

In-vitro-Untersuchungen zur Sensibilität Philadelphia-positiver Knochenmarkzellen  
bei chronischer myeloischer Leukämie gegenüber verschiedenen Zytostatika in  
Kombination mit dem Tyrphostin AG 879

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mechthild Rausch, geb. Schroer  
aus Heessen, jetzt Hamm

Gießen, 2004

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik IV

Leiter: Prof. Dr. med H. Pralle  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. A. Käbisch

Gutachter: Prof. Dr. H. Pralle

Tag der Disputation: 29.06.2004

# Abkürzungen

A-MuLV	Abelson Murine Leukemia Virus
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-2	Protoonkogen bcl-2 (= B-cell-lymphoma)
bcr	„breakpoint cluster region“
c-abl	zelluläres abl-Protoonkogen
c-DNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-fos	zelluläres fos-Protoonkogen
c-jun	zelluläres jun-Protoonkogen
c-myc	zelluläres myc-Protoonkogen
CML	chronische myeloische Leukämie
CTP	Cytidintriphosphat
d-NTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	„epithelium derived growth factor“
ERB2/neu	Protoonkogen ERB2/neu, kodiert für eine Tyrosinkinase
FAK	„focal adhesion kinase“
FCS	Fötale Kälberserum
FISH	Floureszenz-in situ-Hybridisierung
5-FU	5-Fluorouracil
G1-Phase	Ruhephase zwischen der Phase der Zytoplasmateilung und der Phase der DNA-Synthese im Zellzyklus
G2-Phase	Ruhephase zwischen der Phase der DNA-Synthese und der Mitose im Zellzyklus
gag	Sequenz im Virusgenom, die für die Capsidproteine kodiert
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glyeraldehydphosphatdehydrogenase
GDP	Guanosyldiphosphat
GTP	Guanosyltriphosphat
Grb-2	„growth factor receptor binding protein-2“
HZ2-FeSV	„Hardy-Zuckerman 2 feline sarcoma virus“
IE	internationale Einheiten
IGEPAL	Octylphenylpolyethylenglycol
IMDM	Isocove's Modified Dulbeccos Medium
kB	Kilobase
kD	kilo Dalton
M-bcr	„Major breakpoint cluster region“
m-bcr	„minor breakpoint cluster region“
μ-bcr	„mikro breakpoint cluster region“
M-MuLV	„Moloney Murine Leukemia Virus“
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
m-RNA	messenger Ribonukleinsäure
MAP	„mitogen activated protein“

MHC	„Major Histocompatibility Complex“
μM	Mikromol
MPPI	humanes erythroides P55-Gen
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid
NaCl	Natriumchlorid
p53	Tumorsuppressorgen p53
PBS	„Phosphat buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PEG-Interferon	Polyethylenglycol-Interferon
Pgp	P-Glykoprotein
raf	Serin-Threonin-Kinase raf
ras	GTP-bindendes Protein ras
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transcription-Polymerasekettenreaktion
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
SH-Region	src homologe Region
SHC-Protein	Protein mit SH-Regionen aus dem ras-Signaltransduktionsweg
sis	sis-Onkogen, kodiert für die aktive Form des „platelet derived growth factor“
sos	ras-Aktivator „son of sevenless“
STAT	„signal transducer and activator of transkription“
STI	Selectiver Tyrosinkinaseinhibitor
TAE	Tris-Acetat / EDTA
TTP	Thymidintriphosphat
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Chronische myeloische Leukämie (CML)	1
1.2	Die Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms	2
1.3	Das abl-Protoonkogen	3
1.4	Das bcr-abl-Rearrangement	4
1.5	Die Molekularbiologie der chronischen myeloischen Leukämie	9
1.6	Tyrosinkinaseinhibitoren	14
<b>2.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
3.1	Chemikalien	18
3.2	Medien und Seren	19
3.3	Geräte	19
3.4	Sonstige Hilfsmittel	20
3.5	Zelllinien	21
3.6	Reagenzien für RT-PCR	22
3.7	Lösungen	23
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
4.1	Vorversuche	24
4.1.1	Zellkultur mit Zytostatika	24
4.1.2	MTT-Test	24
4.2	Untersuchung von Zellen aus dem Knochenmarksaspirat von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Tyrphostin AG 879 und 5-Fluorouracil	25
4.2.1	Patienten	25
4.2.2	Kontrollgruppe	25
4.2.3	Probengewinnung	26
4.2.4	Isolation der mononukleären Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation	26

4.2.5	Behandlung der Zellen mit Zytostatika	26
4.2.6	Kolonie-Assay	27
4.2.7	Ernten der Kolonien und RNA-Isolation	27
4.2.8	Reverse Transkription	28
4.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
4.2.10	Gelelektrophorese	30
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
5.1	Wachstumshemmung bei Zellkulturzellen	31
5.1.1	Einfluss der verschiedenen Tyrphostin-, Etoposid- und 5-Flourouracil-Konzentrationen auf bcr-abl-positive und bcr-abl-negative Zelllinien	31
5.1.2	Einfluss von 5-Fluorouracil in Kombination mit dem Tyrphostin AG 879 auf die verschiedenen Zelllinien	34
5.1.3	Einfluss von 5-Fluorouracil und Tyrphostin AG 879 auf die verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	36
5.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Zellkulturzellen	38
5.2	Klonogene Knochenmarkzellen	39
5.2.1	Charakterisierung der Patientengruppe und des Kontrollkollektivs	39
5.2.2	Koloniewachstum in der Kontrollgruppe	40
5.2.2.1	Anzahl der Kolonien in den bcr-abl-negativen Kolonie-Assays	40
5.2.2.2	Verteilung der Koloniegrößen in der Kontrollgruppe	42
5.2.3	Koloniewachstum in der Gruppe der CML-Patienten	43
5.2.3.1	Anzahl der Kolonien in den bcr-abl-positiven Colony-Assays	43
5.2.3.2	Verteilung der Koloniegrößen in der Gruppe der CML-Patienten	45
5.2.4	Koloniezahlen in der Gruppe der CML-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe	46
5.2.5	Verhältnis der bcr-abl-positiven zu den bcr-abl-negativen Kolonien bei den CML-Patienten	48
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>61</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie gehört zur Gruppe der myeloproliferativen Erkrankungen. Sie entsteht aufgrund der klonalen Expansion einer transformierten primitiven hämatopoetischen Stammzelle.

Die Inzidenz der Erkrankung beträgt ein bis zwei von 100 000 Menschen. Das mediane Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist 45 bis 55 Jahre.

Bei der CML kommt es in der ersten Phase der Erkrankung, der chronischen Phase, zu einer Vermehrung der Granulozyten auf über 30 000 pro Mikroliter. Es handelt sich dabei um den Klon einer genetisch veränderten hämatopoetischen Stammzelle. Die Granulozytenzahlen im peripheren Blut können Werte bis zu 500 000, in seltenen Fällen sogar bis zu einer Million pro Mikroliter erreichen. Alle Stufen der Myelopoese sind im peripheren Blut zu sehen. Charakteristischerweise tritt eine Basophilie, selten auch eine Eosinophilie auf.

Bei den meisten Patienten kommt es entweder zu Beginn der Erkrankung oder aber im weiteren Verlauf zu einer stark ausgeprägten Splenomegalie, wobei die Milz bis in das kleine Becken und darüber hinaus in den rechten Unterbauch vergrößert sein kann. Abdominelle Beschwerden aufgrund der ausgeprägten Splenomegalie können das erste Symptom sein. Andere klinische Symptome treten spät auf, zum Beispiel in Form einer Anämie im Rahmen des Hypersplenismus. Zu Beginn der Erkrankung besteht in der Regel neben der Leukozytose auch eine Thrombozytose, teilweise mit funktionsgestörten Thrombozyten, was zu einer Blutungsneigung führen kann. Im weiteren Verlauf ist eine zunehmende Thrombozytopenie als Blutungsursache anzuschuldigen. Da die massenhaft gebildeten Granulozyten und Granulozytenvorstufen voll funktionstüchtig sind, kommt es nicht zu gehäuften Infektionen. Nicht selten erfolgt die Diagnosestellung zufällig.

Unter konventioneller Chemotherapie dauert die chronische Phase im Median 3,5 Jahre. Für den Übergang in die Phase der Akzeleration gibt es eine Reihe von Kriterien, von denen definitionsgemäß mindestens eins zutreffen muss. Es sind dies unter anderem ein weiterer Leukozytenanstieg trotz zytostatischer Therapie sowie ein Abfall der Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen. Der Anteil der Blasten im peripheren Blut steigt auf bis zu 20 Prozent. In diesem Stadium treten unspezifische klinische Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust oder Blu-

tungsneigung auf. Es kann zusätzlich auch zu leukämischen Infiltrationen der Haut oder der inneren Organe, zu einer generalisierten Lymphadenopathie, einem Milzinfarkt oder anderen lokalen Manifestationen kommen.

In den meisten Fällen geht die Akzelerationsphase nach kurzer Zeit über in die terminale Blastenkrise. Diese Phase gleicht morphologisch und klinisch einer akuten Leukämie. Der Anteil der Blasten, die sowohl myeloischen als auch lymphatischen Ursprungs sein können, steigt im Knochenmark auf über 30 Prozent. Die meisten Patienten sprechen in dieser Phase der Erkrankung nicht mehr auf eine zytostatische Therapie an und versterben innerhalb der folgenden zwei bis drei Monate. Manche Patienten, insbesondere mit einer lymphatischen Blastenkrise, können noch einmal in eine zweite chronische Phase überführt werden [45,56]

## **1.2 Die Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms**

Im Jahr 1960 stellten Peter Nowell und David Hungerford aus Philadelphia ihre zytogenetischen Untersuchungen bei sieben Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie vor [102]. Sie hatten bei jedem dieser Patienten ein verkürztes Chromosom 22 gefunden und schlossen daher auf einen Zusammenhang zwischen diesem Chromosom und der Erkrankung. Zu diesem Zeitpunkt wussten sie noch nicht, wie es zur Verkürzung dieses Chromosoms, welches sie das Philadelphia-Chromosom nannten, kommt.

1972 entdeckte Janet D. Rowley mit Hilfe der Quinacrin-Fluoreszenz und verschiedener Giemsa-Färbungen in den Karyogrammen von sieben Philadelphia-Chromosom-positiven CML-Patienten matt fluoreszierendes Material am Ende des langen Arms von Chromosom 9, welches ebenso lang und ebenso gefärbt war, wie das fehlende Material am langen Arm von Chromosom 22 [122]. Sie schloss daraus auf eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22. Da sich diese Veränderung sowohl bei Patienten in der Blastenkrise als auch bei Patienten in der chronischen Phase der Erkrankung fand, wurde gleichzeitig deutlich, dass sie bereits im Anfangsstadium der Erkrankung auftritt und nicht erst Teil der vielen verschiedenen genetischen Veränderungen ist, die in der Blastenkrise nachweisbar sind.

### 1.3 Das abl-Protoonkogen

Das abl-Protoonkogen wurde zuerst im Abelson-Mäuseleukämievirus (A-MuLV) identifiziert, welches Abelson und Rabstein 1970 isolierten. Sie untersuchten die Wirkung des Wildtyp-Mäuseleukämie-Virus M-MuLV (Moloney-Murine-Leukemia-Virus) in Prednisolon-behandelten Mäusen und beobachteten dabei eine Maus, die abweichend von den übrigen Mäusen eine lymphoblastische Leukämie entwickelte. Aus diesen Tumoren gewannen sie zellfreie Extrakte und injizierten sie anderen Mäusen, welche daraufhin ebenfalls an lymphoblastischen Leukämien erkrankten [1].

Scher und Siegler entdeckten 1975, dass Mäuse, die durch das A-MuLV transformierte Zellen besaßen, erst eine lymphoblastische Leukämie entwickelten, wenn sie zusätzlich mit dem Wildtyp-Virus infiziert wurden, da sich das A-MuLV allein nicht replizieren kann. Daraus schlossen sie, dass es sich beim A-MuLV um ein defektes Virus handelt, welches das M-MuLV als Helfervirus benötigt [129].

Witte und Mitarbeiter untersuchten 1978 mit Hilfe der Immunpräzipitation die unterschiedliche Proteinexpression von M-MuLV und A-MuLV. Sie konnten sichtbar machen, dass das A-MuLV ein zusätzliches Protein (p120) exprimiert, aber statt dessen die Expression der Reversen Transkriptase und der Envelope-Proteine fehlte. Bis auf einen kleinen Teil des p120, der einem Fragment der retroviralen gag-Sequenz entsprach, fanden sie für das p120 keine homologen Sequenzen im Wildtyp-Virus. Sie schlossen daraus, dass der ursprüngliche Genort der für das p120 kodierenden DNA-Region an anderer Stelle zu suchen ist. Diese Konstellation fand sich bei mehreren onkogenen Retroviren, die durch die Fusion von gag-Sequenzen mit genetischem Material anderen Ursprungs entstanden [160]. Goff und Mitarbeiter sowie Latt und Mitarbeiter stellten fest, dass die ursprüngliche Größe des v-abl-Genprodukts 160 kD beträgt und dass das p120 eine degradierte Form des p160 darstellt. Auf der Suche nach seinem ursprünglichen Genort fanden sie mit Hilfe eines Antiserums 1979 ein zelluläres Protein, das mit dem A-MuLV kreuzreagierte und ein Molekulargewicht von 150 kD hatte (p150) [54,86]. Die Menge dieses Proteins war in normalen Mäusezellen 40- bis 100-fach geringer als die des P120 in A-MuLV-transformierten Zellen [159].

Im Jahr 1980 konnten sie das c-abl-Gen durch Hybridisierung mit einer v-abl-Probe identifizieren. Mit Hilfe des DNA-Aufschlusses durch Restriktionsenzyme zeigten sie, dass es sich um ein zelluläres Gen handeln muss, da es durch Introns unterbrochen wird [53]. Das entsprechende Protein in menschlichen Zellen hat eine Größe von 145 kD (p145<sup>c-abl</sup>) [83]. Sein Genort ließ sich auf dem Chromosom 9 lokalisieren [64]. Beim p120<sup>v-abl</sup> ließ sich eine Tyro-

sinkinaseaktivität feststellen [132,158], im Gegensatz dazu beim p150<sup>c-abl</sup> nicht, was sich jedoch später als methodisch bedingt herausstellte [84]. Die Tyrosinkinaseaktivität des p120<sup>v-abl</sup> erwies sich aber um einiges höher als die des p150<sup>c-abl</sup>. Mutanten des Virus, die keine Kinaseaktivität besaßen, waren auch nicht imstande, Zellen zu transformieren. Das war ein Hinweis darauf, dass die Tyrosinkinaseaktivität essentiell für das onkogene Potential des Virus ist. [84,120,157].

Neben der Suche nach der Funktion der aktivierten abl-Proteine stellte man sich die Frage nach der Funktion des c-abl-Proteins in normalen Zellen. Man versuchte diese Frage zu beantworten, indem man mutierte Mäuse mit einer homozygoten Deletion im c-abl-Genort züchtete. Diese Mäuse wiesen eine Atrophie des Thymus und der Milz und eine Lymphopenie auf, gediehen schlecht und starben in den meisten Fällen kurz nach der Geburt [131,150].

Man fand heraus, dass die c-abl-Kinase an der Zellzyklusregulation beteiligt ist. Sawyers und Mitarbeiter wiesen nach, dass sich in einer Population normaler Zellen mehr als 90 % der Zellen in der G1-Phase, also in einer Ruhephase befinden. Zellen mit einer Deletion im c-abl-Gen befanden sich im Gegensatz dazu zu 23 % in der S- oder der G2/M-Phase, da sie nicht mehr unter dem Einfluss des c-abl-Proteins standen, das sie in der G1-Phase arretiert. Yuan und Mitarbeiter fanden heraus, dass das c-abl zusammen mit dem Produkt des Antionkogens p53 den Zellzyklus in der G1-Phase stoppt, wenn die Zelle durch ionisierende Strahlung geschädigt wird, so dass Reparaturmechanismen einsetzen können, bevor die Zelle in die S-Phase übertritt [127,163].

## 1.4 Das bcr-abl-Rearrangement

Durch Hybridisierungsversuche von c-abl- und v-abl-Proben mit verschiedenen Hybridzellen, welche entweder die normalen menschlichen Chromosomen 9 und 22, nur ein Chromosom 9q<sup>+</sup> oder ein Chromosom 22q<sup>-</sup> enthielten, zeigten de Klein und Mitarbeiter, dass es sich bei dem Philadelphiachromosom um eine Translokation des c-abl-Gens vom Chromosom 9 auf das Chromosom 22 handelte. Eine Hybridisierung ließ sich sowohl zwischen der abl-Probe und den Hybridzellen mit normalen Chromosomen 9 und 22 als auch zwischen der abl-Probe und dem 22q<sup>-</sup>-enthaltenden Hybridzellen nachweisen, nicht aber bei Zellen, die ein 9q<sup>+</sup>-Gen enthielten, aber kein 22q<sup>-</sup>-Gen [34].

Das abl-Protein, für das dieses Hybridgen kodiert, entdeckten Konopka und Mitarbeiter 1984 mit Hilfe der In-Situ-Hybridisierung in der Zelllinie K 562, die aus der Pleuraflüssigkeit einer Patientin mit Blastenkrise bei chronischer myeloischer Leukämie isoliert worden war. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 210 kD (p210<sup>bcr-abl</sup>) zeigte eine hohe Tyrosinkinaseaktivität. Da es sich sowohl beim p120<sup>v-abl</sup> als auch beim p210<sup>bcr-abl</sup> um Proteine handelt, denen gegenüber dem p145<sup>c-abl</sup> aminoternale Sequenzen fehlen, schlossen sie daraus, dass diese Sequenzen des normalen p145<sup>c-abl</sup> für die Regulation der Tyrosinkinaseaktivität verantwortlich sind. Fehlen diese aminoternalen Sequenzen, wird sie dereguliert und dadurch aktiviert [83]. Ebenso verhält es sich beim Hardy-Zuckerman-Virus (HZ2-FeSV), bei dem es wie beim A-MuLV zu einem Einbau von abl-Sequenzen in ein Retrovirus kommt und ein gag-abl-Fusionsprotein exprimiert wird, dem N-terminale Sequenzen des p145<sup>c-abl</sup> fehlen. Auch dieses Protein zeigt eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität [9]. Aminoternale Sequenzen des p145<sup>c-abl</sup> sind beispielsweise verantwortlich dafür, dass das Protein hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und nur schwach aktiv ist, wohingegen das p120<sup>v-abl</sup> und das p210<sup>bcr-abl</sup>, denen ebendiese aminoternale Sequenzen fehlen, im Zytoplasma lokalisiert sind und hier über ihre hohe Tyrosinkinaseaktivität ihr transformierendes Potential entfalten [127].

Die DNA-Region auf dem Chromosom 22q<sup>-</sup>, die für das aminoternale Ende des p210<sup>bcr-abl</sup> kodiert, konnten 1984 Groffen und Mitarbeiter bestimmen. Mit Hilfe von Restriktionsverdau und Hybridisierungen identifizierten sie die Sequenz am 5'-Ende des abl-Gens als Breakpoint Cluster Region (bcr) und lokalisierten die Bruchpunkte. Sie konnten zeigen, dass sich diese im bcr-Gen in einer umschriebenen Region von 5,8 kB Länge befinden [61].

Canaani und Mitarbeiter untersuchten 1984 die m-RNA, die vom bcr-abl-Hybridgen abgeschrieben wird. Sie stellten fest, dass es sich um eine RNA mit einer Länge von 8 kB handelt [16,49]. Shtivelman und Mitarbeiter stellten zusätzlich fest, dass ca. 5,7 kB dieser RNA der abl-Sequenz entstammen, der Rest der bcr-Sequenz [134].

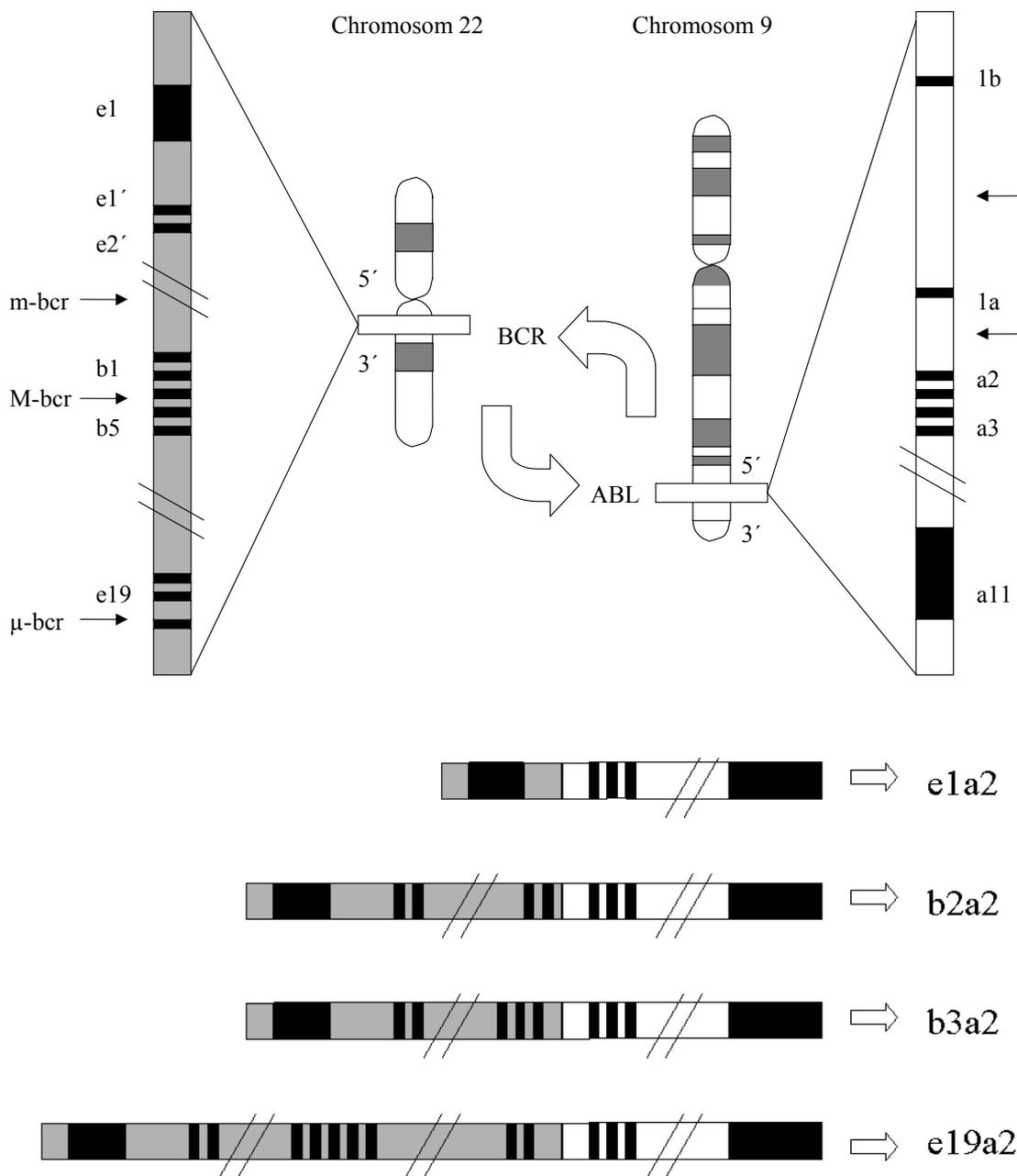


Abb. 1: Das *bcr-abl*-Rearrangement: Bruchpunktregionen (oben) und Messenger-RNAs (modifiziert nach [45]).

Sequenzen vom 3'-Ende des Chromosom 9 werden auf das 3'-Ende des Chromosom 22 transloziert und umgekehrt Sequenzen vom 3'-Ende des Chromosom 22 auf das 3'-Ende des Chromosom 9 (oben).

Die Bruchpunkte liegen an verschiedenen Stellen des *bcr*- und des *abl*-Gens. Daher resultieren vier *m*-RNA-Varianten (unten).

Durch Hybridisierungsversuche mit Antikörpern sowohl gegen die abl-Region als auch gegen die bcr-Region konnten Ben-Neriah und Mitarbeiter noch einmal bestätigen, dass es sich beim p210 um das Genprodukt des bcr-abl-Hybridgens handelt. [8].

Einen anschaulichen Nachweis für die Onkogenität des bcr-abl-Genproduktes erbrachten 1987 McLaughlin und Mitarbeiter. Sie brachten mit Hilfe eines retroviralen Vektors die komplette bcr-abl-Sequenz in Knochenmarkzellen von Mäusen ein. In Langzeitkulturen dieser Zellen dominierten nach wenigen Wochen Zellen, die eine hohe Rate des bcr-abl-Genprodukts p210<sup>bcr-abl</sup> exprimierten. Diese Zellen injizierten sie in syngene Mäuse, um ihr onkogenes Potential in vivo zu untersuchen. Nach einer Latenzzeit von drei bis sechs Wochen bildeten sich bei etwa der Hälfte der Mäuse solide Tumoren an der Injektionsstelle. Aus der Tatsache, dass die andere Hälfte der Mäuse keine Tumoren entwickelte, schlossen sie, dass zusätzlich zum bcr-abl-Rearrangement noch weitere genetische Veränderungen für die Tumorbildung notwendig sind [95].

