllinien BV173 und K562. Hierbei wurden die Zellen mit Imatinib allein, Cisplatin allein und mit der Kombination aus Imatinib und Cisplatin behandelt. Nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation wurde mittels einer Annexin V-FITC Analyse die Zelltodrate durchflusszytometrisch ermittelt. Aus Abbildung 14 wird ersichtlich, dass die Behandlung mit Imatinib keine negative Wirkung auf die Viabilität der Zellen hat. Eine Behandlung der Zellen mit Cisplatin allein wirkt sich lediglich bei der Zelllinie BV173 negativ auf die Viabilität aus und hat keinen Effekt bei K562. Während eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung in der Zelllinie K562 mit funktionell inaktivem p53 keinen Effekt auf den Zelltod hat, führt dieselbe Behandlung zu einer Sensitivierung der Zelllinie BV173 mit Wildtyp-p53. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Imatinib-vermittelte Sensitivierung gegenüber Cisplatin in Bcr/Abl-positiven Zellen abhängig von Wildtyp-p53 ist.

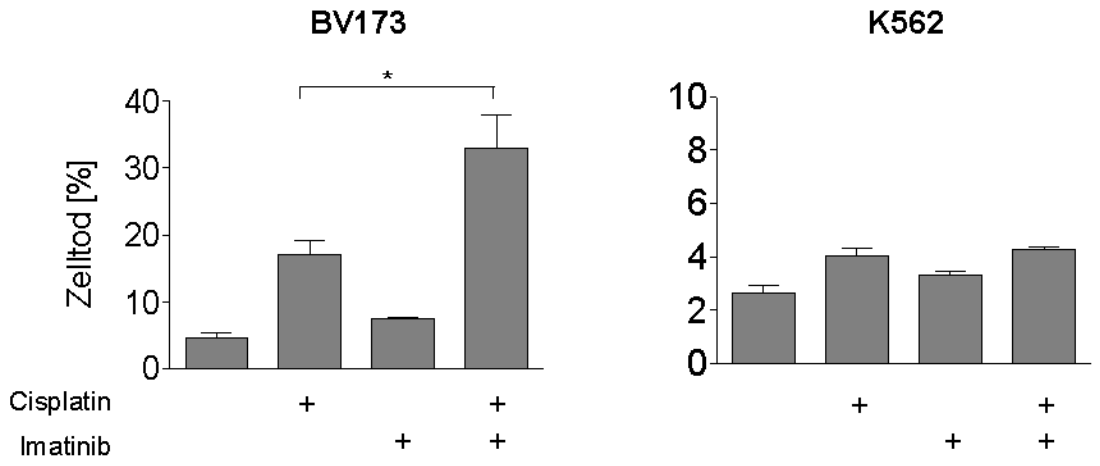

Abb. 14: Bei der Bcr/Abl-positiven Zelllinie BV173 mit funktionellem p53 kommt es in Anwesenheit von Imatinib zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin. Die humanen Zelllinien BV173 und K562 wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) jeweils mit Imatinib (3 µM) und Cisplatin (5 µM) allein und mit der Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Nach einer Inkubation von 16 h wurde der Anteil toter Zellen bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit Annexin V-FITC gefärbt und anschließend die Zelltodrate am Durchflusszytometer analysiert. Kontrollzellen wurden dabei weder mit Imatinib noch mit Cisplatin behandelt. n=3

Die p53-Abhängigkeit für den beobachteten Zelltod konnte durch die transiente Herunterregulierung von p53 durch die Transfektion der Zellen mit shRNA-Konstrukten gegen p53, mit gleichzeitiger GFP-Expression, bestätigt werden. Als Kontrolle wurden parallel Zellen mit einem Kontroll-shRNA-GFP-Konstrukt transfiziert. GFP-positive Zellen wurden 24 h nach Transfektion mittels FACS-Sorter von GFP-negativen Zellen getrennt und anschließend mit bzw. ohne Imatinib und Cisplatin für 16 h behandelt.

Nach Fixierung der Zellen und Inkubation mit anti-p53-Antikörper wurde dann die p53-Induktion von GFP-positiven Zellen, die mit Imatinib und Cisplatin behandelt wurden, im Vergleich zu nicht-behandelten GFP-positiven Zellen, ermittelt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, dass die Behandlung mit p53-shRNA zu einer etwa 50 %-igen Reduktion der p53-Akkumulation nach Cisplatin führt, im Vergleich zur p53-Induktion mit Kontroll-shRNA behandelter Zellen (siehe Abb. 15 links und Mitte). Die shRNA-vermittelte Herunterregulierung von p53 führt zu einer signifikanten Reduktion des Zelltods bei Imatinib- und Cisplatin-behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-shRNA behandelt wurden (siehe Abb. 15 rechts). Demnach ist die Hypersensitivität bei Bcr/Abl-positiven Zellen abhängig von p53.

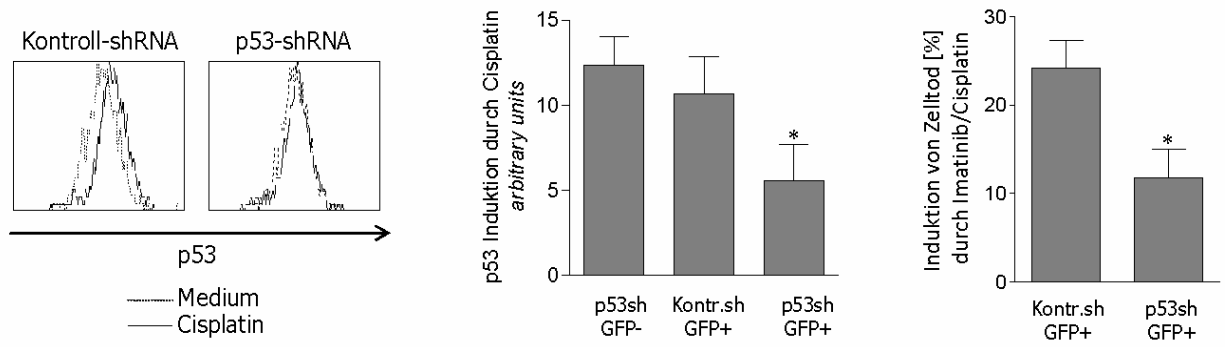

Abb. 15: Hypersensitivität ist abhängig von p53. Bcr/Abl-positive Zellen wurden mit p53-spezifischer oder p53-unspezifischer shRNA transfiziert. In Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) wurden sortierte GFP-positive Zellen mit Cisplatin (5 µM) in Kombination mit Imatinib behandelt. Eine durchflusszytometrische Analyse des Zelltods erfolgte nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation mittels Annexin-Alexa-Färbung.

Die oben beschriebene Beobachtung, dass p53 eine wichtige Rolle bei der Induktion des Zelltods Bcr/Abl-positiver Zellen spielt, der durch eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung vermittelt wird, konnte durch die Verwendung von Nutlin, einem Mdm2-Antagonisten, zusätzlich belegt werden. Die Behandlung der Zellen mit Nutlin führt zu einer verstärkten p53-Akkumulation. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass dieser gesteigerte p53-Level die Cisplatin-Sensitivität Imatinib-behandelter Bcr/Abl-positiver Zellen deutlich steigert und somit nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation etwa 100 % Zelltod erreicht wird. Diese Ergebnisse lassen demnach darauf schließen, dass der hypersensitive Phänotyp von p53 abhängig ist.

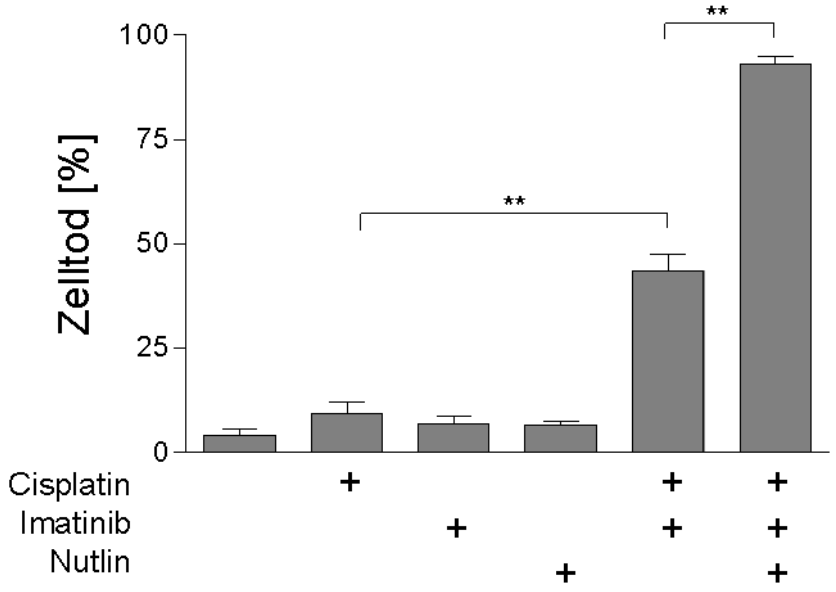

Abb. 16: Nutlin-induzierte p53-Akkumulation verstärkt den Imatinib/Cisplatin-vermittelten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen. Bcr/Abl-positive Zellen wurden mit mIL3 (1 ng/ml) inkubiert. 1/2 h vor Zugabe von Imatinib (3 µM) wurden die Zellen mit Nutlin (10 µM) behandelt. 2 h nach Imatinib-Zugabe wurde Cisplatin (5 µM) zugegeben. Nach einer 16-stündigen Inkubation mit Cisplatin erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung. Dabei wurde der Anteil toter Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung ermittelt. n= 5

Aufgrund der Beobachtung, dass Nutlin kombiniert mit Imatinib infolge von Cisplatin zu einem fast 100 %-igen Zelltod führt, wurde die Wirksamkeit dieser Kombination zusätzlich in primären Zellen untersucht. Um den Einfluss von Nutlin allein und in Kombination mit Imatinib und Cisplatin auf die Viabilität von primären CML-Zellen zu analysieren, wurden Philadelphia-positive Zellen von CML-Patienten und normale myeloische Progenitor-Zellen auf ihre Fähigkeit GM-CFUs zu bilden, getestet. Die Zellen wurden mit Cisplatin allein, Nutlin (1 bzw. 3 µM) allein und mit der Kombination aus Cisplatin, Imatinib und Nutlin (1 bzw. 3 µM) für 16 h behandelt. Bevor die Zellen für den CFU-Assay ausplattiert wurden, wurden die Substanzen herausgewaschen. Cisplatin war so dosiert, dass es allein nicht zu einer signifikanten Reduktion des Überlebens der Zellen führte. Nach einer 14-tätigen Inkubation wurden die Kolonien mit mehr als 50 Zellen der jeweiligen Ansätze ausgezählt.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, führt eine 16-stündige Behandlung mit 1 µM Cisplatin zu einer leichten Sensitivierung Philadelphia-positiver (87,2 % bezogen auf nicht-behandelte Zellen) und negativer (83,5 % bezogen auf nicht-behandelte Zellen) Progenitor-Zellen. Die Behandlung mit 3 µM Nutlin für 16 h hat bei Philadelphia-positiven Progenitoren eine sensitivierende Wirkung verglichen mit normalen Progenitoren. Es kam zu einer Reduktion der Kolonienanzahl von 48,9 % bei Philadelphia-positiven und 65,6 % bei normalen Progenitoren. Die Kombination aus Cisplatin, Imatinib und Nutlin (3µM) führt sowohl bei normalen myeloischen als auch bei Philadelphia-positiven Progenitoren zu einer signifikanten Reduktion der Zahl von GM-CFUs, es wird demnach keine Tumorselektivität erreicht.

Da dieser Effekt nicht tumorselektiv ist, wurde untersucht, ob durch eine Verringerung der Nutlin-Konzentration eine Selektivität erreicht werden kann. Eingesetzt wurde Nutlin in einer Konzentration von 1 µM. Wie in Abbildung 17 zu sehen, kann tatsächlich durch eine Reduktion der Nutlin-Dosierung die Selektivität teilweise erhöht werden. Bei Optimierung dieses Therapieansatzes, könnte es möglichweise eine Behandlungsstrategie von CML-Patienten darstellen.

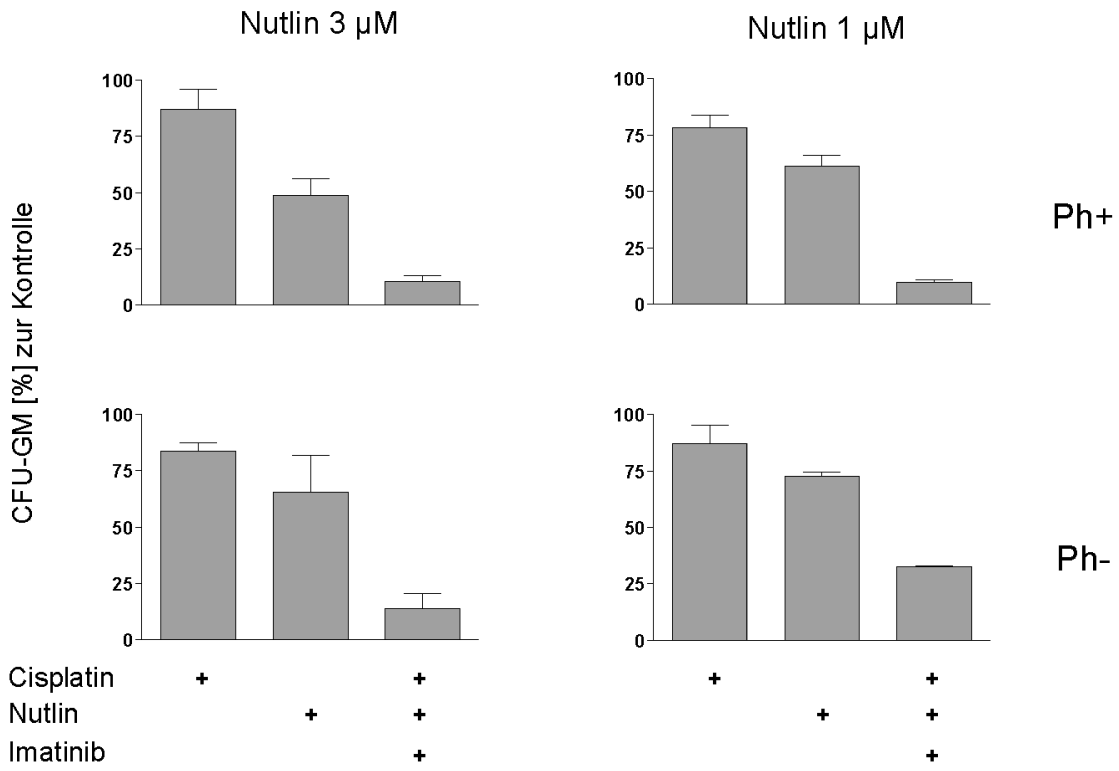

Abb. 17: Bei Philadelphia-positiven Zellen kommt es nach einer Behandlung mit Imatinib, Nutlin und Cisplatin zu einer signifikanten Reduktion der Zahl von GM-CFUs. Je 5000 Philadelphia-positive Zellen aus CML-Patienten und normale Progenitor-Zellen wurden einer 16-stündigen Behandlung mit Cisplatin (1 µM) allein, Nutlin (3 µM bzw. 1 µM) allein, und der Kombination aus Cisplatin, Imatinib und Nutlin in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren hIL3 (1 ng/ml) + GCSF unterzogen. Kontrollzellen wurden dabei unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 24-well Platten ausplattiert. Nach einer Inkubation von 14 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt sind die normierten gemittelten Werte einer 3-fach-Bestimmung und die Standard-Abweichung vom Mittelwert (SEM). n= 3

6.6 Molekularer Einfluss von Imatinib auf die p53-Akkumulation und -Aktivität als Antwort auf Cisplatin

Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die eine Akkumulation und Aktivierung von p53 infolge von Cisplatin beschreiben (Damia *et al.*, 2001; Colton *et al.*, 2006). Dabei wird p53 unter anderem direkt von der Kinase ATM phosphoryliert und aktiviert. Aus diesem Grund wurde im Folgenden der p53-Signalweg infolge von zellulärem Stress untersucht.

6.6.1 Aktivierung des p53-Systems durch die Expression von Bcr/Abl

Zunächst wurde der Einfluss der aktiven Bcr/Abl-Tyrosinkinase auf die Cisplatin-induzierte p53-Antwort untersucht. Mittels einer Western-Blot Analyse wurde die Expression von p53 und zwei seiner wichtigsten Zielstrukturen, nämlich p21 und Mdm2, nach einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung analysiert (vgl. Abb. 18). Der Vergleich Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen zeigt, dass es durch die Anwesenheit des onkogenen Fusionsproteins zu einer erhöhten Expression von p53 infolge von genotoxischem Stress kommt. Auch die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor ist bei Bcr/Abl-positiven Zellen im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen erhöht, da die Behandlung mit Cisplatin zu einer Induktion der Proteinmenge von p21 und Mdm2 führt. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die aktive Bcr/Abl-Tyrosinkinase zu einer Aktivierung des p53-Systems infolge von DNA-schädigenden Agenzien führt.

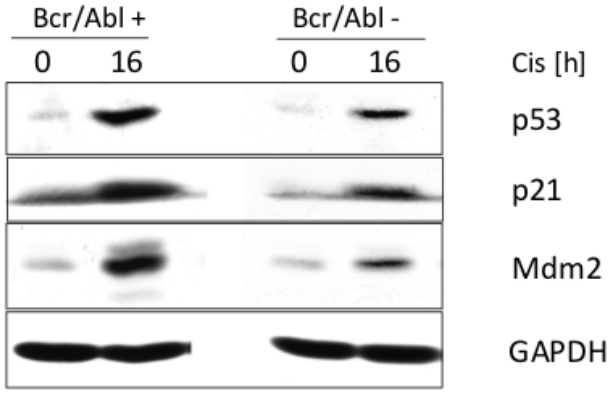

Abb. 18: Bcr/Abl aktiviert das p53-System bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach Cisplatin-Behandlung. Bcr/Abl-negative und Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) behandelt. 16 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen geerntet und das Gesamtlysat isoliert. Mittels SDS-PAGE wurden die Lysate aufgetrennt und durch eine Western-Blot Analyse untersucht. Dabei wurden die Proteinmengen von p53, p21 und Mdm2 analysiert. Die Beladung des Polyacrylamidgels wurde durch Detektion von GAPDH kontrolliert.

6.6.2 Selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen verursacht Imatinib eine verminderte ATM-Aktivierung und eine reduzierte p53-Aktivität infolge von Cisplatin

Um den molekularen Einfluss von Imatinib auf die Induktion und Aktivierung von p53 aufzuklären, wurden Bcr/Abl-positive und Bcr/Abl-negative Zellen mit Cisplatin allein, Imatinib allein und der Kombination beider Substanzen behandelt. Sowohl Bcr/Abl-positive als auch Bcr/Abl-negative Zellen zeigen bereits nach einer 6-stündigen Cisplatin-Behandlung eine Aktivierung von ATM, die eine Akkumulation und Phosphorylierung von p53 an Serin 15 zur Folge hat (vgl. Abb. 19-A/B). Diese Cisplatin-induzierte p53-Aktivierung ist selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen durch eine Imatinib-vermittelte Inhibition von Bcr/Abl deutlich reduziert. Durch die fehlende Aktivierung von ATM bei Bcr/Abl-positiven Zellen in Anwesenheit von Cisplatin und Imatinib, kommt es zu einer reduzierten Phosphorylierung von p53 an Serin 15, eine Stelle, die direkt von ATM phosphoryliert wird. Die Expression des p53-Gesamtproteins hingegen wird nur geringfügig beeinflusst. Im Gegensatz dazu hat Imatinib keinen Einfluss auf die Cisplatin-induzierte Aktivierung von ATM und p53 bei Bcr/Abl-negativen Zellen.

