UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Biochemie und Signaltransduktion
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Georg W. Mayr

Untersuchungen zur Expression der humanen Inositolphosphat-Multikinase in humanen Zelllinien und in primären Zellen von Leukämiepatienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hannah Gerke
aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.02.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Manfred Jücker

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Walter Fiedler

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung 7

2 Einleitung 8

2.1 Zelluläre Signaltransduktion 8

2.2 Der Stoffwechsel der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate 8

2.3 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion 9

2.3.1 Die Familie der Inositol (1,4,5)-Trisphosphat 3-Kinasen 10

2.3.2 Inositol (1,4,5)-Trisphosphat ($InsP_3$)-Signaltransduktionskaskade 10

2.3.3 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) 12

2.3.4 Die Inositolphosphat-Multikinase 12

2.3.4.1 Struktur und Lokalisation 13

2.3.4.2 Enzymatische Aktivität der IPMK 15

2.3.4.3 Mutanten der Inositol-Polyphosphat-Multikinase (IPMK) 17

2.4 Der AKT-Signalweg 18

2.4.1 Zellüberleben 18

2.4.2 Zellwachstum 19

2.4.3 Proliferation 19

2.4.4 Angiogenese 20

2.4.5 Stoffwechsel 20

2.4.6 Der PI3K / AKT Signalweg in Tumoren 20

2.5 Die akute myeloische Leukämie (AML) 21

2.5.1 Definition 21

2.5.2 Klinisches Bild 21

2.5.3 Klassifikation und Therapie der AML 21
2.6 Myelodysplastisches Syndrom (MDS) 24
2.7 Gentransfer und Expressionskontrolle 24
2.7.1 Transfektion 24
2.7.1.1 Transfektion mittels Lipofectamin 25
2.7.1.2 Elektroporation 26
2.7.2 Transduktion mittels retroviraler Vektoren 26
2.7.3 Tet-On System 27
3 Material und Methoden 29
3.1 Material 29
3.1.1 Puffer und Stammlösungen 29
3.1.2 PAGE (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) 32
3.1.3 Western Blot 33
3.1.4 Antikörper (AK) 34
3.1.4.1 Primäre Antikörper 34
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper 34
3.1.5 Geräte 35
3.1.6 Gefäße und Verbrauchsmaterial 38
3.2 Methoden 39
3.2.1 Bakterienkulturen 39
3.2.1.1 Wachstum und Vermehrung 39
3.2.1.2 Anlegen von Glycerolstocks 39
3.2.1.3 Transformation 39
3.2.2 Isolation von Plasmid-DNA 40
3.2.2.1 Plasmid-DNA Maxipräparation 40
3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA 40

3.2.3 Zellkultur 41
3.2.3.1 Zelllinien 41
3.2.3.2 Stammhaltung und Subkultivierung 44
3.2.3.3 Einfrieren von Zellen 44
3.2.3.4 Auftauen von Zellen 45
3.2.3.5 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung 45
3.2.3.6 Transiente Lipofectamin™ Transfektion der Phoenix™ Ampho–Zellen und der HEK 293 T Zellen 45
3.2.3.7 Transduktion der Jurkat Tet-On Zellen mit amphotrophen Viren 46
3.2.3.8 Elektroporation der Jurkat Tet-On Zellen 46
3.2.3.9 Selektion der transformierten Zellen 47
3.2.3.10 Limiting Dilution 47
3.2.3.11 Induktion mit Doxycyclin 47
3.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten 48
3.2.4.1 Herstellen von Proteinlysaten 48
3.2.4.2 DC-Protein Assay von BioRad 49
3.2.4.3 Gelelektrophorese und Western Blot 50
3.2.4.4 Ponceau S Färbung von Westernblot-Membranen 51
4 Ergebnisse 52
4.1 Herstellung retroviraler Vektoren und Transduktion 52
4.2 Nachweis der IPMK in klonalen Jurkat-Zellen 53
4.3 Nachweis geringer IPMK Expression in transient transfizierten HEK 293 T Zellen 53
4.4 Vergleich der Effektivität der Extraktion von nukleären Proteinen durch unterschiedliche Lyseprotokolle 54

4.5 Vergleich von neuen sowie gebrauchten Elektroporationsküvetten auf die Effektivität der Elektroporation ... 55
4.6 Nachweis des EGFP-Vektors in Einzelklonlysaten nach Elektroporation 56
4.7 Kein Nachweis von IPMK in Jurkat- und H1299-Zellen nach Transfektion ... 57
4.8 Nachweis endogener IPMK in primären Proben von Leukämie Patienten ... 59
5 Diskussion ... 61
5.1 Lyseprotokolle ... 62
5.2 Elektroporation ... 63
5.3 Nachweis der IPMK mittels eines Antikörpers gegen die humane IPMK in Zelllysaten ... 64
5.4 Nachweis von IPMK-Mutanten in Jurkat-Zellen ... 64
5.5 Nachweis von IPMK in Leukämien und MPS ... 65
6 Zusammenfassung ... 67
7 Abkürzungsverzeichnis ... 69
8 Literaturverzeichnis ... 71
9 Anhang ... 82
9.1 Abbildungsverzeichnis ... 82
9.2 Tabellenverzeichnis ... 82
10 Danksagung ... 83

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Seit der Entdeckung der humanen Isoform der Inositolphosphat-Multikinase und der Charakterisierung ihrer enzymatischen Aktivität wurden immer neue Funktionen und Zielproteine definiert. Bisher wurden die meisten Forschungsergebnisse durch Untersuchungen an den Substraten der IPMK durchgeführt.

Ein direkter quantitativer Nachweis der humanen IPMK durch Western Blot in Zelllysaten war durch insuffiziente Antikörper gegen die humane IPMK und auf Grund ihrer geringen Expression bisher nicht möglich. Ein Nachweis der humanen Isoform gelang bisher nur in Kernlysaten in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. S. Windhorst. Die Maus-Isoform der IPMK konnte mit den bestehenden Antikörpern auch in Zelllysaten nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität findet wohl nicht nur im Kern statt, so dass Kernlysate für weiterführende quantitative Untersuchungen nicht ideal erscheinen.

In dieser Arbeit soll mittels eines induzierbarem Systems IPMK in humanen Leukämiezellen exprimiert werden. Dazu werden retrovirale Vektoren verwendet, die sowohl die humane Wildtyp IPMK als auch IPMK-Mutanten mit Funktionsverlust der Kinaseaktivität bzw. der Kernlokalisationssequenz (NLS) enthalten. Unterschiede in der Expression der Mutanten sollen untersucht und bewertet werden. Als Modellsystem wurden Jurkat-Zellen gewählt.

Weiterhin soll ein Nachweis der Expression von IPMK in humanen Leukämiezellen erfolgen. Dazu soll die endogene Expression der IPMK in Leukämiezellen auch mit der Expression in induzierten Zelllinien verglichen werden.

Einleitend sollen die Funktionen der IPMK und einige wichtige Stoffwechselwege, in die die IPMK eingreift, zusammengefasst werden.

2 Einleitung

2.1 Zelluläre Signaltransduktion

Zur Steuerung der vielfältigen Funktionen einer Zelle und zur Koordination des Zellverbandes werden chemische Botenstoffe (Hormone, Zytokine, Neurotransmitter) benötigt.

Die Weiterleitung von Informationen durch Hormone in die Zelle und die metabolische oder physiologische Antwort nennt man Signaltransduktion. Die chemischen Botenstoffe binden dabei an spezifische Rezeptoren. Dabei werden zwei Arten von Rezeptoren unterschieden. Rezeptoren in Zellmembranen sind meistens Transmembranproteine, deren zytosolische Domäne durch extrazelluläre Bindung des Hormons aktiviert wird. Hierdurch wird entweder direkt (durch Liganden-aktivierte Ionenkanäle oder Rezeptortyrosinkinase) oder indirekt (z.B. über heterotrimere G-Proteine) ein primärer Effektor (z.B. Phospholipase C) aktiviert, der über Second Messenger (z.B. cAMP, IP3, Diacylglycerin) das Signal verstärkt und weiterleitet. Intrazelluläre Rezeptoren binden lipophile Hormone wie Steroid- und Schilddrüsenhormone. In der Regel fungiert der Komplex aus intrazellulärem Rezeptor und Hormon als Transkriptionsfaktor (Rassow, 2008).

2.2 Der Stoffwechsel der Phosphatidylinositole und Inositolphosphate

Die Phospholipase C bildet durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphat (PIP2) in IP3 und Diacylglycerin (DAG) die Verbindung zwischen den Stoffwechsel der Inositolphosphate und der Phosphatidylinositole. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über Verbindungen zwischen Inositolphosphaten und Phosphatidylinositolen und deren Synthesewege (Abel u. a., 2001).

Vier Jahre später zeigten Resnick et. al., dass die IPMK (Nr. 9 in Abb.1) auch eine nukläere Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) ist und die Transkription reguliert (Resnick u. a., 2005).

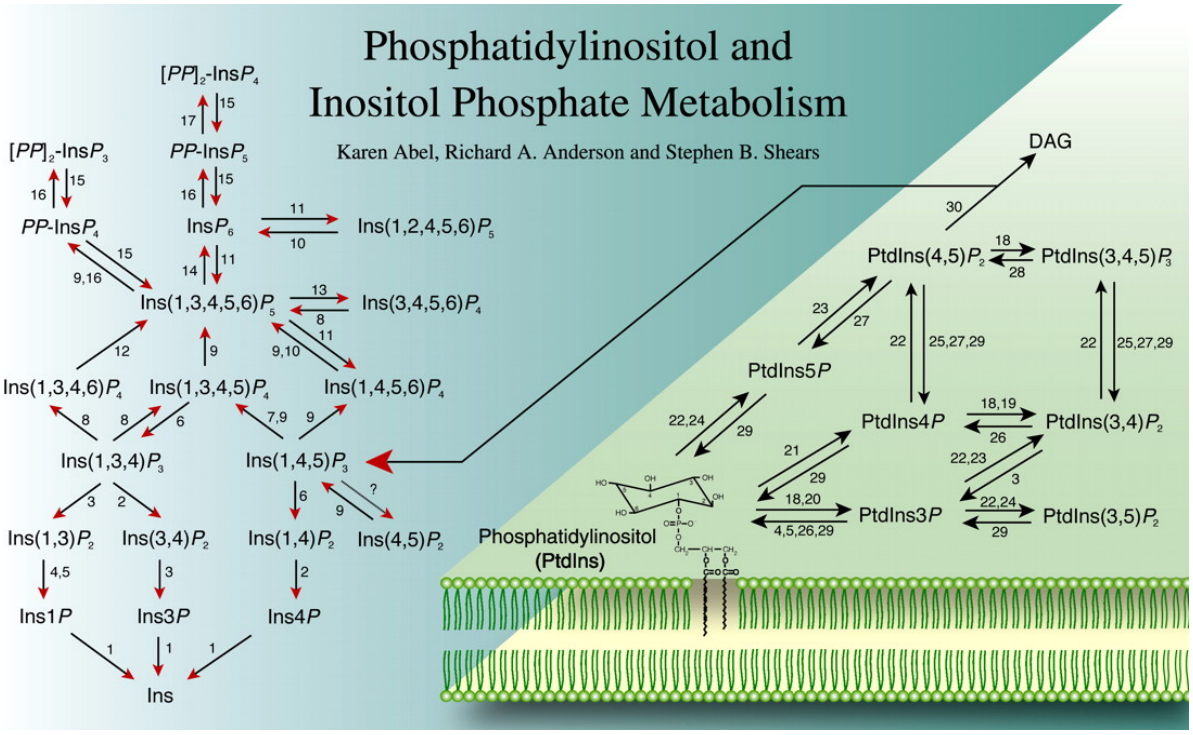

Abbildung 1: Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole.

Das sich im inneren Blatt der Plasmamembran befindende Phosphatidylinositol (PtdIns) und seine an unterschiedlichen Positionen phosphorylierten Das Ins(1,4,5)P3 ist Ausgangssubstrat für eine Vielzahl von Inositolphosphaten, die durch spezifische Kinasen und Phosphatasen erzeugt werden. Durch eine vollständige Dephosphorylierung können die Inositolphosphate zum myo-Inositol abgebaut werden. Die Phosphorylierung führt bis hin zum vollständig phosphorylierten InsP6 und darüber hinaus zu Pyrophosphatgruppen-tragenden Inositolphosphaten.
(Nalaskowski, modifiziert nach (Abel u. a., 2001)
1 Inositol Monophosphatase; **2** Ins(1,4)P2/Ins(1,3,4)P3-1-Phosphatase; **3** Ins(1,3,4)P3/Ins(3,4)P2/PtdIns(3,4)P2-4-Phosphatase; **4** Ins(1,3)P2/PtdIns3P-3-Phosphatase TypI ; **5** Ins(1,3)P2/PtdIns3P-3-Phosphatase TypII ; **6** Ins(1,4,5)P3/Ins(1,3,4,5)P4-5-Phosphatase; **7** Ins(1,4,5)P3-3-Kinase; **8** Ins(1,3,4)P3/Ins(1,3,4,5)P4-1-Kinase; **9** Inositol Polyphosphat Multikinase (IPMK); **10** Ins(1,4,5,6)P4/Ins(1,2,4,5,6)P5-3-Kinase; **11** Multiple Inositol Polyphosphatphosphatase; **12** Ins(1,3,4,6)P4-5-Kinase; **13** Ins(1,3,4,5,6)P5-1-Phosphatase; **14** Ins(1,3,4,5,6)P5-2-Kinase; **15** Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolase; **16** Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase (InsP6-Kinase); **17** Bis-Diphosphoinositol Polyphosphat Synthase; **18** Phosphoinositid-3-Kinase Typ I; **19** Phosphoinositid-3-Kinase Typ II; **20** Phosphoinositid-3-Kinase Typ III; **21** PtdIns-4-Kinase; **22** PtdInsP-Kinase Typ I; **23** PtdInsP-Kinase Typ II; **24** PtdInsP-Kinase Typ III; **25** PtdIns(4,5)P2/PtdIns(3,4,5)P3-5-Phosphatase; **26** PtdInspolyphosphat-3-Phosphatase; **27** SHIP; **28** PTEN; **29** Synaptojanin; **30** Phospholipase C;

2.3 Phosphatidylinositole und Inositolphosphate in der zellulären Signaltransduktion

Inositolphosphate spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalkaskaden. Am besten untersucht ist dabei wohl die Kalziumfreisetzung durch Inositol-1,4,5-Triphosphat ($InsP_{3)}$ (Berridge, Irvine, 1984),(Berridge & Irvine 1984),(Shears, 1998) (s. u.). In den letzten Jahren sind jedoch auch andere Vertreter der Inositolphosphate näher untersucht worden und eine Reihe neuer Funktionen in verschiedenen Signalwegen wurde entdeckt. Ein wichtiger Vertreter der Phosphatidylinositole ist das Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3).

Es wird durch die PI3-Kinase gebildet und steuert durch die Aktivierung von AKT Zellwachstum und Vermehrung (Cantley, 2002). Auch Sekretion und Vesikelsteuerung durch Aktinumlagerung werden durch Phosphatidylinositole gesteuert (Anderson u. a., 1999) (Wen u. a., 2011).

2.3.1 Die Familie der Inositol (1,4,5)-Trisphosphat 3-Kinasen

Die Inositol (1,4,5)-Trisphosphat 3-Kinasen (IP3K) katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3‘-Hydroxylgruppe des Ins(1,4,5)P_3. Durch diese Umsetzung wird der Ca2+-freisetzende, sekundäre Botenstoff Ins(1,4,5)P_3 reduziert und ein wichtiger Stoffwechselweg zu den höherphosphorylierten Inositolphosphaten eröffnet (Irvine, Schell, 2001). Die Familie der IP3Ks hat drei bekannte Mitglieder, die nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Charakterisierung als Isoform A, B und C bezeichnet werden. Alle drei Isoformen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe vom ATP auf die 3’-Hydroxylgruppe des sekundären Botenstoffes Inositol (1,4,5)-Trisphosphat und sind primär zytosolische Proteine.

2.3.2 Inositol (1,4,5)-Trisphosphat ($InsP_3$)-Signaltransduktionskaskade

Nachdem 1984 der Second Messenger $InsP_3$ erstmals beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass durch $InsP_3$ die intrazelluläre Kalziumhomöostase gesteuert und eine Signalkaskade mit Effekten auf Sekretion, Phototransduktion und Zellproliferation ausgelöst wird (Berridge, Irvine, 1984),(M. J. Berridge 1993),(Shears, 1998).

Es gibt zwei verschiedene Signalkaskaden, über die $InsP_3$ auf extrazelluläre Stimuli hin entstehen kann. Ein Weg führt über Neurotransmitter wie Glutamat und Acetylcholin, Geruchsstoffe, Hormone oder Licht zur Aktivierung von heterotrimeren G-Protein gekoppelten Transmembran-Rezeptoren (GPCR, siehe Abbildung 2). Diese Rezeptorproteine besitzen sieben Membran-durchspannende Helices und sind an ihrer zytosolischen Seite an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt. Der Rezeptor dient als Guanylnukleotid-Austausch-Faktor, der nach Bindung des Botenstoffs aktiviert wird. Dadurch wird das an der α-Untereinheit des G-Proteins gebundene Molekül GDP gegen ein Molekül GTP ausgetauscht. Das aktivierte G-Protein zerfällt in die α- und β/γ-Untereinheiten und löst sich vom Rezeptor.

Die Untereinheiten aktivieren unterschiedliche β-Isoformen der Phospholipase C, die die Hydrolyse von membranständigem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P_2) in Diacylglycerol (DAG), welches in der Plasmamembran verbleibt, und das wasserlösliche Ins(1,4,5)P_3 katalysiert (Löffler u. a., 2006).

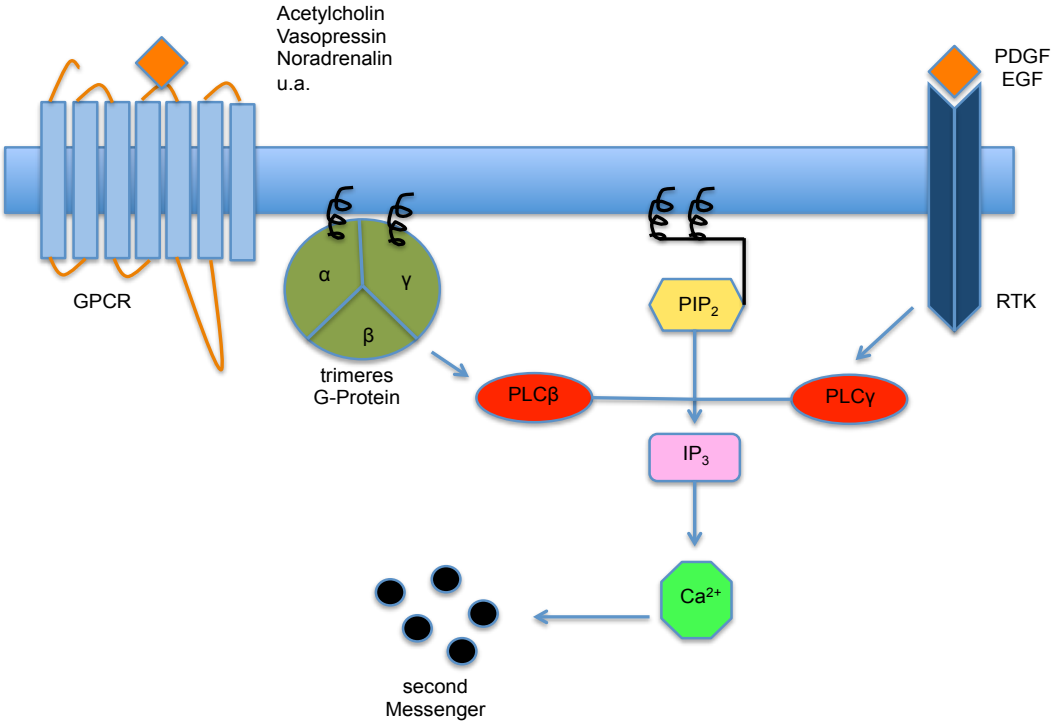

Abbildung 2: Entstehung der Second Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) durch Phospholipase C vermittelte Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2). Während G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) über trimere G-Proteine die Phospholipase Cβ (PLCβ) aktivieren, können Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) Phospholipase Cγ (PLCγ) rekrutieren und aktivieren. Die Bildung von DAG und IP3 führt zur Aktivierung der Proteinkinase C bzw. zur Ca2+-Freisetzung
(Nach Löffler, Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 2008)

Der zweite Signalweg führt über Rezeptor-gekoppelte Tyrosinkinasen. Die Bindung des Liganden an eine Rezeptortyrosinkinase führt zur Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomäne durch Phosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosylreste des Rezeptors. Diese aktivierten Rezeptortyrosinkinasen können nun γ-Isoformen der Phospholipase C über deren SH2-Domänen (src-Homologie-Domäne 2) binden und durch Phosphorylierung aktivieren. Die aktivierte Phospholipase C kann nun auch auf diesem Weg die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P_2) in Diacylglycerol (DAG) und $InsP_3$ katalysieren. Durch Bindung des wasserlöslichen $InsP_3$ an spezifische $InsP_3$-Rezeptor-gekoppelten Kalziumkanäle des Endoplasmatischen Retikulums werden Kalzium Ionen freigesetzt

(Streb u. a., 1983),(Berridge, 1993),(Yoshida, Imai, 1997). Die freigesetzten Kalziumionen und das membranständige DAG können eine Reihe von Proteinkinasen aktivieren, wie z.B. die Proteinkinase C (PKC). In Folge werden Funktionsproteine phosphoryliert, welche die spezifische Zellantwort auslösen (Berridge, 1993). Die $InsP_3$-Moleküle können danach zwei Schicksale haben: $InsP_3$ kann zum einen bis zum myo-Inositol dephosphoryliert und somit inaktiviert werden. Es steht damit der erneuten Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$) zur Verfügung. Der Großteil der $InsP_3$-Moleküle wird durch die Inositol-1,4,5-trisphosphat 3-Kinase (IP3K) oder die IPMK zu $InsP_4$ (Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat) und weiter zu höher phosphorylierten Inositolphosphaten phosphoryliert (Irvine, Schell, 2001).