Mit der gleichen Methode wiesen Daley und Baltimore nach, dass die Expression des p210<sup>bcr-abl</sup> einer Zelle Unabhängigkeit vom Wachstumsfaktor Interleukin-3 verleiht und sie dadurch einem zellulären Regulationsmechanismus entzieht [28].

Da die Translokation t(9;22) reziprok ist, kommt es auch zu einer Translokation von Sequenzen des Chromosom 22 auf das Chromosom 9. Zu diesen Sequenzen gehört das sis-Protoonkogen, das beispielsweise bei menschlichen Sarkomen und Gliomen vermehrt transkribiert wird. Die Vermutung lag nahe, dass auch dieses Protoonkogen an der Genese der CML beteiligt ist. Gale und Canaani konnten jedoch zeigen, dass dieses Gen bei der Translokation t(22;9) nicht aktiviert wird. Sie hybridisierten Material aus Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie mit sis-Proben. Dabei ließ sich keine sis-RNA nachweisen [49].

Das abl-Protoonkogen auf dem Chromosom 9 wird beim Menschen in zwei verschiedene mRNAs transkribiert, eine 6 kB- und eine 7 kB-mRNA. Die Tatsache, dass verschiedene mRNAs gebildet werden, erklärt man mit alternativem „Splicen“. Beim Splicen werden aus der primären RNA, die 1 : 1 von der DNA abgeschrieben wird, die Introns herausgeschnitten, und die Exons aneinandergesetzt. Dabei gibt es zum einen die Möglichkeit, dass das abl-Exon Ib an das Exon II bindet und dabei das Exon Ia übersprungen wird. Es resultiert eine 7 kB-mRNA. Zum zweiten besteht die Möglichkeit, dass das Exon Ia an das Exon II gefügt wird und eine 6 kB-mRNA entsteht. Das abl-Exon II wird aus diesem Grund als promiskuitiv bezeichnet, denn es kann beim Splicen an verschiedene Exons binden, die zum Teil sehr weit entfernt liegen. Dies ist auch der Fall bei der bcr-abl-Translokation. Beim „Splicen“ wird hier

das abl-Exon Ib und Ia sowie teilweise das bcr-Exon III übersprungen, so dass das abl-Exon II an das bcr-Exon II oder III bindet [135]. Verschiedene c-abl-mRNAs bei der Maus unterscheiden sich ebenfalls in ihrem 5'-Ende. Auch hierbei kommt es zur Bindung des abl-Exon II an verschiedene 5'-Exone [7].

Der Bruchpunkt auf dem Chromosom 22 liegt in einem eng umschriebenen Bereich von 5,8 kB im bcr-Lokus (Major breakpoint cluster region, M-bcr) zwischen den bcr-Exons II und III oder III und IV. Dagegen kann der Bruchpunkt im abl-Gen in einer viel längeren Sequenz lokalisiert sein, und zwar in dem Intron zwischen dem abl-Exon Ib und dem abl-Exon Ia, welches eine Länge von mindestens 175 kB hat. Dieses lange Intron macht das abl-Gen besonders empfindlich für Chromosomenbrüche, bei denen die Exons intakt bleiben, so dass das Gen zwar verändert wird, aber funktionstüchtig bleibt. Dies wäre bei einem Chromosomenbruch innerhalb eines Exons nicht der Fall. Auf der Ebene der primären RNA resultiert dann ein Rearrangement zwischen dem bcr-Exon II oder III und dem abl-Exon Ia. Durch das alternative Splicen wird zusätzlich zu den Introns das abl-Exon Ia und teilweise auch das bcr-Exon III herausgeschnitten. Man erhält eine sogenannte b2a2- bzw. b3a2-mRNA [10] (Abb. 1).

Dem Philadelphia-Chromosom, welches in einigen Fällen bei der akuten lymphatischen Leukämie und bei der akuten myeloischen Leukämie gefunden wird, liegt ebenfalls eine bcr-abl-Translokation zugrunde. Der Bruchpunkt im bcr-Gen liegt hier allerdings nicht in der M-bcr-Region, sondern weiter 5' gelegen in einer Region, die minor breakpoint cluster region (m-bcr) genannt wird. Nach dem „Splicen“ resultiert eine e1a2 m-RNA [66] (Abb. 1). Auf Proteinebene resultiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 185 kD ( $p180^{bcr-abl}$ ).

Noch eine dritte Bruchpunktregion konnte auf dem bcr-Gen identifiziert werden. Sie befindet sich in 3'-Richtung von der M-bcr-Region gelegen, umfasst die bcr-Exone 17 bis 20 und wird micro breakpoint cluster region ( $\mu$ -bcr) genannt. Nach dem „Splicen“ resultiert eine e19a2 m-RNA und nach der Translation ein Protein mit einem Molekulargewicht von 230 kD ( $p230^{bcr-abl}$ ). Man findet diese Translokation bei Patienten mit einer klinisch blanderen Form der chronischen myeloischen Leukämie, gekennzeichnet durch niedrigere Leukozytenzahlen im peripheren Blut, schwächer ausgeprägte Anämie und Splenomegalie und deutlich späterem Übertritt in die Blastenkrise. Diese Erkrankung stellt eventuell eine eigene Entität dar und wird als chronische Neutrophilenleukämie bezeichnet [107].

Um die Molekularbiologie der bcr-abl-Translokation besser untersuchen zu können, versuchten verschiedene Gruppen, ein Tiermodell zu schaffen. Hariharan und Mitarbeiter injizierten ein bcr-v-abl-Hybridgen in die Zellkerne von Mäuseeiern und erhielten transgene Mäuse, die

B- oder T-Zell-Lymphome entwickelten, aber keine myeloischen Tumoren [63]. Heisterkamp und Mitarbeiter schufen transgene Mäuse mit dem bcr-abl-Hybridgen. Sie untersuchten zehn dieser Mäuse. Acht von ihnen starben in einem Zeitraum von 10 bis 58 Tagen nach der Geburt, wobei zwei Mäuse eine der Blastenkrise ähnliche myeloische Leukämie entwickelten, die übrigen sechs eine akute lymphatische Leukämie. Zwei Mäuse überlebten den Untersuchungszeitraum [65].

Verschiedene Arbeitsgruppen konstruierten ebenfalls Tiermodelle, indem sie Mäuse mit einer letalen Dosis bestrahlten und ihnen anschließend Knochenmark transplantierten, das Zellen enthielt, die mit einem für das bcr-abl-Gen kodierenden Retrovirus infiziert waren [29,41].

## **1.5 Die Molekularbiologie der chronischen myeloischen Leukämie**

Prywes und Mitarbeiter und Reddy und Mitarbeiter suchten 1983 mit Hilfe verschiedener Mutanten von abl-Proteinen die Stelle des abl-Gens, die für die transformierende Aktivität verantwortlich ist. Sie fanden eine nahe dem 5'-Ende gelegene Region, die ebenso für die transformierende Aktivität wie auch für die Tyrosinkinaseaktivität notwendig ist. Sie fanden auch, dass diese Region deutliche Homologien zu den viralen Onkogenen v-src, v-yes, v-fps und v-fes aufwies [113,119]. Die homologie-enhaltende Region erstreckt sich auf der Ebene der Proteine über eine Sequenz von etwa 260 Aminosäuren und wird als Tyrosinkinasedomäne oder als katalytische Domäne bezeichnet (SH-1-Region = src homologous region 1). Auch die gag-Sequenz schien essentiell für die transformierende Aktivität zu sein, wofür aber vielleicht auch die Lipid-Bindung an der gag-Sequenz (Myristilation) verantwortlich sein konnte, welche die Anheftung des Proteins an die Zellmembran ermöglicht [113]. Die N-terminale Bindung an eine Myristyl-Gruppe findet sich auch bei den Genprodukten des v-src und v-fes [70].

Die Tatsache, dass die für die transformierende Aktivität und die Tyrosinkinaseaktivität verantwortliche DNA-Region in verschiedenen retroviralen Onkogenen sehr ähnlich ist, lässt vermuten, dass es sich um verschiedene Formen einer Familie von Tyrosinkinasen handelt. Sie wurde während der Entwicklung der Vertebraten hoch konserviert, woraus man schließen kann, dass sie eine unentbehrliche biologische Funktion erfüllt [60].

Wang und Baltimore konnten die Tyrosinkinasedomäne der abl-Proteine näher charakterisieren. Sie brachten verschiedene Plasmide, die unterschiedliche Regionen des v-abl-Gens ent-

hielten, in E-coli ein und untersuchten die Tyrosinphosphorylierung bakterieller Proteine durch diese Plasmide. Dabei stellten sie fest, dass sich die Genregion, die für die Tyrosinkinasedomäne kodiert, innerhalb der ersten 1,2 kB des v-abl-Gens befindet. Dies ist gleichzeitig die Region, die für die transformierende Aktivität des v-abl verantwortlich ist. Außerdem zeigte sich, dass diese Region die homologen Stellen zu anderen viralen Onkogenen (v-src, v-yes, v-fps, v-fes, v-ras, v-raf, v-erbB, v-fms) enthält. Weitere Merkmale der v-abl-Tyrosinkinase sind, dass sie löslich und damit nicht membrangebunden ist und dass sie nicht ungezielt alle Proteine phosphoryliert, also eine gewisse Spezifität zeigt [155].

Die Tyrosinkinasedomäne ist jedoch kein spezifisches Merkmal aktivierter abl-Proteine, sondern findet sich genauso auch im normalen c-abl-Protein p145<sup>c-abl</sup>. Daher suchte man nach den N-terminalen Domänen im normalen p145<sup>c-abl</sup>, die bei den aktivierten abl-Proteinen durch andere Sequenzen ersetzt sind und von denen vermutet wurde, dass sie die Tyrosinkinasedomäne regulieren.

Jackson und Baltimore untersuchten 1989 verschiedene Mutanten des c-abl-Gens mit unterschiedlichem N-terminalen Ende bezüglich ihrer Fähigkeit zur Transformation von Zellen. Dabei stellten sie fest, dass für die transformierende Aktivität des v-abl nicht allein die gag-Sequenz verantwortlich ist, wie Prywes und Mitarbeiter [113,114] angenommen hatten, sondern auch die Tatsache, dass N-terminale Sequenzen des abl-Gens fehlen [48,73]. Sie fanden eine Deletion im c-abl-Gen, die zur transformierenden Aktivität führt, in einer Region in einiger Entfernung in 5'-Richtung von der für die Kinase-Domäne kodierenden Sequenz im Bereich von abl-Exon 2 und 3. In dieser Region ähnelt die Struktur des c-abl-Proteins der N-terminalen Sequenz des c-src-Proteins und wird deshalb SH-3-Region (src homologous region 3) genannt. Dass die Deletion an dieser Stelle zur Aktivierung der Tyrosinkinase führt, ist ein Hinweis dafür, dass die SH-3-Domäne an der Regulation der Kinase-Aktivität beteiligt ist. Im Gegensatz zum p120<sup>v-abl</sup> im A-MuLV bleibt die SH-3-Domäne im v-abl-Protein des HZ2-FeSV erhalten. Trotzdem ist hier die Tyrosinkinaseaktivität stark erhöht. Es muss also neben der SH-3-Domäne noch weitere regulierende Regionen geben. Da sich das HZ2-FeSV vom A-MuLV zusätzlich darin unterscheidet, dass ihm C-terminale Sequenzen fehlen, scheinen auch diese für die Regulation der Tyrosinkinasedomäne bedeutsam zu sein [96]. McWhirter und Wang vermuteten, dass bcr-Sequenzen mit der SH-3-Domäne oder der C-terminalen Domäne interagieren, und dadurch deren gemeinsamen hemmenden Effekt auf die Tyrosinkinasedomäne stören.

Auch beim bcr-abl-Rearrangement bleibt die SH-3-Domäne erhalten. Hierbei ist zusätzlich die translozierte bcr-Sequenz verantwortlich für die Aktivierung der Tyrosinkinase. Dies ist

deutlich erkennbar am unterschiedlichen onkogenen Potential des p210<sup>bcr-abl</sup> (bei der CML) und des p185<sup>bcr-abl</sup> (bei einem Teil der Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie) [21,23,46,66]. So fanden Lugo und Mitarbeiter 1990 beim p185<sup>bcr-abl</sup>, das sich vom p210<sup>bcr-abl</sup> nur durch das Fehlen von 501 von der bcr-Sequenz stammenden Aminosäuren unterscheidet, aber die gleiche abl-Sequenz besitzt, eine deutlich höhere Tyrosinkinaseaktivität als beim p210<sup>bcr-abl</sup> [89]. Auch die Klinik der beiden Erkrankungen unterscheidet sich in der chronischen bzw. der akuten Verlaufsform der Leukämie, was ebenfalls für ein stärkeres onkogenes Potential des p185<sup>bcr-abl</sup> spricht.

Einflüsse einzelner bcr-Sequenzen auf die Tyrosinkinaseaktivität des veränderten abl-Genproduktes konnten verschiedene Gruppen nachweisen, indem sie eine Reihe verschiedener bcr-abl-Genprodukte untersuchten, bei denen unterschiedliche bcr-Anteile fehlen [96,101,109]. Muller und Mitarbeiter konnten dabei beispielsweise zeigen, dass ein verändertes p185<sup>bcr-abl</sup>, das nur die ersten zwei von der bcr-Sequenz abgeleiteten Aminosäuren besitzt, nicht zur Transformation von Zellen fähig ist. Das beweist noch einmal, dass für die transformierende Aktivität des Proteins bcr-Sequenzen notwendig sind. Pendergast und Mitarbeiter stellten fest, dass Bereiche des bcr-Proteins an die abl-SH-2-Domäne binden und dadurch die Tyrosinkinase aktivieren [109]. Dies ist eine weitere Domäne im c-abl-Protein, die unmittelbar N-terminal der SH-1-Domäne liegt und die an der Regulation der Tyrosinkinase beteiligt ist. Man findet sie in allen aktivierten abl-Proteinen und auch in anderen Tyrosinkinasen wie v-src und v-fps [121]. McWirther und Wang fanden außerdem, dass bcr-Sequenzen die Bindung des p210<sup>bcr-abl</sup> an Actinfilamente im Zytoplasma vermitteln, was wichtig für die Phosphorylierung bestimmter zellulärer Substrate sein könnte [96].

Insgesamt handelt es sich um ein komplexes Gefüge von Interaktionen zwischen Proteinanteilen aus der bcr- und der abl-Sequenz. Sie verändern alle zusammen die normalen Regulationsmechanismen der abl-Tyrosinkinase und führen dadurch zu ihrer Aktivierung und zur Transformation.

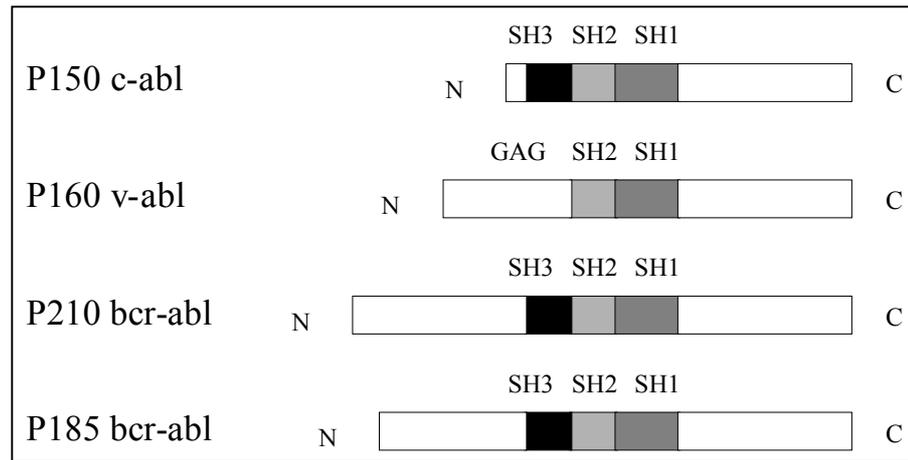


Abb. 2: Die verschiedenen *abl*-Proteine mit ihren SH-Domänen (modifiziert nach [73])

Die auffälligsten Merkmale der chronischen myeloischen Leukämie sind die manchmal extrem hohe Leukozytenzahl und das Vorhandensein sämtlicher myeloepoetischer Vorläuferzellen im peripheren Blut. Ursache für die massive Proliferation der myeloischen Zellen ist zum einen die vermehrte Proliferation und zum zweiten die Hemmung des natürlichen Zelltods, der Apoptose [94]. Die Ausschwemmung von Knochenmarkzellen aller Stufen der Granulopoese ins periphere Blut ist unter anderem Folge einer defekten Adhäsion myeloepoetischer Zellen an das Knochenmarkstroma. Hierdurch geht der wachstumsregulierende Einfluss der Stromazellen des Knochenmarks verloren [57]. Auf welchen Wegen diese Wirkungen ausgehend von der erhöhten Tyrosinkinaseaktivität der *bcr-abl*-positiven Zellen ausgelöst werden, wird intensiv untersucht. Hierbei hat man eine große Zahl zellulärer Proteine identifiziert, die an der Signaltransduktion durch die *bcr-abl*-Tyrosinkinase beteiligt sind und ebenso wie das  $p210^{\text{bcr-abl}}$  SH-2- und SH-3-Domänen enthalten. Dabei könnte der Effekt der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine darin bestehen, die Affinität zu regulieren, mit der sie untereinander interagieren [80].

Der am besten untersuchte Signaltransduktionsweg ist der des *ras*-Onkoproteins [128]. Die Verbindung zwischen dem  $p210^{\text{bcr-abl}}$  und dem *ras*-Signaltransduktionsweg kann über verschiedene Wege hergestellt werden. Zum einen dient das Grb-2-Protein (growth factor receptor bound protein 2) als Adaptor-Molekül und bindet zusammen mit dem SHC-Protein mittels seiner SH-2-Domäne an das autophosphorylierte  $p210^{\text{bcr-abl}}$  und mittels seinen beiden SH-3-Domänen an den *ras*-Aktivator *sos* (son of sevenless). Dieses Protein bewirkt wiederum die Phosphorylierung des  $p21^{\text{ras}}$ -gebundenen GDP zu GTP und aktiviert dadurch den *ras*-Signaltransduktionsweg [52,87,110,115,144]. Gleichzeitig hemmt das  $p210^{\text{bcr-abl}}$  das zelluläre

Protein p120GAP, welches das P21<sup>ras</sup> inaktiviert [138]. Zum anderen kann auch das CRKL-Protein an sos binden und so als Adaptor für die Aktivierung des ras-Onkogen-Produktes fungieren [147]. Das aktivierte p21<sup>ras</sup> aktiviert über die Serin/Treonin-Kinase p74<sup>raf</sup> die MAP-Kinase-2 (mitogen activated-protein) [99], und diese aktiviert die Protoonkogene c-fos und c-jun [92,117].

Eine weitere bedeutende Rolle in der Signaltransduktion des p210<sup>bcr-abl</sup> spielt die Phosphatidylinositol-3 Kinase. Sie bildet einen reversiblen Komplex mit der SH-2-Domäne des p210<sup>bcr-abl</sup> [153]. Dadurch wird die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert, welches sowohl die Expression des Onkogens c-myc als auch die des Protoonkogens bcl-2 erhöht [137]. Eine Untereinheit des Wachstumsfaktorrezeptors für Interleukin 3 wird ebenfalls durch die p210<sup>bcr-abl</sup>-Tyrosinkinase phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Zelle wird dadurch unabhängig vom Wachstumsfaktor, und eine unkontrollierte Zellproliferation kann einsetzen [156]. STAT-Moleküle (signal transducer and activator of transcription) werden normalerweise durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptor aktiviert. In bcr-abl-positiven Zellen erfolgt ihre Aktivierung unabhängig von Wachstumsfaktoren. Die aktivierten STAT-Moleküle binden an spezifische DNA-Sequenzen und beeinflussen dadurch deren Transkription [71].

Auch das GAP-assoziierte p62<sup>dok</sup> wird in bcr-abl-positiven Zellen an Tyrosin phosphoryliert und scheint für die Signaltransduktion des bcr-abl von Bedeutung zu sein [19,42,47,80,100].

Cortez und Mitarbeiter zeigten 1995, dass ein einzelner Signaltransduktionsweg allein nicht für die onkogene Umwandlung von Zellen ausreicht, sondern dass dafür das Zusammentreffen mehrerer unabhängiger Transduktionswege notwendig ist [26]. Ein möglicher Grund dafür ist die Tatsache, dass unterschiedliche Zelltypen (hämatopoetische Zellen und Fibroblasten) auf unterschiedliche Signale reagieren. Sehr wahrscheinlich kommt es auch zu Verknüpfungen und Querverbindungen zwischen den einzelnen Signaltransduktionswegen. Weitere zelluläre Stoffe, die an der Signaltransduktion durch die Tyrosinkinase beteiligt sind, sind die Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin D1, D2 und D3 [2,31], das myc-Onkogen [90,126], das bcl-2-Genprodukt, welches möglicherweise die Apoptose-Induktion durch das myc-Genprodukt hemmt und welches im Signaltransduktionsweg dem ras-Produkt nachgeschaltet ist [124,125], die Phosphatase Syp, die über ihre SH-2-Domäne eine Komplexbindung mit dem p210<sup>bcr-abl</sup> und dem Grb-2 eingeht [144], die „focal adhesion kinase“ p125<sup>FAK</sup> [58] und die Genprodukte von Integrin  $\alpha_6$ , CSCP und MPPI, die für die Adhäsion der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark verantwortlich sind [31].

Philadelphia-positive Zellen entfalten, wie oben beschrieben, ausgehend von der bcr-abl-Translokation über verschiedene Signaltransduktionswege ihr onkogenes Potential bereits in der chronischen Phase der Erkrankung. Bei Patienten, die sich in der Phase der Blastenkrise befinden, findet man zusätzlich zur bcr-abl-Translokation eine große Anzahl weiterer genetischer Aberrationen wie die Monosomie 7 und 17, Trisomie 8, 17, 19, 21, die Translokation t(3;21)(q26;q22), das Isochromosom i(17q) oder ein zusätzliches Philadelphia-Chromosom. Hiervon sind Aberrationen in weiteren Onkogenen und Antionkogenen betroffen - beispielsweise im Antionkogen p53 - welche zur weiteren Entdifferenzierung und ungehemmten Proliferation der malignen Zellen und schließlich zum Tod des Patienten führen [45,68].

Da die erhöhte Tyrosinkinaseaktivität das entscheidende Merkmal ist, welches das bcr-abl-Onkogen-Produkt p210<sup>bcr-abl</sup> von dem normalen c-abl-Genprodukt p145<sup>c-abl</sup> unterscheidet, und da sie am Beginn der verschiedenen Signaltransduktionswege steht, ist man bestrebt, für die Therapie der chronischen myeloischen Leukämie Hemmstoffe für diese Tyrosinkinase zu finden.

## 1.6 Tyrosinkinaseinhibitoren

Tyrosinphosphokinaseinhibitoren sind Substanzen, die mit ATP um die Bindungsstelle an Tyrosinkinasen konkurrieren. Bindet ATP an die Tyrosinkinase, kann es durch Abgabe einer Phosphatgruppe Tyrosinreste an zellulären Substraten, die Teil eines Signaltransduktionsweges der Tyrosinkinase sind, phosphorylieren. Dadurch werden diese zellulären Substrate aktiviert und die oben beschriebenen Signaltransduktionswege angestoßen. Ist die ATP-Bindungsstelle durch ein anderes Molekül – ein Tyrphostin – blockiert, verhindert dies die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege, und die Zelle wird in einen nicht-transformierten Status zurückgeführt oder unterliegt dem programmierten Zelltod [55].

Die ersten Tyrosinphosphokinaseinhibitoren wurden in Bakterien gefunden. Herbimycin A beispielsweise wird aus dem Filtrat des Fadenbakteriums *Streptomyces* gewonnen. Uehara und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es Ratten-Nieren-Zellen, die mit dem Rous-Sarcoma-Virus infiziert und dadurch transformiert sind, in eine normale Morphologie zurückführen kann. Als Grund dafür nahmen sie eine verminderte Tyrosinphosphorylierung in den Herbimycin-behandelten Zellen an [151].

Honma und Mitarbeiter behandelten Zellen der Linie K562 mit Herbimycin A und zeigten, dass es hierbei zu einer erheblichen Reduktion der Tyrosinautophosphorylierung der Tyrosinkinase p210<sup>bcr-abl</sup> und dadurch zu einer Wachstumshemmung kommt. Der Effekt ließ sich durch Kombination mit den Zytostatika Adriamycin und 1-β-D-Arabinofuranosylcytosin noch weiter steigern [68].

