

Bedeutung der c-Abl-Aktivität für die Reaktion auf DNA-Schädigung und für die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Zoologie, Universität Hohenheim

Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart und
Universität Tübingen

vorgelegt von

Silke Fanta

aus Stuttgart

2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Walter-Erich Aulitzky

2. berichtende Person: Prof. Dr. Martin Blum

Eingereicht am: 10. Mai 2011

Mündliche Prüfung am: 28. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 22. Juli 2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt habe.

Silke Fanta

Stuttgart, den 29. Juli 2011

für meine Familie

im Gedenken an meine Oma

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	10
2	EINLEITUNG.....	15
2.1	Imatinib	15
2.1.1	Entwicklung von Imatinib	15
2.1.2	Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) mit Imatinib	16
2.1.3	Nebenwirkungen der Imatinib-Therapie	18
2.2	c-Abl.....	19
2.2.1	c-Abl-Funktion	19
2.2.2	c-Abl-Struktur	21
2.2.3	Hemmung von c-Abl durch Imatinib/ Dasatinib.....	22
2.3	DNA-Reparatur-Prozesse induziert durch ionisierende Strahlung.....	24
2.3.1	Reparatur geschädigter Basen	25
2.3.2	Einzelstrangbruchreparatur (SSBR).....	27
2.3.3	Doppelstrangbruchreparatur (DSBR).....	28
2.3.4	Weitere in die DNA-Stress-Antwort involvierte Proteine	29
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	31
3	MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1	Zellkultur.....	33
3.1.1	Kulturmedium und Zusätze.....	33
3.1.2	Verwendete Zelllinien	34
3.1.3	Kultivierung der Zellen	35
3.1.4	Trypan-Blau Ausschluss-Färbung.....	35
3.1.5	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	36
3.1.6	Stabile Transfektion eines modifizierten c-Abl-Gens in 32D-Zellen	36
3.1.7	Isolierung monoklonaler 32D Abl-wt- bzw. 32D Abl-T315I-Zelllinien	37
3.1.8	Sequenzierung zur Feststellung des c-Abl-Status der transfizierten Zelllinien	37
3.2	Kultur von primärem Zellmaterial.....	40
3.2.1	Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	40
3.3	Behandlung der Zellen.....	41
3.3.1	Induktion von DNA-Schädigung	41
3.3.2	Inhibition der c-Abl-Tyrosinkinase.....	41
3.4	Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay.....	41
3.5	Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers	42

3.5.1	Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung.....	42
3.5.2	Nachweis später Apoptose/ Nekrose über PI-Färbung	43
3.5.3	Zellzyklus-Analyse.....	43
3.5.4	BrdU-Proliferationsanalyse	44
3.5.5	γ -H2AX-Analyse.....	45
3.5.6	PAR-Analyse.....	45
3.6	Untersuchung der Mutationsfrequenz von Zellen.....	46
3.6.1	Prinzip des <i>hprt</i> -Gen Mutations Assay	46
3.6.2	<i>hprt</i> -Gen Mutations Assay/ <i>Cloning Efficiency</i> (CE)-Assay	47
3.6.3	Giemsa-Färbung adhärenter Zellkolonien.....	47
3.7	Untersuchung der Reparaturfähigkeit der Zellen.....	47
3.7.1	Prinzip des Comet-Assays.....	48
3.7.2	Alkalischer Comet-Assay	49
3.7.3	Neutraler Comet-Assay	49
3.7.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese	50
3.8	Protein-Analyse.....	51
3.8.1	Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien (Direktmethode).....	51
3.8.2	Gesamtproteinextraktion aus primären mononukleären Blutzellen (PBMC)	52
3.8.3	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford	52
3.8.4	Immunpräzipitation	53
3.8.5	Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE.....	53
3.8.6	Western-Blot-Analyse	54
3.9	Immunfluoreszenz	57
3.9.1	Lokalisation von γ -H2AX	57
3.9.2	Lokalisation poly-(ADP-ribosyl)ierter Proteine.....	57
3.10	Statistische Auswertungen.....	58
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinienmodelle zur Untersuchung des Einflusses der c-Abl-Aktivität.....	59
4.1.1	Charakterisierung der 32D Abl-wt- und 32D Abl-T315I-Zelllinien.....	60
4.1.2	Bestimmung des c-Abl-Status in den MEF-Zelllinien.....	61
4.2	Inhibition der c-Abl-Aktivität durch Imatinib	62
4.3	Imatinib-beeinflusste Mutationsfrequenz Bcr-Abl-negativer und –positiver Zellen	64
4.4	Einfluss von Imatinib auf die Proliferation und den Zelltod Bcr-Abl-negativer Zellen	66

4.5 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib auf die DNA-Schadens-Reparatur Bcr-Abl-negativer Zellen	71
4.5.1 Imatinib führt zu einer Verzögerung der Reparatur der durch γ -Strahlung induzierten DNA-Strangbrüche.....	71
4.5.2 Die DNA-Strangbruchreparatur ist auch nach Dasatinib-Behandlung verzögert	74
4.5.3 Die Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur ist abhängig von der c-Abl-Tyrosinkinaseaktivität.....	74
4.5.4 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist von Imatinib unbeeinflusst	76
4.6 Einfluss von Imatinib auf verschiedene DNA-Reparatur-Signalwege	81
4.6.1 Kein Einfluss von Imatinib auf die ATM/Chk2- und ATR/Chk1-Signalwege.....	81
4.6.2 Imatinib hat keinen Einfluss auf p53.....	83
4.6.3 Imatinib beeinflusst die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung von Zellproteinen	85
5 DISKUSSION	91
5.1 Hemmung von c-Abl durch Imatinib	91
5.2 Genetische Instabilität Bcr-Abl-negativer Zellen durch Hemmung der c-Abl-Aktivität.....	92
5.3 Imatinib führt zur verzögerten Reparatur der durch γ-Strahlung induzierten DNA-Strangbrüche.....	94
5.4 Die Imatinib-Hemmung der c-Abl-Aktivität beeinflusst die SSBR.....	97
5.5 Imatinib führt zur veränderten Prozessierung von SSB	98
5.6 Fazit und Ausblick.....	104
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	107
7 SUMMARY	111
8 LITERATURVERZEICHNIS	115
9 PUBLIKATIONEN	133
10 DANKSAGUNG	134
11 LEBENS LAUF	135

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampère
Abb.	Abbildung
Abl	<i>Abelson</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	akute lymphatische Leukämie
AP-Stelle	<i>apurinic/ apyrimidinic sites (abasic site)</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	<i>Abl-related gene</i>
ARH3	ADP-Ribosylhydrolase 3
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
Bcr	breakpoint cluster region
BER	<i>base excition repair</i>
BRCA1	<i>breast cancer 1, early onset</i>
BrdU	2-Bromo-5-Desoxyuridin
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
c-Abl	<i>cellular Abelson leukemia virus</i>
CBBG	„Coomassie-Brillant-Blau G-250“
CE	<i>cloning efficiency</i>
Chk1	<i>checkpoint homolog kinase 1</i>
Chk2	<i>checkpoint homolog kinase 2</i>
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase (catalytic subunit)</i>

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DSB	Doppelstrangbru(e)ch(e), <i>double strand break(s)</i>
DSBR	<i>double strand break repair</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
e.g.	<i>exempli gratia (for example)</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FAR	<i>fraction of activity released</i>
FCS	foetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FEN1	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	<i>forwardscatter</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GG	<i>global genomic</i>
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
Hdm2	<i>human double minute 2</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	homologe Rekombination
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IR	ionisierende Strahlung (<i>ionizing radiation</i>)
k	Kilo-
KD	Kinase-defizient

l	Liter
LMT	<i>low melting temperature</i>
m	Milli-
M	Molar (mol/l)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
Mdm2	<i>murine double minute 2</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
min	Minute(n)
mIL3	murines Interleukin 3
mRNA	<i>messenger RNA</i>
μ	Micro-
n	Nano-
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NER	<i>nucleotide excition repair</i>
NES	nukleäre Exportsequenzen
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenzen
N-terminal	Amino-terminal
P-	Phospho- (phosphoryliertes Protein)
PAR	Poly-(ADP-Ribose)
PARG	Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	primäre mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline plus Tween[®]20</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	Phycoerythrin
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
Ph	Philadelphia-Chromosom
PHA-L	Phytohämagglutinin-L
PI	Propidiumjodid
PJ34	N-(6-Oxo-5,6-Dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-Dimethyl-amino)Acetamid Hydrochlorid

RevT	Reverse Transkription
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standartfehler des Mittelwertes (<i>standard error of means</i>)
Ser	Serin
SH2	<i>Src-homology-2</i>
SH3	<i>Src-homology-3</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSB	Einzelstrangbru(e)ch(e), <i>single strand break(s)</i>
SSBR	<i>single strand break repair</i>
SSC	<i>sidescatter</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single stranded DNA</i>)
Tab.	Tabelle
TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline plus Tween[®] 20</i>
TC	<i>transcription coupled</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyroxin
U	<i>unit(s)</i>
u.a.	unter anderem
ub	unbestrahlt
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
W	Watt

w/v	Masse/Volumen
wt	Wildtyp
XRCC1	<i>X-ray repair complementing defective repair Chinese hamster cells 1</i>
z.B.	zum Beispiel

2 EINLEITUNG

2.1 Imatinib

Die Entwicklung von Imatinib (Imatinib Mesylate, STI571, *Glivec*[®], *Gleevec*[®]) war einer der wichtigsten Schritte in der Therapie maligner Erkrankungen während der letzten Jahre und führte zur grundlegenden Änderung der Behandlung der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) (Deininger *et al.*, 2004; Guilhot *et al.*, 2004). Imatinib gehört zu einer neuen Klasse der anti-karzinogenen Wirkstoffe, den sogenannten *small-molecule*-Inhibitoren. Diese zeichnen sich durch eine hohe Selektivität gegen spezifische molekulare Zielstrukturen aus, welche dafür bekannt sind, für den malignen Phänotyp einer Erkrankung mitverantwortlich zu sein. Im Falle der CML ist diese Zielstruktur das onkogene Fusionsprotein Bcr-Abl, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, exprimiert durch das chimäre Onkogen *bcr-abl* (*breakpoint cluster region*, *Abelson leukemia virus*) (Druker *et al.*, 2002).

2.1.1 Entwicklung von Imatinib

Lyndon und Matter, Wissenschaftler bei Ciba Geigy (heute Novartis, Schweiz), arbeiteten in den frühen 1990ern an der Entwicklung spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitoren. Dabei wurde auch ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat entwickelt, welches ursprünglich als PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*)-Inhibitor entworfen war. Später stellte sich auch die inhibitorische Wirkung auf die Autophosphorylierung von c-Abl (*cellular Abelson leukemia virus*), Bcr-Abl, Arg (*Abl-related gene*) und c-Kit (Stammzellefaktor-Rezeptor) heraus (Buchdunger *et al.*, 1996; Carroll *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2000). Die ersten Serien der Komponente waren noch schlecht wasserlöslich und die orale Bioverfügbarkeit gering. Chemisch modifiziert (durch die Anbindung einer hochpolaren Seitenkette) zeigte die so entstandene Substanz CGP57148B (später STI571, Imatinib Mesylate) eine deutlich verbesserte Löslichkeit und orale Bioverfügbarkeit.

In Bcr-Abl-positiven CML- und ALL (akute lymphatische Leukämie)-Zelllinien zeigte sich die vielversprechende antikanzerogene Wirkung der Substanz (Druker *et al.*, 1996; Buchdunger *et al.*, 1996). Imatinib erhielt im Mai 2001 die Zulassung der FDA (Food and Drug

Administration) für die Vereinigten Staaten von Amerika und im November 2001 die Zulassung der EMEA (European Medicines Evaluation Agency) für Europa für die Behandlung der CML.

2.1.2 Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) mit Imatinib

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist gekennzeichnet durch eine Fehlfunktion der hämatopoetischen Stammzellen, wodurch myeloische Vorläuferzellen stark expandieren. Die Erkrankung kommt typischerweise bei älteren Erwachsenen vor, kann jedoch prinzipiell in jedem Alter auftreten. Die CML verläuft in drei Phasen: während die chronische Phase, gekennzeichnet durch eine Vermehrung der Leukozyten (Leukozytose) und Milzvergrößerung (Splenomegalie), sich meist über mehrere Jahre erstreckt, schreitet sie ohne Therapie über die Akzelerationsphase in die tödliche Blastenkrise fort. Die akzelerierte Phase stellt eine Übergangshase dar, wobei es neben der zunehmenden Leukozytose zur Blutarmut (Anämie) und einem Mangel an Blutplättchen (Thrombozytopenie) kommt. Die unbehandelt meist innerhalb weniger Wochen zum Tode führende Blastenkrise tritt plötzlich aus der Akzelerationsphase oder direkt aus der chronischen Phase heraus auf. Charakterisiert ist sie durch einen einer akuten Leukämie entsprechenden Verlauf. Die rasante und unkontrollierte Vermehrung von unreifen Leukozyten-Vorläuferzellen und deren Übertritt ins periphere Blut führt zu starker Anämie, Thrombozytopenie, Blutungen und Infektionen.

Charakterisiert ist die CML durch das Fusionsgen *bcr-abl*, das Ergebnis einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, zytogenetisch sichtbar als verkürztes Chromosom 22, das sogenannte Philadelphia-Chromosom (Nowell & Hungerford, 1960; Rowley, 1973; Vardiman *et al.*, 2001). Resultierend in das Onkoprotein Bcr-Abl ist *bcr-abl* verantwortlich für die Pathogenese der CML: durch die konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität werden hämatopoetische Zellen *in vitro* und *in vivo* transformiert (Daley *et al.*, 1990; Lugo *et al.*, 1990), was zu deren erhöhter Proliferation, gesteigerter Wachstumsfaktor-Unabhängigkeit, verminderter Apoptose und gestörten Interaktionen mit extrazellulärer Matrix und Stroma führt (Übersichten in: Sawyers, 1999; Deininger *et al.*, 2000). Daher stellt die Inhibition der Bcr-Abl-Kinaseaktivität eine hervorragende Therapie-Möglichkeit der CML dar. Imatinib bindet an die Abl-Kinase-Domäne der inaktiven Form von Bcr-Abl und stabilisiert diese damit im inaktiven Zustand (Schindler *et al.*, 2000). *In vitro* zeigt sich die antikanzerogene Wirkung von Imatinib in Bcr-Abl-positiven Zellen durch Hemmung der Proliferation, Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle, Zelltod-Induktion und eine erhöhte genetische Stabilität (Gambacorti-Passerini *et al.*,

1997; Jonuleit *et al.*, 1998; Oetzel *et al.*, 2000; Jonuleit *et al.*, 2000; van der Kuip *et al.*, 2004).

Die ersten klinischen Studien wurden mit Patienten durchgeführt, bei denen die bis dato übliche Interferon- α (IFN α)-Therapie fehlgeschlagen war oder die IFN α nicht vertrugen. Von den 54 Patienten, die eine Tagesdosis von 300 mg oder mehr erhielten, zeigten 53 bereits innerhalb des ersten Monats eine komplette hämatologische Remission (*complete hematological remission*, CHR), also eine Normalisierung des Blutbildes. Bei 31 % erfolgte nach höchstens drei Monaten eine sogenannte „gute zytogenetische Remission“ (*major cytogenetic remission*, MCyR), d.h. das Philadelphia-Chromosom war nur noch stark vermindert nachweisbar. Bei 13 % konnte sogar eine „komplette zytogenetische Remission“ (*complete cytogenetic remission*, CCyR) nachgewiesen werden (Druker *et al.*, 2001).

Phase-II-Studien, mit einer Tagesdosis von 400 mg für Patienten in der chronischen Phase der CML und 600 mg bis 800 mg für Patienten in der Akzelerationsphase oder der Blastenkrise, demonstrierten ebenso den durchschlagenden Erfolg von Imatinib: nach einem Monat zeigten 95 % der CML-Patienten in der chronischen Phase eine CHR, 60 % eine MCyR und 41 % sogar eine CCyR. Zwar waren die Werte für Patienten in der Akzelerationsphase (69 % CHR, 24 % MCyR, 17 % CCyR) und der Blastenkrise (31 % CHR, 16 % MCyR, 7 % CCyR) weniger hoch, jedoch ist auch hier der Erfolg überwältigend (Sawyers *et al.*, 2002; Kantarjian *et al.*, 2002; Talpaz *et al.*, 2002).

In der Phase-III-IRIS-Studie (*International Randomized Study of Interferon and STI571*) wurde die konventionelle IFN α -Cytarabin-Kombinations-Therapie mit der Imatinib-Therapie der CML verglichen. Nach 19 Monaten zeigte die Imatinib-Therapie mit einer CHR von 95 % *versus* 55 %, einer CCyR von 76 % *versus* 15 % die deutliche Überlegenheit gegenüber der IFN α -Cytarabin-Therapie, welche außerdem noch mit stärkeren Nebenwirkungen und somit einer verminderten Lebensqualität einherging (O'Brien *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2003, Roy *et al.*, 2006). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde Imatinib von den Aufsichtsbehörden für Europa und den USA als Erstlinientherapie für die Behandlung der CML empfohlen.

Dennoch ist es nach den bisherigen Ergebnissen klinischer Studien zweifelhaft, ob eine Heilung der CML durch Imatinib möglich ist. Im Rahmen verschiedener Studien, u.a. der STIM-Studie (Stop Imatinib) wurde bei Patienten, die sich in kompletter molekularer Remission befanden, d.h. bei denen selbst mit sensitivsten PCR-Methoden keine *bcr-abl*-Transkripte nachweisbar waren, die Imatinib-Therapie abgesetzt. Ca. 40 % der Patienten waren nach einem Jahr noch

rückfallfrei, bei den anderen kam es zu einem rapiden Wiedererscheinen des Bcr-Abl-positiven Klons (Mauro *et al.*, 2004; Michor *et al.*, 2005; Corbin *et al.*, 2010; Mahon *et al.*, 2010). Demnach ist eine dauerhafte, möglicherweise lebenslange Imatinib-Therapie notwendig, um die CML zu kontrollieren. Als Konsequenz ist es enorm wichtig, die biologischen Effekte von Imatinib in normalen Zellen zu untersuchen und zu verstehen.

2.1.3 Nebenwirkungen der Imatinib-Therapie

Auch wenn die Behandlung im Allgemeinen gut toleriert wird, zeigten sich bereits in den klinischen Studien der Phase I und Phase II Nebenwirkungen. Zu den häufigsten gehören milde Übelkeit, Flüssigkeitsansammlungen (Flüssigkeitsretention) mit leichten bis moderaten Ödemen, Muskelkrämpfe, Durchfall, Hautausschläge und Myelosuppression (Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie). Die meisten dieser Nebenwirkungen sind medikamentös gut zu behandeln. Bei Übelkeit kann schon die Einnahme von Imatinib nach dem Essen ausreichen, das Symptom zu lindern. Die Ausprägung der Nebenwirkungen ist meist abhängig von der Phase der CML und der Imatinib-Dosis (Cohen *et al.*, 2002; Deininger *et al.*, 2003).

Dies gilt auch für die Diarrhö, die vermutlich durch lokale irritierende Effekte von Imatinib ausgelöst wird, wobei alternativ als Grund auch die Inhibierung des Stammzellofaktor-Rezeptors c-Kit diskutiert wird, welcher hochexprimiert in den intestinalen Schrittmacherzellen (interstitiellen Cajal-Zellen) vorkommt (Deininger *et al.*, 2003; Popescu *et al.*, 2006). Flüssigkeitsretention und Ödeme werden vermutlich durch die Inhibierung der Zielstrukturen von Imatinib ausgelöst, welche für die Funktionsfähigkeit von Kapillaren verantwortlich sind. So zeigten Mäuse mit einer homozygoten Deletion des *PDGFR-β*-Gens defekte Venen und Ödeme (Lindahl *et al.*, 1997) und *abl/arg*-Doppel-*knockout*-Mäuse zeigten ebenfalls Ödeme, was nahelegt, dass diese Kinasen hier eine Rolle spielen (Koleske *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde eine toxische Kardiomyopathie festgestellt, direkt verursacht durch die Inhibition von c-Abl durch Imatinib, die ebenso für die Flüssigkeitsretention verantwortlich sein kann (Kerkelä *et al.*, 2006). Jedoch ist die Inzidenz einer Herzinsuffizienz durch Imatinib sehr gering und geht meist einher mit fortgeschrittenem Alter und bereits vor der Imatinib-Therapie bestehenden Herzproblemen (Atallah *et al.*, 2007).

2.2 c-Abl

Um die genetische Stabilität normaler Zellen zu gewährleisten, ist eine komplexe und genaue Regulation von Kontrollmechanismen notwendig. Dabei müssen genetische Schäden erkannt, der Zellzyklus moduliert werden, um diese zu reparieren oder, sollte eine Reparatur nicht möglich sein, der Zelltod eingeleitet werden. c-Abl spielt, vor allem unter zellulärem Stress, eine zentrale Rolle in diesem Regulationsnetzwerk (Shaul & Ben-Yehoyada, 2005).

2.2.1 c-Abl-Funktion

Das Protein c-Abl ist eine ubiquitär exprimierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, deren Aktivität in normalen Zellen streng räumlich und zeitlich kontrolliert ist (Zhu & Wang, 2004). Die Deregulation dieser Aktivität führt zu dramatischen Konsequenzen, was sich sowohl anhand der gestörten Embryogenese in *abl-knockout*-Mäusen, als auch in onkogenen Zellen bezüglich der konstitutiv aktiven Variante Bcr-Abl zeigt, wobei es zur Entwicklung der CML kommt. Die Bedeutung von c-Abl für eine korrekte Embryogenese verdeutlicht sich im Phänotyp von *abl-knockout*-Mäusen: diese Tiere zeigen eine erhöhte perinatale Sterblichkeit, Zwergwuchs, abnormale Milz-, Kopf- und Augenentwicklung und Funktionsstörungen des Immunsystems (Schwartzberg *et al.*, 1991; Tybulewicz *et al.*, 1991).

Die Funktionen von c-Abl sind bestimmt durch die subzelluläre Lokalisation: so kommt c-Abl sowohl im Cytoplasma als auch im Kern vor, zwischen denen es permanent pendelt (Van Etten *et al.*, 1989; Wetzler *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1996; Taagepera *et al.*, 1998). Während durch ionisierende Strahlung nukleäres c-Abl aktiviert wird, wird cytoplasmatisches c-Abl durch oxidativen Stress, bzw. nach der Behandlung der Zellen mit H₂O₂, aktiviert (Kharbanda *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2000a,b).

Die Kinase c-Abl ist in einige Signalwege der Stressantwort involviert und interagiert mit einigen Proteinen, welche in der Prozessierung und der Reparatur von DNA-Schäden eine Rolle spielen. So bindet c-Abl an p53, was zu einer erhöhten Transkription p53-abhängiger Gene führt (Goga *et al.*, 1995; Nie *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2005). Durch die Phosphorylierung des p53-Inhibitors Mdm2 (*murine double minute 2*) bzw. Hdm2 (*human double minute 2*, humanes Analogon zu Mdm2) durch c-Abl an den Tyrosinresten Tyr394 bzw. Tyr276 wird die transkriptorische Aktivität von p53 zusätzlich erhöht, da dadurch sowohl Degradation

als auch Ubiquitinierung von p53 gehemmt wird (Dias *et al.*, 2006; Sionov *et al.*, 1999). Infolge von DNA-Schädigung phosphoryliert c-Abl des Weiteren p73 an Tyr99, was zu dessen Stabilisierung und Aktivierung und der Erhöhung der proapoptischen Funktion dieses p53-Familienmitglieds führt (Yuan *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 1999). DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), eine in die Detektion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen involvierte Proteinkinase, interagiert nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung verstärkt mit c-Abl (Kharbanda *et al.*, 1997). Die Aktivierung von c-Abl nach genotoxischem Stress ist abhängig von dessen Phosphorylierung am Serinrest Ser465 durch ATM (*Ataxia Telangiectasia mutated*), ein Schlüsselprotein in der Prozessierung von Doppelstrangbrüchen (Baskaran *et al.*, 1997; Shafman *et al.*, 1997). c-Abl phosphoryliert außerdem Rad51 an Tyr45 und Tyr315 (Yuan *et al.*, 1998a; Popova *et al.*, 2009). Chen *et al.* (1999) konnten ATM, c-Abl und Rad51 aus Zell-extrakten co-immunopräzipitieren und nachweisen, dass die Phosphorylierung von Rad51 durch c-Abl die Bindung von Rad51 an Rad52 erhöht und damit notwendig für die Rad51/ Rad52-abhängige Rekombination und Reparatur von Strangbrüchen infolge von ionisierender Strahlung ist. Die Interaktionen zwischen ATM, c-Abl und Rad51 schienen hier unabhängig von der DNA-Bindung der Proteine zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten Yuan *et al.* (1998a), dass bei durch c-Abl phosphoryliertem Rad51 die DNA-Bindung inhibiert ist. Auch eine c-Abl-abhängige Phosphorylierung von Rad52 an Tyr104 konnte gezeigt werden. Diese Phosphorylierung ist verantwortlich für die Rad52-Foci-Formation nach DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung (Kitao & Yuan, 2002). Ebenfalls eine wichtige Rolle in der Antwort auf Doppelstrangbrüche spielt BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*), welches konstitutiv mit c-Abl einen Komplex bildet, der infolge von ionisierender Strahlung ATM-abhängig dissoziiert (Foray *et al.*, 2002). Eines der Schlüsselproteine in der Erkennung und Reparatur von Einzelstrangbrüchen ist CSB (*Cockayne Syndrome B*), welches mit c-Abl interagiert und von diesem an Tyr932 phosphoryliert wird, was in eine gegenseitige Regulierung infolge oxidativen Stresses resultiert (Imam *et al.*, 2007). Die Proteinkinase C delta (PKC δ) wird nach ionisierender Strahlung oder oxidativem Stress durch c-Abl an Tyr512 phosphoryliert und aktiviert (Yuan *et al.*, 1998b; Sun *et al.*, 2000b). Die Inhibition von c-Abl durch siRNA (*small interfering RNA*) vermindert die Strahlungs-induzierte Aktivierung von PKC δ und der p38-MAPK (p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen) ebenso wie die darauf folgenden Konformationsänderungen von Bak und Bax. Dies unterstützt die Annahme eines c-Abl-PKC δ -p38-MAPK-Signalwegs, welcher in eine proapoptische DNA-Schadensantwort resultiert (Choi *et al.*, 2006). (Übersicht siehe Abb. 1)

Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass die Aktivität von c-Abl infolge genotoxischen Stresses oder γ -Strahlung hochreguliert wurde (Übersicht in Shaul & Yehoyada, 2005). Dies legt nahe, dass c-Abl eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität innehat, weshalb es von besonderer Wichtigkeit ist, zu untersuchen, ob die Langzeit-Inhibition von c-Abl durch Imatinib diese beeinflusst.

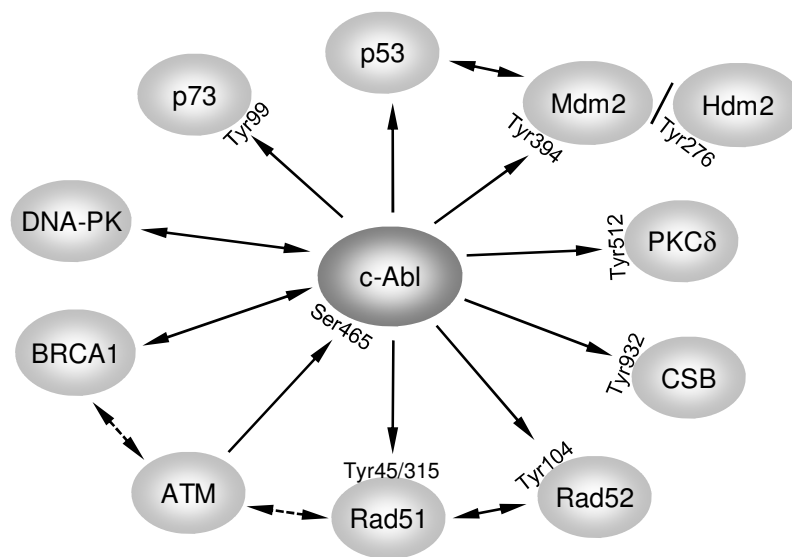


Abbildung 1: Involvierung von c-Abl in die zelluläre Stressantwort. Schematische Darstellung der in die Stressantwort involvierten Proteine, welche Interaktionen mit c-Abl zeigen.

2.2.2 c-Abl-Struktur

Das *abl 1*-Gen, welches für die Nichtrezeptor-Tyrosinkinase c-Abl kodiert, wurde in Säugern als Homologon des retroviralen *v-abl*-Onkogens (*Abelson murine leukemia virus*) identifiziert (Goff *et al.*, 1980). Zusammen mit *Arg*, kodiert durch *arg* (*Abl-related gene*) bzw. *abl 2* gehört c-Abl zur Abl-Familie (Hanks, 2003).

In Säugerzellen ist c-Abl ubiquitär exprimiert und kommt in zwei 145 kDa-Isoformen vor, die aus alternativem Spleißen der beiden ersten Exons resultieren (Ben-Neriah *et al.*, 1986). Die N-terminale Hälfte enthält die SH2- (*Src-homology-2*-), SH3- und die katalytische Domäne. Die SH2-Domäne dient der Bindung Tyrosin-phosphorylierter Proteine, während die SH3-Domäne Prolin-reiche Sequenzen erkennt und bindet (Barilá & Superti-Furga, 1998). Die katalytische

Domäne vermittelt die Tyrosinkinase-Funktion. Der C-Terminus beinhaltet drei nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS), eine nukleäre Exportsequenz (NES), verschiedene Prolinreiche Abschnitte, die SH3-Domänen anderer Proteine binden und Bindestellen für Aktin und DNA (Van Etten *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1996). c-Abl ist durch intramolekulare Interaktionen autoinhibitorisch reguliert, welche die Kinase-Domäne in einer geschlossenen, inaktiven Konformation halten (Barilá & Superti-Furga, 1998; Nagra *et al.*, 2003). Um die aktivierte Konformation zu erreichen und zu stabilisieren, sind eine Reihe von Phosphorylierungen an Tyrosinresten, alle im N-Terminus lokalisiert, notwendig (Hantschel & Superti-Furga, 2004, siehe Abb. 2). Vor allem die Phosphorylierung von Tyr245 und Tyr412 ist essentiell für die Aktivität der Kinase (Brasher & Van Etten, 2000).

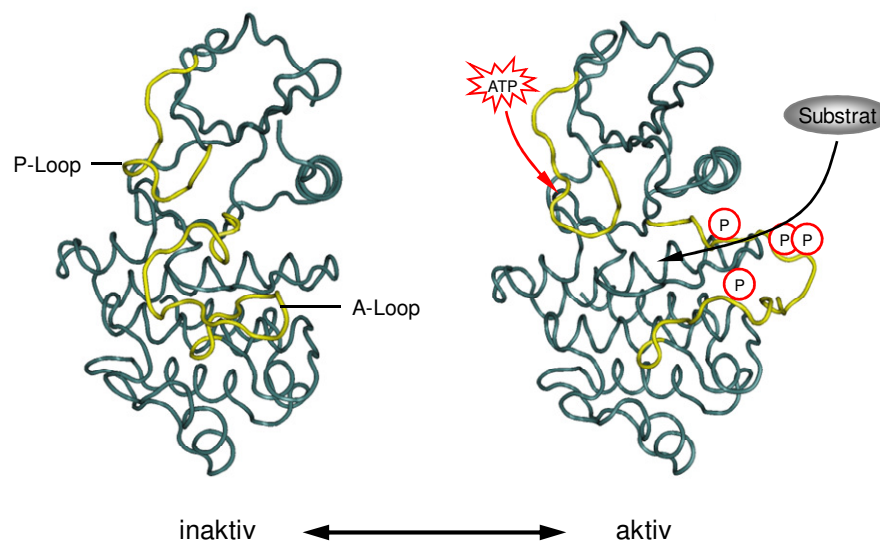


Abbildung 2: Struktur von c-Abl in inaktiver und aktiver Konformation. In der aktiven Form ist der Aktivierungsloop ausgeklappt, sodass in der zwischen Phosphat-Bindungsloop (P-Loop) und Aktivierungsloop (A-Loop) entstandenen Tasche die Substrate binden können. Die Phosphorylierung der Substrate wird durch den ATP-bindenden P-Loop vermittelt. Die Phosphorylierung an verschiedenen Stellen des A-Loops dient dessen Stabilisierung. Nach Nagar *et al.* (2006) und Tokarski *et al.* (2006)

2.2.3 Hemmung von c-Abl durch Imatinib/ Dasatinib

Imatinib bindet neben dem onkogenen Bcr-Abl und der physiologischen Zielstruktur c-Abl die Tyrosinkinasen Arg, c-Kit, und PDGF-Rezeptor, während alle anderen bislang untersuchten Kinasen nicht durch Imatinib gehemmt werden (Übersicht: Cowan-Jacob *et al.*, 2004; siehe Abb. 4). Imatinib kann an die Abl-Domäne nur in deren inaktiven Konformation binden. Durch

diese Bindung von Imatinib an die ATP-bindende Tasche des P-Loops wird Abl in der inaktiven Form stabilisiert, wodurch eine Bindung von ATP nicht mehr möglich ist, was dazu führt, dass Abl keine Substrate mehr phosphorylieren kann (Schindler *et al.*, 2001; Nagar *et al.*, 2002; siehe Abb. 3).

Imatinib bindet an die inaktive Konformation von c-Abl (Nagar *et al.*, 2006), während Dasatinib (BMS-354825, *Sprycel*[®]), ein Tyrosinkinase-Inhibitor der zweiten Generation, an die aktive Konformation von c-Abl (Tokarski *et al.*, 2006; siehe Abb. 3) bindet.

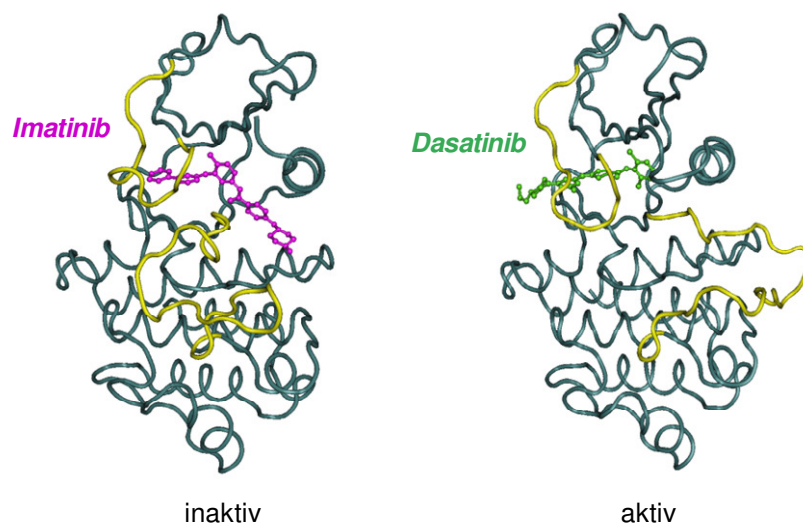


Abbildung 3: Hemmung von c-Abl. Sowohl Imatinib als auch Dasatinib binden in die ATP-bindende Tasche des P-Loops. Dadurch kann ATP nicht mehr binden. Zusätzlich wird durch die Inhibitoren die Bindung der Substrate blockiert. Imatinib bindet an die inaktive Konformation von c-Abl, Dasatinib an die aktive. Nach Nagar *et al.* (2006) und Tokarski *et al.* (2006)

Die Dosis, die notwendig ist, um Bcr-Abl zu hemmen, ist bei Dasatinib etwa 325-fach geringer als bei Imatinib. Darüber hinaus hemmt Dasatinib auch die meisten Imatinib-resistenten Bcr-Abl-Varianten (mit Ausnahme der T315I-Mutation) und kann bei Imatinib-Unverträglichkeit eingesetzt werden (O'Hare *et al.*, 2007; O'Hare *et al.*, 2005; Talpaz *et al.*, 2006 Shah *et al.*, 2004). Im Vergleich zu Imatinib führt allerdings die Dasatinib-Therapie zu erheblich schwereren Nebenwirkungen, da es über 60 Proteinkinasen bindet, darunter die komplette Src-Familie, Mitglieder der MAPK-Familie, TEC-Familie, EGF-Rezeptor-Familie, EPH-Rezeptor-Familie, LIM-Familie etc. (Übersicht in Hantschel *et al.*, 2008, siehe Abb. 4).

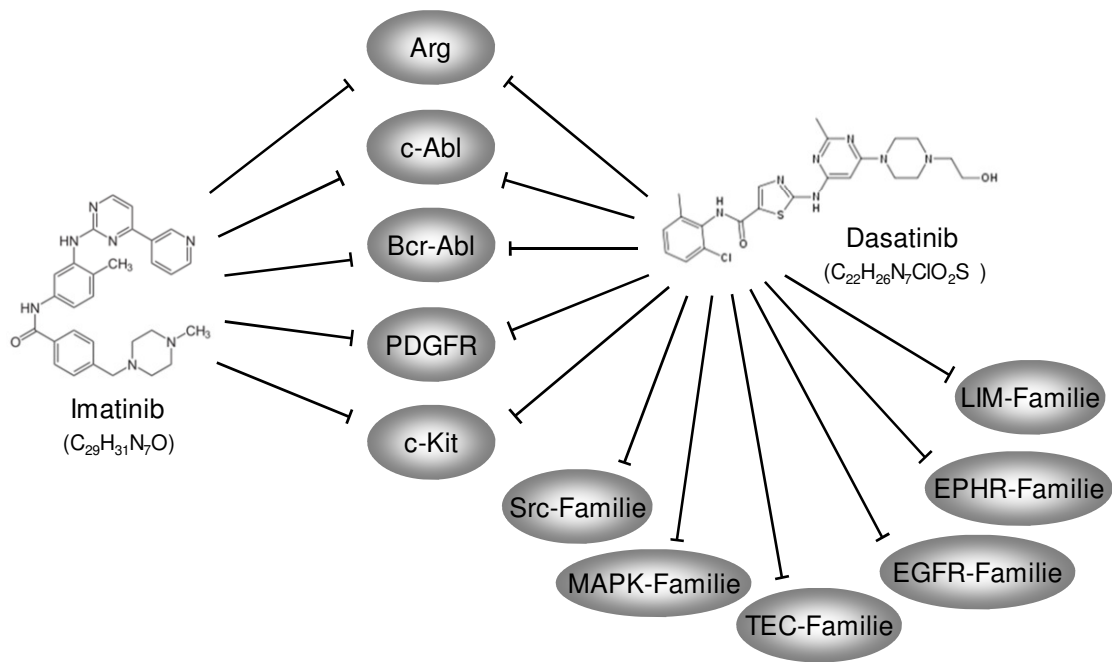


Abbildung 4: Wirkungsspektrum von Imatinib und Dasatinib. Die Übersicht zeigt die schematische Darstellung der Zielproteine, welche durch Imatinib und/ oder Dasatinib inhibiert werden.

2.3 DNA-Reparatur-Prozesse induziert durch ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung, in der vorliegenden Arbeit γ -Strahlung, verursacht eine große Vielfalt an DNA-Schäden: geschädigte Basen, geschädigte Zucker, Einzelstrangbrüche (*single strand breaks*, SSB), Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*, DSB) und *cross-links* (von Sonntag, 2006; Cadet *et al.*, 2004; Cadet *et al.*, 2003; von Sonntag, 1987). Während SSB auch direkt durch γ -Strahlung induziert werden können, werden die meisten DNA-Schädigungen, wie z.B. oxidierte, alkylierte oder deletierte Basen (*apurinic/ apyrimidinic (AP) sites*) durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) verursacht (O'Neill & Wardman, 2009). ROS sind beispielsweise Hydroxyl-, Superoxid- oder Hydroperoxid-Radikale ($\cdot\text{OH}/ \text{O}_2^-/ \text{HO}_2^{\cdot}$), welche durch die Ionisierung des in Zellen enthaltenen und die DNA umgebenden Wassers entstehen. Diese Radikale haben eine sehr limitierte Lebensdauer (Roots & Okada, 1975) und somit auch eine begrenzte Reichweite, was dazu führt, dass DNA-Schäden, verursacht durch ionisierende Strahlung, meist *geclustert* auftreten. Diese Cluster verschiedener DNA-Schäden befinden sich somit häufig innerhalb einer oder weniger DNA-Helix-Windungen (Übersichten in Goodhead, 1994; Blaisdell *et al.*, 2001) und machen 50-80 % der durch ionisierende Strahlung induzierten DNA-Schäden aus (Sutherland *et al.*, 2000a/b). Ein durch Bestrahlung induzierter

DSB ist somit als eng benachbarter, gegenüberliegender SSB zu verstehen. Durch die verschiedenartigen Schäden der DNA werden infolge von γ -Strahlung praktisch alle DNA-Reparaturwege induziert. Diese werden nun in den folgenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben.