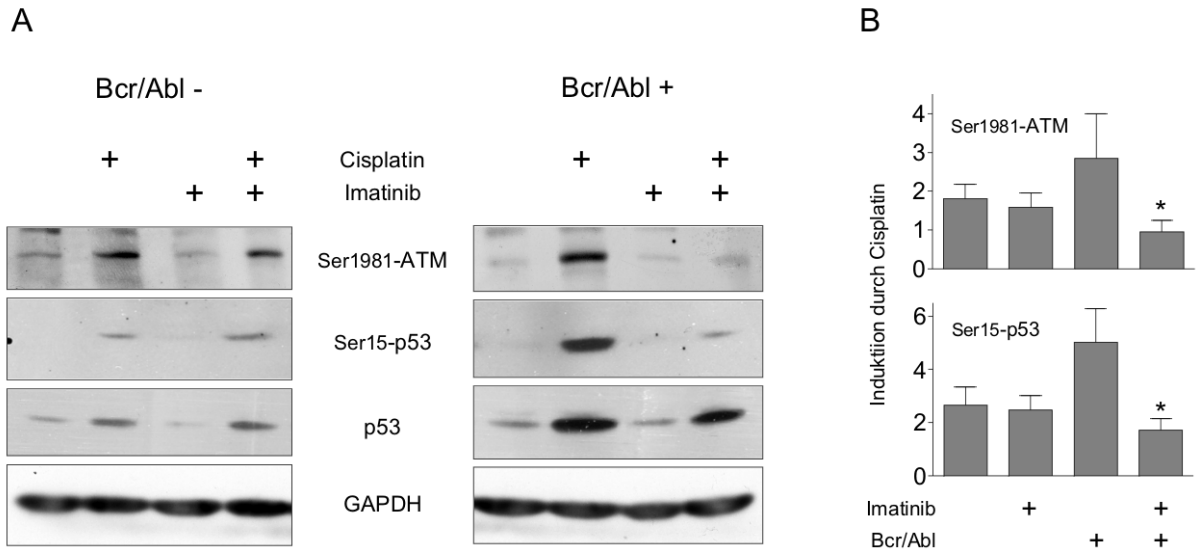

Abb. 19: Imatinib führt bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer reduzierten ATM- und p53-Aktivierung als Antwort auf Cisplatin. (A) Bcr/Abl-negative und Bcr/Abl-positive wurden mit oder ohne Imatinib (3 µM) in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) allein oder in Kombination mit Cisplatin (5 µM) behandelt. Imatinib wurde jeweils 2 h vor Cisplatin-Behandlung zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach einer 6-stündigen Cisplatin-Inkubation geerntet und das Gesamtlysat extrahiert. Die Lysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse auf den Phosphorylierungszustand von ATM und p53, und auf die Expression von p53 untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH kontrolliert. (B) Densitometrische Auswertung von Serin 1981-ATM und Serin 15-p53. n= 5

6.6.3 Imatinib verursacht eine verminderte transkriptionelle Aktivität von p53 und führt somit zu einer reduzierten p21- und Mdm2-Induktion infolge von Cisplatin selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen

Um Auswirkungen der Bcr/Abl-Inhibition durch Imatinib nach einer Cisplatin-Behandlung auf die p53-Aktivität als Transkriptionsfaktor zu untersuchen, wurden Zellzyklus-regulatorische und proapoptotische Zielgene von p53 analysiert.

Bcr/Abl-positive und -negative Zellen wurden dabei 6 h mit Imatinib und Cisplatin allein und der Kombination aus Imatinib und Cisplatin behandelt. In Abbildung 20-A ist das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR Analyse dargestellt. Cisplatin führt zu einer Induktion der Expression der p53-Zielgene *p21* und *Mdm2*, sowohl bei Bcr/Abl-positiven (*p21*-Induktion 2,9-fach, *Mdm2*-Induktion 4,1-fach) als auch bei Bcr/Abl-negativen (*p21*-Induktion 2,1-fach, *Mdm2*-Induktion 1,7-fach) Zellen. Die Behandlung mit Imatinib in Kombination mit Cisplatin führt selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *p21* (1,5-fach) und *Mdm2* (1,8-fach), während die Behandlung mit Imatinib keinen Einfluss auf die Expression beider Gene bei Bcr/Abl-negativen Zellen hat.

Die Western-Blot Analyse der Proteine p21 und Mdm2 ist in Abbildung 20-B dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Blots zeigt (vgl. Abb. 20-C), dass es auch auf Proteinebene nach einer Cisplatin-Inkubation von 6 bzw. 16 h in Anwesenheit von Imatinib zu einer Reduktion der p21-Induktion (nach 16 h: von 5,7- auf 1,6-fach; nach 6 h: von 1,5- auf 1,2-fach) und zu einer signifikanten Reduktion der Mdm2-Induktion (nach 16 h: von 4,7- auf 3,2-fach; nach 6 h: von 1,7- auf 0,5-fach) bei Bcr/Abl-positiven Zellen kommt. In Bcr/Abl-negativen Zellen hat Imatinib weder auf die Expression von p21 noch auf die von Mdm2 eine Auswirkung infolge von Cisplatin (p21-Induktion nach 6 h: von 1,1- auf 1,2-fach; p21-Induktion nach 16 h: von 2,8- auf 2,8-fach) (Mdm2-Induktion nach 6 h: von 1,4- auf 1,2-fach; Mdm2-Induktion nach 16 h: von 2,4- auf 2,6-fach).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität von p53 selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib gehemmt ist, da es zu einer Reduktion der p53-abhängigen Induktion von p21 und Mdm2, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene, kommt.

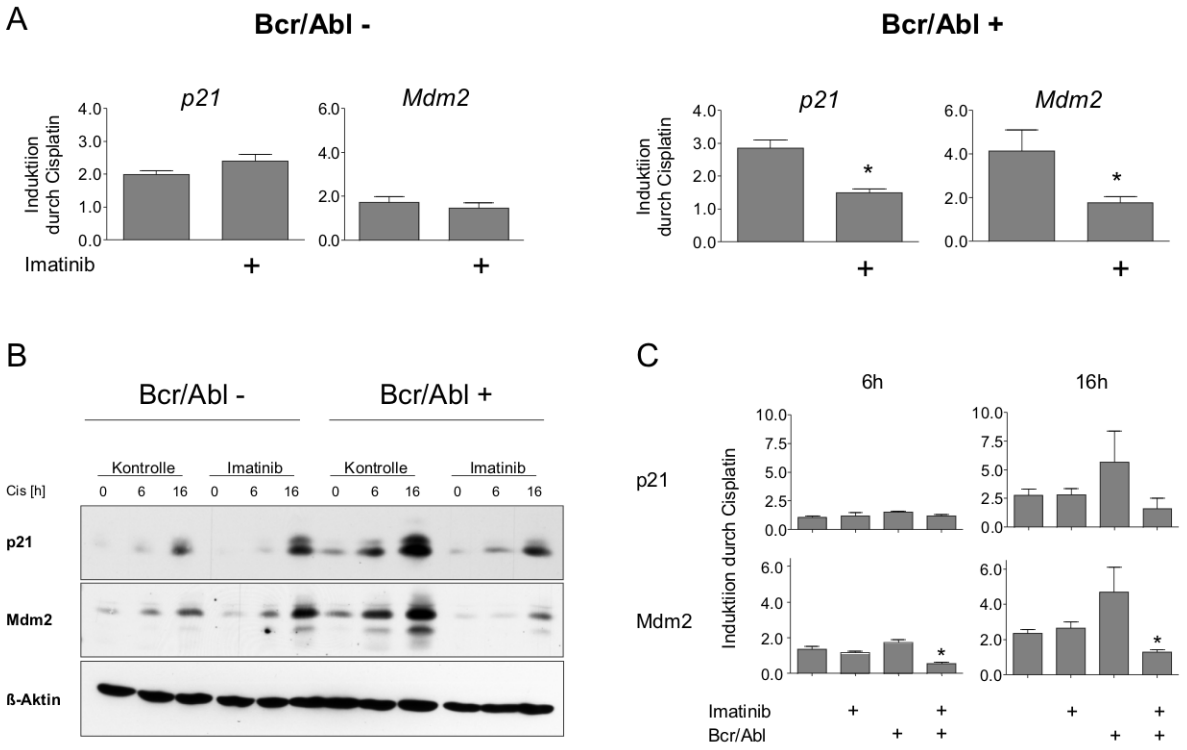

Abb. 20: Imatinib führt bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer reduzierten *p21*- und *Mdm2*-Expression als Antwort auf Cisplatin. (A) Mittels der LightCycler-Technik wurde die Expression von *p21* und *Mdm2* untersucht. Die Abbildung zeigt die Auswertung der RT-PCR Bcr/Abl-negativer und Bcr/Abl-positiver Zellen. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) 6 h mit Cisplatin (5 µM) behandelt. Nach anschließender RNA-Isolierung wurde am LightCycler die Expression von *p21* und *Mdm2* analysiert. Die Diagramme zeigen die Induktion der Gene nach angegebener Behandlung bezogen auf die Kontrolle. Kontrollzellen waren dabei unbehandelt. (B) Western-Blot Analyse Bcr/Abl-negativer und Bcr/Abl-positiver Zellen. Die Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 und in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) nach angegebener Cisplatin-Inkubation (5 µM) pelletiert. Das isolierte Gesamtlysat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, und in der Western-Blot Analyse die Expression von p21 und Mdm2 detektiert. Die Beladung des Gels wird durch Detektion von ß-Aktin gezeigt. (C) Densitometrische Auswertung der Expression von p21 und Mdm2. Die Induktion der Proteinexpression nach jeweiliger Behandlung wurde dabei auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. n=6

Aufgrund der Beobachtung, dass die Transaktivität von p53 bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung vermindert ist, wurde die Expression p53-abhängiger proapoptotischer Zielstrukturen, wie PUMA, BAX und NOXA untersucht (vgl. Abb. 21). Sowohl bei Bcr/Abl-positiven als auch bei Bcr/Abl-negativen Zellen werden diese Gene ohne zellulären Stress bereist hoch exprimiert. Eine Behandlung mit Cisplatin führt zu keiner weiteren Induktion von PUMA, BAX und NOXA. Selbst bei Bcr/Abl-positiven Zellen hat Imatinib

keinen Effekt auf die Expression dieser Gene. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass der Cisplatin-induzierte Imatinib-verstärkte Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen nicht von der Induktion proapoptotischer Gene durch p53 abhängt.

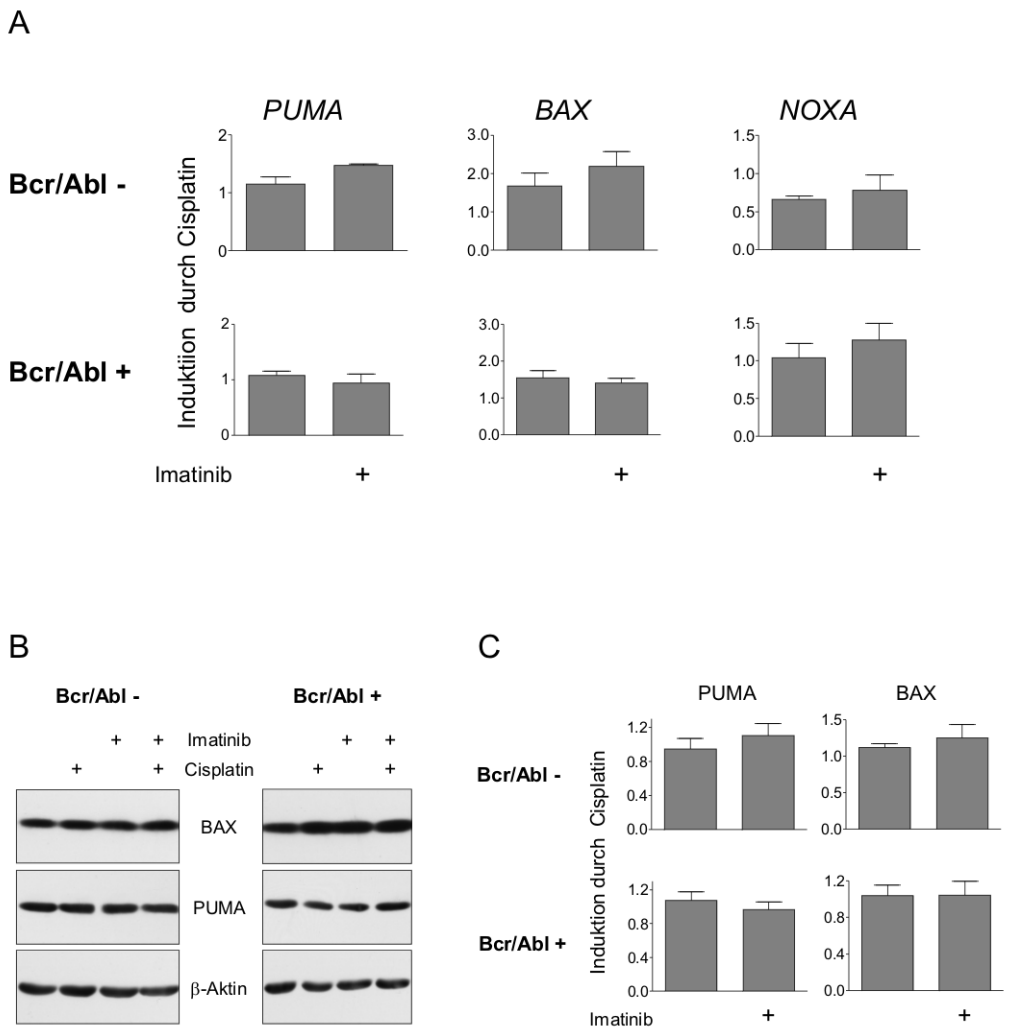

Abb. 21: Eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung hat keinen Effekt auf proapoptotische p53-abhängige Zielstrukturen. (A) Quantifizierung der Transkripte von *PUMA*, *BAX* und *NOXA* mit Hilfe der LightCycler-Technik nach einer 6-stündigen Behandlung mit Cisplatin (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM). (B) Ergebnis einer Western-Blot Analyse. Bcr/Abl-negative und Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 und in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) 6 h nach Cisplatin-Behandlung (5 µM) pelletiert, das Gesamtlysat extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Untersucht wurden die Proteine BAX und PUMA. Die Beladung des Gels wurde durch die Detektion von ß-Aktin kontrolliert. (C) Densitometrische Auswertungvon PUMA und BAX. n=4

6.6.4 Fehlende p53-Phosphorylierung führt zum Verlust der p53-Transaktivität infolge von Cisplatin bei Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen

Eine Imatinib-Behandlung bei Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin führt zu einer verminderten Transaktivität von p53, die sich in einer reduzierten p21- und Mdm2-Induktion nach zellulärem Stress äußert. Aufgrund dieser Tatsache wurde im folgen Teil der Arbeit untersucht, ob diese Beobachtung von der reduzierten p53-Akkumulation abhängt. Hierfür wurden Bcr/Abl-positive Zellen mit dem Mdm2-Antagonisten Nutlin behandelt. Wie erwartet, führt eine Behandlung mit Nutlin zu einer verstärkten Akkumulation von p53. Die durch Nutlin induzierte p53-Akkumulation kann durch die Behandlung der Zellen mit Cisplatin sogar verstärkt werden (vgl. Abb. 22-A). Trotz der erhöhten Akkumulation ist bei Bcr/Abl-positiven Zellen p53 nicht in der Lage *p21* und *Mdm2* zu transaktivieren (vgl. Abb. 22-A). Darüber hinaus wird auch in Anwesenheit von Nutlin die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 durch Imatinib gehemmt (siehe Abb. 22-B). Trotz der hohen Akkumulation, ist p53 demnach transkriptionell nicht aktiv, was wahrscheinlich auf die fehlende Phosphorylierung von p53 an Serin 15 zurückzuführen ist.

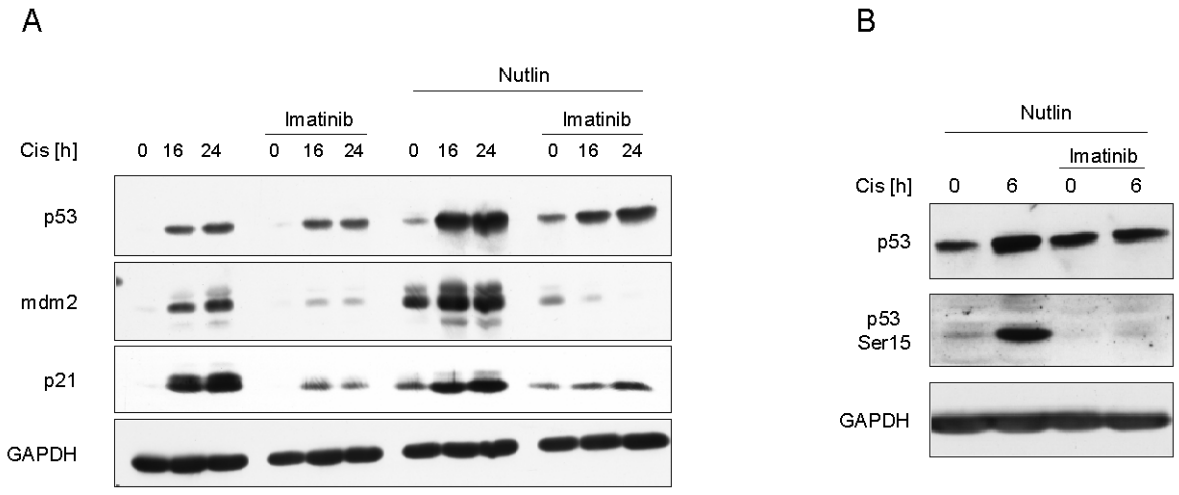

Abb. 22: Bcr/Abl-positive Zellen reagieren auf Cisplatin in Kombination mit Imatinib mit einer verminderten transkriptionellen Aktivität von p53. (A) Bcr/Abl-positive Zellen wurden 1/2 h vor Imatinib-Zugabe (3 µM) mit Nutlin (10 µM) behandelt. 2 h nach Imatinib-Gabe wurden die Zellen mit Cisplatin (5 µM) versetzt und nach angegebenen Zeitpunkten die Proben pelletiert. Das Experiment wurde in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) durchgeführt. Das Gesamtlysat wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse untersucht. Detektiert wurde die Proteinmenge von p53, p21 und Mdm2, sowie die Phosphorylierung von p53 (B). Die Beladung der Polyacrylamidgele wurde durch Detektion von GAPDH überprüft.

6.7 Verminderte p53-Transaktivität bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist abhängig von Bcr/Abl

Der niedermolekulare Inhibitor Imatinib hemmt neben Bcr/Abl und c-Abl eine Reihe weiterer Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel ARG (*Abl related gene*), PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) und c-kit (Goldman *et al.*, 2004). Um mögliche Effekte von Imatinib auf diese Kinasen auszuschließen, wurde eine Imatinib-resistente Zelllinie (T315I-Bcr/Abl-positiv) verwendet, die in ihrer *Bcr/Abl*-Sequenz eine Punktmutation trägt. Es handelt sich bei dieser Mutation um einen Austausch der Aminosäure Threonin durch Isoleucin an Position 315. Hier hat die Behandlung mit Imatinib lediglich die Inhibition der c-Abl-Kinaseaktivität zur Folge. Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, hat Imatinib bei diesen Zellen keine Auswirkung auf die p21- und Mdm2-Induktion nach genotoxischem Stress durch Cisplatin. Dies bedeutet, dass die beobachtete Reduktion der p21- und Mdm2-Expression und somit die verminderte transkriptionelle Aktivität von p53 bei Bcr/Abl-positiven Zellen wahrscheinlich von der Hemmung der Bcr/Abl-Kinase abhängig ist.

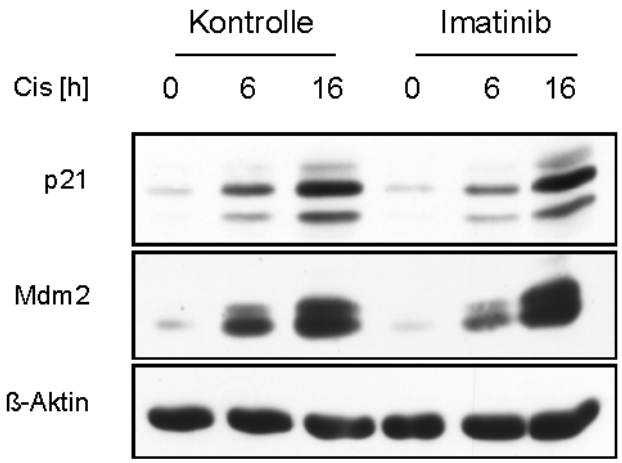

Abb. 23: Verminderte p53-Aktivierung bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist abhängig von der Hemmung der Bcr/Abl-Kinase. T315I-Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) in An- oder Abwesenheit von Imatinib (3 µM) mit Cisplatin (5 µM) behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn der Cisplatin-Behandlung geerntet und das Gesamtlysat isoliert. Gleiche Mengen der Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse auf p21 und Mdm2 untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von β-Aktin überprüft.