2.3.3 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase ist ein Heterodimer, das aus einer kalalytischen und einer regulatorischen Untereinheit besteht. Es werden 3 Klassen unterschieden, die unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Alle PI3K katalysieren die Phosphorylierung der Position D3 des Inositolringes der Phosphatidylinositole. Die PI3K der Klasse I werden wiederum in Klasse Ia und Ib unterteilt. Die PI3K Ia, die $PI(4,5)P_2$ zu $PI(3,4,5)P_3$ phosphoryliert, wird durch Rezeptoren wie z.B. Rezeptortyrosinkinasen rekrutiert. $PI(3,4,5)P_3$ stellt durch die Bindung von AKT und PDK1 eine wichtige Voraussetzung für deren Aktivierung dar (Denley u. a., 2009). AKT wird in Anwesenheit von $PI(3,4,5)P_3$ zunächst durch die PDK1 an Threoninrest 308 und anschließen durch den mTOR-Complex 2 an Serin 473 phosphoryliert und damit aktiviert. Die Zielproteine und Effekte von AKT werden nachfolgend genauer dargestellt.

2.3.4 Die Inositolphosphat-Multikinase

Bereits 1976 beschrieb Messenguy Transkriptionsfaktoren des Arginin-Stoffwechsels von *S. cerevisiae*, die er ArgR I-III (arg 80-82) nannte (Messenguy, 1976). 1999 zeigten Saiardi et. al., dass ArgRIII auch eine Inositolphosphat-Kinase ist, die den Inositolring an unterschiedlichen Stellen phosphorylieren kann, also eine Inositol(-poly)phosphat Multikinase ist (Saiardi u. a., 1999).

2002 identifizierten Nalaskowski et. al. das Gen für die humane IPMK auf dem kurzen Arm von Chromosom 10. Die IPMK ist primär nukleär lokalisiert (Nalaskowski u. a., 2002; Resnick u. a., 2005) und kann ATP-abhängig verschiedene Inositolphosphate (IP) an Position 3 und 6 phosphorylieren.

2.3.4.1 Struktur und Lokalisation

Die humane IPMK besteht aus 416 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 47,219 Kilodalton (kDa) (Nalaskowski u. a., 2002).

Abbildung 3: Kristallstruktur der Hefe-IPMK.
Die Kristallstruktur einer Vollängen IPMK wurde mittels Röntgenstrukturanalyse eines durch Dampfdiffusion und hängendem Tropfen gewonnen Kristalls durchgeführt.
Pink: N-Terminale Domäne; Gelb: IP-Bindungsdomäne; Türkis: C-Terminale Domäne.
(W. Holmes, G. Jogl, 2006)

Die Inositolphosphat-Kinasen lassen sich grundsätzlich in einen N-terminalen, regulatorischen- und einen C-terminalen katalytischen Bereich unterteilen. Die IPMK gehört zu den PDKG Kinasen, einer Gruppe von Inositolphosphat-Kinasen, die durch das gemeinsame Konsensus Inositol-Bindungsmotiv P-X-X-X-D-X-K-X-G definiert werden (Saiardi u. a., 1999). [„IP“ in Abb. 4 A und „PDKG“ in Abb. 4 B].
Auch das IP_3P Bindungsmotiv (Togashi u. a., 1997), die IP_3-katalytische Domäne (Bertsch u. a., 2000) und das SSLL Motiv sind ein gemeinsamer Bestandteil (Saiardi u. a., 2001). Das Expressionslevel der IPMK ist abhängig von der Spezies, der Gewebeart und der metabolischen Aktivität. Durch mRNA-Untersuchungen konnten besonders hohe Expressionslevel in der Leber und im Skelettmuskel gefunden werden (Chang u. a., 2002). Verschiedene Autoren wiesen die IPMK größtenteils im Zellkern nach (Nalaskowski u. a., 2002), (Resnick u. a., 2005).

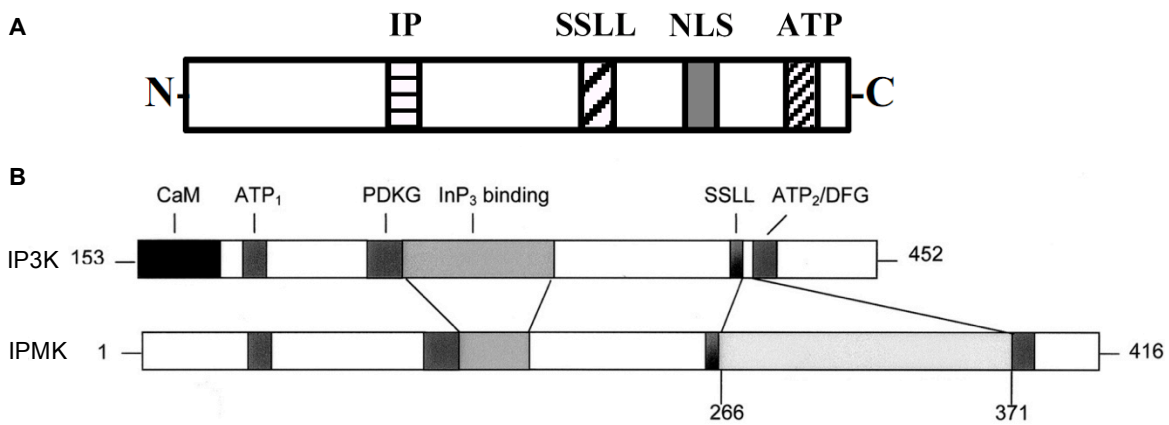

Abbildung 4: Funktionell wichtige Domänen der IPMK (A) und Vergleich mit der IP3K (B).
A Die HsIPMK kann in funktionale Domänen eingeteilt werden. Vom N-zum C-Terminus sind die Inositolphosphat-Bindungsdomäne (IP) [in B „PDKG“], die katalytisch wichtige SSLL-Domäne (SSLL), das Kernlokalisationssignal (NLS) und die ATP-Bindungsstelle (ATP) dargestellt. (Nalaskowski u.a. 2002)
B Vergleich funktioneller Domänen zwischen IPMK und IP3K. PDKG Konsensus-Sequenz; IP3 Bindungs-domäne; SSLL Motiv; ATP-Bindungsstelle (Mayr u. a., 2005)

Da die Kernmembran eine Barriere für größere Moleküle darstellt, besitzt die IPMK für den Transport in den Zellkern ein Kernlokalisationssignal (NLS) im C-terminalen Bereich (Aminosäuren 320-328) (Nalaskowski u. a., 2002) s. Abb. 5. Dabei handelt es sich um ein nicht-klassisches NLS, mit einem Abschnitt mit fünf basischen Aminosäuren in einem Segment von neun Aminosäuren. Die Position der basischen Reste ist zwischen diesem Fragment und einem Fragment des humanen c-Myc Proteins konserviert, das erwiesenermaßen eine NLS-Aktivität besitzt (Dang, Lee, 1988). Die IPMK wurde jedoch auch im Zytoplasma nachgewiesen, wo sie als PI3K an der Steuerung des AKT-Signalweges beteiligt ist (Maag u. a., 2011). Abbildung 5 zeigt die Funktion und Lokalisation des NLS der IPMK durch den Vergleich von transfizierten Zellen mit einem EGFP-IPMK-Fusionsprotein einmal mit NLS (Abb. 5A) und einmal mit einer Mutante, der die NLS fehlt (Abb. 5B). Die Mutante mit deletierter NLS ist dabei sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar, während die Volllängen-IPMK hauptsächlich im Zellkern nachweisbar ist. Weiterhin besitzt die IPMK ein klassisches leucinreiches Kern-Export-Signal im Bereich der Aminosäuren 170-179 (Meyer u.a. 2012), welches durch den CRM1-Export-Rezeptor erkannt wird. Durch Mutation dieses Teilabschnittes der IPMK konnte eine signifikante Zunahme der Kernfraktion der IPMK im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es sich bei der IPMK um ein nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein handelt.

Durch Phosphorylierung an Ser284 durch die ubiquitäre Proteinkinase CK2 (HEK293-Zellen), bzw. pseudo-Phosphorylierung an Ser284 (HeLa-, MeWo-Zellen) kam es zu einer signifikanten Abnahme der Kernfraktion der IPMK. Der Kernimport der IPMK scheint demnach auch von ihrem Phosphorylierungsgrad abhängig zu sein. Dies ist auch ein möglicher Erklärungsansatz für die zellinienspezifischen Unterschiede in der Verteilung zwischen Zellkern und Zytoplasma.

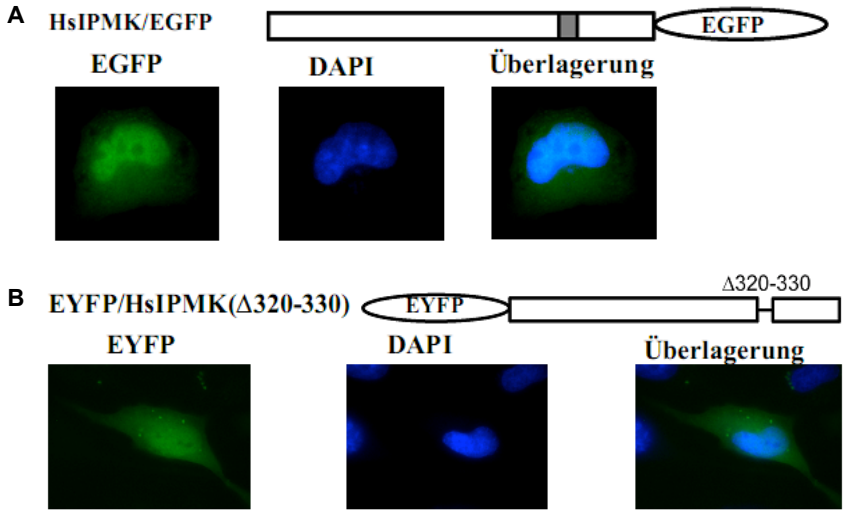

Abbildung 5: Lokalisationsstudien mit Vollängen-IPMK (A) und einer Deletionsmutante ohne NLS (B). Expression der Volllängen-HsIPMK in PC12 Zellen (A):PC12 Zellen wurden transient transfiziert mit Vektoren, die für Fusionsproteine aus HsIPMK und EGFP kodieren. Expression von Deletionsmutanten der HsIPMK in NRK 52E Zellen (B): Eukaryotische Expressionsvektoren wurden durch transiente Transfektion in NRK 52E Zellen eingebracht und die Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine wurde untersucht.
(Nalaskowski et. al, 2002)

2.3.4.2 Enzymatische Aktivität der IPMK

Die IPMK kann ATP-abhängig verschiedene Inositolphosphate (IP) an Position 3 und 6 phosphorylieren. Sie fungiert als Ins(1,4,5)P_3-3-Kinase, Ins(1,4,5,6)P_4-3-Kinase, Ins(1,4,5)P_3-6-Kinase und als Ins(1,3,4,5)P_4-6-Kinase (Nalaskowski u. a., 2002)·(Chang, Majerus, 2006). Die so gebildeten Metabolite haben vielfältige Funktionen wie IP_6-abhängiger mRNA-Export aus dem Zellkern (Odom, 2000), Chromatin-Remodeling (Steger, 2002)·(Shen, 2002), embryonaler Entwicklung, besonders des Neuralrohres bei Mäusen (Frederick u. a., 2005), Funktionen des Immunsystems (Sauer u. a., 2009) und die Telomerlänge (Ponnusamy u. a., 2008; Saiardi u. a., 2005; York u. a., 2005). Die IPMK bildet Ins(1,3,4,5,6)P_5 durch Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P_3 an Position 3 und 6.

Auf einem alternativen Syntheseweg kann Ins(1,3,4,5,6)P_5 über die IP3-Kinase, die Ins(1,4,5)P_3 in Ins(1,3,4,5)P_4 umwandelt (Irvine u. a., 1986) und die ITPK1 (Yang, Shears, 2000) (Saiardi, Cockcroft, 2008), die Ins(1,3,4)P_3 zu Ins(1,3,4,6)P_4 und Ins(1,3,4,5)P_4 phosphoryliert, hergestellt werden (s. Abb.6). Dabei scheint die ITPK1 das benötigte Phosphat aus der Dephosphorylierung von Ins(1,3,4,5,6)P_5 zu Ins(3,4,5,6)P_4 zu gewinnen. Ins(3,4,5,6)P_4 wirkt hemmend auf Kalzium-abhängige Kalziumkanäle, die durch Ins(1,4,5)P_3 abhängig freigesetztes Kalzium aktiviert werden.

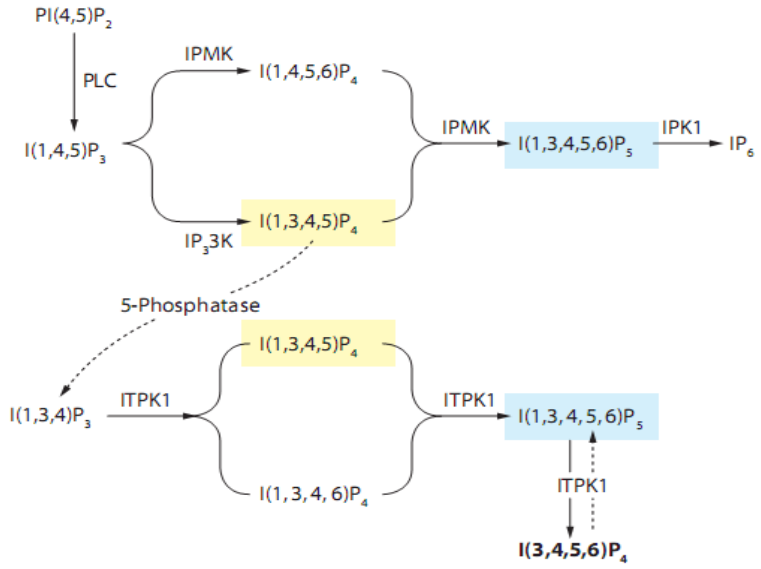

Abbildung 6 Alternative Synthesewege von InsP3 zu InsP5.
Der Second Messenger Ins(1,4,5)P_3 und Ins(1,3,4)P_3 werden durch unterschiedliche Enzyme weiter phosphoryliert und führen zu weitern Signalwegen. (Saiardi A, Cockcroft S., 2008)

Somit besteht über die Verstoffwechselung von Ins(1,4,5)P_3 zu Ins(3,4,5,6)P_4 ein negativer Rückkopplungsmechanismus im Kalziumstoffwechsel. 2005 zeigten Resnik et. al., dass die IPMK auch eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) ist, die die Transkription reguliert (Resnick u. a., 2005). Bis zu 50% der Wachstumsfaktor induzierten AKT-Phosphorylierung wird dabei durch die IPMK vermittelt (Maag u. a., 2011). Ein Teil dieser Aktivierung wird durch die PH-Domänen-Regulation durch lösliches Ins(1,3,4,5)-Tetrakisphosphat vermittelt (Huang u. a., 2007). Akt wird durch die Bindung von PI(3,4,5)P_3 an die PH-Domäne von AKT an die Zellmembran rekrutiert, wo die Phosphorylierung von Thr308 und Ser473 erfolgt. Erst durch diese Phospohrylierung wird AKT vollständig aktiviert.

Ins(1,3,4,5,6)P_5 (Falasca u. a., 2010; Maffucci u. a., 2005; Piccolo u. a., 2004) hemmt kompetitiv die PH-Bindung von PI(3,4,5)P_3 an AKT und damit auch die Aktivierung von AKT. Ins(1,3,4,5)P_4 hemmt die Aktivierung von AKT, wahrscheinlich durch kompetetive Hemmung der PI(3,4,5)P_3 Bindung (Sauer, Cooke 2010) (Sauer u. a. 2013). Als PI3-Kinase aktiviert die IPMK somit den Akt-Signalweg, als Inositolphospat-Kinase hemmt sie ihn und fungiert damit als molekularer Schalter, der diesen Signalweg aktiviert oder inhibiert (Maag u. a., 2011). Eine Möglichkeit der Regulierung dieses „Schalters“ zeigt sich bei den Versuchen, die IPMK mittels Wortmannin zu hemmen. In vitro zeigt sich dabei keine Verminderung der PI3K-Funktion der IPMK (Resnick u. a., 2005). In vivo wird die PI3-Kinase Aktivität der IPMK durch Wortmannin aber um ca. 70% reduziert (Maag u. a., 2011). Die Autoren vermuten, dass die PI3-Kinase Funktion der IPMK ihrerseits mittels Phosporylierung durch Wortmannin-sensitive Kinasen reguliert wird. Damit wäre der hemmende oder aktivierende Einfluss auf den Akt-Signalweg vom Phosphorylierungszustand der IPMK abhängig. Unabhängig von ihrer katalytischen Funktion stabilisiert die IPMK den mTOR-raptor Komplex und beeinflusst dadurch Proteintranslation und Zellwachstum (Kim u. a., 2011). Dies erklärt auch den Tod in der 9. Woche der Embryonalphase bei IPMK Knockout Mäusen, die phänotypisch mTOR knockout Tieren ähneln (Kim u. a., 2011).

2.3.4.3 Mutanten der Inositol-Polyphosphat-Multikinase (IPMK)

Zur Untersuchung der Funktionen der IPMK wurden mehrere Mutationen eingefügt, um spezifische Funktionen auszuschalten. Bei den Mutanten RK322QQ und KK327QQ, im weiteren RK322 und KK327 genannt, wurde die Kern-Lokalisations-Sequenz durch einen Austausch von Aminosäuren so verändert, dass sie nicht mehr spezifisch in den Kern transportiert werden (Nalaskowski u. a., 2002). Die Mutante D385A hat keine Kinaseaktivität. Zusätzlich wurden 2 Doppel-Mutanten verwendet, RK322QQ/ D385A und KK327QQ/ D385A, im weiteren RK322/D385A und KK327/D385A genannt, bei denen sowohl die NLS als auch die Kinasedomäne funktionslos sind. Alle Vektoren wurden mir freundlicherweise von Dr. rer. nat. M. Nalaskowski aus dem Institut für Biochemie und Signaltransduktion der Uniklinik Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt.

2.4 Der AKT-Signalweg

AKT ist ein wichtiges Bindeglied in vielen Signalkaskaden. Es gibt 3 Akt-Isoformen, AKT 1/2/3, auch PKB α/β/γ genannt Manning, B D; Cantley L C 2007).