Auch der Tyrosinphosphokinaseinhibitor Erbstatin wird aus einem Fadenbakterium (*Actinomyces*) gewonnen [152]. Durch chemische Modifikation dieser Substanz erhielt die Arbeitsgruppe von Levitzki Tyrosinphosphokinaseinhibitoren mit einer besonders starken Affinität zur EGF-Rezeptortyrosinkinase. Sie synthetisierten auch gegen die Insulin-Rezeptortyrosinkinase, gegen die ERB2/neu-Kinase und gegen viele andere Tyrosinkinasen spezifische Inhibitoren und schlugen die Bezeichnung „Tyrphostine“ vor [50,133,161].

Außerdem wiesen sie nach, dass die verschiedenen Tyrphostine auch unterschiedliche Affinitäten zum p210<sup>bcr-abl</sup> haben [3]. Zum Beispiel besitzt Herbimycin A eine gewisse Spezifität für die p210<sup>bcr-abl</sup> Tyrosinkinase, wohingegen Genistein oder Staurosporin keinen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum bcr-abl-positiver Zellen aufweisen [105]. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Hemmwirkung des Herbimycins durch eine irreversible Degradierung des p210<sup>bcr-abl</sup> zustande kommt. Im Gegensatz dazu hemmen die Tyrphostine AG 1112 und AG 568 ausschließlich die Tyrosinphosphorylierung der Tyrosinkinase selbst oder der zellulären Substrate, lassen das Protein selbst aber intakt [4]. Die Arbeitsgruppe von Gazit und Levitzki stellte seit 1988 hunderte von unterschiedlichen Tyrphostinen her und untersuchte ihre Spezifität gegenüber verschiedenen Tyrosinkinasen, insbesondere auch gegenüber dem p210<sup>bcr-abl</sup>. Dabei erwiesen sich die Tyrphostine AG 1112, AG 957 und AG 568 als besonders wirksam [4]. Untersuchungen der Arbeitsgruppe von A. Kabisch ergaben, dass auch das AG 879 eine hohe Spezifität für das p210<sup>bcr-abl</sup> aufweist [75].

Mit Hilfe von Tyrphostinen ist es möglich, Knochenmarkzellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie aufzureinigen (Purging). Im Knochenmark dieser Patienten befinden sich neben den transformierten Zellen, die die bcr-abl-Translokation enthalten, auch nicht-transformierte Vorläuferzellen mit normalem Genotyp. Mit dem Einsatz von Colony-Assays konnte gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit dem Tyrphostin Genistein bcr-abl-positiv Vorläuferzellen stärker gehemmt werden, so dass die bcr-abl-negativen Vorläuferzellen einen Wachstumsvorteil erlangen, was sich in einem erhöhten Anteil an bcr-abl-negativen Kolonien im Colony-Assay bemerkbar macht [18].

Eine sehr gute Wirkung gegenüber bcr-abl-positiven Zellen hatte das Tyrphostin CGP 57148. Bei Versuchen mit den Knochenmarkzellen von CML-Patienten zeigte sich eine auf 20 %

verringerte Bildung bcr-abl-positiver Kolonien im Colony-Assay. Im Gegensatz dazu wurde in der Kontrollgruppe das Koloniewachstum nicht gehemmt [20,38]. Ergebnisse einer zweiten Arbeitsgruppe zeigten einen etwas schwächeren Effekt des Tyrphostins auf das Wachstum bcr-abl-positiver Kolonien und eine leichte Hemmwirkung auch auf das Koloniewachstum bcr-abl-negativer Zellen, insgesamt konnte jedoch die Wirkung des CGP 57148 bestätigt werden [24]. In Tierversuchen hat es sich als nicht toxisch erwiesen [14,30,38]. Mit dieser Substanz unter dem Namen STI 571 oder Imatinib (Gleevec, Glivec) wurden ab 1998 die ersten klinischen Phase-I-Studien an interferonrefraktären Patienten in der chronischen Phase der CML und bei Patienten mit bcr-abl-positiver akuter lymphatischer Leukämie sowie in der Blastenkrise der CML durchgeführt. Druker und Mitarbeiter konnten bei einem beträchtlichen Teil der Patienten hämatologische Remissionen erzielen, viele Patienten in der chronischen Phase der CML erreichten sogar eine komplette zytogenetische Remission. Unerwünschte Wirkungen waren in dem noch kurzen Beobachtungszeitraum gering [38,39,55,97]. Rasch wurden Phase-II- und Phase-III-Studien angeschlossen, in die auch Patienten mit neu diagnostizierter Erkrankung ohne Vorbehandlung eingeschlossen wurden. Hierbei zeigte sich zum einen die Überlegenheit von STI 571 gegenüber der Kombinationstherapie mit Interferon  $\alpha$  und Cytarabin, zum anderen wurden bei vielen Patienten jedoch frühe Rezidive nach einer initialen Remission und bei einigen Patienten auch primäre Resistenzen gegenüber STI 571 beobachtet [35,36]. Man geht davon aus, dass die sekundären Resistenzen durch Selektion von bcr-abl-positiven Zellen zustande kommen, bei denen das bcr-abl-Gen amplifiziert ist, überexprimiert wird oder Punktmutationen aufweist, oder die aufgrund des Multidrug-Resistance-P-Glykoprotein Pgp das Tyrphostin nicht aufnehmen [91,154]. Um der Resistenzenentwicklung entgegenzuwirken wurden bereits erste klinische Studien durchgeführt, in denen STI 571 mit konventionellen Zytostatika, beispielsweise Cytarabin, Daunorubicin, Mitoxantron und Etoposid, oder auch mit Interferon- $\alpha$  kombiniert wurde [17,37]. Kombinationen mit neueren Substanzen wie zum Beispiel den Farnesyltransferaseinhibitoren oder Antisense-Oligonukleotiden, oder auch eine Therapiepause sind denkbar [154,37].

Die Entwicklung der Tyrphostine ist auf der einen Seite eine wichtige Hilfe zur weiteren Charakterisierung der Signaltransduktion durch Tyrosinkinase. Auf der anderen Seite stellen sie einen vielversprechenden generelleren Ansatz zur Therapie von Erkrankungen dar, die durch die Aktivierung von Tyrosinkinase ausgelöst werden, wie es bei der chronischen myeloischen Leukämie der Fall ist.

## 2. Aufgabenstellung

Die chronische myeloische Leukämie ist ein sehr gutes Beispiel für eine klonale maligne Erkrankung, der ursächlich eine genetische Aberration, in diesem Falle die bcr-abl-Translokation, zugrunde liegt. Die hierdurch ausgelöste Aktivierung des abl-Gens mit der Folge der gesteigerten Tyrosinkinaseaktivität löst zum einen die maligne Transformation der Zelle aus, stellt aber zum anderen auch einen spezifischen Angriffspunkt für eine zytostatische Therapie dar. Die in den achtziger Jahren entwickelten Tyrphostine greifen direkt in die Tyrosinkinasewirkung ein und hemmen sie spezifisch.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die zusätzliche Gabe eines konventionellen Zytostatikums zum Tyrphostin bei der in-vitro-Behandlung von Knochenmarkzellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie einen Behandlungsvorteil erbringt, welcher sich in einer verminderten Bildung bcr-abl-positiver Kolonien im Colony-Assay nach der zytostatischen Behandlung zeigen sollte. Die Wirksamkeit des hierzu verwendeten 5-Fluorouracil gegenüber bcr-abl-positiven Knochenmarkzellen ist in der Literatur beschrieben [74].

## 3. Material

### 3.1 Chemikalien

Ameisensäure	FLUKA, Neu-Ulm
Aqua dest.	PHARMACIA UND UPJOHN GMBH, Erlangen
Bromphenol	SIGMA, Deisenhofen
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	SIGMA, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA, Deisenhofen
EDTA (Tetripex)	MERCK, Darmstadt
Eisessig	MERCK, Darmstadt
Ethanol absolut	BAKER, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe
Ficoll-Paque <sup>R</sup>	PHARMACIA BIOTECH, Schweden
Fluorouracil	RHÔNE-POULENC PHARMA GMBH, Köln
Glutamin	GIBCO BRL, Eggenstein
Glycerol	SIGMA, Deisenhofen
IGEPAL CA 630	SIGMA, Deisenhofen
Isopropanol	RIEDEL-DE-HAEN, Seelze
MTT	SIGMA, Deisenhofen
Natriumchlorid 5 M	SIGMA, Deisenhofen
PBS (Phosphate buffered saline) ohne Calcium und Magnesium	GIBCO BRL, Eggenstein
Penicillin / Streptomycin	GIBCO BRL, Eggenstein
SDS	ROTH, Karlsruhe
Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	ROTH, Karlsruhe
Tyrphostin AG 879	CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM CORPORATION, La Jolla CA

### 3.2 Medien und Seren

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	GIBCO BRL, Eggenstein
FCS (Fetal Calf Serum)	GIBCO BRL, Eggenstein
Metho Cult™ H 4433	CELL SYSTEMS, Remagen
0,9%	Methylcellulose in Isocove's MDM
30 %	Fetale Bovine Serum
1%	Bovine Serum Albumin
10 <sup>-4</sup> M	2-Mercaptoethanol
2 mM	L-Glutamin
5%	Serum-containing PHA-LCM
3 Units/ml	rh Erythropoietin
RPMI	GIBCO BRL, Eggenstein

### 3.3 Geräte

Autoklav	TECNOMARA DEUTSCHLAND GMBH, Fernwald
Brutschrank Heraeus BB 16	HERAEUS, Hanau
DNA-Werkbank	UNI EQUIP, Martinsried
Elektrophoresekammer	VON KEUTZ, Reiskirchen
Filme: Polaroid 667, 3 ¼ x 4 ¼	POLAROID, St. Albans, UK
Fotoapparat: Polaroid CU 5	POLAROID, St. Albans, UK
Mikroskope:	
Ortholux	LEITZ, Wetzlar
Labovert	LEITZ, Wetzlar
Netzgeräte:	
	VON KEUTZ, Reiskirchen
	BIOMETRA, Göttingen

## PCR-Maschinen:

DNA-Inkubator

BIOZYM, Hameln

DNA Thermal Cycler

PERKIN ELMER

Robocycler 40

STRATAGENE GMBH, Heidelberg

Photometer für Mikrotiterplatten: UV max<sup>TM</sup>  
kinetic microplate reader

Software für UV max<sup>TM</sup> : SoftmaxMOLECULAR DEVICES CORPO-  
RATION, Menlo Park, CA

Sterilbank Lamin Air HB 2448

HERAEUS, Hanau

UV-Licht-Tisch Transilluminator

MAGV-GMBH, Rabenau-Londorf

Zellcounter Max M

COULTER, Krefeld

## Zentrifugen:

Rotixa/KS

HETTICH, Tuttlingen

5415 C

EPPENDORF, Hamburg

**3.4 Sonstige Hilfsmittel**

Bakterienröhrchen

BECTON DICKINSON, Heidelberg

Combitips für Multipipetten

EPPENDORF, Hamburg

Gewebekulturschalen

GREINER, Frickenhausen

FalconR3003, 100 x 20mm

BECTON DICKINSON, Heidelberg

Petrischalen 35 x 10mm

GREINER, Frickenhausen

Glaswaren

KALENSEE, Gießen

Kanülen (0,9 x 40 mm)

BECTON DICKINSON, Heidelberg

Mikrotest III<sup>TM</sup> Gewebekulturplatten

BECTON DICKINSON, Heidelberg

FalconR 3872, 96-Well

Flat Bottom

Multipipette

EPPENDORF, Hamburg

Multiwell<sup>TM</sup> Gewebekulturplatten

BECTON DICKINSON, Heidelberg

FalconR 3847 Primaria, 24-Well,

Flat Bottom

Pasteurpipetten (3 ml)

ROTH, Karlsruhe

**Pipetten**

1000 µl, 100 µl , 20 µl	EPPENDORF, Hamburg
Mikropipetten P20, P100, P200, P1000	ABIMED, Langenfeld
Bio M 10	ABIMED, Langenfeld

**Pipettenspitzen:**

Comfortips <sup>R</sup> gelb und blau	EPPENDORF, Hamburg
CP 10 Tipack	GILSON, Villiers-le-Bel, Frankreich
GELoader Tips	EPPENDORF, Hamburg
Gestopfte Spitzen	ROTH, Karlsruhe

**Reaktionsgefäße:**

0,5 ml	ROTH, Karlsruhe
2,0 ml - Safe Lock	EPPENDORF, Hamburg
Thin Walled Tube	STRATAGENE GMBH, Heidelberg
Thin Walled Tube	PERKIN ELMER, Weiterstadt

**Spritzen (2 ml, 10 ml)**

BRAUN, Melsungen

**Stabpipetten (2, 10, 25 ml)**

BECTON DICKINSON, Heidelberg

**Zellkulturflaschen: Falcon<sup>R</sup>**

BECTON DICKINSON, Heidelberg

**Zentrifugenröhrchen Blue Max<sup>TM</sup>**

BECTON DICKINSON, Heidelberg

**3.5 Zelllinien**

**BV-173:** Diese Zelllinie wurde im Jahr 1980 aus dem peripheren Blut eines 45jährigen Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie in der lymphatischen Blastenkrise gewonnen. Es liegt eine b2a2-Translokation vor. (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Abteilung Menschliche und Tierische Zellkulturen, Braunschweig, DSM No: DSM, ACC 20) [108]

**HL-60:** Diese Zelllinie wurde im Jahr 1977 aus der Leukapherese einer 36jährigen Frau mit akuter Promyelozytenleukämie gewonnen. Sie enthält keine BCR-ABL-Translokation. (ATCC)

K562: Diese Zelllinie wurde im Jahr 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie im Stadium der Blastenkrise gewonnen. Es liegt eine bcr-abl-Translokation vom Typ b3a2 vor.  
(ATCC) [88]

### 3.6 Reagentien für RT-PCR

Agarose:

Ultra-Pur-Agarose (electrophoresis grade)	GIBCO BRL, Eggenstein
NuSieve <sup>R</sup> 3:1 Agarose	FMV BIO PRODUCTS, Rockland, ME
AMP-Erase <sup>R</sup>	PERKIN ELMER, Weiterstadt
Ampli Wax <sup>TM</sup>	PERKIN ELMER, Weiterstadt
123-Basenpaarleiter	GIBCO BRL, Eggenstein
Gene Amp <sup>R</sup> dNTPs (ATP, TTP, GTP, CTP)	PERKIN ELMER, Weiterstadt
Glykogen	BOEHRINGER, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase (mit 5 x Puffer und DTT)	GIBCO BRL, Eggenstein
Mineralöl (DNase-, RNase- und Protease-frei)	SIGMA, Deisenhofen

Primer für die RT-PCR:

ROTH, Karlsruhe

CML a3:	5' > TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA < 3'
CML b1b2:	5' > GAA GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC < 3'
CML a2:	5' > CAG ACC CTG AGG CTC AAA GTC AGA < 3'
CML b2:	5' > CTC CAG ACT GTC CAC AGC ATT CCG < 3'
GAPDH 3':	5' > CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT < 3'
GAPDH 5':	5' > CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA < 3'

Random Primer

BOEHRINGER, Mannheim

---

Ribosomale RNA	BOEHRINGER, Mannheim
RNAsin	PROMEGA, Madison, Wi
Roti <sup>R</sup> -Quick-Kit zur Isolierung von RNA (enthält Gnanidinthiocyanat, Phenol/Chloroform und Isopropanol)	ROTH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase (mit 10 x Puffer und MgCl <sub>2</sub> )	GIBCO BRL, Eggenstein

### 3.7 Lösungen

TAE 50x:	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig (37 %ig)
	100 ml	0,5 M EDTA pH 8
	ad 1 l	

Laufpuffer:	50 %	Glycerol
	0,5 %	SDS
	0,1 %	Bromphenol
	10 mM	EDTA

## 4. Methoden

### 4.1 Vorversuche

#### 4.1.1 Zellkultur mit Zytostatika

Es wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien BV-173, K 562 und HL-60 mit 100, 50 und 25  $\mu\text{M}$  Tyrphostin AG 879 in zwölfmaligem Ansatz in Mikrowell-Platten angesetzt. Als Medium diente RPMI. Nach 24 Stunden wurde zu jeweils sechs Ansätzen 5-FU bzw. Etoposid pipettiert, so dass sich eine Konzentration von 5  $\mu\text{g}$  5-FU/ml bzw. von 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  oder 4  $\mu\text{M}$  Etoposid ergab. Die Ansätze wurden für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Zelllinien mit Tyrphostin AG 879, 5-FU, Etoposid und Medium allein angesetzt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden verschiedene Zellkonzentrationen der gleichen Zelllinien mit 12,5  $\mu\text{M}$  Tyrphostin AG 879 in jeweils drei mal achtfachem Ansatz in Mikrowellplatten angesetzt. Hierzu wurde nach 24 Stunden 5-FU pipettiert, so dass sich eine Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ergab. Entsprechende Kontrollen wurden mit Tyrphostin AG 879, 5-FU sowie Medium allein angesetzt. Die Auswertung erfolgte nach 48, 96 und 168 Stunden mittels MTT-Test.

#### 4.1.2 MTT-Test

Nach Ende der Inkubationszeit wurde zu den Ansätzen je 10  $\mu\text{l}$  MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) pipettiert und weitere 3 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Mikrowellplatten wurden nun für fünf Minuten bei 1200 upm zentrifugiert und dekantiert. Die Pellets wurden in je 100  $\mu\text{l}$  fünfprozentiger Ameisensäure in Isopropanol gelöst und die Mikrowellplatten für drei Minuten auf den Rüttler gestellt. In einem Photometer für Mikrotiterplatten wurden anschließend die Absorptionen bei den Wellenlängen  $L1 = 570 \text{ nm}$  und  $L2 = 650 \text{ nm}$  gemessen.

## **4.2 Untersuchung von Zellen aus dem Knochenmarksaspirat von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Tyrphostin AG 879 und 5-Fluorouracil**

### **4.2.1 Patienten**

Es wurden insgesamt zwölf Knochenmarksaspirate von neun Patienten im Alter zwischen 24 und 75 Jahren (Median: 44) mit chronischer myeloischer Leukämie eingesetzt. Die Patienten befanden sich jeweils in der chronischen Phase der Erkrankung. Die Dauer zwischen Diagnosestellung und Entnahme des Knochenmarksaspirates betrug zwischen 0 und 27 Monaten (Median: 9,8). Von drei Patienten wurden jeweils zwei Knochenmarksaspirate, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen worden waren, verwendet.

Zum Zeitpunkt der Knochenmarksaspiration wurden fünf Patienten mit Interferon  $\alpha$  behandelt, davon einer in Kombination mit Hydroxycarbamid (Litalir<sup>R</sup>). Drei Patienten wurden mit Hydroxycarbamid (Litalir<sup>R</sup>) behandelt. Die Medikation wurde jeweils eine Woche vor der Knochenmarksaspiration ausgesetzt. Bei den übrigen drei Patienten wurde die Therapie erst nach Entnahme des Knochenmarksaspirates eingeleitet.

### **4.2.2 Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe wurden 13 Personen im Alter zwischen 20 und 81 Jahren (Median: 52,5) verwendet, bei denen Knochenmark aspiriert wurde, um eine primäre Knochenmarkerkrankung oder einen Befall des Knochenmarks durch eine andere Erkrankung auszuschließen.

### 4.2.3 Probengewinnung

Die Knochenmarkpunktion erfolgte im Rahmen der Diagnosestellung oder der Therapieüberwachung. Dabei wurden jeweils 6 ml Knochenmark aspiriert, mit 4 ml steriler NaCl-Lösung verdünnt und mit 5000 IE Heparin antikoaguliert.

### 4.2.4 Isolation der mononukleären Zellen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation

Unter einer Laminar-Air-Flow-Arbeitsbank wurden 10 ml Knochenmarksaspirat 1:1 in 1x PBS verdünnt. In vier 15 ml-Röhrchen der Firma Falcon wurden jeweils 3 ml Ficoll Hypaque-Lösung vorgelegt. Darüber wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig jeweils 5 ml des verdünnten Knochenmarksaspirats geschichtet, wobei sich beide Schichten nicht vermischten. Die Röhrchen wurden nun 35 Minuten bei 2000 upm zentrifugiert, so dass die mononukleären Zellen durch das Ficoll von den Erythrozyten und den Thrombozyten getrennt wurden. Sie wurden dann vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgezogen und in 50 ml 1x PBS gewaschen, indem sie noch einmal für 10 Minuten bei 1500 upm zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 20 ml IMDM mit 20 % FCS aufgenommen und die Zelllösung über Nacht in einer Zellkulturflasche zum Depletieren in den Brutschrank (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>) gelegt.

### 4.2.5 Behandlung der Zellen mit Zytostatika

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Ortholux-Mikroskop gezählt und in IMDM + 20 % FCS auf eine Konzentration von 10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt. Sowohl die Zelllösung als auch die Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Tyrphostin AG 879 wurden zunächst in doppelter Konzentration angesetzt und anschließend im Verhältnis 1:1 zusammengegeben, um den Pipettierfehler möglichst gering zu halten.

In die Vertiefungen einer 24-Multiwell-Platte wurden jeweils 2 ml-Ansätze nach folgendem Schema pipettiert:

Ansatz 1:	Zellsuspension mit 12,5 $\mu$ M Tyrphostin AG 879
Ansatz 2:	Zellsuspension mit 38,4 $\mu$ M Fluorouracil
Ansatz 3:	Zellsuspension ohne Zusatz
Ansatz 4:	Zellsuspension mit 12,5 $\mu$ Mol Tyrphostin AG 879 + 38,4 $\mu$ M 5-FU (nach 24 h)

Die Ansätze wurden jeweils zweifach angesetzt.

Zum Ansatz 4 wurden nach 24 Stunden 20  $\mu$ l einer 3,84 mM 5-Fluorouracillösung zupipetiert und vorsichtig vermischt. Dazu wurde das 5-Fluorouracil in einer Lösung aus 80 % IMDM und 20 % FCS verdünnt. Als Endkonzentration ergab sich damit ebenfalls 38,4  $\mu$ M. Die Platte wurde für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

#### 4.2.6 Kolonie-Assay

Das Kulturmedium mit den Zellen wurde sorgfältig mit Pasteurpipetten aus den jeweiligen Vertiefungen der Multiwellplatte ausgespült, beide Ansätze eines Zweifachansatzes jeweils zusammen in Zentrifugenröhrchen gegeben und für zehn Minuten bei 1500 upm abzentrifugiert. Der Überstand in den Röhrchen wurde dekantiert, das Zellpellet in 200  $\mu$ l IMDM + 2 % FCS resuspendiert und in 2,5 ml Methylzellulose gelöst. Die Methylzelluloselösung wurde anschließend auf einem Vortexrührer gemischt und mit einer 2 ml-Spritze mit Kanüle zu jeweils 1,25 ml auf 35 mm-Zellkulturplatten aufgebracht. Damit betrug die Zellzahl pro Platte  $2 \times 10^5$ . Um maximale Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten wurden jeweils zwei 35 mm-Platten zusammen mit einer dritten Platte, die 3 ml Aqua dest. enthielt, in eine 100 mm-Zellkulturplatte gestellt. Die Ansätze wurden darauf im Brutschrank für zwölf Tage bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.7 Ernten der Kolonien und RNA-Isolation

Nach einer Inkubationszeit von 12 Tagen wurden die Kolonien auf den Platten zunächst gezählt. Dabei wurde unterschieden zwischen Kolonien aus weniger als 50, 50 bis 250 und mehr als 250 Zellen. Mit einer Pipette wurden zwischen 6 und 30 Kolonien pro Ansatz von

der Kulturplatte abgezogen. Es wurden dafür nur einzeln liegende Kolonien ausgewählt, um ihre Monoklonalität zu gewährleisten.

Die Kolonien wurden in je 20 µl Guanidinthiocyanat aufgenommen und die Lösung mit einer Kanüle geschert. Um zu verhindern, dass ein Großteil der RNA an der Wand des Reaktionsgefäßes anhaftet, wurden zu jedem Ansatz 2 µg ribosomale RNA hinzugegeben. Bis zur Weiterbearbeitung wurden die Ansätze bei -80° C tiefgefroren.

Um Verunreinigungen durch Proteine, Hämoglobin und andere Bestandteile von der RNA zu trennen, wurden die Ansätze mit je 20 µl Phenol/Chloroform versetzt. Diese Mischung wurde für zehn Minuten auf Eis inkubiert und dabei zwischendurch mehrmals auf dem Vortexrührer gemischt. Anschließend wurden die Ansätze für zehn Minuten bei 14000 upm zentrifugiert. Dabei bildete sich eine obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, und eine untere Phase, in der sich die Verunreinigungen befanden. Die obere Phase wurde vorsichtig abgehoben und mit 25 µl eisgekühltem Isopropanol vermischt. Als Fällungshilfe wurde zu diesem Zeitpunkt 40 µg Glykogen zugegeben, und die Ansätze nun für 20 Minuten bei -80° C tiefgefroren. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation bei 14000 upm wurden die Überstände der Ansätze abgehoben, die Pellets, die die RNA enthalten, in 15 µl Guanidinthiocyanat resuspendiert, die Ansätze mit je 15 µl Isopropanol versetzt und anschließend wieder für 20 Minuten bei -80° C tiefgefroren. Es wurde noch einmal für 20 Minuten bei 14000 upm zentrifugiert. Die Überstände der einzelnen Ansätze wurden sorgfältig abgehoben. Die Pellets wurden nun vorsichtig mit 25 µl 70-prozentigem Ethanol gewaschen, wobei sie selbst nicht gelöst wurden. Nach dem Abziehen des Ethanols standen die Reaktionsgefäße für wenige Minuten geöffnet bei Raumtemperatur, damit der restliche Ethanol verdampfen konnte. Die Pellets wurden schließlich in 10,5 µl destilliertem Wasser gelöst und für die reverse Transkription eingesetzt.