Zusätzlich wurde geprüft, ob die fehlende p53-Transaktivierung nach Imatinib-Behandlung, die von Bcr/Abl abhängig ist, auch auf die Viabilität der Zellen nach Cisplatingabe übertragbar ist. Die Imatinib-resistenten Zellen wurden hierfür mit Imatinib allein, Cisplatin allein und mit der Kombination Imatinib/Cisplatin behandelt. Nach einer 16-stündigen Inkubation wurde die Viabilität der Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wird aus Abbildung 24 ersichtlich, dass die gleichzeitige Behandlung mit Imatinib und Cisplatin keinen Effekt auf die Viabilität dieser Zellen hat. Demnach kann schlussfolgefolgert werden, dass der Imatinib/Cisplatin-vermittelte Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen, von der Hemmung der Bcr/Abl-Kinase abhängig ist.

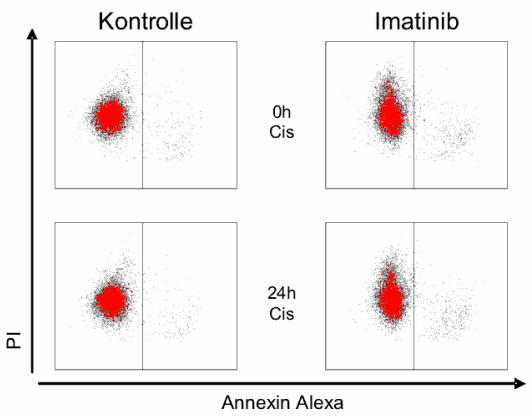

Abb. 24: Imatinib/Cisplatin-vermittelter Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist abhängig von der Hemmung der Bcr/Abl-Kinase. T315I-Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) jeweils mit Imatinib (3 µM) und Cisplatin (5 µM) allein und mit der Kombination beider Substanzen behandelt. Nach einer Inkubation von 16 h wurde die Zelltodrate durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden die Zellen mit Annexin-Alexa gefärbt. Kontrollzellen wurden weder mit Imatinib noch mit Cisplatin behandelt. n= 5

Um nachzuweisen, dass das gehemmte Bcr/Abl-Protein tatsächlich eine Rolle für die verminderte p53-Aktivierung spielt, wurden siRNA-Experimente zur Hemmung der Bcr/Abl-Expression durchgeführt. Eine zweimalige Transfektion der Zellen mit gegen die Bruchpunktregion gerichteten siRNA-Oligonukleotide führt zu einer deutlichen Hemmung der Bcr/Abl-Expression (vgl. Abb. 25-B). Dies hat zur Folge, dass die p21-Induktion in Zellen, die mit Imatinib und Cisplatin behandelt wurden, wieder teilweise restauriert wird (vgl. Abb. 25-A). Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass die Hemmung der transkriptionellen Aktivität von p53 von der Expression von Bcr/Abl abhängt.

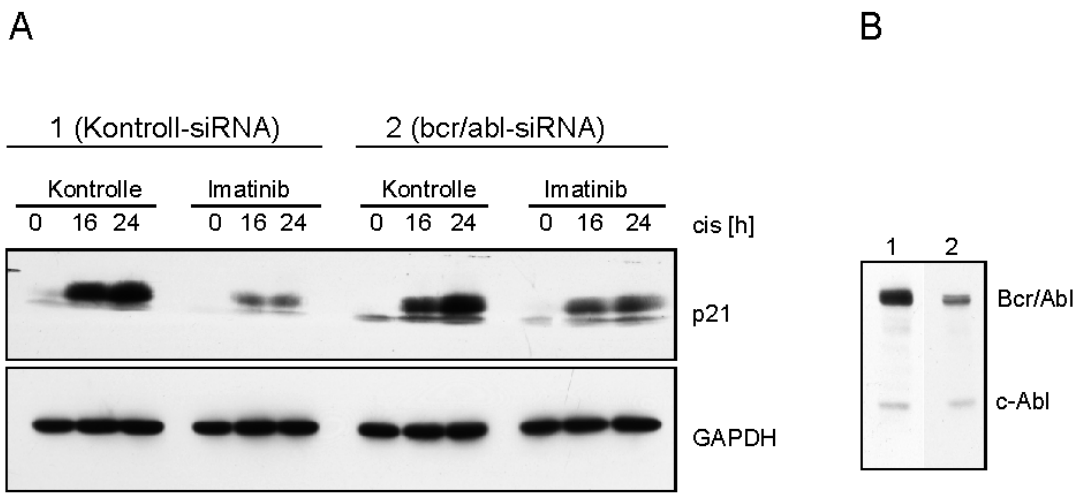

Abb. 25: Verminderte p53-Aktivierung bei Bcr/Abl-positiven Zellen ist abhängig von der Hemmung der Bcr/Abl-Kinase. Bcr/Abl-positive Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 h mit den angegebenen siRNAs elektroporiert. BAF7/BAF9: *Bcr/Abl-e14a2*-spezifische siRNAs; BAF8/BAF13: jeweilige 3 x ‚mismatch'-Kontrolle. (A) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen nach Beginn der Cisplatin-Behandlung geerntet und das Gesamtlysat isoliert. Die Lysate wurden via SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse auf die Expression von p21 untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von GAPDH überprüft. (B) Dargestellt ist der Nachweis der Proteinexpression von Bcr/Abl und c-Abl nach der zweiten siRNA-Behandlung durch Western-Blot Analyse.

6.8 Hemmung von ATM allein reicht nicht aus, um einen hypersensitiven Phänotyp zu induzieren

Wie bereits gezeigt, führt eine Cisplatin-Behandlung zu einer p53-Aktivierung, wobei es zu einer Akkumulation und Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor kommt. Infolge der p53-Aktivierung kommt es zu einer Induktion der p53-Zielgene *p21* und *Mdm2*, während proapoptotische p53-abhängige Gene in Bcr/Abl-positiven Zellen bereits hoch exprimiert sind und durch Cisplatin nicht weiter induziert werden. In Bcr/Abl-positiven Zellen hemmt Imatinib bei gleichzeitiger Inkubation mit Cisplatin den ATM/p53-Signalweg, was einerseits zu einer Reduktion der *p21*- und *Mdm2*-Induktion führt, andererseits proapoptotische Gene in ihrer Expression nicht verändert werden.

Um zu klären, ob die Hemmung von ATM ausreicht, um die bei Bcr/Abl-positiven Zellen durch Imatinib und Cisplatin verursachte Hypersensitivität zu erreichen, wurde bei Bcr/Abl-positiven Zellen ATM pharmakologisch inhibiert. Die Hemmung von ATM erfolgte durch die Inkubation

der Zellen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 und dem spezifischen ATM-Inhibitor KU-55933. Aus der Western-Blot Analyse (vgl. Abb. 26) wird ersichtlich, dass nach einer Cisplatin-Behandlung sowohl LY294002 als auch KU-55399, ebenso wie Imatinib, eine Hemmung der ATM-Aktivierung verursachen, die sich wiederum in eine Hemmung der p53-Aktivierung wiederspiegelt. Es kommt weder zu einer p53-Phosphorylierung an Serin 15 noch zu einer Induktion von Mdm2 durch die Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit allen drei Inhibitoren infolge von Cisplatin.

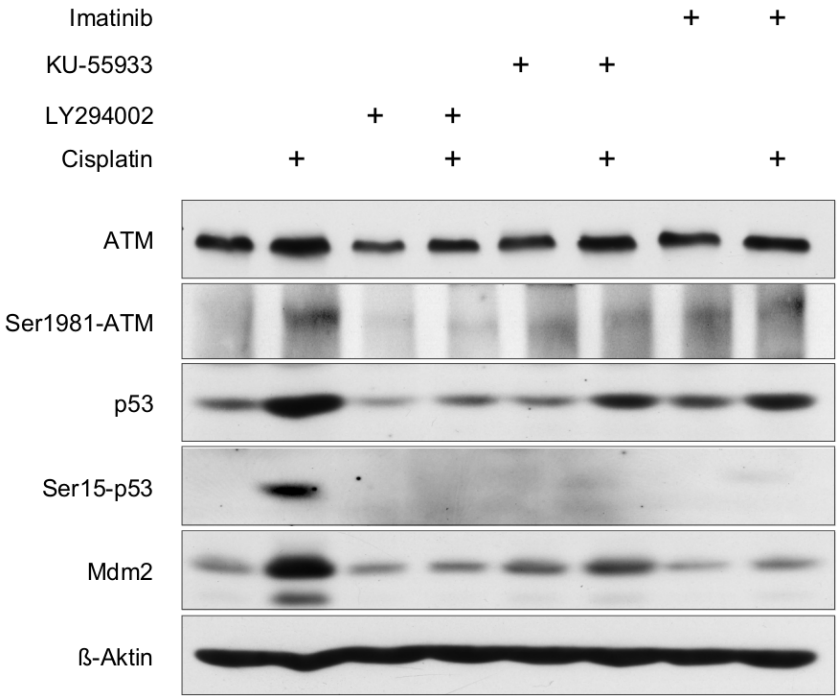

Abb. 26: Imatinib führt bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer reduzierten ATM- und p53-Aktivierung als Antwort auf Cisplatin. Bcr/Abl-positive wurden jeweils mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (25 µM) und dem spezifischen ATM-Inhibitor KU-55933 (10 µM) in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) in Kombination mit Cisplatin (5 µM) behandelt. Die Zellen wurden 2 h mit den Inhibitoren vorinkubiert, und anschließend mit Cisplatin versetzt. Nach einer 6-stündigen Cisplatin-Inkubation wurden die Zellen geerntet und das Gesamtlysat extrahiert. Die Lysate wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse auf den Phosphorylierungszustand von ATM und p53, und auf die Expression von ATM und Mdm2 untersucht. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von ß-Aktin gezeigt.

Eine Analyse des Zellzyklus zeigt (siehe Abb. 27-A), dass es bei unbehandelten Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung zu einem G2/M-Arrest kommt. Bcr/Abl-positive Zellen verlieren sowohl nach einer Behandlung mit Imatinib als auch nach einer Behandlung mit LY294002 die Fähigkeit in der G2/M-Phase zu arretieren. Die Hemmung des ATM-Wegs durch Imatinib scheint somit verantwortlich zu sein für die verlorene Fähigkeit der Zellen in G2/M zu arretieren. Während allerdings Imatinib-behandelte Zellen mit einem Verlust der Viabilität auf Cisplatin reagieren, kommt es bei LY294002- und bei KU-55933-behandelten Zellen nicht zur vermehrten Induktion von Zelltod (siehe Abb. 27-B). Demnach reicht eine verminderte ATM-Aktivierung nicht aus für die Induktion des Imatinib-vermittelten hypersensitiven Phänotyps. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass außer der Hemmung von ATM noch weitere alterierte Mechanismen bei diesem beobachteten hypersensitiven Phänotyp eine Rolle spielen.

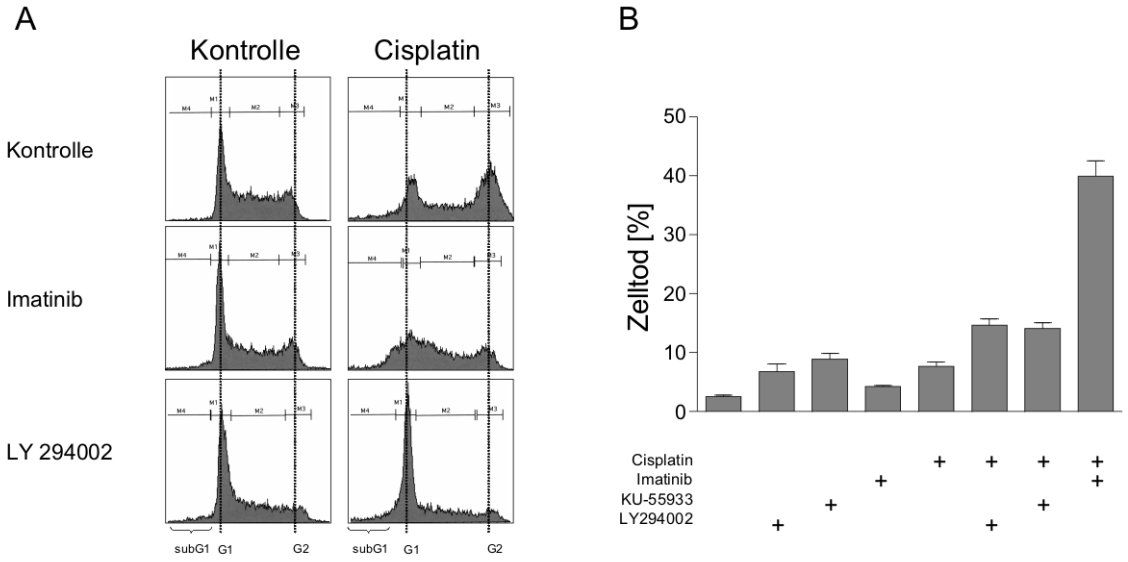

Abb. 27: Pharmakologische Hemmung von ATM führt nicht zu einer Hypersensitivität gegenüber Cisplatin. (A) In Gegenwart von mIL3 (1 ng/ml) wurden Bcr/Abl-positive Zellen nach einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) und LY294002 (25 µM) einer Zellzyklus-Analyse unterzogen. (B) Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) jeweils mit Imatinib (3 µM), KU-55933 (10 µM) und LY294002 (25 µM) 2 h vor Cisplatin-Zugabe (5 µM) behandelt. Nach einer Inkubation mit Cisplatin (16 h) wurde der Anteil toter Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. n=4

6.9 Einfluss von Imatinib und Cisplatin auf die p53-Translokation bei Bcr/Abl-positiven Zellen

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass p53 als Transkriptionsfaktor bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung nicht mehr aktiv war. Dennoch kam es zur Induktion von Zelltod, der abhängig von p53 war. Im Folgenden wurde untersucht, wie p53 trotz seiner verminderten Transaktivität für einen vermehrten Zelltod und damit zur Hypersensitivität beitragen könnte. p53 hat neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor im Zellkern auch eine sehr wichtige proapoptotische Funktion im Zytoplasma. Dort aktiviert p53 nach DNA-Schädigung das proapoptotische Bcl-2 Familienprotein BAX, das als Folge seiner Aktivierung an das Mitochondrium transloziert. Es kommt zur Induktion der Formation von BAX/BAX Homodimeren und BAX/BAK Heterodimeren, die dann Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden und so die Freisetzung mitochondrialer Proteine induzieren (Susin *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). In Abwesenheit von DNA-Stress ist p53 im Zytoplasma an das antiapoptotische Bcl-2 Familienprotein Bcl-x_L gebunden, sodass eine Aktivierung von BAX durch p53 und somit eine Induktion von Zelltod verhindert wird. Daher ist das Verhältnis zwischen Bcl-x_L und p53 im Zytoplasma für das Überleben oder Sterben der Zelle von entscheidender Bedeutung.

6.9.1 Aktivierung von FoxO3a führt zur Translokation von p53 aus dem Zellkern ins Zytoplasma

Damit p53 seine proapoptotische Funktion im Zytoplasma ausüben kann, muss es zunächst aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden. Die p53-Translokation wird unter anderem durch das Protein FoxO3a induziert (You *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass Bcr/Abl über den PI3K-Signalweg FoxO3a phosphoryliert und damit inaktiviert. Somit führt eine Imatinib-induzierte Inhibition von Bcr/Abl potentiell zu einer Aktivierung und schließlich zu einer Translokation von FoxO3a in den Nukleus. In einer Western-Blot Analyse wurde die Aktivität von FoxO3a in Bcr/Abl-positiven Zellen untersucht (siehe Abb. 28-A). Die Diagramme zeigen sowohl die Induktion des Gesamtproteins als auch die Induktion des Phosphorylierungszustands von FoxO3a (siehe Abb.28-B) nach einer 6-stündigen Cisplatin-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen in An- und Abwesenheit von Imatinib als densitometrische Auswertung 3 unabhängiger

Experimente. Wie in Abbildung 28 dargestellt, hat Imatinib keinen Effekt auf die FoxO3a-Proteinmenge. Jedoch führt Imatinib zu einer signifikanten Reduktion der FoxO3a-Phosphorylierung (von 1,1-fach auf 0,4-fach) und somit zu einer Aktivierung und Translokation von FoxO3a in den Zellkern infolge von Cisplatin.

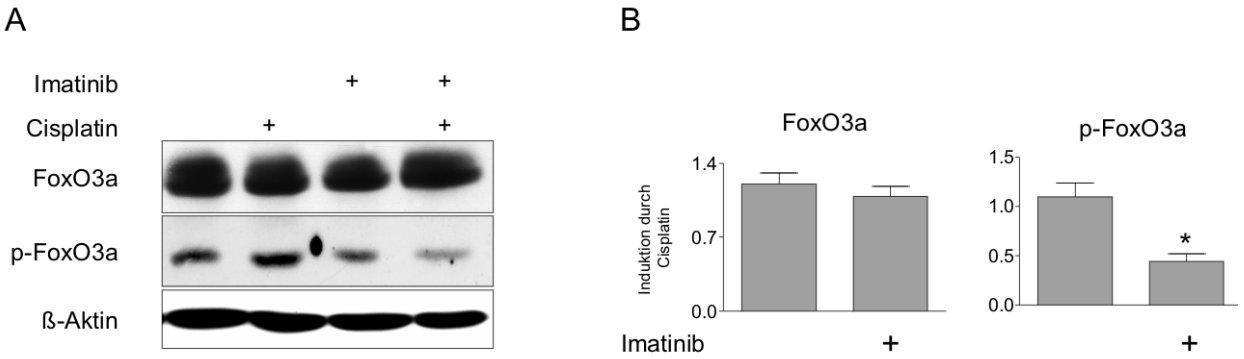

Abb. 28: Bei Bcr/Abl-positiven Zellen führt eine Behandlung mit Imatinib und Cisplatin zu einer Aktivierung von FoxO3a. (A) Western-Blot Analyse Bcr/Abl-positiver Zellen. In Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) wurden die Zellen mit Imatinib (3 µM) in An- und Abwesenheit von Cisplatin (5 µM) behandelt. 6 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen pelletiert, das Gesamtlysat extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Untersucht wurde sowohl die Proteinmenge als auch der Phosphorylierungszustand von FoxO3a. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von ß-Aktin gezeigt. (B) Densitometrische Auswertung von FoxO3a und phospho-FoxO3a. n=3

Aufgrund der Tatsache, dass p53 im Zytoplasma lokalisiert sein muss, um seine Zelltod-induzierende Funktion ausüben zu können, wurde im Folgenden die Lokalisation von p53 untersucht. Dabei wurden Bcr/Abl-positive Zellen mit Cisplatin allein und mit Imatinib kombiniert behandelt. Nach einer 16-stündigen Inkubation mit Cisplatin wurden die Zellen immunhistochemisch analysiert. Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass bei Bcr/Abl-positiven Zellen, die mit Cisplatin und Imatinib behandelt wurden, p53 größtenteils im Zytoplasma akkumuliert. Bei Zellen, die nur mit Cisplatin behandelt wurden, ist p53 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert.

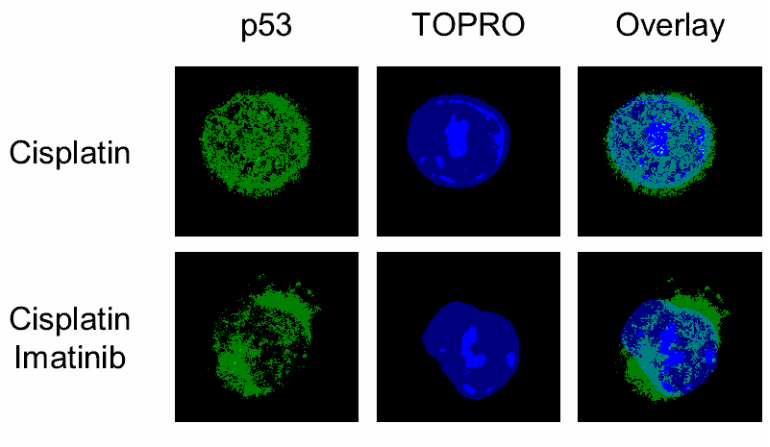

Abb. 29: Nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung akkumuliert p53 größtenteils im Zytoplasma. Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) behandelt. 16 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen fixiert, mit einem p53-spezifischen Antikörper und dem Kernmarker TOPRO gefärbt. Die Proben wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Links: Aufnahme von p53. Mitte: Aufnahme von TOPRO. Rechts: Die Überlagerung von p53 und TOPRO.

6.10 Imatinib führt zu einer verminderten Expression von Bcl-x_L als Antwort auf Cisplatin bei Bcr/Abl-positiven Zellen

Wie bereits gezeigt, kommt es infolge von genotoxischem Stress in Anwesenheit von Imatinib zu einer p53-Translokation aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Unter normalen Bedingungen wird p53 an Bcl-x_L gebunden, sodass seine proapoptotische Funktion unterbunden ist. Basierend darauf, ist für die Viabilität einer Zelle das Gleichgewicht zwischen Bcl-x_L und p53 entscheidend. Aus diesem Grund wurde im folgenden Abschnitt die Expression von Bcl-x_L untersucht.