Im Folgenden sollen die wichtigsten Funktionen dieses Enzyms dargestellt werden, um die Bedeutung für den Zellstoffwechsel und die maligne Entartung von Zellen zu zeigen (Abb 7).

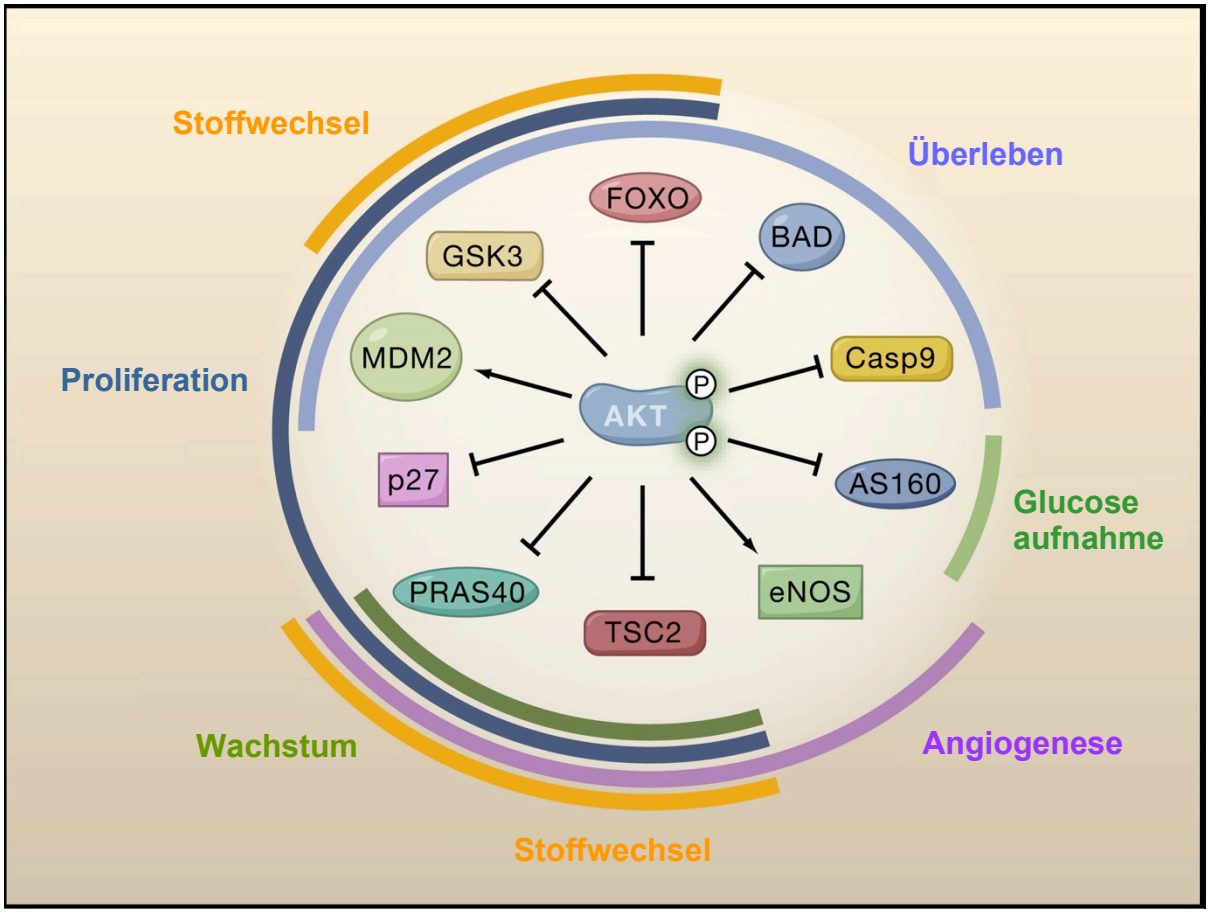

Abbildung 7: Funktion von AKT-Substraten in der Zelle.
Die Akt-vermittelte Phosphorylierung der gezeigten Proteine führt zu deren Aktivierung (Pfeile) oder Hemmung. Die Steuerung dieser Substrate durch AKT beeinflusst viele Prozesse der Zelle, wie Überleben, Wachstum, Proliferation, Glucoseaufnahme, Stoffwechsel und Angiogenese. Wie gezeigt haben einige Substrate Einfluss auf mehrere Signalwege und einige Signalwege mehrere Effektoren, die durch AKT reguliert werden.
(Abb. modifiziert nach Manning und Cantley 2007)

2.4.1 Zellüberleben

Die Bedeutung von AKT für das Zellüberleben war bereits vor der Identifizierung seiner Substrate bekannt. AKT wurde zunächst als Onkogen des AKT 8-Virus, das die Zelle vor Apoptose schützt, identifiziert (Bellacosa u. a., 1991). Proapoptotische Proteine werden durch AKT negativ reguliert und damit blockiert.

Wird das proapoptotische BAD durch AKT phosphoryliert, kann es keine Bcl2-Proteine binden (Datta u. a., 2000), der Signalweg wird unterbrochen. AKT blockiert auch die Transkription von Apoptose-Genen, indem es die FOXO-Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Diese dissoziieren von ihren Genen und werden aus dem Zellkern exportiert.
Wichtige proapoptotische Zielgene der FOXO-Proteine sind das BH3-Only Protein BIM (Dijkers u. a., 2000) und das Cytokin Fas Ligand (FasL) (Brunet u. a., 1999). Wird die E3 Ubiquitinligase MDM2 durch AKT phosphoryliert, transloziert sie in den Zellkern und reguliert dort negativ die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53 (Mayo, Donner, 2001). Ein weiteres Ziel für AKT ist GSK3, das nach Inaktivierung durch AKT das überlebensfördernde MCL-1 nicht mehr inhibieren kann (Maurer u. a., 2006). Caspase 9, die den mitochondrialen Apoptoseweg initiiert, muss zunächst in seine aktive Form überführt werden. Die Phosphorylierung durch AKT hemmt diese Aktivierung und damit die Apoptose (Cardone u. a., 1998).

2.4.2 Zellwachstum

Neben dem Einfluss auf das Zellüberleben spielt AKT auch eine wichtige Rolle in der Steuerung von Zellwachstum. Der wichtigste Steuerungsmechanismus stellt hierbei die Aktivierung des mTOR Komplex 1 (mTORC1) dar. Er reguliert die Initiation der Translation und die Synthese der Ribosomen. Die Aktivierung von mTORC1 wird über zwei Zielproteine von Akt, TSC2 (tuberous sclerosis 2) und PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40), reguliert (Martelli u. a., 2011). In Tumoren ist dieser Signalweg häufig enthemmt und ein möglicher Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie bei malignen Erkrankungen. Auch bei AML-Patienten konnte in 50-80% eine pathologische Aktivierung dieses Signalweges dargestellt werden (Martelli u. a., 2010).

2.4.3 Proliferation

Für die Steuerung der Zellteilung ist neben den o. g. Signalwegen auch die Kontrolle des Zellzyklus entscheidend. Das Protein p27 ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die den Übergang der verschiedenen Zyklusphasen kontrollieren. Wird p27 durch AKT phosphoryliert, gelangt es nicht in den Zellkern und der Zellzyklus kann ungehemmt durchlaufen werden (Larrea u. a., 2009).

In vielen Tumoren ist p27 inaktiviert oder vermindert (Chu u. a., 2008; Wander u. a., 2011).

2.4.4 Angiogenese

Die Angiogenese wird über NO (nitric oxide-Stickstoff) reguliert. In Endothelzellen wird NO durch die endotheliale NO Synthase eNOS gebildet. Diese wird durch AKT aktiviert (Morbidelli u. a., 2003).

2.4.5 Stoffwechsel

AS160 reguliert die Translokation des insulinabhängen GLUT4-Glucosetransporters in die Zellmembran (Hatakeyama, Kanzaki, 2011). Auch der Fettstoffwechsel wird durch AKT reguliert. GSK3 aktiviert SREBPs (sterol regulatory element binding proteins), Transkriptionsfaktoren der Cholesterin- und Fettsäuresynthese (Sundqvist u. a., 2005).

2.4.6 Der PI3K / AKT Signalweg in Tumoren

Damit Zellen entarten und maligne Neoplasien entstehen, müssen normalerweise mehrere Mutationen im Genom in einer einzelnen Zelle entstehen. Durch diese Veränderungen wird die Vermehrung der Zelle von den natürlichen Regulations-mechanismen abgekoppelt und sie kann sich ungehindert vermehren. Die Mutationen betreffen also im allgemeinen Signalwege die Wachstum und Vermehrung regulieren. Die beteiligten Gene werden in Onkogene, die in mutierter Form die Tumorentstehung aktiv fördern und Tumorsuppressorgene, die in inaktiviertem Zustand das Tumorwachstum fördern, unterteilt. Der Einfluss von AKT auf Zellwachstum und Zellteilung macht es zu einem Zielprotein in malignen Zellen. AKT ist in vielen Tumoren amplifiziert (Marte, Downward, 1997; Yuan, Cantley, 2008) oder konstitutiv aktiviert (Grandage u. a., 2005; Xu u. a., 2003).

2.5 Die akute myeloische Leukämie (AML)

2.5.1 Definition

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Erkrankung der myeloschen Zellreihe, zu der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten gehören. Ihre Häufigkeit beträgt etwa 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr und steigt mit dem Alter deutlich an. Durch das verdrängende Wachstum wird die normale Blutbildung beeinträchtigt. Es konnten unterschiedliche Auslöser für eine AML gefunden werden. Nicht selten tritt sie in Zusammenhang mit einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) auf (Weinberg u. a., 2009). Weitere Ursachen sind radioaktive Strahlung, Tabak, verschiedene Chemikalien wie Benzol, aber auch Arzneimittel wie Chloramphenicol und Zytostatika. Die Unterteilung der AML erfolgt nach der WHO-Klassifikation anhand zytogenetischer, molekulargenetischer wie auch morphologischer Veränderungen.

2.5.2 Klinisches Bild

Das klinische Bild wird durch die Verdrängung der Hämatopoese im Knochenmark bestimmt. Dabei können die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark betroffen sein. Die Anämie macht sich durch Schwäche und Blässe bemerkbar, die Neutropenie bedingt schwere Infektionen und die Thrombopenie erhöht die Blutungsneigung. Kommt es zum Blastenschub, erhöhen die Zellen die Blutviskosität und das Risiko für Gefäßverschlüsse steigt.
Seltener sind aleukämische Verläufe mit normaler oder sogar erniedrigter Leukozytenzahl zu beobachten.

2.5.3 Klassifikation und Therapie der AML

Wie alle Leukämien, werden die Unterformen der AML nach ihrer Morphologie eingeteilt.
Die French-American-British (FAB) Klassifikation teilt die AML nach morphologischen und zytochemischen Kriterien ein (Tabelle 1).

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Morphologische Kennzeichen	Typische zytogenetische Aberrationen
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	Unreife Blasten ohne Granulation	-
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	weniger als 10 % reife Zellen (= Promyelozyten, Granulozyten, Monozyten), nur spärliche Granulation	-
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	≥10 % reife Zellen in der Myelopoese, weniger als 20 % Monozyten	t(8;21) (in ca. 20 %)
$M2_{baso}$	Akute Basophilen-Leukämie		t(6;9)
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	30 % Promyelozyten (Blastenanteil oft weniger)	t(15;17), selten t(5;17), t(11;17)
M3v	Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form	-	t(15;17)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloische Zellen (Blasten + Promyelozyten) > 20 %, monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen) 20 % bis 80 %	-
$M4_{Eo}$	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	-	inv(16)
M5	Akute Monoblasten/Monozyten-Leukämie	mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten	-
M5a	Akute Monoblasten-Leukämie	mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon sind mehr als 80 % Monoblasten oder Promonozyten	-
M5b	Akute Monozyten-Leukämie	mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon sind mehr als 20 % Monozyten	-
M6	Akute Erythroleukämie (Erythrämie)	> 50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder >30 % aller Blasten unter den nicht-erythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie	-
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	Hochgradig pleomorphe Blasten	-

Tabelle 1: Die French-American-British (FAB) Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie
Die Einteilung der AML erfolgt aufgrund morphologischer Kriterien. Weiterhin werden zytochemische Eigenschaften wie die Reaktion mit Esterase und Peroxidase genutzt (hier nicht aufgeführt). Einige Subtypen zeigen typische zytochemische Aberrationen.
(Nach Bennet u.a. 1976)

Seit immer mehr zugrundeliegende Mutationen nachgewiesen wurden, änderte sich das Einteilungsschema. Aktuell wird die AML nach zytogenetischen und molekulargenetischen Aspekten unterteilt (WHO-Klassifikation, Tabelle 2)

Akute myeloische Leukämie mit wiederkehrenden zytogenetischen Anomalien	AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 AML mit inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 APL (Akute Promyelozytenleukämie) mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 AML mit inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 AML (megakaryoblastär) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 Vorläufige Entität: AML mit mutiertem NPM1 Vorläufige Entität: AML mit mutiertem CEBPA	
Akute myeloische Leukämie mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen		
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien		
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie (not otherwise specified, NOS)	AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a, b) Akute Erythroleukämie (FAB M6) - reine Erythroleukämie - Erythroleukämie, erythroid/myeloid Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7) Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelosis mit Myelofibrose (Syn.: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)	
Myeloisches Sarkom (Syn.: extramedullärer myeloischer Tumor; granulozytäres Sarkom; Chlorom)		
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom	Transient abnormale Myelopoese (Syn.: Transientes myeloproliferatives Syndrom) Down Syndrom assoziierte myeloische Leukämie	
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien		
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL15 Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und (v;11q23); MLL-Rearrangement Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert) Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert) Vorläufige Entität: Natural killer (NK) Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom	

Tabelle 2: Die WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien.
(Modifiziert nach Vardiman, u.a. 2009)

Neben chromosomalen Aberrationen finden sich auch eine Vielzahl an Punktmutationen bzw. Tandemduplikationen. Einige sollen hier kurz besprochen werden, da sie mittlerweile standardisiert zur Charakterisierung der AML verwendet werden und auch prognostisch bedeutsam sind. Am Häufigsten finden sich Mutationen im Nucleophosmin (NPM1) Gen, das für ein Protein der Chaperon-Gruppe kodiert, welches u.a. die Ribosomen-Biogenese, die Zentrosomen-Duplikation, Histon-Zusammenbau, Zellproliferation und die Regulation der Tumorsuppressor p53/TP53 und ARF steuert (Lindström 2011; Falini 2005). Bei AML Patienten mit normalem Karyotyp ist in 35-55% das NPM1-Gen mutiert, die Mutation ist mit einer günstigen Prognose assoziiert. Eine Mutation im FLT3-Gen

kommt bei ca. 20-40% der AML Patienten mit normalem Karyotp vor. Dieses Gen codiert für einen Tyrosinkinaserezeptor (Rosnet 1991), der Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der Zellen nimmt. Hier kommen sowohl Tandemduplikationen in der Juxtamembrandomäne (FLT3-ITD, 75-80%) (Yokota 1997), als auch Punktmutationen in der Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD, 20-25%) (Yamamoto 2001) vor. Neben diesen relativ spezifischen Mutationen gibt es einige weitere Mutationen, die nicht spezifisch für die AML sind, jedoch eine wichtige Rolle in der Leukämieentstehung spielen. Dazu gehören Punktmutationen im Protoonkogenen c-KIT, das für die Rezeptortyrosinkinase KIT codiert, dessen Ligand der Stammzell-Faktor (SCF) in gesunden Zellen das Wachstum steuert (Ikeda 1991). Ist c-KIT mutiert, ist die Tyrosinkinase auch ohne gebundenen Liganden aktiviert und das Wachstum ist enthemmt. Ähnlich Auswirkungen haben Mutationen im Protoonkogen RAS. Diese Mutationen werden als Typ-I-Mutationen bezeichnet. Typ-II-Mutationen betreffen Mutationen in Transkriptionsfaktoren oder Fusionsgene, die zu einem Differenzierungsstopp führen. Man erhofft sich durch diese feinere genetische Differenzierung auch bessere Behandlungsmöglichkeiten mittels Inhibitoren, die direkt auf die mutierten Proteine wirkt („targeted therapy). Aktuell gibt es unterschiedliche Chemotherapieprotokolle, die im Rahmen von Studien weiterentwickelt werden.

2.6 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

Das Myelodysplastische Syndrom ist ein Sammelbegriff für unterschiedliche Störungen der Knochenmarksfunktion. Es handelt sich um Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle, die durch Dysplasien von Blut- und Knochenmark-zellen mit hämatopoetischer Insuffizienz und erhöhtem Risiko der Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie gekennzeichnet sind. Die Produktion der einzelnen Zelllinien kann dabei unterschiedlich stark eingeschränkt sein.

2.7 Gentransfer und Expressionskontrolle

2.7.1 Transfektion

Transfektion meint das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen. Bei der transienten Transfektion wird die DNA von der Zelle aufgenommen und auch

exprimiert, sie wird jedoch nicht in die DNA der Zelle integriert und kann damit bei der Zellteilung auch nicht weitergegeben werden. Für die transiente Transfektion kann die DNA durch eine kurzfristige Instabilisierung der Zellmembran relativ einfach in hoher Konzentration in eine Zellkultur eingebracht werden. Die DNA wird exprimiert und das Protein kann durch Western Blot nachgewiesen werden. Die Expressionsrate in der Kultur sinkt jedoch nach wenigen Tagen, da das Gen bei der Zellteilung nicht weitergegeben wird. Längerfristige Effekte lassen sich somit nicht durch transiente Transfektion beobachten. Ein weiteres Problem ist die schlechte Reproduzierbarkeit. Die Transfektionsrate ist nicht nur methodenabhängig, sondern wird auch schon durch geringe Schwankungen in der Temperatur oder der Konzentration der Versuchsansätze beeinflusst. Auch die Expression ist sehr variabel. Nach der Transfektion braucht es einige Zeit, bis die Zellen die DNA exprimieren. Es folgt ein Maximum der Expression, während der viele Zellen das Gen integriert haben und es auch exprimieren. Mit dem weiteren Wachstum der Zellkultur überwiegt der Anteil der Zellen, die das Gen nicht mehr besitzen und die Expressionsrate sinkt. Diese Problematik lässt sich durch stabile Transfektion der Zellen umgehen. Hierbei wird die DNA in das Genom der Zelle integriert und damit auch bei der Zellteilung weitergegeben. Bringt man mit dem zu untersuchenden Gen auch eine Antibiotikarestistenz ein, kann man aus der Zellkultur die erfolgreich transfizierten Zellen selektionieren. Aus diesen Zellen lassen sich auch klonale Kulturen kultivieren.

2.7.1.1 Transfektion mittels Lipofectamin

Zur liposomalen Transfektion wurde Lipofectamin Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe), eine 3:1 (w/w)-Zusammensetzung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetat (DOSPA) und des neutralen Lipids Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE), verwendet. Es bildet in wässriger Lösung Mizellen, Liposomen genannt, die Fremd-DNA enthalten. Durch Fusion mit der Zellmembran geben die Mizellen die DNA in die Zelle ab.

2.7.1.2 Elektroporation

Neben unterschiedlichen chemischen Verfahren zum Gentransfer gibt es auch physikalische Methoden, um DNA in Zellen einzubringen. Neben der direkten Injektion von DNA in die Zelle (Graessmann u. a., 1979) kann die Permeabilität der Zellmembran durch das Anlegen eines elektrischen Feldes erhöht werden (Calvin, Hanawalt, 1988; Neumann u. a., 1982).

Für dieses Verfahren werden ein spezielles Elektroporationsgerät und Küvetten benötigt, in denen das elektrische Feld aufgebaut wird. Durch die Einstellung der Spannung (in Volt) am Elektroporationsgerät kann die Größe des elektrischen Feldes nach der Formel $E = V/d$ (V = Volt, d = Abstand zwischen den Elektroden der Küvette in Zentimetern) definiert werden. Es gilt, je größer der Zellradius ist, desto kleiner ist das benötigte äußere elektrische Feld, um eine Permeabilisation der Zellmembran zu erreichen. Der Grad der Permeabilisation kann durch die Pulsdauer kontrolliert werden, je länger die Pulsdauer ist, desto stärker ist die Permeabilisation der Membran in einem bestimmten Bereich. Die Ladung des Kondensators bestimmt die Pulsdauer. Das bedeutet, dass die Versuchsbedingungen je nach Zelltyp variiert werden müssen, um eine effektive Transfektion zu erreichen. Die Herstellerangaben für unterschiedliche Zelllinien bieten eine gute Orientierung für die Versuchsbedingungen. Im Labor wurden zuvor die Versuchsbedingungen weiter optimiert. Die verwendeten Einstellungen von 960 µF und 200 V hatten in umfangreichen Versuchsreihen die höchste Transfektionsrate für Jurkat-Zellen gezeigt (García-Palma u. a., 2005).