2.3.1 Reparatur geschädigter Basen

Oxidierete, alkylierte, deaminierte oder deletierte einzelne Nukleinbasen werden hauptsächlich über den *base excision repair* (BER)-Signalweg während des gesamten Zellzykluses repariert. BER wird initiiert durch die Erkennung und Entfernung der geschädigten Base durch eine von mehreren möglichen Glykosylasen. Jede Glykosylase erkennt spezifisch bestimmte Typen geschädigter Basen (Krokan *et al.*, 1997). Durch die Entfernung der Base entsteht eine AP-Stelle (Lindahl, 1976), die von der AP-Endonuclease (APE1) erkannt wird (Dempfle *et al.*, 1991; Robson & Hickson, 1991; Laval, 1977), welche die Phosphodiesterbindungen des Phosphat-Desoxyribose-Rückrats spaltet. Die DNA Polymerase β (Pol β) fügt daraufhin eine neue Base ein (Allinson *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 1997). Die Ligation erfolgt durch die DNA-Ligase III (LigIII) und deren Co-Faktor XRCC1 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1*).

Es gibt zwei Signalwege der BER: *short-patch* BER und *long-patch* BER. Der oben beschriebene Signalweg beschreibt den *short-patch*-Signalweg (Kubota *et al.*, 1996), wobei nur eine einzelne Base ausgeschnitten wird. Der *long-patch*-Signalweg entfernt nicht nur ein Nukleotid, sondern bis zu acht Nukleotide (Übersicht in Bennett *et al.*, 2001). Die initiiierenden Schritte bis zur Spaltung der Phosphodiesterbindung durch APE1 bleiben gleich, dann werden jedoch durch die DNA-Polymerasen δ/ϵ (Pol δ/ϵ) oder die DNA-Polymerase β (Pol β) und deren Co-Faktor PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) mehrere Nukleotide eingefügt (Prasad *et al.*, 2000; Pascucci *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1999; Dianov *et al.*, 1999; Frosina *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1994). Der zu ersetzende Strang wird durch die Struktur-spezifische Nuklease FEN1 (*flap structure-specific endonuclease 1*) abgespalten und die Lücke durch die DNA-Ligase I geschlossen (Klungland & Lindahl, 1997). Für beide Reparaturwege scheint XRCC1 eine wichtige, stabilisierende Rolle zu spielen. So interagiert XRCC1 nicht nur mit DNA-Ligase III, sondern fungiert auch als Co-Faktor weiterer BER-Proteine. Interaktionen von XRCC1 mit APE1 (Vidal *et al.*, 2001), Pol β (Caldecott *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1996), PCNA und FEN1 (Fan *et al.*, 2004) wurden bereits gezeigt.

Zwar ist die BER einer der häufigsten Reparaturwege, jedoch können über diesen nicht alle Basenschäden behoben werden, da die Auswahl spezifischer Glykosylasen, die jeweils nur bestimmte veränderte Basen detektieren, als limitierender Faktor wirkt. Daher entwickelte sich ein weiterer, in der Erkennung der Schäden flexiblerer Signalweg, die *nucleotide excision repair* (NER). Über diesen Signalweg werden auch „sperrige“ Schäden erkannt, welche die Struktur der DNA verändern. Auch hierbei werden zwei Wege unterschieden, abhängig davon, ob sich die geschädigte Base in einem aktiv transkribierten Strang (*transcription-coupled* NER, TC-NER) oder im aktuell nicht transkribierten Genom (*global genomic* NER, GG-NER) befindet. Die beiden Wege unterscheiden sich während der ersten Schadenserkennungs- und Rekrutierungsschritte, für die unterschiedliche Proteine verantwortlich sind.

Bei der GG-NER erkennen zwei Heterodimere den DNA-Schaden: das erste Heterodimer besteht aus den Proteinen DDB1 (*DNA damage-binding protein 1*) und XPE (*Xeroderma Pigmentosum complementation group E*, DDB2) und bindet an die geschädigte Stelle der DNA. Dabei initiiert es die Rekrutierung des zweiten Heterodimers, bestehend aus XPC und HR23B (*Rad23 homolog B*) (Rapić-Otrin *et al.*, 1998; Sugawara *et al.*, 1998; Keenay *et al.*, 1994; Masutani *et al.*, 1994). Dieses Dimer ermöglicht den Eintritt und die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIIH.

Für die TC-NER spielen andere Erkennungsproteine eine Rolle: Während der normalen Transkription stoppt die RNA-Polymerase an jedem kleinsten Schaden (Mellon *et al.*, 1987). Der DNA-Schaden wird hierbei von den Proteinen CSA und CSB (*Cockayne Syndrome A/B*) erkannt, die wiederum die Bindung von TFIIH an die DNA ermöglichen (Tu *et al.*, 1998; Tantin *et al.*, 1997; van Gool *et al.*, 1997).

Ab der Bindung von TFIIH laufen die beiden Signalwege der NER identisch ab: TFIIH besteht aus zehn Untereinheiten, wovon zwei, XPB und XPD Helicasen sind, welche unter ATP-Verbrauch eine Strecke von 20-30 Nukleotiden entwinden, die geschädigte Stelle eingeschlossen (Svejstrup *et al.*, 1996; Schaeffer *et al.*, 1994; Drapkin *et al.*, 1994). Nun bindet RPA (*replication protein A*), eines der wichtigsten eukaryotischen Einzelstrang-DNA-Bindeproteine, an die beiden separierten Stränge des offenen Komplexes, wodurch diese geschützt werden. Die Nukleasen XPG und XPF-ERCC1 (*excision repair cross-complementing group 1*) binden spezifisch an Bindestellen zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA und schneiden an diesen beiden Stellen das den Schaden enthaltende Oligonukleotid heraus (Evans *et al.*, 1997a 1997b; Mu *et al.*, 1996; Sijbers *et al.*, 1996; O'Donovan *et al.*, 1994). Die DNA-Synthese um die Lücke zu

schließen erfolgt durch die Proteine RFC (*replication factor C*), PCNA und Polymerase δ oder ϵ (Pol δ / Pol ϵ). Die finale Ligation geschieht durch die DNA-Ligase I (Wood & Shivji, 1997; Aboussekhra *et al.*, 1995).

2.3.2 Einzelstrangbruchreparatur (SSBR)

Einzelstrangbrüche, direkt induziert durch γ -Strahlung, durch ROS oder als Zwischenprodukt während der DNA-Reparatur-Prozesse, werden spezifisch über PARP-1 (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1) detektiert (Schreiber *et al.*, 1992; Gradwohl *et al.*, 1990). PARP-1 bindet an den Bruch, wodurch es aktiviert wird, die Konformation ändert und daraufhin sich selbst und andere Zielproteine, wie Histone und Transkriptionsfaktoren, poly-(ADP-ribosyl)iert (Lilyestrom *et al.*, 2010; Lonskaya *et al.*, 2005; Pion *et al.*, 2005). Durch die Bindung von PARP-1 an die DNA wird diese relaxiert, wodurch Reparaturproteinen der Zutritt zur Schadensstelle erleichtert wird (Poirier *et al.*, 1982; Huletsky *et al.*, 1989; Rouleau *et al.*, 2004). Als eines der ersten Proteine wird XRCC1 rekrutiert, welches wiederum für die Rekrutierung der DNA-Ligase III (LigIII) verantwortlich ist (Okano *et al.*, 2003; Leppard *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2002; Caldecott *et al.*, 1996). Durch die Autoribosylierung von PARP-1 verliert dieses die Affinität zur DNA und macht dadurch den Zutritt für weitere Reparaturproteine frei (Ferro & Olivera, 1982). Die Prozessierung der Strangenden geschieht durch die Polynukleotidkinase PNK, das Auffüllen der Lücke durch die Polymerase β und die Ligation schließlich durch die DNA-Ligase III (Jilani *et al.*, 1999).

Eine zentrale Rolle spielt bei der Einzelstrangbruchreparatur (*single strand break repair*, SSBR) die poly-(ADP-Ribosyl)ierung: eine post-translationale Modifikation von Proteinen, vermittelt durch PARP-1. Unter Verbrauch von NAD^+ (Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid) katalysiert PARP-1 die kovalente Bindung von ADP-Ribose-Einheiten an die Zielproteine, wodurch verzweigte Poly-(ADP-Ribose)-Ketten (PAR) entstehen, deren Hauptakzeptor zu 90 % PARP-1 selbst ist (Lindahl *et al.*, 1995; Huletsky *et al.*, 1989). Diese Reaktion ist reversibel: durch die endo- und exoglykosidische Aktivität der Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) werden die ADP-Ribose-Einheiten wieder abgespalten (Lin *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1972).

Neben PARP-1 wurde auch für PARP-2 eine Funktion in der SSBR nachgewiesen, jedoch scheint PARP-2 nur zu einem sehr geringen Anteil von nicht mehr als 15 % für die poly-(ADP-Ribosyl)ierung nach DNA-Schädigung verantwortlich zu sein (Sallmann *et al.*, 2000; Shieh

et al., 1998). Eine Funktion zur spezifischen Spaltung von PAR wurde neben PARG *in vitro* auch für ARH3 (ADP-Ribosylhydrolase 3) identifiziert, jedoch ist bisher unklar, in welchem Umfang dies während der SSBR lebender Zellen stattfindet (Oka *et al.*, 2006).

2.3.3 Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Doppelstrangbrüche (DSB), welche direkt durch ionisierende Strahlung oder während der Reparatur geschädigter DNA entstehen, stellen die fatalsten DNA-Schäden dar, weshalb deren schnelle und effektive Reparatur für das Überleben der Zelle von enormer Wichtigkeit ist. Bei der DSB-Reparatur (DSBR) werden zwei Wege unterschieden: die homologe Rekombination (HR) und das nicht-homologe Verbinden von Enden (*non-homologous end-joining*, NHEJ).

Die HR benutzt für die exakte, fehlerfreie Reparatur der DSB die Information unbeschädigter Schwesterchromatide, wodurch sie nur während der späten S-Phase oder der G₂-Phase der Mitose stattfinden kann. Während der Mitose stellt die HR die dominante DSBR-Methode der Zelle dar. Der Initiationsschritt ist eine nukleolytische 3'-Degradation jeweils eines Stranges an beiden Bruchenden, wobei ein einzelsträngiger DNA-Überhang (*single stranded DNA*, ssDNA) generiert wird. Eine wichtige Rolle bei dieser Strangenden-Prozessierung spielt der MRN-Komplex (MRE11-Rad50-NBS1-Komplex) (Nelms *et al.*, 1998). Die ssDNA-Überhänge werden sofort durch den ssDNA-bindenden Protein-Komplex RPA (*replication protein A*) ummantelt (Wold, 1997). Zusätzlich polymerisiert Rad51 an der ssDNA und bildet dabei ein Nukleoproteinfilament, welches mit Hilfe von Mediatoren (Rad52, Rad55-Rad57-Heterodimer und die Tumor-Suppressoren BRCA1 und BRCA2) die Annäherung an die homologen DNA-Sequenz ermöglicht (Gasior *et al.*, 1998; Song & Sung; 2000, Yang *et al.*, 2002). Die Identifizierung der homologen Sequenz und die Stranginvasion des Nukleofilaments mit dieser Sequenz ist abhängig von Rad51, Rad52 und Rad54 (Sugawara *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 1997; Baumann *et al.*, 1996). Bei der Invasion des beschädigten Strangs in den unbeschädigten, homologen DNA-Duplex findet ein Strangaustausch statt. Dabei verlängert eine DNA-Polymerase die 3'-Enden der Invasionsstränge, wobei die intakten Stränge als Matrize dienen. Eine Resolvase löst die gekreuzten Stränge, welche dann anschließend durch die DNA-Ligase I mit den neu synthetisierten Strängen zur fehlerfrei reparierten heteroduplexen DNA-Struktur ligiert werden (Johnson & Jasin, 2000).

Im Gegensatz zur HR führt der Reparaturweg des NHEJ meist zum Verlust eines oder mehrerer Nukleotide an der Verknüpfungsstelle, was zwar die DNA-Sequenz verändert, jedoch meist ohne Folgen für die korrekte Kodierung bleibt, da der Großteil des Genoms aus nicht-kodierenden Sequenzen besteht. Das NHEJ stellt somit zwar die am wenigsten akkurate, dafür aber schnellste und einfachste Möglichkeit der DSBR dar. Im ersten Schritt der NHEJ bindet das Ku70/80-Heterodimer an die freien Enden des DSB, woraufhin die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) an Ku rekrutiert wird, um das DNA-PK-Holoenzym zu formen, welches die Bruchenden zusammenführt (Bliss & Lane, 1997; Mimori *et al.*, 1986; Gottlieb & Jackson, 1993). Die Prozessierung der Enden geschieht durch den MRN-Komplex (Rad50-MRE11-NBS1-Komplex) (Nelms *et al.*, 1998). Bevor die so "zurechtgeschnittenen" Enden ligiert werden können, müssen die Reparatur-Proteine von der DNA entfernt werden, was vermutlich durch die Autophosphorylierung der DNA-PK geschieht (Chan & Lees-Miller, 1996). Die Ligation erfolgt durch den DNA-Ligase IV/ XRCC4-Komplex (Wilson *et al.*, 1997).

2.3.4 Weitere in die DNA-Stress-Antwort involvierte Proteine

Damit Zellen über die verschiedenen Reparaturwege erfolgreich ihre geschädigte DNA reparieren können, müssen sie ihren Zellzyklus arretieren oder verlangsamen. Wird DNA geschädigt, kommt es über verschiedene Signalkaskaden, je nach DNA-Schaden und den Proteinen, die diesen erkennen, zum G₁- oder G₂-Arrest des Zellzykluses.

Die Schlüsselproteine hierbei sind ATM (*Ataxia Telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related*), beides Serin-Threonin-Kinasen aus der Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K). Sie kontrollieren die G₁/S-, intra-S- und G₂/M-Kontrollpunkte über die Aktivierung ihrer *downstream*-Effektor-Kinasen Chk1 und Chk2. Eines der ersten Ereignisse nach der Induktion von DSB ist die Phosphorylierung des Histons H2AX durch ATM an einem Serinrest, resultierend in Ser139-H2AX (γ -H2AX) (Übersicht in Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004). γ -H2AX wirkt als Signalverstärker, rekrutiert weitere Signalmoleküle an den DSB und erhöht die lokale Aktivität von ATM. Inaktives ATM existiert als Multimer, welches nach Aktivierung in Monomere dissoziiert. Die Aktivierung erfolgt durch die intramolekulare Autophosphorylierung der beiden ATM-Moleküle zu Ser1981-ATM (Bakkenist & Kastan, 2003).

ATR wird teilweise auch durch DSB (Jazayeri *et al.*, 2006; Sartori *et al.*, 2007) aktiviert, jedoch hauptsächlich durch SSB: an die durch SSB entstandenen Stellen einzelsträngiger DNA (*single stranded DNA*, ssDNA) lagert sich sehr schnell das ssDNA-bindende Protein RPA (*replication protein A*) an. Die Rekrutierung von ATR an den SSB geschieht durch ATRIP (*ATR-interacting protein*): ATRIP bindet direkt an RPA und bildet mit ATR einen Komplex (Byun *et al.*, 2005; Zou & Elledge, 2003; Cortez *et al.*, 2001). Sobald aktiviert, phosphorylieren ATM und ATR direkt Effektorproteine, die dann wiederum eine Kaskade an Signal- und Effektorproteinen in Gang setzen, was dann wiederum u.a. Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, oder, falls der DNA-Schaden zu groß ist, Zelltod induziert. ATM phosphoryliert dabei die Kinase Chk2 am Threoninrest Thr68, was eine Autophosphorylierung der Threoninreste Thr383/Thr387 und somit die vollständige Aktivierung von Chk2 bewirkt (Schwarz *et al.*, 2003; Melchionna *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2000). Die Effektorkinase Chk1 wird vorwiegend durch ATR aktiviert mittels der Phosphorylierung an zwei Serinresten: Ser317 und Ser345 (Zhao & Piwnica-Worms, 2001).

Ein weiteres Substrat von ATM, ATR, Chk1 und Chk2 ist das Tumor-Suppressor-Protein p53. Durch dessen Phosphorylierung an Ser15 werden die Zielgene des Transkriptionsfaktors p53, u.a. *p53* selbst, *p21* und *mdm2*, verstärkt transkribiert, wodurch die p53-, p21- und Mdm2-Proteinlevel steigen (Lakin *et al.*, 1999; Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 1997; Siliciano *et al.*, 1997; Lu & Lane, 1993). Der Transkriptionsfaktor p53 selbst wird durch Mdm2 über eine negative Rückkopplung reguliert und degradiert (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997). Das p53-System umfasst ein komplexes Netzwerk von Stress-Signalen und Effektor-Signalwegen wie DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Zelltod (Übersicht in Horn & Vousden, 2007; Efeyan & Serrano, 2007).

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Imatinib ist nach wie vor Erstlinien-Therapie der CML, wobei jedoch trotz dessen sehr guter antileukämischer Wirkung in der chronischen Phase eine Heilung durch die alleinige Behandlung mit Imatinib laut dem bisherigen Stand der klinischen Studien zweifelhaft ist. Insofern wird diese molekulare Therapie über einen sehr langen Zeitraum, möglicherweise lebenslang, fortgesetzt werden müssen. Durch eine andauernde Inhibition der c-Abl-Aktivität bei der Therapie mit Imatinib kann die dadurch veränderte Stressantwort erhebliche Risiken bergen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die systematische Untersuchung der Rolle von c-Abl für die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Ist die c-Abl-Kinaseaktivität für die Erhaltung der genetischen Stabilität bedeutsam? Hierbei wurden der Einfluss einer Imatinib-Behandlung auf die Mutationsfrequenz und DNA-Reparatureffizienz nach DNA-Stress analysiert.
- Beeinflusst die Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung? In geeigneten Zellmodellen und Primärzellen wurden hierbei das Gesamtüberleben, die Induktion von Zellzyklusarrest und Zelltod in Abhängigkeit des c-Abl-Aktivitätsstatus untersucht.
- Welche Signalmoleküle vermitteln die beobachtete Wirkung? Untersucht wurden Expression und Aktivität zentraler DNA-Reparatur- und Apoptose-Mediatoren nach DNA-Stress in Abhängigkeit der c-Abl-Aktivität.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kulturmedium und Zusätze

Für die Kultivierung aller eukaryotischer Zelllinien wurde RPMI 1640-Medium mit den unten aufgeführten Zusätzen verwendet.

RPMI 1640-Medium	Biochrom AG, Berlin
500 ml wurden supplementiert mit:	
10 % (v/v) FCS (fetal bovine serum)	Gibco, Karlsruhe
0,1 g/L Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), pH 7,4	Merck, Darmstadt
2 mM L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
0,13 mM L-Asparagin	Serva, Heidelberg
0,05 mM β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
1 mM Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe
3 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Biochrom AG, Berlin

Dem Kulturmedium wurde zur Kultivierung der *Bcr-Abl*-negativen murinen Zelllinien BaF3 und 32D der Wachstumsfaktor mIL3 (rekombinantes murines Interleukin-3) in einer Konzentration von 1 ng/ml zugegeben. Für Versuche wurden auch die *Bcr-Abl*-positiven Zelllinien 32Dp210 und BaFp185 mit 1 ng/ml mIL3 supplementiert. Zur Selektionierung wurde dem Medium der 32D AblT315I-Zelllinie 0,6 mg/ml Zeocin zugegeben.

Recombinant Murine Interleukin-3 (mIL3)	Strathmann Biotech AG, Hannover
Zeocin	InvivoGen, San Diego

3.1.2 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 1 aufgeführten Zelllinien verwendet.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung, Herkunft	<i>c-Abl</i> -Status	<i>Bcr-Abl</i> -Status
BaF3	Murine Prä-B-Lymphozytenlinie ^a	+ (wt)	-
BaF3p185	durch Transfektion der BaF3- Zellen mit dem Vektor pSLXBcr/Abl ^a (McWhirter <i>et al.</i> , 1993) entstandene Linie	+ (wt)	+ (p185*-wt)
32D	murine Knochenmarkszellen; DSMZ-Nr.: ACC 411	+ (wt)	-
32Dp210	durch Transfektion der 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-wt ^a entstandene Linie	+ (wt)	+ (p210-wt)
32Dp210-T315I	durch Transfektion der 32D-Zellen mit dem retroviralen Vektor Migp210-T315I ^a entstandene Linie	+ (wt)	+ (p210-T315I)
32D Abl-wt	durch Transfektion der 32D-Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1zeo-Abl-wt entstandene Linie ^{a, b}	+ (wt)	-
32D Abl-T315I	durch Transfektion der 32D-Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1zeo-AblT315I entstandene Linie ^{a, b}	+ (T315I)	-
MEF Abl ^{-/-}	murine embryonale <i>c-Abl</i> ^{-/-} -Fibroblasten ^c	-	-
MEF Abl-wt	murine embryonale <i>c-Abl</i> ^{-/-} -Fibroblasten, retroviral stabil retransfiziert mit wildtyp-Abl (wt-Abl) ^c	+ (wt)	-
MEF Abl-KD	murine embryonale <i>c-Abl</i> ^{-/-} -Fibroblasten, retroviral stabil retransfiziert mit Kinase-defizientem Abl (KD-Abl) ^c	+ (KD)	-

^a Prof. Dr. J. Duyster, Technische Universität München

^b Dr. C. Miething, Technische Universität München

^c Dr. J.Y. Wang, UCSD, San Diego, USA

* Konstrukt eines humanen Bcr-Anteils und eines murinen Abl-Anteils

3.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage an einer sterilen Werkbank und unter Verwendung steriler Gerätschaften in definierter Zellzahl subkultiviert, wobei semiadhärente Zellen zunächst mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst wurden.

25 cm ² -, 75 cm ² -, 150 cm ² -Zellkultur-Flaschen	Corning, USA
5-, 10-, 25 ml Stripette [®] -Costar [®]	Corning, USA
6-, 96-well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15-, 50 ml Polypropylen-Röhrchen, steril	Becton Dickinson, USA
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Sterilbank <i>LaminAir HB2472</i>	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau

3.1.4 Trypan-Blau Ausschluss-Färbung

Die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypan-Blau-Färbelösung (Trypan-Blau 1:10 in PBS) gemischt. Trypan-Blau, ein Vitalfarbstoff, der durch die Zellmembran dringt, wird in lebenden Zellen aktiv wieder aus dem Zellinneren transportiert, somit werden nur tote Zellen blau angefärbt. Die Zahl der ungefärbten Zellen diente daher zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

Trypan Blau 0,5 % (w/v)	Biochrom AG, Berlin
PBS (0,27 M NaCl; 0,005 M KCl; 0,015 M Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O ₂ ; 0,003 M KH ₂ PO ₄)	Biochrom AG, Berlin
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Mikroskop	Zeiss, Jena

3.1.5 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden im Schnitt nach zwei Monaten durch kryokonservierte Zellen ersetzt, um durch Selektionsprozesse auftretende genetische Veränderungen während der Kultur zu minimieren. Für die Lagerung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff wurden Zellaliquots à $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml in einer eiskalten Lösung aus DMSO:FCS (1:10) aufgenommen und sofort in Kryo-Röhrchen überführt, um die Vitalität der Zellen nach dem Einfriervorgang zu erhalten. Eine spezielle Einfrierbox gewährleistete eine langsame graduelle Abkühlung auf -80 °C über Nacht. Im Anschluss wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Inkulturnahme konservierter Zellen wurden die Aliquots im Wasserbad bei 37 °C angetaut, um sofort in 10 ml RPMI 1640-Medium überführt zu werden. Direkt im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 300 g, RT) pelletiert und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank kultiviert, um am folgenden Tag nochmals mit frischem Medium versorgt zu werden.

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
1,8 ml CryoTube™	Nalgene Nunc International
5100 Cryo 1 °C Einfrierbox ‚Mr. Frosty‘	Nalgene Nunc International

3.1.6 Stabile Transfektion eines modifizierten c-Abl-Gens in 32D-Zellen

Die Etablierung der Zelllinien 32D Abl-wt und der zugehörigen Mutante 32D Abl-T315I, welche stabil eine Imatinib- und Dasatinib-resistente *c-Abl*-Variante exprimiert, erfolgte durch Elektroporation der parentalen 32D-Zellen mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1zeo(-)-*abl*-wt bzw. pcDNA3.1zeo(-)-*abl*-T315I. Hierfür wurde in den Vektor pcDNA3.1zeo(-) eine Hämagglutinin (HA)-markierte Typ IV *c-Abl*-cDNA kloniert. Die Mutation T315I wurde durch gezielte Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) hergestellt. Die Vektoren wurden von Dr. C. Miething (Klinikum Rechts der Isar, München) zur Verfügung gestellt. Für die Elektroporation wurden je 5×10^6 Zellen in 800 µl Medium in einer 4 mm-Elektroporationsküvette mit 20 µg des entsprechenden Plasmids gemischt. Darauf folgte die Elektroporation mit $2 \times 0,005$ s bei 400 V. Das Selektivum Zeocin wurde erst nach 48 h Kultur supplementiert. Die erfolgreich mit dem Vektor und somit mit der Zeocin-Resistenz transfizierten Zellen überlebten und wurden unter ständiger Zugabe von Zeocin weiterkultiviert (Fanta *et al.*, 2008).

„EasyJect“ Elektroporator
4 mm-Elektroporationsküvette

Peqlab, Erlangen
Peqlab, Erlangen

3.1.7 Isolierung monoklonaler 32D Abl-wt- bzw. 32D Abl-T315I-Zelllinien

Um aus den transfizierten Zellen monoklonale Zelllinien zu erhalten, wurden diese subkloniert. Hierfür wurden in eine 6-Loch-Platte pro Loch 100 Zellen in 3 ml Softagar eingesät. Nach Erstarren des Softagars wurde dieser mit 3 ml Medium überschichtet. Da der Softagar kein Zeocin enthielt, wurde dem überschichtenden Medium die doppelte Menge zugegeben. Die Platten wurden mehrere Tage inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar waren. Diese wurden separiert und weiter in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Kontrolle der Stabilität der Transfektion wurden zu allen Versuchen Zellpellets aliquotiert, die mittels Western-Blot-Analyse auf ihre HA-Expression getestet wurden.

Agar:

1,5 g Difco Agar Noble
50 ml PBS
autoklaviert und auf 60 °C gehalten

Becton Dickinson, USA
Biochrom AG, Berlin

Softagar:

18,9 ml RPMI 1640-Medium
2,1 ml Agar

3.1.8 Sequenzierung zur Feststellung des c-Abl-Status der transfizierten Zelllinien

Um den c-Abl-Status (wt oder T315I) zu verifizieren wurden die Zellen sequenziert. Hierfür wurde nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des RNeasy[®]-Mini Kits (Qiagen, Hilden) zunächst Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die anschließende Reverse Transkription (RevT) der RNA in cDNA und die darauf folgende Erst- und Zweitstrangsynthese und Amplifizierung der DNA mittels PCR (*polymerase chain reaction*) erfolgte mit Hilfe von Primern, welche nur die Kinase-Domäne von c-Abl umfassten (siehe Tab. 2). Für die Reverse Transkription wurde der Reaktionsmix wie in Tab. 3 pipettiert. Im Thermocycler wurde die Reaktion laut Programm (Tab. 4) gestartet, in der Pause wurden 20 U RNase Inhibitor und 0,2 U AMV Reverse Transkriptase zugegeben und das Programm dann vollendet.

Tabelle 2: verwendete Primer für die Sequenzierung des c-Abl-Status mittels PCR

<i>sense</i> Primer	5' - GCG CAA CAA GCC CAC TAT CTA CGG - 3'
<i>antisense</i> Primer	5' - GCC AGG CTC TCA GGT GCG GTC C - 3'

Tabelle 3: Reaktionsmix für die Reverse Transkription der RNA

H ₂ O	12 µl
10 x RevT-Puffer	2 µl
dNTP-Mix (1,25 mM)	2 µl
<i>antisense</i> Primer (10 µM)	1 µl
RNA (200 ng/µl)	1 µl

Tabelle 4: Thermocycler-Programm für die Reverse Transkription der RNA

65 °C	4 min
4 °C	1 min
- Pause -	
52 °C	30 min
99 °C	1 min
4 °C	„for ever“

Der Reaktionsmix für die Erst- und Zweitstrangsynthese und die Amplifizierung der DNA wurde laut Tab. 5 angesetzt und der erhaltenen cDNA zugegeben. Die Reaktion im Thermocycler wurde laut Programm in Tab. 6 durchgeführt.

Tabelle 5: Reaktionsmix für die PCR-Amplifizierung der cDNA

H ₂ O	67,5 µl
10 x PCR-Puffer	8 µl
dNTP-Mix (1,25 mM)	2 µl
<i>sense</i> Primer (10 µM)	1 µl
<i>antisense</i> Primer (10 µM)	1 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,5 µl

Tabelle 6: Thermocycler-Programm für die PCR-Amplifizierung der cDNA

95 °C	2 min	} 35 Zyklen
95 °C	30 s	
65 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	„for ever“	

Die Länge und Qualität der DNA-Produkte wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung (30 min, 100 V) in einem 1 % Agarose-Gel (50 ml plus 2 µl Ethidiumbromid) kontrolliert.

RNeasy®-Mini Kit	Qiagen, Hilden
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
dCTP; dATP; dGTP, dTTP (je 100 mM)	Amersham Biosciences, Freiburg
<u>10 x PCR-Puffer (<i>Taq</i> DNA Polymerase Reaction Buffer):</u>	Stratagene, USA
100 mM Tris-HCl (pH 8,8)	
15 mM MgCl ₂	
500 mM KCl	
0,01 % (w/v) Gelatine	
<u>10 x RevT-Puffer:</u>	
10 x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
+ 15 mM MgCl ₂	Roche, Mannheim
RNase Inhibitor (40 U/µl)	Stratagene, USA
AMV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient	Gibco, Karlsruhe
Agarose, ultra-pure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	LTF Labortechnik, Wasserburg
UV-Detektion	Mitsubishi, Flensburg
Thermopapier	

Die Sequenzierung der Proben wurden von der GENterprise GmbH, Sequenzierservice (Mainz) als sogenannte „Home run“-Reaktionen durchgeführt. Die Vorbereitung der Probe vor deren Versendung erfolgte somit nach Angaben der GENterprise GmbH.

3.2 Kultur von primärem Zellmaterial

Das für die Versuche verwendete primäre Zellmaterial war von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg unter dem Aktenzeichen 035-06-f genehmigt worden.

3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation

Gesunden Probanden wurden 50 ml EDTA-Blut entnommen, die direkt anschließend 1:1 mit sterilem PBS verdünnt wurden. Vorbereitend wurden in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen jeweils 25 ml Ficoll-Separierlösung pipettiert. Diese Separierlösung wurde vorsichtig mit der Blutsuspension überschichtet. Die Trennung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von den roten Blutzellen und den polynukleären Zellen mit einer Dichte von $> 1,077 \text{ g/cm}^3$ gelang durch 25-minütige Zentrifugation bei 300 g (RT, mit niedrigster Beschleunigung, ohne Bremse). Die PBMC sammeln sich als Interphase direkt über der Ficoll-Schicht an. Diese Interphase wurde abpipettiert, in ein frisches 50 ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und 1:1 mit PBS verdünnt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min, 300 g, RT) und in RPMI 1640-Medium aufgenommen. Zur Stimulation der Lymphozyten wurde dem Medium Phytohämagglutinin-L (PHA-L) in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben.

EDTA-S-Monovette® K3E (9 ml)
„BIOCOLL Separating Solution“ (Ficoll)
Phytohämagglutinin-L (PHA-L)

Sarstedt, Nümbrecht
Biochrom AG, Berlin
Roche, Mannheim

3.3 Behandlung der Zellen

3.3.1 Induktion von DNA-Schädigung

Zur Untersuchung der Rolle der c-Abl-Aktivität in der DNA-Schadensreparatur wurden die Zellen genotoxischem Stress durch Bestrahlung ausgesetzt. Hierfür wurde γ -Strahlung in Dosen von 2, 3, 5, 10 bzw. 30 Gy eingesetzt. Dem eingesetzten Kleinbestrahlungsgerät diente Cäsium-137 als Strahlungsquelle.

Kleinbestrahlungsgerät IBL-437C

Oris, Frankreich

3.3.2 Inhibition der c-Abl-Tyrosinkinase

Um den Einfluss der Kinaseaktivität von c-Abl auf die Reparatur der DNA nach genotoxischem Stress zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die c-Abl-Inhibitoren Imatinib und Dasatinib verwendet. Imatinib wurde in einer Konzentration von 3 μ M, Dasatinib in einer Konzentration von 10 nM verwendet. Die Inhibitoren wurden den Zellen für die Versuche immer 48 h vor genotoxischem Stress zugegeben, wobei nach 24 h ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Inhibitoren stattfand. Gelöst wurde Imatinib in DMSO:H₂O (1:1) und als Stammlösung (10 mg/ml) bei -20 °C gelagert. Dasatinib wurde in DMSO gelöst und als Stammlösung (10 mM) bei -20 °C gelagert.

Imatinib (Imatinib Mesylate, STI571, *Glivec*[®], *Gleevec*[®])

Toronto Research Chemicals Inc., Kanada

Dasatinib (Pyridol-[2,3-d]-Pyrimidin Dasatinib,

BMS-354825, *Sprycel*[®])

Toronto Research Chemicals Inc., Kanada

3.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay dient dem Nachweis der Zellviabilität und beruht auf der Umwandlung des gelben Tetrazolium-Salzes MTT in ein violette Formazan-Produkt. Diese Umsetzung geschieht durch eine nur in lebens- bzw. wachstumsfähigen Zellen funktionierende mitochondriale Dehydrogenase. Durch die fotometrische Messung des Farbumschlags kann auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden (Mosmann, 1983). Zur Analyse wurden 7-8 x 10³ Zellen/200 μ l pro Loch in eine 96-Loch-Platte in Anwesenheit von Imatinib in Konzentrationen von 0-30 μ M kultiviert. Nach Inkubation für 48 h bei 37 °C wurden pro Loch 10 μ l einer MTT-Lösung

(10 mg/ml MTT/PBS) zugegeben. Nach weiteren 2 h wurden zum Lysieren der Zellen je 90 μ l MTT-Lysepuffer (15 % SDS in DMF:H₂O (1:1), pH 4,5) pro Loch zupipettiert. Unter leichtem Schütteln wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm am ELISA-Reader quantifiziert.

MTT (Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid)	Sigma, Taufkirchen
DMF (N,N-Dimethylformamid)	Sigma, Taufkirchen
ELISA-Reader ‚Wallac‘	SLT Labinstruments, Crailsheim

3.5 Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers

Das für diese Arbeit verwendete Durchflusszytometer kann fünf optische Parameter gleichzeitig messen: Vorwärtsstreulicht (*forwardscatter*, FSC, Auftrennung der Größe der Zellen), Seitwärtsstreulicht (*sidescatter*, SSC, Auftrennung der Granularität der Zellen) und drei verschiedene Fluoreszenzspektralbereiche (FL-1 bis FL-3). Die Auswertung der Rohdaten wurde mit der Software CellQuest™ durchgeführt.

Fluorescence Activated Cell Analyzer ‚FACSCalibur™‘	Becton Dickinson, USA
<u>Laser:</u>	
488 nm, luftgekühlter Argon-Ionen Laser	
635 nm, roter Diodenlaser	
<u>Detektoren/Filter:</u>	
FL-1: 530 nm (FITC, grüne Fluoreszenz)	
FL-2: 585 nm (PE, PI, rote Fluoreszenz)	
FL-3: 650 nm (dunkelrote Fluoreszenz)	
CELLQuest™ Software	Becton Dickinson, USA

3.5.1 Nachweis früher Apoptose über Annexin V-Färbung

Bereits im frühen Stadium weisen apoptotische Zellen charakteristische Veränderungen der Zellmembran auf. Unter anderem wird das bei gesunden Zellen nur an der Innenseite der Zellmembran vorkommende Phospholipid Phosphatidylserin an der Zelloberfläche exponiert. Diese Eigenschaft apoptotischer Zellen wird für die Annexin V-Färbung genutzt. Annexin V ist ein ca. 35 kDa großes Ca²⁺-abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Markiert mit grün fluoreszierendem Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) stellt es eine geeignete Sonde für apoptotische Zellen dar. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen in der zu untersuchenden Population kann dann durchflusszytometrisch über die Bestimmung der FITC-positiven Zellen ermittelt werden. Die Färbung der Zellen erfolgte nach Angaben des

Herstellers. Je Probe wurden ca. 5×10^5 Zellen für die Annexin V-Färbung verwendet. Diese wurden zunächst pelletiert, einmal in kaltem PBS und einmal in Annexin V-Bindepuffer gewaschen und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ l Färbelösung (5 % (v/v) Annexin V-FITC) resuspendiert, für 10 min inkubiert und mit Annexin V-Bindepuffer auf 500 μ l aufgefüllt. Die Zellen konnten direkt am Durchflusszytometer analysiert werden.

Annexin V-FITC	BD Pharmingen TM , USA
Annexin V Bindepuffer (10 x)	BD Pharmingen TM , USA

3.5.2 Nachweis später Apoptose/ Nekrose über PI-Färbung

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde in Kombination mit der Annexin V-FITC-Färbung eine Färbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff Propidiumjodid (2,5 % (v/v) Propidiumjodid (PI)-Lösung (Stammlösung: 50 μ g/ml)) durchgeführt. PI dringt in Zellen mit geschädigten Plasma-Membranen ein und färbt somit die DNA nekrotischer Zellen und Zellen in später Apoptose an. Diese können dann über die rote Fluoreszenz des PI im Durchflusszytometer von den vitalen Zellen bzw. von Zellen im frühen Apoptosestadium unterschieden werden. Hierfür werden der Färbelösung aus 3.5.1. 2,5 % (v/v) PI-Lösung (Stammlösung: 50 μ g/ml) zugefügt.

Propidiumjodid Stammlösung (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
--------------------------------------	----------------------------

3.5.3 Zellzyklus-Analyse

Die Analyse des Zellzykluses erfolgte durch die Messung des DNA-Gehalts der Zellen. In der G₁-Phase haben die Zellen einen doppelten DNA-Gehalt (2n). Während der S-Phase erhöht sich der DNA-Gehalt graduell auf 4n, die Zelle befindet sich nun in der G₂-Phase. Während der M-Phase halbiert sich der Gehalt wieder auf 2n. Im Verlauf des Zelltods findet internukleosomale DNA-Fragmentierung statt. Nach Permeabilisierung der Zellmembran verliert die Zelle diese DNA-Fragmente durch Diffusion, d.h. apoptotische Zellen haben einen geringeren DNA-Gehalt als vitale Zellen, also weniger als 2n. Man spricht daher auch von Sub-G₁-Zellen. Der Gehalt der DNA wurde mit Hilfe von PI, welches mit der DNA interkaliert, bestimmt. Hierfür wurden die Zellen pelletiert und in kaltem (-20 °C) 70 %-igem Ethanol fixiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 g, 5 min) und

mit 1 ml PI-Färbelösung versetzt. Die Färbelösung setzte sich zusammen aus 50 µL PI (Stamm-
lösung: 1 mg/ml), 10 µl RNase A und 950 µl 1 % Glucose in PBS. Nach 10 min Inkubation
konnte die Einlagerung von PI und somit der DNA-Gehalt der Zellen am Durchflusszytometer
gemessen werden.

Ethanol	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNase A	Qiagen, Hilden

3.5.4 BrdU-Proliferationsanalyse

2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU) ist ein Analogon des Thymidin und wird während der S-Phase
des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. BrdU kann mit spezifischen Anti-
körpern detektiert werden. Zusätzlich können parallel weitere Färbungen, z.B. DNA-Färbung mit
PI, durchgeführt werden. Für die BrdU-Proliferationsanalyse wurden die Zellen mit
10 mM BrdU/PBS für 45 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 70 % Ethanol (-20 °C)
fixiert und ü.N. bei 4 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zugabe von
2N HCl/5 % Triton X-100 denaturiert. Dieser Denaturierungsschritt ist für die Bindung des
Antikörpers an BrdU notwendig. Zur Neutralisierung wurde den Zellen 1 ml 0,1 M Boraxlösung
zugegeben, dann mit 1 ml PBS/1 % BSA/0,5 % Tween[®]20 gewaschen und schließlich mit dem
anti-BrdU-Antikörper (Maus-IgG) 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten Was-
schritt mit 1 ml PBS/1 % BSA/0,5 % Tween[®]20 folgte die Inkubation mit dem sekundären
FITC-markierten Antikörper (anti-Maus IgG) für 30 min bei 4 °C. Die Zellen wurden dann mit
1 ml 1 % Glucose/PBS gewaschen, bevor sie schließlich in 1000 µl PI-Färbelösung (50 µl PI,
10 µl RNase A (= 1 mg), 950 µl Glucose in PBS) aufgenommen wurden. Der Nachweis des
BrdU-Einbaus in die DNA erfolgte durchflusszytometrisch.

Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borax (Di-Natriumtetraborat-Decahydrat)	Roth, Karlsruhe
BSA (bovines Serum-Albumin, Cohn Fraction V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BrdU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-BrdU (Maus IgG)	Becton Dickinson, USA
anti-Maus-FITC IgG	Dianova, Hamburg
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.5.5 γ -H2AX-Analyse

Die Phosphorylierung des Histons H2AX an Ser139 (= γ -H2AX) erfolgt ausschließlich an Doppelstrangbrüchen (DSB) (Rogakou *et al.*, 1998). Gegen γ -H2AX gerichtete Fluoreszenzmarkierte Antikörper sind somit ein geeignetes Mittel, um DSBs zu detektieren und zu quantifizieren. Hierfür wurden pro Probe $1-3 \times 10^6$ Zellen pelletiert, einmal mit TBS gewaschen und mit 95 % Ethanol/5 % HCl fixiert (10 min, RT). Hierauf folgte die Permeabilisierung der Membran mit TBS/1 % PFA/0,25 % Triton X-100 (5 min, RT). Nachdem die Zellen 30 min mit TBS/3 % BSA geblockt wurden, wurde ü.N. (4 °C) mit γ -H2AX-FITC (4 μ g/ml in TBS/3 % BSA) bzw. mit IgG₁-FITC (als Negativ-Kontrolle) inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit TBS wurden die Zellen in TBS aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen.

anti- γ -H2AX-FITC (Maus IgG ₁)	Upstate, USA
IgG ₁ -FITC	Immunotech, Frankreich
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TBS:	
145 mM NaCl	Merck, Darmstadt
2,5 mM KCl	Merck, Darmstadt
25 mM Tris, pH 7,4	Roth, Karlsruhe

3.5.6 PAR-Analyse

Zum Nachweis poly-(ADP-ribosyl)ierter Proteine (PAR) wurden die entsprechend behandelten Zellen pelletiert ($\approx 1-3 \times 10^6$ Zellen), einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem 50 % Methanol/50 % Aceton 10 min bei 4 °C fixiert. Nach vorsichtigem abzentrifugieren (RT, 8 min, 200 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zwei Mal mit 1 ml PBST (1 % Tween[®]20/PBS) gewaschen. Danach wurden jeweils 100 μ l PAR-Antikörper (2 μ g/ml) bzw. Maus-IgG (zur Kontrolle) in 0,1 % Magermilch/PBST zugegeben und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden drei Mal mit eiskaltem PBST gewaschen, bevor je 100 μ l des DyLight[™]488-konjugierten sekundären Antikörpers in 0,1 % Magermilch/PBST zugegeben und für 4 h bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde drei Mal mit PBST gewaschen, die Zellen in PBS aufgenommen und am Durchflusszytometer detektiert. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurden Zellen vor Bestrahlung für 2,5 h mit 4 μ M des PARP-Inhibitors PJ34 inkubiert.

Methanol	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
anti-PAR (Maus, IgG _{3a} , [10 HA])	Trevigen, USA
Maus-IgG ₃	Dianova, Hamburg
DyLight TM 488-konjugierter AffiniPure anti-Maus (Ziege, IgG, H+L)	Dianova, Hamburg
PJ34 (N-(6-Oxo-5,6-Dihydrophenanthridin-2-yl)-(N,N-Dimethyl-amino)Acetamid Hydrochlorid)	Merck, Darmstadt

3.6 Untersuchung der Mutationsfrequenz von Zellen

Mit genetischer Stabilität bezeichnet man die Fähigkeit der Zelle, durch eine effiziente Zellzykluskontrolle und Reparaturmechanismen DNA-Schäden korrekt zu beheben und damit die Funktionalität und Lebensfähigkeit der Zelle zu erhalten oder bei Unfähigkeit zur Reparatur den Zelltod einzuleiten. Ein Maß für genetische Instabilität ist eine durch fehlerhafte oder gehemmte DNA-Schadensreparatur entstandene erhöhte Mutationsfrequenz der Gene.

3.6.1 Prinzip des *hprt*-Gen Mutations Assay

Als Modellgen für den Mutations-Assay eignet sich besonders das *hprt*-Gen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen): es ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Nabholz *et al.*, 1969; Fenwick, 1980), wodurch im männlichen Chromosomensatz nur ein Allel vorhanden bzw. im weiblichen Chromosomensatz nur eines aktiv ist (Kim *et al.*, 2004; Ciavatta *et al.*, 2006). Dadurch führt eine einzige Mutation dieses Gens zu einem Funktionsausfall des HPRT-Proteins.

Die HPRT ist ein Enzym des Purin-Metabolismus, dessen primäre Funktion darin besteht, Purin-Basen degradierter DNA zu verwerten und Purin-Nukleotide zur DNA-Synthese zur Verfügung zu stellen. Wird 6-Thioguanin (6-TG) dem Zellmedium zugefügt, wird es von der HPRT zu 6-TG-Monophosphat phosphoryliert, welches die Biosynthese von Nukleotiden hemmt, oder 6-TG-Monophosphat wird weiter synthetisiert zu 6-TG-Nucleotiden, welche als falsche Nukleotide in die DNA oder RNA eingebaut werden. Beide Wege führen zum Zelltod. Treten nun Mutationen im *hprt*-Gen auf, funktioniert die HPRT nicht mehr, d.h. die Zelle überlebt, da die DNA-Synthese über alternative Wege erfolgt. Diese überlebenden Mutanten bilden im semi-soliden Medium Kolonien. Die Zahl der Kolonien dient als Maß für die Mutationsfrequenz.

3.6.2 *hprt*-Gen Mutations Assay/ Cloning Efficiency (CE)-Assay

Die Durchführung dieses Assay erfolgte wie von van der Kuip *et al.* (2004) beschrieben: die Zellen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen mit und ohne 3 μM Imatinib und γ -Strahlung (3 x 2 Gy) behandelt. Die Suspensionszelllinien 32D und BaF3 wurden dann in semisolidem Softagar (siehe 3.1.7) resuspendiert und in An- oder Abwesenheit von 10 μM 6-TG eingesät. Die Dichte hierfür betrug 200 Zellen/Loch in 6-Loch-Platten für den CE-Assay (*Cloning Efficiency* = Verhältnis der Anzahl gebildeter Zellkolonien zur Anzahl der eingesäten Zellen in Abwesenheit von 6-TG) bzw. 1×10^6 Zellen/Loch in 12-Loch-Platten für den *hprt*-Assay (in Anwesenheit von 6-TG). Die adhärenen MEF-Zelllinien wurden direkt mit einer Dichte von 150 Zellen/30 ml Medium in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen eingesät. Die Zellen wurden für 7-10 Tage inkubiert. Die im semisoliden Medium immobilen Suspensionszellen bildeten sichtbare Kolonien (> 50 Zellen), welche gezählt werden konnten. Um die Kolonien der adhärenen Zellen in den Zellkulturflaschen sichtbar zu machen und zählen zu können, wurden sie mit einer Giemsa-Färbelösung angefärbt (siehe 3.6.3). Aus der Anzahl der Kolonien wurde die CE und die Mutationsfrequenz, korrigiert auf die CE, berechnet.

3.6.3 Giemsa-Färbung adhärenen Zellkolonien

Die adhärenen MEF-Zellen wurden zur Bestimmung der CE und der Mutationsfrequenz direkt in Zellkulturflaschen eingesät, an deren Boden sie Kolonien bildeten. Um diese sichtbar zu machen, wurden sie blau angefärbt. Dazu wurde aus den Zellkulturflaschen das Medium abgesaugt, die Kolonien einmal mit PBS gewaschen und 7 ml der filtrierten Färbelösung für 12 min unter leichtem Schwenken zugegeben. Anschließend wurde zweimal mit 10 ml H_2O und einmal mit 10 ml 70 % Isopropanol gewaschen.

Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung
70 % (v/v) Isopropanol

Merck, Darmstadt
Fischar, Saarbrücken

3.7 Untersuchung der Reparaturfähigkeit der Zellen

Zur Untersuchung der Fähigkeit der Zellen, induzierte DNA-Strangbrüche zu reparieren, wurden neben der γ -H2AX-Analyse (siehe 3.5.5) die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) und die Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.7.1 Prinzip des Comet-Assays

Für den Comet-Assay werden Zellen (nach induzierter DNA-Schädigung) in einer Agarose-schicht auf einen Objektträger gebracht. Die Zellen werden lysiert um die Membranen durchlässig für die DNA-Bruchstücke zu machen. Durch die anschließende Elektrophorese diffundieren die negativ geladenen Bruchstücke je nach Größe unterschiedlich weit aus dem Kern Richtung Kathode. Wird die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt, werden sowohl SSB als auch DSB detektiert. Unter neutralen Bedingungen werden nur DSB detektiert, da hier die DNA nicht denaturiert wird und somit einzelsträngig vorliegt, sondern doppelsträngig bleibt (siehe Abb. 5). Anschließend wird die DNA mit Hilfe des interkalierenden fluoreszierenden Farbstoffes DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und die Objektträger können mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Pro Objektträger wurden mindestens 50 Zellen aufgenommen und die Zellen einzeln mittels der Analysesoftware *CometScore™ Freeware* ausgewertet. Der Anteil der aus dem Kern („Kopf“ des kometenhaften Erscheinungsbildes der Zellen) ausgetretenen DNA-Bruchstücke (als „Schweif“ erkennbar) diente als Maß für die Anzahl der DNA-Brüche.

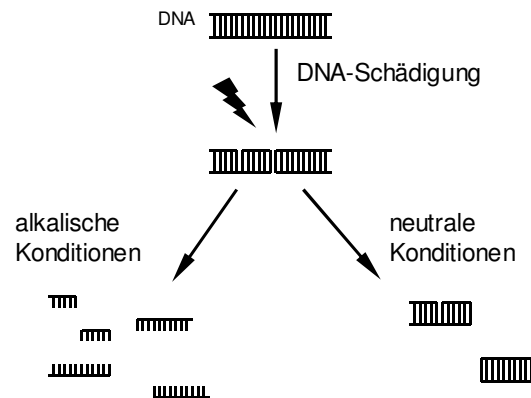


Abbildung 5: Prinzip DNA-Denaturierung während des Comet-Assays. Durch γ -Strahlung werden in der DNA SSB und DSB erzeugt. Unter neutralen Bedingungen entstehen DNA-Fragmente nur an DSB, während unter alkalischen Bedingungen die DNA denaturiert wird, wodurch auch infolge von SSB DNA-Fragmente entstehen.

3.7.2 Alkalischer Comet-Assay

Der alkalische Comet-Assay wurde modifiziert nach Singh *et al.* (1988) und Klaude *et al.* (1996) angewandt. Zur Vorbereitung wurden Objektträger mit 1 % LMT-Agarose/PBS (*low melting temperatur*) beschichtet. Aus 2×10^6 Zellen/ml in PBS wurden 90 μ l mit 400 μ l 0,5 % LMT-Agarose/PBS gemischt. Es wurden 90 μ l dieser Mischung auf den Objektträger geschichtet und 20 min zum Erstarren auf Eis belassen. Nach einer nochmaligen Überschichtung mit 90 μ l 0,5 % LMT-Agarose wurden je 100 μ l Lysepuffer (2,5 M NaCl, 0,1 M Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100, pH 10) aufgebracht und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation in der mit Elektrophoresepuffer (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA) gefüllten Elektrophoresekammer (20 min, 4 °C). Die Elektrophorese lief dann bei 25 V, 300 mA für 15 min bei 4 °C. Nach zweimaligem Waschen für 10 min mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris) wurden die Objektträger mit DAPI gefärbt und analysiert.

Super Frost Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen
LMT-Agarose: NuSieve® GTG® Agarose	BMA, USA
Na ₂ EDTA (Dinatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer: Sub-Cell® Model 96	Bio-Rad, München
Model 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München

3.7.3 Neutraler Comet-Assay

Der neutrale Comet-Assay wurde nach Wojewódzka *et al.* (2002) modifiziert: die Objektträger wurden mit 0,5 % LMT-Agarose überschichtet. Aus einer Zellsuspension von 2×10^6 Zellen/ml PBS wurden 90 μ l mit 400 μ l 0,9 % LMT-Agarose gemischt. Daraus wurden 90 μ l auf den Objektträger geschichtet und für 20 min zum Erstarren auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 1,5 h (im Dunkeln, 4 °C) in mit Lysepuffer (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % N-Lauroylsarcosin Natriumsalz, pH 9,5) gefüllte Küvetten gestellt. Nachdem 3 x 5 min mit Elektrophoresepuffer 0,3 M Natriumacetat, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3) gewaschen wurde, wurden sie in diesem für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Elektrophorese lief bei 11 V und 20-30 mA für 1 h bei 4 °C. Im Anschluss wurde 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris) gewaschen, mit DAPI gefärbt und analysiert.

Tris-HCl PUFFERAN®	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamin-Tetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz, 30 % wässrige Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

3.7.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine Methode, doppelsträngige DNA-Stücke der Größe nach aufzutrennen. Man kann die PFGE, wie sie hier nach Joshi & Grant (2005) modifiziert wurde, auch als „Massen-“ neutralen Comet-Assay bezeichnen, da hier nicht die ausgetretene DNA einzelner Zellen betrachtet wurde, sondern blockweise die von $0,8 \times 10^6$ Zellen zugleich. Bei der PFGE liegt ein Gel mit eingefügten Zell-Agarose-Plugs in einer hexagonalen Elektrophoresekammer, in welcher die Elektroden in Winkeln von 60° gegeneinander angeordnet sind. Somit kann das elektrische Feld die Richtung in einem Bereich von 180° ändern. Zusätzlich wird die Spannung gepulst angelegt, wodurch die DNA einem ständigen Wechsel zwischen Ausrichtung und Relaxation in die sich ändernden Richtungen unterliegt. Durch diesen Mechanismus erfolgt die Bewegung und Auftrennung durch das Gel. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in $35 \mu\text{l}$ RPMI 1640-Medium (ohne Zusätze) aufgenommen, mit $35 \mu\text{l}$ 1 % Agarose gemischt und von diesem Gemisch $60 \mu\text{l}$ entnommen und in Gießformlöcher gegeben. Die so entstehenden Plugs erstarrten bei 4°C in ca. 5 min. Die fertigen Plugs wurden in 1,5 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,5 M EDTA, 2 % N-Lauroylsarcosin Natriumsalz, 0,1 mg/ml Proteinase K, pH 8) gebracht und bei 4°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurde für 16-18 h im Thermomixer bei 50°C leicht schüttelnd (300 rpm) weiterinkubiert. Der Lysepuffer wurde verworfen, zu den Plugs je 1,5 ml Waschpuffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8) zugegeben und für 1 h bei 37°C weiter geschüttelt. Der Waschpuffer wurde abpipettiert, mit 1,5 ml Waschpuffer plus RNase A (0,1 mg/ml) ersetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das Gel (0,8 % Agarose/0,5 x TBE) mit dem zu den Plugs passenden Kamm wurde gegossen und erstarrte 1 h bei RT. Die Plugs wurden in die Taschen des Gels gebracht und mit 1 % LMT-Agarose fixiert. Das so präparierte Gel wurde in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Elektrophorese lief 23 h bei 4°C , ansteigenden Puls-Intervallen von 60 s bis 120 s und 200 V. Das Gel wurde anschließend 40 min mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in 0,5 x TBE-Puffer gefärbt, um unter UV-Licht die DNA zu detektieren. Als Maß der Anzahl der DSB diente die ‚fraction of activity released‘ (FAR), d.h. der Anteil der aus den Plugs ausgetretenen DNA in der Lane bezogen auf den Gesamt-DNA-Gehalt:

FAR	=	$\frac{\text{DNA-Gehalt Lane}}{\text{DNA-Gehalt Lane} + \text{DNA-Gehalt Plugs}}$
-------	---	---

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Proteinase K	AppliChem, Gatersleben
PFGE-System: <i>CHEF-DR[®]II System</i>	Bio-Rad, München
Für 1 L 10 x TBE-Puffer (<i>Tris/Borate/EDTA buffer</i>)	
108 g Tris	Roth, Karlsruhe
55 g Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
40 ml 0,5 M EDTA, pH 8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.8 Protein-Analyse

3.8.1 Gesamtproteinextraktion aus hämatopoetischen Zelllinien (Direktmethode)

Zur Extraktion nukleärer und cytoplasmatischer Proteine wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen zunächst durch Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4 °C) pelletiert und anschließend mit kaltem PBS gewaschen. Die gewonnenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur Protein-Extraktion wurden die noch gefrorenen Zellpellets in 100-500 µl 1 x Lämmli-puffer (62,5 mM Tris-HCl, 5 % (v/v) Glycerol, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % Bromphenolblau, pH 6,8) aufgenommen und sofort für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Ultraschallgeräts homogenisiert und für 20 min abzentrifugiert (8000 g, 4 °C) um den zellfreien proteinhaltigen Überstand zu gewinnen. Für die Auftrennung per SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurden jeweils gleiche Volumina der Proben (30-50 µl) verwendet. Durch das im Lämmli-puffer enthaltene SDS und das Bromphenolblau ist eine Proteinbestimmung nach Bradford bei dieser Methode nicht möglich, es wurden deshalb bei zu vergleichenden Proben die gleichen Zellmengen verwendet.

Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (<i>sodium dodecylsulfate</i>)	Serva, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ultraschall-Homogenisator <i>Sonopuls HD200</i> ; MS72 Mikrospritze aus Titan	Bandelin Elektronik, Berlin

3.8.2 Gesamtproteinextraktion aus primären mononukleären Blutzellen (PBMC)

Da in den PBMC auch die Poly-(ADP-ribosyl)ierung (PAR) der Proteine detektiert wurde, wurde die Proteinextraktion bei diesen Zellen unter dafür geeigneten Bedingungen durchgeführt. Da sich die hierfür verwendete Methode für den Nachweis nicht-ribosylierter Proteine ebenso gut eignete wie die Direktmethode, wurde sie hier für alle Protein-Analysen per SDS-PAGE verwendet. Hierbei wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen zweimal in kaltem PBS gewaschen. Dadurch wurde gewährleistet, dass das im Medium enthaltene FCS vollständig entfernt wurde, da es den Nachweis der PAR stört. Die danach schockgefrorenen Pellets wurden in 100-500 μ l eiskaltem Urea-Lysepuffer (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 62,5 mM Tris, 5 % β -Mercaptoethanol, 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail, 0,01 % Bromphenolblau, pH 6,8) resuspendiert und sofort für 20 s mit Ultraschall homogenisiert (bei 4 °C). Nach 20 min Zentrifugation (8000 g, 4 °C) wurden die proteinhaltigen Überstände abgenommen, mit gleichen Volumina 2 x Lämmli-Puffer gemischt und bei 65 °C für 15 min denaturiert. Da hier aus denselben Gründen wie in 3.8.1 keine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt werden konnte, wurden für zu vergleichende Proben gleiche Zellmengen eingesetzt.

Harnstoff (Urea)	Promega, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail, „complete“	Roche, Mannheim

3.8.3 Proteingehaltsbestimmung nach Bradford

Die kolorimetrische Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) basiert auf der Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes „Coomassie-Brillant-Blau G-250“ (CBBG) an kationischen und unpolare Seitenketten von Proteinen. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der sonst rote Farbstoff in seiner blauen, anionischen Form stabilisiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm verschiebt (Compton & Jones, 1985). Diese Methode wurde zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der Proben für die Immunpräzipitation verwendet. Hierfür wurde 1 μ l des zu untersuchenden Lysats mit einer 20 % Bradford Reagenz-Lösung/H₂O versetzt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer zuvor gemessenen BSA-Standardreihe (Konzentrationsbereich von 0-24 μ g/ μ l) berechnet.

Bradford Reagenz, Protein Assay	BioRad, München
Spektralphotometer Novaspec II	Biochrom, Berlin

3.8.4 Immunpräzipitation

Zur Feststellung der zur Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität notwendigen Imatinib-Konzentration wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden 32 D- bzw. BaF3-Zellen ohne oder mit unterschiedlichen Konzentrationen Imatinib vorinkubiert. 20 min nach einer Bestrahlungsdosis von 30 Gy wurden Pellets à 20-25 x 10⁶ Zellen gewonnen, in 1 ml eiskaltem Lysepuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat, 1 x Proteaseinhibitor-Cocktail, 1 mM Na-Orthovanadat, pH 7,5) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mittels Ultraschall 20 s lang homogenisiert und für 20 min (8000 g, 4 °C) abzentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Volumina entnommen, welches 1 mg Proteinmenge entsprach (bestimmt über Gesamtproteinbestimmung nach Bradford) und entsprechend mit Lysepuffer auf 200 μ l aufgefüllt. Hierzu wurden 20 μ l des Agarose-konjugierten monoklonalen Antikörpers P-Tyr-100 gegeben und für 6 h bei 4 °C über Kopf schüttelnd inkubiert. Dann wurde 5 x mit je 500 μ l Lysepuffer gewaschen (dazwischen für je 1 min, 4 °C, 8000 g). Zuletzt wurde das Pellet in 50 μ l 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C die Proteine denaturiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 8000 g) wurden 40 μ l des Überstandes auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine aufgetrennt.

EGTA (<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na-Pyrophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Na-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phospho-Tyrosin monoklonaler Antikörper [P-Tyr-100]	Cell Signaling Technology, USA

3.8.5 Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE

Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach erforderlichem Molekulargewichtsbereich der aufzutrennenden Proteine wurden unterschiedliche Anteile von Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-Acrylamid verwendet (siehe Tab. 7). Aufgetragen wurden Probenvolumina von 30-50 μ l, für jedes Gel wurde ein für den Bereich geeigneter Molekulargewichts-Marker mit aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 1 % SDS) gefüllten Vertikal-Elektrophoresekammer bei einer konstanten Stromstärke von 7 mA pro Gel für 15-20 h.

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

	4 %-Sammelgel	5 %-Trenngel	7,5 %-Trenngel	10 %-Trenngel
30 % Acrylamid/ Bis-Lösung	1,35 ml	4,2 ml	6,25 ml	8,3 ml
H₂O	6,1 ml	14,1 ml	12 ml	9,95 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	6,22 ml	6,22 ml	6,22 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml	-	-	-
10 % SDS	100 µl	250 µl	250 µl	250 µl
TEMED	10 µl	25 µl	25 µl	25 µl
10 % APS	100 µl	250 µl	250 µl	250 µl

Ammoniumpersulfat (APS)

Bio-Rad, München

TEMED

Roth, Karlsruhe

30 % Acrylamid/Bis-Lösung (37,5:1)

Bio-Rad, München

Molekulargewicht-Marker (7-175 kDa)

Cell Signaling, USA

Molekulargewicht-Marker „HiMark™“ (28-420 kDa)

Invitrogen, USA

Vertikal-Elektrophoresekammer „Protean II xi Cell“

Bio-Rad, München

3.8.6 Western-Blot-Analyse

Unter Verwendung einer Trans-Blot®Semi-Dry Transferkammer wurden die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierzu wurden eine Lage Membran und 6 Lagen Filterpapier auf dieselbe Größe zugeschnitten und mit Transferpuffer (0,025 M Tris-HCl, 0,192 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 1 % (w/v) SDS) getränkt. Auf die Platin-Anode der Transferkammer wurden erst 3 Lagen Filterpapier, dann die Membran, dann das Gel und abschließend wieder 3 Lagen Filterpapier luftblasenfrei aufgebracht. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 15 V für 1,5 h. Um überschüssiges Methanol zu entfernen, wurde die Membran nach dem Transfer in 1 x TBST (TBS/0,1 % Tween®20) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT auf dem Schüttler in 5 % Magermilch/TBST (MM) oder 1 % Western Blocking Reagent/TBS (1 % WBR) (siehe Tab. 8) geblockt. Die Inkubation des Primär-Antikörpers erfolgte entsprechend verdünnt in 5 % Mager-

milch/TBST (MM), 0,5 % „Western Blocking Reagent“/TBS (0,5 % WBR) oder 5 % BSA/TBST (BSA) (siehe Tab. 8) bei 4 °C über Nacht. Als Beladungskontrolle diente in dieser Arbeit immer β -Aktin.

Tabelle 8: Verwendete Primär-Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Blocking	Verdünnung	verdünnt in
c-Abl	Maus, IgG ₁ , [8E9]	BD Pharmingen	1 % WBR	1:1000	0,5 % WBR
Tyr245-c-Abl	Kaninchen, IgG	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	BSA
β -Aktin	Maus, IgG ₁ , [AC-15]	Sigma, Steinheim	MM	1:5000	MM
ATM	Kaninchen IgG [D2E2] XP™	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	BSA
Ser1981-ATM	Maus, IgG ₁ , [10.H11.E12]	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	MM
ATR	Ziege, IgG, [N-19]	Santa Cruz, Heidelberg	MM	1:200	MM
Chk1	Maus, IgG ₁ , [2G1D5]	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	MM
Ser345-Chk1	Kaninchen, IgG	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	BSA
Chk2	Kaninchen, IgG	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:500	BSA
Thr387-Chk2	Kaninchen, IgG	Cell Signaling Technology, USA	MM	1:1000	BSA
HA	Maus, IgG _{2a} , [F-7]	Santa Cruz, Heidelberg	MM	1:500	MM
PARG	Kaninchen, IgG	Abcam, UK	1 % WBR	1:2000	0,5 % WBR
PARP-1	Kaninchen, IgG	Novus Biologicals, USA	MM	1:1000	MM
p53	Maus, IgG ₁ , [Pab 240]	Santa Cruz, Heidelberg	MM	1:500	MM
Ser15-p53	Maus, IgG ₁ , [16G8]	Santa Cruz, Heidelberg	MM	1:1000	MM

Die Membran wurde im Anschluss 3 x 10 min in TBST gewaschen. Entsprechend dem Herkunftsorganismus des eingesetzten primären Antikörpers (Maus, Kaninchen, etc.) wurde nun ein entsprechender Peroxidase (POD)-konjugierter sekundärer Antikörper (siehe Tab. 9) zugegeben. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte bei 4 °C über Nacht in 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBST.

Tabelle 9: Verwendete Sekundär-Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
anti-Kaninchen-IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000
anti-Maus-IgG-POD	Ziege, IgG (H+L)	Cell Signaling Technology, USA	1:2000
anti-Ziege-IgG-POD	Kaninchen, IgG (H+L)	Dianova, Hamburg	1:5000

Danach wurde die Membran 4 x 10 min in TBST gewaschen. Die Detektion der an die Proteine gebundenen Antikörper erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion, wofür „SuperSignal[®] West Dura *Extended Duration Substrate*“ nach Anleitung des Herstellers verwendet wurde. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde über Exposition der Membran gegen einen speziellen Röntgenfilm und die nachfolgende Entwicklung des belichteten Films sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software „Image J“, *Version 1.41* wurden densitometrische Auswertungen durchgeführt.

Protan [®] Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Filterpapier „Gel-Blotting Papier“	Schleicher & Schuell, Dassel
Blottingkammer „Trans-Blot [®] <i>Semi-Dry Transfer Cell</i> “	Bio-Rad, München
PowerPac [™] <i>Basic Power Supply</i>	Bio-Rad, München
Magermilchpulver (<i>skim milk powder</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
„ <i>Western Blocking Reagent</i> “	Roche, Mannheim
Autoradiographie-Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg
“Lumi-Film”, <i>Chemiluminescent Detection Film</i>	Roche, Mannheim
Luminol-Lösung: “SuperSignal [®] West Dura <i>Extended Duration Substrate</i> ”	Pierce Biotechnology, USA
„Image J“, <i>Version 1.41</i>	W. Rasband, NIH, USA

Um bei Bedarf die Membran wieder von primären und sekundären Antikörpern zu befreien, damit sie anschließend mit anderen Antikörpern inkubiert werden kann, wurde diese für 20 min in einer SDS/ β -Mercaptoethanol-Strippinglösung (62,5 mM Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol; pH 6,7) bei 52 °C leicht geschüttelt. So konnte die Membran für die Detektion weiterer Proteine herangezogen werden.

3.9 Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Immunfluoreszenz (IF) bestimmt. Nach der Fixierung und Anfärbung der Zellen wurden diese auf Objektträgern mit *Mounting Medium* aufgebracht, mit einem Deckglas versehen und mittels konfokalem Lasermikroskop detektiert.

Konfokales Lasermikroskop DM IRBE

Leica Microsystems, Wetzlar

Laser:

Argon 488 nm, 514 nm

Helium-Neon 633 nm

Confocal Software Version

Leica Microsystems, Wetzlar

Immersionsöl

Leica Microsystems, Wetzlar

Objektträger SuperFrost® Plus

Menzel-Gläser, Braunschweig

Deckgläschen 24 x 60 mm

Langenbrinck, Teningen

Mounting Medium w/o DAPI „Vectashield H-1000”

Vector, USA

3.9.1 Lokalisation von γ -H2AX

Die Fixierung und Färbung der entsprechend behandelten Zellen wurde wie für die FACS-Analyse in 3.5.5 durchgeführt. Anschließend wurde 3 x mit PBST gewaschen und die Zellen wurden mit *Mounting Medium w/o DAPI* eingedeckt.

3.9.2 Lokalisation poly-(ADP-ribosyl)ierter Proteine

Die Fixierung der Zellen und die Färbung poly-(ADP-ribosyl)ierter Proteine erfolgte wie in 3.5.6 für die FACS-Analyse beschrieben. Die Zellen wurden im Anschluss 3 x mit PBST gewaschen und als Kernfärbung 10 min bei RT mit TO-PRO®-3 (1:1000 in PBST) inkubiert. Die Zellen wurden dann mit *Mounting Medium w/o DAPI* eingedeckt.

 TO-PRO®-3 Jodid (642/661), 1 mM/DMSO

Invitrogen, USA

3.10 Statistische Auswertungen

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm *GraphPad Prism Version 4.03* verwendet. Die Daten wurden durch Angabe des Mittelwertes \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes; *standard error of the mean*) dargestellt. Unterschiede in gepaarten Proben (v.a. mit Imatinib vs. ohne Imatinib) wurden unter Verwendung des zweiseitigen gepaarten Student's *t*-Tests analysiert. Die Signifikanz der Unterschiede der Comet Assay-Mittelwerte wurde mittels des ungepaarten Student's *t*-Tests bestimmt. Eine statistische Signifikanz wurde für einen *p*-Wert kleiner als 0,05 angenommen: * steht für einen *p*-Wert $< 0,05$, ** für einen *p*-Wert $< 0,01$ und *** für einen *p*-Wert $< 0,001$.

4 ERGEBNISSE

Mit der Entwicklung von Imatinib Ende der 90er Jahre wurde ein Wirkstoff konzipiert, welcher spezifisch die Kinaseaktivität von Bcr-Abl hemmt, eines Onkoproteins, verantwortlich für die Pathogenese der CML. Zusätzlich zu Bcr-Abl hemmt Imatinib auch PDGFR, c-Kit und c-Abl. Zwar reagiert der Großteil der Patienten dauerhaft positiv auf eine Imatinib-Therapie, jedoch treten Bcr-Abl-positive Klone häufig nach Absetzen der Therapie wieder auf, was eine ununterbrochene, vermutlich lebenslange Imatinib-Einnahme der Patienten erforderlich macht. Folglich ist es zwingend notwendig, den Effekt von Imatinib auf normale, Bcr-Abl-negative Zellen zu verstehen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung möglicher funktioneller und molekularer Konsequenzen der Inhibition des physiologischen c-Abl durch Imatinib in Bcr-Abl-negativen Zellen. Die streng regulierte Tyrosin-Kinase c-Abl ist in verschiedene Stress-induzierte Signalwege involviert und interagiert mit verschiedenen Proteinen, welche an der DNA-Schadens-Erkennung und -Reparatur beteiligt sind. Des Weiteren wird die Aktivität von c-Abl durch genotoxische Substanzen oder γ -Strahlung hochreguliert. Somit liegt es nahe, dass c-Abl eine wichtige Rolle in der Erhaltung der genetischen Stabilität nach DNA-Schädigung spielt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer Langzeit-Hemmung von c-Abl auf die genetische Stabilität sowie auf die Reparatur und wichtige Regulatoren der DNA-Schadensprozessierung Bcr-Abl-negativer Zellen untersucht.

4.1 Etablierung und Charakterisierung der Zelllinienmodelle zur Untersuchung des Einflusses der c-Abl-Aktivität

Um die Fragestellung beantworten zu können, wurden zunächst geeignete Zelllinien-Modelle etabliert und charakterisiert. Zur Untersuchung Imatinib-abhängiger Effekte wurde die murine hämatopoetische Vorläuferzelllinie 32D mit *abl*-wt und der Imatinib-resistenten Mutante *abl*-T315I transfiziert. Um zu verifizieren, dass diese Effekte tatsächlich auf die Hemmung der Kinase-Aktivität von c-Abl zurückzuführen sind, wurden c-Abl^{-/-}-MEF-Zellen mit *abl*-wt bzw. mit der Kinase-defizienten Variante *abl*-KD retransfiziert.

4.1.1 Charakterisierung der 32D Abl-wt- und 32D Abl-T315I-Zelllinien

Um die Imatinib-resistente c-Abl-Mutation Abl-T315I zu erzeugen, wurde in Kooperation mit Dr. C. Miething (TU München) über eine gezielte Mutagenese des *abl*-wt-tragenden Plasmids an Position 257 die Base Cytosin gegen Thymin ausgetauscht, was wiederum in einem Austausch der Aminosäure Threonin gegen Isoleucin an Position 315 der Kinase-Domäne von c-Abl resultierte. Dadurch wird die Konformation der Kinase-Domäne derart verändert, dass Imatinib nicht mehr binden kann (Schindler *et al.*, 2000). Nachdem die 32D-Zelllinie mit *abl*-wt bzw. mit *abl*-T315I (beide mit einer HA-Markierung versehen) stabil transfiziert wurden, wurden die Zellen unter selektiven Bedingungen subkloniert, einzelne Klone isoliert und weiterkultiviert. Diese Klone wurden nun mittels Western-Blot-Analyse auf ihren HA-Expressionsstatus getestet. Die Klone, welche die höchste HA-Expression und somit die höchste Expression der jeweiligen exogenen c-Abl-Variante aufweisen konnten, wurden zur Weiterkultur ausgewählt und für die Versuche verwendet (Abb. 6).

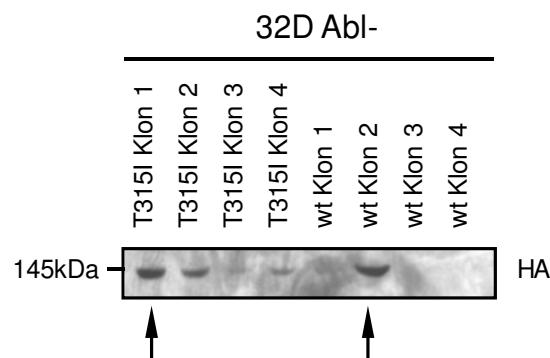


Abbildung 6: Auswahl monoklonaler transfizierter 32D Abl-wt und 32D Abl-T315I-Zelllinien. Die Abl-Varianten, mit denen die 32D-Zellen transfiziert wurden, enthalten eine HA-Markierung. Über die Detektion dieser Markierung wurde die Expression der jeweiligen exogenen transfizierten c-abl-Varianten bestimmt. Die HA-Markierung wurde in der Western-Blot-Analyse von einem spezifischen Antikörper erkannt (auf der Laufhöhe von c-Abl, 145 kDa). Zur Vergleichbarkeit wurden jeweils gleiche Zellzahlen der zuvor subklonierten monoklonalen Zellen zur Proteinextraktion eingesetzt. Die Pfeile zeigen die zur Weiterkultur ausgewählten Klone an.

Des Weiteren konnte nach Sequenzierung der cDNA durch die Firma GENterprise GmbH gezeigt werden, dass sowohl die Mutagenese als auch die Transfektion erfolgreich waren (siehe Abb. 7).

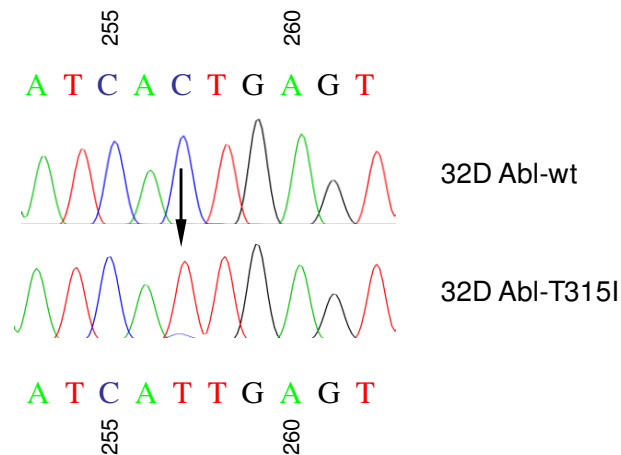


Abbildung 7: Nachweis des c-Abl-Status der transfizierten Zelllinien 32D Abl-wt und 32D Abl-T315I. Der Ausschnitt des Chromatogramms zeigt den Austausch der Base Cytosin (Abl-wt) gegen Thymin (Abl-T315I).

4.1.2 Bestimmung des c-Abl-Status in den MEF-Zelllinien

Murine embryonale c-Abl^{-/-}-Fibroblasten (MEF Abl^{-/-}) (Dr. J.Y. Wang, USA) wurden stabil mit Abl-wt bzw. mit einer Kinase-defekten Variante von c-Abl (Abl-KD) transfiziert. Durch Überprüfung des c-Abl-Status konnte der Erfolg der Transfektion gezeigt werden (siehe Abb. 8). Im Gegensatz zur Linie MEF Abl^{-/-} wird von den Zellen der Linie MEF Abl-wt und MEF Abl-KD c-Abl exprimiert.

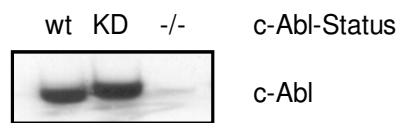


Abbildung 8: Nachweis des c-Abl-Status der transfizierten Zelllinien MEF Abl^{-/-}, MEF Abl-wt und MEF Abl-KD. Aus der jeweils gleichen Anzahl von Zellen der Linien MEF Abl^{-/-} (-/-), MEF Abl-wt (wt) und MEF Abl-KD (KD) wurden die durch Gesamtproteinextraktion gewonnenen Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die c-Abl-Expression wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft.

4.2 Inhibition der c-Abl-Aktivität durch Imatinib

Um den Konzentrationsbereich von Imatinib zu ermitteln, bei dem ohne unspezifische toxische Effekte Bcr-Abl komplett gehemmt wird, wurde die Viabilität verschiedener Zelllinien in Abhängigkeit ansteigender Imatinib-Dosen festgestellt. Hierfür wurden die Bcr-Abl-negativen Zelllinien 32D und BaF3 und die Bcr-Abl-positiven Zelllinien 32Dp210 und BaF3p185 mit steigenden Konzentrationen Imatinib (0-30 μM) behandelt und mittels des MTT-Assays das Wachstum bzw. Überleben der Zellen gemessen. Wie Abb. 9 zeigt, hemmt in den als Referenz dienenden Bcr-Abl-positiven Zellen bereits eine Dosis von 0,3 μM Imatinib die Viabilität der Zellen, ab 3 μM ist die Überlebensfähigkeit komplett gehemmt. Dies gilt für die Bcr-Abl-negativen Zellen erst ab einer Dosis von 30 μM Imatinib. Daher wurde als ideale Dosis 3 μM Imatinib gewählt, da sie ausreicht, um die Bcr-Abl-überexprimierenden Zellen vollständig zu hemmen, gleichzeitig aber die Viabilität von Bcr-Abl-negativen Zellen nicht beeinflusst.

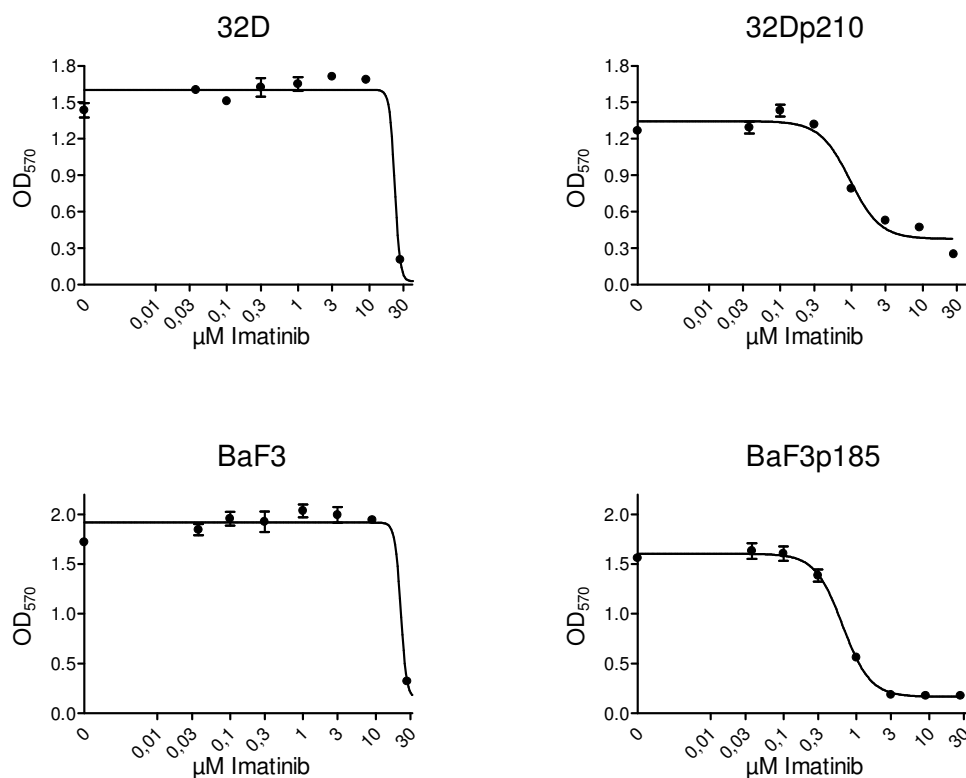


Abbildung 9: Einfluss von Imatinib auf die Viabilität Bcr-Abl-positiver und -negativer Zellen. Bcr-Abl-negative 32D- und BaF3-Zellen und Bcr-Abl-positive 32Dp210- und BaF3p185-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen Imatinib (0-30 μM) behandelt. Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay bestimmt und photometrisch bei einer optischen Dichte von 570 nm (OD₅₇₀) gemessen. Es handelt sich jeweils um die Mittelwerte (\pm SEM) von drei direkten Messungen (d.h. ohne auf die Mediumkontrolle zu korrigieren).

