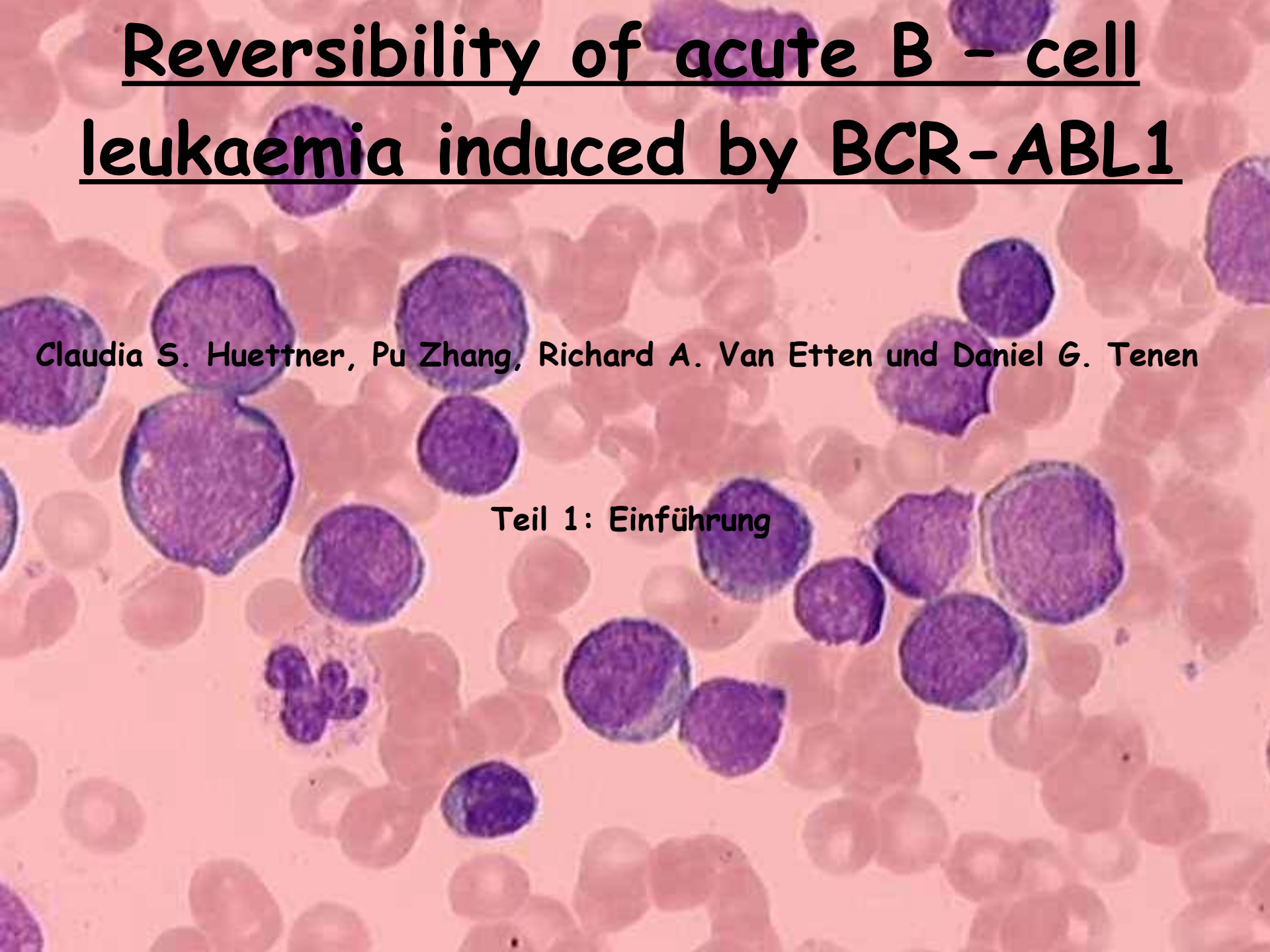


Reversibility of acute B - cell leukaemia induced by BCR-ABL1

Claudia S. Huettner, Pu Zhang, Richard A. Van Etten und Daniel G. Tenen

Teil 1: Einführung



Das Blut – Saft des Lebens

- Blutplasma (55%):

- Wasser (90%)
- Ionen
- Plasmaproteine
- Im Blut transportierte Substanzen (z.B. Atemgase, Hormone)

- Blutzellen (45%)

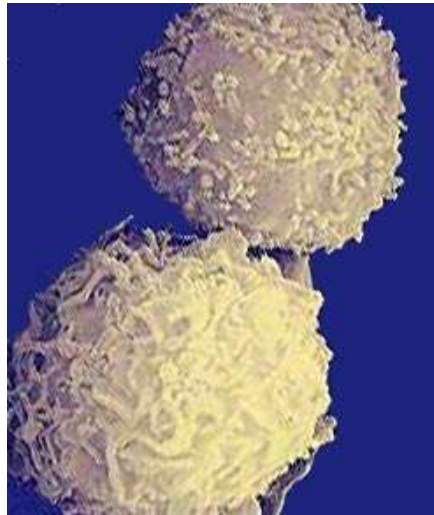
- Erythrocyten
- Leukocyten (Lymphocyten, Monocyten, Granulozyten)
- Thrombozyten

Blutzellen und ihre Funktion



Erythrocyten

*Transport von
Sauerstoff / CO₂*



Leukocyten

Immunabwehr



Thrombozyten

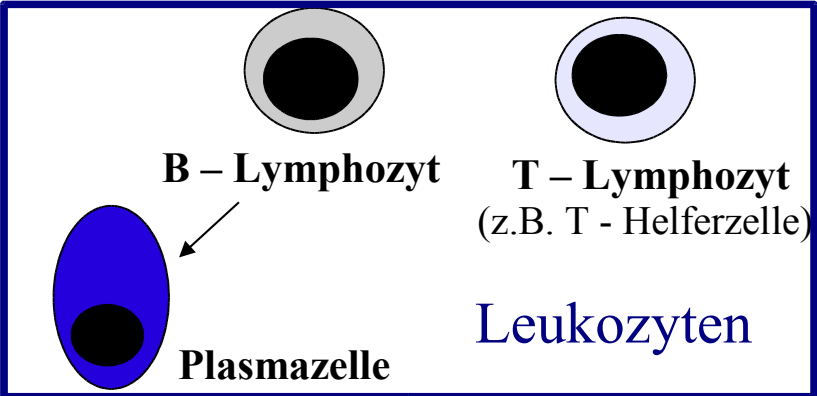
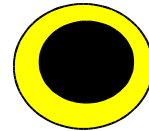
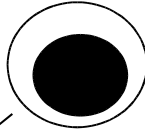
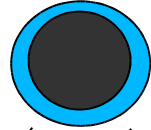
Blutgerinnung

Differenzierung d. Blutzellen

Pluripotente Stammzelle
(im Knochenmark)

Lymphoide Stammzelle

Myeloide Stammzelle



VZ

Erythrocyten

Thrombozyten

Leukozyten

Granulozyten



Basophile



Eosinophile



Neutrophile



Makrophagen



Monocyten

VZ = Versch.
Vorläuferzellen

Was ist Leukämie?

Weißes Blut.

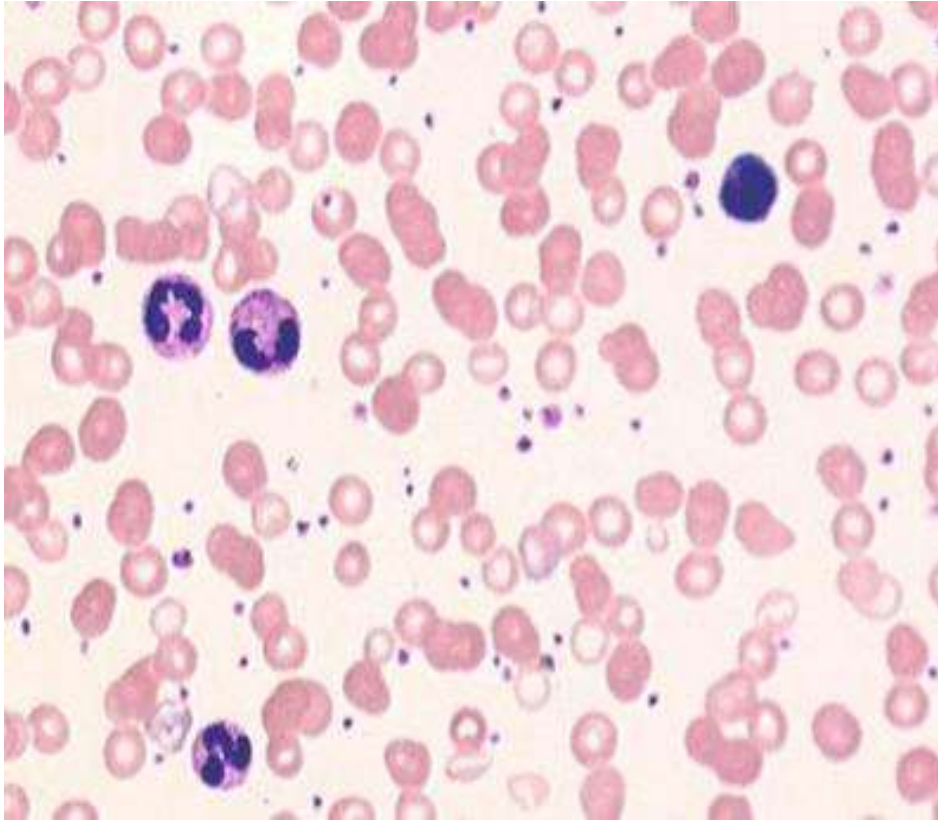
Außer sehr wenig rothen Blutkörperchen bestand der ungleich größere Theil aus denselben farblosen oder weißen Körpern, die auch im normalen Blut vorkommen, nämlich kleinen, nicht ganz regelmäßigen Protosinmolekülen, größeren, körnigen, fetthaltigen, kernlosen Körperchen und granulirten Zellen mit einem rundlichen, hufeisenförmigen oder flecblattartigen oder mit mehreren napfförmigen, distincten Kernen. Die größeren dieser Zellen hatten ein leicht gelbliches Aussehen. Das Verhältniß zwischen den farbigen und farblosen Blutkörperchen stellte sich hier ungefähr umgekehrt, wie im normalen Blut, indem die farblosen die Regel, die farbigen eine Art von Ausnahme zu bilden schienen. Wenn ich daher von weißem Blute spreche, so meine ich in der That ein Blut, in welchem die Proportion zwischen den rothen und farblosen (in Masse weißen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist, ohne daß eine Beimischung fremdartiger chemischer oder morphologischer Elemente zu bemerken wäre.