2.7.2 Transduktion mittels retroviraler Vektoren

Eine weitere Möglichkeit, ein Gen in Zellen einzuschleusen, ist die Transduktion mittels Viren. Dazu kommen unterschiedliche Viren in Frage, zur stabilen Transfektion werden jedoch Retroviren benötigt. Dabei wird das Gen zunächst als DNA in das Genom eines Retrovirus kloniert. Mithilfe einer Helferzelllinie werden aus diesem Plasmid vollständige Viren produziert, die nun auch das eingeschleuste Gen als RNA in sich tragen. Diese Viren infizieren die Zielzelle.

Durch die viruseigene reverse Transkriptase wird die RNA in DNA umgeschrieben und kann sich mittels der Integrase in das Genom der Zielzelle integrieren. Während der Zellteilung wird das Zielgen mit der Kern-DNA verdoppelt und an die

Tochterzellen weitergegeben. Dadurch kann eine effektive Geneinschleusung und Expression erreicht werden.

2.7.3 Tet-On System

Um die Funktion eines einzelnen Gens und seinen Einfluss auf die Zelle untersuchen zu können, ist es notwendig die Genexpression quantifizieren zu können. Damit die Versuche nicht von der zufälligen Transkriptionsrate der Zelle abhängig sind wurde ein System entwickelt, das eine quantitative Steuerung der Expression eines Genes erlaubt (Gossen, Bujard, 1992; Gossen u. a., 1995).
Die Basis dafür ist ein System zur Vermittlung einer Tetracyclinresistenz in E.coli. Es besteht aus zwei regulatorischen Elementen, dem Tet Repressor Protein (TetR) und der Tet Operator DNA Sequenz (tetO), die TetR binden kann. Solange diese Bindung besteht, werden die nachfolgenden Gene für das Tetracyclin-Antiporter-Protein, welches einen aktiven Transport der Tetracycline durch die Zellmembran vermittelt, nicht transkribiert. Das Protein wirkt als Negativ-Regulator auf die Transkription. Bindet Tetracyclin an das TetR Protein, dissoziiert dieses von der tetO und die nachfolgenden Gene könne transkribiert werden. Das Tetracyclin-Antiporter-Protein wird gebildet und das Tetracyclin durch aktiven Transport aus der Zelle gepumpt (Hillen, Berens, 1994). Das Tetracyclin wirkt hier als An-Aus-Schalter für die Transkription. In eukaryotischen Zellen gibt es keine derartigen Regulationssysteme, und damit auch keine entsprechende Tet Operator DNA Sequenz (tetO). Die Aktivierung, bzw. Inhibierung der Genexpression kann dadurch einerseits nur an dem einklonierten Gen erfolgen, andererseits haben die zelleigenen Promotoren keinen Einfluss auf die Expression.
Um dieses Prinzip in eukaryotischen Zellen sinnvoll nutzen zu könne, mussten einige Modifikationen erfolgen. Zunächst wurde ein Hybridprotein aus dem TetR-Protein mit der VP16 Aktivatordomäne des Herpes simplex Virus hergestellt, welches die Transkription nun positiv reguliert, d. h. durch Bindung an die Operator Sequenz die Genexpression aktiviert.
Dieser Tetracyclin kontrollierte Transaktivator (tTA) wird im Tet-Off System eingesetzt, weil er durch Tetracyclin von der Operator-Sequenz dissoziiert und nicht mehr als Transkriptionsfaktor dienen kann. Für das Tet-On System wurde das

nun reverser Tetracyclin kontrollierte Transactivator (rtTA) genannte Protein so verändert, dass es die Transkription aktiviert.

Um ein bestimmtes Gen kontrolliert zu exprimieren, wird es hinter einen Tet-responsiven Promotor einkloniert, der nach Bindung des tTA die Transkription inhibiert, bzw. nach Bindung des rtTA aktiviert. Der Tet-responsive Promotor besteht aus dem Tet-responsiven Element, das aus 7 tetO Sequenzen besteht, und dem minimalen CMV-Promotor.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Stammlösungen

1l LB-Medium

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto Yeast Extract
10 g	NaCl

Mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

LB-Agarplatten

1 L	LB-Medium
ad 15 g	Agar

autoklavieren, nach abkühlen auf 55°C

ad 50 µg/ml	Ampicillin
ad 25 µg/ml	Kanamycin

Lagerung bei 4°C

TE

1 ml	1 M Tris/HCl pH 8,0
0,2 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
ad 100 ml	ddH_2O

10X Ponceau S

2 g	Ponceau S
30 g	Trichloressigsäure
30 g	Sulfosalicylsäure

100% TCA

100 g	TCA
ad 100 ml	ddH_2O

10X TBS

87,66 g	NaCl
100 ml	1 M Tris HCl pH 8
ad 1 L	ddH_2O

1X TBST

500 ml	10X TBS
27,75 g	Tween 20
ad 5 L	ddH_2O

1X TBS 3%T

100 ml	10X TBS
33,33 g	Tween 20
ad 1 L	ddH_2O

1X PBS

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,77 g	Na2HPO4*2H2O
0,24 g	KH2PO4
ad 800 ml	ddH_2O
pH7,4 mit HCl einstellen	
ad 1000 ml	ddH_2O
autoklavieren und bei 4°C lagern	

10ml NP40 Lysepuffer

0,82 ml	ddH_2O
2,5 ml	0,2 M Hepes 7,5
0,3 ml	5M NaCl
0,5 ml	20% NP40
0,2 ml	Trasylol
0,08 ml	250 mM EDTA
1,0 ml	500mM NaF
1,0 ml	100mM NaPPi

2,5 ml	40 % Glycerin
1,0 ml	10 mM Vanadat
0,1 ml	100mM PMSF

5 ml NP40+N Lysepuffer

0,9 ml	ddH_2O
0,5 ml	0,2 M Hepes 7,5
0,42 ml	5M NaCl
0,038 ml	250 mM EDTA
1,25 ml	40 % Glycerin
0,1 ml	Trasylol
0,05 ml	100mM PMSF
0,25 ml	20% NP40
0,5 ml	500mM NaF
0,5 ml	100mM NaPPi
0,5 ml	10 mM Vanadat

10 ml RIPA-Lysepuffer

0,5 ml	20% NP40
0,5 ml	10% SDC (Natriumdeoxycholat)
0,1 ml	10% SDS
1,0 ml	10 mM Vanadat
0,1 ml	100mM PMSF
0,2 ml	Trasylol

10 ml Kernextraktionspuffer 1

0,5 ml	0,2M HEPES pH7,9
0,33 ml	3M KCl
4 ml	0,1mM EDTA
0,1 ml	100mM EGTA
1 ml	10mM Vanadat
1 ml	500mM NaF
1 ml	100mM NaPPi
0,2 ml	10.000KIU/ml Aprotinin

0,1 ml	100mM PMSF
ad 10 ml	ddH_2O

10 ml Kernextraktionspuffer 2

0,5 ml	1M TrisHCl pH 7,5
1 ml	100mM $MgCl_2$
0,2 ml	250mM EDTA
1 ml	10mM Vanadat
1 ml	500mM NaF
1 ml	100mM NaPPi
0,2 ml	10.000 KIU/ml Aprotinin
0,1 ml	100mM PMSF
ad 10 ml	ddH_2O

3.1.2 PAGE (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

1X TAE

40 mM	Tris
13 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA pH 8,0

1x DNA-Ladepuffer

5%	Glycerin
166,7 µM	EDTA pH 8,0
0,025%	Bromphenolblau
0,025%	Xylencyanol

1x Protein-Ladepuffer

62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
3%	SDS (Sodiumdodecylsulfat)
10%	Glycerol
0,01%	Bromphenolblau

3x Protein-Ladepuffer

180 mM	Tris-HCl pH 6,8

6%	SDS
30%	Glycerol
0,01%	Bromphenolblau

10X Laufpuffer

29 g	Tris Base
144 g	Glycin
ad 1 L	ddH_2O

1L 1X Laufpuffer

100 ml	10X Laufpuffer
10 ml	10% SDS
ad 1L	ddH_2O

3.1.3 Western Blot

Transferpuffer

100 ml	10X Laufpuffer
10 ml	10% SDS
200 ml	Methanol
ad 1L	ddH_2O

500 ml 20X MOPS-SDS Laufpuffer für NuPAGE Gele

104,6 g	MOPS 1M
60,6 g	Tris Base 1M
10 g	SDS 69,3M
3 g	EDTA 20,5M

Blocklösung

5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST

Waschlösung

2,5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST

3.1.4 Antikörper (AK)

3.1.4.1 Primäre Antikörper

IPMK H00253430-B01P #08266 (IPMK-B) (1:1000), von Novus Biologicals, polyklonales IgG aus Maus, gerichtet gegen humane IPMK.

SHIP1 (P1C1), sc-8425 (1:500), von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG1 aus Maus, 200 µg/ml, gerichtet gegen Aminosäuren 866-1020 im C-Terminus von Maus-SHIP1.

EGFP (1:1000), Roche Applied Science (Mannheim), Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern IgG1, die gegen EGFP gerichtet sind.

Lamin B (M20) (1:200) Santa Cruz Biotechnology, polyklonales IgG aus Ziege gegen ein Peptid am C-Terminus von Lamin B1 aus der Maus.

Histon (1:300) Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG1 aus Maus, gerichtet gegen AS 7-103 von Histon H4 von Maus, Mensch und Ratte.

GAPDH (6C5), sc-32233 (1:3000), von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG1 aus Maus, 100 µg/mL, gerichtet gegen GAPDH aus Kaninchenmuskel.

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology,

Kaninchen-anti-Ziege IgG (H+L) (1:3000), HRP-konjugiert, von Southern Biotech

Anti-Maus IgG-POD (H+L) (1:3000), Santa Cruz Biotechnology

3.1.5 Geräte

Protein-Gelelektrophoresekammern

SE 600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 16 cm (Hoefer, MA, USA)

SE 640 Wide-Mini Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 8 cm² (Hoefer)

PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, München)

XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)

DNA-Gelelektrophoresekammer (MWG Biotech, Ebersberg)

Blotkammer Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)

Geltrockner GelAir Dryer (Bio-Rad)

Schüttelmaschine RO 10 (Gerhardt, Königswinter)

Schüttelinkubator

G25 Incubator shaker (New Brunswick scientific, Edison, NJ, USA)

Aerotron (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)

Wipptisch Rocky N (Fröbel Labortechnik, Lindau)

Heizblöcke

STK Schnipptherm (Schutron Labortechnik, Quedlinburg)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Mikrowelle R-3A55 (Sharp, Hamburg)

Zentrifugen

Galaxy Mini (VWR, Darmstadt)

Biofuge pico (Heraeus, Hanau)

Sorvall RC-5B Centrifuge (DuPont Instruments, USA)

5415 C (Eppendorf)

5415 R (Eppendorf)

Varifuge OR.3 (Heraeus)

Rotoren

Sorvall GSA (DuPont Instruments)

Sorvall SS-34 (DuPont Instruments)

Heizplatte/Magnetrührer

IKAMAG RH (IKA-Werke, Staufen)

MR 1 (Heidolph Instruments, Schwabach)

pH-Meter CG 820 (Schott-Geräte, Ludwigshafen)

pH-Electrode Sentix 21 (WTW, Weilheim)

Brutschränke

Bakterien: BE 400 (Memmert, Schwabach)

Zellkultur: (Heraeus)

Werkbänke

Bakterien: Typ 20229 (MDH, Saskatoon, Saskatchewan Canada)

Zellkultur: HERA safe Type HS 12 (Heraeus)

Photometer

Ultrospec III (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Flow Titertek Multiskan PLUS Mk 11 (ICN Biomedicals, Frankfurt)

BioPhotometer 6131 (Eppendorf) mit Thermodrucker DPU 414 (Seiko Instruments, Neu-Isenburg)

Waagen

Type PM 200 (Mettler Instrumente, Gießen)

Type PM 2000 (Mettler Instrumente)

Spritze für Probenauftrag Exmine Micro Syringe MS-100 (Carl Roth, Karlsruhe)

Vortexer MS2 Minishaker (IKA-Werk, Staufen)

Zählkammer (Neubauer)

Wasserbäder

Typ 1012 (GFL, Burgwedel)

Typ 1002 (GFL, Burgwedel)

Sonifiziergerät Sonopuls GM70 mit Stab UW70 (Bandelin electronic, Berlin)

Ultraschallbad mit Flüssigkühlung G. Heinemann (Schwäbisch-Gmünd)

UV-Tisch

IL-350-M (Bachofer, Reutlingen) mit Video Monitor WV-BM900 (Panasonic),

Video Graphic Printer UP-890CE, (Sony)

FMC (Kappa)

Luminescent Image Analyzer mit CCD-Kamera LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf)

Mikroskope

Labovert Typ 090-122.012 (Leitz, Wetzlar)

Axiovert 25 (Zeiss, Jena) mit Stromversorgungsgerät mbq 52 ac

Elektroporationsgerät Gene Pulser X-Cell, Bio-Rad

3.1.6 Gefäße und Verbrauchsmaterial

0,5 ml-Reaktionsgefäße	(Biozym)
1,5 ml-Reaktionsgefäße	(Eppendorf, Sarstedt)
2,0 ml-Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
1000 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf)
200 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf)
10 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf)
2,5 µL-Pipettenspitzen	(Biozym)
13 mL Röhrchen	(Greiner bio-one, Sarstedt)
15 mL-Röhrchen	(Greiner bio-one)
50 mL-Röhrchen	(Greiner bio-one)
50 mL/ 250 mL/650 mL Zellkulturflaschen	(Greiner bio-one)
6-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
12-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
24-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
96-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
Petrischalen f. Gewebekultur 94/16 mm	(Greiner bio-one)
Petrischalen für Bakterien	(Sarstedt)
5 mL-/10 mL-/25 mL-Plastikpipetten	(BD Falcon)
Plastikgefäße	(VWR; Vitlab)
Glasgeräte	(Schott; VWR)
Parafilm	(Pechiney Plastic Packaging)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienkulturen

3.2.1.1 Wachstum und Vermehrung

Die Bakterienkulturen wurden im LB-Medium angezüchtet. Da alle verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Gen besaβen, wurde dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugefügt, um die Bakterien, die das gewünschte Plasmid beinhalten, positiv zu selektionieren. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C und unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Um Bakterienkolonien auf festem Boden anzuzüchten, wurde dem Medium mit Ampicillin-Zusatz, 1,5% Agar zugefügt und Agarplatten in Petrischalen gegossen. Die entsprechenden Bakterien wurden auf die Agarplatten angeimpft und über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2 Anlegen von Glycerolstocks

Die Bakterien wurden in Glycerolstocks bei -80°C gelagert. Dafür wurden einzelne Bakterienklone gepickt und über Nacht in 4 ml Medium herangezogen. Nach 12-16 Stunden wurde 1 ml Bakterienkultur in Nunc™-Plastikampullen mit Glycerin (Endkonzentration 15%) versetzt und eingefroren.

3.2.1.3 Transformation

Zur Erzeugung und Expansion der benötigten Plasmide wurden kompetenten *E. coli* DH10B Zellen verwendet. Zunächst wurden die DH10B Zellen mit jeweils 10 ng Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden pro Plasmid jeweils 100 µl kompetente DH-10b Zellen auf Eis aufgetaut und für 30 Minuten mit jeweils 50 ng Plasmid DNA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 Minute bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 38°C in 1 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin inkubiert und anschließend auf LB Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C kultiviert.

3.2.2 Isolation von Plasmid-DNA

3.2.2.1 Plasmid-DNA Maxipräparation

Die Maxipräparation wurde entsprechend des Protokolls aus dem „QUIAGEN Plasmid Purification Handbook“ durchgeführt.

Nach 16 Stunden wurden jeweils 2 Klone gepickt und für 7 Stunden bei 37°C und 300 rpm in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin inkubiert. Anschließend wurde aus jeweils einer Vorkultur 250 µl mit 100 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin für weitere 15 Stunden bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienzellen bei 6.000 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer P1 (10 74 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Es wurden 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10-mal Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit fand die Lyse der Bakterien statt. Anschließend wurden 10 ml 4°C kalter Puffer P3 (3 M KAc pH 5,5) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10-mal Invertieren gemischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 20.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut bei 20.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden Membrantrümmer, Proteine und genomische DNA aus den Proben entfernt. Eine Qiagen-Tip-500 Säule wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand aus dem letzten Schritt wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 10,5 ml propan-2-ol gefällt und bei 15.000 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 15.000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Zunächst wurde in der Gel-Elektrophorese gezeigt, dass alle durch die Maxipräparation gewonnenen Plasmide gleich groß und in ähnlicher Konzentration vorhanden sind. Dazu wurde ein 0,6%-iges Agarose Gel verwendet.

Die Agarose wurde in TAE Laufpuffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60°C, wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das noch flüssige Gel auf den Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden in 1x DNA-Ladepuffer aufgenommen und neben dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Der Längenstandard, mit *Hin*d III gespaltene-DNA (von MBI Fermentas), wurde kurz vor dem Auftragen für 5 min bei 65°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 5–16 V/cm (Kammer von MWG Biotech; Power Supply EPS200 von Amersham Pharmacia Biotech). Die DNA-Banden fluoreszierten aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids bei 312 nm und wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Gelelektrophorese, wurde die Fluoreszenz der zu messenden DNA Banden mit der Fluoreszenz der DNA Banden des mit *Hin*d III gespaltenen DNA Längenstandards verglichen. Bei bekannter DNA Konzentration der Banden des DNA Längenstandards konnte die DNA Konzentration der anderen Banden bestimmt werden. Eine genauere Bestimmung der Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Eppendorf Photometer mit UV-Lampe. Zur Ermittlung der Reinheit wurde die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis der Absorptionen OD260 nm/OD280 nm beträgt für reine DNA ≥ 1,8.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Zelllinien

3.2.3.1.1 HEK 293 T

Die HEK 293 T Zellen wurden aus humanem Nierengewebe kultiviert (human embryonic kidney -HEK), die mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham u. a., 1977). Die 293 Zelllinie T exprimiert zusätzlich das T Antigen des SV40. In neueren Arbeiten wird aufgrund der Expression neuronaler Proteine ein neuronaler Ursprung der Zelllinie diskutiert (Shaw u. a., 2002).

3.2.3.1.2 Die Verpackungszelllinie Phoenix™ Ampho

Zur stabilen Transfektion von Genen in die DNA von Zellen können Retrovieren genutzt werden. Um diese zu produzieren, werden Verpackungszelllinien benötigt, die virale Proteine exprimieren. Die Zelllinie stammt von HEK 293 T Zellen, die eine sehr hohe Transfektionsrate zeigen. Die Zellen beinhaltet Konstrukte für die Produktion von gag-pol (group-specific antigen; polymerase) (Co-Selektionsmarker Hygromycin) sowie für env (envelope, Hüllprotein) für amphotrope Viren (Co-Selektionsmarker Diphtherieresistenz). Die Zellen wachsen adhärent und zeigen bei Erreichen der Konfluenz keine Kontaktinhibition. Die Zellen wurden verwendet für die Pseudotypisierung mit dem konstitutiv exprimierten Hüllprotein des amphotropen Virus Klon 4070A sowie dem G-Protein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G), das durch transiente Transfektion in die Helferzelllinie eingebracht wird.

3.2.3.1.3 Jurkat Tet-On Zellen

Die Jurkat-Zelllinie wurde 1977 aus dem peripheren Blut eines an AML erkrankten Kindes gewonnen (Schneider u. a., 1977). Jurkat Tet-On (Clontech, Mountain View, CA, USA) exprimieren den reversen Tetracyclin kontrollierten Transaktivator. Beide Zelllinien sind Suspensionszellen und wurden von der AG von Prof. Dr. Andreas Guse zur Verfügung gestellt.

3.2.3.1.4 H1299 Zellen

H1299 Zellen wurden aus nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzellen kultiviert (Giaccone u. a., 1992). Es handelt sich um andhärent wachsende, epitheliale Zellen. Sie exprimieren kein p53 und sind dadurch immortalisiert.

