



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

Expression und Aktivität von Separase bei der chronischen myeloischen Leukämie

Autor: Wiltrud Haaß
Institut / Klinik: III. Medizinische Klinik
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. W. Seifarth

Zentrosomale Amplifikation und Aneuploidie sind charakteristische Merkmale der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Funktional besteht ein Zusammenhang zwischen der konstitutiven p210BCR-ABL Tyrosinkinaseaktivität und dem Auftreten von zentrosomalen und chromosomalen Aberrationen. Durch die Hemmung von c-ABL und/oder anderen Kinasen mittels ATP-Analoga wie Imatinib werden *in vitro* und *in vivo* Zentrosomenaberrationen induziert.

Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, wurde der Einfluss der Tyrosinkinase p210BCR-ABL auf zwei Schlüsselproteine des zentrosomalen Replikationszyklus, Separase und Polo-like Kinase 4 (PLK4), im therapeutischen Kontext von Imatinib untersucht. Im Fokus stand die Cystein-Endopeptidase Separase, die für die Trennung von Mutter- und Tochterzentriol bei der Zentrosomenduplikation und für die Separation der Schwesterchromatiden während der Mitose essentiell und damit möglicherweise bedeutend für die Entstehung von Aneuploidie ist. Ziel der Arbeit war, den Einfluss von p210BCR-ABL und Imatinib auf die Expression und proteolytische Aktivität der Separase zu untersuchen. Dazu wurden Kurzzeitexperimente mit einer Reihe von p210BCR-ABL-negativen, -positiven und induzierbaren menschlichen Zelllinien unter Einsatz therapeutischer Imatinib-Dosen durchgeführt. Mittels Western Blot wurde das Proteinlevel von Separase und wichtigen Separase-Inhibitoren nachgewiesen. Mit einem spezifischen fluorometrischen Aktivitätsassay wurde die Separaseaktivität analysiert. Die intrazelluläre Separaselokalisierung wurde durch Immunfluoreszenzfärbung und das Transkriptlevel von Separase mit der *Real-Time*-PCR bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Regulation von Separase in Imatinib-behandelten BCR-ABL-positiven Zellen auf der Ebene der Proteinexpression sowie der Enzymaktivität stattfindet. Alle Zelllinien unter Beobachtung zeigten eine dosisabhängige Abnahme von Separase-Proteinspiegeln unter Imatinib. Dieser Effekt war BCR-ABL-unabhängig. Erwartungsgemäß sank auch die spezifische proteolytische Aktivität der Separase in BCR-ABL-negativen Zelllinien. Überraschenderweise wurde in BCR-ABL-positiven Zellen mit einem e14a2-Transkript eine gesteigerte Separase-Aktivität durch die Imatinib-Behandlung beobachtet. Die Separase-mRNA-Expression wurde entgegengesetzt zur beobachteten Veränderung der Separase-Aktivität kompensatorisch reguliert. Die Bestimmung der Proteinexpression von Separase-inhibierenden Faktoren zeigte eine vom Zellzyklus unabhängige Änderung. Diese entsprach der jeweilig nachgewiesenen Veränderung der Separaseaktivität. Die FACS-Analyse des Zellzyklus und der immunfluorometrische Nachweis der Lokalisierung von Separase zeigten keine Änderung unter Imatinib. Bei der Untersuchung der Proteinexpression von Separase *in vivo* wurde eine Abhängigkeit der Separaseexpression vom BCR-ABL-Expressionslevel nachgewiesen. In Zellen, die von Patienten in der Blastenkrisis stammten, lag Separase vermehrt exprimiert vor. Bei der Analyse der Proteinexpression von PLK4 wurden keine Veränderungen durch Imatinib festgestellt.

Diese Arbeit liefert den experimentellen Nachweis, dass durch Imatinibgabe in BCR-ABL-positiven Zellen eine posttranslationale Aktivierung der proteolytischen Separaseaktivität unabhängig von der Separase-Proteinexpression induziert werden kann. Damit konnte erstmals ein molekular-mechanistischer Zusammenhang zwischen p210BCR-ABL Tyrosinkinaseaktivität, Imatinib-Therapie und dem Auftreten überzähliger Zentrosomen und Aneuploidie hergestellt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die abnormal erhöhte proteolytische Separaseaktivität unplanmäßige Zentriolduplikation und daraus folgende Zentrosomenamplifikation verursacht. Damit könnte das Phänomen der klonalen Evolution und Resistenzentwicklung unter Imatinib-Langzeittherapie erklärt werden.