#### **4.2.8 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, jeweils 0,25 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 1 µl Random Primer, 600 Einheiten M-MLV Reverse Transkriptase und 80 Einheiten RNAsin angesetzt und für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Ansätze anschließend für 15 Minuten bei 99° C erhitzt. Pro fünf untersuchter Kolonien wurde jeweils eine Negativkontrolle mit Aqua dest. angesetzt. Die komplementäre DNA (c-DNA), die aus dieser Reaktion hervorging, wurde bis zur weiteren Ver-

arbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um eine mögliche Kontamination zu vermeiden, wurden alle Reaktionsgefäße vor dem Gebrauch autoklaviert und mit UV-C-Licht bestrahlt.

#### 4.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um zu zeigen, dass in der reversen Transkription eine brauchbare c-DNA synthetisiert wurde, wurde zunächst eine PCR mit dem sogenannten „Housekeeping-Gen“ GAPDH (Glyceraldehydphosphatdehydrogenase) durchgeführt. Für diese PCR wurde das Hot-Start-Protokoll verwendet. Dabei werden die Nukleotide und Primer zunächst durch eine dünne Wachsschicht von der Taq-Polymerase getrennt, so dass sich die Substanzen erst während der dreiminütigen Denaturierungsphase vor dem ersten Zyklus vermischen. Die Konzentrationen der Substanzen im Gesamtvolumen von  $30\ \mu\text{l}$  betragen  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $50\ \text{mM}$  KCl,  $1,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , jeweils  $0,667\ \mu\text{M}$  3'- und 5'-Primer, jeweils  $0,167\ \text{mM}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP und  $1,5$  Einheiten Taq-Polymerase.  $5\ \mu\text{l}$  c-DNA-Lösung wurden auf die obere Schicht pipettiert. Es wurden 40 Zyklen mit je einer einminütigen Denaturierungsphase bei  $94^{\circ}\text{C}$ , einer einminütigen Annealingphase bei  $58^{\circ}\text{C}$  und einer einminütigen Synthesephase bei  $72^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Am Ende schloss sich eine zehnminütige Synthesephase bei  $72^{\circ}\text{C}$  an.

Um nachzuweisen, ob die einzelnen Kolonien aus einer Vorläuferzelle mit dem bcr-abl-Rearrangement hervorgegangen waren, wurde eine PCR durchgeführt, bei der die amplifizierte Sequenz den Bruchpunkt überspannt. Hierfür wurde ein „nested“-Protokoll verwendet. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurde die c-DNA jeder Kolonie vierfach getestet. Die erste PCR wurde in einem Gesamtvolumen von  $15\ \mu\text{l}$  mit jeweils  $0,167\ \text{mM}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP,  $0,667\ \mu\text{M}$  b1b2-Primer,  $0,667\ \mu\text{M}$  a3-Primer,  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl,  $50\ \text{mM}$  KCl,  $1,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0,75$  Einheiten Taq-Polymerase und  $5\ \mu\text{l}$  c-DNA-Lösung angesetzt. Um auszuschließen, dass Teile der Ansätze verdampften, am Deckel der Reaktionsgefäße kondensierten und somit nicht an den Reaktionen teilnahmen, wurde jeder Ansatz mit  $40\ \mu\text{l}$  Mineralöl überschichtet. Die Doppelstränge der c-DNA wurden in einer dreiminütigen Denaturierungsphase bei  $94^{\circ}\text{C}$  gespalten. Danach wurden 30 Zyklen von je einer Minute  $94^{\circ}\text{C}$ , einer Minute  $58^{\circ}\text{C}$  und einer Minute  $72^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Am Ende schloss sich eine zehnminütige Synthesephase bei  $72^{\circ}\text{C}$  an. Zu diesen  $15\ \mu\text{l}$  der PCR-Produkt-Lösung wurde anschließend eine Lösung aus jeweils  $0,167\ \text{mM}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP,  $1,33\ \text{mM}$  b2-Primer,  $1,33\ \text{mM}$  a2-Primer,  $20\ \text{mM}$  Tris-HCl (pH 8,4),  $50\ \text{mM}$  KCl,  $1,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  und

1,5 Einheiten Taq-Polymerase zugegeben, und die PCR mit jeweils einer Minute 94° C, einer Minute 58° C und einer Minute 72° C durchgeführt. Aus jedem Behandlungsansatz wurden zwischen sechs und 20 Kolonien untersucht.

#### **4.2.10 Gelelektrophorese**

Für die Elektrophorese wurde jeder Ansatz mit 25 Vol% Agarose-Laufpuffer versetzt. Die Elektrophorese der GAPDH-Fragmente wurde in einem 1,5%igen, die der bcr-abl-Fragmente in einem 3%igen Agarosegel durchgeführt. Um die PCR-Produkte im Gel sichtbar zu machen, wurde dies mit 0,76 µM Ethidiumbromid versetzt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE verwendet. Es wurde eine Spannung von 90 Volt angelegt. Um die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde eine 123-Basenpaar-DNA-Leiter mitgeführt. Nach ca. zwei Stunden wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel auf einen UV-Licht-Tisch gelegt und fotografiert.

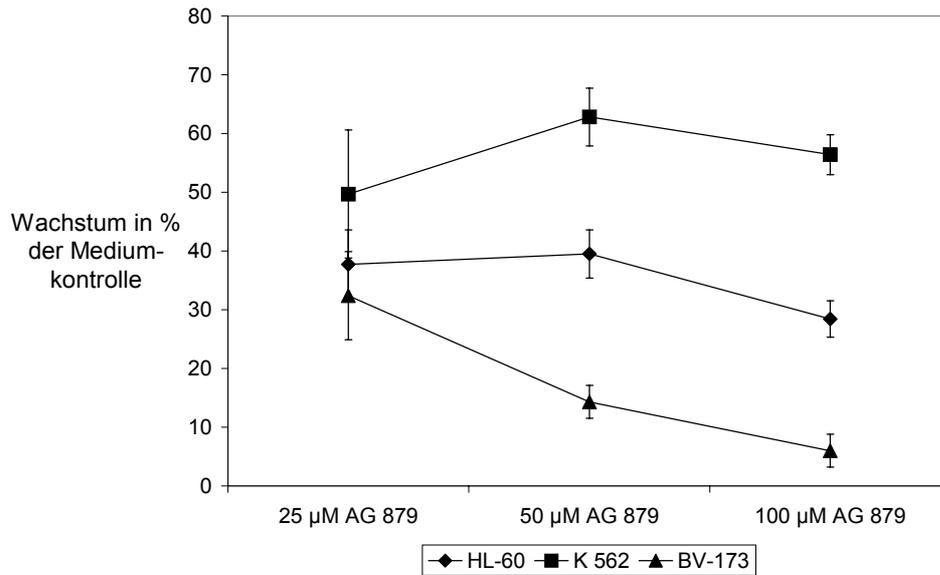
## 5. Ergebnisse

### 5.1 Wachstumshemmung bei Zellkulturzellen

#### 5.1.1 Einfluss der verschiedenen Tyrphostin-, Etoposid- und 5-Fluorouracilkonzentrationen (5-FU) auf bcr-abl-positive und bcr-abl-negative Zelllinien

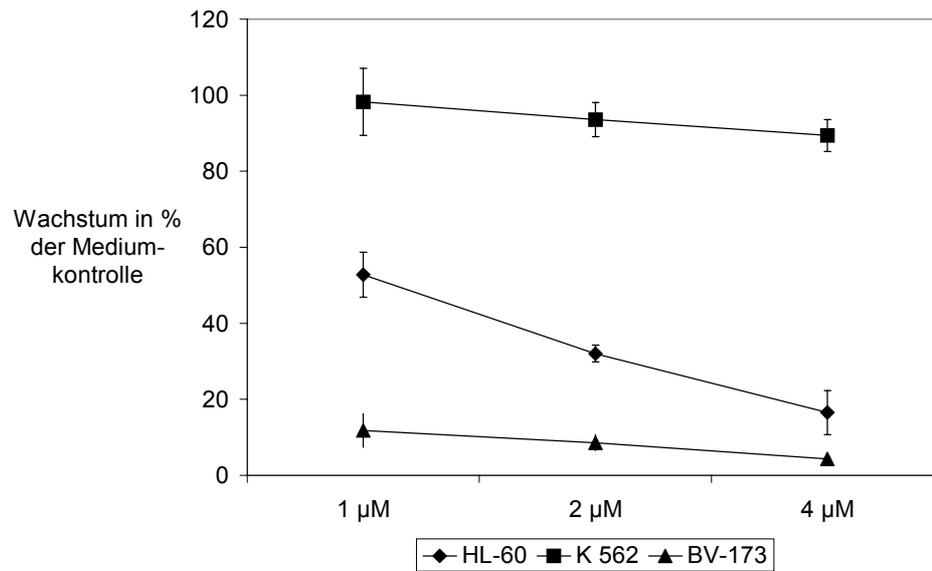
Im ersten Vorversuch wurden verschiedene Konzentrationen des Tyrphostins AG 879 in den Inkubationsansätzen mit den Zelllinien K 562, BV-173 und HL-60 ausgetestet. Hierbei erwies sich eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  als deutlich zu hoch, da sie das weitere Zellwachstum fast vollständig unterdrückte und sich ein signifikanter Unterschied bei der zusätzlichen Gabe von Etoposid oder 5-FU insbesondere bei der Zelllinie BV-173 nicht mehr aufzeigen ließ. Auch die Konzentrationen von 50 und 25  $\mu\text{M}$  erwiesen sich noch als zu hoch (Abb. 3). Die zweite Versuchsreihe wurde daher mit einer Tyrphostinkonzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde zudem der Einfluss von Etoposid in unterschiedlichen Konzentrationen auf das Zellwachstum untersucht. Hier zeigte sich auch nach deutlicher Dosisreduktion von 4 auf 1  $\mu\text{M}$  ein zu starker toxischer Effekt bei der Zelllinie BV-173, die den Patientenzellen bezüglich ihrer Wachstumseigenschaften am ähnlichsten ist (Abb. 4). Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit 5-FU in einer Konzentration von 5 mg/ml bei der Zelllinie K 562 zu keiner und bei der bcr-abl-negativen Zelllinie HL-60 zu einer nur leichten Wachstumshemmung auf 85 % ( $\pm 9,9$  %) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Bei der Zelllinie BV-173 führte die Behandlung mit 5-FU zu einer Reduktion des Wachstums auf 32 % ( $\pm 7,5$  %) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Bei der kombinierten Behandlung mit 5-FU und Tyrphostin ließ sich ein zusätzlicher wachstumshemmender Effekt nachweisen mit einer Reduktion des Wachstums auf 19 % ( $\pm 4,6$  %). Aufgrund der Ergebnisse bei der Zelllinie BV-173, die von den untersuchten Zelllinien am besten als Modell für bcr-abl-positive Patientenzellen geeignet ist, wurde 5-Fluorouracil als Zytostatikum für die nachfolgenden Versuche ausgewählt.



	25 µM AG 879	50 µM AG 879	100 µM AG 879
K 562	49,7 % ± 10,9 %	62,8 % ± 4,9 %	56,4 % ± 3,4 %
HL-60	37,7 % ± 5,9 %	39,5 % ± 4,1 %	28,4 % ± 3,1 %
BV 173	32,4 % ± 7,5 %	14,3 % ± 2,8 %	6 % ± 2,8 %

*Abb. 3: Dosiswirkungskurve bei dem Tyrphostin AG 879*  
*Die bcr-abl-positiven Zelllinien K 562 und BV-173 und die bcr-abl-negative Zelllinie HL-60 wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrphostins AG 879 inkubiert.*  
*Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus sechs parallelen Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.*



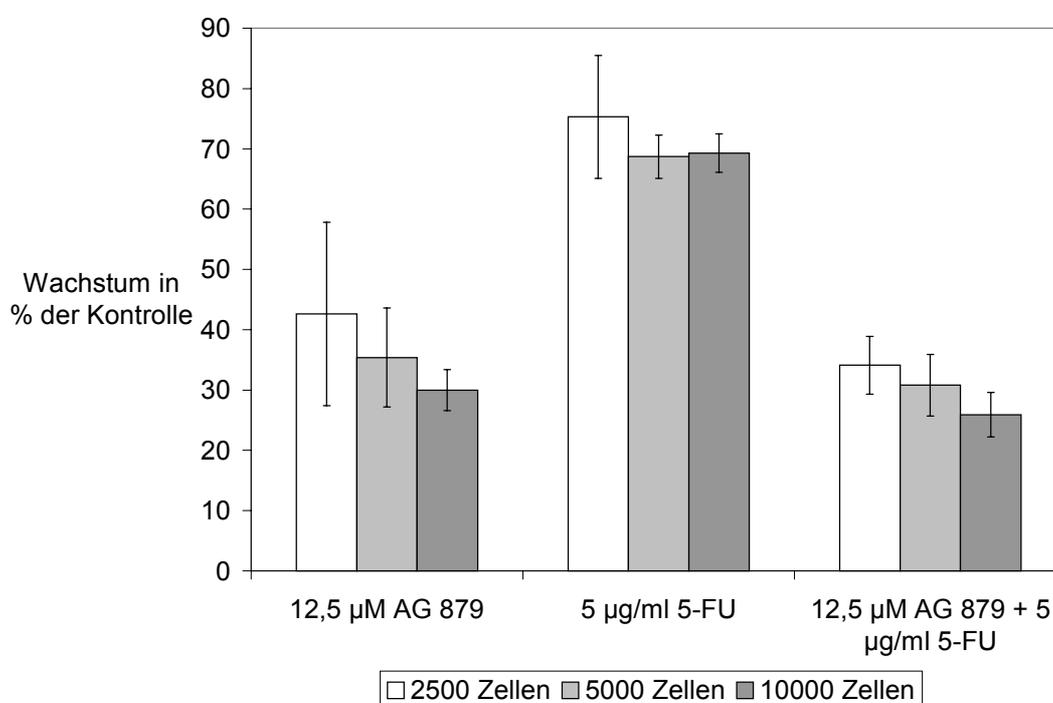
	1 µM	2 µM	4 µM
HL-60	52,8 % ± 5,9 %	32 % ± 2,2 %	16,5 % ± 5,8 %
K 562	98,2 % ± 8,8 %	93,6 % ± 4,5 %	89,4 % ± 4,2 %
BV-173	11,8 % ± 4,4 %	8,6 % ± 2,1 %	4,3 % ± 0,6 %

Abb. 4: *Dosis-Wirkungskurve bei Etoposid*  
 Die *bcr-abl*-positiven Zelllinien K 562 und BV-173 und die *bcr-abl*-negative Zelllinie HL-60 wurden mit Etoposid in verschiedenen Konzentrationen inkubiert.

Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aus sechs parallelen Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.

### 5.1.2 Einfluss von 5-Fluorouracil in Kombination mit Tyrphostin AG 879 auf die verschiedenen Zelllinien

In einer zweiten Vorversuchsreihe wurde nun der Effekt der kombinierten Behandlung der Zelllinien mit 5-FU und Tyrphostin AG 879 in den oben angegebenen Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von insgesamt 48 Stunden untersucht. Am unempfindlichsten gegenüber der Behandlung erwies sich dabei die bcr-abl-positive Zelllinie K 562. Es zeigte sich eine leichte Reduktion des Zellwachstums durch die Behandlung mit 5-FU und eine etwas stärkere Reduktion durch die Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und die Kombinationsbehandlung. (Abb. 5).

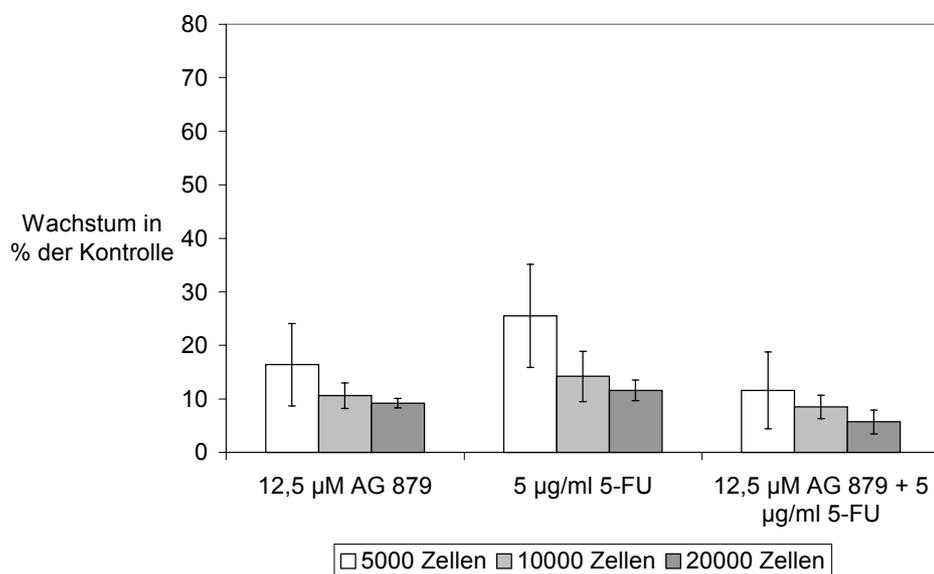


	2500 Zellen	5000 Zellen	10000 Zellen
12,5 µM AG 879	42,6 % ± 15,2 %	35,4 % ± 8,2 %	30,0 % ± 3,4 %
5 µg/ml 5-FU	75,3 % ± 10,2 %	68,7 % ± 3,6 %	69,3 % ± 3,2 %
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	34,1 % ± 4,8 %	30,8 % ± 5,1 %	25,9 % ± 3,7 %

Abb. 5: Wachstum der Zelllinie K 562 nach Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.

Bei der bcr-abl-positiven Zelllinie BV-173 kam es zu einer deutlich stärkeren Wachstums-  
hemmung sowohl durch die Behandlung mit den einzelnen Substanzen als auch durch die  
Kombinationsbehandlung. Nach der Kombinationsbehandlung war das Zellwachstum im  
Vergleich zu den Behandlungen mit den Einzelsubstanzen etwas stärker reduziert, der Unter-  
schied war im Zweistichproben-Gaußtest bei einem Signifikanzniveau von 0,05 signifikant.  
Lediglich im Ansatz mit 5000 Zellen ließ sich zwischen der Kombinationsbehandlung und der  
Behandlung mit dem Tyrphostin allein kein signifikanter Unterschied nachweisen (Abb. 6).

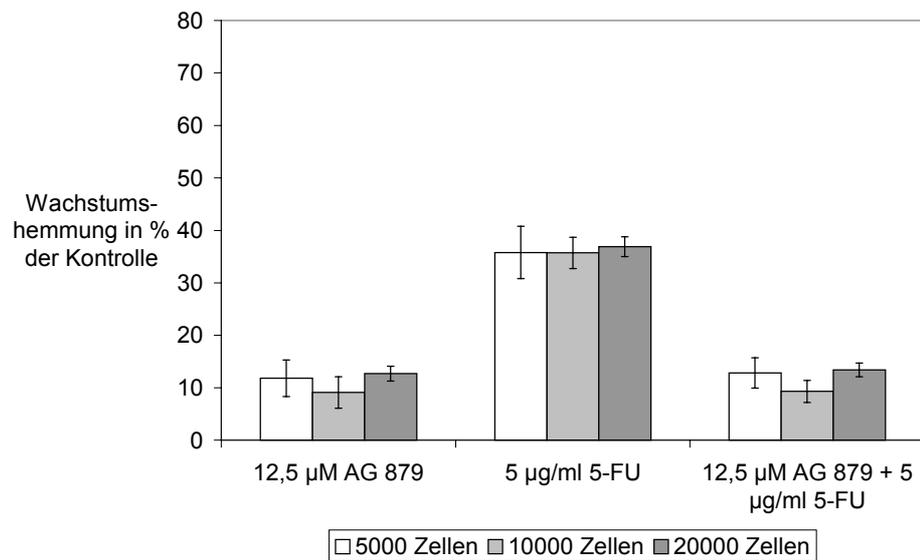


	5000 Zellen	10000 Zellen	20000 Zellen
12,5 µM AG 879	16,4 % ± 7,7 %	10,6 % ± 2,4 %	9,2 % ± 0,9 %
5 µg/ml 5-FU	25,5 % ± 9,6 %	14,2 % ± 4,7 %	11,6 % ± 1,9 %
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	11,6 % ± 7,2 %	8,5 % ± 2,2 %	5,7 % ± 2,2 %

Abb. 6: Wachstum der Zelllinie BV-173 nach Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.

Die bcr-abl-negative Zelllinie HL-60 wurde ebenfalls durch die Monotherapien wie auch durch die Kombinationsbehandlung deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Hier ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Gabe des Tyrphostins und der kombinierten Gabe von Tyrphostin und 5-FU nachweisen (Abb. 7).



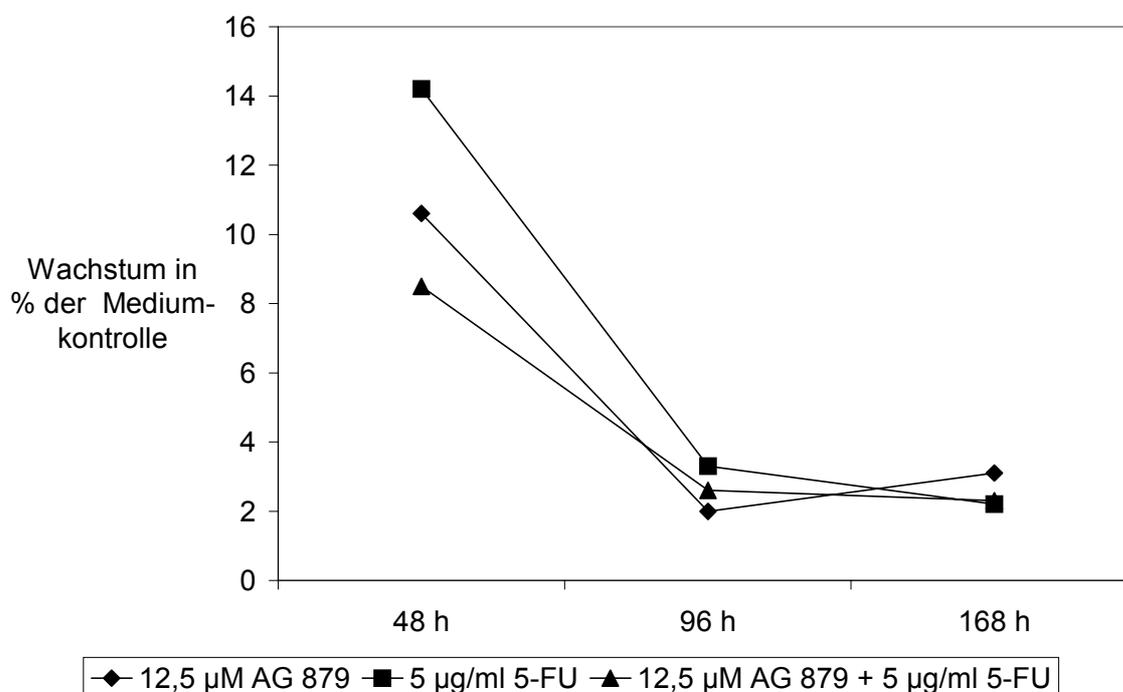
	5000 Zellen	10000 Zellen	20000 Zellen
12,5 µM AG 879	11,8 % ± 3,5 %	9,1 % ± 3,0 %	12,7 % ± 1,4 %
5 µg/ml 5-FU	35,8 % ± 5,0 %	35,7 % ± 3,0 %	36,9 % ± 1,9 %
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	12,8 % ± 2,9 %	9,3 % ± 2,1 %	13,4 % ± 1,3 %

*Abb. 7: Wachstum der Zelllinie HL-60 nach Behandlung mit 5-FU und Tyrphostin AG 879 nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.*

### 5.1.3 Einfluss von 5-Fluorouracil und Tyrphostin AG 879 auf die verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zelllinien untersucht. Hier zeigten sich bei der Zelllinie BV-173 in allen drei Behandlungsansätzen nach 96 und nach 168 Stunden gleich niedrige Absorpti-

onswerte im MTT-Test entsprechend einer fast vollständigen Wachstumshemmung. Bei der Zelllinie K 562 ließ sich das gleiche Verhalten im Kombinationsansatz und im Thyrophostin-Mono-Ansatz beobachten. Das Zellwachstum nach Behandlung mit 5-FU war nach 48 Stunden und nach den längeren Inkubationszeiten nur schwach gehemmt. Bei der Zelllinie HL-60 fiel im Mono-Ansatz mit 5-FU nach 168 Stunden eine deutlich stärkere Wachstumshemmung auf 13 % ( $\pm 4,5$  %) im Vergleich zu 36,0 % ( $\pm 0,7$  %) nach 48 Stunden auf. Die Wachstumshemmung durch die Monobehandlung mit Tyrphostin und die Kombinationsbehandlung mit Tyrphostin und 5-FU unterschied sich dagegen kaum nach den verschiedenen Inkubationszeiten. Beispielhaft ist hier das Wachstumsverhalten der Zelllinie BV-173 nach verschiedenen Inkubationszeiten nach Behandlung mit 5-FU und Tyrphostin AG 879 in einem Inkubationsansatz mit 10000 Zellen dargestellt (Abb. 8).