3.2.3.1.5 Primäre Zellen von Leukämie-und MPS-Patienten

Die Proben zum Nachweis der IPMK in Zellen von Leukämie-und MPS Patienten stammen von Prof. Dr. med. Walter Fiedler aus dem onkologischen Zentrum der Uniklinik Eppendorf.

3.2.3.1.6 Vektoren

Alle verwendeten pLTR-tet-SV-HPH Vektoren wurden freundlicherweise von Markus Nalaskowski zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen γ-retroviralen Vektor mit einem TRE (tet response element) im 3'-LTR für die Doxycyclin-induzierbare Expression nach Integration ins Genom und Hygromycin-Resistenzgen unter SV40-Promotor-Kontrolle. Die IPMK wurden über die BamHI-Schnittstelle eingefügt.

Folgende Vektoren wurden verwendet:

pLTR-HsIPMK; wtIPMK:

wildtyp IPMK (reine IP3K-Aktivität)

pLTR-HsIPMK (RK322QQ); RK322:

Mutante mit inaktiviertem NLS

pLTR-HsIPMK (KK327QQ); KK327:

weitere Mutante mit inaktiviertem NLS

pLTR-HsIPMK (D385A); D385A:

Kinase-tote Mutante

pLTR-HsIPMK (RK322QQ/D385A); RK322/D385A:

inaktives NLS und Kinase-tot

pLTR-HsIPMK (KK327QQ/D385A); KK327/D385A:

inaktives NLS (andere Mutation) und Kinase-tote Mutante

pLTR-HsIP3KA (D2-163); IP3KA D2-163:

Expression von Calmodulin-Bindungs-domäne und katalytischer Domäne der HsIP3KA, N-terminaler Bereich deletiert

pLTR-EGFP:

Codiert für das enhanced green fluorescent protein

M57 SVgp:

Codiert γ-retrovirale gag- und pol-Proteine unter SV40-Promotor-Kontrolle.

K25-2 pHCMV-A-MLVenv (Ampho):

Codiert amphotropes murines Leukämievirus Hüllprotein unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus.

M75 pVSV-G:

Codiert Vesikuläre Stomatitis Virus G Hüllprotein.

3.2.3.2 Stammhaltung und Subkultivierung

Die adhärent wachsenden Zelllinien (Phönix-Ampho, HEK293T) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (= DMEM-Vollmedium) kultiviert. Die Zellen wurden jeden 2.–3. Tag subkultiviert und bei einer Konfluenz von 50-90% gehalten. Dazu wurden die Zellen trypsiniert. Das alte Medium wurde abpipettiert und 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, sodass sie bedeckt wurden. Nach 1 min Inkubation wurde die Wirkung der Trypsin-Lösung durch Zugabe des zweifachen Volumens an Vollmedium blockiert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde der gewünschte Anteil der Zellen subkultiviert und in frischem Medium aufgenommen.

Die Suspensionszellen (Jurkat) wurden als Suspensionskultur in RPMI (Roswell Park Memorial Institue)-Medium 1640 mit Glutamax, 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (= RPMI-Vollmedium) gehalten. Die Suspensionszellen wurden jeden 2.–3. Tag subkultiviert, in einem Verhältnis von 1:2–1:5 geteilt, und bei einer Dichte zwischen 1×10^5 – 1×10^6 Zellen/ml gehalten. Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und in einer 5%-igen CO2-Atmosphäre kultiviert.

3.2.3.3 Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden trypsiniert. Nachdem die Trypsin-Lösung mit Vollmedium blockiert wurde, wurden 1×10^6–1×10^7 Zellen für 5 min bei 2.100 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 2.100 rpm, Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 90%-igem FCS/ 10%-igem DMSO aufgenommen. $1x\ 10^6$–$1x\ 10^7$ Suspensionszellen wurden für 5 min bei 2.100 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen.

Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 2.100 rpm bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 90%-igem FCS/ 10%-igem DMSO aufgenommen. Die Zellen wurden langsam eingefroren (1°C pro Stunde im Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.3.4 Auftauen von Zellen

Die im Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. 9 ml Vollmedium wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und die aufgetauten Zellen dazugegeben. Die Zellen wurden durch Invertierten gemischt und dann sofort für 5 min bei 1.200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in den Inkubator gestellt.

3.2.3.5 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Durch die Trypanblau-Färbung konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen werden erst nach längerer Zeit gefärbt, während tote Zellen aufgrund der geschädigten Zellmembran innerhalb kurzer Zeit (wenige Sekunden) gefärbt werden. Adhärente Zellen wurden trypsiniert. Die Trypsin-Lösung wurde blockiert und die Zellen wurden resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden 1:2 mit der Trypanblaulösung (gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich) verdünnt. Bei Suspensionszellen wurden die Zellen direkt aus der Kultur genommen und 1:2 mit der Trypanblaulösung verdünnt. Nach einer Inkubationsdauer von 1 min erfolgte die Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer.

3.2.3.6 Transiente Lipofectamin™ Transfektion der Phoenix™ Ampho–Zellen und der HEK 293 T Zellen

Zur Transfektion der adhärenten Zellen wurden Lipofectamin™ und PLUS-Reagenz benutzt. Dazu wurde die Konzentration der Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und dann jeweils 1,5 x 10^6 Zellen in 10 ml DMEM-Medium (10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) in 10 cm Petrischalen ausgesät. 2 Tage später wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden jeweils 5 µg des Vektors, sowie 5 µ des Ampho-Vektors, 2 µg des SVgp-Vektors und 10 µg des pVSV-G-Vektors in 1,5 ml Eppendorf-Tubes in 750 µl OPTI-MEM ohne Serum suspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Plus-Reagenz wurde die DNA-Mischung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 30 µl Lipofectamin wurden in separaten Tubes in 750 µl OPTI-MEM ohne Serum suspendiert und zu der DNA–Mischung gegeben.

Das verbrauchte Medium wurde durch 5 ml DMEM–Medium (10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) ersetzt und die Lipofectamin/ DNA-Mischung vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Nach 3 h im Brutschrank wurde mit DMEM–Medium (10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) auf 10 ml aufgefüllt. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 7 ml DMEM–Medium (10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin) ersetzt.

3.2.3.7 Transduktion der Jurkat Tet-On Zellen mit amphotrophen Viren

Zur Virenproduktion für die Transduktion der Jurkat Tet-On Zellen wurden transient transfizierte Phoenix™ Ampho–Zellen verwendet.
Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde der Virenüberstand der Phoenix™ Ampho–Zellen mit einer 10 ml Spritze vorsichtig abgenommen und filtriert (Acrodiskfilter; 0,45 µm; Pallman). Anschließend wurde neues DMEM-Medium hinzupipettiert. Die Jurkat Tet-On Zellen wurden 5 min bei 2.100 rpm abzentrifugiert, in dem frischen Virenüberstand resuspendiert und in 6-Well-Platten überführt. Die Platten wurden für 1 Stunde bei 2.100 rpm und RT zentrifugiert und anschließend für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. In den nächsten 2 Tagen wurde die gleiche Prozedur wiederholt. 24 Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen lysiert.

3.2.3.8 Elektroporation der Jurkat Tet-On Zellen

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wird der Ladungszustand der Zellmembran verändert und es entstehen Poren, durch die DNA von Außen in die Zelle gelangen kann. (Neumann u. a., 1982) Für die Elektroporation mittels Gene-Pulser wurden jeweils 5 x 10^7 Zellen/ ml in FCS in ein 15 ml Tube überführt und 7 min bei 2.100 rpm und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in 400 µl frischem FCS resuspendiert. Pro Ansatz wurden 10 µg DNA in 50 µl TE in eine Elektroporationsküvette (24 Stunden in Ethanol gelegt und getrocknet) vorgelegt und die Zellsuspension hinzupipettiert. Dann erfolgte die Elektroporation mit dem Gene Pulser (Biorad) mit 960 µF und 200 mV. Die Zellen wurde anschließend in 2 ml RPMI Medium resuspendiert und für 17 Stunden in 6-Well Platten inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion mit 8 µg/µl Geneticin. Im Fluoreszensmikroskop wurde der Erfolg der Selektion regelmäßig überprüft. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte Jurkat Tet-On Zellen verwendet.

3.2.3.9 Selektion der transformierten Zellen

Zwei Tage nach dem letzten Virenüberstandswechsel, wurden die Zellen abzentrifugiert und in 4 ml Selektionsmedium, RPMI-/ DMEM Medium mit 400 µg/ ml Hygromycin B, resuspendiert. Das Selektionsmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt, um eine ausreichende Hygromycin B Konzentration zu gewährleisten. Nachdem die Zellen genügend dicht gewachsen waren, wurden sie in kleine Zellkulturflaschen mit 9 ml Selektionsmedium umgesetzt.

3.2.3.10 Limiting Dilution

Um einzelne Klone zu erhalten, wurde die Konzentration der infizierten Jurkat Tet-On Zellen bestimmt und dann in mehreren Verdünnungsschritten auf 10/ml reduziert. Zur Selektion der Zellen, die den Tet-On Vektor integriert haben, wurde dem Medium zusätzlich 800 µg/ml Geneticin hinzugefügt. Anschließend wurde pro Plasmid eine 96-Well Platte mit jeweils 100 µl bestückt, so dass im Mittel 1 Zelle/ Loch befand. Nach vier Tagen wurde kontrolliert, in welchen Wells sich nur jeweils 1 Zelle befand. Aus diesen Zellen wurden durch Expansion klonale Kulturen selektioniert.

3.2.3.11 Induktion mit Doxycyclin

Der verwendete Doxycyclin induzierbare Tet-on Vektor erlaubt die Steuerung der Expression des Vektors. Je Klon wurde eine Doxycyclinprobe, und eine Negativprobe mit 70% Ethanol angesetzt. Dazu wurden je Probe 5 ml RPMI-Medium mit 10 µl Doxyciclin (1 µl/ml), bzw. 10 µl 70% Ethanol (1 µl/ml) versetzt und vorgelegt. Es wurden je Klon 6x 10^6 Zellen ausgezählt und bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml RPMI resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 5 ml der Suspension zum vorgelegten Doxyciclin bzw. Ethanol gegeben. Die Doxyciclin Konzentration lag somit bei 0,5 µl/ml. Nach 48 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt.

3.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

3.2.4.1 Herstellen von Proteinlysaten

3.2.4.1.1 NP40-Puffer Lyse

Die Proben wurden bei 4°C und 2.100 rpm 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und jeweils 5 ml eiskaltes PBS/ Natrium-Ortho-Vanadat zugegeben. Die Proben wurden gevortext und dann erneut bei 4°C und 2.100 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, Reste vorsichtig mit einer 200 µl Pipette abgesaugt. Dann erfolgte die Lyse in eiskaltem NP40 Puffer. Je Lysat wurden ca. 8 x 10^7 Zellen/ml Puffer verwendet. Die Zellen wurden 5x in dem Puffer rauf und runter pipettiert und dann 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube überführt und bei 4°C und 13.000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC-Protein Assay von BioRad durchgeführt.

3.2.4.1.2 RIPA-Puffer Lyse

Die Proben wurden bei 2.100 rpm 5 min bei RT Zentrifugiert, der Überstand verworfen und jeweils 5 ml PBS/ Natrium-Ortho-Vanadat zugegeben. Die Proben wurden gevortext und dann erneut mit 2.100 rpm 10 min zentrifugiert.
Dann erfolgte die Lyse in eiskaltem RIPA-Puffer. Je Lysat wurden ca. 2 x 10^7 Zellen/ml Puffer verwendet. Die Zellen wurden 5x in dem Puffer rauf und runter pipettiert und dann 30 min auf Eis inkubiert. Zur besseren Auftrennung wurden die Proben mit einer 21 Gauge Nadel homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Tube überführt und bei 4°C und 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC-Protein Assay von BioRad durchgeführt.

3.2.4.1.3 TCA-Lyse

Die Proben (5-10 x 10^6 Zellen) wurden 2 min mit 500 rpm bei RT zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde 2x in 500 µl 0,15 M NaCl durch resuspendieren und erneutes abzentrifugieren gewaschen. Anschließend wurde

das Pellet in 450 µl 0,15 M NaCl resuspendiert, 50 µl TCA zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde 5 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl Ladepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 8µl 1M Tris wurde die Probe im Wasserbad zweimal 30 sek. auf Stufe 10 sonifiziert.

3.2.4.1.4 Fraktionierung in Kernlysat und Zytoplasmalysat

Suspensionszellen in Falcon-Röhrchen füllen und 7 min. bei 12.000rpm und 4°C (Zellkulturzentrifuge) zentrifugieren, Medium abgießen und abtropfen lassen.
Zellen in 10ml 1xPBS+Vanadat (1mM f.c.) aufnehmen (PBS/Vanadat: 19 mg Na-Othovanadat in 100 ml PBS einwiegen) und 7 min. bei 1200rpm und 4°C (Zellkulturzentrifuge) zentrifugieren. Überstand abgießen und kurz abtropfen lassen. Pellet vorsichtig in 500µl Puffer 1 resuspendieren, vortexen und in ein Eppendorf-Tube überführen. 15 min. auf Eis inkubieren, zwischendurch wiederholt vortexen.
Anschließend 15,7µl 20%iges NP-40 zufügen und 10 Sek. vortexen, dann ca. 5-10 min. inkubieren lassen und 10 min bei 400g und 4°C zentrifugieren.
Den Überstand (=Cytoplasmafraktion) in ein Eppendorf-Tube geben, noch einmal abzentrifugieren (13.000 g) und bei -80°C einfrieren. Zum verbleibenden Pellet 500µl Puffer 1 geben, 10 min auf Eis inkubieren und 6 min. bei 1000g u. 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen. Auf gleiche Art das Pellet noch 2x waschen. Das Pellet in 200µl Puffer 2 resuspendieren und ca. 6x30Sek. konstant bei 4°C sonifizieren bis das Pellet gelöst ist. Dabei zwischendurch immer wieder auf Eis stellen.
Bei 12.000g und. 4°C 2 min. zentrifugieren. Die so erhaltene Kernfraktion (=Überstand) abnehmen und bei -80°C einfrieren.

3.2.4.2 DC-Protein Assay von BioRad

Zunächst wurde ein BSA-Standard hergestellt. Dazu wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe BSA Konzentrationen von 2,5 mg/ml bis 0,125 mg/ml in dem jeweils verwendeten Puffer, sowie nur Puffer als Leerwert hergestellt. Der BSA Standard wurde bei -20°C eingefroren und konnte mehrfach verwendet werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 5 µl Triplikate der 1:5 verdünnten Proben, bzw. der BSA Standartreihe in Microtiter-Wells pipettiert. Dazu wurden zunächst 25 µl Reagenz A´ und dann 200 µl der Reagenz B aus dem DC-Protein Assay von BioRad hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min konnten die Proben innerhalb einer Stunde im ELISA-Reader bei 595 nm vermessen werden. Mit Hilfe der Extinktion der BSA Standardreihe konnte dann die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden.

3.2.4.3 Gelelektrophorese und Western Blot

Die Gelelektrophorese wurde teilweise mit NuPAGE Gelen von BioRad und teilweise mit selbstgegossenen 10% Polyacrylamidgelen durchgeführt.
Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen für alle Lysate aufgetragen. Ausnahmen waren die Positivkontrollen, die in deutlich geringeren Mengen verwendet wurden. Die Lysate wurden mit dem jeweils verwendeten Lysepuffer auf gleiche Volumina aufgefüllt und mit 3x Ladepuffer mit DTT auf Eis gevortext und zentrifugiert. Die Marker wurden mit 1x Ladepuffer mit DTT versetzt. Die vorbereiteten Proben wurden für 10 min bei 100°C erhitzt und dann wieder auf Eis gestellt. Vor dem Auftragen wurden die Proben abzentrifugiert. Der Laufpuffer der Kathode wurde mit 1 µl/ml DTT versetzt. Nach dem Zeihen der Kämme wurden die Geltaschen mit der Hamiltonspritze gespült, um Acrylmonomerreste zu entfernen. Nach Auftragen der Proben wurde die Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese bei 200 V durchgeführt. Die Stromstärke war variabel.
Eine auf Gelgröße zugeschnittene Nitrocellulosemembran wurde zunächst in ddH20 und anschließend in 1x Transferpuffer gelegt. Gel und die aufgelegte Membran wurden zwischen zwei Whatman®-3MM-Chromatografiepapiere und zwei Scotch-Schwämmen in die Western Blot-Apparatur (Trans-Blot™ Cell, Bio Rad) eingespannt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte über zwei Stunden bei 50 V. Anschließend wurde die Apparatur abgebaut und der am Rand aufgetragene Marker als Streifen von der Membran abgeschnitten.
Nach dem Bloten wurden die Membranen in TBS gespült und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Waschlösung auf Eis angesetzt und die Membranen über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal 10 Minuten in Waschlösung gewaschen. Der Marker wurde

über Nacht in der Blocklösung belassen und am nächsten Tag in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in Waschlösung auf Eis angesetzt und die Membranen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Marker wurde in Streptavidin-HRP 1:3.000 in TBST inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wie folgt gewaschen.

2x kurz in TBS
2x 10 min in 1X TBST
1x 10 min in TBS 3%T
2x 15 min in 1X TBST
2x 30 min in 1X TBST
2x 30 min in 1X TBS

Anschließend wurden die Membranen mit einer Mischung aus je 500 µl Super Signal West pico Luminol/ Enhace Solution und Super Signal West pico Stabile Peroxide Solution, sowie je 50 µl Super Signal West Dura Luminol/ Enhancer Solution und Super Signal West Stabile Peroxide Buffer inkubiert.
Anschließend wurde die Membran und der Markenstreifen zwischen zwei Plastikfolien im Imager *(„Intelligent Dark Box“,* FUJIFILM) entwickelt. Die Filter wurden nach der Entwicklung in 1x TBS bei 4°C gelagert.

3.2.4.4 Ponceau S Färbung von Westernblot-Membranen

Nach dem Bloten wurde die Membran 2 min in salzfreiem H_2O gewaschen.
Anschließend wurde die Membran in Ponceau S Lösung gelegt und 5-15 min auf dem Schüttler gefärbt. Sobald die Proteinbanden deutlich gefärbt waren, wurde die Membran in salzfreiem H_2O zur Entfärbung des Hintergrundes 2-3x gewaschen.
Vor dem Blocken wurde die Membran 2-3x in TBS gewaschen.
Die Ponceau Lösung wurde mehrfach wiederverwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung retroviraler Vektoren und Transduktion

Der verwendete pLTR-tet-SV-HPH-Vektor erlaubt sowohl eine direkte Transfektion von Zellen, als auch die Transduktion mittels Retroviren. Es wurden sechs Vektoren, in die unterschiedliche Konstrukte einkloniert waren, verwendet. Neben dem Vektor mit der humanen IPMK (wtIPMK) wurden Konstrukte mit Mutationen in funktionell wichtigen Domänen verwendet. Es wurden zwei Mutationen der Kernlokalisationssequenz zwischen den Aminosäuren 320-328 gefunden, die die Funktion der NLS stören (KK327, RK322). Eine Mutation im katalytischen Bereich des Enzyms erzeugte eine Kinase-tote Mutante (D385A). Weiterhin wurden zwei Doppelmutanten verwendet, bei denen sowohl jeweils ein NLS, als auch die Kinasedomäne mutiert und damit funktionslos sind (KK327/D385A, RK322/D385A).
Die Vektoren wurden mir freundlicherweise von Dr. Markus Nalaskowski zur Verfügung gestellt.
Um Zellen zu erhalten, die die Konstrukte stabil in ihre DNA integrieren, wurden Retroviren benötigt, die den jeweiligen Vektor enthalten. Um ausreichende Mengen an Plasmiden zu erhalten, wurden zunächst kompetente *E.coli* DH10b transformiert und die Plasmide mittels Maxi-Präparation gewonnen. Anschließend wurden die virusproduzierenden Phoenix™ Ampho Zellen mittels Lipofectamin transfiziert. Der virenhaltige Mediumüberstand wurde zur Transduktion der Jurkat Tet-On Zellen verwendet. Anschließend wurden die Jurkat-Zellen mit Hygromycin B auf den integrierten Vektor hin selektioniert. Hier zeigte sich eine geringe Transduktionsrate, ein Großteil der Zellen starb in den folgenden Tagen. Zwei Kulturen, die mit wtIPMK und RK322 transduzierten Zellen, starben unter Selektion ab. Nach erneuter Transfektion und anschließender Transduktion, konnten Zellen mit diesen Vektoren selektioniert werden. Als Negativkontrolle wurden nicht-transduzierte Jurkat Tet-On Zellen verwendet. Diese starben im Selektionsmedium nach zwei Wochen.