Um zu verifizieren, dass diese Konzentration ausreicht, um die Kinase-Aktivität von c-Abl in den verwendeten Zellsystemen effektiv zu hemmen, wurden die Zelllinien 32D und BaF3 mit unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen (0-3 μM) inkubiert und anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Durch die anschließende Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 3 μM für beide Zelllinien ausreichend ist, um die Tyrosinkinase-Aktivität von c-Abl vollständig zu hemmen (siehe Abb. 10A). Zum Nachweis, dass diese Konzentration auch zur Inhibition von c-Abl in primären humanen PBMC ausreichend ist, wurde ein c-Abl-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen die Tyr245-Phosphorylierungsstelle gerichtet ist, welche eine Autophosphorylierung des aktiven c-Abl repräsentiert. Auch hier konnte die Aktivierung von c-Abl durch Bestrahlung und die Inhibierung dieser Aktivität durch 3 μM Imatinib nachgewiesen werden (siehe Abb. 10B).

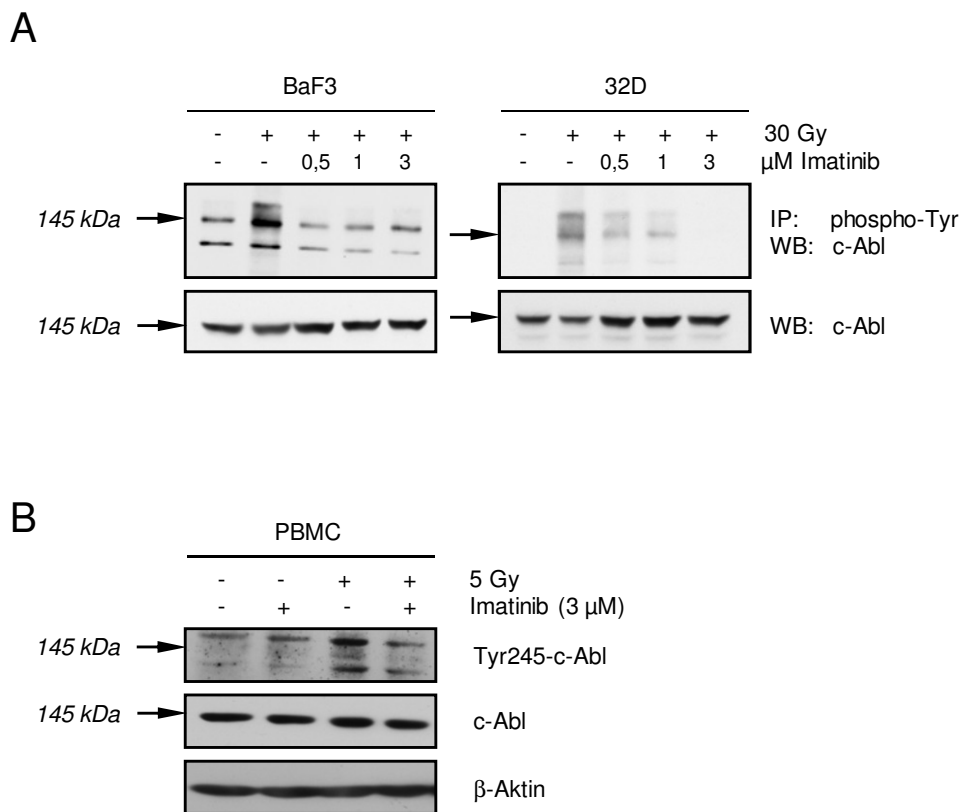


Abbildung 10: Feststellung der inhibitorisch wirksamen Imatinib-Konzentration. (A) 32D- und BaF3-Zellen wurden mit 0 – 3 μM Imatinib vorinkubiert, mit 30 Gy bestrahlt, 20 min später pelletiert, lysiert und mittels des Agarose-konjugierten Antikörpers P-Tyr-100, welcher gegen an Tyrosin-Resten phosphorylierte Proteine gerichtet ist, immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und c-Abl durch eine Western-Blot-Analyse detektiert. Zur Kontrolle wurde die c-Abl-Expression in Lysaten ohne IP untersucht. (B) PBMC wurden mit 3 μM Imatinib vorinkubiert, mit 5 Gy bestrahlt, nach 5 min pelletiert und die extrahierten Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt. c-Abl und die Autophosphorylierung von c-Abl wurden in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Als Beladungskontrolle des Polyacrylamidgels diente β -Aktin.

4.3 Imatinib-beeinflusste Mutationsfrequenz Bcr-Abl-negativer und -positiver Zellen

Um den Einfluss von Imatinib auf die genetische Stabilität festzustellen, wurde mittels des *hprt*-Assays die Mutationsfrequenz Bcr-Abl-positiver und -negativer Zellen untersucht, welche mit und ohne Imatinib inkubiert wurden. Wie bereits von unserer und anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, ist die Mutationsfrequenz in durch γ -Strahlung gestressten PBMC von CML-Patienten, d.h. in Bcr-Abl-positiven Zellen, verglichen mit Bcr-Abl-negativen Zellen, deutlich erhöht (Canitrot *et al.*, 1999; Salloukh & Laneuville, 2000; van der Kuip *et al.*, 2004). Dieser Effekt ist durch die Zugabe von Imatinib reversibel, jedoch senkt sich die Mutationsfrequenz dabei nicht bis auf das Level unbehandelter Bcr-Abl-negativer Zellen. Daher scheint nicht nur die Hemmung der Bcr-Abl-Aktivität durch Imatinib verantwortlich für die veränderte Mutationsfrequenz zu sein. Bcr-Abl-positiv Zellen exprimieren neben Bcr-Abl immer auch c-Abl. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit Imatinib die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen beeinflusst, welche nur c-Abl exprimieren.

Wie in Abb. 11 zu sehen, bewirkt Imatinib in Bcr-Abl-negativen Zellen eine Erhöhung der Mutationsfrequenz, also gegensätzlich dem Effekt, den Imatinib auf Bcr-Abl-positiv Zellen hat. Hier wird auch deutlich, dass das Mutationslevel Bcr-Abl-positiver Zellen unter Imatinib-Zugabe dem Level Bcr-Abl-negativer, Imatinib-behandelter Zellen entspricht. D.h. die Inhibition von Bcr-Abl reduziert die Mutationsfrequenz, während die Inhibition von c-Abl diese erhöht. Des Weiteren wurde die Mutationsfrequenz in Zellen untersucht, welche mit einer Imatinib-resistenten Bcr-Abl-Mutante transfiziert wurden (Bcr-Abl-positiv-T315I). Diese Zellen, die neben Imatinib-resistentem Bcr-Abl auch Imatinib-sensitives c-Abl exprimieren, zeigen in Anwesenheit von Imatinib eine signifikant erhöhte Mutationsfrequenz, welche auf die Hemmung der Imatinib-sensitiven c-Abl-Kinase zurückzuführen ist. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung der Bcr-Abl-Kinase zu einer Erhöhung der genetischen Stabilität führt, während die Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität diese vermindert (Abb. 11).

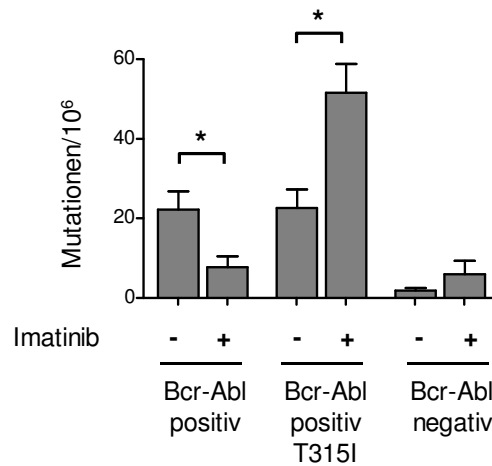


Abbildung 11: Die pharmakologische Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität beeinflusst die genetische Stabilität Bcr-Abl-positiver und -negativer Zellen. Die Zelllinien 32D (Bcr-Abl-negativ), 32Dp210 (Bcr-Abl-positiv) und 32Dp210-T315 (Bcr-Abl-positiv-T315I) wurden mit und ohne 3 μ M Imatinib für 10 Tage kultiviert und während dieses Zeitraumes dreimal mit 2 Gy bestrahlt. Nach der anschließenden Selektion durch 6-Thioguanin wurde die Mutationsfrequenz bestimmt. Pro Experiment wurden je Ansatz 12 wells ausgewertet. Die Werte reflektieren die Mittelwerte von je 6 Experimente \pm SEM.

Um zu verifizieren, dass die genetische Stabilität von der Aktivität der c-Abl-Kinase abhängig ist, wurde der *hprt*-Assay mit Zellen durchgeführt, die Kinase-defizientes c-Abl (MEF Abl-KD) exprimieren. Wie in Abb. 12 gezeigt, ist die Mutationsfrequenz in Zellen, denen die c-Abl-Kinaseaktivität fehlt, verglichen mit den Wildtyp-c-Abl-Zellen (MEF Abl-wt), signifikant erhöht.

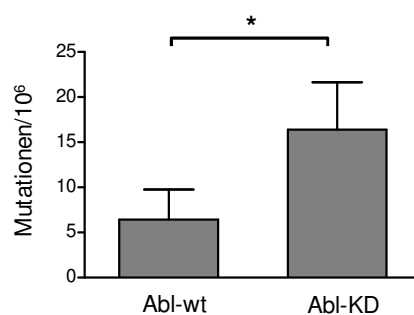


Abbildung 12: Die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen ist abhängig von der Kinase-Aktivität von c-Abl. Die Zelllinie MEF Abl-wt und die zugehörige c-Abl-Kinase-defiziente Linie MEF Abl-KD wurden für 10 Tage kultiviert und während dieses Zeitraumes dreimal mit 2 Gy bestrahlt. Nach der anschließenden Selektion durch 6-Thioguanin wurde die Mutationsfrequenz bestimmt. Pro Experiment wurden je Ansatz 12 wells ausgewertet. Die Werte reflektieren die Mittelwerte von je 6 Experimenten \pm SEM.

4.4 Einfluss von Imatinib auf die Proliferation und den Zelltod Bcr-Abl-negativer Zellen

Eine erhöhte Mutationsrate in Zellen kann unterschiedliche Ursachen haben. So können gestörte DNA-Reparaturmechanismen, Veränderungen der Proliferation, d.h. eine erhöhte Teilungsrate, Zellzyklusänderungen oder verzögerter Zelltod dazu führen, dass geschädigte DNA der Zellen nicht, bzw. inkorrekt repariert werden und die Schäden somit an die Tochterzellen weitergegeben werden. Daher wurden die Teilungsrate und die *Cloning Efficiency* (CE) in Bcr-Abl-negativen Zellen untersucht. Während die Teilungsrate angibt, wie oft sich eine Zellpopulation in einem bestimmten Zeitraum verdoppelt, ist die CE ein Maß für den Anteil einer Zellpopulation, der überhaupt teilungsfähig ist. Die Teilungsrate Imatinib-behandelter und -unbehandelter 32D- und BaF3-Zellen wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen bestimmt. Während dieses Zeitraumes wurden die Zellen dreimal mit 2 Gy bestrahlt. Wie Abb. 13 zeigt, hat Imatinib keinen Einfluss auf die Anzahl der Zellteilungen. Zur Feststellung der CE wurde mit denselben Zellen und zusätzlich mit MEF Abl-wt- und MEF Abl-KD-Zellen ein CE-Assay durchgeführt. Auch hier zeigt Imatinib in den 32D- und BaF3-Zellen keinen Einfluss. Auch die c-Abl-Kinase-Defizienz der MEF Abl-KD-Zellen beeinflusst die CE nicht.

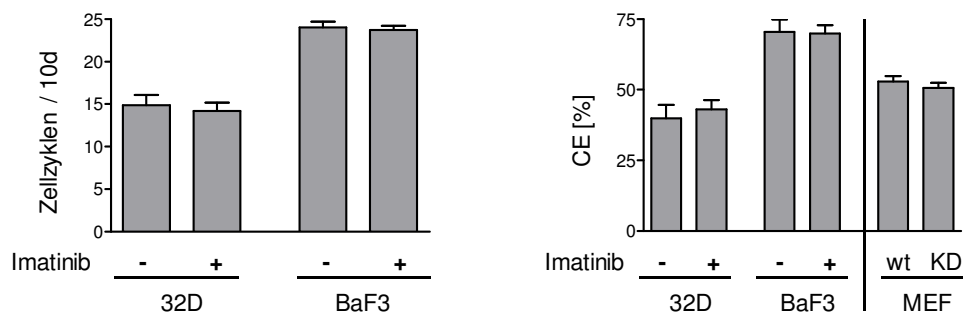


Abbildung 13: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf Teilungsrate und *Cloning Efficiency* (CE) Bcr-Abl-negativer Zellen. Zellen der Linien 32D, BaF3, MEF Abl-wt und MEF Abl-KD wurden über 10 Tage hinweg in An- oder Abwesenheit von 3 μ M Imatinib kultiviert und währenddessen dreimal mit 2 Gy bestrahlt. Zur Bestimmung der Zellteilungsrate der 32D- und BaF3-Zellen wurde alle 48 h die Zellzahl bestimmt und die Anzahl der Teilungen berechnet. Die Zellen wurden dann in semisolidem Medium mit einer Dichte von 200 Zellen pro *well* ausplattiert und für weitere 7 Tage inkubiert. Dann wurden Kolonien (> 50 Zellen) zur Bestimmung der CE gezählt. Die Werte zeigen die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 (BaF3) bzw. 6 (32D, MEF Abl-wt und MEF Abl-KD) unabhängigen Experimenten.

Um den Einfluss von Imatinib auf den Zelltod zu untersuchen, wurden die Bcr-Abl-negativen Zellen mit verschiedenen Dosen bestrahlt und der Anteil Annexin V-positiver, also toter Zellen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung gemessen. Abb. 14 zeigt exemplarisch für BaF3-Zellen, dass der Anteil Annexin V-positiver Zellen, 24 h nach Bestrahlung, abhängig von der Bestrahlungsdosis deutlich ansteigt, jedoch unabhängig ist von einer Imatinib-Behandlung der Zellen.

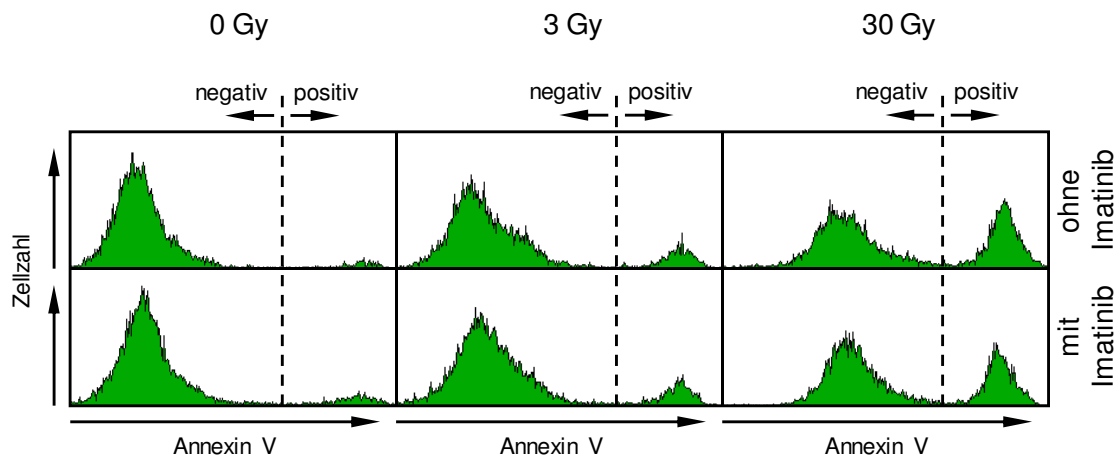


Abbildung 14: Zelltod wird in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis induziert, jedoch unabhängig von Imatinib. Zellen der Linie BaF3 wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib vorinkubiert, mit 0-30 Gy bestrahlt und der Anteil der Annexin V-positiven Zellen nach 24 h durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildungen zeigen Einzelmessungen, welche repräsentativ für Triplikate stehen.

Für Abb.15 wurden die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente mit 32D- und BaF3-Zellen gepoolt. Auch hier zeigt sich die Induktion von Zelltod in Abhängigkeit von der Dosis der Bestrahlung. So sind nach einer Dosis von 30 Gy 24 h später ca. ein Viertel der Zellen, nach zwei Tagen über die Hälfte und nach drei Tagen fast alle Zellen Annexin V-positiv. Im Gegensatz dazu führen 3 Gy nicht zum Zelltod der kompletten Population. Hier erfolgt eine Induktion Annexin V-positiver Zellen bis 48 h nach Bestrahlung, die 72 h später jedoch wieder zurückgeht. Imatinib zeigt in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Induktion des Zelltods bzw. den Anteil Annexin V-positiver Zellen einer Zellpopulation nach DNA-Stress.

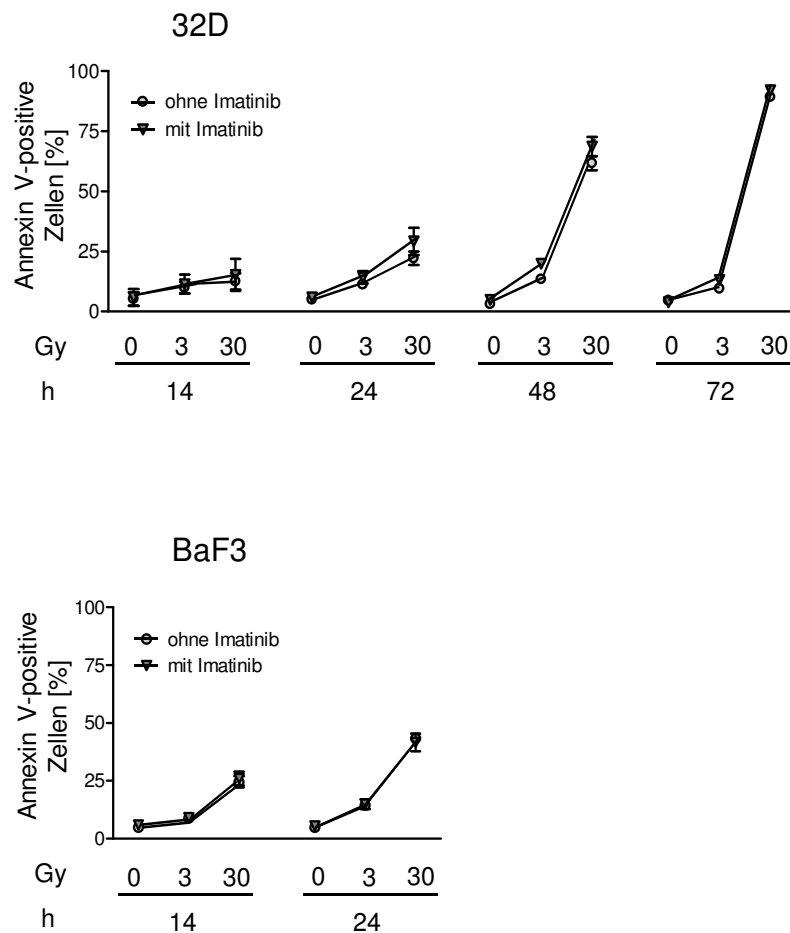


Abbildung 15: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf den Zelltod Bcr-Abl-negativer Zellen. Zellen der Linien 32D und BaF3 wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib kultiviert, mit 0-30 Gy bestrahlt und der Anteil der Annexin V-positiven Zellen zu den angezeigten Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte stehen für drei (32D: 48 h, 32D: 72 h, BaF3: 24 h), vier (32D: 14 h, BaF3: 14 h) bzw. acht (32D: 24 h) unabhängige Experimente \pm SEM.

Zur Feststellung, wie viele Zellen einer festgelegten Population sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in welchem Stadium des Zellzyklus befinden, wurden 32D- und BaF3-Zellen mit und ohne Imatinib kultiviert und 24 h nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen mit Propidiumjodid gefärbt, um den DNA-Gehalt zu bestimmen. Parallel wurde von den Zellen für 30 min inkorporiertes BrdU im Durchflusszytometer detektiert. Wie in Abb. 16 exemplarisch für BaF3-Zellen gezeigt, befinden sich BrdU-positive Zellen in der S-Phase. In der G₁-Phase weisen die Zellen einen DNA-Gehalt von 2n auf, in der G₂-Phase einen von 4n. Ein DNA-Gehalt unter 2n (subG₁) zeigt degradierte bzw. tote Zellen. Während in den unbestrahlten Zellen die charakteristische Verteilung einer Zellpopulation in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus zu sehen

ist, wird 24 h nach einer Dosis von 3 Gy eine leichte Verschiebung Richtung G_1 und ein höherer Anteil an $subG_1$ -Zellen ersichtlich. 24 h nach Bestrahlung mit 10 Gy befinden sich deutlich weniger Zellen in der S-Phase, der Anteil an $subG_1$ -Zellen und Zellen, die aus G_1 und G_2 heraus degradieren, ist stark erhöht. Wurde mit 30 Gy bestrahlt, befinden sich die Zellen ausschließlich im G_2 -Arrest oder sind degradiert bzw. tot. Imatinib zeigt keine Beeinflussung auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus.

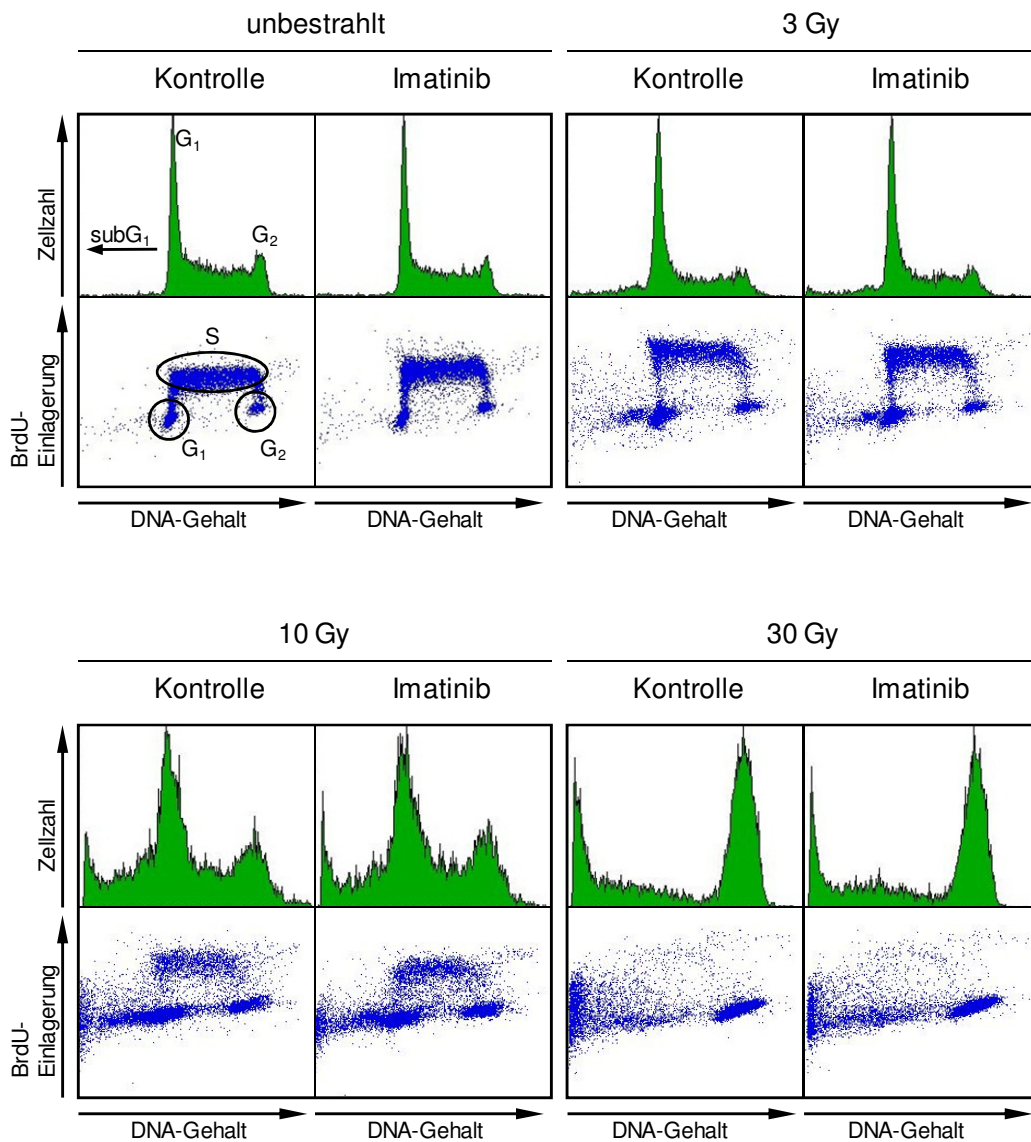


Abbildung 16: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in BaF3-Zellen. BaF3-Zellen wurden für 48 h mit 3 μ M Imatinib vorinkubiert, dann mit 0-30 Gy bestrahlt und 24 h später wurde für 30 min BrdU zugegeben. Anschließend wurde die DNA mit Propidiumjodid markiert und die Zellen mittels Durchflusszytometer analysiert. Die einzelnen Dot-Plots und Histogramme stehen exemplarisch für drei unabhängige Experimente.

Die Zellzyklus-Analyse wurde für die beiden Zelllinien 32D und BaF3 jeweils drei Mal durchgeführt. Die Anteile der Zellpopulation, die sich jeweils in der G₁-, G₂- bzw. S-Phase befanden wurden bestimmt und in Abb. 17 gepoolt. Zellen in subG₁ wurden nicht ausgewertet, da hier nicht nur tote Zellen, sondern auch Zellbruchstücke angezeigt werden, und somit nur eine unzureichende Aussage über den Anteil toter Zellen geliefert wird. Zur Bestimmung des Zelltod-Anteils ist die vorab beschriebene und durchgeführte Annexin V-Analyse weitaus geeigneter. Beide Zelllinien zeigen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen einen erhöhten Anteil in der G₁-Phase nachdem mit 3 Gy bestrahlt wurde. Dieser Anteil nimmt jedoch mit steigender Strahlendosis ab. Abhängig von der Bestrahlungsdosis steigt der Anteil der Zellen, die in G₂-Arrest gehen, während der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, abnimmt. Auch hier wird deutlich, dass die Zellzyklusverteilung einer Bcr-Abl-negativen Zellpopulation nicht von Imatinib abhängig ist.

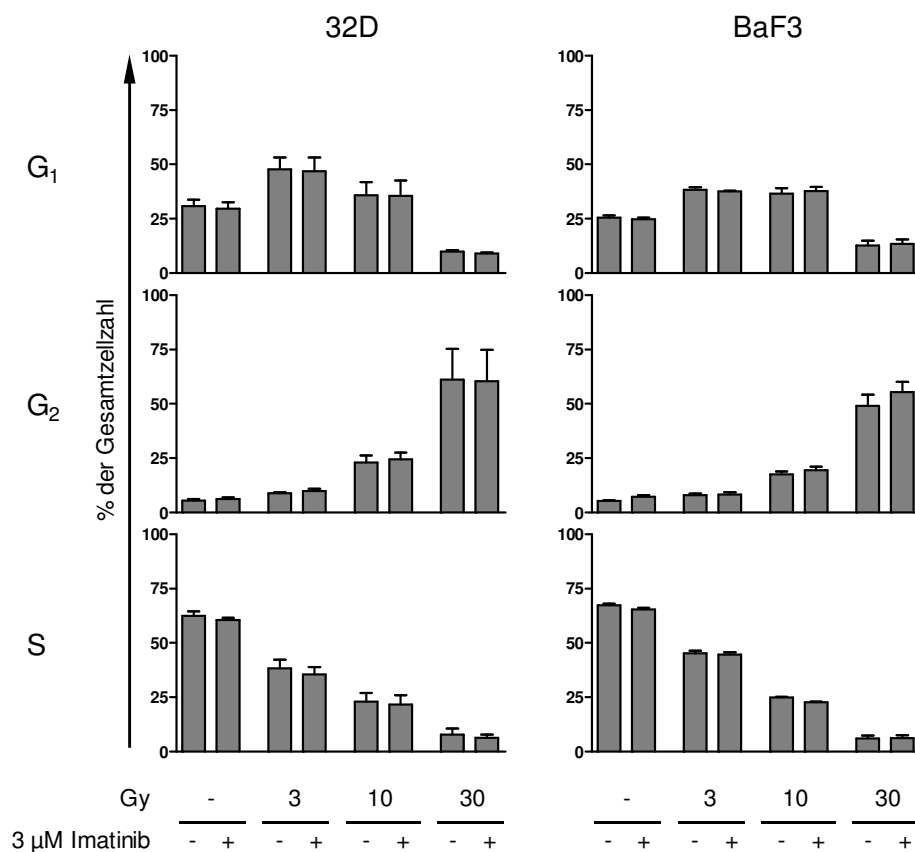


Abbildung 17: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung Bcr-Abl-negativer Zellen. 32D- und BaF3-Zellen wurden für 48 h mit 3 μM Imatinib vorinkubiert, mit 0-30 Gy bestrahlt und 24 h später für 30 min mit BrdU gepulst. Die DNA wurde mit Propidiumjodid markiert und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Werte spiegeln die Mittelwerte von unabhängigen Triplikaten ± SEM wieder.

4.5 Funktionelle Auswirkungen von Imatinib auf die DNA-Schadens-Reparatur Bcr-Abl-negativer Zellen

Da ein Einfluss der gehemmten Kinaseaktivität von c-Abl durch Imatinib auf die zeitliche Begrenzung der DNA-Reparatur, also auf Proliferation und Zelltod, ausgeschlossen werden konnte, wurden im Folgenden die direkte Wirkung von Imatinib bzw. der Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität auf die DNA-Reparatur untersucht. Hierfür wurde in unterschiedlichen Zellsystemen mit unterschiedlichen Dosen γ -Strahlung DNA-Strangbrüche induziert. Die Abhängigkeit der DNA-Reparatur von der Aktivität der c-Abl-Kinase wurde in alkalischen und neutralen Comet-Assays gezeigt.

4.5.1 Imatinib führt zu einer Verzögerung der Reparatur der durch γ -Strahlung induzierten DNA-Strangbrüche

Die murinen Zelllinien 32D und BaF3 und hämatopoetische humane Zellen (PBMC) gesunder Probanden wurden mit und ohne Imatinib für 48 h kultiviert, anschließend mit 30 Gy (*high dose*) bestrahlt und die Kinetik der DNA-Strangbruchreparatur unter Verwendung des alkalischen Comet-Assays analysiert. Zwar zeigt Imatinib keinen Einfluss auf die Induktion von Strangbrüchen (siehe Abb. 18A/B, 0 min-Zeitpunkte) oder auf konstitutive DNA-Strangbrüche vor der Bestrahlung (hier nicht gezeigt), jedoch bewirkt die Vorbehandlung mit Imatinib sowohl in den Zelllinien als auch in den primären Zellen eine signifikante Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur (Abb. 18A).

Gleichzeitig wird hier die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Zellen gegenüber γ -Strahlung deutlich: während direkt nach Bestrahlung (Zeitpunkt 0 min) die DNA der PBMC praktisch komplett fragmentiert ist, tritt bei den deutlich unempfindlicheren Zelllinien nur etwas weniger (BaF3) bzw. mehr (32D) als 50 % der DNA aus dem Kern aus. Dies ist auch deutlich an den längeren Schweifen, d.h. an der vermehrt aus dem Kern ausgetretenen DNA in Abb. 18B (Zeitpunkt 0 min) zu erkennen.

Auch die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Strangbruch-Reparatur unterscheiden sich insofern, dass die Zellen der Linien BaF3 und 32D unbehandelt nach zwei Stunden fast alle Strangbrüche repariert haben, während dies in den PBMC erst für knapp drei Viertel der Strangbrüche der Fall ist (Abb. 18A/B, Zeitpunkt 120 min), ein Level, welches auch nach vier Stunden nicht weiter gesenkt wird. Eine Stunde nach Bestrahlung sind die DNA-Strangbrüche in den

beiden Zelllinien unbehandelt fast zu drei Vierteln repariert, Imatinib-behandelt ca. zur Hälfte. In den PBMC sind zu diesem Zeitpunkt ohne Imatinib-Behandlung erst die Hälfte, mit Imatinib-Behandlung nur ein Viertel der Strangbrüche repariert.

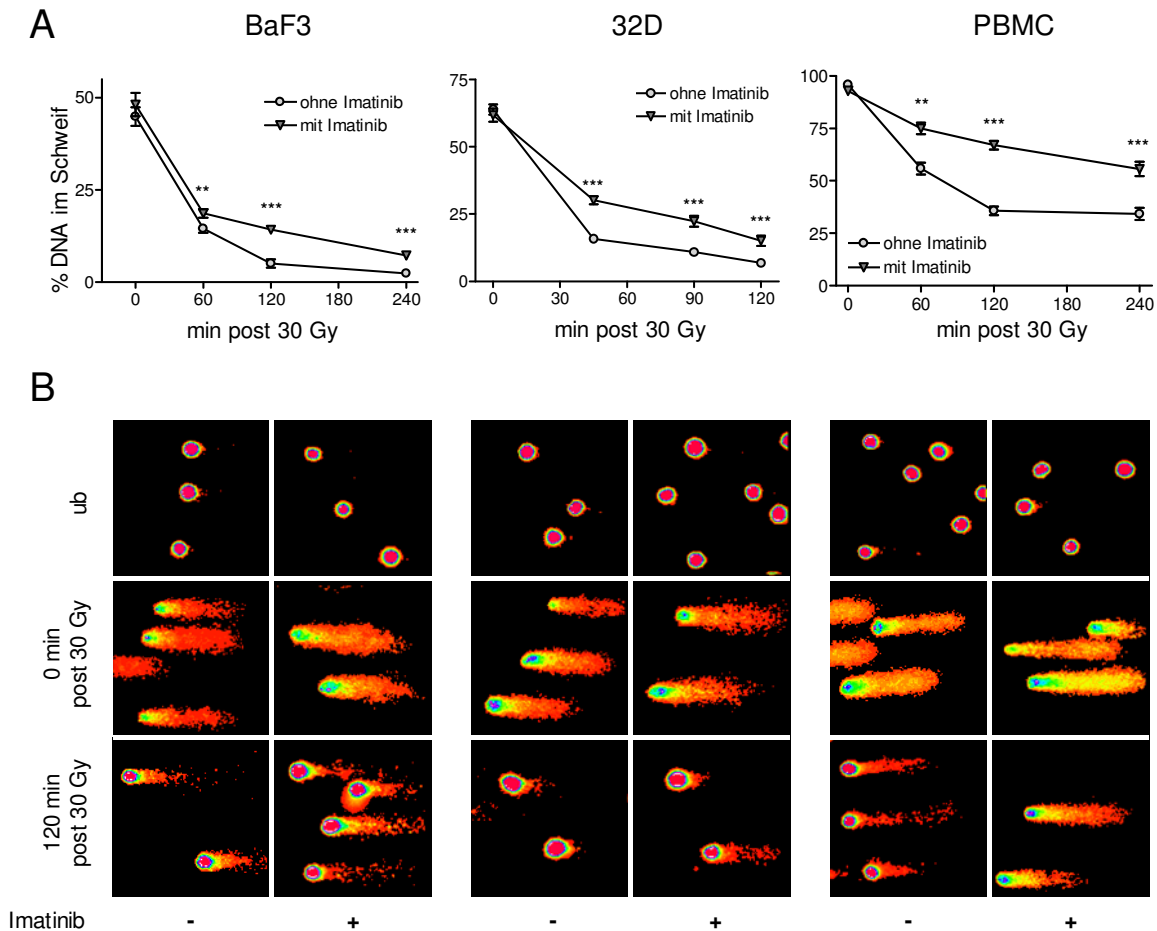


Abbildung 18: Imatinib führt zu einer Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur in mit 30 Gy (high dose) bestrahlten Zellen. 32D-, BaF3-Zellen und PBMC wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib kultiviert, mit 30 Gy bestrahlt (außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (A) Nach Durchführung des alkalischen Comet-Assays wurden die Zellen ausgewertet und der Anteil der DNA in den Schweifen als Maß für DNA-Strangbrüche bestimmt. Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen gepoolten Experimenten (** p -Wert < 0,01, *** p -Wert < 0,001, ungepaarter Student's t -Test). (B) Exemplarische Abbildungen der verschiedenen Zelllinien, jeweils unbestrahlt (ub), 0 min und 120 min nach Bestrahlung. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit der CometScoreTM Freeware in Falschfarben zur Verdeutlichung der Fluoreszenzintensität dargestellt.

Um festzustellen, ob diese Effekte nur bei extremer DNA-Schädigung durch *high dose* γ -Strahlung auftreten, wurden die Comet-Assays unter gleichen Bedingungen durchgeführt, jedoch die Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von nur 3 bzw. 5 Gy (*low dose*) gestresst. Wie

Abb. 19A zeigt, konnte auch hier eine signifikante Verzögerung der Strangbruchreparatur unter Einfluss von Imatinib nachgewiesen werden. Wie bei der Bestrahlung mit *high dose* hatte Imatinib auch hier keinen Einfluss auf konstitutive Brüche vor Bestrahlung (Abb. 19B, unbestrahlt [ub]) und auch nicht auf die Induktion direkt nach Bestrahlung (Abb. 19A/B, Zeitpunkt 0 min). Ebenso wie bei der *high dose*-Bestrahlung zeigen auch bei *low dose*-Bestrahlung die 32D-Zellen mit 20 % DNA-Verlust aus dem Kern eine höhere Sensitivität direkt nach Bestrahlung, als die BaF3-Zellen mit 10 %. Unbehandelt ist die DNA der beiden Zelllinien bereits nach 30 min fast vollständig repariert, Imatinib-behandelt nach 45 min (32D) bzw. 60 min (BaF3).

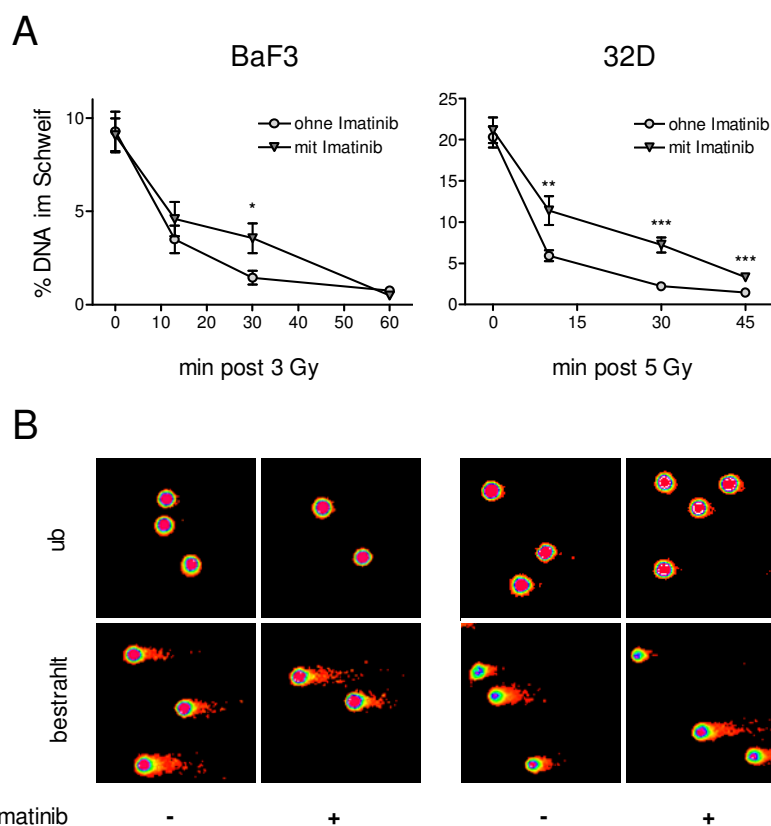


Abbildung 19: Imatinib verzögert die DNA-Strangbruchreparatur in mit 3-5 Gy (*low dose*) bestrahlten Zellen. 32D- und BaF3-Zellen wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib kultiviert, mit 3 Gy (BaF3) bzw. 5 Gy (32D) bestrahlt (außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (A) Nach Durchführung des alkalischen Comet-Assays wurden die Zellen ausgewertet und der Anteil der DNA in den Schweifen als Maß für DNA-Strangbrüche bestimmt. Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM der einzelnen ausgewerteten Zellen eines Experiments (* *p*-Wert < 0,05, ** *p*-Wert < 0,01, *** *p*-Wert < 0,001, ungepaarter Student's *t*-Test). (B) Exemplarische Abbildungen der verschiedenen Zelllinien, jeweils unbestrahlt (ub), 0 min und 120 min nach Bestrahlung. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit der CometScore™ Freeware in Falschfarben zur Verdeutlichung der Fluoreszenzintensität dargestellt.