	48 h	96 h	168 h
12,5 µM AG 879	10,6 % ± 2,4 %	2,0 % ± 0,7 %	3,1 % ± 0,6 %
5 µg/ml 5-FU	14,2 % ± 4,7 %	3,3 % ± 0,5 %	2,2 % ± 0,3 %
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	8,5 % ± 2,2 %	2,6 % ± 0,4 %	2,3 % ± 0,3 %

Abb. 8: Wachstum der Zelllinie BV-173 nach Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von acht Messungen im MTT-Assay bei 570 und 650 nm.

### **5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen mit den Zellkulturzellen**

In den Vorversuchen sollte eine Kombination des Tyrphostins AG 879 und eines konventionellen Zytostatikums bestimmt werden, durch die sich eine Wachstumshemmung bei bcr-abl-positiven Zelllinien erzielen lässt. Dabei soll die kombinierte Gabe zu einer stärkeren Wachstumshemmung führen als die Gabe der Einzelsubstanzen. Als günstigste Kombination stellte sich das Tyrphostin AG 879 in einer Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  mit 5-Fluorouracil in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  dar. Die Inkubationszeit, bei der eine starke, aber nicht vollständige Reduktion des Zellwachstums bei signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsansätzen zu verzeichnen war, betrug 48 Stunden.

Die nachfolgenden Versuche mit Knochenmarkzellen, welche frisch aus Knochenmarksaspiraten von verschiedenen Patienten isoliert worden waren, wurden mit dieser Zytostatikakombination und einer Inkubationszeit von 48 Stunden durchgeführt.

## 5.2 Klonogene Knochenmarkzellen

### 5.2.1 Charakterisierung der Patientengruppe und des Kontrollkollektivs

Die Auswirkung der kombinierten Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-Fluorouracil sollte nun an Knochenmarkzellen von Patienten getestet werden. Hierzu wurden Zellen aus einem Knochenmarksaspirat in Zellkultur gebracht, mit den beiden Substanzen behandelt und anschließend ein Colony-Assay angesetzt. Hieraus wurden zum einen die absolute Anzahl der noch vorhandenen koloniebildenden Zellen anhand der Anzahl der nach zehn Tagen gezählten Kolonien bestimmt. Zum anderen wurden bei den Patienten mit Nachweis von bcr-abl-positiven Knochenmarkzellen einzelne Kolonien entnommen und mittels Polymerasekettenreaktion auf das bcr-abl-Hybridgen untersucht.

Als Kontrollkollektiv dienen Knochenmarkzellen von zehn Patienten, bei denen kein bcr-abl-Rearrangement nachweisbar war. Bei diesen Patienten wurden Knochenmarkpunktionen zur Diagnostik anderer hämatologischer Erkrankungen oder zum Ausschluss einer hämatologischen Erkrankung durchgeführt. In Tabelle 1 sind Alter, Geschlecht, Diagnose und eine gegebenenfalls vorausgegangene Therapie im Rahmen der hämatologischen Grunderkrankung aufgeführt.

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnose	zytostatische Therapie
L. H.	67	m	MPS	Hydroxycarbamid
W. R.	73	w	NHL	Keine
K. R.	71	m	MPS	Hydroxycarbamid
E. N.	81	w	PV	Keine
L. B.	20	w	Leukozytose bei Z. n. Splenektomie	Keine
D. R.	30	m	Reaktion	Keine
M. K.	29	m	Ungeklärt	Keine
M. K.	45	m	malignes Melanom	Keine
C. P.	41	w	Reaktion	Keine
I. M.	42	w	Reaktion	Keine

Tab. 1: Charakterisierung der Patienten des Kontrollkollektivs

Es wurden Knochenmarkszellen von insgesamt neun Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie untersucht. Bei drei Patienten wurde zu einem späteren Zeitpunkt eine zweite Knochenmarkprobe entnommen und ein zweites Mal untersucht. Die Knochenmarkszellen wurden wie bei den Patienten aus dem Kontrollkollektiv in Zellkultur gebracht, mit Tyrphostin und 5-Fluorouracil behandelt und in einem Colony-Assay angesetzt. Aus insgesamt fünf Colony-Assays wurden einzelne Kolonien entnommen und mittels PCR auf die bcr-abl-Translokation untersucht. In der Tabelle 2 sind Alter, Geschlecht, der Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme nach der Diagnosestellung und die gegebenenfalls vorausgegangene zytostatische Therapie dargestellt.

Patient	Alter	Geschlecht	Zeitpunkt der KM-Punktion nach Diagnosestellung:	Zytostatische Therapie:
M. H.	60	W	22 Mon.	Hydroxycarbamid
I. D.	30	W	27 Mon.	Interferon
A. K.	55	M	7 Mon.	Interferon + Hydroxycarbamid
A. K. (2)	56	M	14 Mon.	Hydroxycarbamid
H. R.	49	M	8 Mon.	Interferon
K. E.	24	W	12 Mon.	Interferon
K. E. (2)	25	W	20 Mon.	Interferon
M. N.	30	W	0 Mon.	Keine
J. F.	34	M	0 Mon.	Keine
J. F. (2)	35	M	8 Mon.	Hydroxycarbamid
P. V.	55	M	0 Mon.	Keine
W. O.	75	M	0 Mon.	Keine

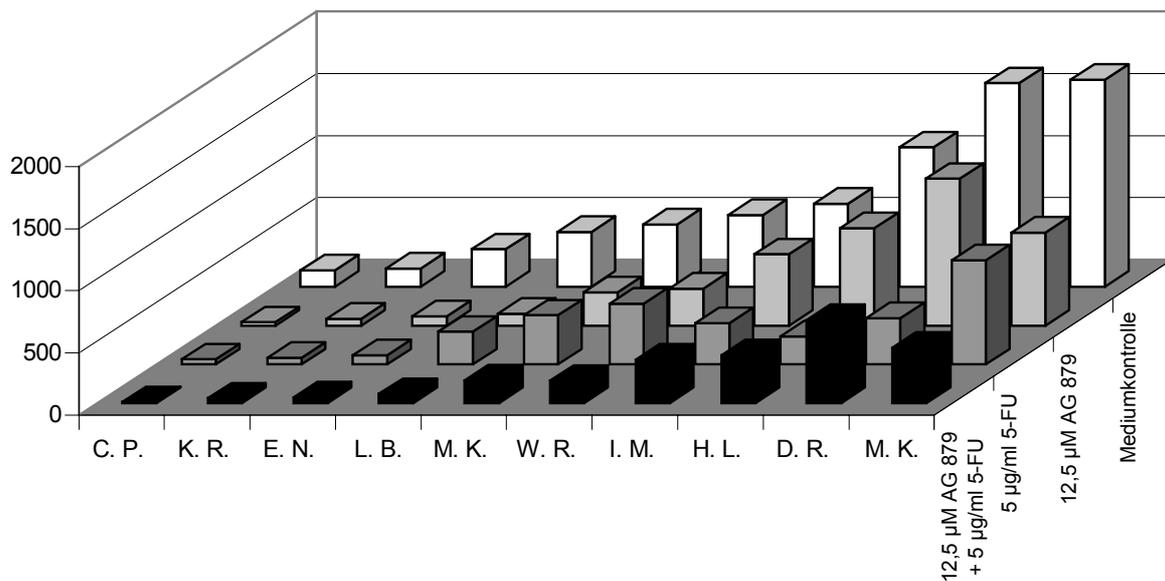
Tab. 2: *Charakterisierung der Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie*

## 5.2.2 Koloniewachstum in der Kontrollgruppe

### 5.2.2.1 Anzahl der Kolonien in den bcr-abl-negativen Colony-Assays

Um die Kolonieanzahlen in den einzelnen Versuchsansätzen miteinander vergleichen zu können, wurden die absoluten Zahlen der gewachsenen Kolonien nach der kombinierten Behandlung sowie nach Behandlung mit den Einzelsubstanzen in Relation gesetzt mit der Kolonieanzahl in der jeweiligen Mediumkontrolle. Aus den Einzelergebnissen wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Nach der Kombinationsbehandlung zeigte sich hierbei eine Re-

duktion der Koloniezahl auf 28,7 % ( $\pm 13,8$  %), nach der Behandlung mit dem Tyrphostin auf 48,1 % ( $\pm 19,2$  %) und nach der Behandlung mit 5-FU auf 45,7 % ( $\pm 23,1$  %). Vergleicht man die Ergebnisse mit Hilfe des Zweitstichproben-Gaußtests, ergibt sich bei einem Signifikanzniveau von 0,05 eine signifikante Reduktion des Koloniewachstums nach der Kombinationstherapie sowohl im Vergleich zur Mediumkontrolle sowie im Vergleich zu den Behandlungsansätzen mit den Einzelsubstanzen. Die Einzelergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

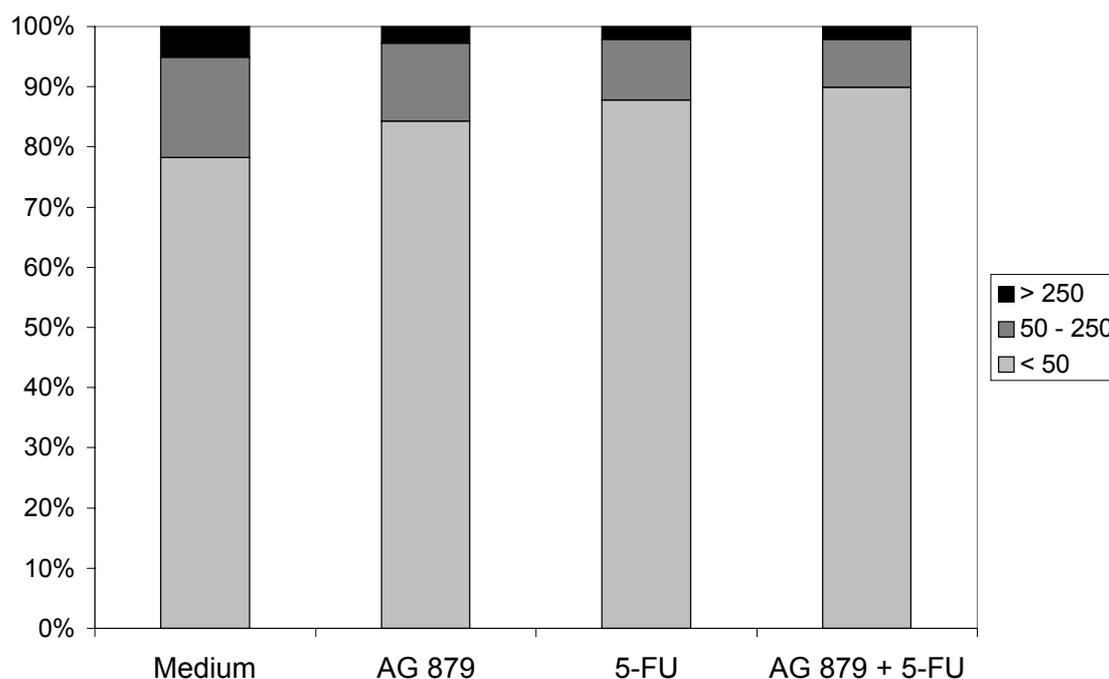


	C. P.	K. R.	E. N.	L. B.	M. K.	W. R.	I. M.	H. L.	D. R.	M. K.	MW	SA
Mediumkontrolle	131	148	302	440	502	578	671	1124	1642	1668	1478.00	306.85
12,5 µM AG 879	26	56	74	94	268	298	575	786	1184	749	906.33	241.18
5 µg/ml 5-FU	41	52	75	263	396	491	331	227	371	839	479.00	319.97
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	8	39	48	74	183	181	351	385	669	446	500.00	149.50

Abb. 9: Anzahl der Kolonien in der Kontrollgruppe (*bcr-abl*-negativ)  
 Dargestellt ist jeweils die Koloniezahl, die in den Kolonie-Assays der klonogenen Zellen verschiedener Patienten nach der Behandlung mit Tyrphostin AG 879, 5-FU oder der Kombination sowie ohne Behandlung innerhalb von zwölf Tagen gewachsen ist.  
 MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung

### 5.2.2.2 Verteilung der Koloniegrößen in der Kontrollgruppe

Bei der Bestimmung der Koloniezahl im Kolonie-Assay nach Behandlung der Knochenmarkzellen wurde zwischen Kolonien unterschiedlicher Größe unterschieden. Mit Hilfe des Zweistichproben-Gaußtests wurden die einzelnen Ansätze bezüglich der Verteilung der Koloniegrößen miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich nach der kombinierten Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU eine signifikante Verschiebung der Koloniegrößen zu kleineren Kolonien im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der Vergleich der kombinierten Behandlung mit den Kontrolluntersuchungen, die mit den Einzelsubstanzen durchgeführt wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Verteilung der Koloniegrößen (Abb. 10).



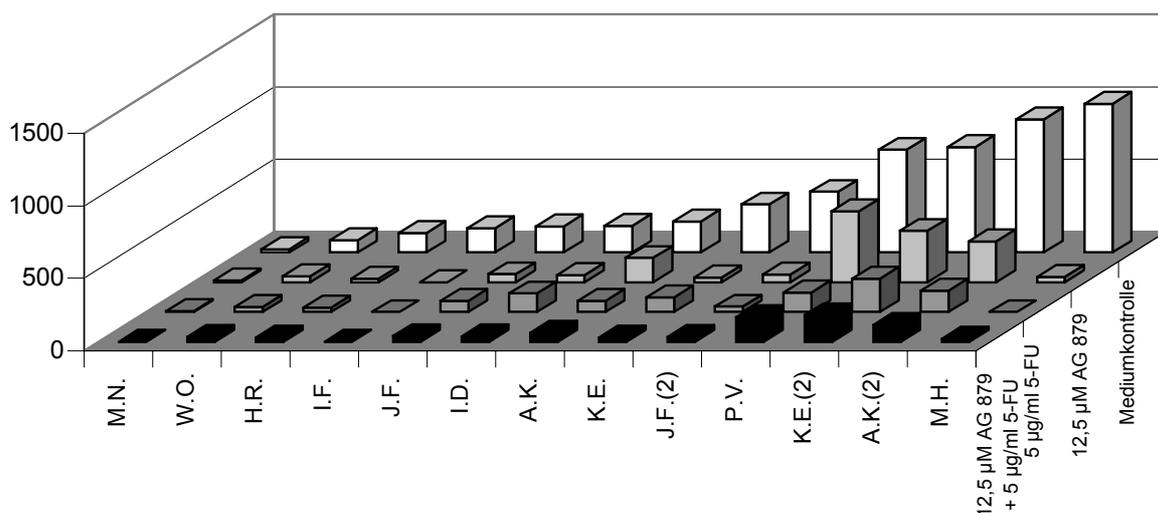
	Mediumkontrolle	AG 879	5-FU	AG 879 + 5-FU
< 50	78.3 % ± 7.8 %	84.2 % ± 9.3 %	87.8 % ± 6.1 %	89.9 % ± 7.9 %
50 – 250	16.6 % ± 5.4 %	13.0 % ± 7.6 %	10.1 % ± 4.1 %	7.9 % ± 6.0 %
> 250	5.1 % ± 3.1 %	2.7 % ± 2.1 %	2.1 % ± 2.3 %	2.1 % ± 1.7 %

Abb. 10: Verteilung der Koloniegrößen in der Kontrollgruppe  
Dargestellt sind die Anteile der Kolonien bestehend aus weniger als 50, 50 bis 250 und über 250 Zellen an der Gesamtkolonienzahl des jeweiligen Versuchsansatzes.

## **5.2.3 Koloniewachstum in der Gruppe der CML-Patienten**

### **5.2.3.1 Anzahl der Kolonien in den bcr-abl-positiven Colony-Assays**

Die Ergebnisse der Koloniezahlen in der Gruppe der CML-Patienten wurden in Analogie zur Kontrollgruppe ausgewertet. Es zeigte sich nach der Kombinationsbehandlung mit 5-FU und dem Tyrphostin AG 879 eine Reduktion des Koloniewachstums auf 16,7 % ( $\pm$  11,4 %) im Vergleich zur Mediumkontrolle. Nach Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 war das Koloniewachstum auf 32,8 % ( $\pm$  24,4 %) reduziert, nach Behandlung mit 5-FU auf 29,2 % ( $\pm$  18,1 %). Die Auswertung mit Hilfe des Zweistichproben-Gaußtests ergibt bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ebenso wie in der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Koloniewachstums nach der Kombinationstherapie im Vergleich zur Mediumkontrolle und zu den Behandlungsansätzen mit den Einzelsubstanzen. Die Ergebnisse bei den einzelnen Patienten sind in Abbildung 11 dargestellt.



	M.N.	W.O.	H.R.	I.F.	J.F.	I.D.	A.K.	K.E.	J.F. (2)	P.V.	K.E. (2)	A.K. (2)	M.H.	MW	SA
Mediumkontrolle	23	85	136	168	181	186	214	332	419	709	728	919	1028	425.42	332.37
12,5 µM AG 879	11	40	26	0	56	51	168	34	55	489	355	282	36	132.67	158.17
5 µg/ml 5-FU	7	36	31	0	76	129	78	103	38	135	232	146	n.u.	91.27	66.74
12,5 µM AG 879 + 5 µg/ml 5-FU	1	32	29	0	40	38	62	31	35	171	185	118	22	63.58	60.53

Abb. 11: Anzahl der Kolonien in der Gruppe der CML-Patienten

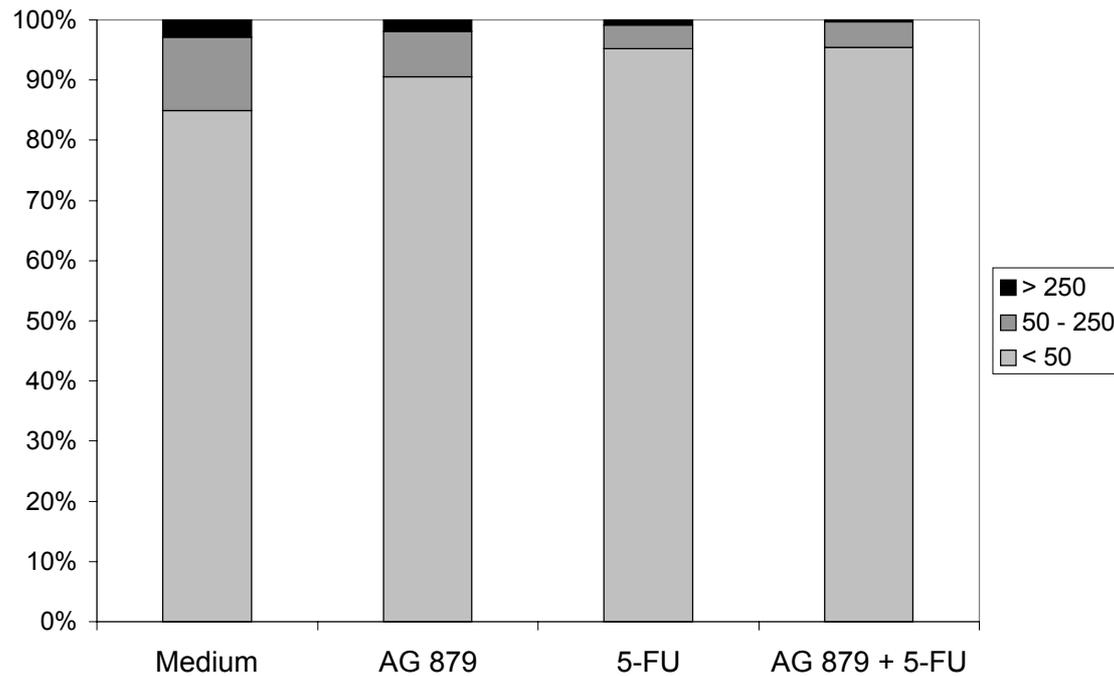
Dargestellt ist jeweils die Koloniezahl, die in den Kolonie-Assays der klonogenen Zellen verschiedener Patienten nach der Behandlung mit Tyrphostin AG 879, 5-FU oder der Kombination sowie ohne Behandlung innerhalb von zwölf Tagen gewachsen ist.

MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung

Vergleicht man die Koloniezahlen in der Gruppe der CML-Patienten mit denen der Kontrollgruppe, sieht man bei den CML-Patienten eine signifikant stärkere Hemmung des Koloniewachstums nach der Kombinationsbehandlung und nach der Behandlung mit 5-FU als in der Kontrollgruppe. Nach der Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe nachweisen.

### **5.2.3.2 Verteilung der Koloniegrößen in der Gruppe der CML-Patienten**

Auch in der Gruppe der CML-Patienten kam es zu einer signifikanten Verschiebung zu kleineren Kolonien nach der kombinierten Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 und 5-FU. Dieser Effekt ließ sich auch nach der Behandlung mit 5-FU nachweisen, nach der Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 ließ sich im Vergleich zur Mediumkontrolle lediglich eine Abnahme des Anteils der Kolonien mit einer Größe von 50 bis 250 Zellen beobachten. Vergleicht man die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit den Behandlungen mit den Einzelsubstanzen, sieht man bezüglich der Koloniegrößen keine Unterschiede außer in der Gruppe der Kolonien mit mehr als 250 Zellen. Diese finden sich nach der Kombinationsbehandlung signifikant seltener als nach der Behandlung mit dem Tyrphostin allein (Abb. 12).



	Mediumkontrolle	AG 879	5-FU	AG 879 + 5-FU
< 50	84.9 % ± 8.1 %	90.6 % ± 9.1 %	95.3 % ± 5.0 %	95.5 % ± 5.9 %
50 – 250	12.3 % ± 5.8 %	7.5 % ± 6.5 %	3.9 % ± 4.5 %	4.2 % ± 5.2 %
> 250	2.8 % ± 3.7 %	1.9 % ± 2.9 %	0.9 % ± 1.2 %	0.3 % ± 0.8 %

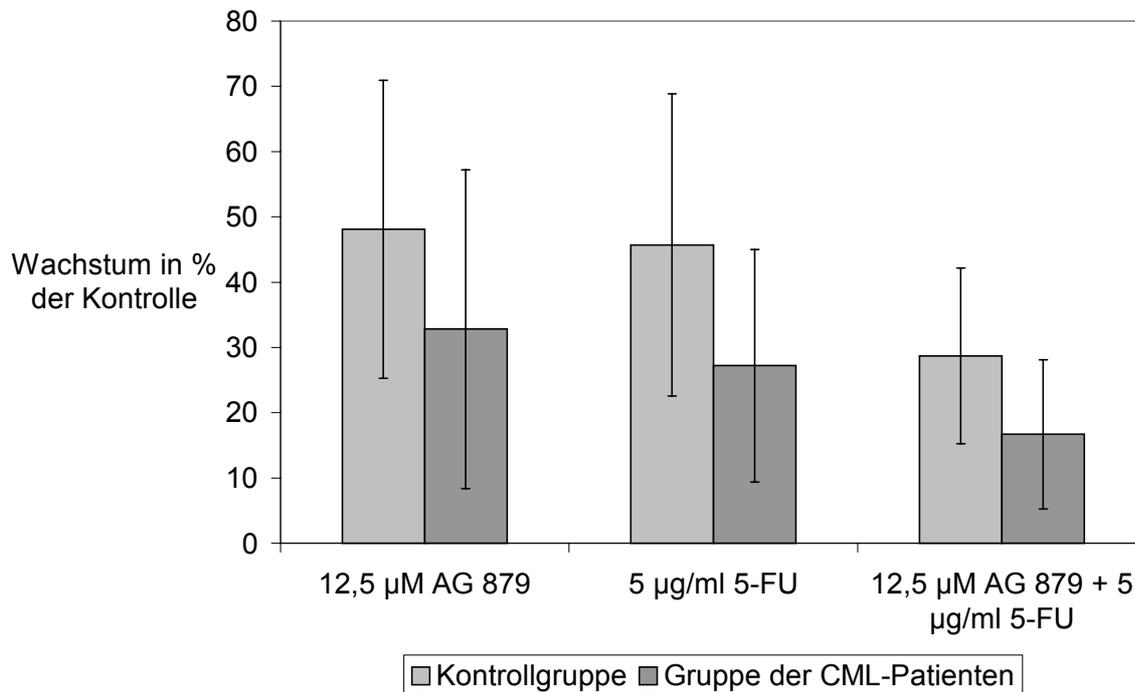
Abb. 12: Koloniegrößen in der Gruppe der CML-Patienten

Dargestellt sind die Anteile der Kolonien bestehend aus weniger als 50, 50 bis 250 und über 250 Zellen an der Gesamtkolonienzahl des jeweiligen Versuchsansatzes.