4.2 Nachweis der IPMK in klonalen Jurkat-Zellen

Nachdem die Jurkat-Zellen unter Selektion expandiert waren, konnte eine Limiting Dilution zur Gewinnung von klonalen Zellkulturen durchgeführt werden. Je Klon wurde anschließend jeweils eine Probe mit Doxycyclin induziert und eine Probe nur mit dem Lösungsmittel Ethanol inkubiert. Nach der Induktion wurden die Zellen mit NP40 Puffer lysiert und die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Zur Auftrennung der Proben wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel verwendet. Nach dem Blotten auf Nitrocellulosemembranen konnten die Positivkontrollen, eine rekombinante bakterielle IPMK bei 48 kDa und ein Lysat von EGFP-IPMK überexprimierenden H1299 Zellen bei 74 kDa, mittels IPMK Antikörper (B1) detektiert werden (s. Abb. 8).

Allerdings ließ sich IPMK weder endogen in H1299 Zellen, noch in den transduzierten Jurkat-Zellen nachweisen. Dabei war zuvor in der AG Mayr bereits ein Nachweis endogener IPMK Expression in H1299 Zellen erfolgt.

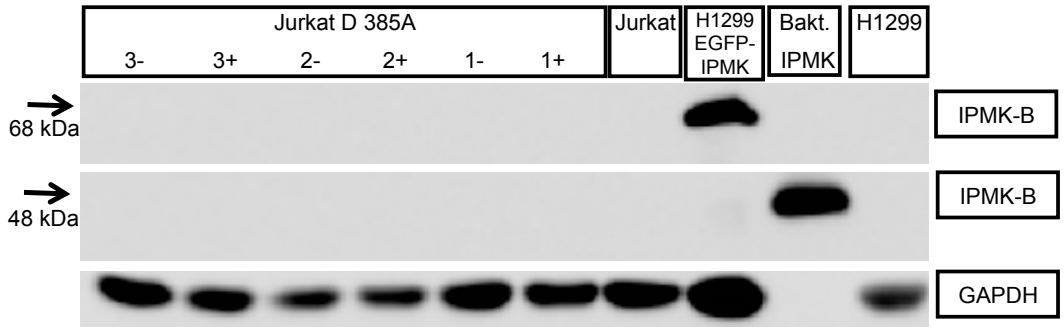

Abbildung 8: Doxycyclininduzierte Expression von IPMK Mutanten in Jurkat Tet-On Zelllysaten.
Es wurden jeweils mehrere Klone je Mutation etabliert und als NP40 Lysat aufgetragen. Für jeden Klon wurde neben dem Doxycylcin induzierten Lysat (+) ein nicht induziertes Lysat (-) aufgetragen. Mit GAPDH wurde die aufgetragene Proteinmenge dargestellt.
Primärer AK: IPMK H00253430-B01P #08266 (IPMK-B) (1:1000), von Novus Biologicals.
Sekundärer AK: Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology.
H1299: Zellen, die endogen IPMK exprimieren; Bakt. IPMK: bakterielle IPMK; H1299 IPMK-EGFP: H1299 Zellen, die ein Fusionsprotein überexprimieren. Jurkat: Jurkat Tet-On Zellen; D385A: Kinase-tote Mutante; RK 322/ D385A: Mutante mit defekter NLS und funktionsloser Kinasedomäne; KK 327: Mutante mit defekter NLS.

4.3 Nachweis geringer IPMK Expression in transient transfizierten HEK 293 T Zellen

HEK 293 T Zellen wurden mittels Lipofectamin mit zwei, aus unterschiedlichen Maxi-Präparationen gewonnenen, pLTR-HsIPMK Plasmiden transfiziert und nach 20 Stunden RIPA Lysate hergestellt (293 T 1+3). Als Positivkontrolle diente

bakterielle rekombinante IPMK (rP), als Negativkontrolle EGFP transfizierte HEK 293 T Zellen verwendet.

Auch nach transienter Transfektion ließen sich nur sehr geringe Mengen der IPMK in den HEK 293 T Zellen nachweisen. Eine Überexpression gegenüber den mit EGFP-Vektor transfizierten Zellen war nicht nachweisbar.

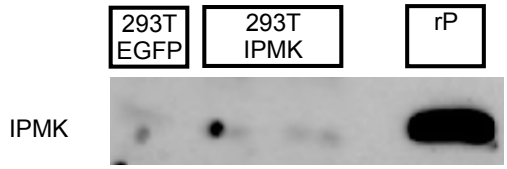

Abbildung 9: IPMK Expression in transient transfizierten HEK 293 T Zellen.
Western Blot mit IPMK Antikörper. HEK 293 T Zellen wurden mit IPMK Vektoren aus 2 Maxi-Präparationen mittels Lipofectamin transfiziert.
Primärer AK: Primäre AK: IPMK H00253430-B01P #08266 (IPMK-B) (1:1000), von Novus Biologicals
Sekundäre AK: Anti-Maus IgG-POD (H+L) (1:3000), Santa Cruz Biotechnology,
293T EGFP: EGFP transfizierte HEK 293 T Zellen; rP: rekombinante bakterielle IPMK.

4.4 Vergleich der Effektivität der Extraktion von nukleären Proteinen durch unterschiedliche Lyseprotokolle

Die IPMK ist ein vorwiegend nukleär lokalisiertes Enzym (Nalaskowski u. a., 2002), zum Nachweis ist deswegen eine effektive Lyse des nukleären Kompartimentes wichtig. Es wurden unterschiedliche Lyseprotokolle angewendet und die quantitative Extraktion zytoplasmatischer und nukleärer Proteine durch Western Blots mit Antikörpern gegen zytosolische (SHIP) und nukleäre (Lamin B) Proteine verglichen (s. Abb. 10 A). Gleichzeitig wurde eine zweite Gelelektrophorese mit denselben Lysaten durchgeführt. Hier wurde der IPMK B01 Antikörper verwendet (s. Abb.10 B).

In dem NP40+N Puffer war eine erhöhte Salzkonzentration gegeben. Die Jurkat-Lysate wurden freundlicherweise von Wiebke Wegner zur Verfügung gestellt. Das H1299 Lysat mit EGFP-IPMK Überexpression wurde, ebenso wie das H1299 Lysat mit endogener IPMK Expression, von Susanne Giehler zur Verfügung gestellt, aber in deutlich niedrigerer Dosierung aufgetragen als die restlichen Proben. Wegen der geringen Proteinmenge dieser Probe, konnte kein Lamin B nachgewiesen werden.

In den NP40 und NP40+N Lysaten konnte ebenfalls kein Lamin B nachgewiesen werden. Dies spricht gegen eine effektive Kernaufspaltung durch diese Lyseverfahren.

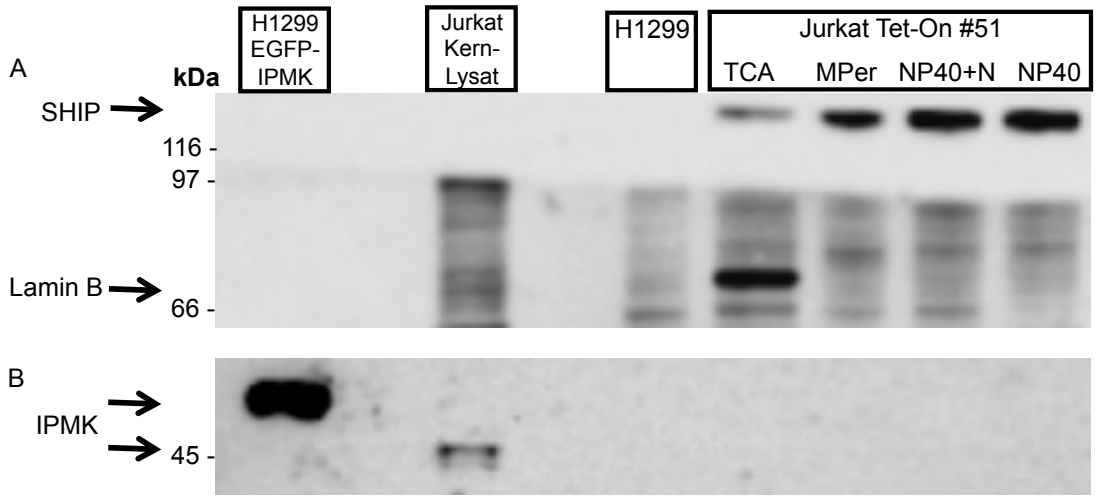

Abbildung 10: Vergleich verschiedener Lyseprotokolle.
A Nachweis des nukleären Proteins Lamin B und des zytosolischen SHIP mittels Western Blot. SHIP konnte in allen Jurkat Lysaten nachgewiesen werden (TCA, MPer, NP40+N, NP40).
Primäre AK: SHIP1 (P1C1), sc-8425 (1:500), von Santa Cruz Biotechnology, Lamin B (M20) (1:200) Santa Cruz Biotechnology. Sekundäre AK; Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology, Kaninchen-anti-Ziege IgG (H+L) (1:3000), HRP-konjugiert, von Southern Biotech
H1299 EGFP-IPMK: H1299 Zellen, die EGFP-IPMK überexprimieren. Jurkat Kernlysat: TCA-Lysat
B Nachweis der nukleären IPMK mittels Western Blot, es wurden die gleichen Lysate wie bei A verwendet.

Dies ist eine mögliche Erklärung für die fehlende Detektion der IPMK in den vorhergehenden Versuchen. Die TCA-Lyse zeigt zwar eine hohe Lamin B Konzentration, die IPMK war aber nicht nachweisbar. Im Kernlysat konnte die IPMK nachgewiesen werden. H1299 Zellen exprimieren kein SHIP, im Kernlysat konnte es als zytosolisches Protein nicht nachgewiesen werden. Das stärkste Signal beim Lamin B wurde durch TCA-Lyse erreicht. Das bakterielle EGFP-IPMK Fusionsprotein sowie die endogene IPMK in einem Jurkat-Kernlysat konnten mit dem Antikörper nachgewiesen werden.

4.5 Vergleich von neuen sowie gebrauchten Elektroporations-küvetten auf die Effektivität der Elektroporation

Für die Elektroporation werden spezielle Küvetten verwendet, in denen ein starker elektrischer Puls erzeugt wird. Da Verunreinigungen in den Küvetten das elektrische Feld stören, empfiehlt der Hersteller der sterilen Küvetten, diese nur einmal zu verwenden. Es wurde ein Vergleich der Transfektionseffektivität mittels Elektroporation mit neuen Küvetten gegen gebrauchte Küvetten, die 24 Stunden in 70% Ethanol gelegt und anschließend getrocknet wurden, durchgeführt.

Eine höhere Transfektionseffektivität wäre für die neuen Küvetten zu erwarten gewesen. Es wurde ein pLTR-tet-eGFP-SV-HPH Vektor verwendet, der durch Hygromycin B selektioniert werden konnte. Der Versuch wurde mit Jurkat Tet–On Zellen durchgeführt. Nach zwei Wochen Selektion fanden sich keine lebenden Zellen in der Negativkontrolle. Die zu vergleichenden EGFP-Kulturen zeigten floureszensmikroskopisch deutlich leuchtende Zellen (s. Abb. 11). Nach 3 Wochen zeigten die Zellen aus den gebrauchten Küvetten sogar ein dichteres Wachstum als die aus den neuen Küvetten. Bei sorgsamer Reinigung der Küvetten können diese ohne Einbußen bei der Effektivität mehrfach verwendet werden.

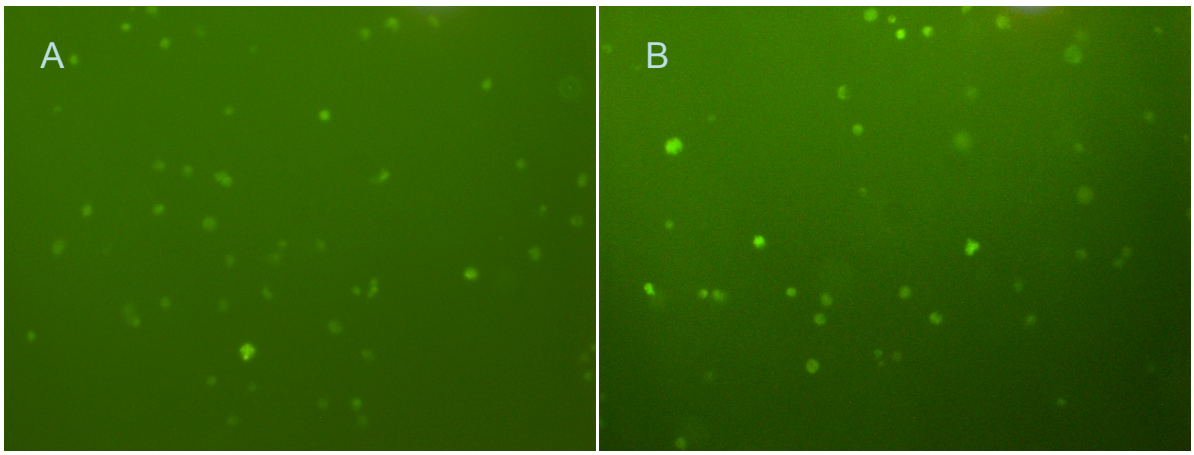

Abbildung 11: Vergleich der Transfektionseffektivität von neuen und wiederverwendeten Elektroporationsküvetten.
Transfektion von Jurkat Tet-On Zellen mit einem EGFP-Vektor. Zellen die EGFP exprimieren, leuchten im Fluoreszenzmikroskop. Neun Tage nach Transfektion zeigte sich kein Unterschied in der Effektivität bei neuen (A) und wiederaufbereiteten (B) Küvetten.

4.6 Nachweis des EGFP-Vektors in Einzelklonlysaten nach Elektroporation

Jurkat Tet-On Zellen wurden mittels Elektroporation mit einem pLTR-tet-EGFP-SV-HPH Vektor transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einem gleichartigen Vektor mit einem IPMK-Konstrukt verwendet. Als Positivkontrolle wurden mittels Lipofectamin transient EGFP transfizierte HEK 293T RIPA Lysate verwendet. Nach Selektion mit Hygromycin B konnten durch *Limiting Dilution* Einzelklone selektioniert werden. Die Expression des EGFP-Vektors konnte durch die Fluoreszenz der Zellen dargestellt werden (s. Abb. 12). Klon 1 zeigte im Verlauf keine Fluoreszenz. Die Elektroporation der Jurkat-Zellen erzeugte in 3 von 4 Fällen Klone, die das integrierte Konstrukt stabil exprimieren (Abb. 12 B-D).

Nach transienter Lipofectamin Transfektion (Abb. 12 A) konnte auch eine EGFP-Expression gezeigt werden, diese war jedoch deutlich geringer als nach Elektroporation und Selektion.

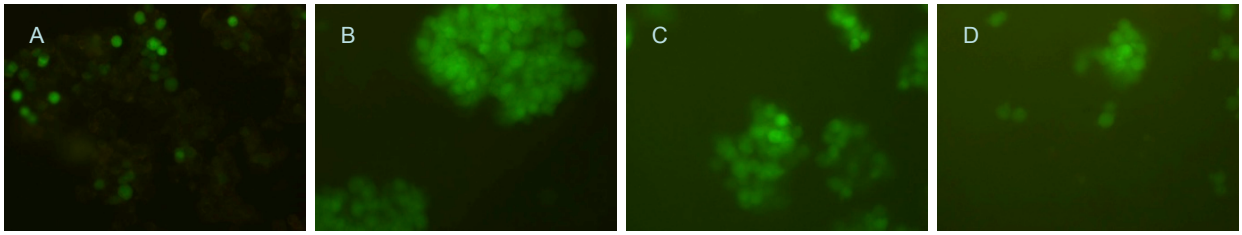

Abbildung 12: Expression von EGFP in 293T (A) und Jurkat Tet-On Zellen (B-D).
Die 293T Zellen (A) wurden transient transfiziert und dienten als Positivkontrolle für den anschließenden Western Blot. Die Jurkat Tet-On Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Die durch *Limiting Dilution* gewonnenen Klone 3 (B), 4 (C) und 5 (D) exprimierten das EGFP stabil.

Nach ausreichender Expansion der klonalen Kulturen wurden RIPA Lysate hergestellt und diese Zelllysate mittels Gelelektrophorese und Western Blotting mit Anti-EGFP untersucht (Abb. 15). In den Klonen 2-4, die eine starke Fluoreszenz zeigten, konnte EGFP sicher detektiert werden. Die EGFP Konzentration in Klon 1, der keine Fluoreszenz zeigte, war deutlich geringer.

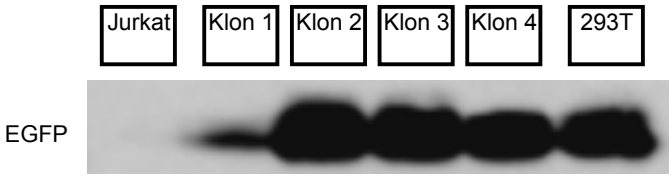

Abbildung 13: Nachweis von EGFP nach Elektroporation.
Vier klonale Jurkat Tet-On Zellkulturen (Klon 1, 2, 3, 4) sowie transient transfizierte 293T Zellen wurden mit Anti-EGFP geblotet. Als Negativkontrolle diente ein Jurkat Lysat, welches mit einem anderen Vektor transfiziert wurde.
Primärer AK: EGFP (1:1000), Roche Applied Science (Mannheim).
Sekundärer AK: Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology

4.7 Kein Nachweis von IPMK in Jurkat-und H1299-Zellen nach Transfektion

Nachdem durch Transduktion keine induzierbaren Klone etabliert werden konnten, sollte die Expression durch eine effektivere Transfektion mittels Elektroporation verstärkt werden. Neben den IPMK Mutanten wurde auch ein EGFP Vektor zur Erfolgskontrolle verwendet (s. u.). Nach der Elektroporation wurde die Zellen für knapp 7 Wochen mittels Hygromycin B selektioniert. Anschließend wurden durch

Limiting Dilution Einzelklonkulturen unter weiterer Hygromycin B Selektion etabliert, um Unterschiede in der Expression der IPMK zu untersuchen. Es wurden fünf klonale Kulturen selektioniert. Nachdem nachgewiesen wurde, dass mit dem NP40 Puffer keine ausreichende Kernaufspaltung erreicht wurde, ist für die Lysate der Kernlysepuffer RIPA verwendet worden. Die Gelelektrophorese der Proben wurde gemeinsam mit einem nicht klonalen wtIPMK Lysat, einem RIPA H1299 Lysat, sowie Lysate von H1299 Zellen, die ein EGFP-IPMK Fusionsprotein exprimieren und ein bakterielles rekombinantes Protein zur Positivkontrolle durchgeführt. Nach der Übertragung auf Nitrozellulose wurde diese zunächst mit IPMK Antikörper und anschließend mit GAPDH inkubiert (s. Abb. 14). Die schwachen GAPDH Banden der wtIPMK Klone zeigten eine niedrige Proteinkonzentration in den Proben, wodurch der Nachweis der IPMK erschwert wird. Das nicht klonale Lysat und das H1299 Lysat wiesen jedoch eine hohe Proteinkonzentration auf, so dass hier ein Nachweis zu erwarten gewesen wäre. Weder in dem nicht klonalen Lysat, noch im H1299 Lysat war die IPMK nachweisbar.