4.5.2 Die DNA-Strangbruchreparatur ist auch nach Dasatinib-Behandlung verzögert

Als nächstes wurde untersucht, ob diese Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur ein von Imatinib abhängiges Phänomen ist oder auch mit einem anderen c-Abl-Inhibitor gezeigt werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Versuche auf dieselbe Weise erneut durchgeführt, mit dem Unterschied, dass für 48 h mit 10 nM Dasatinib inkubiert wurde. Wie Abb. 20 zeigt, führt die Hemmung der c-Abl-Tyrosinkinase durch Dasatinib zu einer vergleichbaren signifikanten Verzögerung der Reparatur der DNA-Strangbrüche.

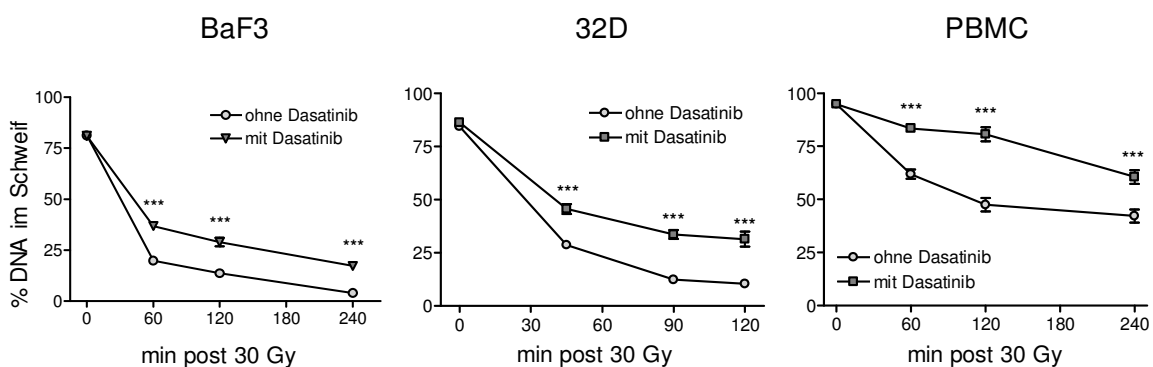


Abbildung 20: Die Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur in mit 30 Gy (*high dose*) bestrahlten Zellen kann auch nach Dasatinib-Behandlung beobachtet werden. 32D-, BaF3-Zellen und PBMC wurden für 48 h mit und ohne 10 nM Dasatinib kultiviert, mit 30 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Nach Durchführung des alkalischen Comet-Assays wurden die Zellen ausgewertet und der Anteil der DNA in den Schweifen als Maß für DNA-Strangbrüche bestimmt. Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen gepoolten Experimenten (** p -Wert $< 0,01$, *** p -Wert $< 0,001$, ungepaarter Student's t -Test).

4.5.3 Die Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur ist abhängig von der c-Abl-Tyrosinkinaseaktivität

Da sowohl Imatinib als auch Dasatinib nicht nur c-Abl inhibieren, sondern auch andere Substrate wie c-Kit, PDGFR und ARG, wurde nun betrachtet, ob die Reparatur-Verzögerung tatsächlich ausschließlich von der Kinase-Aktivität von c-Abl abhängt. Um dies zu untersuchen, wurde der Comet-Assay, wie bereits beschrieben, mit MEF Abl-wt- und MEF Abl-KD-Zellen durchgeführt. Wie in Abb. 21A zu sehen ist, reicht die Inaktivität der c-Abl-Kinase, um die DNA-Strangbruchreparatur signifikant zu verzögern. Wie in den PBMC und den Zelllinien 32D und

BaF3 hat Imatinib keinen Einfluss auf konstitutive Strangbrüche vor Bestrahlung und die Induktion der Strangbrüche nach Bestrahlung hat, so hat auch die Defizienz der Kinase von c-Abl weder einen Einfluss auf konstitutive Strangbrüche (hier nicht gezeigt) noch auf die Strangbruch-Induktion durch Bestrahlung (Abb. 21A, Zeitpunkt 0 min). Ebenso wie die beiden Zelllinien haben auch die MEF-Zellen nach zwei Stunden unbehandelt nahezu alle DNA-Strangbrüche repariert. Um endgültig einen von der Hemmung der Abl-Kinase unabhängigen Effekt von Imatinib auszuschließen, wurde des Weiteren die Reparatur-Kinetik in der Imatinib-resistenten Zelllinie 32D Abl-T315I betrachtet. Abb. 21B zeigt zweifelsfrei, dass ein Einfluss von Imatinib, wenn die c-Abl-Kinase nicht gehemmt werden kann, nicht gegeben ist. Induktion von Strangbrüchen und Kurvenverlauf der Strangbruchreparatur der transfizierten 32D Abl-T315I-Zellen entsprechen sowohl mit als auch ohne Imatinib-Behandlung der Induktion und dem Verlauf der nicht-transfizierten 32D-Zellen (Abb. 18, ohne Imatinib bzw. Abb. 20, ohne Dasatinib) Somit ist erwiesen, dass die Verzögerung der Reparatur der DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung abhängig ist von der Kinase-Aktivität von c-Abl.

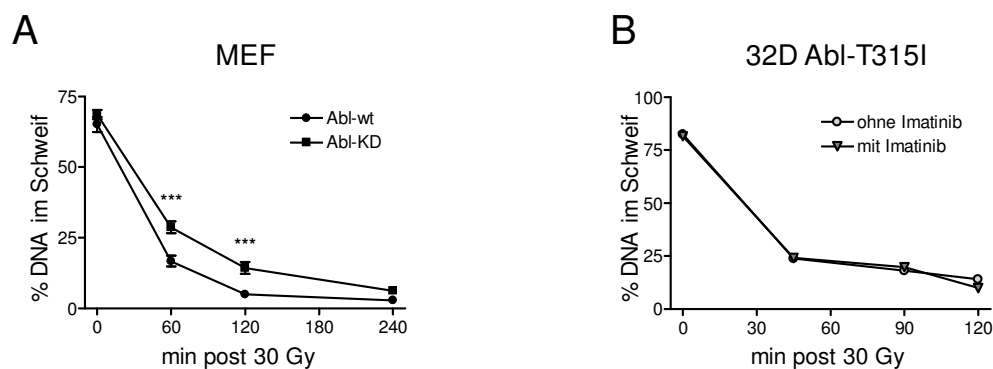


Abbildung 21: Die Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur ist nicht Substanzabhängig, sondern abhängig von der Inhibition der c-Abl-Kinaseaktivität. (A) MEF Abl-wt-, MEF Abl-KD wurden mit 30 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (B) 32D Abl-T315I-Zellen wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib kultiviert, dann mit 30 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (A+B) Nach Durchführung des alkalischen Comet-Assays wurden die Zellen ausgewertet und der Anteil der DNA in den Schweifen als Maß für DNA-Strangbrüche bestimmt. Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen gepoolten Experimenten (***) p -Wert < 0,001, ungepaarter Student's t -Test).

4.5.4 Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist von Imatinib unbeeinflusst

Da mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays durch die Denaturierung der DNA sowohl Einzelstrangbrüche (SSB) als auch Doppelstrangbrüche (DSB) detektiert werden, stellte sich nun die Frage, ob es sich bei den verzögert reparierten Strangbrüchen um SSB, DSB oder um eine Reparaturverzögerung beider Strangbrucharten handelt.

Um die Reparatur von DSB zu analysieren, wurde der Comet-Assay unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Dadurch unterbleibt eine Denaturierung der DNA, wodurch ausschließlich DSB detektiert werden können. In 32D-Zellen und PBMC werden DSB deutlich durch γ -Strahlung induziert (Abb. 22B), jedoch zeigt sich weder bei der Induktion noch bei der Reparatur der DSB ein Einfluss von Imatinib (Abb. 22A).

Wie bereits im alkalischen Comet, konnte auch hier eine erhöhte Sensitivität der PMBC gegen Bestrahlung festgestellt werden: verglichen mit den 32D-Zellen, welche direkt nach Bestrahlung einen Anteil von 25 % fragmentierter DNA aufweisen, befinden sich bei den PBMC zu diesem Zeitpunkt knapp 50 % DNA im Schweif (Abb. 22A, Zeitpunkt 0 min). In beiden Zelltypen wird des Weiteren ersichtlich, dass die Reparatur der DSB im neutralen Comet-Assay deutlich langsamer abläuft, als die Reparatur der Gesamtheit der Strangbrüche im alkalischen Comet-Assay. So sind nach vier (PBMC) bzw. zwei Stunden (32D) kaum ein Viertel der DSB repariert. D.h. die Verzögerung der Strangbruchreparatur, die unter Imatinib-Behandlung mit dem alkalischen Comet-Assay beobachtet werden konnte, ist wohl nur auf die Reparatur der SSB zurückzuführen und involviert nicht die DSB-Reparatur.

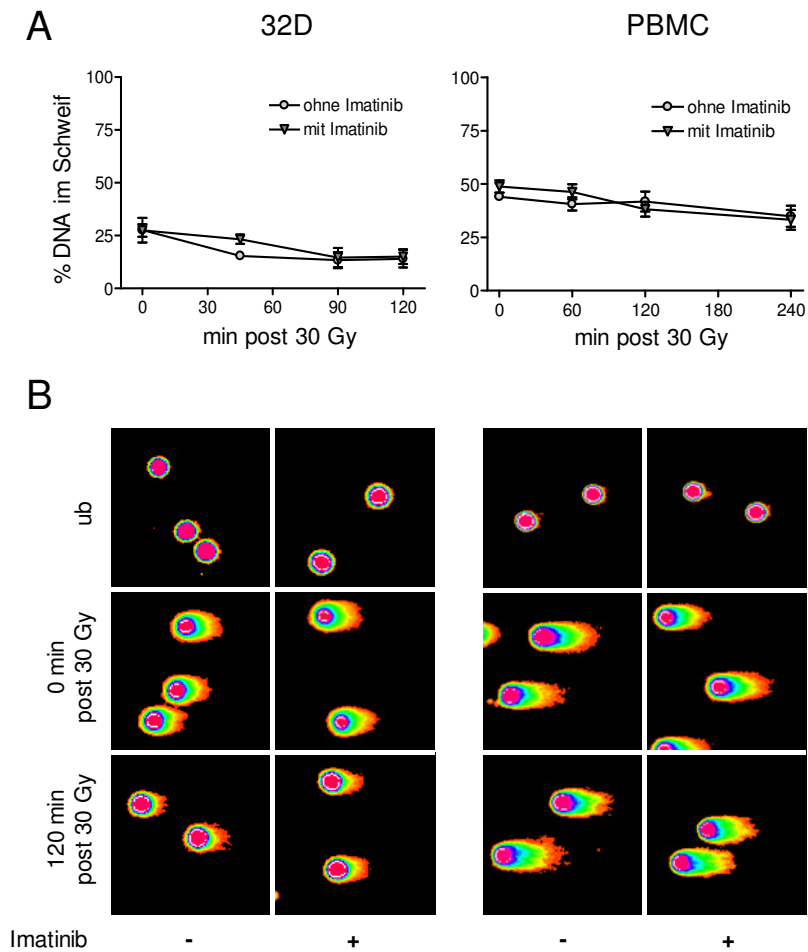


Abbildung 22: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur im neutralen Comet-Assay. 32D-Zellen und PBMC wurden für 48 h mit und ohne 3 μ M Imatinib kultiviert, dann mit 30 Gy bestrahlt (außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. (A) Nach Durchführung des neutralen Comet-Assays wurden die Zellen ausgewertet und der Anteil der DNA in den Schweifen als Maß für DNA-Strangbrüche bestimmt. Pro Ansatz wurden mindestens 50 Zellen ausgewertet. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM von drei (32D) bzw. fünf (PBMC) unabhängigen gepoolten Experimenten. (B) Exemplarische Abbildungen der verschiedenen Zelllinien, jeweils unbestrahlt (ub) und 0 min nach Bestrahlung. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit der *CometScoreTMFreeware* in Falschfarben zur Verdeutlichung der Fluoreszenzintensität dargestellt.

Als weitere Methode, DSB und ihre Reparaturkinetik zu detektieren, wurde die Pulsfeld-Gel-elektrophorese (PFGE) eingesetzt. Das Prinzip ist ähnlich dem des Comet-Assays, jedoch werden hier nicht einzelne Zellen und ihre DNA-Bruchstück-Schweife betrachtet, sondern der „Gesamtschweif“ fast einer Millionen Zellen auf einmal. Das Maß für die Anzahl der DNA-Bruchstücke wird in ‚fraction of activity released‘ (FAR) angegeben. Die PFGE wurde mit BaF3-Zellen durchgeführt.

Wie in Abb. 23A zu sehen, zeigt sich auch hier eine deutliche Induktion der DSB durch Bestrahlung, jedoch ist im Verlauf der Reparatur kein Einfluss von Imatinib zu erkennen (Abb. 23B). Es stellt sich zudem die Frage, ob diese Methode zum Nachweis einer Reparatur-Kinetik wirklich geeignet ist, da die Werte eine sehr hohe Streuung aufweisen.

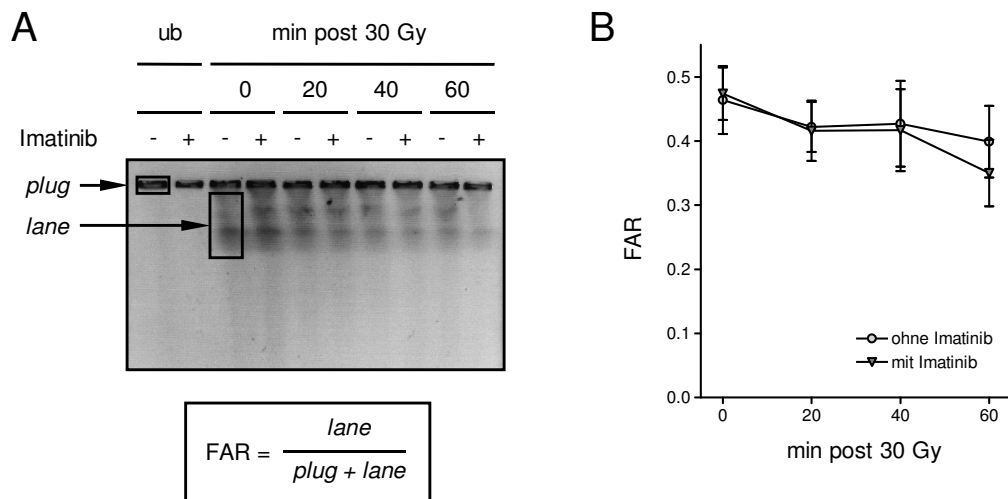


Abbildung 23: Imatinib zeigt keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur in der PFGE. BaF3-Zellen wurden 48 h mit und ohne 3 µM Imatinib kultiviert, anschließend mit 30 Gy bestrahlt (außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]) und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. (A) zeigt die exemplarische Aufnahme eine Ethidiumbromid-gefärbten Gels. (B) Nach der PFGE wurde für jeden Ansatz die FAR als Maß für die Anzahl der DSB bestimmt. Die Werte stehen für die Mittelwerte ± SEM von sechs unabhängigen gepoolten Experimenten.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Methoden wurde noch eine dritte Methode zum Nachweis von DSB herangezogen: da das Histon H2AX ausschließlich an DSB an Ser139 phosphoryliert wird (γ -H2AX), ist dessen Detektion über spezifische Antikörper bestens zur Analyse von DSB und deren Lokalisation geeignet (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999).

Wie in der Immunfluoreszenzfärbung in Abb. 24A zu sehen ist, wird γ -H2AX erwartungsgemäß stark durch γ -Strahlung induziert und ist, Histon-charakteristisch, im Kern lokalisiert. Schon nach 30 min ist eine deutliche Abnahme der γ -H2AX-Foci zu erkennen. Bis zum Zeitpunkt 90 min nach Bestrahlung sind immer noch H2AX-Histone phosphoryliert. Eine durchflusszytometrische Bestimmung von γ -H2AX in 32D-Zellen und PBMC, die mit und ohne Imatinib kultiviert wurden, zeigt ebenfalls die Induktion von γ -H2AX durch Bestrahlung, jedoch keine Abhängigkeit der DSB-Reparatur von Imatinib. Abb. 24B zeigt exemplarisch für die 32D-Zellen die γ -H2AX-Induktion durch Bestrahlung und dessen Abnahme, d.h. die Reparatur der DSB, als *Shift* der *Peaks* nach links. Abb. 24C zeigt die zugehörigen gepoolten Messungen dreier unabhängiger Versuche und verdeutlicht die extrem langsame Reparatur: wie bereits im neutralen Comet-Assay gezeigt werden konnte, wird auch hier nach zwei Stunden nur ein Teil der DSB repariert. Die Induktion von γ -H2AX wurde in PBMC nach *low dose*-Bestrahlung (5 Gy) betrachtet und auch hier ist bis zu einem Zeitraum von 45 min keine Abhängigkeit von Imatinib festzustellen (Abb. 24D).

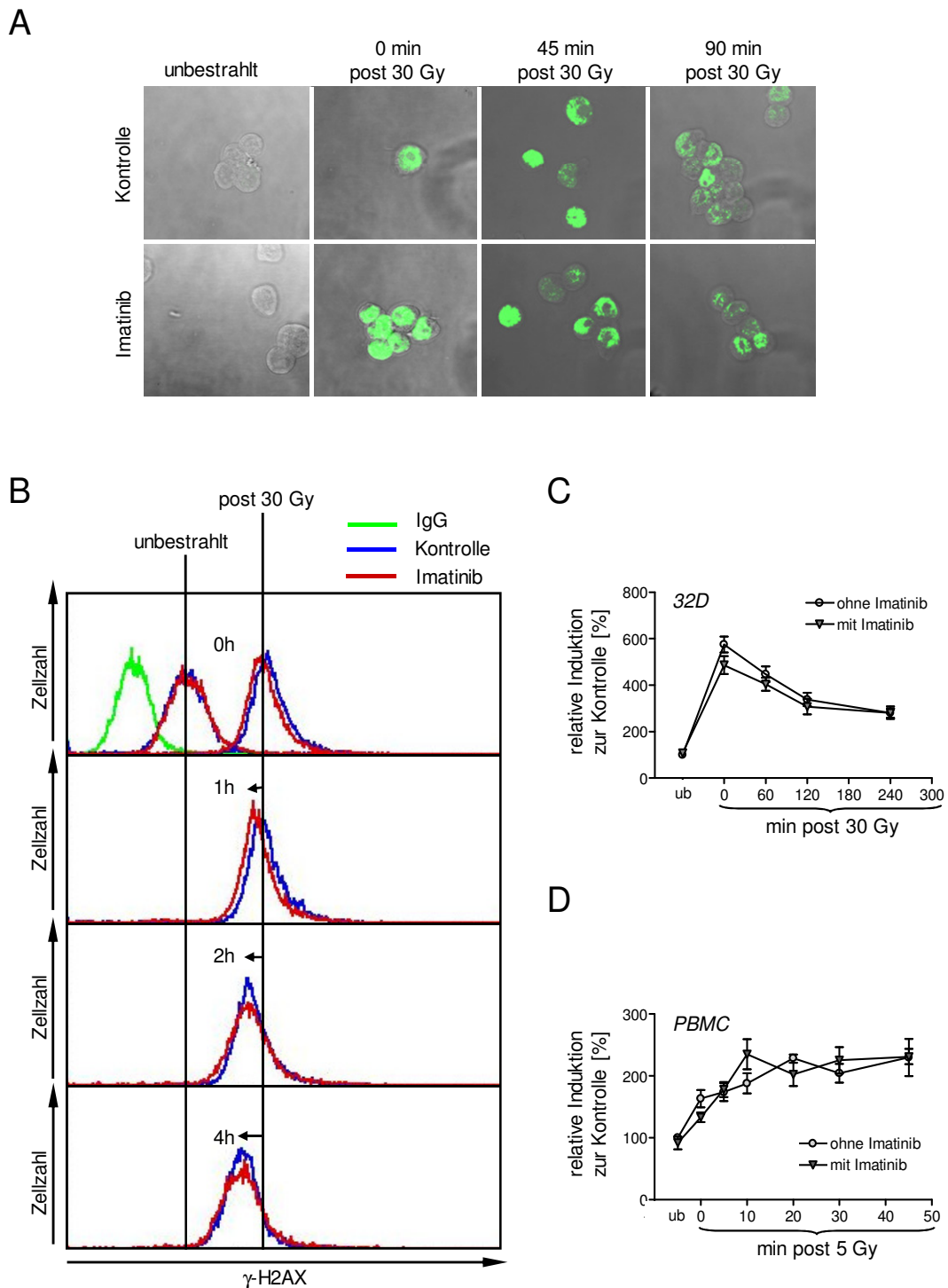


Abbildung 24: Die Induktion und Reparatur von DSB, detektiert über γ -H2AX ist unabhängig von Imatinib.

Die Zellen wurden mit und ohne Imatinib kultiviert, mit 5 bzw. 30 Gy bestrahlt, zu entsprechenden Zeitpunkten fixiert und mit fluoreszenz-markiertem γ -H2AX-Antikörper inkubiert. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 32D-Zellen nach Bestrahlung (30 Gy). (B) Exemplarische Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von γ -H2AX in 32D-Zellen nach Bestrahlung (30 Gy). (C) Durchflusszytometrische Bestimmung von γ -H2AX in 32D nach 30 Gy. Die Werte (relativ zur unbestrahlten [ub] Kontrolle) stehen für die Mittelwerte \pm SEM unabhängiger Triplikate. (D) Durchflusszytometrische Detektion von γ -H2AX in PBMC nach 5 Gy Bestrahlung. Die Werte stehen für die Mittelwerte \pm SEM fünf unabhängiger Experimente.

4.6 Einfluss von Imatinib auf verschiedene DNA-Reparatur-Signalwege

Im Folgenden wurden verschiedene DNA-Reparatur- und DNA-Stress-Antwort-Signalwege untersucht, um die molekulare Auswirkung der c-Abl-Inhibition durch Imatinib in Bezug auf mögliche Interaktionspartner, welche in die Reparatur von Strangbrüchen involviert sind, festzustellen.

4.6.1 Kein Einfluss von Imatinib auf die ATM/Chk2- und ATR/Chk1-Signalwege

Wie bereits in 4.4 gezeigt, gehen die Zellen nach Bestrahlung zur Reparatur in den G₁- bzw. G₂-Arrest (Abb. 17), werden dabei jedoch nicht von Imatinib beeinflusst. Diese Beobachtung wurde im Folgenden durch molekulare Untersuchungen der ATM/Chk2- und ATR/Chk1-Signalwege bestätigt. Wie bereits in 2.3.4 beschrieben, werden je nach Art der DNA-Schädigung die Kinasen ATM und ATR induziert, welche dann über die Aktivierung ihrer Effektorinasen Chk2 und Chk1 den Zellzyklus während der DNA-Reparatur kontrollieren.

Hierfür wurden primäre mononukleäre Zellen (PBMC) mit und ohne Imatinib kultiviert und mit 5 Gy bestrahlt. Für die Western-Blot-Analyse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die Signalproteine und ihre Aktivität bzw. die Aktivität ihrer *downstream*-Zielstrukturen ermittelt. Abb. 25 stellt die Untersuchung des hauptsächlich durch DSB aktivierten ATM-Chk2-Signalwegs dar. Es zeigt sich deutlich, dass direkt nach Bestrahlung ATM aktiviert, d.h. an Ser1981 phosphoryliert ist. Zeitgleich erfolgt die Aktivierung von Chk2 zu Thr387-Chk2, wobei hier die Phosphorylierung bereits nach 5 min deutlich abnimmt, die Dephosphorylierung bis zum Zeitpunkt 45 min nach Bestrahlung jedoch nicht vollständig stattgefunden hat. Dies wird auch anhand der gepoolten Werte der densitometrischen Auswertung mehrerer Experimente ersichtlich (Abb. 25B+C). Hier wird auch deutlich, dass die Aktivität von Chk2, nachdem sie ihr Maximum direkt nach Bestrahlung erreicht, gleich wieder abnimmt, während die ATM-Aktivität erst nach 10 min maximal ist und dieses Level auch bis 45 min nach Induktion der DNA-Schädigung hält (Abb. 25B). Diese Beobachtung steht analog zur ATM-induzierten Aktivität von H2AX: auch hier erreicht das Level an γ -H2AX sein Maximum erst nach 10 min (Abb. 24D), um sich dort bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt zu halten. Alle Ereignisse zeigen allerdings keine Abhängigkeit von Imatinib.

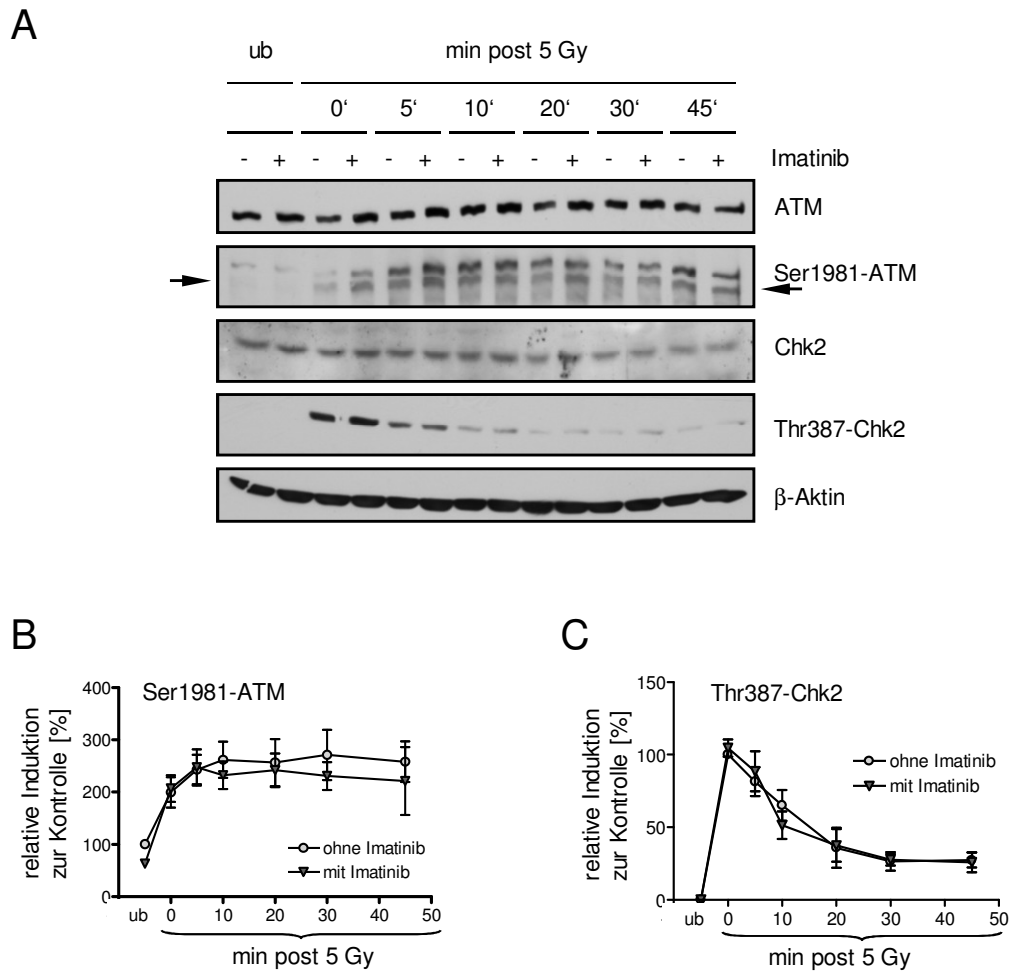


Abbildung 25: Imatinib hat keinen Einfluss auf den ATM-Chk2-Signalweg. PBMC wurden mit und ohne 3 μ M Imatinib 48 h kultiviert, mit 5 Gy bestrahlt, nach entsprechenden Zeitpunkten auf Eis gestellt, pelletiert und die extrahierten Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt. ATM, Chk2 und deren funktionelle Phosphorylierungen wurden in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen. (A) zeigt exemplarisch für fünf unabhängige Experimente die Western-Blots. Als Beladungskontrolle des Polyacrylamidgels diente β -Aktin. Für (B) und (C) wurden die Blots der phosphorylierten Proteine Ser1981-ATM (B) und Thr387-Chk2 (C) densitometrisch ausgewertet und die Werte gepoolt. Die Induktionswerte (relativ zur unbestrahlten [ub] Kontrolle) stehen für die Mittelwerte \pm SEM von fünf (B) bzw. sieben (C) unabhängigen Experimenten.

Ebenso zeigt auch die Untersuchung des ATR-Chk1-Signalwegs, welcher vor allem durch SSB induziert wird, keine Abhängigkeit von einer Hemmung der c-Abl-Aktivität durch Imatinib (Abb. 26). Die Induktion von Ser345-Chk1 durch ATR erfolgt etwas langsamer, steigt jedoch bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt (45 min nach Bestrahlung) kontinuierlich an (Abb. 26B). Bei der densitometrischen Auswertung sechs unabhängiger Experimente konnten starke Abweichungen bezüglich der Strahlungs-induzierten Chk1-Aktivität zwischen den PBMC der verschiedenen Probanden festgestellt werden.

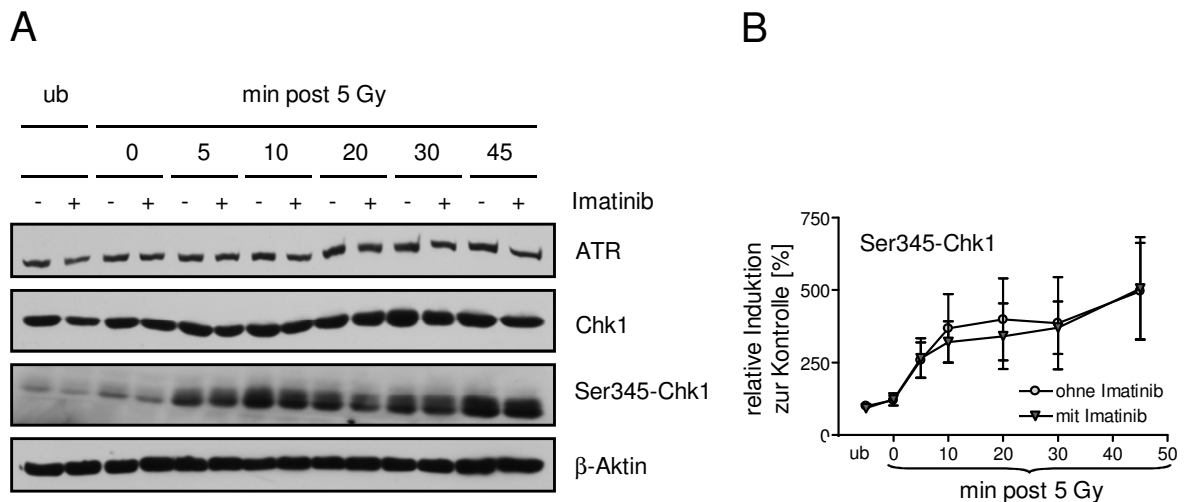


Abbildung 26: Der ATR-Chk1-Signalweg ist unbeeinflusst von Imatinib. Nach einer Vorbehandlung (48 h) mit und ohne Imatinib wurden PBMC bestrahlt (5 Gy), nach den angegebenen Zeitpunkten auf Eis gestellt, pelletiert und die extrahierten Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt. ATR, Chk1 und die funktionelle Phosphorylierung von Chk1 wurden mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. In (A) werden Blots gezeigt, die exemplarisch für sechs unabhängige Experimente stehen. Als Beladungskontrolle des Polyacrylamidgels diente β -Aktin. (B) Densitometrische Auswertung der Ser345-Chk1-Blots. Die Induktionswerte (relativ zur unbestrahlten [ub] Kontrolle) stehen für die Mittelwerte \pm SEM von sechs unabhängigen Experimenten.

4.6.2 Imatinib hat keinen Einfluss auf p53

Das Tumor-Suppressor-Protein p53 spielt eine zentrale Rolle in einem Netzwerk von Stress-Signalen und Effektor-Signalwegen, welche involviert sind in DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Zelltod (siehe 2.3.4). Daher wurden sowohl die Aktivität als auch die Expression von p53 nach γ -Strahlung in mononukleären Primärzellen (PBMC) untersucht. Nachdem die PBMC mit und ohne Imatinib kultiviert wurden, wurden die Zellen mit 5 Gy bestrahlt, um anschließend zu fortlaufenden Zeitpunkten Proben zu entnehmen und diese mittels Western-Blot zu analysieren.

Die Aktivität von p53, gemessen anhand der Phosphorylierung zu Ser15-p53, nimmt nach der Bestrahlung zwar langsam, aber kontinuierlich bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt (45 min) zu (Abb. 27). Die Hemmung der c-Abl-Aktivität durch Imatinib zeigt keinerlei Einfluss auf die p53-Aktivität, weder konstitutiv noch nach DNA-Schädigung.

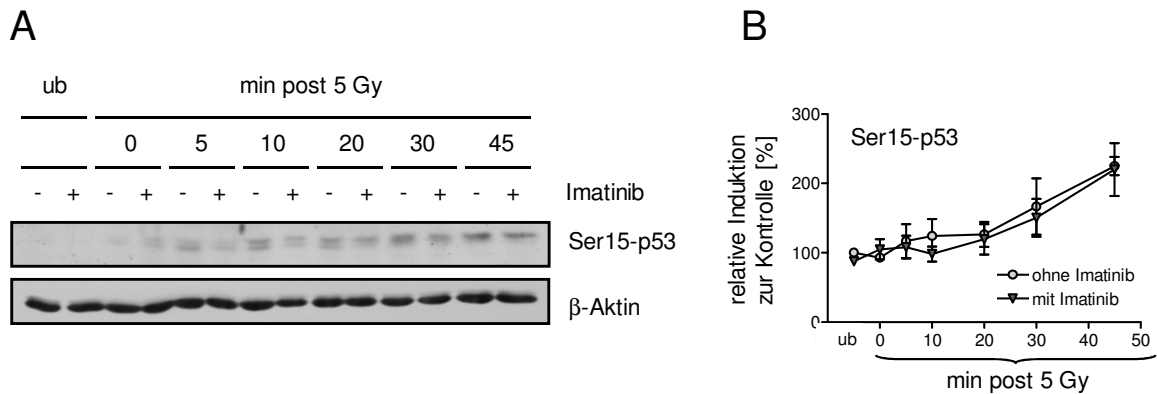


Abbildung 27: Die Aktivität von p53 ist unabhängig von Imatinib. PBMC wurden nach einer Vorbehandlung (48 h) mit und ohne Imatinib bestrahlt (5 Gy), nach entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen und mittels Western-Blot-Analyse wurde Ser15-p53 nachgewiesen. (A) Exemplarischer Blot für drei unabhängige Experimente. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. Für (B) wurden diese Blots densitometrisch ausgewertet und gepoolt. Die Induktionswerte (relativ zur unbestrahlten [ub] Kontrolle) stehen für die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten.

Als Transkriptionsfaktor induziert aktiviertes p53 verschiedene, für die DNA-Stress-Antwort wichtige Gene, weshalb auch das Proteinlevel von p53 vor und nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung eine entscheidende Rolle spielt. Analog zur Aktivität von p53 (Abb. 27) zeigt die Western-Blot-Analyse in Abb. 28 einen langsam ansteigenden p53-Proteingehalt nach γ-Strahlung. Jedoch konnte auch für diese p53-Akkumulation keine Abhängigkeit von Imatinib festgestellt werden.

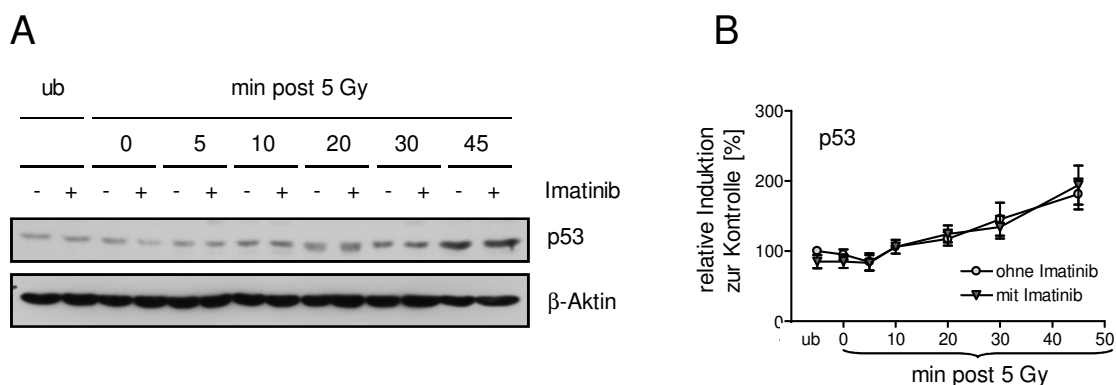


Abbildung 28: Die DNA-Stress-induzierte Akkumulation von p53 ist unabhängig von Imatinib. Nachdem PBMC für 48 h mit Imatinib vorbehandelt und anschließend mit 5 Gy bestrahlt wurden, wurden Proben zu angegebenen Zeitpunkten entnommen. p53 wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Stellvertretend für fünf unabhängige Experimente zeigt (A) einen exemplarischen Blot. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. (B) Densitometrische Auswertung der Blots. Die Induktionswerte (relativ zur unbestrahlten [ub] Kontrolle) stehen für die Mittelwerte ± SEM fünf unabhängiger Experimente.

4.6.3 Imatinib beeinflusst die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung von Zellproteinen

Anhand der Ergebnisse aus 4.4, 4.6.1 und 4.6.2 konnte gezeigt werden, dass die Verzögerung der Strangbruchreparatur (4.5.1) nicht durch einen veränderten Zellzyklus oder Zelltod verursacht wurde. Somit liegt nahe, dass die Imatinib-abhängige Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität direkt die Reparatur von Strangbrüchen beeinflusst. Da im untersuchten Zeitraum die Reparatur von DSB nicht durch Imatinib beeinträchtigt ist (4.5.4), wurden im Folgenden Signalproteine der SSBR auf ihre Abhängigkeit gegenüber der c-Abl-Aktivität untersucht.

Ein Schlüsselprotein in der SSBR (2.3.2) ist PARP-1. PARP-1 spielt sowohl bei der Detektion von SSB als auch bei der Rekrutierung weiterer SSBR-Proteine eine zentrale Rolle. PARP-1 vermittelt die poly-(ADP-Ribosyl)ierung nukleärer Proteine in unmittelbarer Umgebung der SSB. Diese PAR-Ketten werden vom PARP-1-Antagonisten PARG wieder abgespalten. Um Expressionslevel von PARP-1 und PARG zu untersuchen, wurden primäre Lymphozyten (PBMC) mit und ohne Imatinib kultiviert, dann bestrahlt und zu entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen. Durch spezifische Antikörper wurden die PARP-1- und PARG-Proteinlevel in den Proben gleicher Zellzahl bestimmt. Wie Abb. 29 zeigt, wird die Expression beider Proteine weder durch Bestrahlung induziert, noch durch Imatinib beeinflusst.

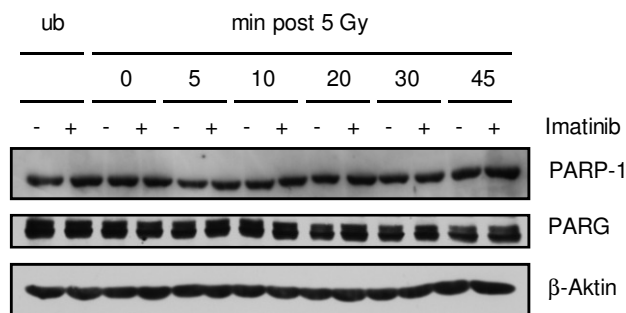


Abbildung 29: Die Expression der Reparaturproteine PARP-1 und PARG wird nicht durch Imatinib beeinflusst. PBMC wurden für 48 h mit und ohne Imatinib kultiviert und im Anschluss bestrahlt (5 Gy, außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]), nach entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen und mittels Western-Blot-Analyse wurden PARP-1 und PARG nachgewiesen. Der exemplarische Blot steht für neun unabhängige Experimente. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin.

Die Aktivität von PARP-1 kann anhand der poly-(ADP-Ribosyl)ierung (PAR) nukleärer Proteine festgestellt werden. Hierfür wurden wie oben behandelte PBMC entsprechend fixiert und zur durchflusszytometrischen Analyse mit einem spezifischen, gegen PAR gerichteten Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte über einen gegen den ersten Antikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper.

Die Spezifität des PAR-Antikörpers und die Effektivität der Methode wurden vorab sowohl durch Isotypenkontrollen als auch mittels eines Inhibitor-Versuchs gesichert. Bei der Isotypenkontrolle wurde zusätzlich zum spezifischen PAR-Antikörper die Probe mit Maus-Immunglobulin G (IgG) mitgeführt, um unspezifische Bindungen des PAR-Antikörpers ausschließen zu können (Abb. 30).