ich
würde mich glücklich schätzen, der Wissenschaft dadurch zu einer neuen und, wie es mir scheint, nicht unwichtigen Thatfache verholfen zu haben. —

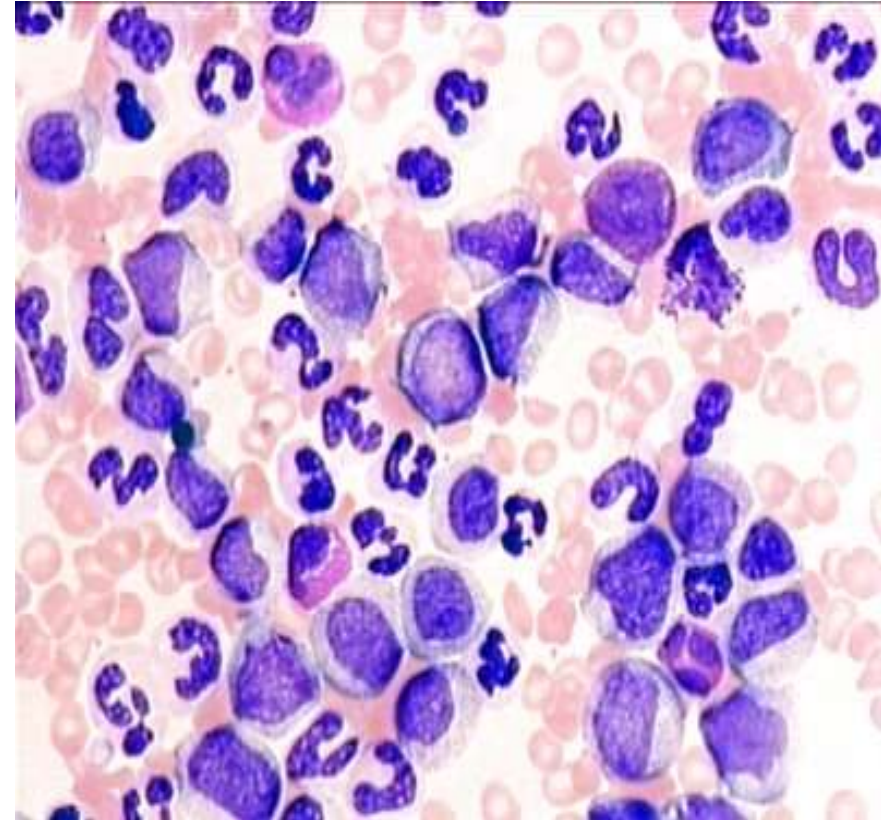
Dr. Virchow.

- Erkrankung des blutbildenden Systems
- Erstmals von Rudolf Virchow im Jahre 1845 beschrieben => „Weißes Blut“

Vergleich: Blutbilder



Normales Blutbild



Blutbild Leukämie (CML)

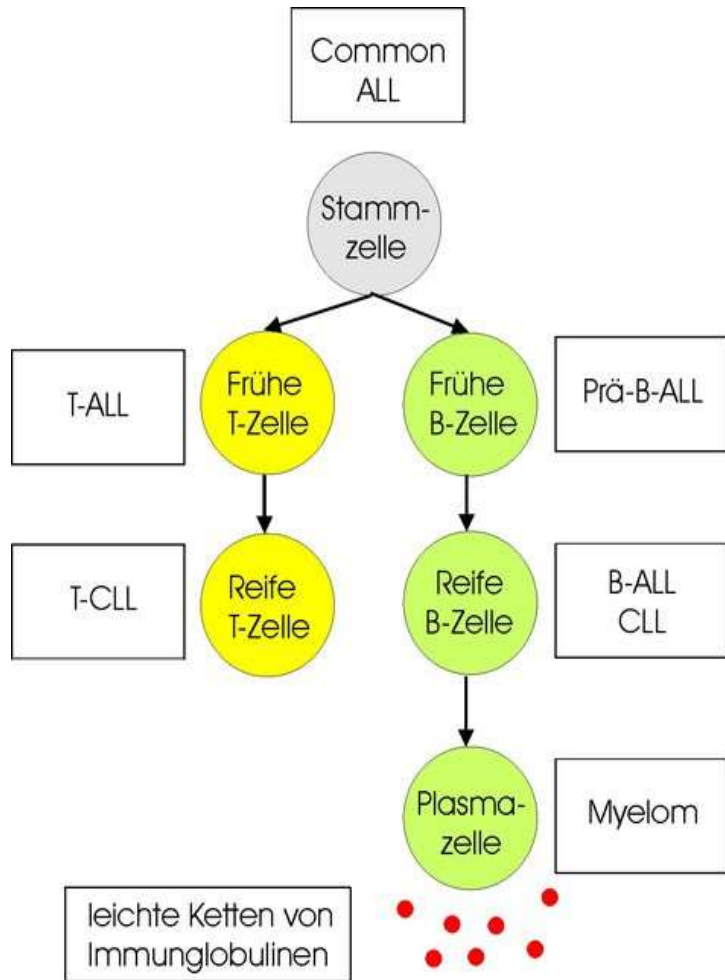
Leukämie – Krebserkrankung der weißen Blutzellen

- Entartung der weißen Blutkörperchen: Krebszellen
- Verlust der Zellwachstums- /Zellteilungsregulierung:
Unkontrollierte Vermehrung der weißen
Blutkörperchen
- Funktionsverlust
- Ausbreitung im Knochenmark:
Störung der normalen Blutbildung durch Verdrängung
der gesunden Knochenmarkszellen
- Infiltration von Leber, Milz, Lymphknoten, weitere Organe
=> Beeinträchtigung der Funktion

Folgen und auftretende Krankheitssymptome

- Folgen:
 - **Mangel** an Erythrocyten (Anämie)
 - **Mangel** an blutungsstillenden Blutplättchen
 - **Mangel** an funktionstüchtigen weißen Blutkörperchen
- Symptome:
 - Blässe, Schwäche
 - Schlecht heilende Wunden
 - Anfälligkeit für Infektion
 - Geschwollene Lymphknoten
 - Milz-, Lebervergrößerung

Formen der Leukämie



- **Akute lymphatische Leukämie (ALL):** Bösartige Veränderung der Lymphozyten
- **Akute myeloische Leukämie (AML):** Bösartige Veränderung einer unreifen myeloischen Zelle
- **Chronische lymphatische Leukämie (CLL):** Bösartige Veränderung der Lymphozyten
- **Chronische myeloische Leukämie (CML):** Erkrankung einer pluripotenten Stammzelle,

Benennung lymphatischer Leukämieerkrankungen entsprechend dem Differenzierungsstadium der entarteten Lymphozytenpopulationen

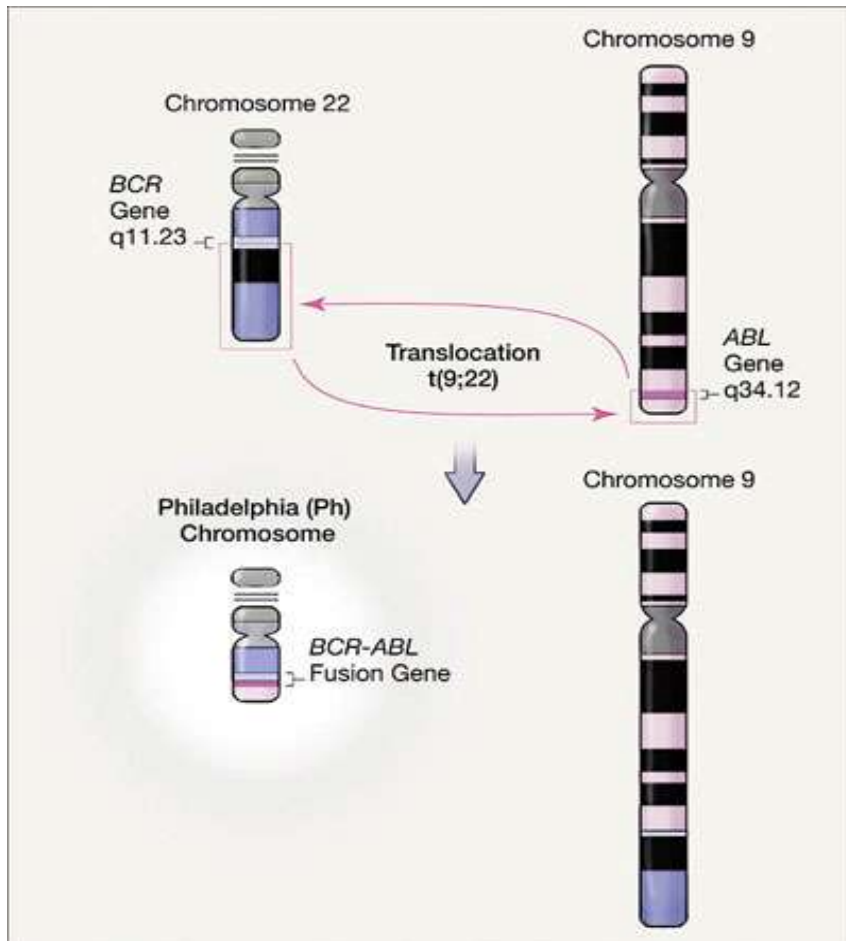
Ursachen

- Chemikalien (Benzol)
- Ionisierende Strahlung
- Viren
- Radioaktivität
- **TRANSLOKATION (ALL,CLM)**