Die Western-Blot Analyse (Abb. 30-A) zeigt, dass es infolge einer 6-stündigen Cisplatin-Behandlung zu einer reduzierten Expression von Bcl-x_L in Anwesenheit von Imatinib kommt. Die densitometrische Auswertung der Blots ergibt eine Reduktion der Bcl-x_L Expression von 0,9- auf 0,4-fach (siehe Abb. 30-B). Die reduzierte Proteinmenge von Bcl-x_L hat zur Folge, dass „viel“ p53 frei im Zytoplasma und somit in der Lage ist, durch die Aktivierung von BAX, Zelltod zu induzieren.

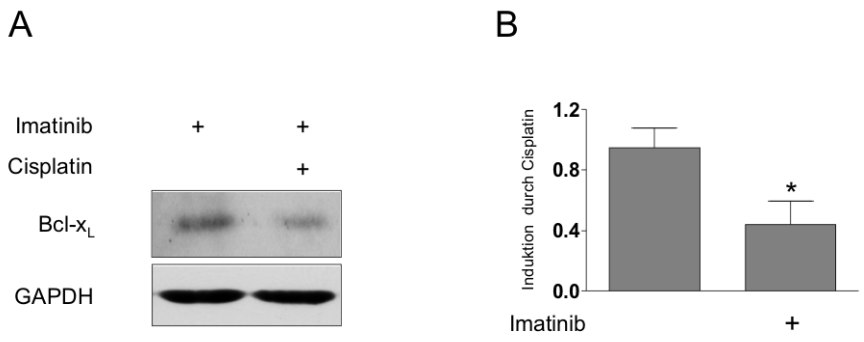

Abb. 30: Bei Bcr/Abl-positiven Zellen kommt es zu einer Reduktion der Bcl-x_L-Expression als Antwort auf eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung. (A) Western-Blot Analyse Bcr/Abl-positiver Zellen. Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Imatinib (3 µM) in An- und Abwesenheit von Cisplatin (5 µM) behandelt. 6 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen pelletiert, das Gesamtlysat extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Untersucht wurde die Expression von Bcl-x_L. Die Beladung des Gels wurde durch die Detektion von GAPDH kontrolliert. (B) Densitometrische Auswertung von Bcl-x_L. n=3

6.10.1 Exogene Expression von Bcl-x_L verhindert AIF-Translokation und somit die Hypersensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen

Um zu untersuchen, ob der durch Imatinib/Cisplatin-induzierte Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen durch das Wiederherstellen des Bcl-x_L/p53-Gleichgewichts verhindert werden kann, wurde in Bcr/Abl-positiven Zellen Bcl-x_L überexprimiert. Wie aus der Western-Blot Analyse ersichtlich (vgl. Abb. 31-A), verhindert eine exogene Bcl-x_L-Expression den Imatinib/Cisplatin-vermittelten Verlust von Bcl-x_L. Darüber hinaus kann dadurch die Translokation von AIF aus dem Mitochondrium in den Zellkern verhindert werden, während bei den mit Kontrollvektor transfizierten Zellen AIF im Nukleus akkumuliert (siehe Abb. 32). Die durch Wiederherstellung des Bcl-xL/p53-Gleichgewichts verursachte Hemmung der AIF-Translokation führt schließlich auch zu einer signifikanten Hemmung des Cisplatin/Imatinib-induzierten Zelltods in diesen Zellen (siehe Abb. 33). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass das Verhältnis zwischen Bcl-x_L und p53 entscheidend für die Viabilität der Zellen ist, und somit Bcl-x_L eine wichtige Rolle für die Induktion des hypersensitiven Phänotyps spielt.

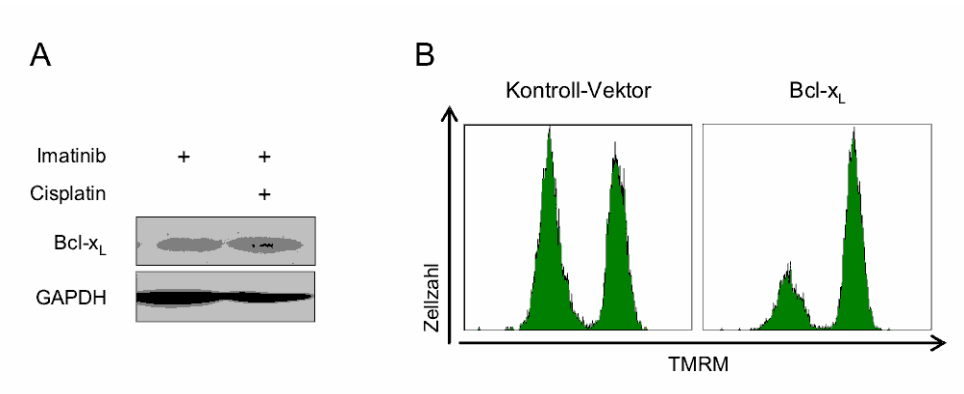

Abb. 31: Eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung hat keine Auswirkung auf die Bcl-x_L-Expression bei Bcl-x_L-überexprimierenden Bcr/Abl-positiven Zellen. Bcl-x_L-überexprimierende Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Imatinib (3 µM) in An- und Abwesenheit von Cisplatin (5 µM) behandelt. Die Zellen wurden 6 h nach Cisplatin-Inkubation pelletiert. Anschließend wurden die Gesamtlysate via SDS-PAGE aufgetrennt und in der Western-Blot Analyse die Expression von Bcl-x_L untersucht. Die Beladung des Polyacrylamidgels wurde durch Detektion von GAPDH überprüft.

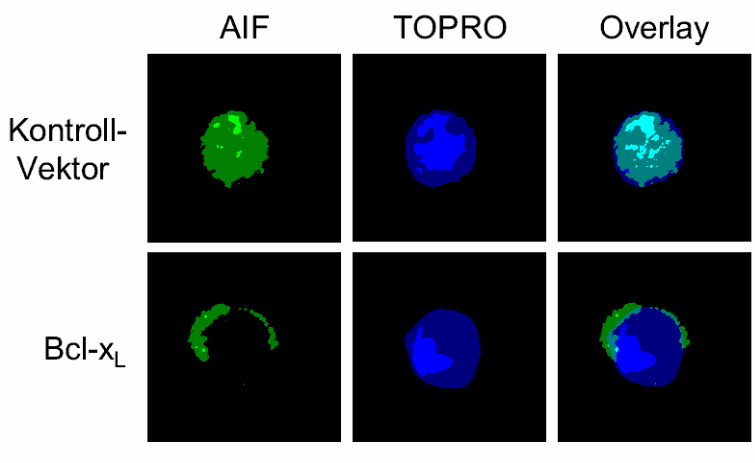

Abb. 32: Exogene Expression von Bcl-x_L bei Bcr/Abl-positiven Zellen verhindert die AIF Translokation in den Zellkern. Bcr/Abl-positive Zellen, transfiziert mit einem Leervektor und Bcl-x_L-überexprimierende Bcr/Abl-positive Zellen wurden in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) mit Cisplatin (5 µM) in Kombination mit Imatinib (3 µM) behandelt. Nach einer 16-stündigen Cisplatin-Inkubation wurden die Zellen fixiert. Gefärbt wurde mit einem AIF-spezifischen Antikörper und dem Kernmarker TOPRO, und anschließend am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Links: Aufnahme von AIF. Mitte: Aufnahme von TOPRO. Rechts: Die Überlagerung von AIF und TOPRO.

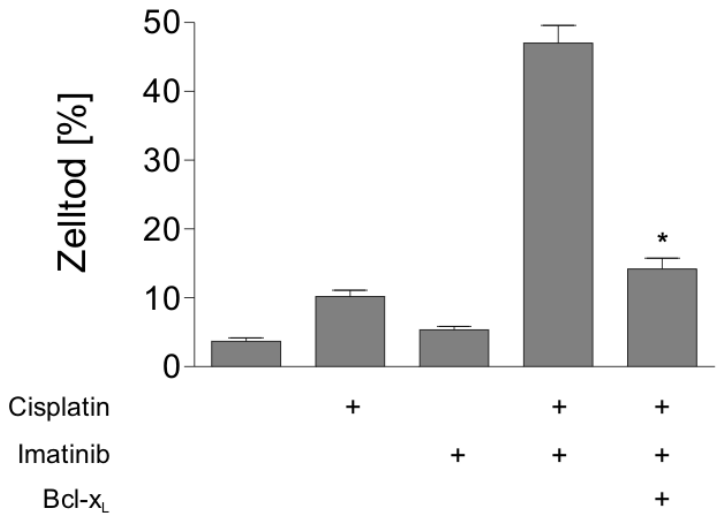

Abb. 33: Hemmung des Zelltods bei Bcr/Abl-positiven Zellen durch exogenes Bcl-x_L. In Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) wurden Bcl-x_L-überexprimierende Bcr/Abl-positive Zellen mit Imatinib (3 µM) und Cisplatin (5 µM) behandelt. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde nach einer 16-stündigen Cisplatin-Behandlung mittels AnnexinV-FITC-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. n=3

6.11 Hemmung von ATM und gleichzeitige Reduktion der Bcl-x_L-Expression führen zum hypersensitiven Phänotyp

Basierend auf der Beobachtung, dass es in Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin zu einer fehlenden ATM-Aktivierung und zusätzlich zu einer verminderten Bcl-x_L–Expression kommt, was schließlich zum Verlust der Zellviabilität führt, wurde die Expression von Bcl-x_L in Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Inkubation mit LY294002 und KU-55399 untersucht. Aus der Western-Blot Analyse (vgl. Abb. 34) wird ersichtlich, dass eine Inkubation mit LY294002 und KU-55399 keinen Effekt auf die Bcl-x_L-Proteinmenge infolge von Cisplatin hat. Demnach kommt es lediglich durch eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung zu einer Reduktion der Bcl-x_L-Expression. Da der hypersensitive Phänotyp selektiv bei Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin zu beobachten ist, lassen diese Beobachtungen darauf schließen, dass die Hypersensitivität gegenüber Cisplatin ein Resultat aus fehlender ATM-Aktivierung und reduzierter Bcl-x_L–Expression ist.

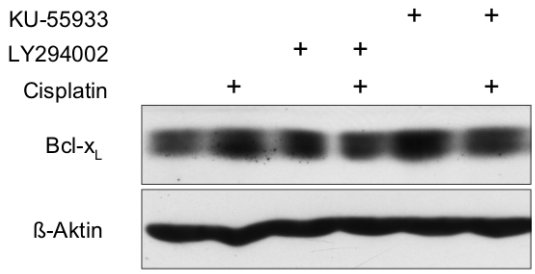

Abb. 34: Pharmakologische Hemmung von ATM hat keinen Effekt auf die Bcl-x_L-Expression in An- und Abwesenheit von Cisplatin. Western-Blot Analyse Bcr/Abl-positiver Zellen. Zellen wurden in Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) mit KU-55933 (10 µM) und LY294002 (25 µM) in An- und Abwesenheit von Cisplatin (5 µM) behandelt. 6 h nach Cisplatin-Behandlung wurden die Zellen pelletiert, das Gesamtlysat extrahiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Untersucht wurde die Expression von Bcl-x_L. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von ß-Aktin gezeigt.

6.12 Eine Imatinib-Behandlung führt auch in Anwesenheit von Etoposid zur Hypersensitivität

Um zu untersuchen, ob die Konsequenzen einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung auch durch andere Zellstress-Induktoren vermittelt werden können, wurden Bcr/Abl-positive und -negative Zellen mit Etoposid in Kombination mit Imatinib behandelt.

Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Zellen mit Imatinib (3 µM) allein, Etoposid (2 µM) allein und mit der Kombination aus Imatinib und Etoposid behandelt. Wie aus Abbildung 35 ersichtlich, arretieren sowohl Bcr/Abl-positive als auch -negative Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach einer 16-stündigen Etoposid-Behandlung. Während eine zusätzliche Behandlung mit Imatinib keinen Effekt auf den G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-negativen Zellen hat, sind Bcr/Abl-positive Zellen in Anwesenheit von Imatinib nicht mehr in der Lage zu arretieren und es kommt zum Verlust der Zellviabilität. Eine Akkumulation der Zellen in der subG1-Phase wird demnach nicht nur durch eine Imatinib/Cisplatin-Kombination erreicht, sondern auch durch die Kombination aus Imatinib und Etoposid.

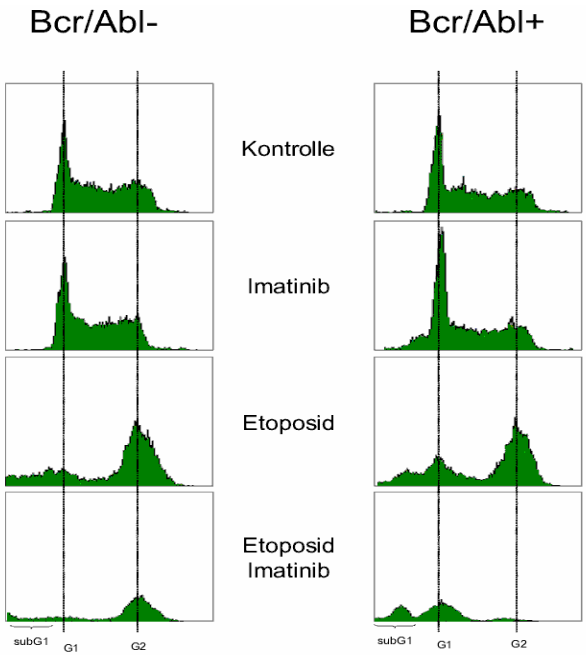

Abb. 35: Bcr/Abl-positive Zellen reagieren auf Etoposid in Kombination mit Imatinib mit einem Verlust des G2/M-Arrest und einer Induktion von Zelltod. Die Analyse des Zellzyklus Bcr/Abl-positiver Zellen wurde mittels PI-Färbung der DNA und Nachweis des BrdU-Einbaus untersucht. Die Zellen wurden mit Etoposid (2 µM) allein oder in Kombination mit Imatinib (3µM) behandelt. Das Experiment wurde in Anwesenheit von mIL3 (1 ng/ml) durchgeführt. Der Zellzyklus wurde nach einer 16-stündigen Etoposid-Inkubation am Durchflusszytometer analysiert.

Zusätzlich wurden weitere Konsequenzen einer Etoposid/Imatinib-Behandlung untersucht. Dabei wurden die Zellen einer 6-stündigen Inkubation mit Etoposid (2 µM) in An- und Abwesenheit von Imatinib (3 µM) unterzogen. Wie aus der Western-Blot Analyse ersichtlich (vgl. Abb. 36-A), führt eine Etoposid-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer Hemmung der ATM-Aktivierung, zu einer verminderten p53-Phosphorylierung an Serin 15 und zu einer reduzierten Mdm2-Induktion. Darüber hinaus kommt es nach einer 16-stündigen Behandlung mit Etoposid in Anwesenheit von Imatinib selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen zur Induktion von Zelltod und somit zum hypersensitiven Phänotyp (vgl. Abb. 36-B). Diese Beobachtungen lassen demnach schlussfolgern, dass die in Bcr/Abl-positiven Zellen beobachtete Hypersensitivität nicht auf Cisplatin beschränkt ist.

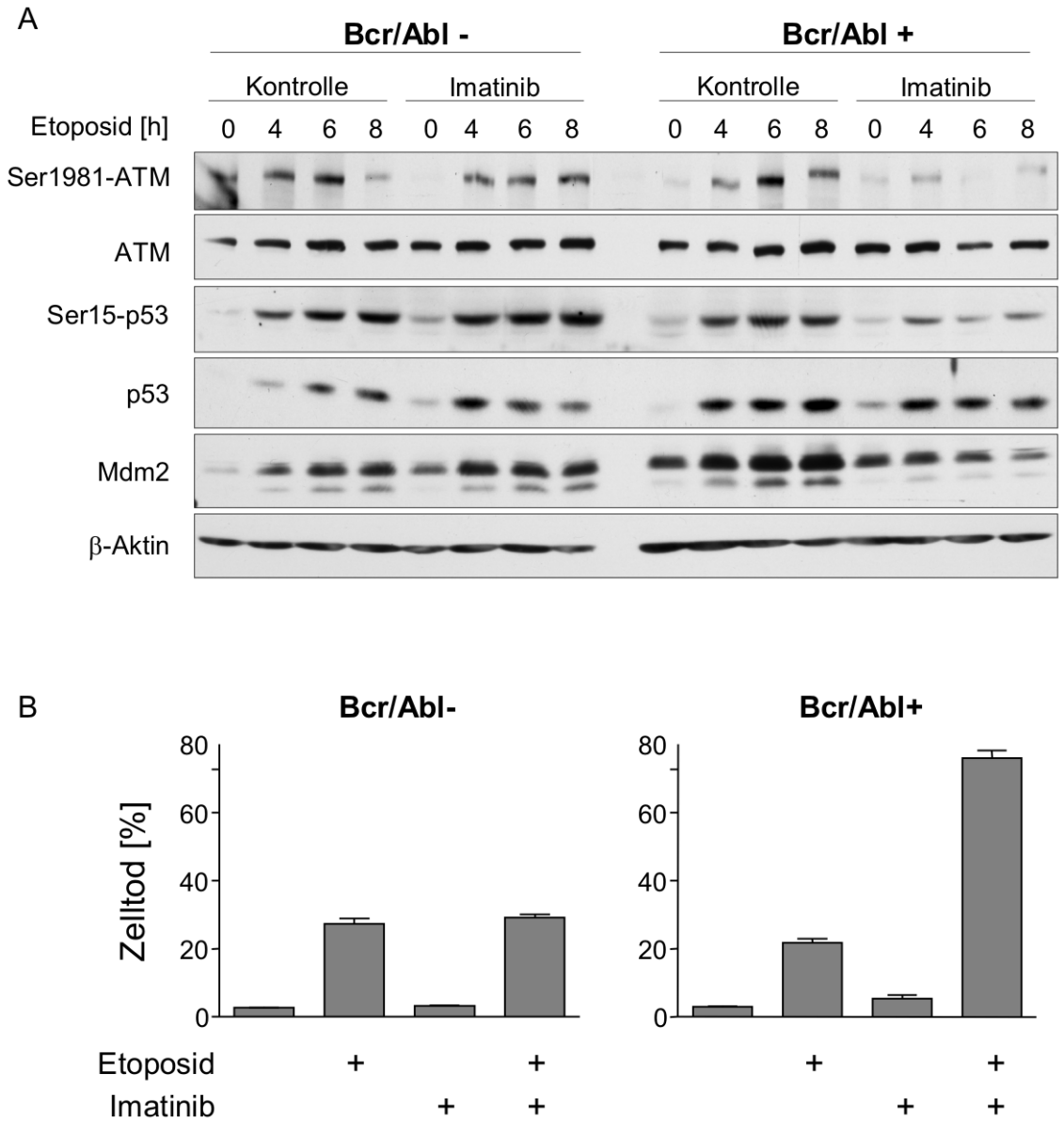

Abb. 36: In Anwesenheit von Imatinib kommt es zur Hemmung der ATM-Aktivierung, zur verminderten p53-Phosphorylierung an Serin 15 und zur reduzierten Mdm2-Induktion. (A) Western-Blot Analyse Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen. In Anwesenheit des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) wurden die Zellen mit und ohne Imatinib (3 µM) einer Cisplatin-Behandlung (5 µM) unterzogen. Nach angegebener Cisplatin-Inkubation wurden die Zellen pelletiert und das Gesamtlysat extrahiert. Mittels SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt und die Expression von ATM, p53 und Mdm2 untersucht. Zusätzlich wurde der Phosphorylierungszustand von ATM und p53 analysiert. Die Beladung des Gels wurde durch Detektion von ß-Aktin gezeigt. (B) Bcr/Abl-positive und -negative Zellen wurden in Gegenwart des exogenen Wachstumsfaktors mIL3 (1 ng/ml) jeweils mit Imatinib (3 µM) allein, Etoposid (2 µM) allein und mit Imatinib und Etoposid in Kombination behandelt. Nach einer Inkubation mit Etoposid (16 h) wurde der Anteil toter Zellen mittels Annexin V-FITC-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. n=3

7 Diskussion

Die onkogene Kinaseaktivität von Bcr/Abl ist für die Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie (CML) essentiell. Bcr/Abl aktiviert eine Reihe von Signalwegen und führt dadurch zu einer verstärkten Proliferation (Cortez *et al.*, 1997; Jonuleit *et al.*, 2000), zu einer verminderten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren (Daley & Baltimore, 1988), zu einer beschleunigten DNA-Reparatur (Canitrot *et al.*, 2003; Nowicki *et al.*, 2004; Slupianek *et al.*, 2002), zu einem verlängerten G2/M-Zellzyklus-Arrest (Bedi *et al.*, 1995; Nieborowska-Skorska *et al.*, 2006) und somit zum Schutz vor zellulärem Stress wie Cisplatin (Slupianek *et al.*, 2002). Da Bcr/Abl selektiv in malignen Zellen exprimiert wird und kausal für die CML ist, stellt das onkogene Fusionsprotein einen hervorragenden Angriffspunkt für eine zielgerichtete Behandlung der Krankheit dar.