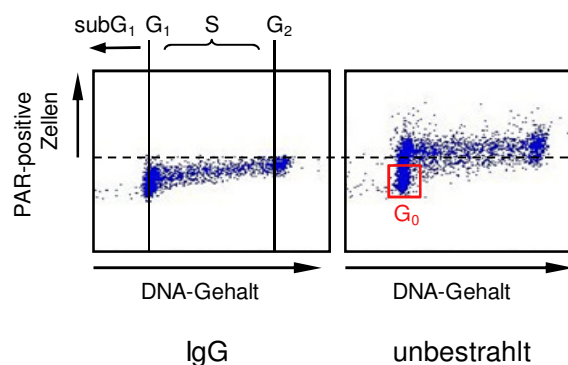


Abbildung 30: Konstitutive poly-(ADP-Ribosyl)ierung in Zellen. Zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurden die unbestrahlte, fixierte PBMC parallel zum PAR-Antikörper mit Maus-IgG inkubiert. Zusätzlich wurden alle Ansätze noch mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt, um den DNA-Gehalt der einzelnen Zellen zu bestimmen. Dargestellt sind die Dot-Blots der einzelnen Experimente.

Die Spezifität dieses Antikörpers konnte darüber hinaus funktionell nachgewiesen werden durch Kultivierung der PBMC in An- oder Abwesenheit des hochpotenten PARP-Inhibitors PJ34 (Garcia Soriano *et al.*, 2001) und anschließender Bestrahlung mit 30 Gy. Abb. 31 zeigt eine starke PAR-Induktion durch Bestrahlung, welche durch PJ34 komplett gehemmt werden kann. Ein Teil der Zellen aus diesen Versuchsansätzen wurde entnommen und mikroskopisch untersucht. Die Zellen wurden hierfür zusätzlich mit TO-PRO[®], einem blau fluoreszierendem Kern- bzw. DNA-Farbstoff gegengefärbt. Die exemplarischen Aufnahmen (Abb. 31B) bestätigen die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse (Abb. 31A): direkt (0 min) nach einer

Bestrahlungsdosis von 30 Gy (Abb.31A/B, mittlere Spalte) sind stark induzierte PAR-Signale erkennbar. Die Spezifität dieser Färbung wurde zusätzlich untermauert durch die Art und die Lokalisation der Signale: Es handelt sich erwartungsgemäß um Spots innerhalb der Zellkerne, welche die einzelnen DNA-Strangbrüche markieren. Diese Induktion kann durch die Zugabe von PJ34 komplett gehemmt werden (Abb. 31A/B, rechte Spalte). Die gepoolten Auswertungen mehrerer durchflusszytometrischer Messungen (Abb. 31C) bestätigen eindrücklich die visuellen Erkenntnisse der Immunfluoreszenzfärbungen. Damit eignet sich dieser PAR-Antikörper hervorragend für die Fluoreszenz-basierte Detektion und Quantifizierung von PAR.

Der Vorteil der durchflusszytometrischen Analyse besteht darin, dass hier noch ein weiteres Merkmal der Zelle simultan detektiert werden kann. Die Zellen konnten außer auf PAR auch noch auf ihren DNA-Gehalt hin untersucht werden. Hierfür wurden sie zusätzlich mit Propidiumjodid (PI) angefärbt, ein Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert. Die exemplarischen Dot-Blots, bei denen die poly-(ADP-Ribosyl)ierung (Y-Achse) gegen den DNA-Gehalt (X-Achse) aufgetragen sind, zeigen zum Einen, dass bei fast allen Zellen auch ohne Bestrahlung eine geringe konstitutive Ribosylierung nachweisbar ist (Abb. 30). Nur bei einem kleinen Prozentsatz der Zellen mit einem DNA-Gehalt von $2n$ bleibt diese Ribosylierung aus. Möglicherweise handelt es sich dabei um Zellen, die sich nicht aktiv im Zellzyklus, sondern in der Ruhephase (G_0) befinden. Zum Anderen konnte mit dieser Technik nachgewiesen werden, dass die Induktion der poly-(ADP-Ribosyl)ierung nach Bestrahlung wiederum in fast allen Zellen und in jeder Zellzyklusphase in einem vergleichbaren Ausmaß stattfindet (Abb. 31A, mittlerer Dot-Blot). Eine Ausnahme stellt wiederum ein Teil der Zellen mit einem DNA-Gehalt von $2n$ dar. Bei dieser wahrscheinlich ruhenden G_0 -Zellpopulation ist keine PAR-Induktion nachweisbar.

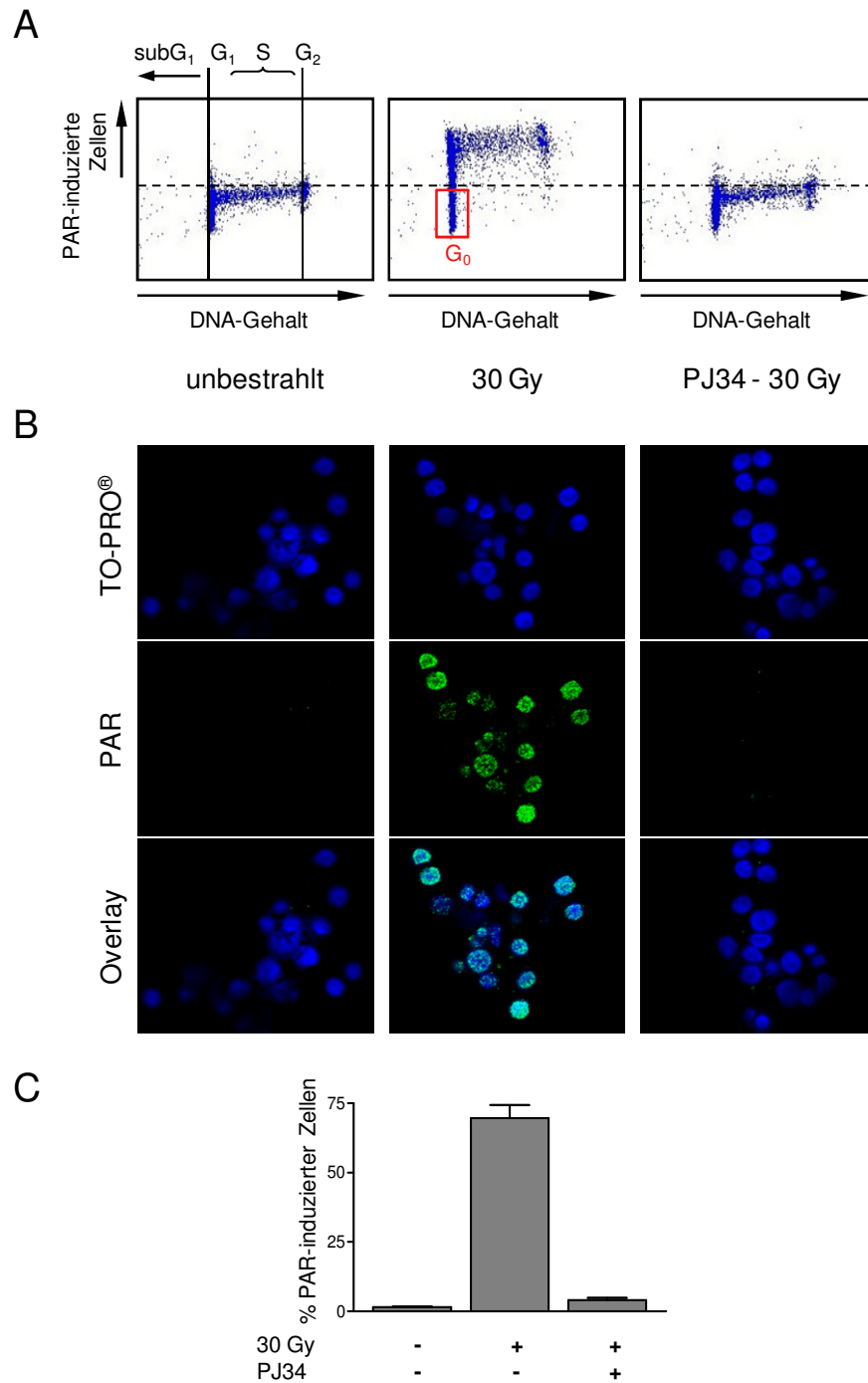


Abbildung 31: Nachweis der Spezifität des PAR-Antikörpers. Zum Nachweis von PAR wurden PBMC für 2,5 h mit oder ohne 4 μ M PARP-Inhibitor PJ34 inkubiert, bevor mit 30 Gy bestrahlt wurde. Die Zellen wurden fixiert und mit einem PAR-Antikörper angefärbt. Zusätzlich zu PAR wurden die Zellen noch mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt, um den DNA-Gehalt zu bestimmen; (A) zeigt hierzu exemplarische Dot-Blots für bestrahlte (0 min) und unbestrahlte Zellpopulationen. (B) Für die repräsentative Aufnahmen wurden die Zellen nach der Fixierung noch mit dem Kernfarbstoff TO-PRO® gegengefärbt (blau), PAR ist grün dargestellt. (C) Die gepoolten Ergebnisse stehen für elf (unbestrahlt), sechs (30 Gy, ohne PJ34) bzw. zwei (30 Gy, mit PJ34) durchflusszytometrische Bestimmungen PAR-induzierter Zellen (Mittelwerte \pm SEM).

Um der Frage nachzugehen, inwieweit Imatinib einen Einfluss auf die Ribosylierungsereignisse hat, wurden PBMC wie bisher mit und ohne Imatinib kultiviert, dann mit *low dose* (5 Gy) bestrahlt und zu entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen. Diese wurden fixiert, mit dem PAR-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abb. 32A zeigt, dass bereits unmittelbar nach Bestrahlung die Induktion von PAR drastisch ansteigt. Das erreichte maximale Induktionslevel nimmt bereits nach 5 min deutlich ab, um bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt (40 min) wieder fast Ausgangswerte zu erreichen. Durch Imatinib-Behandlung sind sowohl *per se*, als auch nach Bestrahlung mehr Zellen poly-ribosyliert. Durch die Zugabe von Imatinib wird nicht nur die Induktion der poly-(ADP-Ribosyl)ierung stark erhöht, v.a. senkt sich das Level von PAR deutlich langsamer. Während unbehandelte Zellen nach 30 min schon fast wieder das Ausgangslevel erreicht haben, ist dies bei Imatinib-behandelten Zellen auch nach 40 min noch nicht der Fall.

Zusätzlich zur PAR-Färbung wurde hier mittels PI-Färbung der DNA-Gehalt einzelner Zellen bestimmt. Der repräsentative Dot-Blot (Abb. 32B) zeigt, dass die Bestrahlung einer Zellpopulation zum gegebenen Zeitpunkt nur bei einem Teil der Zellen zur Induktion von poly-(ADP-Ribosyl)ierung führt und dass diese Induktion durch Imatinib deutlich verstärkt wird. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten zeigte sich auch hier, dass nur aktiv im Zellzyklus befindliche Zellen poly-ribosyliert sind, was für in der Ruhephase befindliche Zellen nicht zutrifft. Im Gegensatz zu der nach einer *high dose*-Bestrahlung (30 Gy) beobachteten Induktion von Ribosylierung in nahezu allen Zellen, die sich im Zellzyklus befinden (Abb. 31A, mittlerer Dot-Blot), ist dies nach Bestrahlung mit geringer Dosierung (5 Gy) nicht der Fall: In allen Phasen des Zellzyklus findet sich ein relativ großer Anteil von Zellen, bei denen keine PAR-Induktion nachweisbar ist (Abb. 32B).

Die Beobachtung, dass nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 Gy nur bei einem Teil der Zellen einer Population PAR-induziert wird, ließ sich mit einer weiteren Methode bestätigen: Von den für die FACS-Analyse behandelten, fixierten und mit PAR-Antikörpern inkubierten Zellen wurden Aliquots für die Immunfluoreszenz-Färbung entnommen. Als Kernfärbung wurde der DNA-Farbstoff TO-PRO[®] benutzt. Die konfokalen Aufnahmen (Abb. 32C) zeigen keine PAR-positiven Zellen vor Bestrahlung. Nach Bestrahlung ist nur ein Teil der Zellen PAR-positiv, und auch die Stärke der poly-Ribosylierung, bzw. die Anzahl der Spots im Kern ist unterschiedlich stark ausgeprägt, was die durchflusszytometrischen Ergebnisse (Abb. 32B) widerspiegelt: Nach Bestrahlung sind Imatinib-behandelte Zellen zum Teil deutlich stärker ribosyliert als nicht-behandelte Zellen.

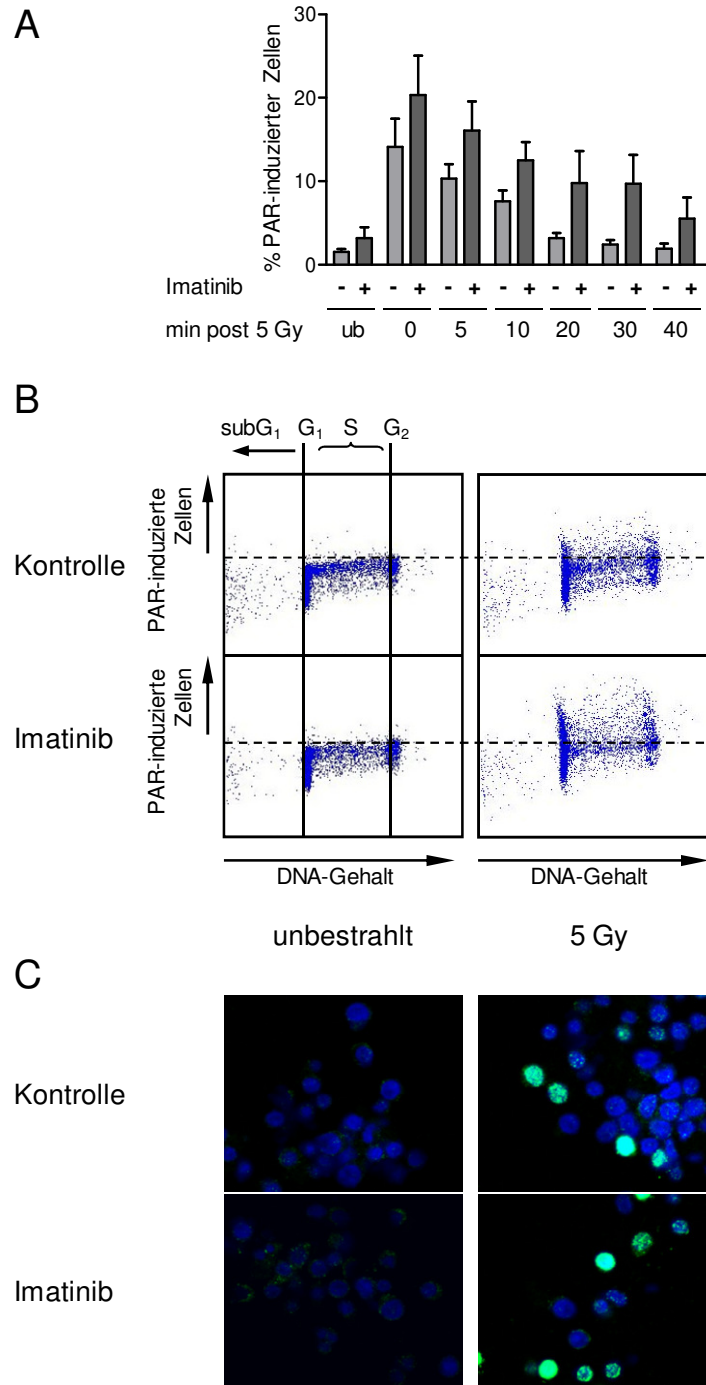


Abbildung 32: Imatinib hat in allen Phasen des Zellzyklus Einfluss auf die poly-Ribosylierung (PAR) nukleärer Proteine. Zum Nachweis von PAR wurden PBMC für 48h mit und ohne Imatinib kultiviert, anschließend mit 5 Gy bestrahlt (außer der unbestrahlten Kontrolle [ub]) und es wurden zu entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen. Diese wurden fixiert und mit einem PAR-Antikörper angefärbt. (A) zeigt die gepoolten Ergebnisse von fünf durchflusszytometrischen Bestimmungen von PAR (Mittelwerte \pm SEM). Für diese Bestimmung wurden die Zellen zusätzlich noch mit Propidiumjodid (PI) gefärbt, um den DNA-Gehalt zu bestimmen. Exemplarisch zeigt dies der Dot-Blot in (B) für bestrahlte (0 min) und unbestrahlte Zellpopulationen. Für die repräsentative Aufnahme (C) wurden die Zellen nach der Fixierung noch mit dem Kernfarbstoff TO-PRO[®] gegengefärbt (blau), PAR ist grün dargestellt.

5 DISKUSSION

Der von Novartis (Schweiz) entwickelte Bcr-Abl-Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Imatinib Mesylate, STI571, *Glivec*[®], *Gleevec*[®]) ist seit 2001 zur Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) zugelassen. Seit 2002 ist die Behandlung mit Imatinib *first-line*-Therapie der CML, wobei vor allem während deren chronischer Phase herausragende Erfolge erzielt wurden (Cohen *et al.*, 2002; Druker *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010). Jedoch ist eine Heilung der CML mit Imatinib in den meisten Fällen nicht möglich, weshalb für die Patienten die lebenslange Imatinib-Einnahme notwendig ist (Corbin *et al.*, 2010). Imatinib bindet sowohl an die Abl-Domäne von Bcr-Abl als auch an das physiologische c-Abl selbst (Nagar *et al.*, 2006). Einige der von Imatinib verursachten Nebenwirkungen konnten bereits auf die Hemmung der c-Abl-Kinase zurückgeführt werden, wie z.B. Ödeme, Flüssigkeitsretention und toxische Kardiomyopathie (Koleske *et al.*, 1998; Kerkelä *et al.*, 2006). c-Abl spielt vor allem unter zellulärem Stress eine zentrale Rolle in verschiedenen Signalwegen zur Erhaltung der genetischen Stabilität (Übersicht in: Shaul & Ben-Yehoyada, 2005). Daher wurde dieser Arbeit die systematische Untersuchung der Rolle der c-Abl-Aktivität für die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen zugrunde gelegt.

5.1 Hemmung von c-Abl durch Imatinib

Wie schon bei der Wahl des Zellsystems, wurde auch bei der Identifikation der in dieser Arbeit eingesetzten Imatinib-Konzentration großer Wert auf Vergleichbarkeit mit den beim Patienten erreichten Serumkonzentrationen gelegt. Zur Therapie der CML wird eine tägliche Dosis von 400 mg (chronische Phase) bzw. 600 mg (beschleunigte Phase/ Blastenkrise) Imatinib eingesetzt. Picard *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Imatinib-Plasmakonzentrationen der verschiedenen Patienten von 0,3 μM bis zu 5 μM stark variierten. Die durchschnittlichen Konzentrationen lagen bei $1,8 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (bei einer Tagesdosis von 400 mg Imatinib) bzw. $2,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (bei einer Tagesdosis von 600 mg).

Die in Abb. 9 dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass eine deutlich höhere Dosis Imatinib notwendig ist, um die Viabilität Bcr-Abl-negativer Zellen, verglichen mit Bcr-Abl-positiven Zellen, zu hemmen. Übereinstimmend damit konnten verschiedene Arbeitsgruppen feststellen, dass es auch für die komplette Hemmung der c-Abl-Aktivität einer höheren Imatinib-

Konzentration bedarf als für die Hemmung der Aktivität von Bcr-Abl (White *et al.*, 2005; Burton *et al.*, 2005; Zipfel *et al.*, 2004; Druker *et al.*, 1996). Daher wurde die in dieser Arbeit verwendete Dosis von 3 μM gewählt: Diese Konzentration ist innerhalb des klinisch relevanten Bereichs und wie in 4.2 beschrieben, ist diese Dosis ausreichend, um die Aktivität von c-Abl in den verwendeten Zellsystemen komplett zu hemmen (Abb. 10), ohne dabei die Viabilität der Bcr-Abl-negativen Zellen zu beeinträchtigen (Abb. 9).

5.2 Genetische Instabilität Bcr-Abl-negativer Zellen durch Hemmung der c-Abl-Aktivität

In Vorarbeiten zu diesem Projekt konnten van der Kuip *et al.* (2004) nachweisen, dass in Bcr-Abl-positiven Zellen die Bcr-Abl-Kinaseaktivität zu einer erhöhten Frequenz sowohl spontaner als auch durch γ -Strahlung induzierter HPRT-Mutationen führt. Dieser Effekt kann durch Behandlung mit Imatinib teilweise wieder aufgehoben werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass Imatinib in Bcr-Abl-negativen Zellen gegenteilig wirkt. So führt bei normalen Lymphozyten eine langandauernde Imatinib-Behandlung zu einer gesteigerten Mutationsfrequenz (Abb. 11, publiziert in Fanta *et al.*, 2008). Dadurch wird klar belegt, dass für die genetische Stabilität der Zellen nicht nur die Hemmung des onkogenen Bcr-Abl eine Rolle spielt, sondern auch die Hemmung eines physiologischen Targets von Imatinib von Bedeutung ist. Bereits in frühen klinischen Studien konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine Erhöhung chromosomaler Aberrationen in Bcr-Abl-negativen Zellen von CML-Patienten nach einer Imatinib-Therapie feststellen (Terre *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2002). Auch Hughes *et al.* (2010) konnten zytogenetische Anomalitäten in Bcr-Abl-negativen Klonen feststellen. Wie Abb. 11 zeigt, wird die infolge der Bcr-Abl-Aktivität erhöhte Mutationsfrequenz durch die Imatinib-vermittelte Hemmung von Bcr-Abl gesenkt, während durch die Inhibition einer physiologischen Zielstruktur von Imatinib das durch DNA-Stress induzierte Mutationslevel erhöht wird. Während in Bcr-Abl-negativen Zellen nur die erhöhte Mutationsfrequenz in Anwesenheit von Imatinib festgestellt wird, geschieht in Bcr-Abl-positiven Zellen beides gleichzeitig: durch die Hemmung von Bcr-Abl wird die Bcr-Abl-induzierte Erhöhung der Mutationsfrequenz zwar verhindert, jedoch nur bis auf das Level, welches aus der Erhöhung der Mutationsfrequenz durch die Hemmung des physiologischen Targets resultiert. Daher zeigen Bcr-Abl-positive und -negative Zellen nach Behandlung mit Imatinib eine

vergleichbare Stress-induzierte Mutationsfrequenz. Konsequenterweise zeigen Zellen, die eine Imatinib-resistente Bcr-Abl-Variante exprimieren (T315I) eine Addition des Bcr-Abl-Effekts und des Imatinib-Effekts: Zwar führt die Bcr-Abl-Kinaseaktivität zum erhöhten Mutationslevel, jedoch kann dieses infolge der Imatinib-Resistenz der Bcr-Abl-T315I-Variante durch Imatinib-Zugabe nicht gesenkt werden. Zusätzlich wird dieses Level durch die Hemmung des physiologischen Targets von Imatinib weiter erhöht. Diese Erkenntnisse sind vor allem für solche CML-Patienten von entscheidender Bedeutung, die *per se* Imatinib-resistent sind oder im Verlauf der Therapie mit Imatinib Resistenzen entwickeln. Durch den hier *in vitro* gezeigten Effekt der durch Imatinib gesteigerten Mutationsfrequenz könnte es in solchen Patienten zu einer beschleunigten Progression der Erkrankung oder zur Entwicklung von Sekundärtumoren kommen. In diesen Fällen wäre ein sofortiger Abbruch der Imatinib-Behandlung und ein Wechsel auf andere Bcr-Abl-Inhibitoren oder andere Therapieformen angezeigt. Die hier gefundenen Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit eines konsequenten und regelmäßigen Resistenz-Monitorings der Patienten während der Imatinib-Therapie. Dies ist vor allem für Patienten von großer Bedeutung, die über mehrere Jahre hohe Imatinib-Dosen erhalten, da diese eine gesteigerte Neigung zur Resistenzbildung aufweisen (Branford *et al.*, 2002).

Da mit *bcr-abl* transfizierte Zellen neben Bcr-Abl auch immer c-Abl exprimieren und c-Abl eine zentrale Rolle in der zellulären DNA-Stress-Antwort innehat (Shaul & Ben-Yehoyada, 2005, siehe 2.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem betreffenden physiologischen Target von Imatinib um c-Abl handelt. Um zu verifizieren, ob der Bcr-Abl-unabhängige Effekt tatsächlich auf die Hemmung der c-Abl-Kinase zurückzuführen ist, wurden die HPRT-Mutationsexperimente auch mit genetischen c-Abl-Modellen durchgeführt. Die hierfür verwendeten embryonalen Mausfibroblasten exprimieren entweder die Wildtyp-Variante von c-Abl (MEF Abl-wt) oder eine Kinase-defekte Form (MEF Abl-KD). Im Vergleich zur Abl-wt-Form ist die Mutationsfrequenz in der Kinase-defekten Variante signifikant erhöht, womit erwiesen ist, dass die c-Abl-Kinaseaktivität eine essentielle Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität spielt (Abb. 12, publiziert in Fanta *et al.*, 2008).

Die gewonnenen *in vitro*-Daten weisen somit darauf hin, dass eine lang andauernde Behandlung mit c-Abl-Inhibitoren nicht nur ökonomisch durch die extrem hohen Kosten von teilweise über 60.000 \$ pro Jahr (Blankart *et al.*, 2011; Breitscheidel *et al.*, 2008; Frame; 2007), sondern auch hinsichtlich einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit sekundärer Neoplasien als Spätfolge bedenklich sein könnte. Für eine abschließende Aussage, inwieweit Letzteres in der Klinik tatsächlich ein relevantes Problem werden könnte, ist es sicherlich zu früh, da die längsten

Studien zur Imatinib-Therapie der CML sieben (TARGET-Studie) bzw. zehn Jahre (IRIS-Studie) laufen (Hughes *et al.*, 2010; Tauchi *et al.*, 2010). Allerdings gibt es durchaus erste Hinweise, dass durch Imatinib die Chance eines Sekundärtumors erhöht wird. So wurde von Fällen von EBV-positiven (Epstein-Barr-Virus) kutanen B-Zell-lymphoproliferativen Erkrankungen nach Imatinib-Behandlung bei CML-Patienten und über eine gesteigerte Inzidenz von soliden Tumoren, vor allem Prostatakarzinomen berichtet (Bekkenk *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2005). Bacher *et al.* (2005) konnten bei einigen Patienten nach Langzeit-Therapie mit Imatinib Karyotyp-Veränderungen Bcr-Abl-negativer Zellen feststellen. Fabarius *et al.* (2007) wiesen *in vitro* einen Zusammenhang chromosomaler und centrosomaler Aberrationen mit genetischer Instabilität als Folge therapeutisch relevanter Imatinib-Dosen nach. Bei einer Analyse von 1701 CML-Patienten traten bei drei Patienten ca. zwei Jahre nach Beginn der Imatinib-Therapie eine akute myeloische Leukämie (AML) bzw. Hochrisiko-Myelodisplastisches Syndrom (MDS) auf, welches dann sehr schnell zur AML transformierte (Kovitz *et al.*, 2006). Auch Jabbour *et al.* (2007) fanden bei der Untersuchung von 258 neu-diagnostizierten CML-Patienten unter Imatinib-Therapie nach durchschnittlich drei Jahren bei 9 % chromosomale Aberrationen in Bcr-Abl-negativen Zellen, darunter einen Patienten mit Monosomie-7, der daraufhin eine AML entwickelte.

Diese Studien legen nahe, dass der in dieser Arbeit gefundene Einfluss von Imatinib auf die genetische Stabilität Bcr-Abl-negativer Zellen auch *in vivo* relevant sein könnte und dass eine genauere Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen notwendig ist.

5.3 Imatinib führt zur verzögerten Reparatur der durch γ -Strahlung induzierten DNA-Strangbrüche

Für eine erhöhte Mutationsrate in Zellen können unterschiedliche Ursachen verantwortlich sein: Veränderungen der Proliferation, verzögerte Induktion von Zelltod oder gestörte DNA-Reparaturmechanismen können dazu führen, dass geschädigte DNA nicht, nicht korrekt oder nicht vollständig repariert wird und somit die Schäden bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben werden.

Es wurde gezeigt, dass c-Abl durch genotoxischen Stress, wie z.B. ionisierende Strahlung aktiviert wird und daraufhin mit verschiedenen Proteinen der Zellzykluskontrolle, der DNA-Schadenserkennung und -prozessierung und der Apoptose interagiert (Übersicht: Meltser *et al.*,

2011). Daher wurde hier untersucht, ob die Inhibition der c-Abl-Aktivität und ihr Effekt auf die genetische Stabilität durch veränderte Proliferation oder induzierte Apoptose bedingt sind. Jedoch konnte weder bei der Teilungsrate noch bei der *Cloning Efficiency* (CE) der hämatopoetischen Bcr-Abl-negativen Zellen (32D und BaF3) ein Einfluss von Imatinib festgestellt werden bzw. zeigte sich hier kein Unterschied zwischen MEF-Zellen, welche Wildtyp-c-Abl exprimieren und MEF-Zellen mit Kinase-defektem c-Abl (Abb. 13). Ebenso konnte in den 32D- und den BaF3-Zellen keine signifikante Imatinib-abhängige Änderung festgestellt werden bezüglich der Apoptose-Induktion nach Bestrahlung (Abb. 14/15). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch die Ergebnisse, dass Imatinib die Zellzyklusverteilung Bcr-Abl-negativer Zellen in keinerlei Weise beeinflusst (Abb. 16/17). Der Einfluss der c-Abl-Hemmung auf Zellzyklus und Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Kharbanda *et al.* (1998) und Wang (2000) zeigten, dass die Aktivierung von c-Abl durch verschiedene DNA-Schädigungen mit der Inhibition von Zellwachstum und der Induktion von Zelltod assoziiert ist. Auch Yuan *et al.* (1997) zeigten für murine *c-abl*^{-/-}-Zellen ein erhöhtes Überleben nach Bestrahlung, während die aviane *c-abl*^{-/-}-B-Lymphozytenlinie der Arbeitsgruppe um Takao *et al.* (2000) im Überleben nach Bestrahlung keine Abhängigkeit von c-Abl aufwies. Auf der anderen Seite konnten, übereinstimmend mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, Uemura & Griffin (2000) keinen Einfluss der pharmakologischen Hemmung von c-Abl durch Imatinib auf die Bestrahlungssensitivität und das Zellüberleben feststellen, weder in murinen primären hämatopoetischen Zellen noch in humanen p53-mutierten Zelllinien. Diese widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von c-Abl bzw. der c-Abl-Aktivität auf die Proliferation, Apoptose bzw. zusammengefasst das Überleben von Zellen deuten darauf hin, dass dieser Effekt möglicherweise stark vom Zelltyp und der Art der DNA-Schädigung abhängt.

Im letzten Jahrzehnt häuften sich die Nachweise einer Interaktion von c-Abl mit Proteinen, welche direkt in die Signalwege und Prozessierung der DNA-Schadensreparatur involviert sind. Die Aktivierung und Phosphorylierung von c-Abl als Konsequenz von DNA-Schädigung ist abhängig von der Anwesenheit von ATM (Baskaran *et al.*, 1997; Shafman *et al.*, 1997). Ebenso gehören Schlüsselproteine der Homologen Rekombination (HR) und des Nicht-homologen End-Joinings (NHEJ) zu den Interaktionspartnern von c-Abl, die von diesem teils durch Phosphorylierung aktiviert werden, wie z.B. DNA-PKcs, Rad51, Rad52 (Kharbanda *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998a). Auch in die Doppelstrangbruchreparatur involviert ist BRCA1, ein weiterer Interaktionspartner von c-Abl (Foray *et al.*, 2002). Eine schematische Übersicht dieses komplexen Netzwerks findet sich in Abb. 1. Dass Proteine, welche in die DNA-Schadens-Antwort involviert

sind, mit zu den am besten untersuchten Targets der c-Abl-Kinase gehören, bestärkt die Annahme, dass hier die Hemmung von c-Abl durch Imatinib von Bedeutung sein könnte. Um die Frage zu untersuchen, ob Imatinib mit der Reparaturkinetik γ -Strahlung-induzierter DNA-Strangbrüche interferiert, wurden alkalische Comet-Assays sowohl mit murinen hämatopoetischen Zelllinien, als auch mit humanen Lymphozyten (PBMC) gesunder Probanden durchgeführt. Imatinib zeigte zwar weder einen Einfluss auf die Induktion von Strangbrüchen noch auf die Zahl konstitutiv vorhandener Strangbrüche, jedoch konnte nach der Vorbehandlung mit Imatinib sowohl in den murinen Zelllinien-Modellen als auch in den humanen Primärzellen eine signifikante Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur nachgewiesen werden (Abb. 18). Die verzögerte Reparaturkinetik ist unabhängig von der Strahlendosis, sie konnte für *high dose*- (30 Gy) genauso wie für *low dose*-Bestrahlung (5 Gy) gezeigt werden (Abb. 18/19). Diese Imatinib-abhängige Reparaturverzögerung konnte mit dem Abl-Inhibitor Dasatinib in analoger Weise dargestellt werden (Abb. 20). Diese Daten legen nahe, dass Imatinib in Bcr-Abl-negativen Zellen deshalb zur genetischen Instabilität führt, da die Reparaturmechanismen eingeschränkt oder verzögert ablaufen und dass dieser Effekt nicht durch eine unspezifische Wirkung von Imatinib, sondern in gleicher Weise durch Dasatinib auftritt, d.h. tatsächlich abhängig ist von der Kinaseaktivität eines gemeinsamen physiologischen Targets (publiziert in Fanta *et al.*, 2008).

Der Nachweis, dass dieser Effekt der verzögerten Reparatur tatsächlich von der Inhibition der c-Abl-Kinase abhängig ist, wurde wiederum durch den Einsatz von Zelllinien-Modellen verschiedener Abl-Varianten erbracht. Auch hier war die Defizienz der c-Abl-Kinaseaktivität (MEF Abl-KD) ausreichend, um zu einer signifikanten Verzögerung der DNA-Reparatur nach γ -Strahlung zu führen (Abb. 21A). Konsequenterweise wurde in Zellen, welche eine Imatinib-resistente Abl-Version (c-Abl-T315I) exprimieren, keinerlei Einfluss von Imatinib festgestellt (Abb. 21B, publiziert in Fanta *et al.*, 2008).

Zusammenfassend ließ sich hier belegen, dass die Hemmung von c-Abl die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur und damit wahrscheinlich auch die genetische Stabilität beeinflusst. Diese Phänomene liegen ursächlich an der Defizienz bzw. der Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität, unabhängig davon, ob dazu genetische oder pharmakologische Methoden angewandt werden. Zur Klärung welche molekularen Mechanismen der DNA-Schadensreparatur diesem funktionellen Effekt der c-Abl-Hemmung zugrunde liegen musste zunächst festgestellt werden, welche der verschiedenen Reparatur-Signalwege beeinflusst werden bzw. ob sich die verzögerte Reparaturkinetik auf DSB oder SSB bezieht.

5.4 Die Imatinib-Hemmung der c-Abl-Aktivität beeinflusst die SSBR

Da anhand des Comet-Assays sowohl die Reparatur von SSB als auch von DSB nachgewiesen wird, wurden weitere Methoden verwendet, um festzustellen, welche Reparatur-Signalwege durch die Hemmung der c-Abl-Aktivität betroffen sein könnten. Daher wurde der Comet-Assay unter neutralen Bedingungen durchgeführt: Hierbei unterbleibt die Denaturierung der DNA-Bruchstücke, wodurch selektiv nur die DSB analysiert werden (vgl. Abb. 5). Je nach Zelltyp und verwendeter Analysemethode konnten verschiedene Arbeitsgruppen feststellen, dass durch γ -Strahlung 25-250 mal mehr SSB als DSB verursacht werden (Ward, 1988; Jones *et al.*, 1993; Milligan *et al.*, 1996). Daher war es nicht überraschend, dass auch in der vorliegenden Arbeit deutlich weniger DSB als SSB durch Bestrahlung induziert wurden. Jedoch zeigt die Analyse anhand des neutralen Comet-Assays, dass weder die Induktion noch die Reparatur der DSB durch Imatinib beeinflusst wird (Abb. 22).

Da mit Hilfe des neutralen Comet-Assays pro Ansatz nur 50-100 Zellen analysiert wurden, könnte es möglich sein, dass minimale Unterschiede im Gehalt fragmentierter DNA zwischen Imatinib-behandelten und -unbehandelten Zellen mit dieser Methode nicht detektiert wurden. Daher wurde als zweite Methode die Pulsfeld-Gelelektrophorese durchgeführt, mit welcher es möglich ist, fast eine Million Zellen pro Ansatz gleichzeitig auf DSB zu analysieren. Auch mit dieser Methode konnte die Induktion von DSB durch ionisierende Strahlung deutlich festgestellt werden. Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen ließ sich jedoch auch hier keine Beeinflussung der Reparaturkinetik durch Imatinib nachweisen (Abb. 23). Zum Zeitpunkt 60 min nach Bestrahlung ist ein Trend hin zur schnelleren DSBR mit Imatinib ersichtlich, welcher aufgrund der hohen Streuung der Werte jedoch nicht signifikant war. Aus diesem Grund wurde eine dritte Methode herangezogen, um die Reparatur der DSB zu analysieren. Die durchflußzytometrische Detektion von γ -H2AX zum Nachweis von DSB ist deutlich sensitiver als der Nachweis mittels des neutralen Comet-Assays oder der Pulsfeld-Gelelektrophorese: über die Detektion von γ -H2AX können bereits DNA-Schäden von 1-5 DSB pro Zelle nachgewiesen werden (Rothkamm & Löbrich, 2003), der Comet-Assay ist erst ab 40-100 DSB pro Zelle sensitiv (Olive, 2004). Analog zu den beiden vorangegangenen Analysemethoden zeigte sich auch hier sowohl in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 24A) als auch in den durchflußzytometrischen Analysen (Abb. 24B-D) deutlich die DSB-Induktion durch Bestrahlung. Diese Induktion konnte sowohl nach *low dose*- (5 Gy) als auch nach *high dose*-Bestrahlung (30 Gy) für primäre mononukleäre Zellen (PBMC) wie auch für die hämatopoetische Zelllinie

32D gezeigt werden. Aber auch hier ließ sich kein signifikanter Einfluss von Imatinib auf die Reparaturkinetik der DSB erkennen.

Im Gegensatz zu den hier gewonnenen Erkenntnissen konnten Meltser *et al.* (2010) einen Einfluss der c-Abl-Kinaseaktivität auf die DSBR feststellen: sowohl unter Imatinib-Zugabe als auch in einem c-Abl-*knockout*-Modell (MEF) kam es zur schnelleren Reparatur von DSB. Jedoch konnte dies signifikant erst 24 h nach Bestrahlung festgestellt werden, während in der vorliegenden Arbeit nur Zeiträume von maximal fünf Stunden untersucht wurden, da innerhalb dieses Zeitraums in dieser Arbeit eine Imatinib-abhängige Verzögerung festzustellen ist (siehe 4.5). Außerdem inkubierten Meltser *et al.* (2010) die Zellen nur für 2 h vor Bestrahlung mit einer Dosis von 10 μM und somit viel kürzer und mit einer Imatinib-Konzentration, die weit über der normalen Plasmakonzentration eines Patienten unter Imatinib-Therapie liegt. Meltser *et al.* (2010) verwendeten des Weiteren karzinogene Zelllinien (MCF7 und HeLa). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die zentrale Frage nach dem Imatinib-Einfluss auf die DNA-Reparatur normaler, nicht-entarteter Zellen gestellt wird, wurden hier normale, nicht-karzinogene Linien myeloischer Vorläuferzellen und primäre hämatopoetische Zellen gesunder Probanden untersucht. Übereinstimmend mit Meltser *et al.* (2010) konnten auch Wang *et al.* (2011) erst nach 24 h einen Einfluss von c-Abl auf die DSBR feststellen, allerdings wurde in dieser Arbeit eine Verzögerung der DSBR in c-Abl-*knockout*-Zellen (MEF) gezeigt. Konform mit den hier gewonnenen Ergebnissen zeigten Wang *et al.* (2011), dass bereits nach 30 min eine deutlichere Verzögerung der SSB-Reparatur in c-Abl-defizienten MEFs erfolgt.

Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse von Meltser *et al.* (2010) nicht direkt mit den hier gewonnenen vergleichbar, da hier anhand von drei verschiedenen Methoden sowohl für die murinen hämatopoetischen Zelllinien als auch für die humanen PBMC nachgewiesen wurde, dass die Hemmung der c-Abl-Kinase keinen Einfluss auf die DSBR hat, d.h. die Verzögerung der Reparatur, die anhand der alkalischen Comet-Assays festgestellt wurde ist auf einen Effekt von c-Abl auf die SSB zurückzuführen.