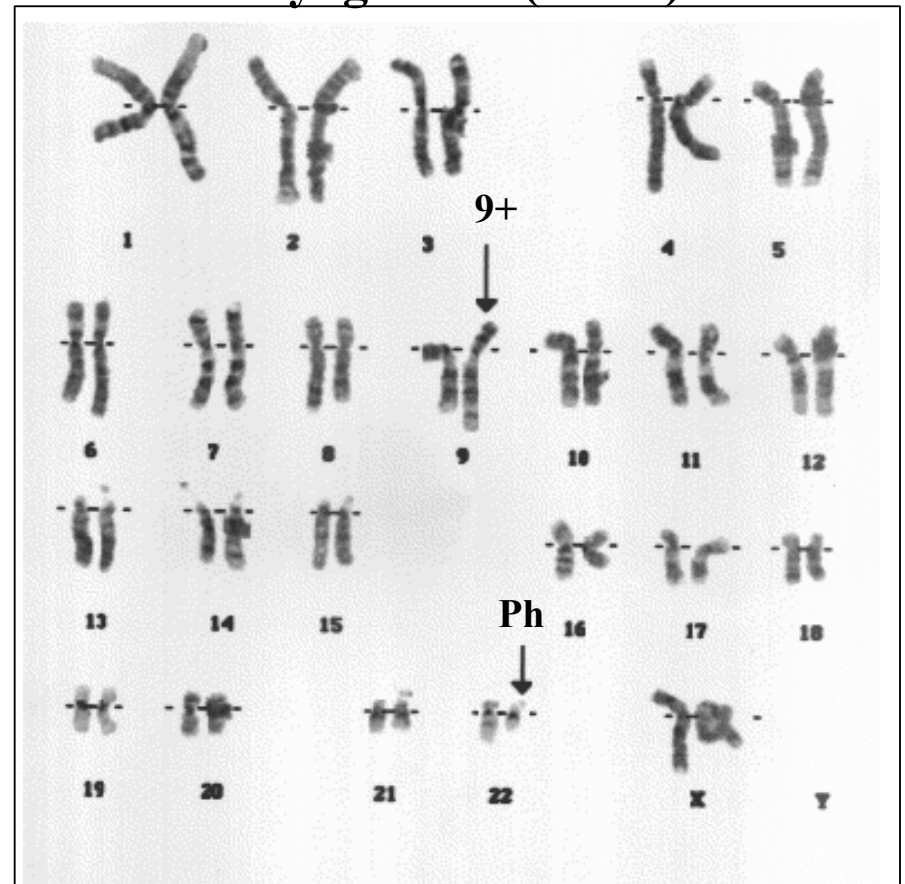
Translokation und ihre Folgen

- Eine Ursache für ALL/CML:
Entstehung eines **Onkogens** in der Zelle in Folge einer **Translokation**
- **Reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und 22**
- **Chromosom 9: Protoonkogen ABL: ABL-Kinase(Regulation d. Zellproliferation)**
- **Chromosom 22: Gen BCR**
- **Folge: *Entstehung* des chimären Onkogens BCR-ABL**
- **Gen kodiert für funktionsfähiges Fusionsprotein:
BCR-ABL Protein (Tyrosinkinase)**
- **Tyrosinkinaseaktivität [Konstitutive Aktivität] => Folgen:**
 - **Hemmung der Apoptose**
 - **Vermehrte Zellproliferation**
 - **Gestörte Interaktion mit Komponenten des Knochenmarkstomas und der extrazellulären Matrix**

Entstehung des BCR-ABL Gens



Karyogramm (CML)



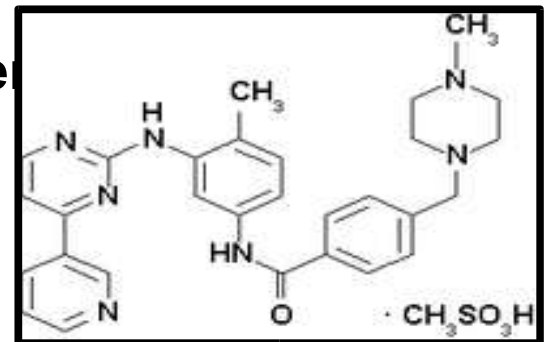
Ph = Philadelphiachromosom

Grundlagenforschung: Entdeckung von BCR-ABL1

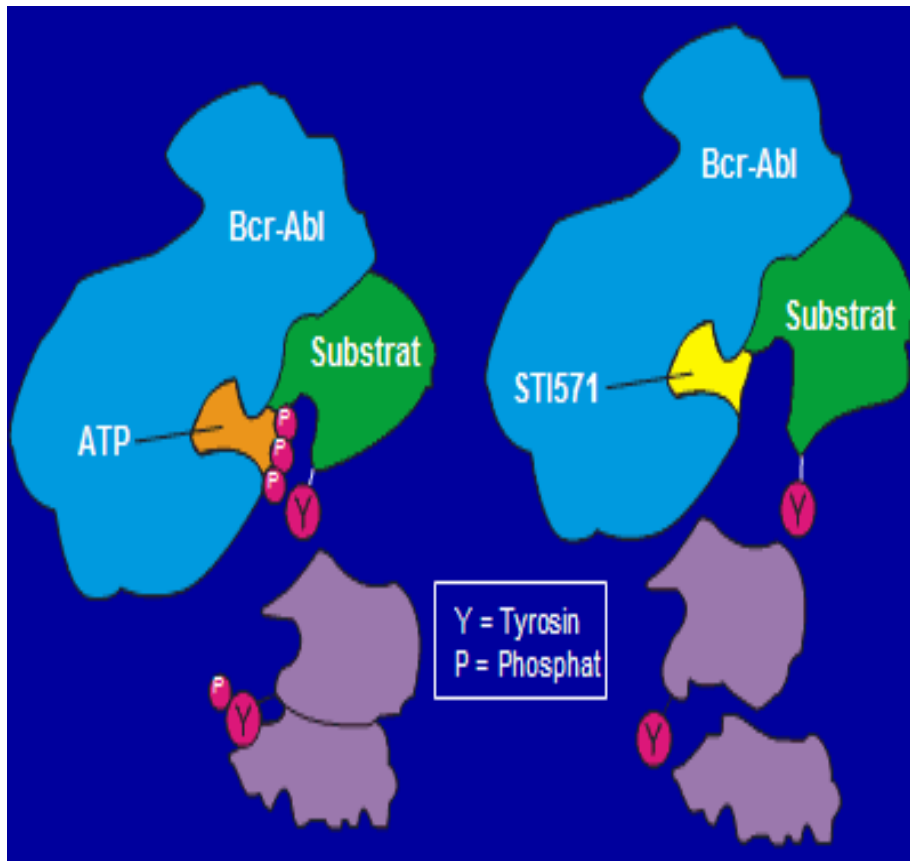
- 1845: Entdeckung und Beschreibung der Leukämie durch Virchow (CML)
- 1960: Erstbeschreibung des Ph-Chromosoms *durch* Nowell und Hungerford
- Um 1970: Entdeckung der reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 als Ursache der Erkrankung
- Folgende Jahre: Entdeckung der Translokationspartner ABL und BCR
- Ende der 80er Jahre: Entdeckung der Enzymaktivität des chimären BCR-ABL Proteins (Tyrosinkinase)
- Suche nach Therapie: Voraussetzung: 2 Entdeckungen:
 - Tyrosinkinaseaktivität ist Voraussetzung für Entstehung dieser Krankheit
 - BCR-ABL *induziert (und erhält)* die Leukämieerkrankung
- Suche nach Inhibitoren der BCR-ABL Tyrosinkinase

Die Suche nach dem geeigneten Tyrosinkinasehemmer

- **Erste erzeugte Hemmer zeigten zu geringe Selektivität: Große Toxizität!**
- **Schwierigkeit:**
Sehr geringe Unterschiede im **katalytischen Zentrum** der Tyrosinasen
- **Rational drug design:** Entwicklung von STI571 (**Imatinib**)
- **Drug design:**
Ausgehend von Struktur des Target, konsekutive Veränderung der Ligandenverbindungen mit immer höherer Selektivität
- **Entdeckung von *Imatinib*** (ursprünglich als Inhibitor der PDGF Rezeptorkinase entdeckt)
- **Bisher nur noch Kit-Rezeptorkinase als weitere Zielprotein definiert**
- **Inhibierung weiterer Kinasen durch *Imatinib* nicht ausgeschlossen!**



Wirkungsmechanismus von Imatinib

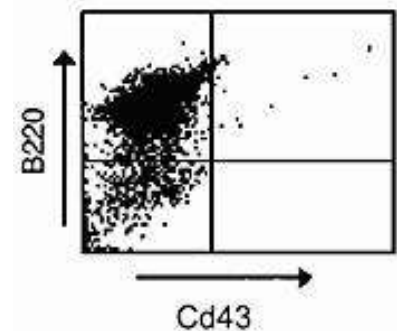
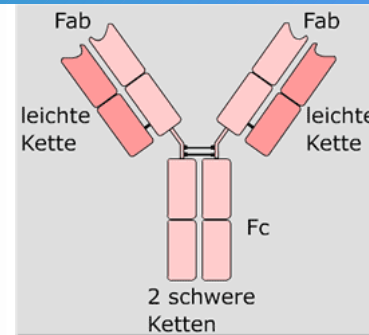
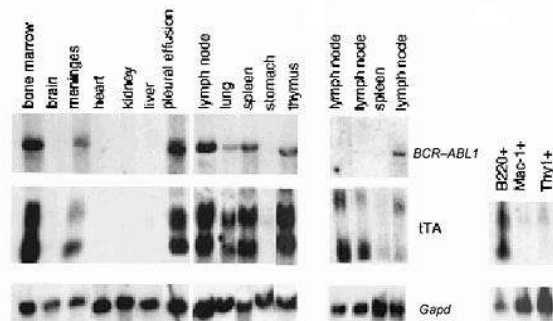
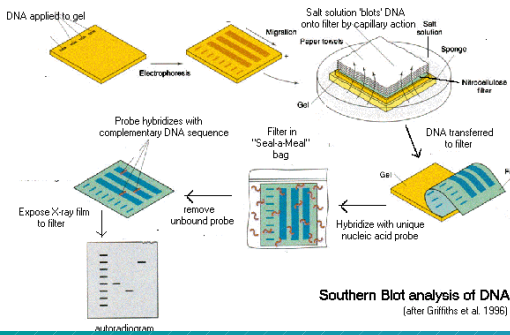


- *Passt genau in die ATP-Bindetasche*
- Kompetitiver Hemmer: **Verhindert ATP Bindung** an die katalytische Domäne der Kinase => **Verdrängung von ATP**
- Wirkung von Imatinib: **Hemmung der BCR-ABL Kinase**