Seit 2001 ist der von Novartis (Basel, Schweiz) entwickelte Bcr/Abl-Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib Mesylat (Glivec®; Gleevec™; STI571) von der amerikanischen ‚Food and Drug Administration' (FDA) zur Therapie *Bcr/Abl*-positiver Leukämien zugelassen. Bisher konnten große therapeutische Erfolge mit Imatinib bei Patienten mit CML in chronischer Phase erzielt werden (Druker *et al.*, 2001-A/B). Die Wirkung von Imatinib basiert auf der Bindung des Inhibitors an die ATP-Bindedomäne von Bcr/Abl. Dadurch wird Bcr/Abl in seiner inaktiven Form stabilisiert und ist nicht mehr in der Lage seine Substrate zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Schindler *et al*., 2000; Nagar *et al*., 2002).

Für die zelluläre Reaktion auf genotoxischen Stress wie Mechanismen der Schadenserkennung, des Zellzyklusarrests, der DNA-Reparatur und des Zelltods hat das Tumorsuppressorprotein p53 eine entscheidende Funktion (Vogelstein *et al.*, 2000). Während bei mehr als 50% aller maligner Erkrankungen p53 durch Mutation funktionell verändert ist, ist dies bei der CML äußerst selten und wird, wenn überhaupt, nur in fortgeschrittenen Phasen der Erkrankung beobachtet (Ahuja *et al.*, 1991; Feinstein *et al.*, 1991; Lanza *et al.*, 1995).

Ziel der Arbeit war es, molekulare und funktionelle Auswirkungen von Imatinib auf die p53-abhängige zelluläre Antwort gegenüber genotoxischem Stress, ausgelöst durch Cisplatin, in Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen zu untersuchen.

7.1 Verwendetes Zellsystem

Die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit, welche molekularen und funktionellen Einflüsse Imatinib auf die p53-abhängige zelluläre Antwort gegenüber Cisplatin-vermittelten Stress bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen hat, wurde unter Verwendung verschiedener Zellsysteme untersucht.

Für die Untersuchung möglicher Effekte von Imatinib in Kombination mit Cisplatin wurden zunächst primäre, hämatopoetische Progenitor-Zellen aus Patienten verwendet. In Langzeitkulturen von zuvor selektionierten $CD34^+$ Zellen ist es durch die Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren möglich, Behandlungseffekte auf die für die Erkrankung entscheidenden Progenitor-Zellen zu analysieren (Steelman *et al.*, 2004). Dieses Zellsystem ist somit der *in vivo*-Situation sehr nahe, hat aber den Nachteil, dass nur sehr bedingt funktionelle und molekulare Untersuchungen durchgeführt werden können. Dies liegt in erster Linie an der geringen Zahl primärer Progenitor-Zellen ($CD34^+$; $CD38^-$; Lin^-) und der schnellen Differenzierung unreifer Stammzellen zu Monozyten und Granulozyten in Kultur.

Ein weiteres Zellsystem, das zur Charakterisierung der Folgen einer Imatinib-Behandlung nach zellulärem Stress zur Auswahl stand, sind humane CML-Zelllinien. Bei den Zelllinien K562 und BV173 handelt es sich um humane Blasten-Linien. Ein Nachteil dieser Zelllinien ist, dass sie neben Bcr/Abl weitere Mutationen aufweisen, was eine Interpretation der Rolle von Bcr/Abl erschwert (Drexler *et al.*, 1999). Darüber hinaus haben die Zelllinien K562 und BV173 keine entsprechende Bcr/Abl-negative Ausgangslinie, sodass ein direkter Vergleich Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen im selben System nicht möglich ist.

Eine weitere humane CML-Zelllinie ist die Mo7e, eine Megakaryozyten-Linie. Dieses Zellsystem hat zwar den Vorteil, dass man Bcr/Abl-positive und -negative Zellen innerhalb des Systems vergleich kann, jedoch kann hier der Imatinib-vermittelte Wachstumssignalentzug, der zum Zelltod führt, durch die Zugabe externer Wachstumsfaktoren nicht verhindert werden. Es ist bekannt, dass sich biologische Effekte von Bcr/Abl mit denen von IL3 überschneiden. Aufgrund dessen, sind Bcr/Abl-exprimierende Zellen in ihrer Proliferation und ihrem Überleben nicht abhängig von externen Wachstumsfaktoren wie IL3 und GM-CSF, sodass eine Behandlung mit Imatinib in Abwesenheit exogener Wachstumsfaktoren zum Zelltod Bcr/Abl-positiver Zellen führt (Pendergast *et al.*, 1993; Sirard *et al.*, 1994; de Groot *et al.*, 1999; Sillaber *et al.*, 2000). Ein Grund dafür, dass sich der Imatinib-vermittelte Zelltod bei der Zelllinie Mo7e selbst durch die Zugabe externer Wachstumsfaktoren nicht verhindern lässt, konnte von Donato *et al.* (2001) gezeigt werden. Sie sahen eine Herunterregulierung der ß-Untereinheit des IL3/GM-CSF-Rezeptors bei Bcr/Abl-positiven humanen CML-Zellen infolge von Imatinib, die mit einer

fehlenden STAT5-Aktivierung assoziiert war. Durch eine Imatinib-vermittelte Hemmung von Bcr/Abl kam es zur Induktion von Zelltod. Demnach war dieses Zellsystem für die Untersuchung der Auswirkung von Imatinib infolge von Cisplatin ungeeignet und wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

Das in dieser Arbeit für die Mehrzahl der Untersuchungen verwendete Zellsystem basiert auf der murinen prä-B-Lymphozytenlinie BaF3. Durch eine stabile Transfektion dieser Zellen mit einem Bcr/Abl-Chimär, dessen Bcr-Anteil human und Abl-Anteil murin ist, entstand die Bcr/Abl-positive Zelllinie BaF3p185. Ein Vorteil dieses Konstrukts ist, dass durch den murinen Abl-Anteil keine Speziesbarriere zwischen Kinase und Substrat besteht. Aufgrund der transformierenden Eigenschaften von Bcr/Abl sind Bcr/Abl-positive Zellen in ihrem Überleben und ihrer Proliferation unabhängig von Wachstumsfaktoren, während die Bcr/Abl-negative Ausgangszelllinie nur in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren überleben kann. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von exogenen Wachstumsfaktoren ausreicht, um die durch Imatinib in der Tyrosinkinase-Aktivität gehemmten Bcr/Abl-positiven Zellen vor dem Zelltod zu schützen. Dass die Zugabe von Wachstumsfaktoren ausreicht, um murine Bcr/Abl-positive Zellen vor dem Imatinib-vermittelten Zelltod zu schützen, wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (van der Kuip *et al*., 2001; Schuster *et al*., 2003) (siehe Abb. 2). Ein weiterer Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten Zellsystems liegt darin, dass nicht nur Bcr/Abl-positive und -negative Zellen innerhalb desselben Zellsystems verglichen werden können, sondern auch ein direkter Vergleich von Zellen mit unterschiedlichem Bcr/Abl-Status möglich ist. Demnach können Bcr/Abl-positive und –negative Zellen, aber auch Bcr/Abl-positive Zellen mit aktiver bzw. gehemmter Bcr/Abl-Kinase innerhalb eines Zellsystems untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente in Anwesenheit von mIL3 durchgeführt. Somit konnte verhindert werden, dass Bcr/Abl-positive Zellen durch den Imatinib-vermittelten Wachstumssignalentzug sterben. Zusätzlich konnte verhindert werden, dass sich die Effekte des Wachstumssignalentzugs mit den Effekten der Stressantwort infolge von genotoxischem Stress vermischen, sodass eine klare Interpretation der Ergebnisse möglich war. Darüber hinaus haben die Zellen dieses Modells nur wenige Sekundärmutationen und sind somit ein sehr gut geeignetes Zellsystem für die Untersuchung der Fragestellung dieser Dissertation.

7.2 Einfluss von Imatinib auf die zelluläre Antwort Bcr/Abl-positiver und -negativer Zellen infolge von Cisplatin

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, die sich in erster Linie mit den Effekten der Bcr/Abl-Hemmung durch Imatinib beschäftigt, wurde von Stoklosa *et al.* (2004) ausschließlich der Effekt der aktiven Bcr/Abl-Tyrosinkinase infolge von genotoxischem Stress untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Stoklosa *et al.* (2004) konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die aktive Bcr/Abl-Kinase vor DNA-schädigenden Substanzen schützt und zu einem resistenten Phänotyp führt (vgl. Abb. 3).

Die hier beschriebene sensitivierende Wirkung von Imatinib gegenüber Cisplatin, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für andere Tumorentitäten ebenfalls gezeigt. So konnte beispielsweise Wang-Rodriguez *et al.* (2006) nachweisen, dass Imatinib die antiproliferative Wirkung von Cisplatin bei Kopf-Hals-Karzinomen verstärkt. Es kam zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation und Kolonienbildung in Anwesenheit von Imatinib und Cisplatin, während Cisplatin allein keinen Effekt hatte. Eine Verstärkung des antiproliferativen Effekts von Cisplatin durch Imatinib konnte *in vitro* auch für die Mammakarzinomlinie MCF-7 gezeigt werden, wobei es zu einer 60 %-igen Reduktion der Zellzahl kam. Dabei hatte die Kombination aus Imatinib und Cisplatin einen negativen Effekt sowohl auf die Proliferation als auch auf die Viabilität dieser Zellen (Yerushalmi *et al.*, 2007).

Dass Imatinib bei der CML eine sensitivierende Wirkung gegenüber zellulärem Stress hat, wurde erstmals von Goldberg *et al.* (2004) gezeigt. Die Autoren belegten, dass eine Behandlung mit Imatinib den durch Bestrahlung induzierten genotoxischen Stress in der Bcr/Abl-positiven Zelllinie BV173 zusätzlich verstärkte und damit die Zellen gegenüber DNA-Stress sensitivierte.

Im Gegensatz zu Goldberg *et al.* (2004) konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich Bcr/Abl-positiver mit Bcr/Abl-negativen Zellen desselben Zellsystems untersucht werden, ob Imatinib lediglich die durch Bcr/Abl induzierte Resistenz verhindert oder ob vielmehr die Sensitivität im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen durch Behandlung mit Imatinib sogar gesteigert werden kann. Dabei konnte tatsächlich belegt werden, dass selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen die Vorbehandlung mit Imatinib zu einer extremen Induktion des durch Cisplatin induzierten Zelltodes führt, während eine Imatinib-Behandlung den Cisplatin-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-negativen Zellen nicht weiter verstärkt. Da die Sensitivität Imatinib-behandelter Bcr/Abl-positiver Zellen gegenüber Cisplatin nicht wie erwartet den Wert der Sensitivität Bcr/Abl-negativer Zellen infolge von Cisplatin erreichte, sondern einen signifikant gesteigerten Verlust der Zellviabilität zur Folge hatte, kam es durch eine

Imatinib/Cisplatin-Behandlung zu einer Hypersensitivierung maligner Zellen, die in diesem Ausmaß bisher von anderen Arbeitsgruppen nicht beschrieben wurde (siehe Abb. 3).
Dieser hypersensitive Phänotyp war nicht beschränkt auf das in dieser Arbeit verwendete murine Zellmodell. Vielmehr konnte in vorliegender Dissertation diese Hypersensitivität auch in primären Zellen aus CML-Patienten in Anwesenheit von Imatinib nachgewiesen werden. Während eine Behandlung mit Cisplatin allein und Imatinib allein keine signifikante Wirkung auf Philadelphia-positive und -negative Zellen hatte, führte eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung zu einem hypersensitiven Phänotyp Philadelphia-positiver Zellen (siehe Abb. 1).
Interessanterweise ergab ein Vergleich der Cisplatin-Sensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen mit anderen Tumorzelllinien, dass die murine Bcr/Abl-positive Zelllinie BaF3p185 in Anwesenheit von Imatinib im selben Sensitivitätsbereich wie die hochsensitive Hodenzelllinie N-TERA lag (vgl. Abb. 4). Hodentumore gehören zu den wenigen Tumorentitäten, die sich mit Cisplatin gut behandeln lassen und bei denen eine Cisplatin-Therapie häufig zur Heilung führt (di Pietro *et al.*, 2005). Voraussetzung für eine komplette Heilung einer malignen Erkrankung scheint eine extreme Sensitivität der Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen zu sein.

Um mögliche Ursachen der Hypersensitivität Imatinib-behandelter CML-Zellen gegenüber Cisplatin zu analysieren, wurden funktionelle Auswirkungen in Bcr/Abl-positiven und -negativen hämatopoetischer Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl Bcr/Abl-positive als auch Bcr/Abl-negative Zellen infolge einer Cisplatin-Behandlung in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretierten. In Übereinstimmung mit Beobachtungen von Slupianek *et al.* (2002) und Stoklosa *et al.* (2004), die einen verlängerten G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von alkylierenden Substanzen zeigen konnten, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Cisplatin-induzierte G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-positiven Zellen im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen verstärkt war (siehe Abb. 5 und Abb. 6).
Während eine zusätzliche Behandlung mit Imatinib zu einem Verlust des G2/M-Arrests und zu einer schnellen Induktion von Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen führte, hatte Imatinib keinen Effekt auf den Cisplatin-induzierten G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-negativen Zellen (siehe Abb. 5). Darüber hinaus wurde mittels einer Färbung der Zellen mit CFSE eine Analyse der einzelnen Zellgenerationen durchgeführt. Mittels einer zusätzlichen Färbung mit PI bzw. TMRM konnte die Induktion von Zellzyklusarrest und die mitochondriale Membranpermeabilität in jeder Zellgeneration gemessen werden. Aus dieser Analyse wurde ersichtlich, dass Bcr/Abl-positive Zellen nach einer Cisplatin-Behandlung bereits nach der ersten Zellteilung in der G2/M-Phase arretierten, und eine kleine Zellpopulation, vermutlich nach erfolgter Reparatur des DNA-

Schadens, ohne signifikanten Verlust der mitochondrialen Integrität, eine dritte Zellteilung vollendet hatte. In Anwesenheit von Imatinib hingegen waren die Zellen nicht in der Lage in G2/M zu arretieren. Es kam vielmehr bereits nach der ersten Zellteilung zum Verlust der mitochondrialen Integrität infolge von Cisplatin (vgl. Abb. 9).

7.3 Charakterisierung des Zelltods

Der Mechanismus des Zelltods, der durch eine Imatinib-vermittelte Hemmung der Bcr/Abl-Kinase induziert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert. Wie bereits erwähnt, führt eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen zu einem schnellen Verlust der mitochondrialen Integrität. Der Zelltod ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit mitochondrial-vermittelt. Dabei kommt es zur Freisetzung Zelltod-induzierender Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum, wie beispielsweise Cytochrom C und zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Im Zytoplasma bindet Cytochrom C an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und lagert sich in Gegenwart von ATP zu einem Heptamer zusammen. In dieser Form ist Apaf-1 in der Lage über seine Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) Caspase-9 zu rekrutieren und zu aktivieren. An diesem hochmolekularen Komplex, dem sogenannten Apoptosom, werden in einer definierten Reihenfolge die Effektor-Caspasen-3 und -7 direkt und Caspase-6 indirekt durch die Initiator-Caspase-9 prozessiert und aktiviert. Dieser Mechanismus ist somit von der Aktivierung von Caspasen abhängig (Riedl *et al.*, 2007).

Da der klassische Todesmechanismus über die Freisetzung von Cytochrom C und damit Caspase-abhängig abläuft, wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Einsatz des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk eine mögliche Rolle von Caspasen bei der Imatinib-vermittelten Sensitivierung Bcr/Abl-positiver Zellen gegenüber Cisplatin untersucht. Die Induktion von Zelltod konnte durch eine Inkubation der Zellen mit zVAD-fmk nicht verhindert werden, sodass eine Rolle von Caspasen ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu den murinen Bcr/Abl-positiven Zellen, konnte eine Inkubation mit zVAD-fmk den Cisplatin-induzierten Zelltod bei den hypersensitiven N-TERA-Zellen komplett verhindern, was nicht nur die Wirksamkeit von zVAD-fmk beweist, sondern zusätzlich zeigt, dass fundamental unterschiedliche Todesmechanismen zum selben Resultat, nämlich einer Hypersensitivität, führen können (siehe Abb. 10).

Neben Cytochrom C werden weitere mitochondriale Proteine, wie AIF und EndoG (Endonuclease G) freigesetzt (Susin *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2008). Die Translokation von AIF aus dem Mitochondrium in den Zellkern induziert schließlich einen Caspase-unabhängigen Todesmechanismus. Da AIF und EndoG, im Gegensatz zu den übrigen Proteinen nicht im mitochondrialen Intermembranraum, sondern in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind, wurde im Folgenden mit Hilfe einer TMRM- und Calcein-AM-Färbung die Integrität beider mitochondrialer Membranen untersucht. Da TMRM lediglich im mitochondrialen Intermembranraum akkumuliert, gilt dessen Freisetzung aus dem Mitochondrium als Nachweis für eine Zerstörung der äußeren mitochondrialen Membran. Voraussetzung für die Freisetzung von Calcein-AM ist eine Zerstörung beider mitochondrialer Membranen (Petronilli *et al.*, 2001). Da es in der vorliegenden Arbeit sowohl zu einer Freisetzung von TMRM als auch von Calcein-AM kam (vgl. Abb. 8 und Abb. 11), kann davon ausgegangen werden, dass bei Bcr/Abl-positiven Zellen neben der äußeren auch die innere mitochondriale Membran nach einer Behandlung mit Imatinib und Cisplatin zerstört wurde.

Aufgrund der Beobachtungen, dass der Zelltod Caspase-unabhängig abläuft und es zu einer Zerstörung beider mitochondrialer Membranen kommt, wurde eine mögliche Rolle von AIF überprüft. Bereits nach frühen Zeitpunkten wurde eine AIF-Translokation vom Mitochondrium in den Zellkern detektiert (vgl. Abb. 12). Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen publiziert, ist AIF bei der Induktion von Caspase-unabhängigem Zelltod involviert. Die unter normalen Bedingungen im Mitochondrium lokalisierte NADH-Oxidase transloziert infolge von DNA-Stress in den Zellkern und führt schließlich zum Zelltod (Susin *et al.*, 1999; Vahsen *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus der AIF-Freisetzung ist allerdings unklar. Ein möglicher Mechanismus der AIF-Freisetzung ist abhängig von der Prozessierung von AIF zu tAIF durch die Protease Calpain. Dabei zerfällt Calpain in Anwesenheit von Calcium in seine beiden Untereinheiten, wird dabei aktiviert und ist dann in der Lage AIF am N-Terminus zu schneiden (Otera *et al.*, 2005; Polster *et al.*, 2005; Yuste *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Calpain-Inhibitor (PD 150606) den Cisplatin/Imatinib-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen nicht verhindert. Die AIF-Freisetzung aus dem Mitochondrium läuft demnach in diesem Zellsystem mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig von einer AIF-Prozessierung durch Calpain ab (siehe Abb. 13).

Zusätzlich wird diese Annahme gestützt durch die Beobachtung, dass eine Verringerung der Calcium-Konzentration im Mitochondrium, vermittelt durch eine Inkubation mit BAPTA-AM, den Zelltod nicht verhindern konnte. Somit kann in diesem Zusammenhang eine Rolle von

Calcium ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 13).

Eine AIF-Translokation aus den Mitochondrien in den Kern und ein darauffolgender Caspase-unabhängiger, schneller Zelltod wurde auch im Zusammenhang mit der Aktivierung von PARP nach Behandlung von Fibroblasten mit Alkylanzien beschrieben (Wsierska-Gadek *et al.*, 2003). Eine AIF-Translokation konnte durch PARP-Hemmung verhindert werden und wurde bei PARP-knockout-Zellen nicht beobachtet (Yu *et al.*, 2002). Da in vorliegender Arbeit bei Bcr/Abl-positiven Zellen in Anwesenheit von Imatinib eine vergleichbar schnelle AIF-Freisetzung und Translokation in den Kern nach Cisplatingabe nachweisbar war, wurde auch eine potentielle Rolle der PARP-Aktivierung durch pharmakologische Hemmung dieses Enzyms untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der PARP-Inhibitor (PJ34) keinen Effekt auf den Cisplatin/Imatinib-induzierten Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen hat. Somit spielt auch PARP für die Hypersensitivität Imatinib-behandelter Bcr/Abl-positiver Zellen keine Rolle (siehe Abb. 13).