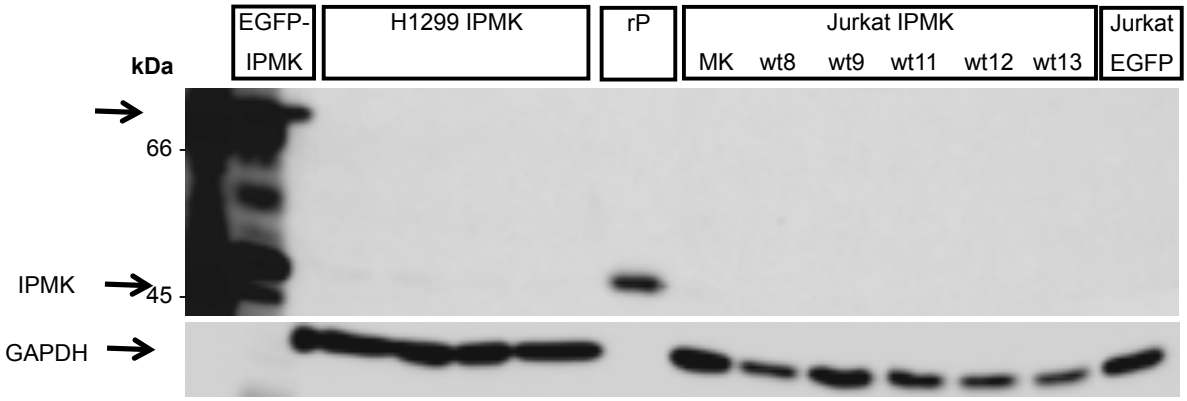

Abbildung 14: Kein Nachweis von IPMK in H1299 und Jurkat-Zellen.
Jurkat Tet-On Zellen wurden mittels Elektroporation mit wtIPMK transfiziert. Nach Etablierung von Einzelklon-kolonien wurden RIPA Lysate hergestellt. Weiterhin wurden RIPA Vollzelllysate von H1299 Zellen verwendet. Nachblott mit GAPDH.
Primäre AK: IPMK H00253430-B01P #08266 (IPMK-B) (1:1000), von Novus Biologicals, GAPDH (6C5), sc-32233 (1:3000), von Santa Cruz Biotechnology
Sekundäre AK: Anti-Maus IgG-POD (H+L) (1:3000), Santa Cruz Biotechnology, Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology,
rP: rekombinante IPMK; wt8-13: Einzelklonlysate; EGFP-IPMK: H1299Zellen, die ein Fusionsprotein exprimieren; H1299: RIPA Lysat untransfizierter H1299 Zellen; wtIPMK: nicht-klonales RIPA Lysat; Jurkat EGFP: Negativkontrolle

4.8 Nachweis endogener IPMK in primären Proben von Leukämie-Patienten

Zur weiteren Untersuchung der Funktion der IPMK in Leukämiezellen wurden NP40 Lysate von Proben verschiedener Patienten des onkologischen Zentrums der UKE untersucht. Zum Vergleich wurden auch Zellen von gesunden Spendern untersucht. Dabei wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die durch Ficoll Gradienten-Fractionierung aus dem „buffy coat“ gewonnen werden verwendet. Weiterhin wurden die PBMC weiter fraktioniert in T-Zellen (CD3+) und den nach T-Zell-Depletion verbleibenden Rest (Monocyten, B-Zellen, CD3-).

Das Lysat Nr. 1148 stammt aus dem peripheren Blut eines 62-jährigen Patienten mit AML nach Polycythämia vera und MPS (Myeloproliferatives Syndrom). Bei dem Patienten zeigten sich auch chromosomale Veränderungen in Knochenmarkproben. Die beiden MPS Proben stammen von einer 84-jährigen Patientin mit essentieller Thrombozythämie (727) und einem 64-jährigen Patienten mit Osteomyelofibrose (669). Eine AML-Probe stammt von einem 50-jährigen Patienten (636). Laut FACS-Analyse CD19 pos., CD 20 pos., CD23 pos. B-Zellen, die auch myeloische Marker exprimieren. Probe 569 stammt von einer 71-jährigen Patientin mit AML M4, Probe 549 von einer 60-jährigen Patientin mit AML M4 Rezidiv. Probe 657 stammt aus Knochenmarksblut eines 71-jährigen Patienten mit AML. Die PBMC-Probe und die CD3+ und CD3- Zellen stammen von gesunden Spendern. Zum Vergleich wurden die mit IPMK elektroporierten Jurkat-Zellklone, sowie SHIP transduzierte Jurkat-Kernlysate mit und ohne Doxycyclin-Induktion (Jurkat -/+) aufgetragen. Die Lysate der mit wt IPMK transient transfizierten HEK 293 T Zellen wurden erneut in höherer Konzentration aufgetragen. Weiterhin wurde ein H1299-Lysat mit IPMK Überexpression (++) und eines mit endogener IPMK Expression (end.), sowie rekombinantes baktereielles Protein (rP) als Positivkontrolle aufgetragen (Abb. 15).

Dabei fiel zunächst auf, dass die IPMK-Banden ein unterschiedliches apparentes Molekulargewicht im SDS-PAGE zeigten. Ursachen für ein verändertes Laufverhalten können beispielsweise eine unterschiedliche Phosphorylierung oder andere posttranslationale Modifizierungen sein.

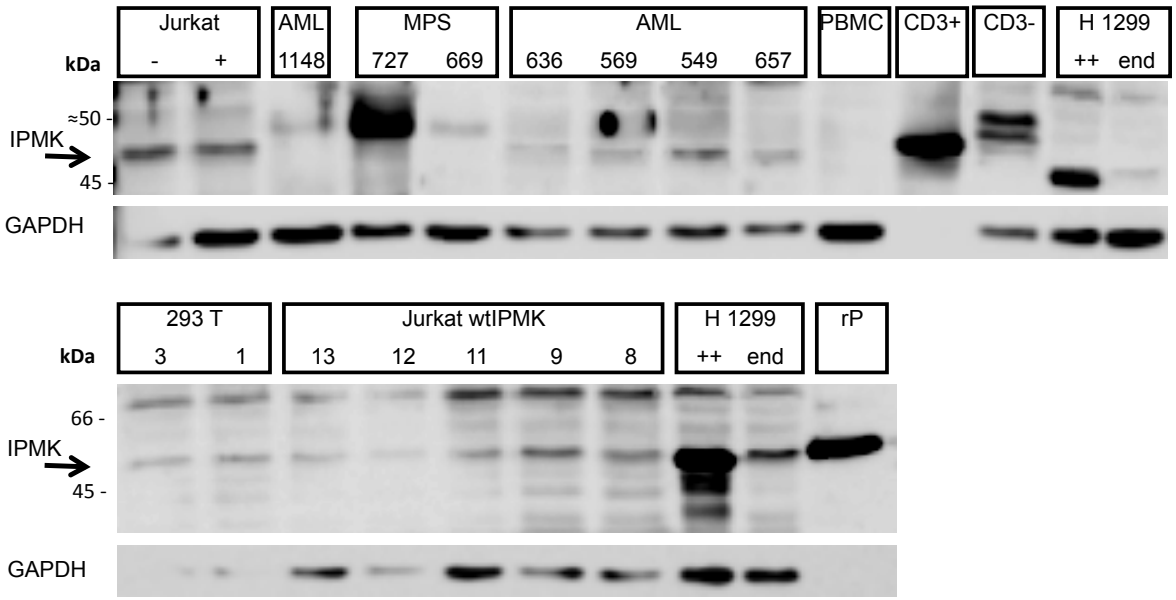

Abbildung 15: Nachweis von IPMK in Blutproben von Leukämiepatienten und gesunden Spendern sowie in transfizierten Zelllinien.
Unterschiedliche Proben wurden mittels IPMK B01 Antikörper auf IPMK Expression untersucht. Bei den Blutproben, den Jurkat +/- Proben und den H1299 Proben handelt es sich um NP40 Lysate, Jurkat wtIPMK und 293 T wtIPMK Zellen wurden mit RIPA lysiert. Unten jeweils GAPDH zur Proteinquantifizierung.
Primäre AK: IPMK H00253430-B01P #08266 (IPMK-B) (1:1000), von Novus Biologicals, GAPDH (6C5), sc-32233 (1:3000), von Santa Cruz Biotechnology
Sekundäre AK: Anti-Maus IgG-POD (H+L) (1:3000), Santa Cruz Biotechnology, Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, sc-2055 (1:5000), Santa Cruz Biotechnology,

In den Jurkat NP40 Lysaten konnte endogene IPMK Expression nachgewiesen werden. Hier war die IPMK Menge deutlich größer, als in den stabil transfizierten Jurkat-Klonen und den transient transfizierten HEK 293 T Zellen. Klon 9 der Jurkat-Zellen, die mittels Elektroporation transfiziert wurden, zeigte im Vergleich mit den restlichen Klonen eine Überexpression. In der MPS Probe 727 wurde eine große Proteinmenge etwas oberhalb von 47 kDa detektiert. Es könnte sich dabei um ein posttranslational verändertes IPMK-Protein handeln.

Eine Verifizierung wäre durch Proteinaufreinigung und Massensprektrometrie möglich. In den AML Proben konnten unterschiedliche, jedoch insgesamt eher geringe Mengen eines Proteins nachgewiesen, die der IPMK entsprechen kann. Auch in den malignen H1299 Zellen wurde eine IPMK Expression gezeigt. Diese Zellen zeigten nach Transfektion mit dem IPMK Vektor eine deutliche Überexpression.

In der untersuchten Probe der PBMC konnte keine IPMK nachgewiesen werden. Sowohl in der T-Zell Fraktion der PBMC (CD3+) als auch in der Probe der T-Zell depletierten PBMC zeigte sich jedoch eine deutliche IPMK-Expression.

5 Diskussion

Die IPMK ist ein multifunktionales Enzym, dessen Struktur über viele Spezies konserviert ist (Resnick, Saiardi, 2008). Die Hauptsubstrate der IPMK unterscheiden sich jedoch zwischen den Spezies, so dass die Ergebnisse von Studien an verschiedenen Arten nicht immer vergleichbar sind. Auch innerhalb eines Organismus ist die Expression je nach Gewebe unterschiedlich. Bei Menschen werden besonders hohe Level in der Leber und im Muskel nachgewiesen (Chang u. a., 2002), bei Ratten in der Niere und dem Kleinhirn (Saiardi u. a., 2001). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass die IPMK-Expression innerhalb einer Zelle stark vom energetischen Zustand der Zelle abhängt. Im Hypothalamus von hungernden Mäusen ist IPMK kaum nachweisbar. Nach erneuter Zufuhr von Nahrung steigt die IPMK Expression innerhalb kurzer Zeit deutlich an (Bang u. a., 2012). Als wichtige Schaltstelle unterschiedlicher Stoffwechselwege integriert die IPMK unterschiedliche Signale und beeinflusst durch die von ihr umgesetzten Substrate eine Vielzahl von Zielproteinen. Unter anderem bildet sie einen molekularen Schalter, der die AKT Aktivität reguliert (Maag u. a., 2011). AKT beeinflusst viele Stoffwechselwege und ist damit ein wichtiges Zielprotein für Onkogene. Eine konstitutive PI3K/ AKT Aktivierung ist eine wichtige Voraussetzung für das Überleben maligner Zellen bei AML und hat damit auch prognostische Bedeutung (Grandage u. a., 2005; Xu u. a., 2003)'(Min u. a., 2003). Inhibitoren, die Proteine downstream von Akt, z. B. mTOR hemmen, bieten Ansätze zu Therapie von AML (Altman u. a., 2011)'(Martelli u. a., 2011, 2010). Die Bedeutung der IMPK für die AKT Aktivierung wird durch Versuche mit siRNA gegen IPMK verdeutlicht. Durch die RNA Interferenz wird die Translation des codierten Gens in ein Protein unterdrückt. Durch Kombination der siRNA gegen IPMK mit einem AKT Inhibitor konnte eine deutlich höhere Zelltoxizität als mit AKT Inhibitor alleine gezeigt werden (Morgan-Lappe u. a., 2006). Durch die große Variabilität der Funktion, Expression und Aktivität der IPMK zwischen den Spezies, aber auch innerhalb eines Organismus und sogar der einzelnen Zelle, wird die Erforschung dieses Enzyms erschwert.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurden zumeist indirekte Nachweismethoden herangezogen. So wurden Proteine, die potentiell downstream in der Signalkaskade liegen, herangezogen, um die IPKM-Wirkung zu untersuchen

(Morgan-Lappe u. a., 2006; Chang u. a., 2002; Steger, 2002), oder es wurden Verfahren zu Anreicherung verwendet, die für quantitative Untersuchungen wenig geeignet sind (Saiardi u. a., 1999). Erst in letzter Zeit wurden Antikörper entwickelt, die die murine IPMK auch direkt in Zelllysaten sicher detektieren können (Bang u. a., 2012). In embryonalen Mausfibroblasten (murine embryonic fibroblasts (MEFs) konnte im Vergleich mit IPMK -/- Mutanten mittels murinem IPMK Antikörper eine Proteinbande dargestellt werden (Maag u. a., 2011). Für die humane IPMK gelang dies mit diesem Antikörper nicht. Der Nachweis der IPMK mittels Western Blot wird auch von den Herstellern der Antikörper in Kernlysaten gezeigt. In der Arbeit wird auf die Probleme der Sensitivität des Maus IPMK Antikörpers für die humane IPMK hingewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine endogene IPMK-Expression in H1299 Zellen mittels des humanen IPMK-Antikörpers nachgewiesen. Andere Autoren konnten in H1299 Zellen keine endogene IPMK nachweisen, verwendeten jedoch einen anderen Antikörper (Windhorst u. a., 2010). Die Entwicklung effektiverer Methoden zur Transfektion und Zelllyse waren die Voraussetzung für eine Untersuchung der IPMK. Um die vielen, nur schwer zu kontrollierenden Umgebungsfaktoren besser kontrollieren zu können, sollten induzierbare Klone etabliert werden. Diese haben den Vorteil, dass die klonalen Zellen nicht nur genetisch gleich sind, sondern bis zur Induktion auch unter gleichen Umgebungsbedingungen gehalten werden.

5.1 Lyseprotokolle

Da das Kernprotein IPMK nur schwer in Zelllysaten nachweisbar ist, sollte zunächst das Lyseprotokoll optimiert werden, um eine gute Kernaufspaltung zu gewährleisten. Neben dem NP40 Puffer wurde eine modifizierte Variante verwendet, die mehr Salz enthält (NP40+N) und die Kernmembran besser aufspaltet. Der MPer Puffer kann für adhärente- und Suspensionszellen verwendet werden, ist aber ein eher milder Lysepuffer, der die Kernmembran nicht gut aufspaltet. Die mit TCA lysierten Proben wurden zusätzlich sonifiziert, um die Effektivität zu steigern. Ein Vergleich der Lyseprotokolle zeigte erneut, dass Kernlysate zur Darstellung der IPMK am besten geeignet sind. Überraschenderweise konnte mit dem TCA Protokoll, das eine gute Kernaufspaltung, zu Erkennen an der hohen Lamin B Menge, zeigte, keine

endogene IPMK in Jurkat-Zellen gezeigt werden. Für die nachfolgenden Versuche wurde der RIPA Puffer nach der Rezeptur von santa cruz biotechnology verwendet. Dieser Puffer wird. u.a. durch den Hersteller des verwendeten IPMK-Antikörpers Novus Biologicals zur Herstellung von IPMK-Überexpressions-Lysaten aus HEK293-T-Zellen verwendet (s. Datasheet des Herstellers). Mit diesen Lysaten wurde auch der Western Blot für den Nachweis der Antikörperfunktion durch den Hersteller erbracht. Der Nachteil dieses Puffers ist die Möglichkeit der Denaturierung von Kinasen und die Unterbrechung von Protein-Protein Interaktionen.

5.2 Elektroporation

Nachdem die Induktion der retroviral transduzierten Jurkat-Zellen zu keinem nachweisbaren Anstieg der Expression führte, sollte zunächst ein effektiveres Transfektionsverfahren getestet werden. In der AG Jücker mit Jurkat-Zellen durchgeführte Untersuchungen zeigten eine besonders hohe Transfektionsrate für das Elektroporationsverfahren. Dabei entstehen durch anlegen eines elektrischen Feldes kleinste Poren in der Zellmembran, so dass DNA in die Zelle aufgenommen werden kann (Knippers, 2006). Zunächst wurde die Effektivität des Verfahrens mittels eines durch Hygromycin B selektionierbaren EGFP Vektors getestet. Nachdem ein Effektivitätsverlust durch Mehrfachverwendung der als Einmalartikel deklarierten, speziellen Elektroporationsküvetten nicht gezeigt wurde, war zunächst eine Versuchsreihe mit EGFP transfizierten Jurkat-Zellen durchgeführt worden. Der Transfektionserfolg wurde regelmäßig mittels Fluoreszensmikroskop kontrolliert. Nach Elektroporation konnte der Nachweis sowohl stabil EGFP exprimierender Jurkat-Klone, als auch transient transfizierter HEK 293T Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop und Western Blot erbracht werden. Nach Elektroporation ließ sich die Kinase-tote IPMK Mutante in Jurkat-Zelllysaten nachweisen. Für die Wildtyp-IPMK und die endogene IPMK Expression in H1299 Zellen konnte auch das optimierte Verfahren keinen Nachweis erbringen. Nach Etablierung von fünf klonalen wtIPMK transfizierten und auf den Vektor selektionierten Jurkat-Klonen, zeigten auch diese keine nachweisbare IPMK Expression. Die starke EGFP Expression beweist die gute Effektivität der Elektroporation, der Nachweis der Kinase-toten IPMK Mutante zeigt, dass der Antikörper die humane IPMK erkennt.

5.3 Nachweis der IPMK mittels eines Antikörpers gegen die humane IPMK in Zelllysaten

Um die humane IPMK detektieren zu können, wurde ein humaner IPMK Antikörper verwendet. Dieser konnte sicher ein Fusionsprotein von hsIPMK und EGFP, welches von H1299 Zellen überexprimiert wurde, sowie ein von DH10B *E. coli* exprimiertes hsIPMK Protein erkennen. Eine Detektion der vermeintlich geringeren Proteinmengen in den Jurkat Lysaten gelang zunächst jedoch nicht.

Die geringe Sensitivität des Antikörpers für die IPMK in Zelllysaten wurde auch für transient transfizierten HEK 293 T Zellen gezeigt. Im Folgenden mussten die bekannten Verfahren von der Transfektion der Zellen bis zur Lyse und Quantifizierung mittels Western Blot so optimiert werden, dass eine sichere Darstellung der IPMK möglich wurde. Dies gelang nicht nur für die Zelllinien Jurkat, HEK293T und H1299, sondern auch für primäre Zellen von Patienten aus dem onkologischen Zentrum der Uniklinik Eppendorf. Mit der erstmaligen Darstellung dieses Enzyms mittels humanem IPMK Antikörper ist ein wichtiger Schritt für seine weitere Erforschung und die Entwicklung neuer Behandlungsansätze für eine Reihe von Erkrankungen getan.

5.4 Nachweis von IPMK-Mutanten in Jurkat-Zellen

Zu den spezifischen Charakteristika der Jurkat-Zelllinie gehören ein hoher basaler PI(3,4,5)P_3 Spiegel und eine daraus resultierende AKT-Aktivierung (Freeburn u. a., 2002)·(Denley u. a., 2009). Der PI3K /AKT Signalweg ist auch in anderen AML Zellen konstitutiv aktiviert und bedingt das Wachstumsfaktor unabhängige Wachstum (Grandage u. a., 2005). Die IPMK stellt durch ihre PI3K Aktivität einen alternativen Weg zur Aktivierung von AKT dar. Ist dieser Weg in malignen Zellen bereits aktiviert, verliert die IPMK an Bedeutung und eine Downregulation wäre eine denkbare Folge. Da die IPMK die AKT-Phosphorylierung durch Produktion von IP5 auch hemmen kann, wäre auch eine verminderte Expression der IPMK, die damit als „Tumorsuppressor“ diente, denkbar. Dies kann eine Erklärung für die niedrigen IPMK-Spiegel in Jurkat-Zellen und die Schwierigkeiten der Transfektion sein.

Es würde auch die stärkere Expression der Kinase-toten Mutanten D385A und RK322/D385A erklären. Andererseits zeigen die Forschungsergebnisse, dass durch Über- und Minderexpression die Enzymfunktion nicht ausreichend dargestellt werden kann. Der Phosphorylierungszustand der IPMK bestimmt wahrscheinlich eher die Funktion dieses Enzyms, als das Expressionslevel. Die Frage, unter welchen Voraussetzungen die IPMK hemmend, bzw. aktivierend auf die AKT Aktivierung einwirkt, bleibt weiterhin bestehen. Letztlich konnte eine Überexpression auch in selektionierten Klonen nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Überexpression der IPMK toxisch und führt zum Absterben oder zur Wachstumshemmung von IPMK- überexprimierenden Jurkat-Zellen. Ein Hinweis dafür zeigt sich in der Rolle der IPMK als Co-Aktivator von p53. IPMK bindet an p53 und steigert dessen Acetylierung, wodurch die Aktivität deutlich gesteigert wird (Xu, Snyder 2013). Die IPMK wirkt damit durch die Aktivierung von p53 pro-apoptotisch.