5.5 Imatinib führt zur veränderten Prozessierung von SSB

Im Folgenden wurden molekulare Wege der DNA-Schadensprozessierung untersucht. Wie bereits in 2.3.4 beschrieben, müssen Zellen zunächst ihren Zellzyklus verlangsamen oder arretieren, um eine korrekte DNA-Reparatur durchführen zu können. Rekrutierung und

Aktivierung von ATM, DNA-PKcs und ATR stellen die Schlüsselereignisse der DNA-Schadens-Signalleitung dar (Übersicht: Abraham, 2001). DNA-PKcs wird ausschließlich durch DSB aktiviert, was zum Großteil auch für ATM gilt, jedoch wird ATM auch durch SSB initiiert, während ATR auf eine Vielzahl von DNA-Schädigungen reagiert (Übersicht: Burma & Chen, 2004; Shiloh, 2003). Als Zielproteine werden Chk1, Chk2, H2AX und p53 phosphoryliert, um Zellzyklus-Kontrollpunkte und Reparatur bzw. Zelltod zu aktivieren (Übersicht: Riley *et al.*, 2008; Bartek & Lukas, 2007). Für den Großteil dieser Schlüsselproteine wurden bereits Abhängigkeiten bzw. Interaktionen mit c-Abl nachgewiesen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Bereits in einer Vielzahl an Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass c-Abl durch ionisierende Strahlung oder genotoxische Agenzien in Abhängigkeit von ATM aktiviert wird (Baskaran *et al.*, 1997; Shafman *et al.*, 1997; Kharbanda *et al.*, 1997), was durch die hier durchgeführten Versuche erwartungsgemäß bestätigt wurde: Durch Bestrahlung wird die Aktivität und damit die Autophosphorylierung von c-Abl stark induziert (Abb. 10). Ebenso ist bekannt, dass die Aktivität und Phosphorylierung von ATM und damit auch ihrer direkten Zielproteine Chk2 und p53 direkt nach Bestrahlung rapide zunimmt (Khanna *et al.*, 1998; Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Auch in dieser Arbeit konnte eine starke Induktion der ATM-Aktivität binnen kürzester Zeit nach γ -Strahlung anhand der Phosphorylierung von ATM selbst und von Chk2 und p53 gezeigt werden (Abb. 25, 27, 28). Jedoch war in den hier verwendeten humanen PBMC kein Einfluss der c-Abl-Hemmung durch Imatinib auf eines dieser Proteine oder deren Aktivität ersichtlich. Im Gegensatz dazu konnten Wang *et al.* (2011) einen Einfluss von c-Abl auf die Aktivität von ATM feststellen, jedoch wurden als Zellmodell keine humanen primären Zellen, sondern c-Abl^{-/-}-MEFs verwendet, d.h. nicht nur das Zellsystem, sondern auch der Effekt von nicht-vorhandenem c-Abl mit gehemmten c-Abl sind kaum miteinander vergleichbar. Des Weiteren wurden bei Wang *et al.* (2011) erst Zeiträume ab 4 h betrachtet, während in der vorliegenden Arbeit in erster Linie die erste Stunde nach Bestrahlung interessant war und untersucht wurde, da hier in den Comet-Assays sowohl bei *high dose*- als auch bei *low dose*-Bestrahlung die ersten bzw. stärksten verzögernden Reparatur-Effekte auftraten. Dass der Einfluss von c-Abl auf ATM und damit möglicherweise auf die DSB-Reparatur erst zu sehr späten Zeitpunkten auftritt, wird neben Wang *et al.* (2001) auch von Meltser *et al.* (2010) bestätigt, die ebenfalls erst Zeitpunkte 24 h nach Bestrahlung betrachteten und hier einen Einfluss der c-Abl-Hemmung auf die DSB-Reparatur und die γ -H2AX-Akkumulation feststellen konnten. H2AX wird nach DNA-Schaden an DSB von ATM zu γ -H2AX aktiviert (Fernandez-

Capetillo *et al.*, 2004). Diese starke Aktivierung von γ -H2AX konnte auch hier nachgewiesen werden, sowohl in murinen hämatopoetischen Zellen als auch in humanen PBMC, wobei frühe, hier relevante Zeitpunkte betrachtet wurden, bei denen ebenso kein signifikanter Einfluss einer c-Abl-Hemmung auf die Induktion von γ -H2AX festgestellt werden konnte (Abb. 24).

Ebenso konnten in den PBMC innerhalb der untersuchten Zeitpunkte von maximal einer Stunde zwar die Aktivierung von ATR anhand der Phosphorylierung seines Substrats Chk2 festgestellt werden, jedoch kein Effekt der c-Abl-Hemmung (Abb. 26). Zwar konnten Wang *et al.* (2011) eine c-Abl-abhängige Phosphorylierung an ATR identifizieren, jedoch ist noch unklar, inwieweit diese für die Aktivität von ATR bzw. dessen Funktionen von Relevanz ist. Auch Meltser *et al.* (2011) nehmen an, dass c-Abl nicht für die Rekrutierung von ATM und ATR an DNA-Schadensstellen oder die Formierung von Reparaturfoci notwendig ist, sondern vermutlich erst eine Rolle in der späten und nicht in der frühen DNA-Schadensantwort spielt.

Als Zielprotein von ATM und ATR wurde der Transkriptionsfaktor p53 untersucht, welcher jedoch durch eine Imatinib-Behandlung weder in seiner Aktivität noch in seiner Expression beeinflusst wurde (Abb. 27, 28). Zwar gibt es Arbeiten, die auf eine direkte Interaktion zwischen c-Abl und p53 hinweisen, jedoch scheinen auch hier das gewählte Zellsystem und die betrachteten Zeitpunkte von Relevanz zu sein (Wang *et al.*, 2011; Nie *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 1999).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verzögerte SSBR, die hier zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlungsdosis beobachtet wurde, ihre Ursache nicht in der Schadenserkenkung durch ATR- und ATM-Signalwege oder der Zellzyklusregulation hat, weshalb im Folgenden eine detailliertere Untersuchung der an der SSBR beteiligten Proteine durchgeführt wurde.

SSB können direkt durch γ -Strahlung induziert werden, oder während der BER bzw. NER entstehen. In der BER und NER sind SSB eine enzymatische Konsequenz der DNA-Schadensreparatur und stellen somit ein Risiko für die Zelle dar, wenn es während dieser Reparaturmechanismen nicht möglich ist, den Bruch zu detektieren, mittels einer DNA-Polymerase zu füllen und einer DNA-Ligase zu verbinden. Ein Schlüsselprotein in der SSBR ist PARP-1 (siehe 2.3.2; Dantzer *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2002, 2006). Als sehr frühes Ereignis in der Prozessierung der DNA-Einzelstrangbrüche bindet PARP-1 an den Bruch und wird dadurch aktiviert. Infolge der Aktivierung synthetisiert PARP-1 negativ geladene Polymerketten aus ADP-Riboseresten (poly-(ADP-Ribose)ketten, PAR) an Akzeptorproteine wie Histone und

DNA-Reparaturproteine in unmittelbarer Nachbarschaft des SSB, welche dann rapide durch PARG wieder abgespalten werden (Übersicht: Rouleau *et al.*, 2010).

Bereits vor über 20 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von PARP-1 zu einer Verzögerung der Reparatur von durch ionisierende Strahlung induzierten Strangbrüchen führt (Übersicht in Berger, 1985; Oleinick & Evans, 1985). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in Zelllinienmodellen nachweisen, dass Inhibition oder *knock-out* von PARP-1 zu Reparaturdefekten, Zellzyklusstörungen und erhöhter genomischer Instabilität führen (Schreiber *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Menissier de Murcia *et al.*, 1997; Masutani *et al.*, 1999).

Erst seit wenigen Jahren wurde deutlich, dass die Funktion von PARG, die Abspaltung der poly-Ribose-Einheiten, mindestens genauso wichtig für die genomische Stabilität ist wie der Aufbau von PAR durch PARP-1: *knock-out* von PARG in embryonalen Stammzellen oder Mäusen führte zur Hypersensitivität gegen UV- und ionisierende Strahlung (Zhou *et al.*, 2010; Amé *et al.*, 2009; Cortes *et al.*, 2004). Fisher *et al.* (2007) führten alkalische Comet-Assays mit humanen Epithelzellen durch, bei welchen die Expression von PARG oder PARP-1 mittels RNA-Interferenz inhibiert wurden. In beiden Fällen konnte die Arbeitsgruppe eine deutliche Verzögerung der Reparatur feststellen. Ausprägung und Verlauf der Reparatur-Verzögerung sind vergleichbar mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen des alkalischen Comet-Assays, bei denen die Zellen mit Imatinib behandelt wurden. Dies legte die Vermutung nahe, dass möglicherweise die Inhibition von c-Abl durch Imatinib einen Einfluss auf die poly-Ribosylierung von Proteinen in Folge von DNA-Stress haben könnte.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden primäre humane Lymphozyten zunächst auf PARP-1 und PARG-Expression getestet. Wie in Abb. 29 zu sehen ist, sind beide Proteine in allen Ansätzen gleich hoch exprimiert, d.h. das jeweilige Proteinlevel ist unabhängig von DNA-Schaden oder Imatinib-Zugabe. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisherigen Erkenntnissen, dass die Funktionalität von PARP-1 nicht expressions- sondern aktivitätsabhängig ist (Übersicht: Rouleau *et al.*, 2010; Moehring *et al.*, 2005). Daher wurde die Aktivität von PARP-1 und PARG anhand ihres Produkts PAR gemessen. Der Anteil von Zellen, deren Proteine ribosyliert wurden, wurde mittels eines PAR-Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt. Die Spezifität des PAR-Antikörpers und die Effektivität der Methode wurden vorab sowohl durch Isotypenkontrollen (Abb. 30) als auch mittels eines Inhibitor-Versuchs (Abb. 31) gesichert. In Abb. 30 zeigt die Gegenüberstellung der Isotypenkontrolle mit unbestrahlten und unbehandelten PBMCs, dass Zellen auch ohne DNA-Schaden *per se* eine Grundribosylierung aufweisen und dass dies auf fast

alle Zellen über alle Zellzyklusphasen verteilt zutrifft. Einzige Ausnahme bildet eine Subpopulation von Zellen mit einem DNA-Gehalt von $2n$, die nicht PAR-positiv sind. Vermutlich handelt es sich hierbei um Zellen in der Ruhephase G_0 , d.h. um Zellen, die sich außerhalb des Zellzyklus, nicht in Zellteilung befinden und transkriptionell inaktiv sind. In aktiven Zellen, die sich innerhalb des Zellzyklus befinden, spielt PARP-1 neben der SSBR auch in diesen Bereichen eine Rolle (Isabelle *et al.*, 2010; Übersicht: Agarwal *et al.*, 2009). Die vermutlich in der G_0 -Phase befindliche Subpopulation bleibt auch nach einer *high dose* Bestrahlung mit 30 Gy PAR-negativ (Abb. 31), während alle Zellen der übrigen Zellzyklusphasen eine starke poly-(ADP-Ribosyl)ierung aufweisen. Diese Ribosylierung konnte mit dem PARP-1-Inhibitor PJ34 komplett gehemmt werden, wodurch die Spezifität des Antikörpers und damit der Methode erwiesen wurde. In den funktionellen Versuchen mit humanen PBMCs konnten sowohl nach *high dose*-Bestrahlung (30 Gy) als auch nach *low dose* (5 Gy) mit oder ohne Imatinib-Inkubation direkt nach der Bestrahlungsdosis eine starke PAR-Induktion festgestellt werden, welche bis zum Zeitpunkt 40 min fast auf das Ausgangslevel zurückging (Abb. 32A). Diese Ergebnisse bestätigten auch die Beobachtungen von Aguilar-Quesada *et al.* (2007), die ebenfalls humane Zellen bestrahlten (10 Gy) und übereinstimmend mit den hier beschriebenen Ergebnissen eine maximale PAR-Induktion direkt nach Bestrahlung feststellen konnten, welche dann bis zum Zeitpunkt 60 min auf das Ausgangslevel zurückging. Mit dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass die Imatinib-vermittelte Hemmung von *c-Abl* die poly-Ribosylierung von Proteinen *per se* als auch nach Bestrahlung beeinflusst. Unabhängig von der Position im Zellzyklus sind nach Imatinib-Behandlung mehr Zellen PAR-positiv. Wie die durchflusszytometrische Analyse (Abb. 32B) als auch die Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 32C) zeigt, scheint auch die Stärke der Ribosylierung in den einzelnen Zellen unterschiedlich zu sein.

Für PARG existieren mehrere *Splice*-Varianten von einem einzigen *parg*-Gen, wobei nur das *full-length* PARG-Protein ein nukleäres Transportsignal enthält, wodurch es nach DNA-Schaden aus dem Zytoplasma in den Nukleus translozieren kann (Meyer *et al.*, 2007; Meyer-Ficca *et al.*, 2004). Somit stellt das Zusammenspiel von PARP-1 und PARG und damit die Ribosylierung ein zeitlich und räumlich streng moduliertes System dar (Rancourt & Satoh, 2009; Bonicalzi *et al.*, 2005; Shimokawa *et al.*, 1999). Eine kinetische Beobachtung der Ribosylierungsabläufe wird durch die extrem schnellen PAR-Prozesse erschwert: poly-Ribosylierung durch PARP-1 und Deribosylierung durch PARG laufen mit einer Halbwertszeit von nur ein bis zwei Minuten ab (Alvarez-Gonzales & Althaus, 1989; Parsons *et al.*, 2005). Umfangreiche Interaktom-Analyse von PARP-1 und PARG, bei welcher weit über hundert bereits bekannte Interaktionspartner

bestätigt bzw. neu identifiziert wurden (Isabelle *et al.*, 2010), konnten zwar bisher keine direkte Interaktion von PARP-1 oder PARG mit c-Abl nachweisen, jedoch kann bereits eine indirekte Beeinflussung dieses räumlich und zeitlich hochempfindlichen Systems zu dessen Destabilisierung führen. Denkbar wäre auch ein Einfluss der c-Abl-Aktivität auf die Formation der PAR-Ketten. Fahrer *et al.* (2007) konnten zeigen, dass Verzweigung und Länge der an die Proteine gehefteten poly-Riboseketten zu unterschiedlichen funktionellen Folgen führen kann. Da bisher unbekannt ist, unter welchen Bedingungen PAR linear oder verzweigt synthetisiert wird, bzw. ob daran evtl. weitere Proteine außer PARP-1 selbst beteiligt sind, lässt sich schwer sagen, wie ein Einfluss der c-Abl-Aktivität hier aussehen könnte. Denkbar wären c-Abl-abhängige Phosphorylierungsstellen an PARP-1 oder möglichen beteiligten Proteinen, welche funktionell wirksame Konformationsänderungen induzieren.

Als einem der ersten und wichtigsten Interaktionspartner von PARP-1 wurden in der Arbeitsgruppe bereits erste Untersuchungen von XRCC1 bezüglich dessen Aktivität und intrazellulärer Lokalisation in Abhängigkeit von Imatinib durchgeführt. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch Bestrahlung die Phosphorylierung von XRCC1 induziert wird. Diese Induktion scheint durch Imatinib-Zugabe bei der Kultivierung der PBMC leicht verzögert zu sein. Caldecott konnte in der eigenen Arbeitsgruppe und in Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen Co-Lokalisationen von XRCC1 und PAR als Folge von oxidativem Stress durch H₂O₂ oder UV-Strahlung nachweisen (Okano *et al.*, 2003; El-Khamisy *et al.*, 2003; Loizou *et al.*, 2004). In ersten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte eine solche Co-Lokalisation nach γ -Strahlung bisher jedoch nicht gezeigt werden. Keil *et al.* (2006) konnten im Zelllinienmodell auch für PARG eine Interaktion mit XRCC1 nachweisen. PARP-1 spielt nicht nur eine zentrale Rolle in der SSB, sondern auch im *short-patch*-Signalweg der BER, in welchem es mit einigen Schlüsselproteinen wie DNA-Polymerase β , DNA-Ligase III und XRCC1 interagiert (Dantzer *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2002, 2006). Somit scheint eine detailliertere Analyse der Interaktionen und Aktivitäten von PARP-1 und PARG diesen Schlüsselproteinen und weiterer, mit der SSB-Reparatur bzw. der BER assoziierter Proteine in Zusammenhang mit einer Imatinib-Behandlung sinnvoll zu sein. Hypothetische Überlegungen dazu sind in Abb. 34 skizziert.

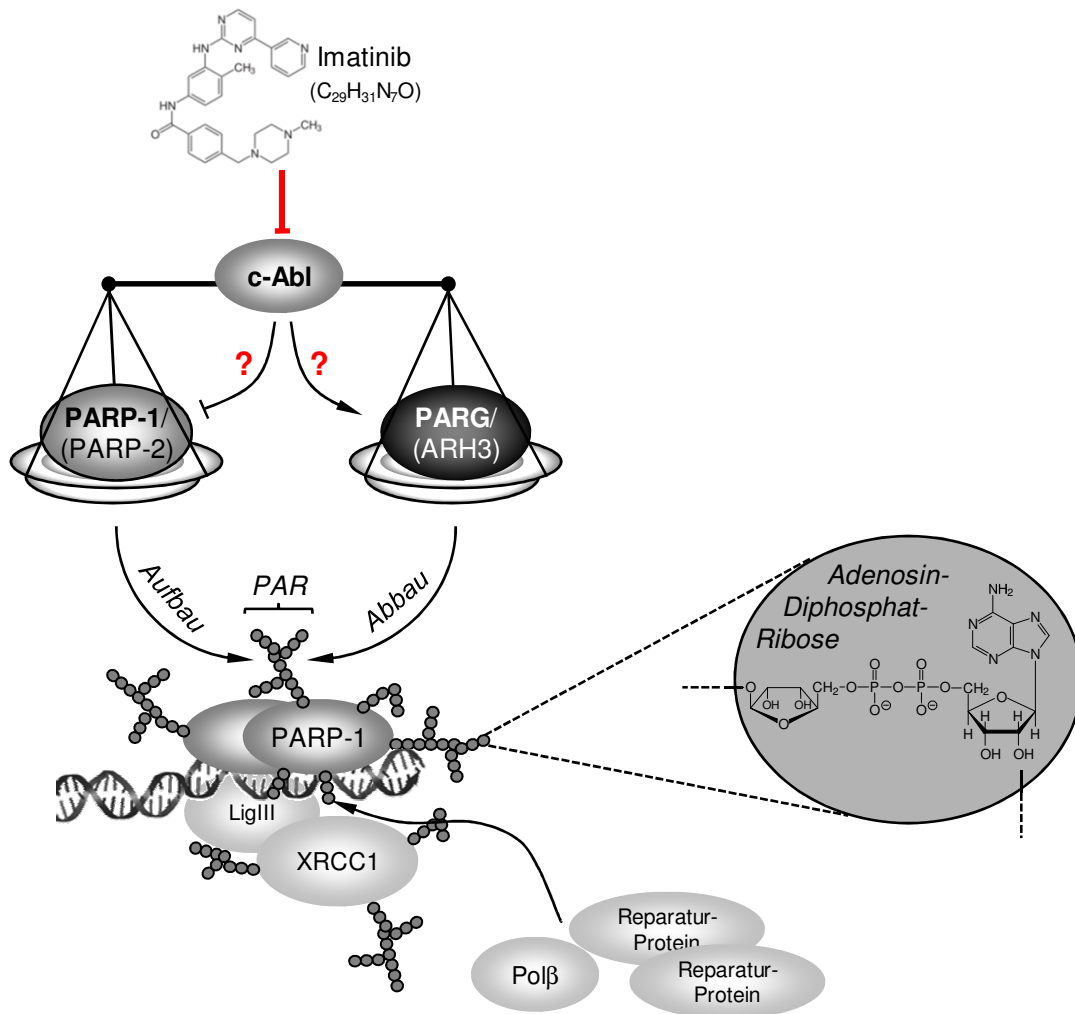


Abbildung 34: c-Abl beeinflusst das Gleichgewicht der Aktivitäten von PARP-1 bzw. PARP-2 und PARG bzw. ARH3. In Folge von DNA-Stress dimerisieren PARP-1 und/ oder PARP-2 an Einzelstrangbrüchen und poly-(ADP-ribosyl)iert sich selbst und weitere nukleäre Proteine. Dies ist Voraussetzung für die Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturproteine an den Bruch. PARG und/ oder ARH3 spalten bereits kurz nach der Polymerisierung PAR wieder von den Akzeptorproteinen ab. Die Hemmung von c-Abl durch Imatinib führt zu einer Deregulation dieser Prozesse.

5.6 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Kinaseaktivität von c-Abl durch Imatinib eine gesteigerte Mutationsfrequenz in Bcr-Abl-negativen Zellen induziert. Womit belegt ist, dass nicht nur die Hemmung von Bcr-Abl, sondern auch die Hemmung eines physiologischen Targets von Imatinib einen wichtigen Einfluss auf die genetische Stabilität hat. Dies ist vor allem in Bcr-Abl-positiven Imatinib-resistenten Zellen von Bedeutung: neben dem

Bcr-Abl-Transkript enthalten diese Zellen auch immer ein c-Abl-Transkript, wodurch die *per se* durch die Bcr-Abl-Aktivität erhöhte Mutationsfrequenz durch die Hemmung der c-Abl-Kinase noch weiter erhöht wird (Fanta *et al.*, 2008; van der Kuip *et al.*, 2004). Dies ist von hoher klinischer Relevanz und unterstreicht die Wichtigkeit eines ständigen Screenings Imatinib-behandelter CML-Patienten und Bcr-Abl-positiver ALL-Patienten auf bereits vorhandene oder neu auftretende Imatinib-Resistenzen. Bei Vorliegen einer solchen sollte unmittelbar Imatinib abgesetzt werden. Zurzeit werden im regelmäßigen CML-Monitoring nur Parameter bezüglich des Krankheitsverlaufs und des Bcr-Abl-Status geprüft, erst bei dort auftretenden Verschlechterungen wird eine Analyse von Mutationen in der Kinasedomäne von Bcr-Abl indiziert (vergleiche: von Bubnoff & Duyster, 2010; Hughes & Branford, 2009). In einer Studie wurden CML-Patienten über zwei Jahre zweimal jährlich auf Mutationen getestet (Khorashad *et al.*, 2008). Die Autoren kamen zu der Folgerung, dass ein Mutationsscreening für alle CML-Patienten nicht ökonomisch ist, jedoch durchaus für alle CML-Patienten umsetzbar wäre, die noch Bcr-Abl-Transkripte aufweisen. In einem weiteren Ansatz wurde ein regelmäßiges Screening mittels D-HPLC getestet, jedoch blieb hier die Frage nach der Spezifität und der Effektivität offen (Ernst *et al.*, 2008). Auf jeden Fall sollten Patienten insoweit aufgeklärt werden, dass sie unter Therapie möglichst „mutagene Situationen“, wie z. B. exzessives Sonnenbaden und Rauchen vermeiden sollten.

In vorangegangenen Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass im Todesprozess, der durch Imatinib in Bcr-Abl-positiven Zellen ausgelöst wird, die PARP-Aktivität eine wichtige Rolle spielt (Moehring *et al.*, 2005). Es ist somit nicht überraschend, dass auch die c-Abl-Hemmung durch Imatinib dieses System beeinträchtigt. Daher wäre es sicherlich von Interesse, zu untersuchen, ob die Ribosylierung von Proteinen in Krankheiten mit dereguliertem Abl verändert ist, vor allem, da Ribosylierungsereignisse nicht nur im Kern, sondern auch in den Mitochondrien stattfinden (vergleiche Übersicht in Hakmé *et al.*, 2008). Mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen konnte nun erstmals gezeigt werden, dass auch die Imatinib-induzierte Hemmung der c-Abl-Aktivität in Bcr-Abl-negativen Zellen einen Einfluss auf die PARP- und/oder die PARG-Aktivität hat. Gegenstand weiterer Untersuchungen ist daher die Klärung biochemischer Mechanismen und des Zusammenhangs der PARP-/PARG-Aktivität mit der Imatinib-vermittelten Verzögerung der SSBR. Zu klären wäre nun die Frage, ob diese Imatinib-abhängige Erhöhung PAR-positiver Zellen das Resultat einer Steigerung der PARP-1-Aktivität oder einer Hemmung der PARG-Aktivität ist, oder ob weitere Faktoren hier eine Rolle spielen. Zwar wurde neben PARP-1 auch für PARP-2 eine Funktion in der SSBR nachgewiesen, jedoch

scheint PARP-2 nur zu einem sehr geringen Anteil von nicht mehr als 15 % für die poly-(ADP-Ribosyl)ierung nach DNA-Schaden verantwortlich zu sein (Sallmann *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 1998), womit die weit größeren Unterschiede der Ribosylierung mit oder ohne Hemmung durch Imatinib kaum zu erklären wären. Auch die Rolle von PARG wäre zu verifizieren. Zu klären wäre außerdem, ob für die Abspaltung von PAR tatsächlich ausschließlich PARG verantwortlich ist. Ebenso enzymatisch aktiv gegen PAR ist die ADP-Ribosylhydrolase 3 (ARH3), allerdings weit weniger effizient als PARG (Oka *et al.*, 2006). Die PARG-Aktivität von ARH3 wurde nur *in vitro* nachgewiesen, es liegen bisher keine Informationen über die ARH3-Aktivität bzw. deren Effizienz im Kern lebender Zellen vor.

Neben der Klärung der molekularen Mechanismen der c-Abl-Hemmung durch Imatinib und deren Auswirkung auf die genetische Stabilität ist nachdrücklich zu betonen, dass das vorrangige Ziel der CML-Therapie die Heilung sein sollte, also die komplette Vernichtung des malignen Klons, um die Imatinib-Behandlung zu verkürzen. Eine langfristige, möglicherweise lebenslange Therapie mit Imatinib ist nicht nur mit zum Teil unangenehmen Nebenwirkungen verbunden, sondern kann durch die in dieser Arbeit beschriebenen Phänomene zu sekundären Neoplasien führen. Verschiedene Studien beschäftigen sich zur Zeit mit möglichen Ansätzen, wie einer initialen hochdosierten Imatinib-Therapie, das Einsetzen von Thyrosinkinase-Inhibitoren der zweiten Generation als Erstlinien-Therapie oder der Kombination von Imatinib mit weiteren Agenzien, v.a. Interferon α (zur Übersicht vergleiche: Fava & Saglio, 2010). Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten Skorta *et al.* (2009) nachweisen, dass die Kombinationstherapie von Imatinib mit Cisplatin eine Möglichkeit sein könnte, hochselektiv die Sensitivität Bcr-Abl-positiver Zellen gegen Chemotherapie stark zu erhöhen.

Imatinib wird nicht nur in der Therapie der CML, sondern auch in der Therapie der GIST (Gastrointestinale Stromatumore) und in der Bcr-Abl-positiven ALL (Akute Lymphatische Leukämie) eingesetzt. Indikator von GIST ist die Expression von c-Kit (alternative Bezeichnung: CD117), welches hier neben dem PDGF-Rezeptor α (PDGFR α) als Ziel der Imatinib-Therapie dient (Singer *et al.*, 2002; van Oosterom *et al.*, 2001; Sakurai *et al.*, 1990). Wie bei der CML ist auch bei GIST nach dem bisherigen Stand der Studien keine Heilung möglich, was auch hier eine langfristige bis lebenslange Imatinib-Therapie bedeutet, bei welcher meist bereits nach zwei bis drei Jahren Imatinib-Resistenzen auftreten (Übersicht in: George & Trent, 2011). Inwieweit die hier gefundenen Ergebnisse auch auf diese Erkrankungen übertragbar wären, wäre sicherlich von Interesse.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Einführung von Imatinib (Glivec[®], Gleevec[®], STI571) im August 2001 bedeutete einen entscheidenden Fortschritt in der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML). Der *small-molecule*-Inhibitor greift direkt die onkogene Bcr-Abl-Tyrosinkinase an, welche als ursächliches Ereignis der Pathogenese der CML identifiziert wurde. Zwar hat sich Imatinib als Goldstandard der Primärtherapie der CML etabliert, jedoch ist nach aktuellem Forschungsstand keine Eliminierung des malignen Bcr-Abl-positiven Klons durch die Imatinib-Therapie möglich, weshalb eine langfristige, möglicherweise lebenslange Imatinib-Behandlung der Patienten notwendig ist. In der Konsequenz ist es von großem Interesse, die biologischen Effekte von Imatinib auf physiologisch normale Zellen zu klären.

In Vorarbeiten zu dieser Studie konnte die Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Behandlung mit Imatinib in Bcr-Abl-positiven Zellen zu einer Verminderung der Mutationsfrequenz nach DNA-Schädigung führt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Behandlung nicht-karzinogener primärer humaner Lymphozyten (PBMC) und muriner hämatopoetischer Zelllinien (32D und BaF3) mit Imatinib die Mutationsraten nach DNA-Schädigung deutlich erhöht. Damit hat Imatinib in Bcr-Abl-negativen Zellen den gegenteiligen Effekt wie in Bcr-Abl-positiven Zellen. Somit wurde belegt, dass nicht nur die Hemmung von Bcr-Abl durch Imatinib, sondern in Bcr-Abl-negativen Zellen auch die Hemmung einer physiologischen Zielstruktur von Imatinib eine wichtige Rolle für die genetische Stabilität spielt. Zur Untersuchung, ob der Bcr-Abl-unabhängige Effekt auf eine Hemmung der c-Abl-Aktivität durch Imatinib zurückzuführen ist, wurden die Experimente zur Stress-induzierten Mutationsfrequenz an genetischen c-Abl-Modellen durchgeführt. Hierfür wurden c-Abl-*knockout*-MEFs (embryonale Mausfibroblasten) verwendet, welche mit einer Wildtyp-Form von c-Abl bzw. einer Kinase-defekten Variante retransfiziert wurden. Die Mutationsfrequenz nach DNA-Schädigung ist in Zellen mit Kinase-defektem c-Abl (MEF Abl-KD) im Vergleich zu den c-Abl-wt-Zellen (MEF Abl-wt) signifikant erhöht, was bedeutet, dass die c-Abl-Aktivität tatsächlich von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ist.

Ursächlich für eine erhöhte Mutationsfrequenz in Zellen können unterschiedliche Faktoren, wie beispielsweise eine veränderte Proliferation der Zellen, gestörte DNA-Reparaturmechanismen oder eine verzögerte Induktion von Zelltod sein, welche dazu führen, dass die DNA-Schäden nicht oder nicht korrekt repariert und an die Tochterzellen weitergegeben werden. In dieser Arbeit konnte in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien gezeigt werden, dass weder die

pharmakologische noch die genetische Hemmung der c-Abl-Aktivität einen Einfluss auf die Zelltod-Induktion, Teilungsraten, Teilungsfähigkeit (*Cloning Efficiency*) und Zellzyklusverteilung der Zellen hat.

Um zu untersuchen, inwieweit Imatinib die Kinetik der DNA-Strangbruchreparatur nach Bestrahlung beeinflusst, wurden alkalische Comet-Assays durchgeführt. Zwar konnte weder auf die Induktion von Strangbrüchen, noch auf konstitutive Strangbrüche vor Bestrahlung ein Einfluss von Imatinib festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine signifikante Verzögerung der DNA-Strangbruchreparatur in Imatinib-behandelten Zellen. Diese Verzögerung konnte in hämatopoetischen Zelllinien-Modellen und in primären humanen Lymphozyten in analoger Weise sowohl nach Behandlung mit Imatinib als auch mit Dasatinib, einem Abl-Inhibitor der zweiten Generation, nachgewiesen werden. Unter Verwendung von Zelllinien-Modellen mit verschiedenen c-Abl-Varianten konnte der Nachweis erbracht werden, dass dieser Effekt tatsächlich durch die Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität verursacht wird: Die verzögerte Strangbruchreparatur konnte in Zellen mit Kinase-defektem c-Abl (MEF Abl-KD) ebenso gezeigt werden, während die Behandlung mit Imatinib keinen Effekt auf die Reparaturkinetik von Zellen zeigte, welche eine Imatinib-resistente Variante von c-Abl (c-Abl T315I) exprimieren.

Unter alkalischen Bedingungen werden im Comet-Assay sowohl Doppel- (DSB) als auch Einzelstrangbrüche (SSB) erfasst. Zur selektiven Analyse ausschließlich der DSB-Reparatur wurde der Assay daher auch unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Verglichen mit der SSB-Induktion konnte zwar eine erwartungsgemäß deutlich geringere Induktion von DSB nach Bestrahlung festgestellt werden, jedoch zeigte Imatinib weder bei der Induktion noch bei der Reparaturkinetik der DSB einen Einfluss. Mit Hilfe zweier weiterer Methoden, der Pulsfeld-Gelelektrophorese und der Quantifizierung von γ -H2AX, konnte bestätigt werden, dass Imatinib keine Auswirkung auf die DSB-Reparatur hat, sondern ausschließlich eine Imatinib-abhängige Beeinflussung der SSB-Reparatur verantwortlich für die verzögerte Reparaturkinetik der Zellen ist.

Umfangreiche Untersuchungen der molekularen Signalwege der DNA-Schadensprozessierung zeigen, dass die Hemmung der c-Abl-Aktivität keinen Einfluss auf den ATM-Chk2-p53- oder den ATR-Chk1-Weg hat. Ein sehr frühes Ereignis in der Prozessierung der SSB-Reparatur stellt die poly-(ADP-Ribosyl)ierung von Proteinen dar. Diese Protein-Modifizierung mit langen, verzweigten poly-(ADP-Ribose)ketten (PAR) ist ein essentieller Bestandteil der SSB-Reparatur und der *base excision repair* (BER). Synthese und Abspaltung von PAR werden vermittelt durch die

Kinasen PARP-1 (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1) und PARG (Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase). Diese Aktivität wurde anhand der Quantifizierung von PAR und der Bestimmung des Anteils der Zellen, welche zu einem bestimmten Zeitpunkt PAR-positiv waren, bestimmt. Zur Untersuchung möglicher Effekte der c-Abl-Hemmung durch Imatinib auf die poly-Ribosylierung wurde zunächst eine Methode entwickelt, um PAR-Ereignisse auf Einzelzell-Ebene nachzuweisen. Hierzu wurden die Poly-Ribosereste durch einen spezifisch gegen PAR gerichteten Antikörper markiert und mittels Fluorochrom-gekoppeltem sekundären Antikörper detektiert. Die Spezifität dieser Methode konnte eindeutig nachgewiesen werden anhand des kompletten Verlusts der Bestrahlungs-induzierten Ribosylierung nach Behandlung der Zellen mit einem bekannten spezifischen PARP-Inhibitor (PJ34). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass durch die gleichzeitige Bestimmung des DNA-Gehalts in jeder Zelle die Ribosylierungsereignisse in Abhängigkeit von der Verteilung im Zellzyklus analysiert werden können. Anhand dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass Imatinib-behandelte Zellen sowohl konstitutiv als auch induziert durch γ -Strahlung deutlich stärker poly-ribosyliert sind. Außerdem führt die Bestrahlung zu einem gegebenen Zeitpunkt nur bei einem Teil der Zellen zu Poly-Ribosylierung: Eine Subpopulation von Zellen, die sich vermutlich in der Ruhephase G_0 befindet, bleibt sowohl vor als auch nach Bestrahlung PAR-negativ. In der vorliegenden Arbeit wurden damit erstmals Ribosylierungsereignisse vor und nach DNA-Schädigung in Zusammenhang mit der Verteilung im Zellzyklus gezeigt und zudem deren Abhängigkeit von der Imatinib-vermittelten c-Abl-Hemmung. Die Hemmung der Kinaseaktivität von c-Abl scheint somit zu einem verzögerten Abbau von PAR zu führen, was entweder durch eine verminderte Aktivität des PARP-1-Gegenspielers PARG oder durch eine erhöhte Aktivität von PARP-1 selbst verursacht wird. Eine Störung des räumlich und zeitlich eng modulierten Auf- und Abbaus von PAR kann zu einer verlängerten Interaktion von PARP-1 mit Reparaturproteinen der SSB-Reparatur oder der BER führen, wie z. B. XRCC1 und DNA-Polymerase β , und somit die beobachtete verzögerte DNA-Schadensreparatur verursachen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit neue Erkenntnisse über den Einfluss von Imatinib auf Bcr-Abl-negative Zellen gewonnen werden. Die hier gewonnenen *in vitro*-Daten deuten darauf hin, dass eine lang andauernde Behandlung mit c-Abl-Inhibitoren mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit sekundärer Neoplasien verbunden sein könnte. Trotz der hervorragenden Erfolge der Imatinib-Behandlung bei CML-Patienten in chronischer Phase sollte deshalb die vollständige Elimination des malignen Klons das vorrangige Ziel der Behandlung Bcr-Abl-positiver Leukämien sein.

7 SUMMARY

The launch of Imatinib (Glivec[®], Gleevec[®], STI571) in August 2001 was an important advancement in the therapy of chronic myeloid leukemia (CML). The small-molecule inhibitor directly targets the oncogenic tyrosine kinase Bcr-Abl, which has been identified as the central cause for the development of CML. Treatment with Imatinib is the gold standard in the therapy of CML. However, taking the current state of research, an elimination of the malignant Bcr-Abl-positive clone cannot be achieved by treatment with Imatinib. Thus, long-term or even lifelong treatment of patients is necessary. As a consequence, it is of great interest to clarify the biological effects of Imatinib on physiologically normal cells.

Previous studies of the group showed that Imatinib treatment of Bcr-Abl-positive cells leads to a decreased mutation frequency following DNA damage. Within the scope of the present work, evidence for significantly enhanced mutation rates after DNA damage in non-cancerogenic primary human lymphocytes (PBMC) and murine hematopoietic cell lines (32D and BaF3) after Imatinib treatment was obtained for the first time. Thus, Imatinib treatment of Bcr-Abl-negative cells shows opposite effect compared to Bcr-Abl-positive cells. It was therefore proven that the Imatinib-related inhibition of Bcr-Abl as well as the off-target effects in Bcr-Abl-negative cells play an important role in the genetic stability. To determine whether an Imatinib-mediated inhibition of c-Abl activity is responsible for effects independent of Bcr-Abl, genetic c-Abl models were used to assess stress-induced mutation frequency. To this, we employed c-Abl-knockout-MEFs (embryonic mouse fibroblasts), which were retransfected with wild type c-Abl and a kinase-deficient form, respectively. After DNA damage, there was a significant increase in mutation frequency in the kinase-deficient cells (MEF Abl-KD) when compared to the c-Abl wild type (MEF Abl-wt) cells. Consequently, c-Abl activity is of great importance for the maintenance of genetic stability.

Several factors can result in an increased mutation frequency in cells. Examples include altered cell proliferation, impaired DNA repair mechanisms or a delayed induction of cell death. In the latter case, DNA damage is not adequately repaired and passed to the daughter cells. In this study, different hematopoietic cell lines were used to show that neither the pharmacological nor the genetic inhibition of c-Abl activity has an influence on induction of cell death, division rate, cloning efficiency and cell cycle distribution.

To investigate how far Imatinib influences the kinetics of DNA strand break repair after

irradiation, alkaline comet assays were performed. Imatinib treatment of cells had no influence on induction of strand breaks or constitutive strand breaks prior to irradiation. However, cells treated with Imatinib exhibited a significantly delayed repair of DNA strand breaks. This delay was shown in the same manner in hematopoietic cell line models and in primary human lymphocytes, which were treated with Imatinib as well as with Dasatinib, a second generation Abl-inhibitor. Cell line models with different forms of c-Abl were used to provide evidence that this effect is caused by inhibition of the c-Abl kinase activity. The delayed repair of DNA strand breaks was also seen in cells with a kinase-deficient form of c-Abl (MEF Abl-KD). But treatment with Imatinib had no effect on the kinetics of DNA repair in cells that expressed an Imatinib-resistant form of c-Abl (c-Abl T315I).

Double- (DSB) as well as single-strand breaks (SSB) are determined in an alkaline comet assay. By applying neutral conditions, this assay can be modified to exclusively analyze DSB repair. As expected, there was a significantly lower induction of DSB after irradiation when compared to the occurrence of SSB. However, Imatinib did neither influence the induction nor the kinetics of DSB repair. Both pulsed-field gel electrophoresis and the quantification of γ -H2AX were used to confirm that Imatinib does not affect DSB repair. Rather, the delayed repair kinetics are exclusively caused by an Imatinib-dependent interference with SSB repair.

Extensive investigations of the molecular signaling pathways of DNA damage repair show that inhibition of c-Abl activity does not affect ATM-Chk2-p53 or ATR-Chk1 signaling. Poly(ADP-ribose)ylation of proteins is an early event in the processing of the SSB repair. This modification of proteins by addition of long and branched poly(ADP-ribose) chains (PAR) is an essential part of the SSB repair and base excision repair (BER). Both the synthesis and the cleavage of PAR is mediated by the kinases PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) and PARG (poly(ADP-ribose) glycohydrolase). This activity was determined by quantification of PAR and the percentage of cells, which were PAR-positive at a certain time. Possible effects of an Imatinib-induced inhibition of c-Abl on poly(ADP-ribose)ylation were investigated. To this, a method for the measurement of PAR events on a single-cell level was established. Poly(ADP-ribose) residues were marked with a PAR-specific antibody and detection followed by means of a fluorochrome-conjugated secondary antibody. The specificity of the method was proven unequivocally by a complete loss of signal when a specific PARP inhibitor (PJ34) was applied prior to irradiation-induced ribosylation. The advantage of this method is that the simultaneous determination of the DNA content in every cell allows the analysis of ribosylation events in correlation with cell cycle distribution. Based on these experiments it was found that in Imatinib-

treated cells both the constitutive and the irradiation-induced poly-ribosylation are significantly enhanced. Furthermore, irradiation does not result in poly-ribosylation of all cells at a certain time: A subpopulation of cells, presumably those in the G₀ resting phase, remain PAR-negative before and after irradiation. Thus, a novelty of the work at hand lies in the correlation of ribosylation events and cell cycle distribution before and after DNA damage. In this context, the central role of the Imatinib-mediated inhibition of c-Abl could also be established. The inhibited kinase activity of c-Abl seems to cause a delayed degradation of PAR. This is either caused by decreased activity of the PARP-1 antagonist PARG or by increased activity of PARP-1 itself. A disturbance of the spatially and temporally tightly modulated synthesis and degradation of PAR may lead to a prolonged interaction of PARP-1 with proteins related to SSB repair or BER, e.g. XRCC1 and DNA polymerase β , thus resulting in the observed delay in DNA damage repair.