Grundlagenforschung: Entdeckung von BCR-ABL1

- 1845: Entdeckung und Beschreibung der Leukämie durch Virchow (CML)
- 1960: Erstbeschreibung des Ph-Chromosoms *durch* Nowell und Hungerford
- Um 1970: Entdeckung der reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 als Ursache der Erkrankung
- Folgende Jahre: Entdeckung der Translokationspartner ABL und BCR
- Ende der 80er Jahre: Entdeckung der Enzymaktivität des chimären BCR-ABL Proteins (Tyrosinkinase)
- Suche nach Therapie: Voraussetzung: 2 Entdeckungen:
 - Tyrosinkinaseaktivität ist Voraussetzung für Entstehung dieser Krankheit
 - BCR-ABL *induziert (und erhält)* die Leukämieerkrankung
- Suche nach Inhibitoren der BCR-ABL Tyrosinkinase

Teil 2: Methoden

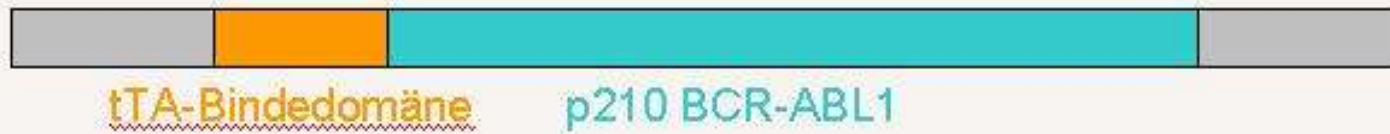


Modell-Organismus: Maus

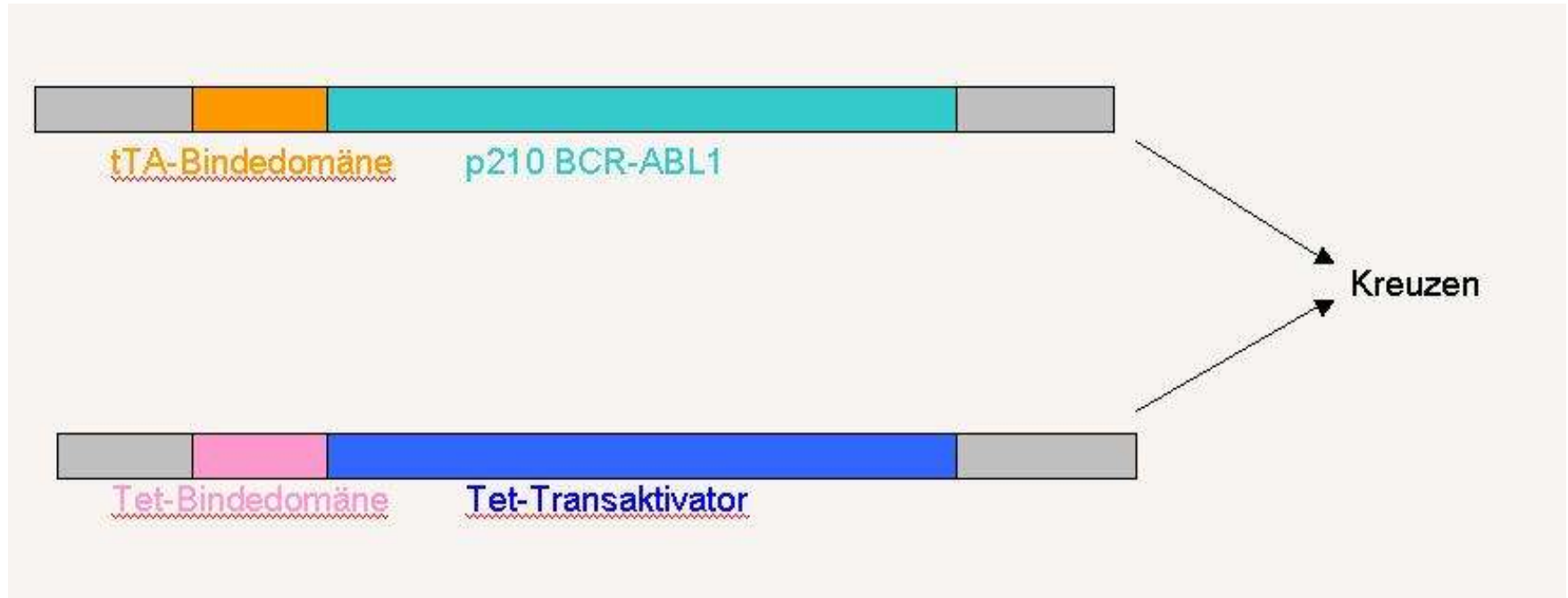
Maus-Modell für ALL (= akute lymphoblastische Leukämie)