#### 5.2.4 Koloniezahlen in der Gruppe der CML-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die Wachstumsreduktion, die durch Tyrphostin AG 879, 5-FU und die Kombination beider Substanzen hervorgerufen wird, wurde außerdem anhand der Gesamtzahl der Kolonien eines jeweiligen Behandlungsansatzes untersucht. Dabei wurden die Koloniezahlen in Relation zur Mediumkontrolle des jeweiligen Patienten gesetzt und von allen Patienten der entsprechenden Gruppe für die einzelnen Ansätze die Mittelwerte bestimmt. Es zeigt sich eine signifikant

stärkere Wachstumsreduktion in der Gruppe der CML-Patienten als in der Kontrollgruppe (Abb. 13).



	Kontrollgruppe	Gruppe der CML-Patienten
12,5 µM AG 879	48,1 % ± 22,8 %	32,8 % ± 24,4 %
5 µg/ml 5-FU	45,7 % ± 23,1 %	27,2 % ± 17,8 %
12,5 µM AG 879+ 5 µg/ml 5-FU	28,7 % ± 13,4 %	16,7 % ± 11,4 %

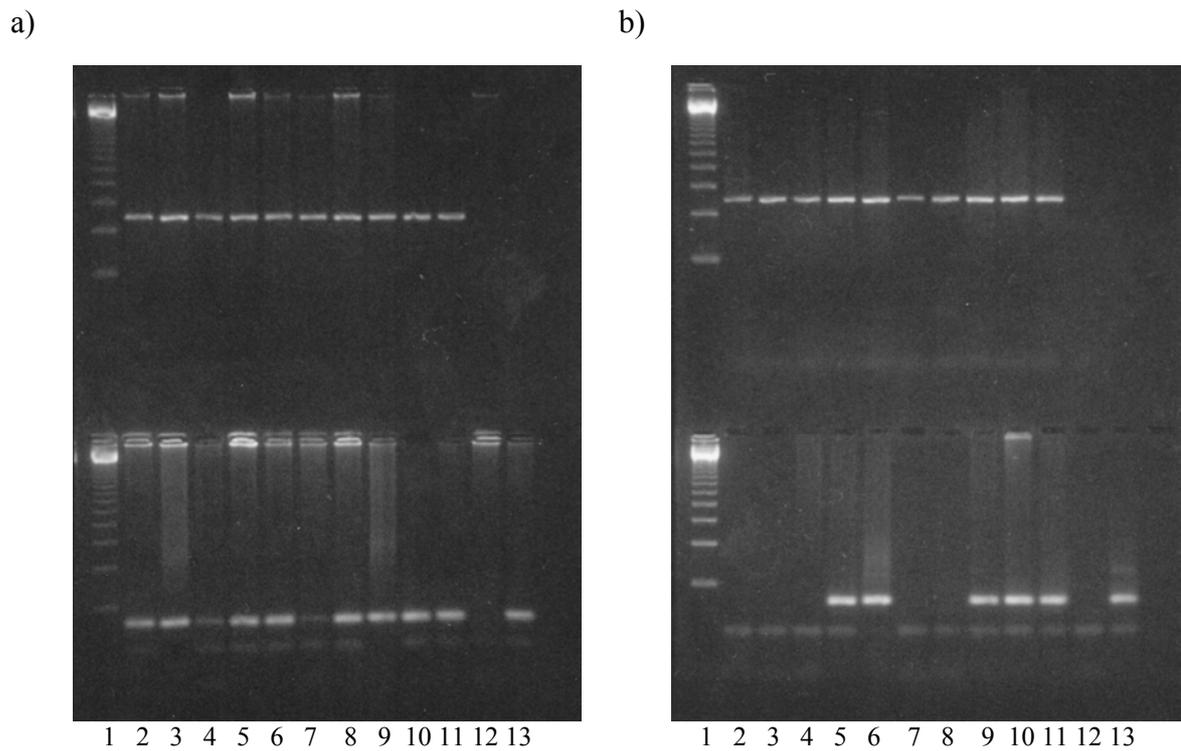
Abb.13: Mittelwerte der Koloniezahlen im Verhältnis zur Mediumkontrolle in der Kontrollgruppe und der Gruppe der CML-Patienten nach der Behandlung mit Tyrphostin, 5-FU und der Kombination aus beiden Substanzen.

---

### **5.2.5 Verhältnis der bcr-abl-positiven zu den bcr-abl-negativen Kolonien in der Gruppe der CML-Patienten**

Durch die Bestimmung der Kolonieanzahlen nach der kombinierten Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU sowie nach der Behandlung mit den Einzelsubstanzen und den Vergleich mit der Mediumkontrolle konnte gezeigt werden, dass die zytostatische Behandlung die Anzahl der koloniebildenden Zellen deutlich reduziert. Die Tatsache, dass die Wachstumsreduktion in der Gruppe der CML-Patienten nach der kombinierten Behandlung und der Behandlung mit 5-FU stärker war als in der Kontrollgruppe, legt die Vermutung nahe, dass die koloniebildenden Zellen mit positivem Nachweis des bcr-abl-Rearrangements empfindlicher gegenüber der Behandlung waren. Es wurde nun überprüft, ob durch die Behandlung neben dem quantitativen Effekt auch ein qualitativer Effekt in Form eines verminderten Wachstums bcr-abl-positiver Kolonien zugunsten eines vermehrten Wachstums bcr-abl-negativer Kolonien nachweisbar war. Hierzu wurden bei fünf Patienten aus jedem Ansatz zwischen 6 und 30 Kolonien isoliert und mittels Polymerasekettenreaktion auf das bcr-abl-Rearrangement in den einzelnen Kolonien untersucht (Abb. 14).

Die Auswertung der Ergebnisse mittels des Zweistichproben-Gaußtests ergab bei einem Signifikanzniveau von 0,05 keine signifikanten Unterschiede zwischen der kombinierten Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU zur Mediumkontrolle oder zu den Kontrollansätzen mit den Einzelsubstanzen bezüglich des Verhältnisses der bcr-abl-positiven zu den bcr-abl-negativen Kolonien (Abb 15).



*Abb 14: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte, die aus der mRNA der verschiedenen Einzelkolonien aus dem Knochenmark der CML-Patienten und der Kontrollgruppe gewonnen wurden:*

*a) ohne Behandlung (Mediumkontrolle), b) nach kombinierter Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 und 5-Fluorouracil*

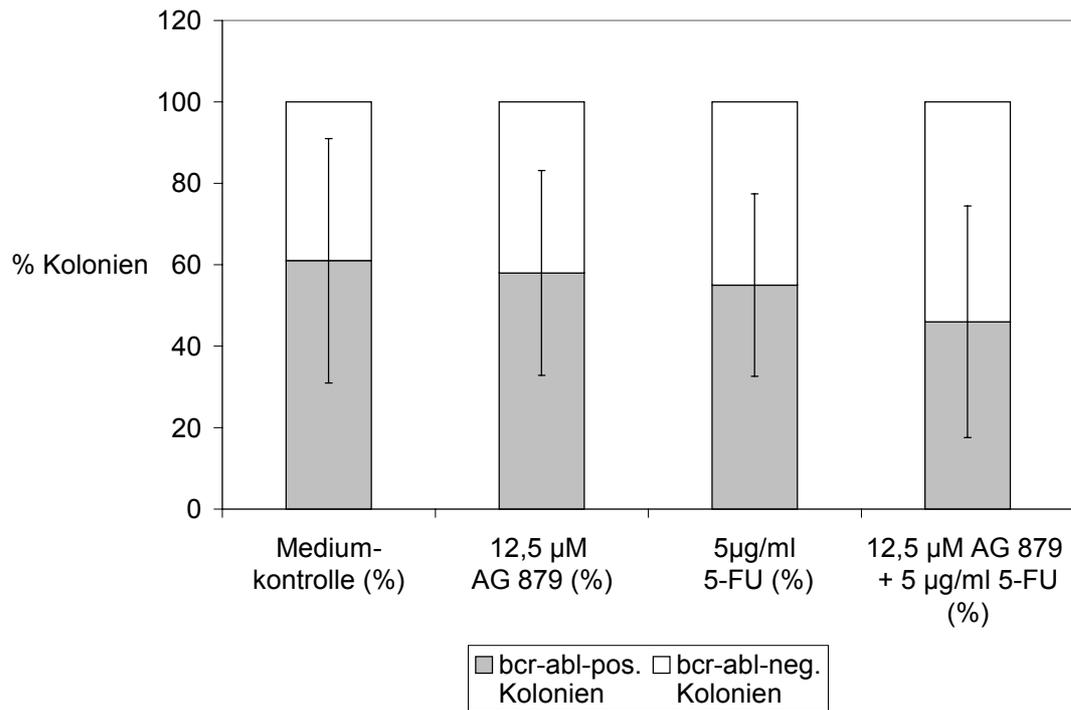
*Obere Reihen: GAPDH-Kontroll-PCR*

*Untere Reihen: bcr-abl-PCR*

*Spur 1: 123-Basenpaarleiter, Spur 2-11: Proben, Spur 12: negative Kontrolle,*

*Spur 13: positive Kontrolle der bcr-abl-PCR*

*(Eine positive Kontrolle der GAPDH-PCR erübrigte sich bei positiver bcr-abl-PCR der Probe.)*



	Mediumkontrolle	AG 879	5-FU	AG 879 + 5-FU
bcr-abl-pos. Kolonien	64.2% ± 30.0 %	62.7% ± 25.1 %	55% ± 22.4 %	50.6% ± 28.4 %
bcr-abl-neg. Kolonien	35.8% ± 30.0 %	37.3% ± 25.1 %	45% ± 22,4 %	49.4% ± 28.4 %

Abb. 15: Verhältnis der bcr-abl-positiven zu den bcr-abl-negativen Kolonien in der Gruppe der CML-Patienten.

## 6. Diskussion

Mit der Entdeckung des Philadelphiachromosoms [102] im Blut von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie konnte zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen einer genetischen Aberration und einer malignen Erkrankung gezeigt werden. Heute geht man davon aus, dass alle malignen Erkrankungen ihren Ursprung in molekulargenetischen Veränderungen haben [116].

Zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie standen bis zur Entwicklung und Etablierung der Tyrosinkinaseinhibitoren nur wenige Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Seit langer Zeit in klinischer Anwendung sind Busulfan und Hydroxycarbamid, wobei in klinischen Studien festgestellt wurde, dass die Therapie mit Hydroxycarbamid einen Überlebensvorteil gegenüber der Therapie mit Busulfan erbringt. Die Nebenwirkungsrate ist bei der Therapie mit diesen Substanzen geringer als mit Interferon [136]. Die einzige zur Zeit verfügbare kurative Therapiemöglichkeit stellt die allogene Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation dar. Allerdings kommt diese Option aufgrund des Alters und der Verfügbarkeit von Spendern nur für etwa 15 – 20 % der Patienten infrage [130]. Für alle anderen Patienten war die Therapie der Wahl für Patienten mit guten Prognosefaktoren und in einem frühen Stadium der chronischen Phase bis vor kurzem die Gabe von Interferon- $\alpha$ , eventuell in Kombination mit Cytarabin oder Hydroxycarbamid [62]. Eine Weiterentwicklung des Interferons stellt das Polyethylenglycol-Interferon (PEG-Interferon) dar. Wegen seiner längeren Halbwertszeit muss es nur einmal pro Woche verabreicht werden. Seine Wirksamkeit ist höher als die des Interferon- $\alpha$ , da höhere Plasmaspiegel erreicht werden (höhere AUC), ohne dass hierbei die Toxizität steigt. Mit dieser Substanz konnten daher auch Erfolge bei Patienten erzielt werden, die auf Interferon- $\alpha$  nicht ansprachen. In einer Phase-I-Studie wurden bereits gute therapeutische Ergebnisse erzielt [15,44,141].

Neben diesen etablierten Verfahren und den Tyrosinkinaseinhibitoren gibt es noch weitere Entwicklungen, die auf eine spezifische Hemmung der bcr-abl-m-RNA, der Tyrosinkinase oder eines Proteins aus der Signaltransduktionskaskade des P210<sup>bcr-abl</sup> abzielen. Hierzu gehören die Antisense-Oligonukleotide. Es handelt sich um Oligonukleotide mit einer Länge von etwa zwanzig Nukleotiden, die komplementär zur Bruchpunktregion auf der bcr-abl-m-RNA sind. Mit ihr bilden sie RNA-DNA-Komplexe, welche dann von dem zellulären Enzym RNAse H abgebaut werden. Schwierigkeiten beim Einsatz dieser Moleküle bereiten allerdings ihre

kurze Halbwertszeit und ihre erschwerte intrazelluläre Aufnahme. Es wurden verschiedene Modifikationen an den Oligonukleotiden vorgenommen, um sie stabiler zu machen und ihre intrazelluläre Aufnahme zu erleichtern, so dass 1998 bereits die erste klinische Studie durchgeführt werden konnte, in denen die Antisense-Oligonukleotide zum Aufreinigen (purging) von peripheren Blutstammzellen bei der autologen Stammzelltransplantation eingesetzt wurden [22,33]. Dabei wurde in jedem Fall eine komplette hämatologische Remission erreicht, in einigen Fällen auch zytogenetische Remissionen. Ein Langzeitüberlebensvorteil ergab sich aber nicht. Möglicherweise können die Ergebnisse durch Kombination mit Antisense-Oligonukleotiden verbessert werden, die gegen m-RNA-Moleküle gerichtet sind, welche für andere Proteine in der Signaltransduktionskaskade des P210<sup>bcr-abl</sup> kodieren. Auch Kombinationen mit konventionellen Zytostatika sind denkbar [44,123]. Erste in-vitro Erfolge wurden mit modifizierten Antisense-Oligonukleotiden erzielt, den PNA (Peptidnukleinsäuren). Es handelt sich um Hybridmoleküle bestehend aus einem Peptid und einer RNA-Sequenz, die komplementär zur Bruchpunktregion der bcr-abl-m-RNA mit b2a2-Translokation ist. Man geht davon aus, dass es hierbei nicht zu einer Spaltung des RNA-RNA-Komplexes durch RNase H kommt, sondern dass die Translation sterisch gehemmt wird [118].

Ein ähnliches Prinzip wie mit den Antisense-Oligonukleotiden verfolgt man mit der Entwicklung der Ribozyme. Dies sind RNA-Moleküle mit einer katalytischen Domäne, welche von Sequenzen flankiert wird, die komplementär zu bestimmten RNA-Molekülen sind und diese daher spezifisch binden. Gegen die Bruchpunktregion der bcr-abl-m-RNA gerichtete Ribozyme können diese folglich spezifisch binden, sie zerschneiden und anschließend an die nächste bcr-abl-m-RNA binden. In vitro-Untersuchungen an bcr-abl-positiven Zelllinien und an Knochenmarkzellen bcr-abl-positiver CML-Patienten mit entsprechenden Ribozymen wurden bereits erfolgreich durchgeführt [98,106,139]. Auch erste Tierversuche zeigten vielversprechende Ergebnisse [143]. Der mögliche Einsatzbereich der Ribozyme liegt ebenso wie der der Antisense-Oligonukleotide in der Aufreinigung (Purging) des Transplantats bei autologer peripherer Blutstammzelltransplantation. Maxizyme und DNazyme sind Weiterentwicklungen der Ribozyme mit zum Teil besserer Wirksamkeit [5].

Bei der allogenen Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation hat der Graft-versus-Leukemia-Effekt als Immunantwort von Spender-T-Lymphozyten gegen die verbliebenen malignen Zellen des Empfängers einen wesentlichen Anteil an der Remission. Patienten mit einem Rezidiv der Erkrankung nach allogener Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation konnten durch die Infusion von Spender-T-Lymphozyten daher in eine erneute Remission überführt werden [81,82]. Ausgehend von dieser Feststellung hat man Impfstrategien gegen

Bestandteile des P210<sup>bcr-abl</sup>, die mittels MHC-Molekülen an der Oberfläche der malignen Zellen präsentiert werden [12,27], entwickelt [11,146,162]. In einer Phase-I-Studie wurde bereits gezeigt, dass durch die Immunisierung mit diesen spezifischen Proteinen – Aminosäuresequenzen aus der Bruchpunktregion des P210<sup>bcr-abl</sup>, ausgehend von der b3a2-Translokation – eine spezifische Immunreaktion ausgelöst werden kann. Der klinische Erfolg konnte in dieser Studie nicht untersucht werden, da die Patienten weiterhin ihre vorherige etablierte anti-leukämische Therapie, zum Beispiel Interferon- $\alpha$ , erhielten [112]. In einer anderen Studie wurden dendritische Zellen aus Leukapherese-Präparaten bcr-abl-positiver CML-Patienten isoliert, ex vivo gegenüber bcr-abl-Peptiden exponiert und den Patienten zurückgegeben. Auch hier wurde eine spezifische Immunreaktion mit Bildung zytotoxischer T-Lymphozyten gegen bcr-abl-Peptide nachgewiesen, ohne dass jedoch eine klinische Reaktion beobachtet werden konnte [140]. Beide Studien kommen zu dem Schluss, dass für eine erfolgreiche Vaccinierung zunächst die Reduktion der Tumorlast erforderlich ist. Dies könnte beispielsweise durch eine vorangestellte intensive konventionelle zytostatische Therapie oder eine Stammzelltransplantation erreicht werden [112,140]. Bei Untersuchungen der bcr-abl-positiven Zellkulturlinie K562 wurden in letzter Zeit insgesamt 16 verschiedene Leukämie-assoziierte Antigene (LAA) identifiziert, mithilfe derer möglicherweise eine polyvalente Vaccine zur Therapie der chronischen myeloischen Leukämie entwickelt werden kann [59].

Bei Rezidiven nach allogener Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation kann durch die Infusion von Spender-T-Lymphozyten über den Graft-versus-leukemia-Effekt eine erneute Remission erzielt werden. Dieses Prinzip macht man sich auch bei den sogenannten Mini-Transplantationen zunutze. Als Konditionierung wird hierbei ein nicht-myeloablatives Verfahren angewandt, da das Ziel der Transplantation nicht der komplette Knochenmarkerersatz durch Spenderzellen sondern die Übertragung von Spender-T-Lymphozyten ist, die auf immunologischem Weg antileukämisch wirken [6, 123,130].

Eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktionskaskade des bcr-abl spielt das Onkoprotein Ras. Seine Wirkung kann durch Farnesyltransferaseinhibitoren gehemmt werden. Sie verhindern die Bindung des Ras-Onkoproteins an die Zellmembran, welche für die onkogene Wirkung des Ras unabdingbar ist [51]. In der Zellkultur und im Tierversuch führten Farnesyltransferaseinhibitoren zu einer erheblichen Reduktion bcr-abl-positiver Zellen, selbst wenn diese resistent gegenüber dem Tyrosinkinaseinhibitor STI 571 waren [69,111]. In ersten klinischen Studien wurden jedoch bisher nur vorübergehende hämatologische mit partiellen zytogenetischen Remissionen erzielt [25]. Der Ras-MAPK-Signaltransduktionsweg wird außerdem durch MEK-Inhibitoren gehemmt. Drei Substanzen wurden bisher entwickelt, die eine

gute antileukämische Wirkung auf bcr-abl-positive Zelllinien haben und einen Synergismus mit STI 571 aufweisen [5].

Weitere Erfolge konnten mit zwei neuentwickelten Zytostatika erzielt werden. Das Homoharringtonin ist ein pflanzliches Alkaloid. Hiermit wurde in ersten klinischen Studien ein hoher Prozentsatz an hämatologischen und zytogenetischen Remissionen erzielt, zum Teil mit besseren Ergebnissen als mit Interferon- $\alpha$ . Kombinationen mit Interferon- $\alpha$  oder Cytarabin oder beiden Substanzen zeigen vielversprechende Erfolge [44,78,103,104]. Das Cytidin-Analogon Decitabin (5-Aza-2'-Deoxycytidin) bewirkt durch Hemmung der Methyltransferase eine Demethylierung der DNA. Insbesondere in Tumorzellen beobachtet man häufig Hypermethylierungen im Bereich von Tumorsuppressorgenen, was zu einer unkontrollierten Proliferation führt. Durch Gabe von Decitabin können diese Tumorsuppressorgene wieder reaktiviert werden [72]. In ersten klinischen Studien wurden hiermit gute Erfolge bei Patienten in der akzelebrierten Phase und in der Phase der Blastenkrise erzielt [77]. Hauptnebenwirkung dieser beiden Medikamente ist die zum Teil prolongierte Myelosuppression.

Eine neuere Entwicklung stellt das Leptomycin B dar. Es hemmt den Transport des P210<sup>bcr-abl</sup> aus dem Kern in das Zytoplasma, wo es sich regulär aufhält. Akkumulation von P210<sup>bcr-abl</sup> im Kern wirkt antileukämisch, indem es die Apoptose anstößt. Die Kombination dieser Substanz mit STI 571 erweist sich in in-vitro-Untersuchungen mit der Zelllinie K562 als gut wirksam. Da Leptomycin B neurotoxisch ist, ist seine Anwendung in vivo problematisch. Ein mögliches Einsatzgebiet für diese Substanz ist aber das ex-vivo-purging bei der autologen Stammzelltransplantation [5].

Der Pilz-Metabolit Wortmannin und sein synthetisches Analogon LY294002 hemmen die Phosphatidylinositol-3-Kinase und entfalten hierüber ihr antileukämisches Potential. Mit STI 571 wirken sie synergistisch [5].

Das Benzoquinon Ansamycin-Antibiotikum Geldanamycin und sein weniger toxisches Analogon 17-AAG bewirken die Degradierung des P210<sup>bcr-abl</sup> und erwiesen sich in vitro auch wirksam gegenüber STI 571-resistenten Zelllinien [5].

Die bisher einzige kurative Therapieoption, die allogene Knochenmark- oder periphere Blutstammzelltransplantation, bleibt vielen Patienten in Ermangelung eines passenden Geschwister- oder Fremdspenders verwehrt. Für diese Patienten ist die autologe periphere Blutstammzelltransplantation eine mögliche therapeutische Option. Problem dieses Verfahrens ist allerdings, dass mit dem Transplantat bcr-abl-positive Leukämiezellen zurückgegeben werden können und die Patienten ein frühes Rezidiv erleiden [32,142]. Da das krankheitsfreie Überleben bei bcr-abl-negativen Transplantaten erwartungsgemäß länger ist als bei bcr-abl-

positiven [85], ist man bestrebt, das Transplantat nach der Entnahme aufzureinigen (Purging), indem man die bcr-abl-positiven Zellen herauslöst. Hierzu werden eine Reihe der oben genannten neu entwickelten Substanzen und insbesondere auch die Tyrphostine eingesetzt.

Die Entdeckung und Entwicklung der Tyrosinphosphokinaseinhibitoren stellt ein effektives und spezifisches Prinzip dar. Das Produkt einer genetischen Aberration zu hemmen, um dadurch die maligne Transformation und ungehemmte Proliferation der Philadelphia-positiven Zellen zu verhindern, hat potentiell therapeutischen Modellcharakter. Den primären und sekundären Resistenzen gegen Tyrphostine, die in den bereits durchgeführten klinischen Studien beobachtet wurden, versucht man zu begegnen, indem man sie mit anderen Substanzen kombiniert. In dieser Arbeit wurde versucht, die Wirkung des Tyrphostins AG 879 durch die zusätzliche Gabe des konventionellen Zytostatikums 5-Fluorouracil zu steigern.

In den Vorversuchen wurde zunächst die Dosierung des Tyrphostins AG 879 ermittelt, die bei der bcr-abl-positiven Zelllinie BV-173 zu einer Wachstumshemmung auf etwa 30 % führte. Die zusätzliche Gabe des Zytostatikums 5-Fluorouracil 24 Stunden nach Inkubation mit dem Tyrphostin erfolgte in einer Dosierung, die zu einer Wachstumshemmung um weitere 15 % führte.

Die Vorversuche wurden parallel auch mit der bcr-abl-positiven Zelllinie K 562 durchgeführt. Hierbei fiel auf, dass diese Zelllinie gegenüber allen verwendeten Substanzen, insbesondere gegenüber dem 5-Fluorouracil, am unempfindlichsten war. Im Gegensatz zur Zelllinie BV-173 weist die Linie K 562 neben der bcr-abl-Translokation noch viele zusätzliche genetische Aberrationen auf, wie sie bei Patienten in der Blastenkrise auftreten [88]. Diese Aberrationen führen zu einer weitgehenden Chemotherapie-Resistenz mit geringerer Empfindlichkeit gegenüber 5-Fluorouracil. Die Behandlung mit dem Tyrphostin AG 879 führte jedoch auch bei dieser Zelllinie zu einer Wachstumshemmung auf im Mittel 36 %. Auf zahlreiche Tyrphostine reagiert sie dagegen weitgehend unempfindlich [4].