Da die Daten der vorliegenden Arbeit sowohl einen Calcium, und somit Calpain-abhängigen, als auch einen PARP-abhängigen Mechanismus der AIF-Freisetzung weitgehend ausschließen, könnte möglicherweise die Zerstörung der inneren mitochondrialen Membran ausreichen um eine Freisetzung von AIF zu induzieren. Tatsächlich konnte durch den Nachweis der Calcein-AM-Freisetzung gezeigt werden, dass nicht nur die äußere, sondern auch die innere mitochondriale Membran geschädigt wird. Eine AIF-Freisetzung nach dem Potentialverlust beider Membranen wurde auch von Wolff *et al.* (2008) beschrieben.

7.4 Zelltod ist abhängig von p53

Der Tumorsuppressor p53 spielt in der Antwort auf zellulären Stress eine zentrale Rolle, da er abhängig vom Ausmaß der DNA-Schädigung zelluläre Prozesse wie DNA-Reparatur, Zellzyklus, Seneszenz und Zelltod reguliert (Übersicht in Oren, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass p53 bei der CML nicht mutiert ist, sondern vielmehr durch die Bcr/Abl-Kinaseaktivität aktiviert wird, wurde die Rolle von p53 für die Induktion des hypersensitiven Phänotyps in Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen untersucht. Klare Hinweise dafür, dass für den hypersensitiven Phänotyp die p53-Aktivität notwendig ist, zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit. Während es zu einer Sensitivierung Imatinib-behandelter BV173 Zellen mit Wildtyp-p53 gegenüber Cisplatin kam, hatte dieselbe Behandlung keinen Effekt auf die Viabilität der Zelllinie K562 (siehe Abb. 14). Da die humane Zelllinie K562 durch nicht-funktionelles p53 charakterisiert ist, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass für den hypersensitiven Phänotyp

funktionelles p53 notwendig ist.

Dass p53 eine große Rolle bei der Imatinib-vermittelten Cisplatin-Sensitivierung Bcr/Abl-positiver Zellen spielt, zeigten darüber hinaus Experimente, bei denen durch die Transfektion der Zellen mit p53-shRNA-Konstrukten eine Verminderung der p53-Induktion durch Cisplatin erreicht wurde. Dabei wurde ersichtlich, dass es durch die shRNA-vermittelte Herunterregulierung der p53-Induktion zu einer signifikanten Reduktion des Cisplatin-induzierten Zelltods bei Imatinib-behandelten Zellen kam im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-shRNA behandelt wurden (vgl. Abb. 15).

Ein weiterer Nachweis, dass für den hypersensitiven Phänotyp Bcr/Abl-positiver Zellen der Tumorsuppressor p53 eine wichtige Funktion hat, gelang durch den Einsatz des Mdm2-Antagonisten Nutlin. Durch eine Bindung von Nutlin an Mdm2 wird eine Mdm2-p53-Interaktion verhindert. Da wiederum für eine Degradation eine p53-Ubiquitinierung durch Mdm2 notwendig ist, führt eine Behandlung mit Nutlin zu einer erhöhten p53-Proteinmenge (Vassilev *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit diente der Einsatz von Nutlin als pharmakologische Möglichkeit die p53-Akkumulation nach Cisplatin zu erhöhen, um damit mögliche Effekte der gesteigerten p53-Induktion für die Sensitivität gegenüber Cisplatin zu untersuchen. Aus Ergebnissen dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass eine Nutlin-vermittelte erhöhte p53-Akkumulation bei Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin und in Anwesenheit von Imatinib zu einer zusätzlichen signifikanten Steigerung der Sensitivität führte, wodurch ein fast 100 %-iger Verlust der Zellviabilität erreicht wurde (siehe Abb. 16).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die p53-Proteinmenge und der p53-Mutationsstatus eine entscheidende Rolle bei der Hypersensitivität der Zellen gegenüber Cisplatin spielt. Die Zellen können nur dann sensitiviert werden, wenn funktionelles p53 exprimiert wird. Wenig p53 reduziert die Sensitivität, während eine vermehrte p53-Induktion die Sensitivität erheblich steigert.

Somit spielt die p53-Aktivität für den hypersensitiven Phänotyp Imatinib-behandelter Bcr/Abl-positiver Zellen eine entscheidende Rolle. Deshalb wurden im Folgenden molekulare Effekte einer Cisplatin-Behandlung auf das p53-System bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen in An- und Abwesenheit von Imatinib analysiert.

7.5 Einfluss der aktiven Bcr/Abl-Tyrosinkinase auf das p53-System

Im Gegensatz zu etwa 50 % aller Tumore ist bei der CML der Tumorsuppressor p53 in der Regel nicht mutiert. Dennoch ist das p53-System auch bei der CML dereguliert, da Bcr/Abl eine

modulierende Wirkung auf den p53-Signalweg hat. So wurde eine veränderte, von der Bcr/Abl-Aktivität abhängige Expression von Mdm2 beschrieben (Götz *et al.*, 2001; Trotta et al., 2003). Eine Hemmung der Tyrosinkinase führte zu einer Reduktion der Proteinmenge von Mdm2, hatte aber keine Auswirkung auf die Expression der *Mdm2*-mRNA.

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Expression von p53 als auch die Induktion der p53-abhängigen Proteine, p21 und Mdm2, vergleichend in Bcr/Abl-positiven und -negativen Zellen untersucht. Aus den gewonnen Daten wurde ersichtlich, dass es bei Bcr/Abl-positiven Zellen selbst in Abwesenheit von genotoxischem Stress zu einer verstärkten Expression der Proteine p53, p21 und Mdm2 im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen kam. Diese Beobachtungen stimmen mit Daten anderer Arbeitsgruppen überein (vgl. Abb. 18). Dass unbehandelte murine Bcr/Abl-positive Zellen eine leicht erhöhte p53-Proteinmenge und -Aktivität verglichen mit Bcr/Abl-negativen Zellen zeigen, konnte bereits von Stoklosa *et al.* (2004) gezeigt werden.

Darüber hinaus hat Bcr/Abl eine positive Wirkung auf die p53-Aktivierung nach DNA-Stress. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bereits konstitutiv erhöhte p53-Proteinmenge infolge einer Cisplatin-Behandlung bei Bcr/Abl-exprimierenden Zellen weiter verstärkt wurde, verglichen mit der Menge der entsprechenden Bcr/Abl-negativen Ausgangszelllinie. Auch die direkten Zielgene von p53, wie *Mdm2* und *p21*, wurden als Antwort auf eine Cisplatin-Behandlung in Bcr/Abl-positiven Zellen stärker induziert, was für eine erhöhte p53-Transaktivität spricht (siehe Abb. 18). Die Beobachtung, dass es infolge von genotoxischem Stress zu einer erhöhten p53-Akkumulation bei Bcr/Abl-positiven Zellen im Vergleich zu Bcr/Abl-negativen Zellen kommt, wurde auch von Goldberg *et al.* (2004) beschrieben. Diese Daten stimmen wiederum mit der Beobachtung überein, dass eine Bcr/Abl-Überexpression mit einer erhöhten p53-Akkumulation korreliert (Keeshan *et al.*, 2001; Stoklosa *et al.*, 2004).

7.6 Effekt der Bcr/Abl-Hemmung auf das p53-System

Im Weiteren wurden die Auswirkungen einer Hemmung von Bcr/Abl vermittelt durch Imatinib infolge von genotoxischem Stress analysiert. Aus Resultaten der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass eine Behandlung mit Imatinib kombiniert mit Cisplatin selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer leichten Reduktion der p53-Proteinmenge führt (vgl. Abb. 19). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit publizierten Daten von Goldberg *et al.* (2004). Dabei kam es bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer reduzierten p53-Expression nach einer Behandlung mit Imatinib kombiniert mit DNA-Stress. Die Kinase-Aktivität von Bcr/Abl ist demnach für eine p53-Akkumulation infolge von zellulärem Stress in CML-Zellen notwendig.

Offensichtlich wird aber nicht nur die Proteinstabilität von Bcr/Abl beeinflusst, sondern vielmehr auch dessen posttranslationale Modifikation nach Cisplatin-Behandlung. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 nach Cisplatin-Behandlung in Anwesenheit von Imatinib signifikant reduziert wird. Bei Bcr/Abl-negativen Zellen hatte eine Behandlung mit Imatinib keine Effekte auf die Stabilität oder die Serin 15-Phosphorylierung von p53 infolge einer Behandlung mit Cisplatin (siehe Abb. 19).

p53 wird an Serin 15 direkt durch ATM infolge von zellulärem Stress phosphoryliert (Siliciano *et al.*, 1997; Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die beobachtete Reduktion der p53-Phosphorylierung abhängig von ATM ist. Tatsächlich kam es wiederum selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer Hemmung der ATM-Aktivierung infolge von Cisplatin in Anwesenheit von Imatinib, während eine zusätzliche Behandlung mit Imatinib bei Bcr/Abl-negativen Zellen keinen Effekt auf die ATM-Aktivierung hatte (vgl. Abb. 19). Es ist deshalb naheliegend, dass eine reduzierte Kinase-Aktivität von ATM verantwortlich für die verminderte p53-Phosphorylierung sein könnte.

Als Ursache der verminderten ATM-Aktivierung ist eine direkte Interaktion zwischen Bcr/Abl und ATM denkbar. Voraussetzung für eine Bcr/Abl-ATM-Interaktion ist eine Translokation des vorwiegend im Zytoplasma lokalisierten Bcr/Abl in den Zellkern. Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Bcr/Abl unter bestimmten Umständen in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren. Die Autoren zeigten, dass eine Etoposid-Behandlung zu einer Translokation von Bcr/Abl in den Nukleus führen kann, wo es direkt mit ATR und ATM interagiert. Dabei kam es nur zu einer Hemmung der Aktivität von ATR, während ATM nicht beeinflusst wurde. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Translokation von Bcr/Abl in den Zellkern transient war, da nach Herauswaschen von Etoposid Bcr/Abl wieder ins Zytoplasma translozierte (Dierov *et al.*, 2004). In Gegenwart von Etoposid führte aktives Bcr/Abl im Zellkern letztlich zur Induktion des Zelltods. Vermutlich lässt sich der Verlust der Viabilität damit erklären, dass eine

Zerstörung des ATR-Signalweges Auswirkungen auf die genetische Stabilität und somit auf die Viabilität der Zellen hat. Dass aktives Bcr/Abl allerdings verantwortlich ist für einen vermehrten Zelltod durch Etoposid, steht in Kontrast zu Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die übereinstimmend zeigen, dass Bcr/Abl die Zellen vor Zelltod infolge von genotoxischem Stress schützt (Bedi *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 2004; Niebrowska-Skorska *et al.*, 2006; Niebrowska-Skorska *et al.*, 2006). Neben dieser Stress-induzierten Translokation von Bcr/Abl in den Kern gibt es einen weiteren, wahrscheinlicheren Mechanismus, der erstmals von Vigneri *et al.* (2001) beschrieben wurde. Vigneri *et al.* (2001) konnten nachweisen, dass es zu einer transienten Translokation von Bcr/Abl in den Zellkern infolge einer Hemmung der Bcr/Abl-Tyrosinkinase-Aktivität durch Imatinib-Behandlung kommen kann. Eine gleichzeige Inkubation der Zellen mit Leptomycin B verhinderte den Export von Bcr/Abl und führte nach Entfernung von Imatinib schließlich zum Zelltod Bcr/Abl-transformierter Zellen (Vigneri *et al.*, 2001).
Übertragen auf die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit würde dies bedeuten, dass für den hypersensitiven Phänotyp eine Imatinib-vermittelte Translokation von Bcr/Abl in den Nukleus Voraussetzung ist. Im Kern kommt es potentiell zu einer Interaktion der inaktiven Tyrosinkinase mit ATM, wobei dadurch die Cisplatin-induzierte ATM-Aktivierung verhindert wird.

Eine mögliche Ursache für die Hypersensitivität Bcr/Abl-positiver Zellen könnte somit eine veränderte Funktion von Bcr/Abl sein, wenn dieses durch Imatinib gehemmt wird. Es ist durchaus denkbar, dass Bcr/Abl als Kinase-defektes Molekül eine Rolle einnimmt, die von der aktiven Kinase nicht erfüllt werden kann. Durch die Translokation der inaktiven Kinase in den Zellkern kommt es potentiell zu diversen Protein-Protein-Interaktionen, die in der normalen Zelle mit c-Abl als Partner stattfinden.
Hinweise dafür, dass die inaktive Bcr/Abl-Kinase eine dominant negative Funktion im Kern ausüben könnte, zeigen die Daten der siRNA-Experimente dieser Arbeit. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp durch die Herunterregulation des Onkoproteins teilweise reversierbar war. In Zellen, die mit siRNA-Oligonukleotiden gegen Bcr/Abl behandelt waren, konnte die Cisplatin-induzierte p21-Proteinmenge, durch die zusätzliche Behandlung mit Imatinib teilweise wieder restauriert werden. Hingegen kam es bei siRNA-behandelten Kontrollzellen zu einer reduzierten Cisplatin-vermittelten p21-Induktion in Anwesenheit von Imatinib (siehe Abb. 25).

7.7 In Anwesenheit von Imatinib kommt es in Bcr/Abl-positiven Zellen zu einer Hemmung der p53-Aktivität als Transkriptionsfaktor infolge einer Cisplatin-Behandlung

Aus Daten der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass eine gleichzeitige Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit Imatinib und Cisplatin eine reduzierte Aktivierung von ATM und somit eine Reduktion der Phosphorylierung des Serin-Restes an Stelle 15 von p53 zur Folge hatte (vgl. Abb. 19). Um zu überprüfen, welche Konsequenzen diese Beobachtungen für die transkriptionelle Aktivität von p53 haben könnten, wurde die Expression p53-abhängiger Gene analysiert. Die Hemmung von Bcr/Abl führte infolge von Cisplatin zu einer reduzierten Transaktivität von p53, die sich in einer verminderten Expression der p53-Zielstukturen, p21 und Mdm2, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, wiederspiegelte (siehe Abb. 20). Die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor wird durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen reguliert, wie beispielsweise Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Methylierung, Acetylierung, Sumoylierung (Shieh *et al.*, 1997; Unger, 1997; Gu und Roeder, 1997; Meek, 1999; Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 scheint dabei eine sehr wichtige Funktion für die Induktion des hypersensitiven Phänotyps einzunehmen. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine Inkubation mit Nutlin zwar zu einer verstärkten Cisplatin-abhängigen p53-Akkumulation führte, aber nicht in der Lage war, die durch Imatinib verursachte Hemmung der transkriptionellen Funktion von p53 wiederherzustellen (siehe Abb. 22-A). Die vermehrte Akkumulation von p53 durch die Behandlung mit Nutlin ging nicht mit einer vermehrten p53-Phosphorylierung an Serin 15 einher (siehe Abb. 22-B). Die reduzierte transkriptionelle Aktivität von p53 ist somit unabhängig von der p53-Menge, die posttranslationale Modifizierung hingegen spielt eine wichtige Rolle. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, führt die Modifikation von p53 an Serin 15 durch ATM und ATR infolge von DNA-Schädigung nicht nur zur Protein-Stabilisierung sondern auch zu einer verstärkten Transaktivität von p53 (Saito *et al.*, 2003; Meek, 2004).

Die zentrale Bedeutung der p53-Phosphorylierung des Serin-Restes an Stelle 15 für die Transaktivität von p53 wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben (Fiscella *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1999b; Dumaz *et al.*, 1999). Dabei hatten p53-Mutationen an Stelle 15 eine verminderte Transaktivität zur Folge. Veränderungen der p53-Regulation aufgrund einer fehlenden p53-Phosphorylierung des Serin 15 führten zu Alterationen der p53-abhängigen Regulation von Apoptose und Zellzyklus (Fiscella *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1999b). So zeigten Daten von Braithwaite *et al.* (2005) eine erleichterte Bindung des Transkriptionsfaktors an den

Promotor des Zellzyklus-regulatorischen Gens *CDKN1A*, das für das Protein p21 kodiert, wenn p53 am Serin-Rest an Stelle 15 phosphoryliert war.

Dass Bcr/Abl-positive Zellen in Anwesenheit von Imatinib und Cisplatin nicht mehr in der Lage sind im Zellzyklus zu arretieren, könnte somit möglicherweise verursacht sein durch die reduzierte p21-Expression in Folge der fehlenden p53-Phosphorylierung an Serin 15. p21 spielt nicht nur für den G1-Checkpoint eine wichtige Rolle sondern auch für die Einleitung des G2/M-Arrests (Cayrol *et al.*, 1998; Niculescu *et al.*, 1998; Satyanarayana *et al.*, 2007; Kann *et al.*, 2007). Im Zellkern interagiert p21 mit nukleären Proteinen, die sowohl für den G1/S-Phasenübertritt als auch für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose essentiell sind (Dulic *et al.*, 1998). Daten von Boulaire *et al.* (2000) beschreiben eine Hemmung der CDK (cyclin dependent kinase)-Aktivität durch eine direkte Bindung von p21 an Cyclin/CDK- Komplexe.

Die Ser/Thr-Kinase cdc2, auch CDK1 bezeichnet, ist ein Schlüsselenzym des Zellzyklus. Vor allem in der Regulation des G2/M-Übergangs hat cdc2 eine wichtige Funktion (King *et al.*, 1994; Nurse, 1997). Für eine Aktivierung von cdc2 am G2/M-Übergang ist die Synthese und die Bindung von Cyclin B1 an cdc2 notwendig. Während der G2-Phase wird cdc2 durch die Kinasen wee1 und myk1 an den Seitenketten des Threonins 14 und des Tyrosins 15 phosphoryliert und somit inaktiviert, wobei die Phosphatreste wahrscheinlich die Substratanlagerung beeinträchtigen (Lundgren *et al.*, 1991; Mueller, 1995; Booher *et al.*, 1997). Erst die Dephosphorylierung von cdc2 durch die Phosphatase Cdc25C ermöglicht die Bildung eines cdc2/Cyclin B1-Komplexes und führt infolgedessen zur Initiation des G2/M-Übergangs (Strausfeld *et al.*, 1991). In der vorliegenden Dissertation konnte eine Reduktion der cdc2-Phosphorylierung und somit eine Aktivierung von cdc2 (siehe Abb. 7), möglicherweise verursacht durch die verminderte p21-Induktion, bei Bcr/Abl-positiven Zellen infolge einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung festgestellt werden. Eine Aktivierung von cdc2 ermöglichte die Bildung eines cdc2/Cyclin B1-Komplexes. Die Zellen arretierten somit nicht in der G2/M-Phase des Zellzyklus, stattdessen kam es zur Progression der Zellen im Zellzyklus. Diese Beobachtung erklärt möglicherweise den verlorenen G2/M-Arrest Bcr/Abl-positiver Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es anstelle des G2-Arrests bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer gleichzeitigen Inkubation mit Imatinib und Cisplatin zur Induktion von Zelltod kam, der von p53 abhängig war (vgl. Abb. 6). Um zu überprüfen, ob der Verlust der Zellviabilität möglicherweise von einer selektiven Induktion proapoptotischer p53-Zielgene abhängig ist, wurde die Expression von *BAX*, *PUMA* und *NOXA* untersucht. Erstaunlicherweise waren diese p53-abhängigen Gene bereits in Abwesenheit von zellulärem Stress hoch exprimiert und wurden durch die Behandlung mit Cisplatin nicht weiter induziert. Auch eine zusätzliche

Behandlung der Zellen mit Imatinib hatte keine Auswirkungen auf die Expression von *BAX*, *PUMA* und *NOXA* (siehe Abb. 21). Somit hat p53 in diesem Zellsystem keine transaktivierende Wirkung auf diese proapoptotischen Gene nach einer Behandlung mit Cisplatin. Man kann daraus schließen, dass vermutlich die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor durch Behandlung mit Imatinib gestört ist. Strnad *et al.* (2008) beschrieben eine konstitutiv hohe BAX-Expression in primären Zellen von CML-Patienten.

Zusammenfassend wird aus den Daten der vorliegenden Arbeit ersichtlich, dass der hypersensitive Phänotyp von p53 abhängig ist. Obwohl die Transaktivität des Tumorsuppressors nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung reduziert war, war p53 dennoch in der Lage Zelltod zu induzieren.

