



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Zentrosomenaberrationen und genetische Instabilität im Verlauf der
chronischen myeloischen Leukämie**

Autor: Michelle Giehl
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine neoplastische myeloproliferative Erkrankung des hämatopoietischen Systems, die durch das Auftreten des Philadelphia-Chromosoms (Ph) charakterisiert ist. Die zugrunde liegende reziproke Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ der Gene *bcr* und *abl* führt zur Bildung eines pathophysiologisch relevanten BCR-ABL-Fusionsproteins mit konstitutiver Tyrosinkinaseaktivität, das in verschiedene zelluläre Signalwege eingreift. Der erfolgreiche therapeutische Einsatz selektiver, gegen BCR-ABL gerichteter Tyrosinkinase-Inhibitoren hat wesentlich zur Verlängerung des Gesamtüberlebens beigetragen. Im Verlauf der Erkrankung ist ein zunehmender Verlust der genetischen Stabilität in den Tumorzellen zu verzeichnen. Genetische Instabilität, die sich in Punktmutationen, Gendelektionen, aber auch in einer Chromosomenzahlveränderung bei der Zellteilung manifestieren kann (Aneuploidie), ist Kennzeichen der fortgeschrittenen Krankheitsphasen und gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose. Ungleichgewichte in der Chromosomenverteilung sind in der Regel auf fehlerhaft verlaufende Zellteilungen und Defekte im Zentrosomen-/Spindelapparat sich teilender Tumorzellen zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob bei der CML Zentrosomenaberrationen auftreten und ob die in fortgeschrittenen Stadien der CML beobachtbare chromosomale Instabilität durch Zentrosomen-defekte erklärt werden kann. Des Weiteren sollte die Rolle der BCR-ABL-Tyrosinkinase sowie der Einfluss klinisch-relevanter Tyrosinkinaseinhibitoren auf den Zentrosomen- und Karyotypstatus in menschlichen Zellen untersucht werden. Immunfärbung von Zentrosomen sowie Karyotypanalysen an CD34+Ph+ Tumorzellen von 34 Patienten mit CML ergaben, dass Zentrosomenaberrationen bereits in den frühesten Stadien der CML vorhanden sind. Sie wurden in 30 % der Tumorzellen aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt gefunden. Dieser Prozentsatz verdoppelte sich in den entsprechenden Zellen der Blastenphase und ging mit einer signifikanten Zunahme chromosomaler Zusatzaberrationen einher. Dies ließ den Schluss zu, dass Zentrosomenaberrationen eng mit dem Krankheitsverlauf verknüpft sind, der Aneuploidie vorausgehen und als klinisch-prognostische Verlaufsmarker dienen könnten. Die Frage nach der mechanistischen Rolle der konstitutiven BCR-ABL-Tyrosinkinaseaktivität für die Entstehung von Zentrosomenaberrationen wurde mit Hilfe eines humanen *in vitro* Modellsystems (U937-P210BCR-ABL/c6) mit induzierbarer p210BCR-ABL Tyrosinkinase-Aktivität (Tet-On) untersucht. Dabei kamen neben Immunfärbetechniken und konventioneller Zytogenetik molekulare und biochemische Methoden wie quantitative „real-time“-PCR und Western Blot/Immunfärbung zum Einsatz. Langzeitexperimente mit induzierten und nicht-induzierten Zellen ergaben, dass BCR-ABL ursächlich in der Lage ist, Zentrosomenaberrationen zu induzieren. Das Ausschalten der BCR-ABL-Expression sowie eine Behandlung der U937-P210BCR-ABL/c6 Zellen mit gegen *abl* gerichteter siRNA führte zu einem Rückgang zuvor entstandener Zentrosomenaberrationen. Interessanterweise führte die Imatinib-Behandlung nicht-induzierter U937P210BCR-ABL/c6 Zellen zu einem deutlichen Anstieg von Zentrosomenaberrationen, was auf eine funktionale Beteiligung von Wildtyp-ABL oder anderer Imatinib-sensitiver Kinasen bei der Entstehung von Zentrosomenaberrationen hinwies. Dieser Befund konnte durch analoge Imatinib-Hemmexperimente in *bcr-abl*-negativen primären Fibroblastenkulturen von Mensch, Hamster und Muntjak bestätigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen erstmals, dass sowohl durch eine Translokations-bedingte Überaktivität der ABL-Tyrosinkinase, als auch durch Hemmung von cABL und/oder anderen Kinasen durch ATP-Analoga *in vivo* und *in vitro* Zentrosomenaberrationen ursächlich ausgelöst werden können. Da Tyrosinkinaseinhibitoren in der Therapie der CML gegenwärtig einen hohen Stellenwert besitzen, können die vorgestellten Ergebnisse zu einer Optimierung der Therapie der CML beitragen.