Bei der Zelllinie HL-60 wäre eigentlich ein schwächerer wachstumshemmender Effekt des Tyrphostins zu erwarten gewesen, da hier keine bcr-abl-Translokation besteht und damit auch keine vermehrte Tyrosinkinaseaktivität messbar ist. Die Tatsache, dass auch bei dieser Zelllinie das Wachstum durch das Tyrphostin AG 879 deutlich gehemmt wurde, weist darauf hin, dass neben der Hemmung der bcr-abl-Tyrosinkinase zusätzlich ein unspezifischer toxischer Effekt auf die Zellen einwirkt. Dieser ist möglicherweise durch Hemmung anderer zellulärer Tyrosinkinasen bedingt, wie für verschiedene Tyrphostine beschrieben [18].

Bei der Untersuchung der Wirkung der Kombination von Tyrphostin AG 879 und 5-Fluorouracil auf das Koloniewachstum von Knochenmarkzellen von Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie sowie von Patienten aus einer Kontrollgruppe zeigte sich in beiden Gruppen eine sehr deutliche Hemmung des Koloniewachstums sowohl durch die Einzelsubstanzen als auch durch die kombinierte Gabe von 5-Fluorouracil und AG879. Dabei fand sich nach Behandlung mit dem Tyrphostin allein kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Reduktion der Koloniezahlen. Dies entspricht den Ergebnissen der Vorversuche und weist auf einen zusätzlichen unspezifischen toxischen Effekt des Tyrphostins hin. Im Gegensatz hierzu führte die Behandlung mit 5-Fluorouracil allein und in Kombination mit dem Tyrphostin AG 879 in der Gruppe der CML-Patienten zu einer deutlicheren Reduktion des Koloniewachstums als in der Kontrollgruppe, was für einen spezifischen hemmenden Effekt der Kombinationstherapie auf bcr-abl-positive Zellen sprechen könnte.

Die Wirksamkeit der Behandlung der Knochenmarkzellen mit den verschiedenen Substanzen sollte sich neben der Reduktion der Gesamtzahl der Kolonien auch in einer Verschiebung der Koloniegrößen hin zu kleineren Kolonien zeigen. Dies ließ sich sowohl in der Gruppe der CML-Patienten als auch in der Kontrollgruppe nachweisen. Bei beiden Patientengruppen ließ sich bezüglich der Koloniegrößen kein Unterschied zwischen der Behandlung mit den Einzelsubstanzen und der Kombinationstherapie nachweisen.

Durch die Untersuchung einzelner Kolonien der Colony-Assays aus der Gruppe der CML-Patienten sollte gezeigt werden, ob es durch die Behandlung zum Untergang bcr-abl-positiver koloniebildender Zellen, damit zu einem Wachstumsvorteil bcr-abl-negativer koloniebildender Zellen und dadurch zur einer vermehrten Bildung bcr-abl-negativer Kolonien kommt. Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht im signifikanten Ausmaß nachweisen. Der Anteil der bcr-abl-positiven und bcr-abl-negativen Kolonien war im Mittel in allen vier Versuchsansätzen gleich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Behandlung von Knochenmarkzellen sowohl mit 5-FU als auch mit dem Tyrphostin AG 879 als auch mit der Kombination beider Substanzen einen erheblichen toxischen Effekt auf die koloniebildenden Zellen hat. Dieser zeigt sich in der Reduktion der Koloniezahlen und in einer Verschiebung der Relation von größeren zu kleineren Kolonien im Colony Assay. Ein Unterschied zwischen Knochenmarkzellen von Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie und Knochenmarkzellen von Patienten aus der Kontrollgruppe lässt sich nur bezüglich der Behandlung mit 5-Fluorouracil nachweisen, das auf die Knochenmarkzellen der CML-Patienten einen stärkeren

ren Effekt hat als auf die der Kontrollgruppe. Die Wirkung des Tyrphostins allein unterscheidet sich bei der Behandlung der Knochenmarkzellen von CML-Patienten und von Patienten aus der Kontrollgruppe nicht. Eine signifikante Wachstumshemmung bcr-abl-positiver zugunsten bcr-abl negativer koloniebildender Zellen findet nicht statt.

Das Prinzip, antileukämische Substanzen mit Hilfe eines Kolonie-Assays und anschließender Untersuchung der Kolonien durch die Polymerasekettenreaktion *in vitro* zu testen, ist die Methode der Wahl bei der Entwicklung von Medikamenten gegen die chronische myeloische Leukämie. Hiermit werden sowohl Einzelsubstanzen als auch Zytostatikakombinationen vor der Durchführung von *in vivo*-Studien untersucht. Translokationen können mittels der Polymerasekettenreaktion selbst in sehr wenigen Zellen, wie sie in dieser Arbeit in den Kolonien vorlagen, nachgewiesen werden. Man benötigt hierzu ein PCR-Protokoll mit hoher Sensitivität, wie es das nested-Protokoll darstellt. Um falsch negative Ergebnisse auszuschließen, wurde jede Kolonie in vier einzelnen PCR-Ansätzen untersucht. Gleichzeitig ist mit der hohen Sensitivität auch die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen verbunden. Um Kontaminationen zu vermeiden, mussten daher die einzelnen Arbeitsschritte sehr sorgfältig und räumlich voneinander getrennt durchgeführt werden. Aufgrund dieses hohen Arbeitsaufwandes kann im Rahmen derartiger Untersuchungen jeweils nur eine begrenzte Anzahl von Knochenmarkaspiraten bcr-abl-positiver und –negativer Patienten in die Versuche einbringen. Die ersten Untersuchungen des Tyrphostins STI 571 wurden daher ebenfalls mit einer geringen Probenzahl durchgeführt - sechs Knochenmarksaspirate von Kontrollpersonen und sieben von CML-Patienten. Wie die Untersuchungen von Druker und seinen Mitarbeitern gezeigt haben, ist diese Probenzahl jedoch durchaus geeignet, erste Aussagen über die antileukämische Wirksamkeit einer Substanz bzw. der Kombination von Substanzen zu machen (40).

Ein möglicher Einfluss der jeweiligen Vorbehandlung der Patienten mit Hydroxyurea oder Interferon- $\alpha$  auf die Versuche wurde dadurch minimiert, dass die Patienten das Medikament eine Woche vor der geplanten Knochenmarkpunktion aussetzten. Aufgrund der relativ geringen Inzidenz der Erkrankung war es leider nicht möglich, nur Knochenmarkzellen von Patienten in die Versuche einzubringen, bei denen die Erkrankung erstmals diagnostiziert wurde und die daher keine Vorbehandlung erfahren hatten.

Die praktischen Versuche zu dieser Arbeit wurden durchgeführt, bevor die ersten *in-vitro*- und Tierversuche mit STI 571 publiziert wurden. Daher kam das Tyrphostin AG 879 zum Einsatz und nicht STI 571, welches sich im Nachhinein als potenter erwiesen hat. Sicherlich wäre es interessant und vielversprechend, die Wirksamkeit der Kombination von STI 571 und 5-Fluorouracil zu testen. Da bereits Resistenzen gegenüber STI 571 beobachtet werden, wird

die Kombination dieser Substanz mit einem anderen Zytostatikum wie zum Beispiel dem 5-Fluorouracil in Zukunft unerlässlich sein.

## 7. Zusammenfassung

Zur Therapie der chronischen myeloischen Leukämie liegen eine Reihe verschiedenster Therapiekonzepte vor, von denen derzeit einzig die allogene Knochenmark- oder periphere Blutstammzelltransplantation kurative Ansätze darstellen. Die in den letzten Jahren entwickelten Tyrosinkinaseinhibitoren, namentlich STI 571 (Gleevec, Glivec) stellen ein neues erfolgversprechendes Therapiekonzept für Patienten dar, bei denen eine Transplantation nicht angezeigt ist.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob die wachstumshemmende Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors AG 879 auf bcr-abl-positive klonogene Knochenmarkzellen durch die zusätzliche Gabe des Zytostatikums 5-Fluorouracil gesteigert werden kann.

Mit Hilfe der bcr-abl-positiven Zelllinien K562 und BV-173 sowie der bcr-abl-negativen Zelllinie HL 60 wurden zunächst die Konzentrationen von 12,5  $\mu$ M Tyrphostin AG 879 und 5 mg/ $\mu$ l 5-FU ermittelt, die eine optimale Hemmwirkung auf das Wachstum klonogener Zellen ausüben.

Anschließend wurden Knochenmarkzellen von 9 Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie und von 10 Patienten eines Kontrollkollektivs mit Tyrphostin AG 879 und 5-FU jeweils einzeln und in Kombination in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt und ihre Fähigkeit zur Koloniebildung untersucht. Sowohl bei der Patientengruppe als auch bei der Kontrollgruppe zeigte sich durch die Kombinationsbehandlung eine signifikante Wachstumshemmung anhand der Anzahl der Kolonien im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz. Die Zahl der Kolonien war in der Kontrollgruppe auf 28,7% ( $\pm$  13,8%) nach der Kombinationsbehandlung, 48,1% ( $\pm$  19,2%) nach der Behandlung mit Tyrphostin AG 879 und 45,7% ( $\pm$  23,1%) nach der Behandlung mit 5-FU reduziert. In der Patientengruppe war die Zahl der Kolonien nach der Kombinationsbehandlung auf 16,7% ( $\pm$  11,4%), nach der Behandlung mit Tyrphostin AG 879 auf 32,8% ( $\pm$  24,4%) und nach der Behandlung mit 5-FU auf 29,2% ( $\pm$  18,1%) reduziert. In beiden Gruppen ist die Reduktion der Kolonienzahlen gegenüber der Mediumkontrolle und gegenüber den Behandlungsansätzen mit den Einzelsubstanzen statistisch signifikant. Die Reduktion der Kolonienzahlen nach der Kombinationsbehandlung und nach der Behandlung mit 5-FU ist in der Patientengruppe signifikant stärker als in der Kontrollgruppe.

Der wachstumshemmende Effekt der Kombinationsbehandlung mit 5-FU und

Tyrphostin AG 879 zeigt sich außerdem in der Verschiebung der Koloniegrößen zu kleineren Kolonien. Dieser Effekt wurde sowohl in der Patientengruppe als auch in der Kontrollgruppe beobachtet.

CML-Patienten besitzen neben den malignen klonogenen Zellen mit bcr-abl-Translokation auch noch gesunde bcr-abl-negative klonogene Zellen im Knochenmark. Die wichtigste Untersuchung hinsichtlich der Fragestellung, ob eine Kombinationstherapie mit 5-FU und Tyrphostin AG 879 zu einer Wachstumshemmung bcr-abl-positiver klonogener Knochenmarkzellen führt, ist daher die Untersuchung der Kolonien auf die bcr-abl-Translokation mittels der Polymerasekettenreaktion. In der Mediumkontrolle betrug der Anteil bcr-abl-positiver Kolonien  $64,2 \% \pm 30,0 \%$ . Der Anteil der bcr-abl-positiven Kolonien ist nach der Kombinationstherapie ( $50,6 \% \pm 28,4 \%$ ) und auch nach der Behandlung mit Tyrphostin AG 879 ( $62,7 \% \pm 25,1 \%$ ) und 5-FU ( $55,0 \% \pm 22,4 \%$ ) zwar geringer als in der Mediumkontrolle, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Zytostatikum 5-Flourouracil, der Tyrosinkinaseinhibitor AG 879 und die Kombination beider Substanzen klonogene Knochenmarkzellen von Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie stärker hemmen als klonogene Knochenmarkzellen eines Kontrollkollektivs. Signifikante Unterschiede bezüglich der Anteile bcr-abl-positiver und bcr-abl-negativer Kolonien bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie gegenüber der Mediumkontrolle bestehen nach den verschiedenen Behandlungen nicht.

---

## 8. Literatur

1. Abelson, H. T., Rabstein, L. S.  
Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice  
Cancer Res 30: 2213–2222, 1970.
2. Afar, D. E. H., Mc Laughlin, J., Sherr, C. J., Witte, O. N., Roussel, M. F.  
Signalling by abl oncogenes through cyclin D 1  
Proc Natl Acad Sci USA 92: 9540-9544, 1995.
3. Anafi, M., Gazit, A., Gilon, C., Ben-Neriah, Y., Levitzki, A.  
Selective interactions of transforming and normal abl proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrphostins  
J Biol Chem 267: 4518-4523, 1992.
4. Anafi, M., Gazit, A., Zehavi, A., Ben-Neriah, Y., Levitzki, A.  
Tyrphostin-induced inhibition of p210<sup>bcr-abl</sup> tyrosine kinase activity induces K562 to differentiate  
Blood 82: 3524-3529, 1993.
5. Barnes, D. J., Melo, J. V.  
Management of chronic myeloid leukemia: targets for molecular therapy  
Semin Hematol 40: 34-49, 2003.
6. Barrett, J.  
Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia  
Semin Hematol 40: 59-71, 2003.
7. Ben-Neriah, Y., Bernards, A., Paskind, M., Daley, G. Q., Baltimore, D.  
Alternative 5' exons in c-abl mRNA  
Cell 44: 577-586, 1986.
8. Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A.-M., Witte, O. N., Baltimore, D.  
The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene  
Science 233: 212-214, 1986.

- 
9. Besmer, P., Hardy Jr W. D., Zuckermann, E. E., Bergold, P., Lederman, L., Snyder Jr, H. W.  
The Hardy-Zuckerman 2-FeSV, a new feline retrovirus with oncogene homology to Abelson-MuLV  
Nature 303: 825-828, 1983.
  10. Bernards, A., Rubin, C. M., Westbrook, C. A., Paskind, M., Baltimore, D.  
The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia  
Mol Cell Biol 7: 3231-3236, 1987.
  11. Bocchia, M., Korontsvit, T., Xu, Q., Mackinnon, S., Yang, S. Y., Sette, A., Scheinberg, D. A.  
Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides  
Blood 87: 3587-3592, 1996.
  12. Bocchia, M., Wentworth, P. A., Southwood, S., Sidney, J., McGraw, K., Scheinberg, D. A., Sette, A.  
Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules  
Blood 85: 2680-2684, 1995.
  13. O'Brien, S., Talpaz, M., Cortes, J., Shan, J., Giles, F. J., Faderl, S., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Mallard, S., Rios, M. B., Koller, C., Kornblau, S., Andreeff, M., Murgu, A., Keating, M., Kantarjian, H. M.  
Simultaneous homoharringtonine and interferon- $\alpha$  in the treatment of patients with chronic-phase myelogenous leukemia  
Cancer 94: 2024-2032, 2002.
  14. Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., Lydon, N. B.  
Inhibition of the abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylamino-pyrimidine derivative  
Cancer Res 56: 100-104, 1996.
  15. Bukowski, R. M., Tandler, C., Cutler, D., Rose, E., Laughlin, M. M., Statkevich, P.  
Treating cancer with PEG intron  
Cancer 95: 389-396, 2002
  16. Canaani, E., Steiner-Saltz, D., Aghai, E., Gale, R. P., Berrebi, A., Januszewicz, E.  
Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukemia  
Lancet North Am Ed, March 17: 593-595, 1984.

- 
17. Capdeville, R., Silbermann, S., Dimitrijevic, S.  
Imatinib: the first 3 years  
*Eur J Cancer* 38, Suppl. 5: S77-S82
  
  18. Carlo-Stella, C., Dotti, G., Mangoni, L., Regazzi, E., Garau, D., Bonati, A., Almici, C., Sammarelli, G., Savoldo, B., Rizzo, M. T., Rizzoli, V.  
Selection of myeloid progenitors lacking bcr-abl mRNA in chronic myelogenous leukemia patients after in vitro treatment with the tyrosine kinase inhibitor Genistein  
*Blood* 88: 3091-3100, 1996.
  
  19. Carpino, N., Wisniewski, D., Strife, A., Marshak, D., Kobayashi, R., Stillman, B., Clarkson, B.  
p62<sup>dok</sup>: A constitutively tyrosine-phosphorylated, GAP-associated protein in chronic myelogenous leukemia progenitor cells  
*Cell* 88: 197-204, 1997.
  
  20. Carroll, M., Ohno-Jones, S., Tamura, S., Buchdunger, E., Zimmermann, J., Lydon, N. B., Gilliland, D. G., Druker, B. J.  
CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing bcr-abl, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins  
*Blood* 90: 4947-4952, 1997.
  
  21. Chan, L. C., Karhi, K. K., Rayter, S. I., Heisterkamp, N., Eridani, S., Powles, R., Lawler, S. D., Groffen, J., Foulkes, J. G., Greaves, M. F., Wiedemann, L. M.  
A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia  
*Nature* 325: 635-637, 1987.
  
  22. Clark, R. E.  
Antisense therapeutics in chronic myelogenous leukemia: the promise, the progress and the problems  
*Leukemia* 14: 347-355, 2000.
  
  23. Clark, S. S., McLaughlin, J., Timmons, M., Pendergast, A. M., Ben-Neriah, Y., Dow, L. W., Crist, W., Rovera, G., Smith, S. D., Witte, O. N.  
Expression of a distinctive bcr-abl oncogene in Ph<sup>1</sup>-positive acute lymphocytic leukemia (ALL)  
*Science* 239: 775-777, 1988.

- 
24. Collins, S. J., Gallo, R. C., Gallagher, R. E.  
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukemic cells in suspension culture  
Nature 270: 347-349, 1977.
25. Cortes, J., Albitar, M., Thomas, D., Giles, F., Kurzrock, R., Thibault, A., Rackoff, W., Koller, C., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Talpaz, M., Kantarjian, H.  
Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies  
Blood 101: 1692-1697, 2003
26. Cortez, D., Kadlec, L, Pendergast, A. M.  
Structural and signaling requirements for bcr-abl-mediated transformation and inhibition of apoptosis  
Mol Cell Biol 15: 5531-5541, 1995.
- 27 Cullis, J. O., Barrett, A. J., Goldman, J. M., Lechler, R. I.  
Binding of bcr-abl junctional peptides to major histocompatibility complex (MHC) class I molecules: studies in antigen-processing defective cell lines  
Leukemia 8: 165-170, 1994.
28. Daley, G. Q., Baltimore, D.  
Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210<sup>bcr/abl</sup> protein  
Proc Natl Acad Sci USA 85: 9312-9316, 1988.
29. Daley, G. Q., van Etten, R. A., Baltimore, D.  
Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210<sup>bcr/abl</sup> gene of the Philadelphia chromosome  
Science 247: 824-830, 1990.
30. Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., Lydon, N., Melo, J. V.  
The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148B selectively inhibits the growth of bcr-abl positive cells  
Blood 90: 3691-3698, 1997.
31. Deininger, M. W. N., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J. M., Melo, J. V.  
Bcr-abl tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia  
Cancer Res 60:2049-2055, 2000.

- 
32. Deisseroth, A. B., Zu, Z., Claxton, D., Hanania, E. G., Fu, S., Ellerson, D.,  
Genetic marking shows that Ph<sup>+</sup> cells present in autologous transplants of chronic  
myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in  
CML.  
Blood 83: 3068-3076, 1994.
33. de Fabritiis, P., Petti, M. C., Montefusco, E., De Propriis, M. S., Paggi, M. G.,  
Nierborowska-Skorska, M., Lisci, A., Buffolino, S., Campbell, K., Geiser, T., Calabretta,  
B.,  
Bcr-abl antisense oligodeoxynukleotide in vitro purging and autologous bone marrow  
transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in advanced phase  
Blood 91, 3156-3162, 1998.
34. de Klein, A., van Kessel, A. G., Grosveld, G., Bartram, C. R., Hagemeijer, A.,  
Bootsma, D., Spurr, N. K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J. R.  
A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic  
leukemia  
Nature 330: 765-767, 1982.
35. Druker, B. J.  
Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted  
therapy  
Eur J Cancer 38, Suppl. 5: S70-S76, 2002.
36. Druker, B. J.  
Inhibition of the bcr-abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML  
Oncogene 21: 8541-8546, 2002.
37. Druker, B. J.  
Imatinib alone and in combination for chronic myeloid leukemia  
Semin Hematol 40: 50-58, 2003.
38. Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M.,  
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 344: 1038-1042, 2001

- 
39. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C. L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia  
N Engl J Med 344: 1031-1037, 2001
40. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N. B. Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells  
Nat Med 2: 561-566, 1996.
41. Elefanty, A. G., Hariharan, I. K., Cory, S. Bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice  
EMBO J 9: 1069-1078, 1990.
42. Ellis, C., Moran, M., Mc Cormick, F., Pawson, T. Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases  
Nature (London) 343: 377-381, 1990.
43. Emanuel, P. D., Snyder, R. C., Wiley, T., Gopurala, B., Castleberry, R. P. Inhibition of juvenile myelomonocytic leukemia cell growth in vitro by farnesyltransferase inhibitors  
Blood 95: 639-645, 2000.
44. Faderl, S., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., O'Brien, S. New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia  
Semin Oncol 27: 578-586, 2000.
45. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H. M. The biology of chronic myeloid leukemia  
N Engl J Med 341: 164-172, 1999.
46. Fainstein, E., Marcelle, C., Rosner, A., Canaani, E., Gale, R. P., Drezzen, O., Smith, S. D., Croce, C. M. A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia  
Nature 330: 386-388, 1987.

- 
47. Frackelton Jr., A.R., Kumar, P. S., Kannan, B., Clark, J. W.  
Tyrosine phosphorylated proteins in chronic myelogenous leukemia  
Leuk Lymphoma 11, Suppl. 1: 125-129, 1993.
48. Franz, W. M., Berger, P., Wang, J. Y. J.  
Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential  
EMBO J 8: 137-147, 1989.
49. Gale, R. P., Canaani, E.  
An 8-kilobase abl RNA transcript in chronic myelogenous leukemia  
Proc Natl Acad Sci USA 81: 5648-5652, 1984.
50. Gazit, A., Osherov, N., Posner, I., Yaish, P., Poradosu, E., Gilon, C., Levitzki, A.  
Tyrosine kinase inhibitors. 2. Heterocyclic and  $\alpha$ -substituted benzylidenemalononitrile tyrosine kinase inhibitors as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases  
J Med Chem 34: 1896-1907, 1991.
51. Gibbs, J. B., Oliff, A., Kohl, N. E.  
Farnesyltransferase inhibitors: ras research yields a potential cancer therapeutic  
Cell 77: 175-178, 1994.
52. Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E. H., Saffran, D. C., Witte, O. N.  
Alternative signals to ras for hematopoietic transformation by the bcr-abl Oncogene  
Cell 82: 981-988, 1995.
53. Goff, S. P., Gilboa, E., Witte, O. N., Baltimore, D.  
Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA  
Cell 22: 777-785, 1980.
54. Goff, S. P., Witte, O. N., Gilboa, E., Rosenberg, N., Baltimore, D.  
Genome structure of Abelson murine leukemia virus variants: proviruses in fibroblasts and lymphoid cells  
J Virol 38: 460-468, 1981.
55. Goldman, J. M.  
Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukemia  
Lancet North Am Ed 355: 1031-1032, 2000.

- 
56. Goldman, J. M., Marks, D. I.  
Chronic myelogenous leukemia  
Blood: Principles and Practice of Hematology, edited by R. I. Handin, T. P. Stossel and S. E. Lux, LB Lippincott Company, 457-471, Philadelphia 1995.
57. Gordon, M. Y., Dowding, C. R., Riley, G. P., Goldman, J. M., Greaves, M. F.  
Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukemia  
Nature 328: 342-344, 1987.
48. Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., Tauchi, T., Boswell, H. S., Broxmeyer, H. E., Toyama, K.  
Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125<sup>FAK</sup>) by BCR-ABL oncoprotein  
Exp Hematol 23: 1153-1159, 1995.
59. Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Hauser, T., Schmitt, A., Dohner, H., Schmitt, M.  
Charakterisation of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia  
Int J Cancer 106: 224-231, 2003
60. Groffen, J., Heisterkamp, N., Reynolds Jr, F. H., Stephenson, J. R.  
Homology between phosphotyrosine acceptor site of human c-abl and viral oncogene products  
Nature 304: 167-169, 1983.
61. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., Grosveld, G.  
Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22  
Cell 36: 93-99, 1984.
62. Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J.-L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., Abgrall, J.-F., Tanzer, J.  
Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia  
N Engl J Med 337: 223-229, 1997.
63. Hariharan, I. K., Harris, A. W., Crawford, M., Abud, H., Webb, E., Cory, S., Adams, J. M.  
A bcr-v-abl oncogene induces lymphomas in transgenic mice  
Mol Cell Biol 9: 2798-2805, 1989.