The present study provides new insights into the impact of Imatinib on Bcr-Abl-negative cells. The obtained *in vitro* data suggest that long-term treatment with c-Abl inhibitors may be associated with an increased likelihood of secondary neoplasias. Despite the outstanding success in Imatinib treatment of CML patients in the chronic phase, the complete elimination of the malignant clone should be the primary goal of the treatment of Bcr-Abl-positive leukemias.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aboussekhra A**, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protić M, Hübscher U, Egly JM, Wood RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*. 1995; 80(6): 859-868
- Abraham RT**. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*. 2001; 15(17): 2177-2196
- Agarwal A**, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7:143
- Aguiar-Quesada R**, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Matínez-Romero R, Quiles-Pérez R, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Ruiz de Almodóvar M, Oliver FJ. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol Biol*. 2007; 8: 29
- Ahn JY**, Schwarz JK, Piwnica-Worms H, Canman CE. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*. 2000; 60(21): 5934-5936
- Allinson SL**, Dianova II, Dianov GL. DNA polymerase beta is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts. *EMBO J*. 2001; 20(23): 6919-6926
- Alvarez-Gonzalez R**, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. *Mutat Res* 1989; 218(2): 67-74
- Amé JC**, Fouquerel E, Gauthier LR, Biard D, Boussin FD, Dantzer F, de Murcia G, Schreiber V. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 12): 1990-2002
- Andersen MK**, Pedersen-Bjergaard J, Kjeldsen L, Dufva IH, Brøndum-Nielsen K. Clonal Ph-negative hematopoiesis in CML after therapy with imatinib mesylate is frequently characterized by trisomy 8. *Leukemia*. 2002; 16(7): 1390-1393
- Atallah E**, Kantarjian H, Cortes J. Emerging safety issues with imatinib and other Abl tyrosine kinase inhibitors. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007; 7 Supplement 3: 105-112
- Bacher U**, Hochhaus A, Berger U, Hiddemann W, Hehlmann R, Haferlach T, Schoch C. Clonal aberrations in Philadelphia chromosome negative hematopoiesis in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib or interferon alpha. *Leukemia*. 2005; 19(3): 460-463
- Bakkenist CJ**, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 2003; 421(6922): 499-506
- Banin S**, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*. 1998; 281(5383): 1674-1677
- Barilá D**, Superti-Furga G. An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet*. 1998; 18(3): 280-282
- Bartek J**, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19(2): 238-245
- Baskaran R**, Wood LD, Whitaker LL, Canman CE, Morgan SE, Xu Y, Barlow C, Baltimore D,

- Wynshaw-Boris A, Kastan MB, Wang JYJ. Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature*. 1997;387: 516–519
- Baumann P**, Benson FE, West SC. Human Rad51 protein promotes ATPdependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*. 1996; 87: 757-766
- Bekkenk MW**, Vermeer MH, Meijer CJ, Jansen PM, Middeldorp JM, Stevens SJ, Willemze R. EBV-positive cutaneous B-cell lymphoproliferative disease after imatinib mesylate. *Blood*. 2003 Dec 1;102(12):4243
- Ben-Neriah Y**, Bernardis A, Paskind M, Daley GQ, Baltimore D. Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell*. 1986; 44(4): 577-586
- Bennett SE**, Sung JS, Mosbaugh DW. Fidelity of uracil-initiated base excision DNA repair in DNA polymerase beta-proficient and -deficient mouse embryonic fibroblast cell extracts. *J Biol Chem*. 2001; 276(45): 42588-42600
- Bennett RA**, Wilson DM 3rd, Wong D, Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(14): 7166-7169
- Berger NA**. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res*. 1985; 101(1): 4-15
- Blaisdell JO**, Harrison L, Wallace SS. Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions. *Radiat Prot Dosimetry*. 2001; 97(1): 25-31
- Blankart CR**, Stargardt T, Schreyögg J. Availability of and access to orphan drugs: an international comparison of pharmaceutical treatments for pulmonary arterial hypertension, Fabry disease, hereditary angioedema and chronic myeloid leukaemia. *Pharmacoeconomics*. 2011; 29(1): 63-82
- Bliss TM**, Lane DP. Ku selectively transfers between DNA molecules with homologous ends. *J Biol Chem*. 1997; 272(9): 5765-5773
- Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254
- Branford S**, Rudzki Z, Walsh S, Grigg A, Arthur C, Taylor K, Herrmann R, Lynch KP, Hughes TP. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood*. 2002; 99(9): 3472-3475
- Brasher BB**, Van Etten RA. c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem*. 2000; 275(45): 35631-35637
- Breitscheidel L**. Cost utility of allogeneic stem cell transplantation with matched unrelated donor versus treatment with imatinib for adult patients with newly diagnosed chronic myeloid leukaemia. *J Med Econ*. 2008; 11(4): 571-584
- Buchdunger E**, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Müller M, Druker BJ, Lydon NB. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996; 56(1): 100-104
- Burma S**, Chen DJ. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3(8-9): 909-918
- Burton EA**, Plattner R, Pendergast AM. Abl tyrosine kinases are required for infection by

- Shigella flexneri. *EMBO J.* 2003; 22(20): 5471-5479
- Byun TS**, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA. Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 2005; 19(9): 1040-1052
- Cadet J**, Bellon S, Douki T, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Pouget JP, Ravanat JL, Romieu A, Sauvaigo S. Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2004; 23(1): 33-43
- Cadet J**, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res.* 2003; 531(1-2): 5-23
- Caldecott KW**, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24(22): 4387-4394
- Canitrot Y**, Lautier D, Laurent G, Fréchet M, Ahmed A, Turhan AG, Salles B, Cazaux C, Hoffmann JS. Mutator phenotype of BCR--ABL transfected Ba/F3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase beta. *Oncogene.* 199; 18(17): 2676-2680
- Canman CE**, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science.* 1998; 281(5383): 1677-1679
- Carroll M**, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood.* 1997; 90(12): 4947-4952
- Chan DW**, Lees-Miller SP. The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem.* 1996; 271(15): 8936-8941
- Chen G**, Yuan SS, Liu W, Xu Y, Trujillo K, Song B, Cong F, Goff SP, Wu Y, Arlinghaus R, Baltimore D, Gasser PJ, Park MS, Sung P, Lee EY. Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J Biol Chem.* 1999; 274(18): 12748-12752
- Choi SY**, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Soh JW, Kim JH, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase C delta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem.* 2006 281(11): 7049-7059
- Ciavatta D**, Kalantry S, Magnuson T, Smithies O. A DNA insulator prevents repression of a targeted X-linked transgene but not its random or imprinted X inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(26): 9958-9963
- Cohen MH**, Williams G, Johnson JR, Duan J, Gobburu J, Rahman A, Benson K, Leighton J, Kim SK, Wood R, Rothmann M, Chen G, U KM, Staten AM, Pazdur R. Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(5): 935-942
- Compton SJ**, Jones, CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem.* 1985; 151: 369-374
- Corbin AS**, Agarwal A, Loriaux M, Cortes J, Deininger MW, Druker BJ. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest.* 2010. pii: 35721. doi: 10.1172/JCI35721

- Cortes U**, Tong WM, Coyle DL, Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Petrilli V, Herceg Z, Jacobson EL, Jacobson MK, Wang ZQ. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(16): 7163-7178
- Cortez D**, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 2001; 294(5547): 1713-1716.
- Cowan-Jacob SW**, Guez V, Fendrich G, Griffin JD, Fabbro D, Furet P, Liebetanz J, Mestan J, Manley PW. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4(3): 285-299
- Daley GQ**, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990; 247(4944): 824-830
- Dantzer F**, de la Rubia G, Ménissier-De Murcia J, Hostomsky Z, De Murcia G, Schreiber V. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Biochemistry*. 2000; 39(25):7559-7569.
- Deininger MW**, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000; 96(10): 3343-3356
- Deininger MW**, O'Brien SG, Ford JM, Druker BJ. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J Clin Oncol*. 2003; 21(8): 1637-1647
- Deininger MW**. Basic science going clinical: molecularly targeted therapy of chronic myelogenous leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004; 130(2): 59-72
- Demple B**, Herman T, Chen DS. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(24): 11450-11454
- Dianov GL**, Prasad R, Wilson SH, Bohr VA. Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*. 1999; 274(20): 13741-13743
- Dias SS**, Milne DM, Meek DW. c -Abl phosphorylates Hdm2 at tyrosine 276 in response to DNA damage and regulates interaction with ARF. *Oncogene*. 2006; 25(50): 6666-6671
- Drapkin R**, Reardon JT, Ansari A, Huang JC, Zawel L, Ahn K, Sancar A, Reinberg D. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature*. 1994; 368(6473): 769-772
- Druker BJ**, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996; 2(5): 561-566
- Druker BJ**, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001; 344(14): 1031-1037
- Druker BJ**. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene*. 2002; 21(56): 8541-8546
- Druker BJ**, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C,

- Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006; 355(23): 2408-2417
- Efeyan A**, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle.* 2007; 6(9): 1006-1010
- El-Khamisy SF**, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(19): 5526-5533
- Ernst T**, Hoffmann J, Erben P, Hanfstein B, Leitner A, Hehlmann R, Hochhaus A, Müller MC. ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2008; 93(9): 1389-1393
- Evans E**, Fellows J, Coffey A, Wood RD. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.* 1997a; 16(3): 625-638
- Evans E**, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J.* 1997b; 16(21): 6559-6573
- Fabarius A**, Giehl M, Frank O, Spiess B, Zheng C, Müller MC, Weiss C, Duesberg P, Hehlmann R, Hochhaus A, Seifarth W. Centrosome aberrations after nilotinib and imatinib treatment in vitro are associated with mitotic spindle defects and genetic instability. *Br J Haematol.* 2007; 138(3): 369-373
- Fahrer J**, Kranaster R, Altmeyer M, Marx A, Bürkle A. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(21): e143
- Fan J**, Otterlei M, Wong HK, Tomkinson AE, Wilson DM 3rd. XRCC1 co-localizes and physically interacts with PCNA. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(7): 2193-2201
- Fanta S**, Sonnenberg M, Skorta I, Duyster J, Miething C, Aulitzky WE and van der Kuip H. Pharmacological inhibition of c-Abl compromises genetic stability and DNA repair in Bcr-Abl-negative cells. *Oncogene.* 2008; 27(31): 4380-4384
- Fava C**, Saglio G. Can we and should we improve on frontline imatinib therapy for chronic myeloid leukemia? *Semin Hematol.* 2010; 47(4): 319-326
- Fenwick RG Jr.** Reversion of a mutation affecting the molecular weight of HGPRT: intragenic suppression and localization of X-linked genes. *Somatic Cell Genet.* 1980; 6(4): 477-494
- Fernandez-Capetillo O**, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst).* 2004; 3(8-9): 959-967
- Ferro AM**, Olivera BM. Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. *J Biol Chem.* 1982; 257(13):7808-7813
- Fisher AE**, Hochegger H, Takeda S, Caldecott KW. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(15): 5597-5605
- Foray N**, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V, Jeggo P. Constitutive association of BRCA1 and c-Abl and its ATM-dependent disruption after irradiation. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(12): 4020-4032
- Frame D.** New strategies in controlling drug resistance. *J Manag Care Pharm.* 2007; 13(8

Suppl A): 13-17

- Frosina G**, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(16): 9573-9578
- Gambacorti-Passerini C**, le Coutre P, Mologni L, Fanelli M, Bertazzoli C, Marchesi E, Di Nicola M, Biondi A, Corneo GM, Belotti D, Pogliani E, Lydon NB. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 1997; 23(3): 380-394
- Garcia Soriano F**, Virág L, Jagtap P, Szabó E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med.* 2001; 7(1): 108-113
- Gasior SL**, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK. Rad52 associates with RPA and functions with Rad55 and Rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev.* 1998; 12: 2208-2221
- George S**, Trent JC. The role of imatinib plasma level testing in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67 Suppl 1: S45-350
- Goff SP**, Gilboa E, Witte ON, Baltimore D. Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell.* 1980; 22(3): 777-785
- Goga A**, Liu X, Hambuch TM, Senechal K, Major E, Berk AJ, Witte ON, Sawyers CL. p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene.* 1995; 11(4): 791-799
- Goldberg Z**, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y. Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J.* 2002; 21(14): 3715-3727
- Gong JG**, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature.* 1999; 399(6738): 806-809
- Goodhead DT**. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65(1): 7-17
- Gottlieb TM**, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell.* 1993; 72(1): 131-142
- Gradwohl G**, Ménissier de Murcia JM, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JH, de Murcia G. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(8): 2990-2994
- Guilhot F**. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. *Oncologist.* 2004; 9(3): 271-281
- Gupta RC**, Bazemore LR, Golub EI, Radding CM. Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 463-468.
- Hakmé A**, Wong HK, Dantzer F, Schreiber V. The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* 2008; 9(11): 1094-1100
- Hanks SK**. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective.

- Genome Biol. 2003; 4(5): 111
- Hantschel O**, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(1): 33-44.
- Hantschel O**, Rix U, Superti-Furga G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49(4): 615-619
- Haupt Y**, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997; 387: 296-299
- Heinrich MC**, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood.* 2000; 96(3): 925-932
- Horn HF**, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene.* 2007; 26(9): 1306-1316
- Hughes TP**, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM, Radich JP; International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 349(15): 1423-1432
- Hughes TP**, Branford S. Monitoring disease response to tyrosine kinase inhibitor therapy in CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009: 477-487
- Hughes TP**, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, Druker BJ, Guilhot F, Larson RA, O'Brien SG, Rudoltz MS, Mone M, Wehrle E, Modur V, Goldman JM, Radich JP; IRIS investigators. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood.* 2010; 116(19): 3758-3765
- Huletsky A**, de Murcia G, Muller S, Hengartner M, Ménard L, Lamarre D, Poirier GG. The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J Biol Chem.* 1989; 264(15): 8878-8886
- Imam SZ**, Indig FE, Cheng WH, Saxena SP, Stevnsner T, Kufe D, Bohr VA. Cockayne syndrome protein B interacts with and is phosphorylated by c-Abl tyrosine kinase. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(15): 4941-4951
- Isabelle M**, Moreel X, Gagné JP, Rouleau M, Ethier C, Gagné P, Hendzel MJ, Poirier GG. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry. *Proteome Sci.* 2010; 8: 22
- Jabbour E**, Kantarjian HM, Abruzzo LV, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Shan J, Rios MB, Cortes J. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood.* 2007; 110(8): 2991-2995
- Jazayeri A**, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(1): 37-45
- Jilani A**, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW, Lasko DD. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem.* 1999; 274(34): 24176-24186

- Johnson RD** and Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* 2000; 19(13): 3398-3407
- Jones GD**, Milligan JR, Ward JF, Calabro-Jones PM, Aguilera JA. Yield of strand breaks as a function of scavenger concentration and LET for SV40 irradiated with 4He ions. *Radiat Res.* 1993; 136(2): 190-196
- Jonuleit T**, Peschel C, Schwab R, van der Kuip H, Buchdunger E, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *Br J Haematol.* 1998; 100(2): 295-303
- Jonuleit T**, van der Kuip H, Miething C, Michels H, Hallek M, Duyster J, Aulitzky WE. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood.* 2000; 96(5): 1933-1939
- Joshi N**, Grant SG. DNA double-strand break damage and repair assessed by pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2005; 291: 121-129.
- Kantarjian H**, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E; International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002; 346(9): 645-652
- Keeney S**, Eker AP, Brody T, Vermeulen W, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Linn S. Correction of the DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group E by injection of a DNA damage-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(9): 4053-4056
- Kerkelä R**, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, Rosenzweig A, Salomon RN, Van Etten RA, Alroy J, Durand JB, Force T. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006; 12(8): 908-916
- Khanna KK**, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli B, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet.* 1998; 20(4): 398-400
- Kharbanda S**, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature.* 1995; 376(6543): 785-788
- Kharbanda S**, Pandey P, Jin S, Inoue S, Bharti A, Yuan ZM, Weichselbaum R, Weaver D, Kufe D. Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature.* 1997; 386(6626): 732-735
- Kharbanda S**, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene.* 1998; 17(25): 3309-3318
- Khorashad JS**, de Lavallade H, Apperley JF, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D. Finding of kinase domain mutations in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia responding to imatinib may identify those at high risk of disease progression. *J Clin Oncol.* 2008; 26(29): 4806-4813
- Keil C**, Gröbe T, Oei SL. MNNG-induced cell death is controlled by interactions between PARP-1, poly(ADP-ribose) glycohydrolase, and XRCC1. *J Biol Chem.* 2006; 281(45): 34394-34405

- Kim MY**, Kim HW, Park JH, Kim JS, Jin H, Moon SH, Eu KJ, Cho HS, Kang G, Kim YS, Kim YC, Kim HY, Lee KH, Cho MH. Molecular analysis of hprt mutation in B6C3F1 mice exposed to ozone alone and combined treatment of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and/or dibutyl phthalate for 32 and 52 weeks. *J Vet Sci.* 2004; 5(4): 379-385
- Kitao H**, Yuan ZM. Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2002; 277(50): 48944-48948
- Klaude M**, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996; 363(2): 89-96
- Klungland A**, Lindahl T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* 1997; 16(11): 3341-3348
- Koleske AJ**, Gifford AM, Scott ML, Nee M, Bronson RT, Miczek KA, Baltimore D. Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron.* 1998; 21(6): 1259-1272
- Kovitz C**, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Abruzzo LV, Cortes J. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia developing after imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2006; 108(8): 2811-2813
- Krokan HE**, Standal R, Slupphaug G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J.* 1997; 325(Pt 1): 1-16
- Kubbutat MHG**, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997; 387: 299-303
- Kubota Y**, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J.* 1996; 15(23): 6662-6670
- Lakin ND**, Hann BC, Jackson SP. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene.* 1999; 18(27): 3989-3995.
- Laval J**. Two enzymes are required from strand incision in repair of alkylated DNA. *Nature.* 1977; 269(5631): 829-832
- Leppard JB**, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(16): 5919-5927
- Lewis JM**, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JY. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(26): 15174-15179
- Lilyestrom W**, van der Woerd MJ, Clark N, Luger K. Structural and biophysical studies of human PARP-1 in complex with damaged DNA. *J Mol Biol.* 2010; 395(5): 983-994
- Lin W**, Amé JC, Aboul-Ela N, Jacobson EL, Jacobson MK. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem.* 1997; 272(18): 11895-11901
- Lindahl P**, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997; 277(5323): 242-245
- Lindahl T**. New class of enzymes acting on damaged DNA. *Nature.* 1976; 259(5538): 64-66
- Lindahl T**, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-

- ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(10): 405-411
- Loizou JI**, El-Khamisy SF, Zlatanou A, Moore DJ, Chan DW, Qin J, Sarno S, Meggio F, Pinna LA, Caldecott KW. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell.* 2004; 117(1): 17-28
- Lonskaya I**, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL, Soldatenkov VA. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem.* 2005; 280(17): 17076-17083
- Lugo TG**, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990; 247(4946): 1079-1082
- Lu X**, Lane DP. Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation - defects in chromosome instability syndromes? *Cell.* 1993;75:765-778
- Mahon FX**, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, Legros L, Charbonnier A, Guerci A, Varet B, Etienne G, Reiffers J, Rousselot P; Intergroupe Français des Leucémies Myéloïdes Chroniques. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11(11): 1029-1035
- Masutani C**, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D, et al. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.* 1994; 13(8): 1831-1843
- Masutani M**, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(5): 2301-2304
- Matsumoto Y**, Kim K, Bogenhagen DF. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(9): 6187-6197
- Matsumoto Y**, Kim K, Hurwitz J, Gary R, Levin DS, Tomkinson AE, Park MS. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274(47): 33703-33708
- Mauro MJ**, Druker BJ, Maziarz RT. Divergent clinical outcome in two CML patients who discontinued imatinib therapy after achieving a molecular remission. *Leuk Res.* 2004; 28 Supplement 1: 71-73
- Melchionna R**, Chen XB, Blasina A, McGowan CH. Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(10): 762-765
- Mellon I**, Spivak G, Hanawalt PC. Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell.* 1987; 51(2): 241-249
- Meltser V**, Ben-Yehoyada M, Reuven N, Shaul Y. c-Abl downregulates the slow phase of double-strand break repair. *Cell Death and Disease.* 2010; 1: e20; doi:10.1038/cddis.2009.21
- Meltser V**, Ben-Yehoyada M, Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase in the DNA damageresponse: cell death and more. *Cell Death Differ.* 2011; 18(1): 2-4
- Meyer RG**, Meyer-Ficca ML, Whatcott CJ, Jacobson EL, Jacobson MK. Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)

- activity. *Exp Cell Res.* 2007; 313(13): 2920-2936
- Meyer-Ficca ML**, Meyer RG, Coyle DL, Jacobson EL, Jacobson MK. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res.* 2004; 297(2): 521-532
- Michor F**, Hughes TP, Iwasa Y, Branford S, Shah NP, Sawyers CL, Nowak MA. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature.* 2005; 435(7046): 1267-1270
- Milligan JR**, Aguilera JA, Wu CC, Ng JY, Ward JF. The difference that linear energy transfer makes to precursors of DNA strand breaks. *Radiat Res.* 1996; 145(4): 442-448
- Mimori T**, Hardin JA, Steitz JA. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem.* 1986; 261(5): 2274-2278
- Moehring A**, Wohlbold L, Aulitzky WE, van der Kuip H. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activity in imatinib mesylate-induced cell death. *Cell Death Differ.* 2005; 12(6): 627-636
- Mosmann T**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63
- Mu D**, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem.* 1996; 271(14): 8285-8294
- de Murcia JM**, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(14): 7303-7307
- Nabholz M**, Miggiano V, Bodmer W. Genetic analysis with human--mouse somatic cell hybrids. *Nature.* 1969; 223(5204): 358-363
- Nagar B**, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 2002; 62(15): 4236-4243
- Nagar B**, Hantschel O, Young MA, Scheffzek K, Veach D, Bornmann W, Clarkson B, Superti-Furga G, Kuriyan J. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell.* 2003; 112(6): 859-71
- Nelms BE**, Maser RS, MacKay JF, Lagally MG, Petrini JH. In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science.* 1998; 280(5363): 590-592
- Nie Y**, Li HH, Bula CM, Liu X. Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(3): 741-748
- Nowell P**, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960; 132: 1497
- O'Brien SG**, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ; IRIS Investigators. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2003; 348(11): 994-1004
- Oetzel C**, Jonuleit T, Götz A, van der Kuip H, Michels H, Duyster J, Hallek M, Aulitzky WE. The tyrosine kinase inhibitor CGP 57148 (ST1 571) induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells by down-regulating BCL-X. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(5): 1958-1968

- O'Donovan A**, Davies AA, Moggs JG, West SC, Wood RD. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*. 1994; 371(6496): 432-435
- O'Hare T**, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005; 65(11): 4500-4505
- O'Hare T**, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 110(7): 2242-2249
- Oka S**, Kato J, Moss J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem*. 2006; 281(2): 705-713
- Okano S**, Lan L, Caldecott KW, Mori T, Yasui A. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(11): 3974-3981
- Oleinick NL**, Evans HH. Poly(ADP-ribose) and the response of cells to ionizing radiation. *Radiat Res*. 1985; 101(1): 29-46
- Olive PL**. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol*. 2004; 75: 355-373
- O'Neill P**, Wardman P. Radiation chemistry comes before radiation biology. *Int J Radiat Biol*. 2009; 85(1): 9-25
- Parsons JL**, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS J*. 2005; 272(8): 2012-2021.
- Pascucci B**, Stucki M, Jónsson ZO, Dogliotti E, Hübscher U. Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem*. 1999; 274(47): 33696-33702
- Pendergast AM**. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res*. 2002; 85: 51-100.
- Picard S**, Titier K, Etienne G, Teilhet E, Ducint D, Bernard MA, Lassalle R, Marit G, Reiffers J, Begaud B, Moore N, Molimard M, Mahon FX. Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007; 109(8): 3496-3499
- Pion E**, Ullmann GM, Amé JC, Gérard D, de Murcia G, Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry*. 2005; 44(44): 14670-14681
- Poirier GG**, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79(11): 3423-3427
- Popescu LM**, Vidulescu C, Curici A, Caravia L, Simionescu AA, Ciontea SM, Simion S. Imatinib inhibits spontaneous rhythmic contractions of human uterus and intestine. *Eur J Pharmacol*. 2006; 546(1-3): 177-181
- Popova M**, Shimizu H, Yamamoto K, Lebechec M, Takahashi M, Fleury F. Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Y54 phosphorylation is dependent on that of Y315. *FEBS Lett*. 2009; 583(12): 1867-1872
- Prasad R**, Dianov GL, Bohr VA, Wilson SH. FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem*. 2000;

275(6): 4460-4466

- Rancourt A**, Satoh MS. Delocalization of nucleolar poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the nucleoplasm and its novel link to cellular sensitivity to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2009; 8(3): 286-297
- Rapić-Otrin V**, Kuraoka I, Nardo T, McLenigan M, Eker AP, Stefanini M, Levine AS, Wood RD. Relationship of the xeroderma pigmentosum group E DNA repair defect to the chromatin and DNA binding proteins UV-DDB and replication protein A. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(6): 3182-3190
- Riley T**, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5): 402-412
- Robson CN**, Hickson ID. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19(20): 5519-5523
- Rogakou EP**, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998; 273(10): 5858-5868.
- Rogakou EP**, Boon C, Redon C, Bonner WM. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*. 1999; 146(5): 905-916
- Roots R**, Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res*. 1975; 64(2): 306-320
- Rothkamm K**, Löbrich M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(9): 5057-5062
- Rouleau M**, Aubin RA, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci*. 2004; 117(Pt 6): 815-825
- Rouleau M**, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(4): 293-301
- Rowley JD**. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973; 243(5405): 290-293
- Roy L**, Guilhot J, Martineau G, Larchée R, Guilhot F. Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2005; 19(9): 1689-1692
- Roy L**, Guilhot J, Krahnke T, Guerci-Bresler A, Druker BJ, Larson RA, O'Brien S, So C, Massimini G, Guilhot F. Survival advantage from imatinib compared with the combination interferon-alpha plus cytarabine in chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials. *Blood*. 2006; 108(5): 1478-1484
- Sakurai S**, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal). *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90(12): 1321-1328
- Salloukh HF**, Laneuville P. Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase. *Leukemia*. 2000; 14(8): 1401-1404
- Sartori AA**, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. 2007; 450(7169): 509-514

- Sawyers CL.** Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999; 340(17): 1330-1340
- Sawyers CL,** Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood.* 2002 May; 99(10): 3530-3539
- Schaeffer L,** Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JH, Egly JM. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 1994; 13(10): 2388-2392
- Schindler T,** Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science.* 2000; 289(5486): 1938-1942
- Schreiber V,** Molinete M, Boeuf H, de Murcia G, Ménissier-de Murcia J. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *EMBO J.* 1992; 11(9): 3263-3269
- Schreiber V,** Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, De Murcia JM. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(11): 4753-4757
- Schreiber V,** Amé JC, Dollé P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem.* 2002; 277(25): 23028-23036
- Schreiber V,** Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(7): 517-528.
- Schwartzberg PL,** Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP. Mice homozygous for the *abl1* mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell.* 1991; 65(7): 1165-1175
- Schwarz JK,** Lovly CM, Piwnica-Worms H. Regulation of the Chk2 protein kinase by oligomerization-mediated cis- and trans-phosphorylation. *Mol Cancer Res.* 2003; 1(8): 598-609
- Shafman T,** Kanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavine MF. Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature.* 1997; 387: 520-523
- Shah NP,** Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science.* 2004; 305(5682): 399-401
- Shaul Y,** Ben-Yehoyada M. Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell Res.* 2005; 15(1): 33-35
- Shieh SY,** Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997; 91(3): 325-334
- Shiloh Y.** ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(3): 155-168

- Sijbers AM**, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell*. 1996; 86(5): 811–822
- Siliciano JD**, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*. 1997; 11(24): 3471-3481
- Singer S**, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2002; 20(18): 3898-3905
- Singh NP**, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175(1): 184-191.
- Sionov RV**, Moallem E, Berger M, Kazaz A, Gerlitz O, Ben-Neriah Y, Oren M, Haupt Y. c-Abl neutralizes the inhibitory effect of Mdm2 on p53. *J Biol Chem*. 1999; 274: 8371–8374.
- Skorta I**, Oren M, Markwardt C, Gutekunst M, Aulitzky WE, van der Kuip H. Imatinib mesylate induces cisplatin hypersensitivity in Bcr-Abl+ cells by differential modulation of p53 transcriptional and proapoptotic activity. *Cancer Res*. 2009; 69(24): 9337-9345
- Song B**, Sung P. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem*. 2000; 275(21): 15895-15904
- Speit G** & Hartmann A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 1999; 113: 203-212.
- Sugasawa K**, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 1998; 2(2): 223-232
- Sugawara N**, Wang X, Haber JE. In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell*. 2003; 12: 209–219
- Sun X**, Majumder P, Shioya H, Wu F, Kumar S, Weichselbaum R, Kharbanda S, Kufe D. Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2000a; 275(23): 17237-17240
- Sun X**, Wu F, Datta R, Kharbanda S, Kufe D. Interaction between protein kinase C delta and the c-Abl tyrosine kinase in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2000b; 275(11): 7470-7473
- Sutherland BM**, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000a; 97(1): 103-108
- Sutherland BM**, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*. 2000b; 39(27): 8026-8031
- Svejstrup JQ**, Vichi P, Egly JM. The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21(9): 346-350
- Taagepera S**, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(13): 7457-7462
- Takao N**, Mori R, Kato H, Shinohara A, Yamamoto K. c-Abl tyrosine kinase is not essential for ataxia telangiectasia mutated functions in chromosomal maintenance. *J Biol Chem*. 2000;

275(2): 725-728

- Talpaz M**, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002; 99(6): 1928-1937
- Talpaz M**, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 2006; 354(24): 2531-2541
- Tantin D**, Kansal A, Carey M. Recruitment of the putative transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 to RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol*. 1997; 17(12): 6803-6814
- Tauchi T**, Kizaki M, Okamoto S, Tanaka H, Tanimoto M, Inokuchi K, Murayama T, Saburi Y, Hino M, Tsudo M, Shimomura T, Isobe Y, Oshimi K, Dan K, Ohyashiki K, Ikeda Y; the TARGET investigators. Seven-year follow-up of patients receiving imatinib for the treatment of newly diagnosed chronic myelogenous leukemia by the TARGET system. *Leuk Res*. 2010. [Epub ahead of print]
- Terre C**, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, Mozziconacci MJ, Maarek O, Mossafa H, Auger N, Dastugue N, Talmant P, Van den Akker J, Leonard C, N'Guyen Khac F, Mugneret F, Viguié F, Lafage-Pochitaloff M, Bastie JN, Roux GL, Nicolini F, Maloisel F, Vey N, Laurent G, Recher C, Vigier M, Yacouben Y, Giraudier S, Vernant JP, Salles B, Roussi J, Castaigne S, Leymarie V, Flandrin G, Lessard M; France Intergroupe pour la Leucemie Myeloide Chronique. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004; 18(8): 1340-1346
- Thompson AM**, Steel CM, Chetty U, Hawkins RA, Miller WR, Carter DC, Forrest AP, Evans HJ. p53 gene mRNA expression and chromosome 17p allele loss in breast cancer. *Br J Cancer*. 1990; 61(1): 74-78
- Tu Y**, Bates S, Pfeifer GP. The transcription-repair coupling factor CSA is required for efficient repair only during the elongation stages of RNA polymerase II transcription. *Mutat Res*. 1998; 400(1-2): 143-151
- Tybulewicz VL**, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 1991; 65(7): 1153-1163
- Ueda K**, Oka J, Naruniya S, Miyakawa N, Hayaishi O. Poly ADP-ribose glycohydrolase from rat liver nuclei, a novel enzyme degrading the polymer. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972; 46(2): 516-523
- Uemura N**, Griffin JD. The ABL kinase inhibitor STI571 does not affect survival of hematopoietic cells after ionizing radiation. *Blood*. 2000; 96(9): 3294-3295
- van der Kuip H**, Moehring A, Wohlbold L, Miething C, Duyster J, Aulitzky WE. Imatinib mesylate (STI571) prevents the mutator phenotype of Bcr-Abl in hematopoietic cell lines. *Leuk Res*. 2004; 28(4): 405-408
- Van Etten RA**, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization.

- Cell. 1989; 58(4): 669-678
- van Etten RA**, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA. The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol.* 1994; 124(3): 325-340
- van Gool AJ**, Citterio E, Rademakers S, van Os R, Vermeulen W, Constantinou A, Egly JM, Bootsma D, Hoeijmakers JH. The Cockayne syndrome B protein, involved in transcription-coupled DNA repair, resides in an RNA polymerase II-containing complex. *EMBO J.* 1997; 16(19): 5955-5965
- van Oosterom AT**, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato di Paola E, Dimitrijevic S, Martens M, Webb A, Scot R, Van Glabbeke M, Silberman S, Nielsen OS; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet.* 2001; 358(9291): 1421-1423
- Vardiman JW**, Pierre R, Thiele J et al. Chronic myeloproliferative diseases. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001: 15-59.
- Vidal AE**, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J.* 2001; 20(22): 6530-6539
- von Bubnoff N**, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; 107(7): 114-121
- von Sonntag C**. Free-radical-induced DNA damage and its repair. A chemical perspective. Springer, Berlin. 2006
- von Sonntag C**. The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis, London. 1987
- Wang JY**. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene.* 2000; 19(49): 5643-5650
- Wang X**, Zeng L, Wang J, Chau JF, Lai KP, Jia D, Poonepalli A, Hande MP, Liu H, He G, He L, Li B. A positive role for c-Abl in Atm and Atr activation in DNA damage response. *Cell Death Differ.* 2011; 18(1): 5-15
- Wang ZQ**, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K, Wagner EF. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 1997; 11(18): 2347-2358
- Ward JF**. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988; 35: 95-125
- Wei G**, Li AG, Liu X. Insights into selective activation of p53 DNA binding by c-Abl. *J Biol Chem.* 2005; 280(13): 12271-12278
- Wei G**, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol.* 2010; 3: 47
- Wen ST**, Jackson PK, van Etten RA. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.* 1996; 15(7): 1583-1595
- Werness BA**, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990; 248(4951): 76-79

- Wetzler M**, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest.* 1993; 92(4): 1925-1939
- White D**, Saunders V, Lyons AB, Branford S, Grigg A, To LB, Hughes T. In vitro sensitivity to imatinib-induced inhibition of ABL kinase activity is predictive of molecular response in patients with de novo CML. *Blood.* 2005; 106(7): 2520-2526
- Wilson TE**, Grawunder U, Lieber MR. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature.* 1997; 388(6641): 495-498
- Wojewódzka M**, Buraczewska I, Kruszewski M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutat Res.* 2002; 518(1): 9-20
- Wold MS**. Replication protein A: heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1997; 66: 61-92.
- Wright JA**, Keegan KS, Herendeen DR, Bentley NJ, Carr AM, Hoekstra MF, Concannon P. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(13): 7445-7450
- Yang H**, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science.* 2002; 297(5588): 1837-1848
- Yuan ZM**, Huang Y, Ishiko T, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of DNA damage-induced apoptosis by the c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(4): 1437-1440
- Yuan ZM**, Huang Y, Ishiko T, Nakada S, Utsugisawa T, Kharbanda S, Wang R, Sung P, Shinohara A, Weichselbaum R, Kufe D. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 1998a; 273(7): 3799-3802
- Yuan ZM**, Utsugisawa T, Ishiko T, Nakada S, Huang Y, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. Activation of protein kinase C delta by the c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Oncogene.* 1998b; 16(13): 1643-1648
- Yuan ZM**, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature.* 1999; 399(6738): 814-817
- Zhao H**, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(13): 4129-4139
- Zhou Y**, Feng X, Koh DW. Enhanced DNA accessibility and increased DNA damage induced by the absence of poly(ADP-ribose) hydrolysis. *Biochemistry.* 2010; 49(34): 7360-7366
- Zhu J**, Wang JY. Death by Abl: a matter of location. *Curr Top Dev Biol.* 2004; 59: 165-192
- Zipfel PA**, Zhang W, Quiroz M, Pendergast AM. Requirement for Abl kinases in T cell receptor signaling. *Curr Biol.* 2004; 14(14): 1222-1231
- Zou L**, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science.* 2003; 300(5625): 1542-1548

9 PUBLIKATIONEN

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Originalarbeit:

Fanta S, Sonnenberg M, Skorta I, Duyster J, Miething C, Aulitzky WE, van der Kuip H:
Pharmacological inhibition of c-Abl compromises genetic stability and DNA repair in Bcr-Abl
negative cells.
Oncogene, 2008, 27(31): 4380-4

Abstracts/ Vorträge:

Fanta S, Sonnenberg M, Skorta I, Duyster J, Miething C, Aulitzky WE, van der
Kuip H: Imatinib (STI571) kompromittiert die genetische Stabilität Bcr-Abl negativer
Zellen durch Hemmung der c-Abl-Kinaseaktivität.
Onkologie 2007; 30(suppl 3): 1-244 [V52]

Fanta S, Skorta I, Sonnenberg M, Aulitzky WE, van der Kuip H: c-Abl inhibition
affects DNA repair kinetics and genetic stability.
Proc Amer Assoc Cancer Res; 2008 Apr 12-16; [A 4871]

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Walter E. Aulitzky danke ich für die Bereitstellung des spannenden Forschungsthemas. Seine Unterstützung, Begeisterung, Diskussion und stetige Motivation haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Martin Blum danke ich für seine Bereitschaft, die Arbeit von Seiten der Universität Hohenheim zu betreuen, was es mir erst ermöglichte, diese am IKP durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Heiko van der Kuip für die allerbeste Betreuung, vor allem seine unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, welche mir immer wieder neuen Aufschwung gaben!

Für die schöne Arbeitsatmosphäre am IKP ein ganz großes Danke an alle Mitarbeiter, an meine „BGs“ (Bürogemeinschaftler): Svitlana Igel, Julia Beisner, Uli Griese und Ina Abele, und natürlich an die „Aulis“: Maike Sonnenberg, Ioanna Skorta, Kerstin Willecke, Tabea Peuß, Silke Haubeiß, Matthias Gutekunst, Jens Schmid und ganz besonders meiner „SG“ (Schreibgemeinschaftlerin) Annette Staiger, die mir motivierend und kulinarisch unterstützend während der Schreibphase zur Seite saß und Christian Joffroy für die anglistische Unterstützung.

Meiner Oma danke ich für alles, was sie mir mitgab und dass sie nie daran zweifelte, dass ich es schaffe, auch wenn sie dies leider nicht mehr miterleben konnte.

Meinen Eltern und meinem Bruder kann ich nicht genug dafür danken, dass sie immer hinter mir stehen, dass sie immer da sind, wenn ich sie brauche und mich unterstützen. Danke!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung dieser Dissertation.

11 LEBENS LAUF

Name Silke Fanta
Anschrift Friedrich-Ebert-Str. 20
73730 Esslingen
geboren am 15. August 1978 in Stuttgart

SCHUL AUSBILDUNG

1985 - 1989 Grundschule Schillerschule, Filderstadt
1989 - 1998 Eduard-Spranger-Gymnasium, Filderstadt

BERUFLICHE AUSBILDUNG

1998 - 2001 Lehre zur Biologielaborantin an der Universität Hohenheim, Stuttgart

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

2001 - 2006 Studium der Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart
Schwerpunkte: Zoologie (Entwicklungsbiologie), Zoophysiologie, Zelluläre Mikrobiologie
Diplomarbeit am Institut für Zoologie und am Institut für Agrarökologie; Universität Hohenheim und Leyte State University, Philippinen
Thema: „*Abundanzdynamik ausgewählter Arthropoden in Nassreisfeldern auf Leyte, Philippinen*“
finanziert durch ein Stipendium der Eiselen-Stiftung
Abschluss: Diplom-Biologin

2006 - 2011 Promotion am Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart.
Thema der Dissertation: „*Bedeutung der c-Abl-Aktivität für die Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung und für die genetische Stabilität bei Bcr/Abl-positiven und -negativen Neoplasien*“
Abschluss zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Ab 2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Bildungsprojekts „COACHING4FUTURE“, ein Programm der Baden-Württemberg Stiftung gGmbH, Stuttgart; Projektagentur Flad & Flad Communication GmbH, Heroldsberg