Transgene Mäuse

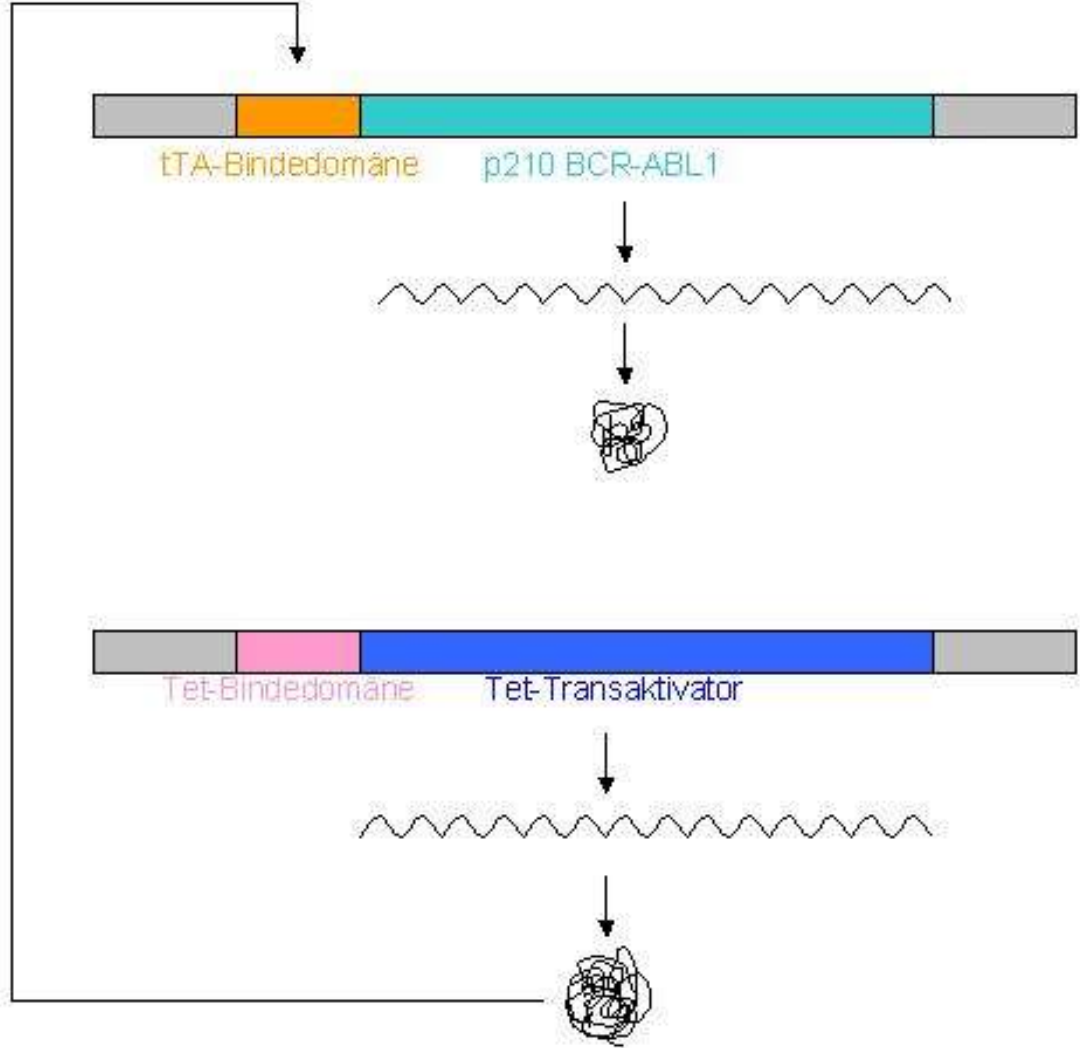


Transgene Mäuse - Kreuzung

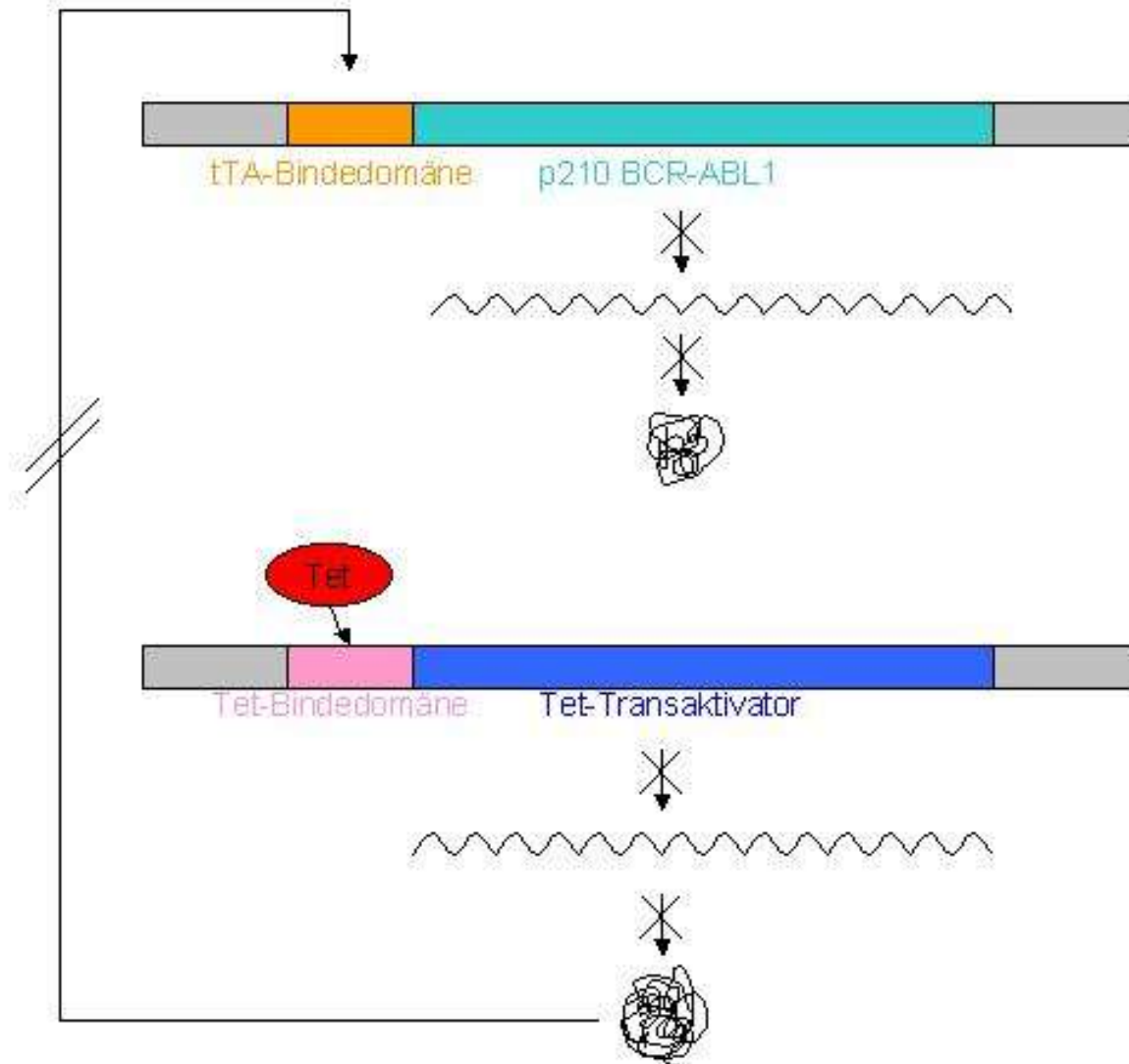


⇒ doppelt transgene Mäuse

Doppelt transgene Mäuse

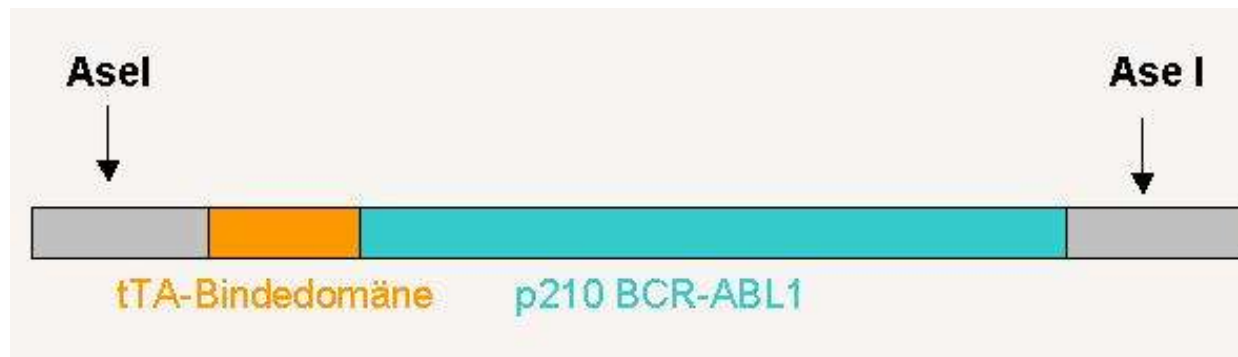


Doppelt transgene Mäuse – Wirkung von Tetrazyklin

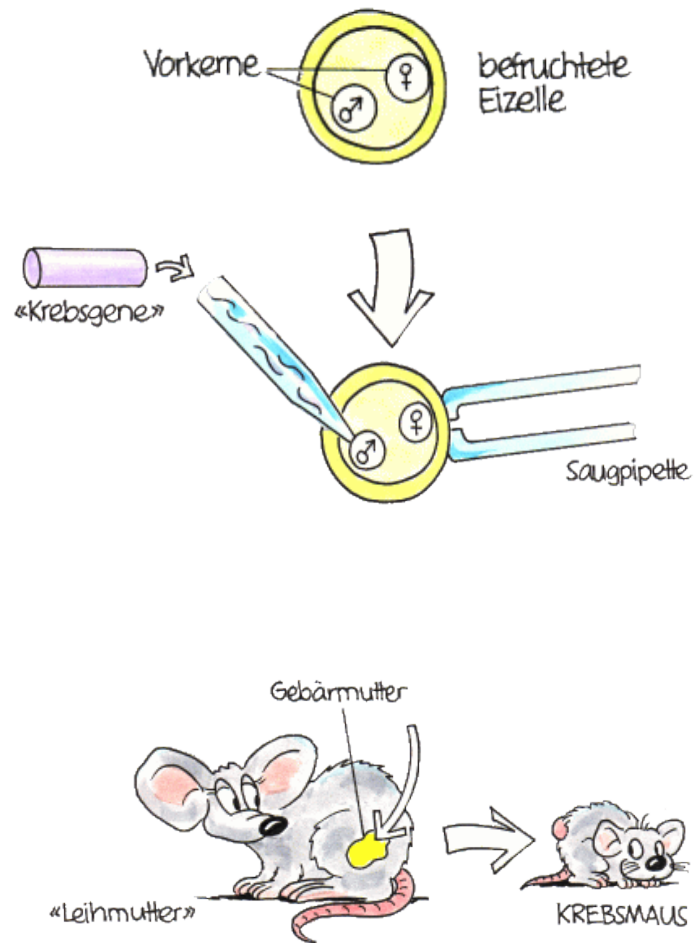


Erzeugung transgener Mäuse

- cDNA für p210 BCR-ABL1 durch Verdau mit EcoRI aus dem Plasmid GDP210, Einklonieren in EcoRI-Stelle des Transporter- Plamids pUHD10-3
- 720 bp Fragment des rabbit HBB Intron 8 downstream inserieren, Polyadenylierungsstelle liefert das pUHD 10-3
- Verdau mit AseI:



Erzeugung transgener Mäuse

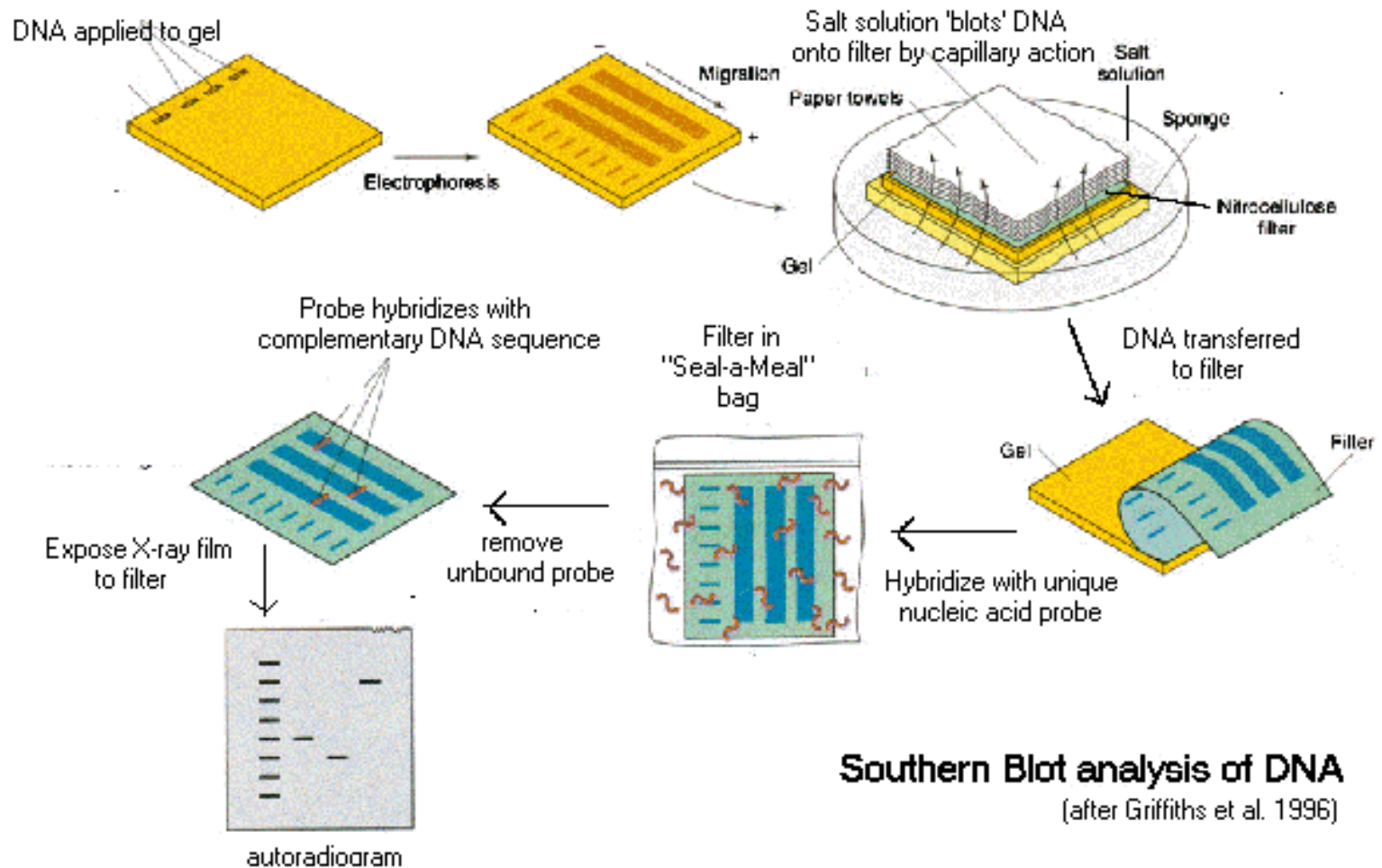


- Injektion der DNA in befruchtete Eizellen
 - Implantieren der Eizelle in eine Maus
- Entstehung einer transgenen Maus

Identifikation der transgenen Mäuse durch Southern Blot

- Restriktionsverdau mit EcoRI
- Denaturierung der DNA
- Agarose-Gelelektrophorese
- Übertragen des Agarose-Gels auf Membran (= Blotten)
- Hybridisierung der DNA-Sonden:
 - 450 bp Fragment der BCR-ABL1 Region (PCR)
 - 1020 bp tTA Fragment, das durch Verdau mit EcoRI und BamHI aus dem Transaktivator-Plasmid pUHD 15-3 isoliert wurde