- 
64. Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J. R. Spurr, N. K., Goodfellow, P. N., Solomon, E., Carritt, B., Bodmer, W. F.  
Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes  
Nature 299: 747-749, 1982.
65. Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pattengale, P. K., Groffen, J.  
Acute leukemia in bcr/abl transgenic mice  
Nature 344: 251-253, 1990.
66. Hermans, A., Heisterkamp, N., von Lindern, M., van Baal, S., Meijer, D., van der Plas, D., Wiedemann, L. M., Groffen, J., Bootsma, D., Grosveld, G.  
Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia  
Cell 51: 33-40, 1987.
67. Honda, H., Ushijima, T., Wakazono, K., Oda, H., Tanaka, Y., Aizawa, S., Ishikawa, T., Yazaki, Y., Hirai, H.  
Acquired loss of p53 induces blastic transformation in P210<sup>bcr-abl</sup>-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML  
Blood 95: 1144-1150, 2000.
68. Honma, Y., Okabe-Kado, J., Hozumi, M., Uehara, Y., Mizuno, S.  
Induction of erythroid differentiation of K562 human leukemic cells by Herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase activity  
Cancer Res 49: 331-334, 1989.
69. Hoover, R. R., Mahon, F.-X., Melo, J. V., Daley, G. Q.  
Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336  
Blood 100: 1068-1071, 2002.
70. Hunter, T., Cooper, J. A.  
Protein-tyrosine kinases  
Annu Rev Biochem 54: 897-930, 1985.
71. Ilaria, R. L., Van Etten, R. A.  
P210 and P190<sup>bcr-abl</sup> induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members  
J Biol Chem 271: 31704-31710, 1996.

- 
72. Issa, J. P., Baylin, S. G., Herman, J. G.,  
DNA methylation changes in hematologic malignancies: biologic and clinical  
implications  
Leukemia 11, Suppl. 1: S7-11, 1997.
73. Jackson, P., Baltimore, D.  
N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of  
c-abl  
EMBO J 8: 449-456, 1989.
74. Jazwiec, B., Mahon, F. X., Pigneux, A., Pigeonnier, V., Reiffers, J.  
5-flourouracil-resistant CD34<sup>+</sup> cell population from peripheral blood of CML patients  
contains bcr-abl-negative progenitor cells  
Exp Hematol 23: 1509-1514, 1995.
75. Käbisch, A.  
Habilitationsschrift  
1998
- 76 Kano, Y., Akutsu, M., Tsunoda, S., Mano, H., Sato, Y., Honma, Y., Furukawa, Y.  
In Vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with  
commonly used antileukemic agents  
Blood 97: 1999-2007, 2001
77. Kantarjian, H. M., O'Brien, S. M., Keating, M., Beran, M., Estey, E., Giralto, S.  
Results of decitabine therapy in the accelerated and blastic phases of chronic myelogenous  
leukemia  
Leukemia 11: 1617-1620, 1997.
78. Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Santini, V., Murgu, A., Cheson, B., O'Brien, S.  
Homoharringtonine: History, current research, and future directions  
Cancer 92: 1591-1605, 2001
79. Kaur, G., Gazit, A., Levitzki, A., Stowe, E., Cooney, D. A., Sausville, E. A.  
Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210<sup>bcr/abl</sup> autokinase  
activity in K 562 chronic myelogenous leukemia  
Anticancer Drugs 5: 213-222, 1994.

- 
80. Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C., Pawson, T.  
SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins  
*Science* 252: 668-674, 1991.
- 81 Kolb, H. J., Mittermüller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., Wilmanns, W.  
Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients  
*Blood* 76: 2462-2465, 1990.
- 82 Kolb, H. J., Schattenberg, A., Goldman, J. M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., van Rhee, F., Mittermueller, J., de Witte, T., Holler, E., Ansari, H.  
Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients  
*Blood* 86: 2041-2050, 1995.
83. Konopka, J. B., Watanabe, S. M., Witte, O. N.  
An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity  
*Cell* 37: 1035-1042, 1984.
84. Konopka, J. B., Witte, O. N.  
Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products  
*Mol Cell Biol* 5: 3116-3123, 1985.
85. Koziner, B., Dengra, C., Lucero, G., Klein, G., Cánepa, C., Milovic, V., Milone, G., Robinson, A., Cerutti, I., Saporito, G, Kusminsky, G., Milone, J., Bordone, J., Lastiri, F.  
Autologous stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia  
*Cancer* 95: 2339-2345, 2002.
86. Latt, S. A., Goff, S. P., Clifford, J. T., Paskind, M., Wang, J. Y.-J., Baltimore, D.  
Cloning and analysis of reverse transcript P160 genomes of Abelson murine leukemia virus  
*J Virol* 45: 1195-1199, 1983.
87. Lowenstein, E. J., Daly, R. J., Batzer, A. G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E. Y., Bar-Sagi, D., Schlessinger, J.  
The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling  
*Cell* 70: 431-442, 1992.

- 
88. Lozzio, C. B., Lozzio, B. B.  
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome  
*Blood* 45: 321-334, 1975.
89. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J., Witte O. N.  
Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products  
*Science* 247:1079-1082, 1990.
90. Lugo, T. G., Witte, O. N.  
The bcr-abl oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc  
*Mol Cell Biol* 9: 1263-1270, 1989.
91. Mahon, F. X., Deininger, M. W. N., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J.,  
Goldman, J. M., Melo, J. V.  
Selection and characterization of bcr-abl positive cell lines with differential sensitivity to  
the tyrosine kinase inhibitor STI 571: diverse mechanisms of resistance  
*Blood* 96: 1070-1079, 2000.
92. Mandanas, R. A., Leibowitz, D. S., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G. S.,  
Miyazawa, K., Jayaram, H. N., Boswell, H. S.  
Role of p21 ras in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells  
*Blood* 82: 1838-1847, 1993.
93. Mayer, B. J., Gupta, R.  
Functions of SH2 and SH3 domains  
*Curr Top Microbiol Immunol*, Springer, 1-22, 1998.
94. McGahon, A., Bissonette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R., Cotter, T. G.  
Bcr-abl maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell  
death.  
*Blood* 83: 1179-1187, 1994.
95. McLaughlin, J., Chianese, E., Witte, O. N.  
In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 bcr-abl oncogene  
product of the Philadelphia chromosome  
*Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6558-6562, 1987.
96. McWhirter, J. R., Wang, J. Y. J.  
Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr  
sequences in bcr/abl fusion proteins  
*Molecular and Cellular Biology* 11: 1553-1565, 1991.

- 
97. Melo, J. V., Talpaz, M., Druker, B.  
Chronic myeloid leukemia: a review  
Trends in Onco-Hematology 7: 56-62, 1999.
98. Mendoza-Maldonado, R., Zentilin, L., Fanin, R., Giacca, M.  
Purging of chronic myelogenous leukemia cells by retrovirally expressed anti-bcr-abl ribozymes with specific cellular compartmentalization  
Cancer Gene Ther 9: 71-86, 2002.
99. Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., Wolfman, A.  
Complexes of Ras-GTP with Raf-1 and Mitogen-Activated Protein Kinase kinase  
Science 260: 1658-1661, 1993.
100. Moran, M. F., Polakis, P., McCormick, F., Pawson, T., Ellis, C.  
Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21<sup>ras</sup> GTPase-activating protein  
Mol Cell Biol 11: 1804-1812, 1991.
101. Muller, A. J., Young, J. C., Pendergast, A.-M., Pondel, M., Landau, N. R., Littman, D. R., Witte, O. N.  
Bcr first exon sequences specifically activate the bcr-abl tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome positive human leukemias  
Mol Cell Biol 11: 1785-1792, 1991.
102. Nowell, P. C., Hungerford, D. A.  
A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia  
Science 132: 1497, 1960.
103. O'Brien, S. M., Kantarjian, H., Keating, M., Beran, M., Koller, C., Robertson, L. E.  
Homoharringtonine therapy induces responses in patients with chronic myelogenous leukemia in late chronic phase  
Blood 86: 3322-3326, 1995.
104. O'Brien, S. M., Kantarjian, H., Koller, C., Feldman, E., Beran, M., Andreeff, M., Giralt, S., Cheson, B., Keating, M., Freireich, E., Rios, M. B., Talpaz, M.  
Sequential homoharringtonine and interferon- $\alpha$  in the treatment of early chronic phase chronic myelogenous leukemia  
Blood 93: 4149-4153, 1999.

- 
105. Okabe, M., Uehara, Y., Miyagishima, T., Itaya, T., Tanaka M., Kuni-Eda, Y., Kurosawa, M., Miyazaki, T.  
Effect of Herbimycin A, an antagonist of tyrosine kinase, on bcr/abl oncoprotein-associated cell proliferations: abrogative effect on the transformation of murine hematopoietic cells by transfection of a retroviral vector expressing oncoprotein P210<sup>bcr/abl</sup> and preferential inhibition on Ph<sup>1</sup>-positive leukemia cell growth  
Blood 80: 1330-1338, 1992.
106. Pachuk, C. J., Yoon, K., Moelling, K., Coney, L. R.  
Selective cleavage of bcr-abl chimeric RNAs by a ribozyme targeted to non-contiguous sequences  
Nucleic Acids Res 22: 301-307, 1994.
107. Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., Rotoli, B.  
Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (bcr-abl with c3/a2 junction)  
Blood 88: 2410-2414, 1996.
108. Pegoraro, L., Matera L., Ritz, J., Levis, A., Palumbo, A., Biagini, G.  
Establishment of a Ph<sup>1</sup>-positive human cell line (BV 173)  
J Natl Cancer Inst 70: 447-453, 1983.
109. Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y., Witte, O. N.  
Bcr sequences essential for transformation by the bcr-abl oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner  
Cell 66: 161-171, 1991.
110. Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., Gishizky, M. L.  
Bcr-abl-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein  
Cell 75: 175-185, 1993.
111. Peters, D., G., Hoover, R. R., Gerlach, M. J., Koh, E. Y., Zhang, H., Choe, K., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Daley, G. Q.  
Activity of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH 66336 against bcr-abl-induced murine leukemia and primary cells from patients with chronic myeloid leukemia  
Blood 97: 1404-1412, 2001

- 
112. Pinilla-Ibarz, J., Cathcart, K., Korontsvit, T., Soignet, S., Bocchia, M., Caggiano, J., Lai, L., Jimenez, J., Kolitz, J., Scheinberg, D. A.  
Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses  
*Blood* 95: 1781-1787, 2000.
113. Prywes, R., Foulkes, J. G., Rosenberg, N., Baltimore, D.  
Sequences of the A-MuLV protein needed for fibroblast and lymphoid cell Transformation  
*Cell* 34: 569-579, 1983.
114. Prywes, R., Hoag, J., Rosenberg, N., Baltimore, D.  
Protein stabilization explains the gag requirement for transformation of lymphoid cells by Abelson murine leukemia virus  
*J Virol* 54: 123-132, 1985.
115. Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pellici, P. G., Arlinghaus, R., Pawson, T.  
Bcr-abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway.  
*EMBO J* 13: 764-773, 1994.
116. Rabbits, T. H.  
Chromosomal translocations in human cancer  
*Nature* 372: 1143-149, 1994.
117. Raitano, A. B., Halpern, J. R., Hambuch, T. M., Sawyers, C. L.  
The bcr-abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation  
*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11746-11750, 1995.
118. Rapozzi, V., Burm, B. E. A., Cogoi, S., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Quadrifoglio, F., Xodo, L., E.  
Antiproliferative effect in chronic myeloid leukaemia cells by antisense peptide nucleic acids  
*Nucleic Acids Res* 30: 3712-3721, 2002
119. Reddy, E. P., Smith, M. J., Srinivasan, A.  
Nucleotide sequence of Abelson murine leukemia virus genome: Structural similarity of its transforming gene product to other onc gene products with tyrosine-specific kinase activity  
*Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3623-3627, 1983.

120. Reynolds, R. K., van de Ven, W. J. M., Stephanson, J. R.  
Abelson murine leukemia virus transformation defective mutants with impaired P120 associated protein kinase activity  
*J Virol* 36: 374-386, 1980.
121. Risser, R., Holland, G. D.  
Structures and activities of activated abl oncogenes  
*Curr Top Microbiol Immunol*, Springer, 129-153, 1989.
122. Rowley, J. D.  
A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining  
*Nature* 243: 290-293, 1973.
123. Saesle, S., Verfaillie, C. M.  
Bcr-abl: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia  
*Oncogene* 21: 8547-8559, 2002.
124. Sánchez-García, I., Grütz, G.  
Tumorigenic activity of the bcr-abl oncogenes is mediated by BCL2  
*Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5287-5291, 1995.
125. Sánchez-García, I., Martín-Zanca, D.  
Regulation of Bcl-2 gene expression by bcr-abl is mediated by ras  
*J Mol Biol* 267, 225-228, 1997.
126. Sawyers, C. L., Callahan, W., Witte, O. N.  
Dominant negative Myc blocks transformation by Abl oncogenes  
*Cell* 70: 901-910, 1992.
127. Sawyers, C. L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., Witte, O.  
The nuclear tyrosine kinase c-ABL negatively regulates cell growth  
*Cell* 77: 121-131, 1994.
128. Sawyers, C. L., McLaughlin, J., Witte, O. N.  
Genetic requirement for ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the bcr-abl oncogene  
*J Exp Med* 181: 307-313, 1995.

- 
129. Scher, C. D., Siegler, R.  
Direct transformation of 3T3 cells by Abelson murine leukemia virus  
*Nature* 253: 729–731, 1975.
130. Schiffer, C. A., Hehlmann, R., Larson, R.  
Perspectives on the treatment of chronic phase and advanced phase CML and philadelphia chromosome positive ALL  
*Leukemia* 17: 691-699, 2003.
131. Schwartzberg, P. L., Stall, A. M., Hardin, J. D., Bowdish, K. S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M. L., Robertson, E. J., Goff, S. P.  
Mice homozygous for the *abl*<sup>ml</sup> mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations  
*Cell* 65: 1165-1175, 1991.
132. Sefton, B. M., Hunter, T., Raschke, W. C.  
Evidence that the Abelson virus protein functions in vivo as a protein kinase that phosphorylates tyrosine  
*Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1552-1556, 1981.
114. Shechter, Y., Yaish, P., Chorev, M., Gilon, C., Braun, S., Levitzki, A.  
Inhibition of insulin-dependent lipogenesis and anti-lipolysis by protein tyrosine kinase inhibitors  
*EMBO J* 8: 1671-1676, 1989.
134. Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., Canaani, E.  
Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukemia  
*Nature* 315: 550-554, 1985.
135. Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., Roe, B. A., Canaani, E.  
Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene  
*Cell* 47: 277-284, 1986.
136. Silver, R. T., Woolf, S. H., Hehlmann, R., Appelbaum, F. R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J. M., Guilhot, F., Kantarjian, H. M., Lichtin, A. E., Talpaz, M., Tura, S.  
An evidence-based analysis of the effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology (review article)  
*Blood* 94: 1517-1536, 1999.

- 
137. Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J. K., Trotta, R., Wlodarski, P., Danilo, P., Chan, T. O., Wasik, M. A., Tschlis, P., N., Calabretta, B.  
Transformation of hematopoietic cells by bcr-abl requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway  
EMBO J 16: 6151-6161, 1997.
138. Skorski, T., Kanakaraj, P., Ku, D. H., Nieborowska-Skorska, M., Canaani, E., Zon, G., Perussia, B., Calabretta, B.  
Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210<sup>bcr/abl</sup>: Implication for ras-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth  
J Exp Med 179: 1855-1865, 1994.
139. Snyder, D. S., Wu, Y., Wang, J. L., Rossi, J. J., Swiderski, P., Kaplan, B. E., Forman, S. J.  
Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line  
Blood 82: 600-605, 1993.
140. Takahashi, T., Tanaka, Y., Nieda, M., Azuma, T., Chiba, S., Juji, T., Shibata, Y., Hirai, H.  
Dendritic cell vaccination for patients with chronic myelogenous leukemia  
Leuk Res 27: 795-802, 2003.
141. Talpaz, M., Cortes, J., O'Brien, S., Keating, M., Giles, F., Rose, E.  
Phase-I-study of Polyethylene Glycol (PEG) Interferon alpha-2b (Intron-A) in CML patients (Abstract)  
Blood: 92, Suppl. 1: 251a, 1998.
142. Talpaz, M., Kantarjian, H., Liang, J., Calvert, L., Hamer, J., Tibbits, P.,  
Percentage of Philadelphia chromosome (Ph)-negative and Ph-positive cells found after autologous transplantation for chronic myelogenous leukemia depends on percentage of diploid cells induced by conventional-dose chemotherapy before collection of autologous cells.  
Blood 85: 3257-3263, 1995.
143. Tanabe, T., Kuwabara, T., Warashina, M., Kenzaburo, T., Taira, K., Asano, S.  
Oncogene inactivation in a mouse model  
Nature 406: 473-474, 2000.

- 
144. Tauchi, T., Boswell, H. S., Leibowitz, D., Broxmeyer, H. E.  
Coupling between p210<sup>bcr-abl</sup> and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to Ras activation pathway  
J Exp Med 179: 167-175, 1994.
145. Tauchi, T., Feng, G.-S., Shen, R., Song, H. Y., Donner, D., Pawson, T.,  
Broxmeyer, H. E.  
SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210<sup>bcr-abl</sup> tyrosine kinase  
J Biol Chem 269: 15381-15387, 1994.
146. ten Bosch, G. J. A., Toornvliet, A. C., Friede, T., Melief, C. J. M., Leeksa, O.C.  
Recognition of peptides corresponding to the joining region of p210<sup>BCR-ABL</sup> protein by human T cells  
Leukemia 9: 1344-1348, 1995.
147. ten Hoeve, J., Kaartinen, V., Fioretos, T., Haataja, L., Voncken, J.-W.,  
Heisterkamp, N., Groffen, J.  
Cellular interactions of CRKL, an SH2-SH3 adaptor protein  
Cancer Res 54: 2563-2567, 1994.
148. Thiesing, J. T., Ohno-Jones, S., Kolibaba, K. S., Druker, B. J.  
Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells  
Blood 96: 3195-3199, 2001
149. Tolpaly, J., Zeller, W. J., 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 15: 342-347, 2001
150. Tybulewicz, V. L. J., Crawford, C. E., Jackson, P. K., Bronson, R. T., Mulligan, R. C.  
Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene  
Cell 65: 1153-1163, 1991.
151. Uehara, Y., Hori, M., Takeuchi, T., Umezawa, H.  
Screening of agents which convert „transformed morphology“ of rous sarcoma virus-infected rat kidney cells to „normal morphology“: Identification of an active agent as herbimycin and its inhibition of intracellular src kinase  
Jpn J Cancer Res (Gann) 76: 672-675, 1985.

- 
152. Umewaza, H., Imoto, M., Sawa, T., Isshiki, K., Matsuda, N., Uchida, T., Iinuma, H., Hamada, M., Takeuchi, T.  
Studies on a new epidermal growth factor kinase inhibitor, erbstatin, produced by MH 435-hF3  
*J Antibiot* 39: 170-173, 1986.
153. Varticovski, L., Daley, G. Q., Jackson, P., Baltimore, D., Cantley, L. C.  
Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants  
*Mol Cell Biol* 11: 1107-1113, 1991.
154. von Bubnoff, N., Peschel, D., Duyster, J.  
Resistance of philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back  
*Leukemia* 17: 829-838, 2003.
155. Wang, J. Y. J., Baltimore, D.  
Localization of tyrosine kinase-coding region in v-abl oncogene by the expression of v-abl-encoded proteins in bacteria  
*J Biol Chem* 260, 64-71, 1985.
156. Wilson-Rawls, J., Xie, S., Liu, J., Laneuville, P., Arlinghaus, R. B.  
P210 bcr-abl interacts with the interleukin 3 receptor  $\beta_c$  subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation  
*Cancer Res* 56: 3426-3430, 1996.
157. Witte, O. N., Dasgupta, A., Baltimore, D.  
Abelson murine leukemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine  
*Nature* 283: 826-831, 1980.
158. Witte, O. N., Goff, S., Rosenberg, N., Baltimore, D.  
A transformation-defective mutant of Abelson murine leukemia virus lacks protein kinase activity  
*Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4993-4997, 1980.
159. Witte, O. N., Rosenberg, N. E., Baltimore, D.  
A normal cell protein cross-reactive to the major Abelson murine leukaemia virus gene product  
*Nature* 281: 396-398, 1979.

160. Witte, O. N., Rosenberg, N., Paskind, M., Shields, A., Baltimore, D.  
Identification of an Abelson murine leukemia virus-encoded protein present in transformed fibroblast and lymphoid cells  
Proc Natl Acad Sci USA 75: 2488–2492, 1978.
161. Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C., Levitzki, A.  
Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors  
Science 242: 933-935, 1988.
162. Yotnda, P., Firat, H., Garcia-Pons, F., Garcia, Z., Gourru, G., Vernant, J. P., Lemonnier, F. A., Leblond, V., Langlade-Demoyen, P.  
Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 bcr-abl protein in patients with chronic myelogenous leukemia  
J Clin Invest 101: 2290-2296, 1998.
163. Yuan, Z.-M., Huang, Y., Whang, Y., Sawyers, C., Weichselbaum, R., Kharbanda, S., Kufe, D.  
Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage  
Nature 382: 272-274, 1996.

## Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie ist die erste maligne Erkrankung, bei der eine genetische Aberration als Ursache identifiziert werden konnte. Es handelt sich um eine Translokation vom Chromosom 9 auf das Chromosom 22, durch die das bcr-abl-Hybridgen entsteht. Das Genprodukt p210<sup>bcr-abl</sup> ist eine Tyrosinkinase, die durch Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden kann. Hiermit wurden bereits erste klinische Erfolge erzielt. Problem der Tyrosinkinaseinhibitoren sind Resistenzen, die zunehmend beobachtet werden. Daher ist die Kombination mit anderen Zytostatika sinnvoll. Der Tyrosinkinaseinhibitor AG 879 reduziert das Wachstum klonogener Zellen von Patienten mit bcr-abl-positiver chronischer myeloischer Leukämie auf 32,8 % gegenüber der Mediumkontrolle. Das konventionelle Zytostatikum 5-Fluorouracil führt zu einer Reduktion auf 29,2 %. Die Kombination beider Substanzen bewirkt eine Reduktion auf 16,7 %. Im Vergleich dazu ist die Wachstumsreduktion durch gleichartige Behandlung bei den klonogenen Knochenmarkzellen eines Kontrollkollektivs schwächer ausgeprägt. Bei der Untersuchung der einzelnen Kolonien aus der Gruppe der CML-Patienten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl bcr-abl-positiver und -negativer Kolonien nach Behandlung mit 5-Fluorouracil, AG 879 und der Kombination beider Substanzen.

## Summary

Chronic myelogenous leukemia is the first malignant disease in which a genetic aberration was identified as its cause. Bcr-abl-hybrid gene develops due to a translocation between chromosome 9 and 22. The product of the gene p210<sup>bcr-abl</sup> is a tyrosine kinase, which tyrosine kinase inhibitors may repress. A first clinical success was achieved with these substances. However, resistance creates a problem with the tyrosine kinase inhibitors which is increasingly observed. As a consequence the combination with other cytostatic agents well justified. In bone marrow samples of patients with bcr-abl-positive chronic myelogenous leukemia the tyrosine kinase inhibitor AG 879 reduces growth of clonogenic cells, compared to medium control, to 32.8 %. The conventional cytostatic 5-Fluorouracil results in a reduction to 29.2 %. Upon combining both substances the growth of cells lessens to 16.7 %. When compared, the reduced growth of clonogenic bone marrow cells from control patients receiving equal treatment is poorer. When examining single colonies from patients with chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction, there are no significant differences in the number of bcr-abl-positive and -negative colonies after treatment with 5-Fluorouracil, AG 879 and the combination of both drugs.

# Danksagung

Herrn Prof. Dr. Pralle, dem Leiter der Klinik für Hämatologie und Onkologie, danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Käbisch danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Beratung und Betreuung sowie für die stets freundschaftliche Unterstützung.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Ulrike Seay für ihre unermüdliche Hilfe, Beratung und Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Frau Marianne Hoeck und Herrn Steffen Gerhard danke ich für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich den Probanden für ihre bereitwillige Mitarbeit.

# Lebenslauf

Name Mechthild Rausch, geb. Schroer  
Geburtstag 26.08.1971 in Heessen, jetzt Hamm  
Familienstand verheiratet, ein Sohn

## Schulbildung

12.06.1991 Abitur am Gymnasium Hammonense in Hamm

## Hochschulbildung

10/1991 – 10/1997 Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen  
10/1997 – 10/1998 Praktisches Jahr an den Städtischen Kliniken Bielefeld Mitte,  
Lehrkrankenhaus der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster

## Berufstätigkeit

2/1999 – 7/2000 Ärztin im Praktikum am Franziskushospital in Bielefeld, Klinik für  
Hämatologie und Onkologie  
10/2000 – 1/2003 Assistenzärztin an den Städtischen Kliniken Bielefeld Mitte, Institut für  
Pathologie  
seit 2/2003 Elternzeit