



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Zellzyklusregulation bei chronischer myeloischer Leukämie unter
der Therapie mit Imatinib**

Autor: Ursula Cabib
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. A. Hochhaus

Das hier beschriebene Forschungsprojekt hatte die Erkennung, die Identifizierung und die weitere Analyse bisher im Zusammenhang mit der CML unbekannter Gene zum Ziel, die auf transkriptioneller Ebene durch *BCR-ABL* reguliert werden.

Im ersten Teil des Projekt wurde dazu die Methode des Differential Displays verwendet, um Gene, deren Expression von der BCR-ABL-Tyrosinkinase abhängig sind, ausfindig zu machen: Dazu wurden zunächst KYO-1 Zellen in einer Zellkultur während ihrer idealen Wachstumsphase für 10 Stunden mit dem BCR-ABL-Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt. Die DNA dieser Zellen, in denen die Tyrosinkinase „ausgeschaltet“ worden war, wurde dann gewonnen und anhand des Differential Displays mit der DNA von unbehandelten KYO-1 Zellen, in denen somit die Tyrosinkinase aktiv geblieben war, verglichen.

Zeigten sich bei dieser Technik, die mit Hilfe eines radioaktiven Markers die PCR-Produkte sichtbar macht, Unterschiede in der Expression bei behandelten und unbehandelten Zellen, wurde das jeweilige PCR-Produkt gewonnen und falls das gleiche Expressionmuster auf RNA-Ebene mit der Methode des Northern blottings bestätigt werden konnte, dessen DNA sequenziert.

Bei 21 von 58, mittels KYO-1-Zellen getesteten Primerkombinationen des verwendeten Differential-Display-Kits konnten insgesamt 52 differentiell exprimierte Genfragmente ausfindig gemacht werden. Von diesen 52 Banden konnten 30 amplifiziert, geklont und mittels der Northern Blot-Technik überprüft werden. Letztlich konnten von der grossen Anzahl der primär potentiellen Kandidaten zwei der so gewonnenen Genfragmente erfolgreich sequenziert werden:

1) Das hypothetische *Homo sapiens*-Protein FLJ 11795, für welches eine Hochregulierung in KYO1-Zellen nach Behandlung mit Imatinib mesylate für 10h im DD-Screening bei Amplifikation mit dem Primerpaar HAP 5 und

HT₁₁-G* gefunden wurde.

2) Das G₂/M-Checkpoint-Gen CHK1, welches von einer herunterregulierten Bande von KYO1 Zellen, die für 10h mit Imatinib mesylate behandelt worden waren, in einem DD-Screening mit den Primern HAP 13 und HT₁₁-C* isoliert wurde.

Um nachzuweisen, dass sich die unterschiedliche Genexpression auch in „echten“ CML-Zellen und nicht nur in Zellen von CML-Zelllinien wie KYO-1 zeigt, wurde das Projekt um einen zweiten Teil erweitert, in dem zunächst Expressionsuntersuchungen von CHK1, dem vielversprechenderen der beiden Gene, fortgeführt wurden. Es wurden geeignete Primer entworfen und mittels der SYBR-GREEN-RT-PCR-Technik die CHK1-Expression bei CML-Patienten der chronischen Phase und gesunden Probanden sowie Imatinib-Respondern und Non-Respondern verglichen. Dieser Vergleich ergab eine zweifach höhere Expression (Median) von CHK1 bei CML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und eine mehr als fünffach höhere Expression (Median) von CHK1 bei Imatinib-Non-Respondern im Vergleich zu Imatinib-Respondern. Darüberhinaus wurde die CHK1 Expression bei Cd34+-positiven Zellen, Mononukleären Zellen und Gesamtleukozyten untersucht sowie eine zyklische Expression von CHK1 in KYO1-Zellen unter Imatinibbehandlung dargestellt.

Nach diesen ermutigenden Ergebnissen, wurden Untersuchungen zur Expression von CHK2, des zweiten wichtigen Zellzyklus-regulierenden Gens angeschlossen. Ebenfalls wurden geeignete Primer entworfen und wiederum wurde mittels der SYBR-GREEN-RT-PCR die CHK2-Expression bei CML-Patienten der chronischen Phase und gesunden Probanden sowie Imatinib-Respondern und Non-Respondern verglichen. Diesmal zeigte sich eine siebenfach höhere CHK2-Expression (Median) bei CML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und eine dreifach höhere CHK2-Expression (Median) bei Non-Respondern im Vergleich zu Respondern. Ebenso wurde seine Expression bei Cd34+-positiven Zellen, Mononukleären Zellen und Gesamtleukozyten dargestellt.

Abschliessend erfolgte die Expressionsuntersuchung mittels SYBR-GREEN-PCR zweier weiterer, für die Regulierung des Zellzyklus wichtiger Gene, C-TAK und PLK3, bei CML-Patienten der chronischen Phase und gesunden Probanden. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Expression, sodass die Expressionsuntersuchung für die beiden Gene bei Imatinib-Respondern im Vergleich zu Non-Respondern nicht durchgeführt wurde.

Aufgrund der höheren Expression von Chk1 bei CML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden sowie bei Non-Respondern im Vergleich zu Respondern, stellten wir die Hypothese auf, dass *CHK1* in leukämischen Zellen aufgrund ihrer onkogenen Transformation hochreguliert ist. Dieses stimmt mit der ursprünglichen Beobachtung überein, bei welcher sich nach zehnstündiger Inkubation der leukämischen Zelllinie KYO1 mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib-mesylat eine Herunterregulierung von CHK1 zeigte. Dadurch wird der leukämischen Zelle ein verlängerter G2-Aufenthalt ermöglicht und somit ihre Resistenz gegenüber zytotoxischen Therapien gesteigert.

Die Kombination von molekularer Therapie, durch Unterdrückung dieses verlängerten G2-Aufenthalt mittels Imatinib oder direkter Inhibition des CHK1-Checkpoints durch spezifische Checkpoint-Inhibitoren und Chemo-/Radiotherapie, könnte zu einer erheblichen Steigerung der Zytotoxizität der Chemo-/Radiotherapie führen. Inzwischen sind spezifische CHK1-Inhibitoren in der Prüfung in Phase I und II-Studien.