7.8 In Anwesenheit von Imatinib kommt es in Bcr/Abl-positiven Zellen zur p53-Translokation nach einer Cisplatin-Behandlung

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass p53 neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor im Kern auch eine Zelltod-induzierende Funktion im Zytoplasma hat (Moll *et al.*, 1998; Schuler *et al.*, 2001). Damit p53 seine proapoptotische Funktion ausüben kann, muss es zunächst aus dem Nukleus ins Zytoplasma translozieren. In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis einer p53-Akkumulation im Zytoplasma selektiv bei Imatinib-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin, während p53 in Abwesenheit von Imatinib sowohl im Zytoplasma als auch Zellkern akkumulierte (siehe Abb. 29). Der p53-Export aus dem Nukleus ist dabei von mehreren Faktoren abhängig. Durch posttranslationale Modifikationen von p53 kann die Lokalisation des Tumorsuppressors reguliert werden. Dabei spielt vor allem die Phosphorylierung des Serin-Restes an Stelle 15 von p53 infolge von zellulärem Stress eine wichtige Rolle. Diese Phosphorylierungsstelle ist in der N-terminalen NES von p53 lokalisiert, sodass eine Stress-induzierte Phosphorylierung zur nukleären Akkumulation von p53 führt. Eine Phosphorylierung von p53 an dieser Stelle, induziert durch UV, verhinderte einen p53-Export aus dem Zellkern (Zhang *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der p53-Phosphorylierung am Serin-Rest an Stelle 15 nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung bei Bcr/Abl-positiven Zellen kam (vgl. Abb. 19).

Auch eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO3a für den Transport von p53 aus dem Kern ins Zytoplasma wurde beschrieben. So zeigten You *et al.* (2006), dass eine shRNA-vermittelte Herunterregulierung von FoxO3a eine Translokation von p53 verhindern konnte.

Möglicherweise wird die p53-Oligomerisierung durch FoxO3a verhindert, die NES von p53 wird nicht verdeckt und infolgedessen kommt es zum p53-Export ins Zytoplasma. In vorliegender Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit Imatinib und Cisplatin eine Dephosphorylierung und somit eine Aktivierung von FoxO3a zur Folge hatte (siehe Abb. 28). Dabei kam es zu einem parallelen Verlauf von FoxO3a-Aktivierung und p53-Export aus dem Nukleus (vgl. Abb. 29). Aufgrund der Tatsache, dass nur aktives FoxO3a in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren und den p53-Export zu induzieren, stehen die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Daten in Übereinstimmung mit den von You *et al.* (2006) publizierten Beobachtungen.

Ein weiterer Mechanismus über den der Export von p53 aus dem Zellkern reguliert wird, wurde von Li *et al.* (2003) gezeigt. Dabei spielt der p53-Regulator Mdm2 eine zentrale Rolle. Während eine geringe Mdm2-Proteinmenge zu einer Mono-Ubiquitinierung und damit zu einem nukleären Export von p53 führt, sind höhere Proteinmengen von Mdm2 für eine Poly-Ubiquitinierung von p53 verantwortlich, was schließlich zu einer proteasomalen Degradation von p53 führt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Imatinib-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen infolge von Cisplatin eine reduzierte Mdm2-Induktion zur Folge hat (siehe Abb. 20). Somit kann die vermehrte zytoplasmatische Akkumulation von p53 bei Imatinib/Cisplatin-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen auch aufgrund eines erhöhten p53-Exports nach Mono-Ubiquitinierung durch Mdm2 erklärt werden.

Alle drei publizierten Mechanismen, die in der Regulation des p53-Exports eine Rolle spielen, könnten somit zu der beobachteten vermehrten p53-Akkumulation nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen im Zytoplasma beitragen.

7.9 Rolle von Bcl-x_L bei der Induktion von Zelltod

Das antiapoptotische Protein Bcl-x_L nimmt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der Apoptose und in der Pathogenese vieler maligner Erkrankungen ein. Bei vielen Tumoren kommt es zu einer Bcl-x_L-Überexpression, wodurch die Zellen vor dem Zelltod geschützt sind. Dabei spielen vor allem die STAT-Transkriptionsfaktoren, die bei vielen Tumoren konstitutiv aktiv sind, eine große Rolle. Zahlreiche Publikationen beschreiben Bcl-x_L als Zielgen sowohl von STAT5 als auch von STAT3 (Socolovsky *et al.*, 1999; Bromberg *et al.*, 1999; Grandis *et al.*, 2000; Gesbert *et al.*, 2000). Da der STAT-Signalweg eine Reihe von Genen reguliert, die in der Regulation von Zellwachstum und -überleben involviert sind, führt eine Aktivierung dieses Wegs zu verstärktem Zellüberleben (Bromberg *et al.*, 2000; Bowman *et al.*, 2000). Grandis *et al.* (2000) zeigte, dass

eine Hemmung des STAT3-Signalwegs bei Kopf-Hals-Karzinomen zu einer reduzierten Bcl-x_L-Expression und damit verbunden zur Induktion von Zelltod führte. Es ist bekannt, dass auch bei der CML das antiapoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bcl-x_L hoch exprimiert ist. Vermittelt wird die Bcl-x_L-Hochregulation durch das Onkoprotein Bcr/Abl. Die konstitutiv aktive Tyrosinkinase führt zu einer Aktivierung von STAT5, die wiederum eine erhöhte Bcl-x_L-Expression zur Folge hat (Socolovsky *et al.*, 1999).

Bcl-x_L spielt für die Zellviabilität eine entscheidende Rolle, da es die proaoptotische Funktion von p53 im Zytoplasma reguliert (Moll *et al.*, 1998; Übersicht in Chipuk *et al.*, 2006). Unter normalen zellulären Bedingungen ist lediglich eine geringe p53-Proteinmenge in der Zelle und somit auch im Zytoplasma vorhanden. Infolge von DNA-Stress kommt es zur Akkumulation von p53. Dabei bindet p53 an Bcl-x_L und wird inaktiviert, sodass es nicht in der Lage ist seine proapoptotische Funktion auszuüben. Demnach ist das Gleichgewicht zwischen p53 und Bcl-x_L entscheidend für die Zellviabilität (Übersicht in Chipuk *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass p53 nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung größtenteils im Zytoplasma akkumulierte (vgl. Abb. 29). Darüber hinaus kam es bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Behandlung mit Imatinib und Cisplatin zu einer reduzierten Bcl-x_L-Expression (siehe Abb. 30). Diese verminderte Expression von Bcl-x_L führte somit wahrscheinlich zu einem Ungleichgewicht zwischen p53 und Bcl-x_L zugunsten von p53, sodass vermehrt freies p53 im Zytoplasma vorlag, das dann in der Lage war, BAX zu aktivieren und einen mitochondrialen Zelltod zu induzieren. Dies wird gestützt durch den Befund, dass eine exogene Überexpression von Bcl-x_L, die das Gleichgewicht mit p53 wiederherstellte, eine Translokation von AIF und somit die Induktion von Zelltod bei Bcr/Abl-positiven Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung verhindern konnte (siehe Abb. 32 und Abb. 33). Aus diesen Resultaten wurde ersichtlich, dass für die Hypersensitivität eine reduzierte Bcl-x_L-Proteinmenge notwendig war.

Darüber hinaus wurde von Wolff *et al.* (2008) gezeigt, dass mutiertes p53 nicht in der Lage ist mitochondrial-vermittelten Zelltod zu induzieren. Missense-Mutationen in der DNA-Bindedomäne von p53 führten zu einer reduzierten BAX- und BAK-Aktivierung. Da die Aktivierung von BAX und BAK für den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, und somit für die Induktion von Zelltod notwendig sind, kann nur Wildtyp-p53 mitochondrial-vermittelten Zelltod induzieren. Dies erklärt wiederum die fehlende Hypersensitivierung bei den K562-Zellen, die kein funktionelles p53 exprimieren (vgl. Abb. 14).

7.10 Hypersensitiver Phänotyp ist abhängig von ATM-Hemmung und reduzierter Bcl-x_L-Expression

Um den Mechanismus für die Hypersensitivität zu charakterisieren, wurde überprüft ob die reduzierte ATM-Aktivierung und die vermutlich dadurch verhinderte p53 Phosphorylierung die alleinige Ursache für diesen Phänotyp ist. Dies würde bedeuten, dass eine direkte Hemmung von ATM infolge von Cisplatin den gleichen Effekt auf die Sensitivität der Zellen haben müsste wie Imatinib in Kombination mit Cisplatin. Um dies zu klären, wurde die ATM-Aktivierung pharmakologisch durch den Einsatz der Inhibitoren LY294002 bzw. KU-55933, gehemmt.
Aus Proteinanalysen wurde ersichtlich, dass eine Behandlung der Zellen mit LY294002 oder KU-55933 in Kombination mit Cisplatin zu vergleichbaren Effekten führte wie nach Hemmung von Bcr/Abl durch Imatinib. So kam es zu einer Reduktion der ATM-Aktivierung, zu einer Reduktion der p53-Phosphorylierung am Serin-Rest an Stelle 15 und zu einer Reduktion der p53-Induktion. Auch die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor war nach direkter Hemmung der ATM-Kinase gestört. Wie bei Imatinib kam es auch nach der direkten ATM-Hemmung durch LY294002 oder KU-55933 zu keiner Induktion von Mdm2 nach Cisplatin-Behandlung (siehe Abb. 26).
Darüber hinaus wurde aus Zellzyklusanalysen ersichtlich, dass die Hemmung von ATM auch ausreicht, um den auf die Cisplatin-Behandlung folgenden G2/M Arrest zu unterdrücken.
Erstaunlicherweise kam es allerdings nur durch eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung zu einem starken Verlust der Zellviabilität, während eine Behandlung mit LY294002 lediglich einen geringen Effekt auf den Zelltod hatte. Eine pharmakologische Hemmung von ATM führte zwar zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin (siehe Abb. 27), jedoch war die dadurch erreichte Sensitivität vergleichbar mit der Cisplatin-behandelter Bcr/Abl-negativer Zellen. Aus diesen Resultaten wird ersichtlich, dass die verminderte Kinase-Aktivität von ATM vermutlich der Grund für den Verlust des G2/M-Arrest bei Bcr/Abl-positiven Zellen infolge von Cisplatin ist, nicht aber für den extrem gesteigerten Zelltod und für die Hypersensitivität. Demnach spielen für den hypersensitiven Phänotyp Bcr/Abl-positiver Zellen nach einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung zusätzliche Faktoren eine Rolle.

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass eine Imatinib/Cisplatin-Behandlung zu einer Reduktion der Bcl-x_L-Expression bei Bcr/Abl-positiven Zellen führt und dass die exogene Expression von Bcl-x_L den hypersensitiven Phänotyp weitgehend verhindert, spielt offensichtlich die verminderte Expression von Bcl-x_L für den hypersensitiven Phänotyp eine entscheidende Rolle. Durch die exogene Expression von Bcl-x_L konnte die Sensitivierung auf ein Maß reduziert

werden (siehe Abb. 33), das wiederum vergleichbar ist mit dem, was bei ATM-Hemmung durch LY294002 oder KU-55933 infolge von Cisplatin erreicht wird (siehe Abb. 27). Eine Reduktion der Bcl-x_L-Proteinmenge konnte nur infolge einer Imatinib/Cisplatin-Behandlung beobachtet werden, nicht jedoch durch die Kombination aus ATM-Inhibitoren mit Cisplatin (vgl. Abb. 34). Diese Befunde sprechen sehr dafür, dass für den hypersensitiven Phänotyp beides notwendig ist, eine ATM-Hemmung und eine Bcl-x_L-Herunterregulation. Durch eine Hemmung von ATM wird eine Reduktion der p53-Funktion als Transkriptionsfaktor verursacht, was zu einem Verlust der Möglichkeit der Zellen führt zu arretieren und zu reparieren. Darüber hinaus kommt es vermutlich allein durch eine Hemmung von ATM zu einer vermehrten Akkumulation von p53 im Zytoplasma. Notwendig für den hypersensitiven Phänotyp ist darüber hinaus die Reduktion der Bcl-x_L-Proteinmenge, die zu einem ungleichmäßigen Bcl-x_L/p53-Verhältnis zugunsten von p53 führt, sodass p53 im Zytoplasma aktiv und damit in der Lage ist BAX zu aktivieren und somit einen schnellen und effektiven Zelltod zu induzieren. Der hypersensitive Phänotyp kann demnach nur durch eine vermehrte p53-Akkumulation im Zytoplasma und eine gleichzeitige Herunterregulation von Bcl-x_L erreicht werden. Induziert wird beides nur durch eine Imatinib-Behandlung der Zellen kombiniert mit Cisplatin, da sowohl durch eine Hemmung der p53-Expression als auch durch eine Induktion von Bcl-x_L der hypersensitive Phänotyp verloren geht.

7.11 Fazit und Ausblick

Mit der Einführung von Imatinib (Glivec®; Gleevec™; STI571) im August 2001 wurde ein entscheidender Fortschritt in der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie erreicht. Der niedermolekulare Inhibitor greift direkt die onkogene Bcr/Abl-Tyrosinkinase an, die als ursächliches Ereignis für die Entwicklung der CML identifiziert wurde. Obwohl sich Imatinib zum Goldstandard in der Primärtherapie der CML etabliert hat, ist nach aktuellem Erkenntnisstand keine Eliminierung aller leukämischen Zellen durch eine Imatinib-Monotherapie in Patienten möglich. Daher ist die Entwicklung neuer Behandlungs-Strategien, die eine vollständige Heilung der CML erzielt, nach wie vor von großer Bedeutung. Erfolgversprechend könnte die Kombination aus Imatinib und anderen Medikamenten, wie zum Beispiel Chemotherapeutika, sein.

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis einer Sensitivierung Imatinib-behandelter CML-Zellen gegenüber Cisplatin. Dabei hatte Imatinib in Kombination mit Cisplatin einen sensitivierenden Effekt selektiv bei primären Philadelphia-positiven Zellen, während diese Kombination keine Auswirkung bei Philadelphia-negativen Zellen hatte. Möglicherweise könnte

diese Therapiestrategie eine Möglichkeit darstellen, den malignen Klon zu eliminieren und damit die CML zu heilen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Behandlung mit Nutlin zu einem noch stärkeren Viabilitätsverlust der Zellen führt, die Sensitivität gegenüber Cisplatin also nochmal zusätzlich gesteigert wird. Dieser Effekt war allerdings nicht komplett Tumor-selektiv, jedoch konnte durch eine Verringerung der Nutlin-Konzentration die Selektivität teilweise erreicht werden (siehe Abb. 17). Durch die Optimierung der Dosierung könnte dieser Therapieansatzes die Möglichkeit einer sehr schnellen Elimination des malignen Klons und so einer Heilung von CML-Patienten bieten.

Die sensitivierende Wirkung von Imatinib gegenüber Cisplatin konnte sehr klar in einem murinen Zellsystem demonstriert werden. Dieses Zellmodell ermöglichte die Untersuchung der molekularen und funktionellen Effekte von Imatinib infolge von zellulärem Stress. Dabei gelang der Nachweis einer Hypersensitivität Imatinib-behandelter Bcr/Abl-positiver Zellen, die bislang von anderen Arbeitsgruppen so nicht beschrieben wurde. Aus Daten der vorliegenden Arbeit wurde ersichtlich, dass eine Imatinib-Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen sehr weit oben in der Erkennung des DNA-Schadens Alterationen hervorruft. So kommt es zu einer Reduktion der ATM-Aktivierung infolge von Cisplatin selektiv bei Bcr/Abl-positiven Zellen. Konsequenzen hatte dies auf die durch zellulären Stress hervorgerufene p53-Antwort, wobei es zu einer verminderten transkriptionellen Aktivität von p53 kam. Interessanterweise kam es dennoch zu einer raschen Induktion von Zelltod, vermittelt vermutlich durch zytoplasmatisches p53. p53 führte möglicherweise zur Aktivierung von BAX im Zytoplasma und zu Depolarisierung der mitochondrialen Membranen.

Darüber hinaus wurde in Imatinib/Cisplatin-behandelten Bcr/Abl-positiven Zellen ein weiterer Weg identifiziert, der für den hypersensitiven Phänotyp eine große Rolle spielt. Die Kombination aus Imatinib und Cisplatin führte in Bcr/Abl-exprimierenden Zellen zu einer Reduktion der Bcl-x_L-Expression. Die verminderte Bcl-x_L-Proteinmenge hatte ein Ungleichgewicht zwischen Bcl-x_L und p53 zugunsten von p53 zur Folge, das infolgedessen seine Zelltod-induzierende Funktion im Zytoplasma ausführen konnte.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hypersensitivität nicht auf Cisplatin beschränkt ist, da auch eine Behandlung Bcr/Abl-positiver Zellen mit Etoposid in Anwesenheit von Imatinib zu einem hypersensitiven Phänotyp führt (vgl. Abb. 34 und Abb. 35).

Basierend auf der Tatsache, dass bei vielen Tumoren Signalwege der DNA-Schadensprozessierung per se dereguliert sind, könnte die pharmakologische Hemmung eines weiteren Wegs zu einer Hypersensitivität führen. Diese Hypersensitivität wäre tumorselektiv, da bei normalen Zellen durch diesen pharmakologischen Eingriff lediglich ein Weg gehemmt

würde, der andere jedoch weiterhin intakt wäre.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Imatinib kombiniert mit Cisplatin bei der CML von therapeutischem Wert sein kann. Inwieweit diese Strategie auf die Klinik übertragbar ist, müssen im Weiteren nun Untersuchungen in CML-Xenograft-Modellen und darauf folgend klinische Studien zeigen.

8 Literaturverzeichnis

Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen S L, Goldman J, Snyder D, Foti A, and Cline M. The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. J Clin Invest. 1991;87(6):2042–2047.

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

Appella, E., Anderson, C. W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. Eur. J. Biochem. 2001;268:2764-2772.

Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, and Y. Ziv. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science. 1998;281:1674–1677.

Bar J, Lukaschuk N, Zalcenstein A, Wilder S, Seger R, Oren M. 2005. The PI3K-Inhibitor LY294002 prevents p53 induction by DNA damage and attenuates chemotherapy-induced apoptosis. Cell Death and Differentiation. 2005;12:1578-1587.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, T., Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. EMBO J. 1993;12:461-468.

Baskaran R, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D, Wynshaw Boris A, Kastan MB, Wang JY. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. Nature. 1997;387(6632):516-9.

Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, Akhtar AJ, Hilton J, Jones RJ. 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(3):1148-58.

Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. Blood. 1994;83:2038–2044.

Ben Neriah Y, Bernards A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D. Alternative 5' exons in c-abl mRNA. Cell. 1986b;44:577-586.

Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. Mol Cell Biol. 2004;24:1341–1350.

Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. 2004;4:793-805.

Booher, RN., Holman, P.S. und Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that

inhibits cdc2 but not cdk2 activity. Journal of Biological Chemistry. 1997;272: 22300.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 1999;96:857–868.

Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. J Leukoc Biol. 2003;73:689–701.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene. 1998;17:1395–1413.

Canitrot Y, Falinski R, Louat T, Laurent G, Cazaux C, Hoffmann JS, Lautier D, Skorski T. p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. Blood. 2003;102(7):2632-7.

Canman, C. E., D. S. Lim, K. A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M. B. Kastan, and J. D. Siliciano. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. Science. 1998;281:1677–1679.

Carlesso N, Frank DA, Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. J Exp Med. 1996;183:811–820.

Cawley S, Bekiranov S**,** Ng HH**,** Kapranov P**,** Sekinger EA**,** Kampa D**,** Piccolboni A**,** Sementchenko V**,** Cheng J**,** Williams AJ**,** Wheeler R**,** Wong B**,** Drenkow J**,** Yamanaka M**,** Patel S**,** Brubaker S**,** Tammana H**,** Helt G**,** Struhl K**,** Gingeras TR. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. Cell. 2004;116(4):499-509.

Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53 deficient cells. Oncogene. 1998;16(3):311-20.

Chuikov S, Kurash JK**,** Wilson JR**,** Xiao B**,** Justin N**,** Ivanov GS**,** McKinney K**,** Tempst P**,** Prives C**,** Gamblin SJ**,** Barlev NA**,** Reinberg D**.** Regulation of p53 activity through lysine methylation. Nature. 2004;432(7015):353-60.

Colton SL, Xu XS, Wang YA, Wang G. The involvement of ataxia-telangiectasia mutated protein activation in nucleotide excision repair-facilitated cell survival with cisplatin treatment. J Biol Chem. 2006;281:27117-25.

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(19):2333-42.

Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85(23):9312-6.

Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, Broggini M, Cisplatinum and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation . Neoplasia. 2001;3:10-6.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 1999;13:2905-2927.

Deininger MW. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. J Cancer Res Clin Oncol. 2004;130(2):59-72.

DeLeo, A. B. *et al.* Detection of a transformationrelated antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979;76:2420-2424.

Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, M'Kacher R, Rasy SD, Eschwege F, Vainchenker W, Turhan AG, Bourhis J. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. Blood. 2001;97(7):2084-90.

di Pietro A, Vries EG, Gietema JA, Spierings DC, de Jong S. Testicular germ cell tumours: the paradigm of chemo-sensitive solid tumours. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(12):2437-56.

Dierov J, Dierova R, Carroll M. BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. Cancer Cell. 2004;5(3):275-85.

Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003;3:11–22.

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.

Druker BJ (A), Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2001;344:1031-1037.

Druker BJ (B), Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med. 2001;344(14):1038-42.

Druker BJ. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. Oncogene. 2002;21(56):8541-6.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102:33-42.

Dulic, V., G. H. Stein, D. F. Far, and S. I. Reed. Nuclear accumulation of p21 Cip1 at the onset

of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. Mol. Cell. Biol. 1998;18:546–557.

Dumaz N, David W. Meek Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2 The EMBO Journal. 1999;18:7002–7010.

Elmore SP, Nishimura Y, Qian T, Herman B, Lemasters JJ. Discrimination of depolarized from polarized mitochondria by confocal fluorescence resonance energy transfer. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004;422:145-52

Fanta S, Sonnenberg M, Skorta I, Duyster J, Miething C, Aulitzky WE, van der Kuip H. Pharmacological inhibition of c-Abl compromises genetic stability and DNA repair in Bcr-Abl negative cells. Oncogene. 2008;27(31):4380-4.

Feinstein E, Cimino G, Gale RP, Alimena G, Berthier R, Kishi K, Goldman J, Zaccaria A, Berrebi A, Canaani E. p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;88(14):6293-7.

Fiscella M, Ullrich SJ, Zambrano N, Shields MT, Lin D, Lees-Miller SP, Anderson CW, Mercer WE, Appella E. Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. Oncogene. 1993;8(6):1519-28.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem. 1998;67:481-507.

Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells Mol Dis. 1997;23:380-94.

Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. Blood. 2000;96:2269–2276.

Ghaffari S, Jagani Z, Kitidis C, Lodish HF, Khosravi-Far R. Cytokines and BCR-ABL mediate suppression of TRAIL-induced apoptosis through inhibition of forkhead FOXO3a transcription factor. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:6523–6528.

Goldberg Z, Levav Y, Krichevsky S, Fibach E, Haupt Y. Treatment of chronic myeloid leukemia cells with imatinib (STI571) impairs p53 accumulation in response to DNA damage. Cell Cycle. 2004;3(9):1188-95.

Goldman JM. Chronic myeloid leukemia-still a few questions. Experimental Hematology. 2004;32:2-10.

Gostissa M., Hengstermann A., Fogal V., Sandy P., Schwarz SE., Scheffner M., Del Sal G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. EMBO J. 1999;18:64626471.

Groffen J ,Stephenson JR, Heisterkamp N ,de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia

chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell. 1984;36:93-99.

Gu W, Luo J**,** Brooks CL**,** Nikolaev AY**,** Li M. Dynamics of the p53 acetylation pathway. Novartis Found Symp. 2004;259:197-205.

Gu, J., Linghu, N., Wiederschain, D., Youan, Z. Identification of p53 sequence elements that are required for Mdm2-medieated nuclear export. Mol. Cell. Biol. 2001;21:8533-8546.

Guilhot F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. Oncologist. 2004;9(3):271-81.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science. 1994;266(5192):1821-1828.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature. 1997;387(6630): 296-299.

Hehlmann R, Berger U, Pfi rrmann M. Drug treatment is superior to allografting as first line therapy in chronic myeloid leukemia. Blood. 2007.

Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature. 1985;315:758-761.

Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. Oncogene. 1997;15:1573–1581.

Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R. Chronische myeloische Leukämie. 2. ed. UNIMED

Horita M, Andreu EJ, Benito A, Arbona C, Sanz C, Benet I, Prosper F, Fernandez-Luna JL. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. J Exp Med. 2000;191:977–984.

Ilaria RL Jr, Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. J Biol Chem. 1996;271:31704-31710.

Jonuleit T, Peschel C, Schwab R. 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.

Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, et al. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. Blood. 2000;96:1933-9.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer. 2002;2:301–310.

Karin M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. Cancer J Sci Am. 1998;4:92–99.

Keeshan K, Mills K I, Cotter T G and McKenna S L. Elevated Bcr-Abl expression levels are sufficient for a haematopoietic cell line to acquire a drug-resistant phenotype. December 2001;15(12):1823-1833.

Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. Advances in cancer research. 1998;72:57-107.

Khosravi-Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. Cancer Metastasis Rev. 1994;13:67-89.

King, RW., Jackson, P.K. und Kirschner, M.W. Mitosis in transition (review). Cell. 1994;79:563-571.

Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. Oncogene. 2002;21:5868–5876.

Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, Mori M, Kirito K, Kikuchi S, Liu Q, Tauchi T, Miyazawa K, Endo H, Nagai T, Ozawa K. A member of Forkhead transcription factor FKHRL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. J Biol Chem. 2003;278:6411–6419.

Kruse JP, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications. Cell. 2008;133(5):930-30.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR and Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. Cell. 2002;111:331–342.

Kuwana T, Newmeyer DD**.** Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(6):691-9.

Lane, D. P. & Crawford, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature. 1997;278:261–263.

Lanza F, Bi S. Role of p53 in leukemogenesis of chronic myeloid leukemia. Stem Cells. 1995;13(4):445-52.

Levine AJ, Hu W**,** Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ. 2006;13(6):1027-36.

Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature. 2001;412:95–99.

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. Science. 2003;302(5652):1972-5.

Linzer, D. I. & Levine, A. J. Characterization of a 54 Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell. 1979;17:43-52.

Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., Berger, S. L. p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage. Mol. Cell. Biol. 1999;19:1202-1209.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science. 1990;247:1079-1082.

Lundgren, KN., Walworth, R., Booher, R.N., Dembski, M., Kirschner, M.W. und Beach, D. Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. Cell, 1991;64:1111.

Luo J, Li M**,** Tang Y**,** Laszkowska M**,** Roeder RG**,** Gu W**.** Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo**.** Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(8):2259-64.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. Cancer cell. 2003;4:257–262.

Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. J Immunol Meth. 2000;243:147-154.

Meek DW. The p53 response to DNA damage. DNA Repair (Amst). 2004;3(8-9):1049-56.

Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. Leukemia. 1996a;10:751-756.

Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. Nat Rev Genet. 2004;5:355-365.

Moll UM, Schramm LM. p53-An Acrobat in Tumorigenesis. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 1998;1:23-37

Morris G F, Bischoff J R, and Mathews M B. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93(2):895-899.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 1983;65:55-63.

Mueller, PR. A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates cdc2 on both threonine14 and tyrosine15. Science. 1995;270, 86.

Murray-Zmijewski F, Slee EA**,** Lu X**.** A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(9):702-12.

Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). Cancer Res. 2002;62:4236-4243.

Nakamura, S., Roth, J., Mukhopadhyay. Multiple lysine mutations in the c-terminal domain of p53 interfere with Mdm2-dependent protein degradation und ubiquitinierung. Mol. Cell. Biol. 2000;20:9391-9398.

Niculescu AB, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. Mol Cell Biol. 1998;18(1):629-43.

Nie Y, Li HH, Bula CM, Liu X. Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C-terminus and tetramerization. Mol Cell Biol. 2000;20(3):741-8.

Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Kossev P, Wasik MA, Skorski T. Complementary functions of the antiapoptotic protein A1 and serine/threonine kinase pim-1 in the BCR/ABL-mediated leukemogenesis. Blood. 2002;99:4531–4539.

Nieborowska-Skorska M, Stoklosa T, Datta M, Czechowska A, Rink L, Slupianek A, Koptyra M, Seferynska I, Krszyna K, Blasiak J, Skorski T. ATR-Chk1 axis protects BCR/ABL leukemia cells from the lethal effect of DNA double-strand breaks. Cell Cycle. 2006;5(9):994-1000.

Nieborowska-Skorska M, Wasik MA, Slupianek A, Salomoni P, Kitamura T, Calabretta B, Skorski T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. J Exp Med. 1999;189:1229-1242.

Norberg E, Gogvadze V**,** Ott M**,** Horn M**,** Uhlén P**,** Orrenius S**,** Zhivotovsky B**.** An increase in intracellular Ca2+ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death.Cell Death Differ. 2008;15(12):1857-64.

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

Nowicki MO, Falinski R, Koptyra M, Slupianek A, Stoklosa T, Gloc E, Nieborowska-Skorska M, Blasiak J, Skorski T. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. Blood. 2004;104(12):3746-53.

Nurse, P. Checkpoint pathways come of age (Review). Cell. 1997;91:865-867.

O'brien SG, Guilhot F, Larson RA. Imatinib compared with interferon and lowdose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2003;348:994-1004.

Oetzel C, Jonuleit T, Götz A, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148 (ST1 571) induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells by down-regulating BCL-X. Clin Cancer Res. 2000;6:1958-68.

Ohta T, Kinoshita T, Naito M, Nozaki T, Masutani M, Tsuruo T. Requirement of the caspase-3/CPP32 protease cascade for apoptotic death following cytokine deprivation in hematopoietic cells. J Biol Chem. 1997;272:23111–23116.

Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. Cell Death Differ. 2003;10(4):431-42.

Otera, **H.**, S. Ohsakaya, Z. Nagaura, N. Ishihara, and K. Mihara. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. EMBO J. 2005;24:1375-1386.

Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate - the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. New Engl J Med. 2003;348(11):1048-50.

Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, 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.

Penserga ET, Skorski T. Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability. Oncogene. 2007;26:11–20.

Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. Oncogene. 2006;25(11):1602-11.

Polster, B. M., G. Basanez, A. Etxebarria, J. M. Hardwick, and D. G. Nicholls. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. J. Biol. Chem. 2005;280:6447-6454.

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

Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. Genes. 1998;12:968–981.

Riedl SJ, Shi Y**.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(11):897-907.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M. Lain, S., Laine, D. P., Hay, R. T. Multiple Cterminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. Mol. Cell. Biol. 2000;20:8458-8467.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M. Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., Hay, R. T. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. EMBO J. 1999;18:6455- 6461.

Rowley J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243:290–293.

Roy L, Guilhot J, Krahnke T et al. Survival advantage from Imatinib compared to the combination Interferon-{alpha} plus Cytarabine in chronic phase CML: historical comparison between two phase III trials. Blood. 2006;

Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Rios MB, Giles FJ, Beran M, Koller CA, Keating MJ, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the

results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. Cancer. 1999;86(12):2632-41.

Saito S, Goodarzi AA**,** Higashimoto Y**,** Noda Y**,** Lees-Miller SP**,** Appella E**,** Anderson CW**.** ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. J Biol Chem. 2002;277(15):12491-4.

Sakaguchi, K., Herrera, j. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., Appella, E. DNA damage activates p53 through a phosphorylationacetylation cascade. Genes Dev. 1998;12:2831-2841.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998.

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. Mol Cell. 2001;8:781–794.

Sarin A, Williams MS, Alexander-Miller MA, Berzofsky JA, Zacharchuk CM, Henkart PA. Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. Immunity. 1997;6:209-215.

Satyanarayana A, Hilton MB, Kaldis P. p21 Inhibits Cdk1 in the absence of Cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. Mol Biol Cell. 2008;19(1):65-77.

Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood. 2002;99(10):3530-9.

Sawyers CL, McLaughlin J, Witte ON. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. J Exp Med. 1995;181:307–313.

Schiffer CA., BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med. 2007;357(3):258-65.

Schindler T, Bornmann W, Pellicena P et al. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. Science. 2000;289:1938-1942.

Schuler M, Green DR**.** Mechanisms of p53-dependent apoptosis. Biochem Soc Trans. 2001;29(6):684-8.

Schuster C, Forster K, Dierks H, Elsasser A, Behre G, Simon N, Danhauser-Riedl S, Hallek M, Warmuth M. The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic

differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. Blood. 2003;101:655-63.

Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(1):44-55.

Shafman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. Nature. 1997;387(6632):520-3.

Shah NP, Witte ON, Denny CT. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome- positive and -negative cell lines. Mol Cell Biol. 1991;11:1854-1860.

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 allevates inhibition by Mdm2. Cell. 1997;91:325-334.

Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCRABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. Oncogene. 1996;13:247–254.

Siliciano, J. D., C. E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella, and M. B. Kastan. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. Genes Dev. 1997;11:3471-3481.

Sionov RV, Coen S, Goldberg Z, Berger M, Bercovich B, Ben-Neriah Y, Ciechanover A, Haupt Y. c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination. Mol Cell Biol. 2001;21(17):5869-78.

Sirard C, Laneuville P, Dick JE. Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. Blood. 1994;83:1575-1585.

Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO, Wasik MA, Tsichlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. Embo J. 1997;16:6151–6161.

Skorski T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. Nat Rev Cancer. 2002;2(5):351-60.

Skorski T. Oncogenic tyrosine kinases and the DNA-damage response. Nat Rev Cancer. 2002;2:351-60.

Slupaniek A, Hoser G, Majsterek I, Bronisz A, Malecki M, Blasiak J, Fishel R, Skorski T. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. Mol Cell Biol. 2002;22(12):4189-201.

Smits VA, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkela TP, Medema RH. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. J Biol Chem.

2000;275(39):30638-43.

Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia. 2004;18(2):189-218.

Sternberg DW, Gilliland DG. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. J Clin Oncol. 2004;22:361–371.

Stoklosa T, Slupianek A, Datta M, Nieborowska-Skorska M, Nowicki MO, Koptyra M, Skorski T. BCR/ABL recruits p53 tumor suppressor protein to induce drug resistance. Cell Cycle. 2004;3:1463-72.

Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. und Doree, M. Dephosphorylation and Activation of a p34cdc2 Cyclin B Complex in vitro by Human Cdc25 Protein. Nature. 1991;351:242-245.

Strnad M, Brajuskovic G, Strelic N, Todoric-Zivanovic B, Stamatovic D, Tatomirovic Z, Magic Z. Expression of programmed cell death proteins in patients with chronic myeloid leukemia. J BUON. 2008;13(3):403-8.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature. 1999;397: 441–446.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. Nature. 1999;397, 441-446.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol Cell. 2001;8:613-621.

Tan T, Chu G. p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. Mol Cell Biol. 2002;22(10):3247-54.

Tang Y, Zhao W**,** Chen Y**,** Zhao Y**,** Gu W**.** Acetylation is indispensable for p53 activation. Cell. 2008;133(4):612-26.

Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. Leukemia. 2001;15(3):342-7.

Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:1888–1893.

Trotta R, Vignudelli T, Candini O, Intine RV, Pecorari L, Guerzoni C, Santilli G, Byrom MW, Goldoni S, Ford LP, Caligiuri MA, Maraia RJ, Perrotti D, Calabretta B. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. Cancer Cell. 2003;3(2):145-60.

Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E. Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., Haupt, Y. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. EMBO J. 1999;18:1805-1814.

Unger T, Sionov RV, Moallem E, Yee CL, Howley PM, Oren M and Haupt Y. Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. Oncogene. 1999;18(21):3205-12.

Vahsen, N., C. Cande, J. J. Briere, P. Benit, N. Joza, N. Larochette, P. G. Mastroberardino, M. O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F. Madeo, M. Piacentini, J. M. Penninger, H. Schagger, P. Rustin, and G. Kroemer. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. EMBO J. 2004;23:4679–4689.

van der Kuip H, Moehring A, Wohlbold L. Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of Bcr-Abl in hematopoietic cell lines. Leuk Res. 2004;28:405–8.

Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. Mol Cell Biol. 1991;11:1107–1113.

Vassilev LT, Vu BT**,** Graves B**,** Carvajal D**,** Podlaski F**,** Filipovic Z**,** Kong N**,** Kammlott U**,** Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science. 2004;303(5659):844-8.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell. 2000;102:43–53.

Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. Nat Med. 2001;7(2):228-34.

Virchow R. Weisses Blut. [Froriep‘s] Notizen aus dem Gebiet der Natur- und Heilkunde. 1845;36:151-156.

Virchow, R. Weisses Blut und Milztumoren I. Medicinische Zeitung. 1846;15:157-159.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2:489–501.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). Journal of Biological Chemistry. 1994;269:5241-8.

Vogelstein B, Lane D and Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. Nature 408: 307–310.

Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. Biochim Biophys Acta. 2002;1602(1):47-59.

Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Altuna X, Chu TS, Weisman RA, Ongkeko WM. STI-571 (Gleevec) potentiates the effect of cisplatin in inhibiting the proliferation of head and neck squamous cell carcinoma in vitro. Laryngoscope. 2006;116(8):1409-16.

Westbrook CA, Le Beau MM, Diaz MO, Groffen J, Rowley JD. Chromosomal localization and characterization of c-abl in the t(6;9) of acute nonlymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 1985;82(24):8742-6.

Wolff S, Erster S, Palacios G, Moll UM. p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. Cell Res. 2008;18(7):733-44.

Wsierska-Gadek, J., M. Gueorguieva, and J. Wojciechowski. MNNG induces dramatic DNA damage and non-apoptotic changes in cervical carcinoma HeLa cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2003;1010:278-282.

Wu, X. W., Bayle, J. H., Olson, D., Levine, A. J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. Genes Dev. 1993;7:1126-1132.

Xu Y. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. Cell Death Differ. 2003;10(4):400-3.

Yerushalmi R, Nordenberg J, Beery E, Uziel O, Lahav M, Luria D, Fenig E. Combined antiproliferative activity of imatinib mesylate (STI-571) with radiation or cisplatin in vitro. Exp Oncol. 2007;29(2):126-31.

You H, Yamamoto K**,** Mak TW**.** Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(24):9051-6.

Yu, S. W., H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson. Mediation of poly- (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science. 2002;297:259–263.

Yuste, V. J., R. S. Moubarak, C. Delettre, M. Bras, P. Sancho, N. Robert, J. d'Alayer, and S. A. Susin. Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. Cell Death Differ. 2005;12:1445–1448.

Zhang Y, Xiong Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. Science. 2001;292:1910-5.

Zuckerman V, Lenos K, Popowicz GM, Silberman I, Grossman T, Marine JC, Holak TA, Jochemsen AG, Haupt Y. c-Abl phosphorylates Hdmx and regulates its interaction with p53. J Biol Chem. 2008.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Walter E. Aulitzky danke ich für die Bereitstellung des spannenden Forschungsthemas. Seine ausgezeichnete Unterstützung und stetige Motivation haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Peter Scheurich danke ich für seine Bereitschaft die Arbeit von Seiten der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Heiko van der Kuip für die exzellente Betreuung. Sein Interesse an der Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Hilfe und Diskussion haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen und werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. Auch für die kritische Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn van der Kuip ganz herzlich bedanken.

Für das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei den Kolleginnen und Kollegen (auch ehemaligen) des Instituts für Klinische Pharmakologie bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Frau Maike Sonnenberg, Frau Silke Fanta, Frau Tabea Peußer, Frau Kerstin Willecke und Frau Silke Haubeiß. Vielen Dank.

Der Robert Bosch Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Durchführung dieser Dissertation.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Ioanna Skorta
Anschrift	Seestrasse 342 8038 Zürich
Geburtsdatum und -ort	25. Juli 1980, Hagen

AKADEMISCHER WERDEGANG

November 2005 bis April 2009	Promotion an der Universität Stuttgart Abschluss zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.). Thema der Dissertation: „Hemmung von Bcr/Abl durch Imatinib führt zu einer Cisplatin-Sensitivierung und zu einer modulierten p53-Funktion bei Bcr/Abl-positiven Zellen.“
September 2005 bis April 2009	Stipendiatin der Robert Bosch Gesellschaft für Medizinische Forschung mbH
Oktober 2000 bis Juli 2005	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Schwerpunkte: Mikrobiologie, Physiologie, medizinische Mikrobiologie Diplomarbeit am Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Heraklion Thema: „Genetische und biochemische Charakterisierung der Translokationskomponente Sec A.“ Abschluss: Diplom-Biologin

PRAKTIKA

Oktober bis Dezember 2004	Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Heraklion
Juli bis August 2003	Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Heraklion

SCHULBILDUNG

1991 bis 2000	Eduard-Spranger-Gymnasium in Filderstadt
1987 bis 1991	Grundschule Bruckenackerschule in Filderstadt
1987 bis 1993	Griechische Grundschule in Filderstadt

Zürich, den 12. Januar 2010