Southern Blot



Southern Blot analysis of DNA

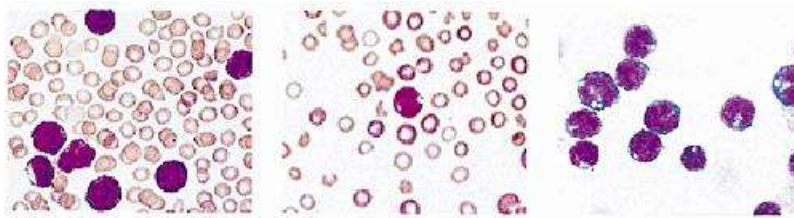
(after Griffiths et al. 1996)

Sekundäre Transplantation der akuten B-Zell-Leukämie

- Injektion von $5 \cdot 10^6$ Zellen aus den vergrößerten Lymphknoten eines Tieres mit akuter Leukämie
- 2x wöchentlich auf Entwicklung von Leukämie untersuchen

Untersuchung des peripheren Blutes auf Anzeichen von Leukämie

- Auszählen der ausdifferenzierten weißen Blutkörperchen im peripheren Blut der doppelt transgenen und der einfach oder nicht transgenen Mäuse
- Anfärben des peripheren Blutes durch Wright Giemsa Färbung



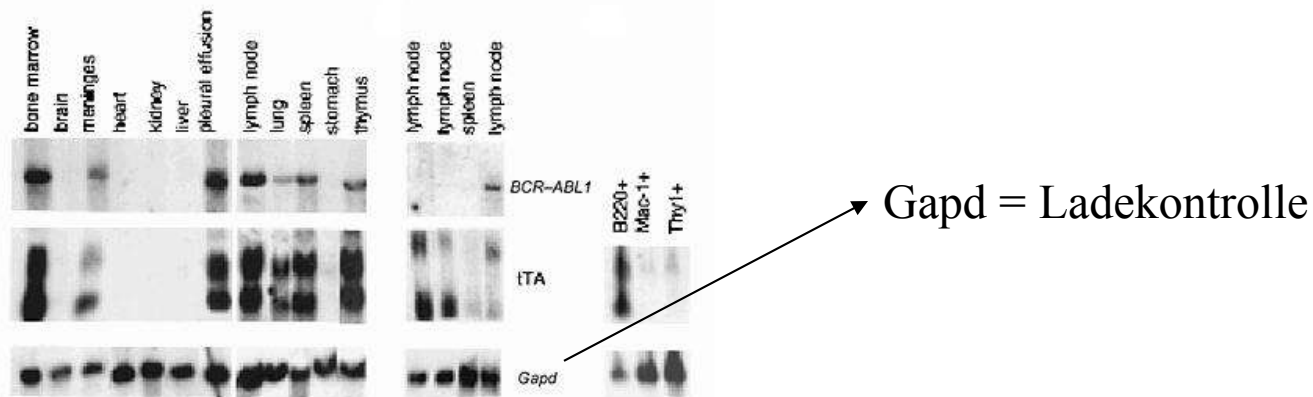
- FACS-Analyse (= Fluorescence Activated Cell Sorter)
mittels Färbung mit fluoreszenten Antikörpern nach Lyse der roten Blutkörperchen mit Lysepuffer;
verwendete monoklonale Antikörper: anti-Thy 1.1, anti-Cd4, anti-Cd8, anti-Cd43, anti-Bp-1, anti-Cd24, anti-B220, anti-Gr-1, anti-Mac-1

Knochenmarkszellen

- Entnehmen des Knochenmarks aus Tibia und Femur, da Anhäufung von Leukämiezellen auch im Knochenmark bei Ausbruch der Krankheit vorzufinden
- Isolieren der Zellen, die T-Zell Marker Thy 1, B-Zell Marker B220 und myeloid Marker Mac-1 exprimieren
(mittels Mini Macs System nach Angaben des Herstellers Miltenyi Biotec)
- zweimalige Durchführung der Reinigung für jeden Marker

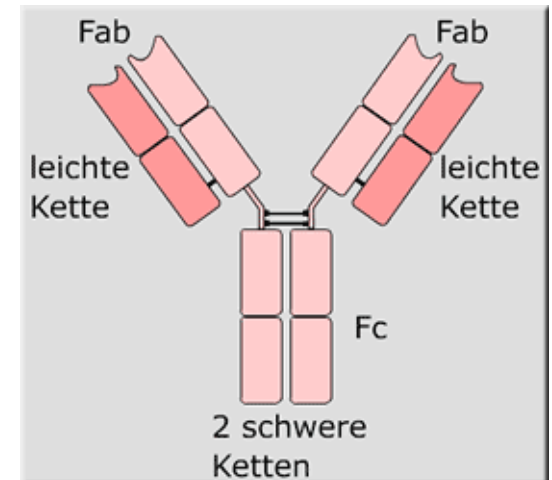
Isolation der RNA und Northern Blot

- Extraktion der RNA aus Geweben von erkrankten Mäusen und Kontroll-Mäusen nach Homogenisierung in Guanidin-Isothiocyanat-Lösung
- Trennung der RNA auf 1% Agarose-Gel, das Formaldehyd (0,22M) enthält,
- Übertragung auf eine ungeladene Nylon-Membran (Kapillartransfer)
- Behandlung der Membran mit einem ultravioletten Crosslinker
- anschließend Nachweis der RNA durch Hybridisierung mit markierter DNA (^{32}P - α [dCTP] radioaktivmarkierte Proben auf BCR-ABL1 und tTA)



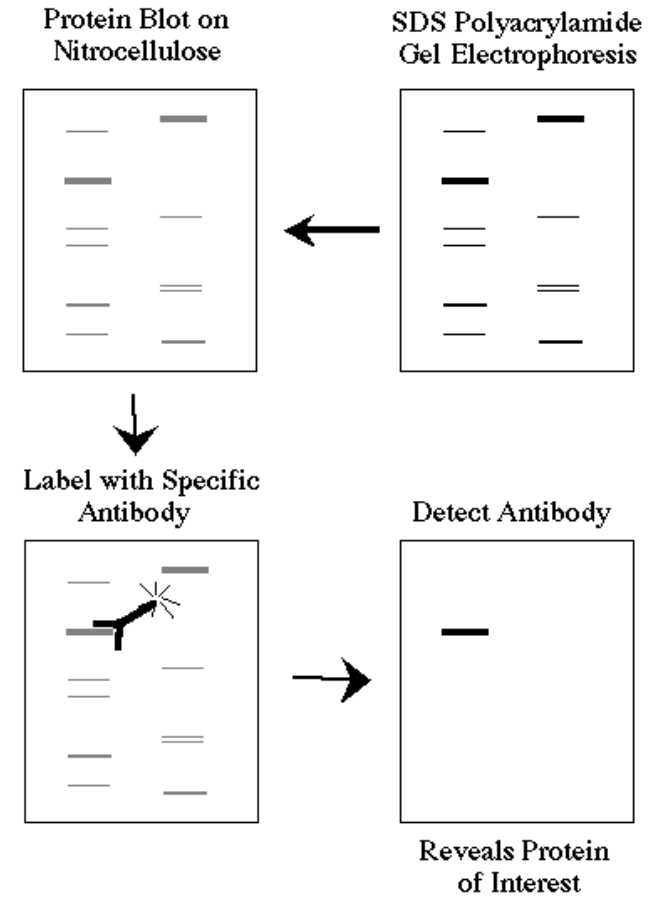
Southern Blot zur Analyse von Immunglobulin-Rearrangements

- Isolieren der genomischen DNA aus Gewebe erkrankter Mäuse
- Verdau der DNA mit EcoRI zur Analyse von Rearrangements der schweren Ketten der Immunglobuline, EcoRI + BamHI zur Analyse der leichten Ketten
- Elektrophorese in 0,6% Agarose-Gel
- Übertragen auf positiv geladene Nylon-Membran
- Hybridisierung mit radioaktiven Proben für die schweren und leichten Ketten



Western Blot

- Homogenisierung der Protein-Lysate hämatopoietischer Zellen und Gewebe
- SDS-Gelelektrophorese
- Bestimmung der Menge an Protein, die in jeder Bahn geladen wurde, durch Bradford Assay und Coomassie Blau Färbung
- Western Blot Analyse: Überführen des Gels auf Membran
- Immundetektion: Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers: anti-ABL Antikörper



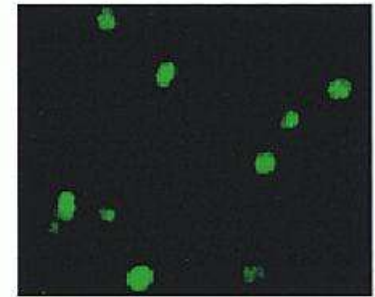
Ermitteln von apoptotischen Zellen im peripheren Blut

- Ermitteln der weißen Blutkörperchen des peripheren Blutes, die Apoptose durchführten, mittels TUNEL Assay nach Lyse der roten Blutkörperchen

TUNEL Assay:

Charakteristische Eigenschaft von apoptotischer Zellen:
enzymatischer Abbau ihrer DNA in Fragmente definierter
Größe

lichtmikroskopische Sichtbarmachung der apoptoseinduzierten
DNA-Strang-Brüche durch Markierung: freie 3'-OH-Enden
der DNA-Fragmente werden mit fluoreszierendem Farbstoff
mit Hilfe des Enzyms Terminale-desoxynucleotidyl-Transferase
(TDT) markiert

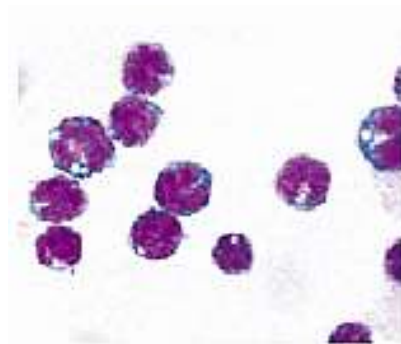
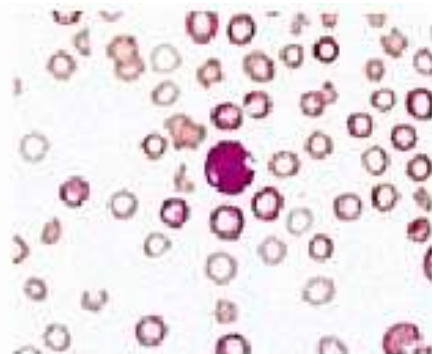
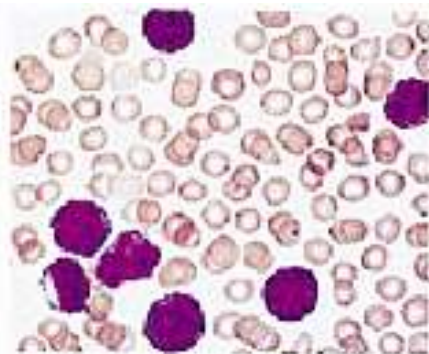


Teil 3: Ergebnisse

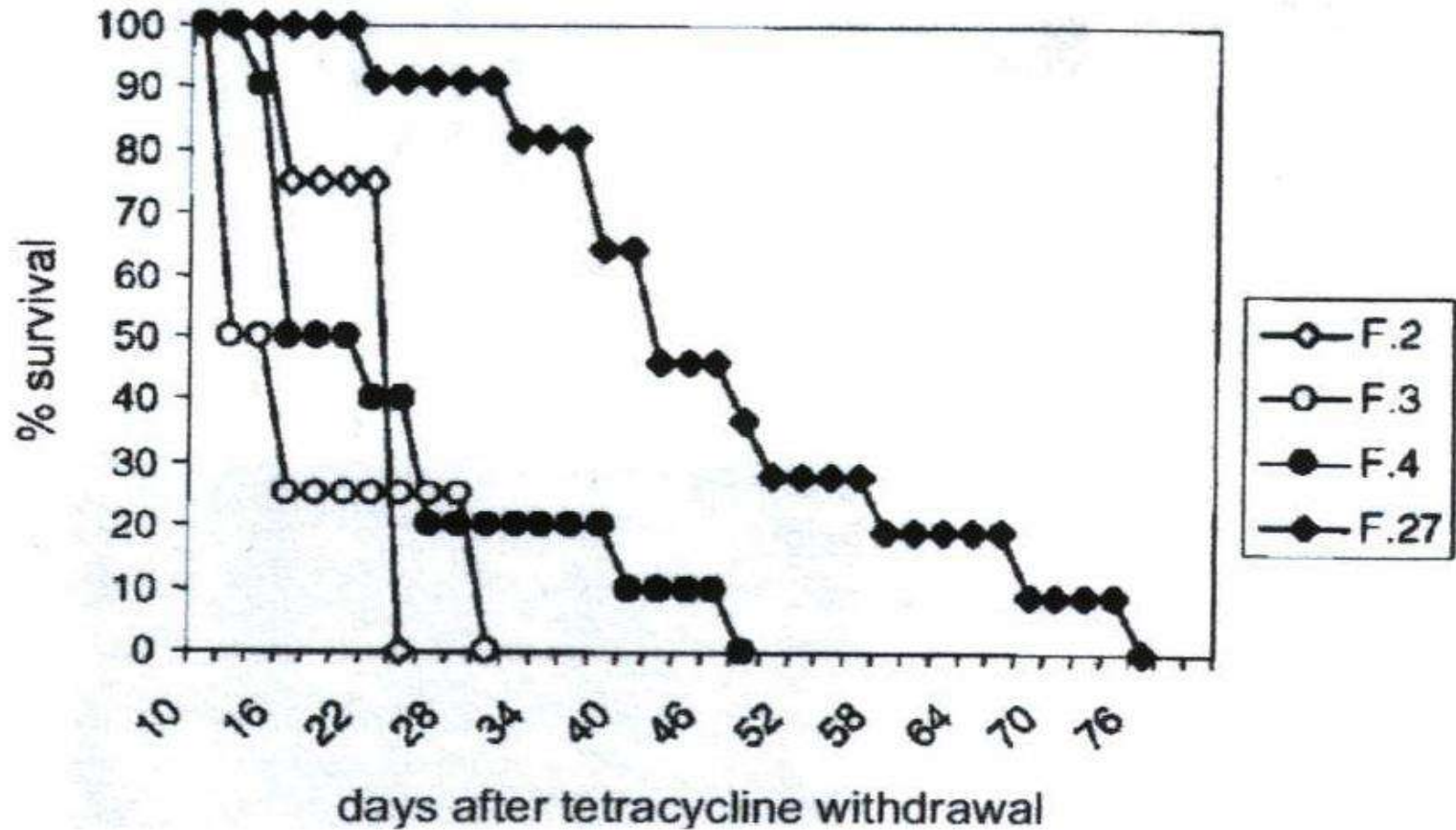
Induktion der Leukämie

- Expression des BCR-ABL1 Gens durch Absetzung von Tetracyclin
- Leukämiesymptome:
 - > 90% der Zellen im peripheren Blut sind Lymphoblasten
 - Entwicklung massiver Lymphadenopathie und Splenomegalie
 - Eindringen leukämischer Zellen in Haut, Pleura und Meningen
 - bleiches Knochenmark, hämatopoietische Zellen durch Lymphoblasten ersetzt
 - schwere Anämie und Thrombozytopenie im peripheren Blut
 - Transfer der Leukämie in nichtbefallene Rezipienten

a

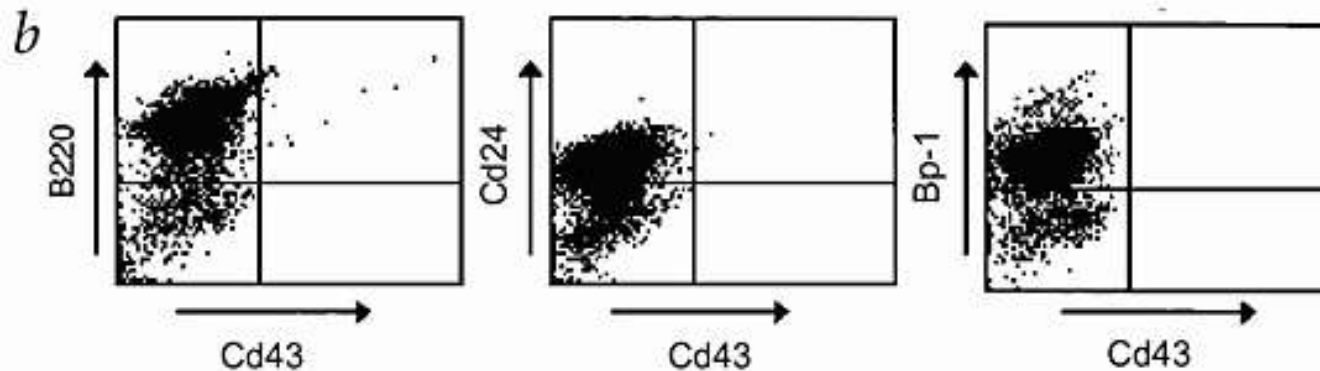


Sterblichkeit nach Induktion

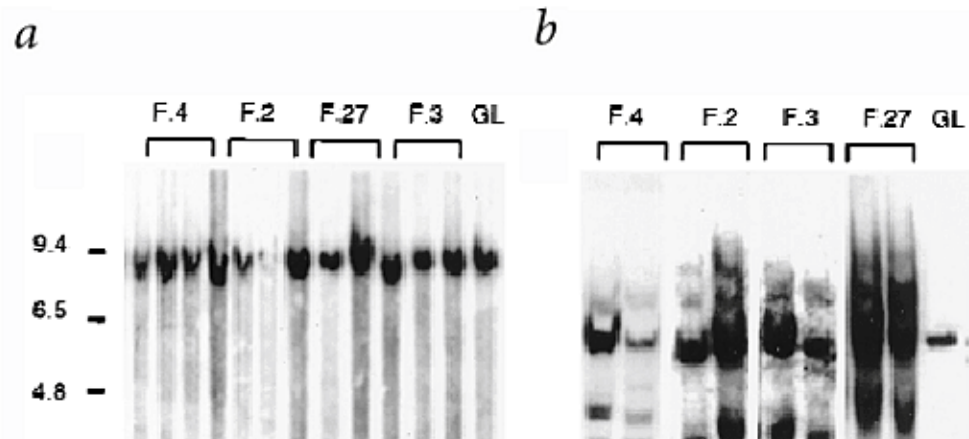


Cytometrie und Southern Blot

- Cytometrie: Aussage über die betroffene Zellart



- Southern Blot: Immunglobulin-Rearrangement
→ Arrest im späten pro-B-Zell-Stadium

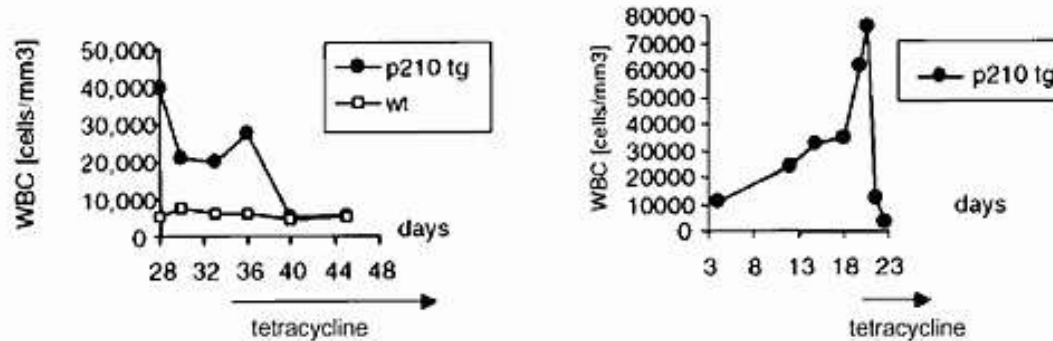


Schlußfolgerung:

BCR-ABL1 hat eine akute B-Zell-Leukämie (ALL) verursacht

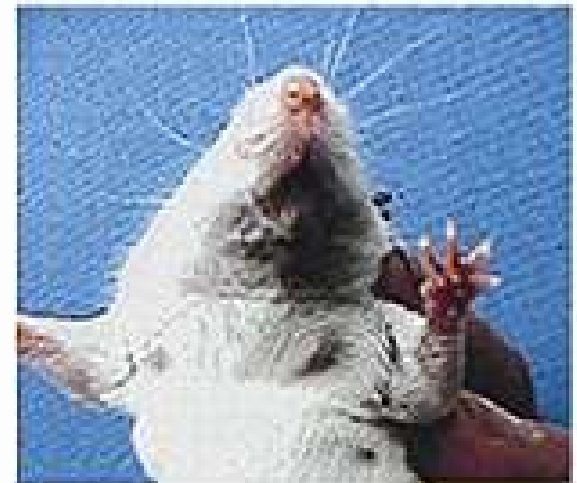
Aufhebung des Phänotyps

- Mäusen mit fortgeschrittenen Stadien der Leukämie wurde wieder Tetrazyklin gegeben
- die Folgen: Normalisierung der Leukozytenzahl



keine Lymphoblasten mehr nachweisbar
vollständiger Rückgang vergrößerter Lymphknoten

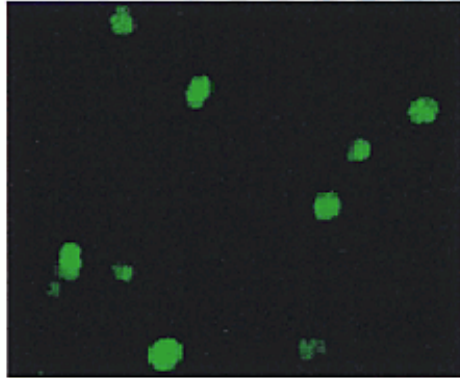
a



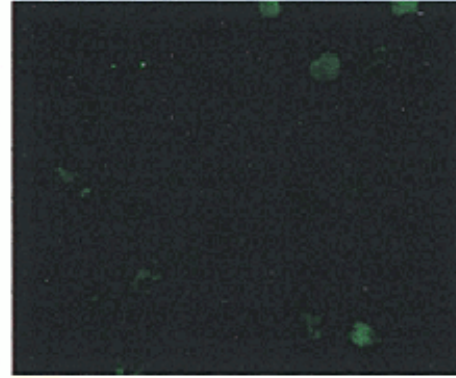
Aufhebung des Phänotyps

- Schnelles Verschwinden der leukämischen Zellen durch Apoptose

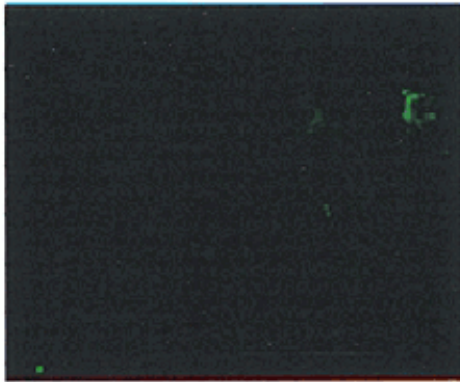
a



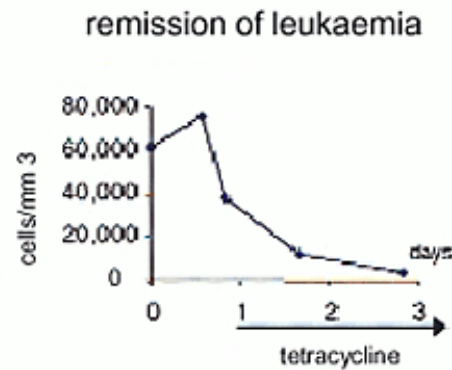
b



c

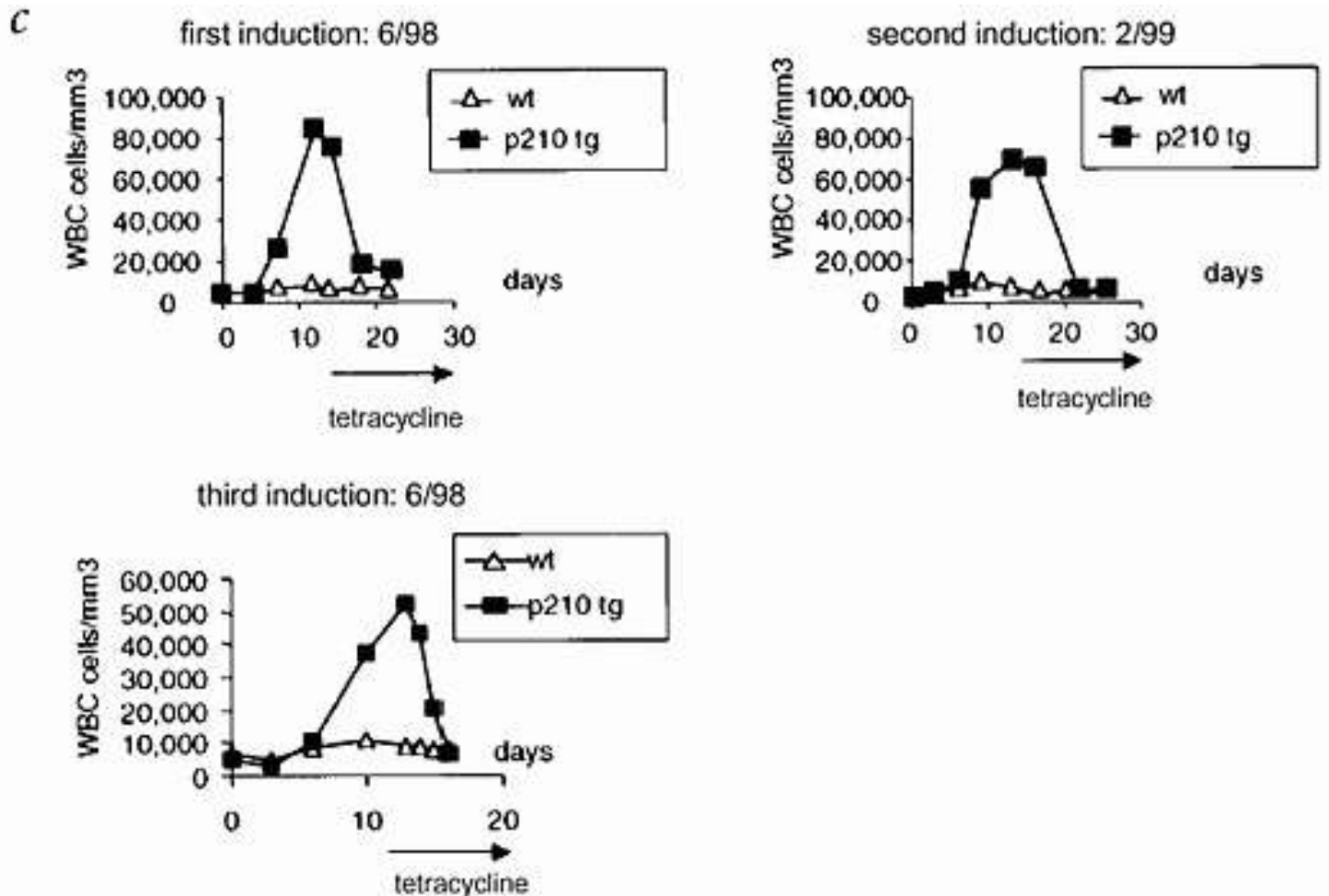


d



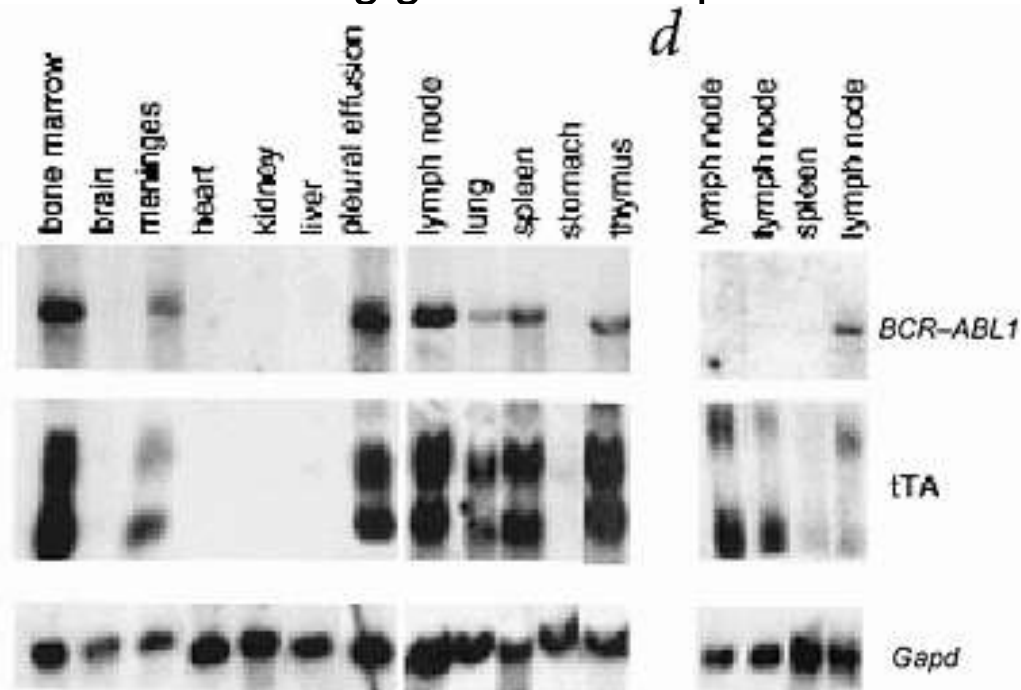
Aufhebung des Phänotyps

- Reversion des Phänotyps in den Linien 2, 3 und 4 permanent, solange Tetracyclin gegeben wurde
- späterer Entzug induzierte wieder Leukämie
- mehrmalige Reversion und Induktion möglich



Besonderheiten der Linie 27

- Reversion des Phänotyps nicht permanent
- nach 2 – 4 Wochen Entwicklung einer schnell fortschreitenden B-Zell-Leukämie
- diese Leukämie war *unabhängig* von der Expression von BCR-ABL1 *c*



- Vermutung: Sekundärmutation(en) als Verursacher

Zusammenfassung

- transgenetisches Modell zur konditionalen Expression des Onkogens BCR-ABL1
- das Modell zeigt erstmals:
 - kontinuierliche Expression des Onkogens zu Aufrechterhaltung der Leukämie nötig
 - Leukämie-Phänotyp selbst im fortgeschrittenen Stadium komplett reversibel
- Reversibilität möglicherweise abhängig davon, wie schnell/langsam eine Zelle Leukämie entwickelt
- Längere Expression von BCR-ABL1 könnte Wahrscheinlichkeit von Sekundärmutationen erhöhen
- dauerhafte Heilung von ALL könnte durch Aufheben/Unterdrücken der Mutation erreicht werden
- für die Zukunft: dieser Ansatz sollte auch bei anderen Leukämien genutzt werden

Danke für die Aufmerksamkeit