Die induzierbaren Klone müssten mit einem sensitiveren Antikörper erneut auf Induzierbarkeit getestet werden. Dazu wären Kernextrakte sinnvoll, da dort bislang der beste Nachweis erfolgt ist.

5.5 Nachweis von IPMK in Leukämien und MPS

Die Verwendung von definierten Zelllinien für die Grundlagenforschung hat viele Vorteile. Die Zelllinien sind genau charakterisiert, Besonderheiten im Stoffwechsel und mutierte Gene bekannt. Auch die bereits bekannten optimalen Umgebungsbedingungen für die kultivierten Zellen und standardisierte Protokolle vereinfachen die Arbeit mit diesen Zellen. So werden die Ergebnisse weltweit vergleichbar und die Reproduzierbarkeit erleichtert die Überprüfung und Bestätigung wichtiger Forschungsfortschritte. So stellen häufig verwendete Zelllinien Modelle für bestimme Erkrankungen dar, die diesen in bestimmten charakteristische Eigenarten gut entsprechen.

Andererseits zeigen diese Zellen nur ein theoretisches Modell, das in wichtigen Punkten von den tatsächlichen Verhältnissen im menschlichen Körper abweicht. Die vielfältige Unterteilung der akuten myeloischen Leukämie wird u.a. nach zytogenetischen Anomalien vorgenommen, ein Tiermodell kann daher immer nur einer Unterkategorie der AML angenähert werden.

Ob die dadurch gewonnenen Erkenntnisse auf andere Subtypen anwendbar ist, kann nicht sicher gefolgert werden. Um die Ergebnisse der Versuche in einen Zusammenhang mit echten Krankheitsbildern zu stellen, wurden Proben von AML Patienten und solche von Patienten mit MPS, das häufig im Krankheitsverlauf in eine AML übergeht, untersucht. In den Proben von Patienten mit AML war dabei ein eher geringes Expressionslevel der IPMK nachweisbar. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Untersuchung der Jurkat-Zellen überein.

Es handelt sich hierbei um den erstmaligen Nachweis der endogenen IPMK in humanen Leukämiezellen. Ursachen für die geringe Expression der IPMK können die nachgewiesenermaßen hohe PI3K-Aktivität und die bekannten Mutationen in Signalkaskaden downstream von IPMK sein (Martelli u. a., 2010; Monserrate, York, 2010), die Funktionen der IPMK in den mutierten Zellen übernehmen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen ihrer katalytischen Aktivität steuert die Inositolphosphat-Multikinase (IPMK) als Inositolphosphat-Kinase u.a. den IP_6-abhängigen mRNA-Export aus dem Zellkern, die embryonale Entwicklung des Neuralrohres bei Mäusen und die Aktivierung von Kalzium-abhängigen Kalziumkanälen. Als Phosphatidylinositol-3-Kinase kann die IPMK $PI(3,4,5)P_3$ bilden, welches als second messenger u.a. die Proteinkinase AKT aktiviert. Neben der katalytischen Aktivität stabilisiert die IPMK den mTOR-Raptor-Komplex und beeinflusst dadurch Translation und Zellwachstum. Trotz der umfangreichen Forschung an der IPMK sind Arbeiten über die Bedeutung der humanen Form der IPMK in menschlichen Zellen bisher kaum vorhanden.

In dieser Arbeit gelang der Nachweis der endogenen humanen IPMK in CD3+ T-Zellen eines gesunden Spenders sowie in einem Kernlysat und in Gesamtzelllysaten der humanen Leukämie-Zelllinie Jurkat. Nach retroviraler Transduktion von Jurkat-Zellen mit einem IPMK-Expressionsvektor konnten mittels *Limiting Dilution* keine Zellklone selektioniert werden, die die IPMK stabil exprimierten. Eine Erklärung dafür könnte die durch die IPMK vermittelte Aktivierung von p53 sein, wodurch die IPMK pro-apoptotisch wirkt (Xu, Snyder 2013). Weiterhin gelang es erstmalig, die Expression der endogenen IPMK in primären Leukämiezellen nachzuweisen. Bei 3 von 5 Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie konnte mittels Western-Blot die Expression der IPMK nachgewiesen werden. Weiterhin konnte in den primären Zellen bei einer von zwei Personen mit Myeloproliferativem Syndrom eine starke Expression eines Proteins mit einem leicht erhöhten apparenten Molekulargewicht von 50 kDa dargestellt werden. Ob es sich bei diesem Protein um eine posttranslationale Form der IPMK, z.B. durch eine Phosphorylierung, handeln könnte, muss durch weitere Untersuchungen gezeigt werden.

Der erstmalige Nachweis der endogenen IPMK in humanen CD3+ T-Zellen, in der lymphatischen Leukämie-Zelllinie Jurkat und in primären Leukämiezellen von Patienten mit Myeloproliferativem Syndrom und akuter myeloischen Leukämie deutet auf eine Funktion der IPMK in normalen hämatopoetischen Zellen und in der Leukämogenese hin.

In weiterführenden Experimenten muss die genaue Funktion der IPMK in humanen hämatopoetischen Zellen und leukämischen Zellen weiter untersucht werden. Dies könnte durch gewebespezifische knock-out-Experimente und induzierbare Überexpressionssysteme in hämatopoetischen Zellen erfolgen.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
AML	akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintrisphosphat
BSA	Rinderalbumin *(bovine serum albumin)*
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
DAG	Diacylglycerin
dd	didestilliert
DMEM-Medium	Dulbecco' s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FCS	fötales Kälberserum *(fetal calf serum)*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein gekoppelten Transmembran-Rezeptoren
HEK	human embryonic kidney
Ig	Immunglobulin
$InsP_3$	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP	Inositolphosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
IP3K	Inositol (1,4,5)-Trisphosphat 3-Kinase
IPMK	Inositolphosphat-Multikinase
ITPK1	Inositol-Tetrakisphosphat-1-Kinase
kDa	Kilodalton
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NLS	Kernlokalisationssequenz *(Nuclear Localization Signal)*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDK1	PDK1 Pyruvat-dehydrogenase-Kinase 1
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PtdIns	Phosphatidylinositol
rpm	Umdrehungen pro Minute *(rounds per minute)*
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institue Medium
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetracyclin kontrollierte Transactivator
SH2-Domäne	src-Homologie-Domäne 2

8 Literaturverzeichnis

Abel, Karen; Anderson, Richard A.; Shears, Stephen B. (2001): „Phosphatidylinositol and inositol phosphate metabolism“. In: *Journal of Cell Science*. 114 (12), S. 2207 –2208.

Altman, Jessica K; Sassano, Antonella; Platanias, Leonidas C (2011): „Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions“. In: *Oncotarget*. 2 (6), S. 510–517.

Anderson, Richard A.; Boronenkov, Igor V.; Doughman, Scott D. u. a. (1999): „Phosphatidylinositol Phosphate Kinases, a Multifaceted Family of Signaling Enzymes“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 274 (15), S. 9907 –9910.

Bang, Sookhee; Kim, Seyun; Dailey, Megan J; u. a. (2012): „AMP-activated protein kinase is physiologically regulated by inositol polyphosphate multikinase“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (2), S. 616–620.

Bellacosa, A; Testa, J R; Staal, S P; u. a. (1991): „A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region“. In: *Science* 254 (5029), S. 274–277.

Bennet JM u. a. (1976) "Proposals for the classification of the acute leukaemias" (FAB Cooperative Group). Brit J Haematol 33 S. 451-458.

Berridge, M J; Irvine, R F (1984): „Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction“. In: *Nature*. 312 (5992), S. 315–321.

Berridge, Michael J. (1993): „Inositol trisphosphate and calcium signalling“. In: *Nature*. 361 (6410), S. 315–325.

Bertsch, U; Deschermeier, C; Fanick, W; u. a. (2000): „The second messenger binding site of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase is centered in the catalytic domain and related to the inositol trisphosphate receptor site“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (3), S. 1557–1564.

Brunet, A; Bonni, A; Zigmond, M J; u. a. (1999): „AKT promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor“. In: *Cell*. 96 (6), S. 857–868.

Calvin, N M; Hanawalt, P C (1988): „High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation.“. In: *Journal of Bacteriology*. 170 (6), S. 2796–2801.

Cantley, L. C. (2002): „The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway“. In: *Science*. 296 (5573), S. 1655–1657.

Cardone, M H; Roy, N; Stennicke, H R; u. a. (1998): „Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation“. In: *Science* 282 (5392), S. 1318–1321.

Chang, Shao-Chun; Majerus, Philip W (2006): „Inositol polyphosphate multikinase regulates inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 339 (1), S. 209–216.

Chang, Shao-Chun; Miller, Aimee L; Feng, Yucheng; u. a. (2002): „The human homolog of the rat inositol phosphate multikinase is an inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (46), S. 43836–43843.

Chu, Isabel M; Hengst, Ludger; Slingerland, Joyce M (2008): „The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy“. In: *Nature Reviews. Cancer*. 8 (4), S. 253–267.

Dang, C V; Lee, W M (1988): „Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal“. In: *Molecular and Cellular Biology*. 8 (10), S. 4048–4054.

Datta, S R; Katsov, A; Hu, L; u. a. (2000): „14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation“. In: *Molecular Cell*. 6 (1), S. 41–51.

Denley, Adam; Gymnopoulos, Marco; Kang, Sohye; u. a. (2009): „Requirement of phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate in phosphatidylinositol 3-kinase-induced oncogenic transformation“. In: *Molecular Cancer Research: MCR*. 7 (7), S. 1132–1138.

Dijkers, P F; Medema, R H; Lammers, J W; u. a. (2000): „Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1“. In: *Current Biology: CB*. 10 (19), S. 1201–1204.

Falasca, M; Chiozzotto, D; Godage, H Y; u. a. (2010): „A novel inhibitor of the PI3K/AKT pathway based on the structure of inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate“. In: *British Journal of Cancer*. 102 (1), S. 104–114.

Falini, Brunangelo, u.a., (2005): " Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype". In: *The New England Journal of Medicine* 352 S. 254-66.

Frederick, Joshua P.; Mattiske, Deidre; Wofford, Jessica A. u. a. (2005): „An essential role for an inositol polyphosphate multikinase, Ipk2, in mouse embryogenesis and second messenger production“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (24), S. 8454–8459.

Freeburn, Robin W; Wright, Karen L; Burgess, Steven J; u. a. (2002): „Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors“. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 169 (10), S. 5441–5450.

García-Palma, Lizet; Horn, Stefan; Haag, Friedrich; u. a. (2005): „Up-regulation of the T cell quiescence factor KLF2 in a leukaemic T-cell line after expression of the inositol 5’-phosphatase SHIP-1“. In: *British Journal of Haematology*. 131 (5), S. 628–631.

Giaccone, G.; Battey, J.; Gazdar, A. F. u. a. (1992): „Neuromedin B Is Present in Lung Cancer Cell Lines“. In: *Cancer Research*. 52 (9 Supplement), S. 2732s – 2736s.

Gossen, M; Bujard, H (1992): „Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89 (12), S. 5547–5551.

Gossen, M; Freundlieb, S; Bender, G; u. a. (1995): „Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells“. In: *Science* 268 (5218), S. 1766–1769.

Graessmann, A; Graessmann, M; Topp, W C; u. a. (1979): „Retransformation of a simian virus 40 revertant cell line, which is resistant to viral and DNA infections, by microinjection of viral DNA“. In: *Journal of Virology*. 32 (3), S. 989–994.

Graham, F L; Smiley, J; Russell, W C; u. a. (1977): „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5“. In: *The Journal of General Virology*. 36 (1), S. 59–74.

Grandage, V L; Gale, R E; Linch, D C; u. a. (2005): „PI3-kinase/AKT is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways“. In: *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*. 19 (4), S. 586–594.

Hatakeyama, Hiroyasu; Kanzaki, Makoto (2011): „Molecular basis of insulin-responsive GLUT4 trafficking systems revealed by single molecule imaging“. In: *Traffic* 12 (12), S. 1805–1820.

Hillen, W; Berens, C (1994): „Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance“. In: *Annual Review of Microbiology*. 48 , S. 345–369,

Horn, Stefan, u.a. (2004): "Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/GSK-3beta signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle". In: *Leukemia*. Nov;18(11):1839-49.

Huang, Yina H; Grasis, Juris A; Miller, Andrew T; u. a. (2007): „Positive regulation of Itk PH domain function by soluble IP4“. In: *Science* 316 (5826), S. 886–889.

Ikeda, H., u.a. (1991): " Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells". In: *Blood*. 78, S. 2962-2968.

Irvine, R. F.; Letcher, A. J.; Heslop, J. P. u. a. (1986): „The inositol tris/ tetrakisphosphate pathway—demonstration of Ins(l,4,5)P3 3-kinase activity in animal tissues“. In: *Nature*. 320 (6063), S. 631–634.

Irvine, Robin F.; Schell, Michael J. (2001): „BACK IN THE WATER: THE RETURN OF THE INOSITOL PHOSPHATES“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2 (5), S. 327–338.

Kim, Seyun; Kim, Sangwon F; Maag, David; u. a. (2011): „Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase“. In: *Cell Metabolism*. 13 (2), S. 215–221.

Knippers, Rolf (2006): *Molekulare Genetik*. 9., komplett überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Larrea, Michelle D; Wander, Seth A; Slingerland, Joyce M (2009): „p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility“. In: *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. 8 (21), S. 3455–3461.

Lindström, Mikael S. (2011): "NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling". In: *Biochemistry Research International* Volume 2011.

Löffler, Georg; Petrides, Petro E.; Heinrich, Peter C. (2006): *Biochemie und Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearb. Aufl. Springer Berlin Heidelberg.

Maag, David; Maxwell, Micah J; Hardesty, Douglas A; u. a. (2011): „Inositol polyphosphate multikinase is a physiologic PI3-kinase that activates Akt/PKB“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (4), S. 1391–1396.

Maffucci, Tania; Piccolo, Enza; Cumashi, Albana; u. a. (2005): „Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects“. In: *Cancer Research*. 65 (18), S. 8339–8349.

Manning, B D; Cantley L C (2007) "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream.” In: *Cell* 129(7): 1261–1274.

Marte, B M; Downward, J (1997): „PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond“. In: *Trends in Biochemical Sciences*. 22 (9), S. 355–358.

Martelli, A M; Evangelisti, C; Chappell, W; u. a. (2011): „Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway“. In: *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*. 25 (7), S. 1064–1079.

Martelli, Alberto M.; Evangelisti, Camilla; Chiarini, Francesca; u. a. (2010): „The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients“. In: *Oncotarget*. 1 (2), S. 89–103.

Maurer, Ulrich; Charvet, Céline; Wagman, Allan S; u. a. (2006): „Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1“. In: *Molecular Cell*. 21 (6), S. 749–760.

Mayo, L D; Donner, D B (2001): „A phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (20), S. 11598–11603.

Mayr, Georg W.; Windhorst, Sabine; Hillemeier, Kirsten (2005): „Antiproliferative Plant and Synthetic Polyphenolics Are Specific Inhibitors of Vertebrate Inositol-1,4,5-trisphosphate 3-Kinases and Inositol Polyphosphate Multikinase“. In: *Journal of Biological Chemistry*. 280 (14), S. 13229 –13240.

Messenguy, F (1976): „Regulation of arginine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: isolation of a cis-dominant, constitutive mutant for ornithine carbamoyltransferase synthesis“. In: *Journal of Bacteriology*. 128 (1), S. 49–55.

Meyer, Rüdiger; u.a. (2012): "Nucleocytoplasmic shuttling of human inositol phosphate multikinase is influenced by CK2 phosphorylation". In: *Biological Chemistry.* Mar;393(3), S. 149-60.

Min, Y H; Eom, J I; Cheong, J W; u. a. (2003): „Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable“. In: *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*. 17 (5), S. 995–997.

Monserrate, Jessica P; York, John D (2010): „Inositol phosphate synthesis and the nuclear processes they affect“. In: *Current Opinion in Cell Biology*. 22 (3), S. 365–373.

Morbidelli, Lucia; Donnini, Sandra; Ziche, Marina (2003): „Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis“. In: *Current Pharmaceutical Design*. 9 (7), S. 521–530.

Morgan-Lappe, S; Woods, K W; Li, Q; u. a. (2006): „RNAi-based screening of the human kinome identifies Akt-cooperating kinases: a new approach to designing efficacious multitargeted kinase inhibitors“. In: *Oncogene*. 25 (9), S. 1340–1348.

Nalaskowski, Marcus M; Deschermeier, Christina; Fanick, Werner; u. a. (2002): „The human homologue of yeast ArgRIII protein is an inositol phosphate multikinase with predominantly nuclear localization“. In: *The Biochemical Journal*. 366 (Pt 2), S. 549–556.

Nalaskowski, Marcus M; Metzner, Anja; Brehm, Maria A; u. a. (2012): „The inositol 5-phosphatase SHIP1 is a nucleo-cytoplasmic shuttling protein and enzymatically active in cell nuclei“. In: *Cellular Signalling*. 24 (3), S. 621–628.

Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; Wang, Y; u. a. (1982): „Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.“. In: *The EMBO Journal*. 1 (7), S. 841–845.

Odom, A. R. (2000): „A Role for Nuclear Inositol 1,4,5-Trisphosphate Kinase in Transcriptional Control“. In: *Science*. 287 (5460), S. 2026–2029.

Piccolo, Enza; Vignati, Sara; Maffucci, Tania; u. a. (2004): „Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/AKT pathway“. In: *Oncogene*. 23 (9), S. 1754–1765.

Ponnusamy, Suriyan; Alderson, Nathan L; Hama, Hiroko; u. a. (2008): „Regulation of telomere length by fatty acid elongase 3 in yeast. Involvement of inositol phosphate metabolism and Ku70/80 function“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 283 (41), S. 27514–27524.

Rassow J. *Duale Reihe - Biochemie*. Thieme; 2008.

Resnick, Adam C; Snowman, Adele M; Kang, Bingnan N; u. a. (2005): „Inositol polyphosphate multikinase is a nuclear PI3-kinase with transcriptional regulatory activity“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (36), S. 12783–12788.

Resnick, Adam Cain; Saiardi, Adolfo (2008): „Inositol polyphosphate multikinase: metabolic architect of nuclear inositides“. In: *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 13 , S. 856–866.

Rosnet, O. (1991): "Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family". In: *Oncogene* Sep;6(9), S. 1641-50.

Saiardi, A; Erdjument-Bromage, H; Snowman, A M; u. a. (1999): „Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases“. In: *Current Biology: CB*. 9 (22), S. 1323–1326.

Saiardi, Adolfo; Cockcroft, Shamshad (2008): „Human ITPK1: A Reversible Inositol Phosphate Kinase/Phosphatase That Links Receptor-Dependent Phospholipase C to Ca2+-Activated Chloride Channels“. In: *Sci. Signal.* 1 (4), S. pe5.

Saiardi, Adolfo; Nagata, Eiichiro; Luo, Hongbo R. u. a. (2001): „Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98 (5), S. 2306 –2311.

Saiardi, Adolfo; Resnick, Adam C; Snowman, Adele M; u. a. (2005): „Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (6), S. 1911–1914.

Sauer, Karsten; Huang, Yina Hsing; Lin, Hongying; u. a. (2009): „Phosphoinositide and inositol phosphate analysis in lymphocyte activation“. In: *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*. Chapter 11 , S. Unit11.1.

Sauer, Karsten; u. a. (2013): "Inositol tetrakisphosphate limits NK cell effector functions by controlling PI3K signaling". *Blood* 121, S 286-297.

Schneider, U; Schwenk, H U; Bornkamm, G (1977): „Characterization of EBV-genome negative „null“ and „T“ cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma“. In: *International Journal of Cancer.* 19 (5), S. 621–626.

Shaw, G. u. a., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*.

Shears, S B (1998): „The versatility of inositol phosphates as cellular signals“. In: *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1436 (1-2), S. 49–67.

Shen, X. (2002): „Modulation of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes by Inositol Polyphosphates“. In: *Science*. 299 (5603), S. 112–114.

Steger, D. J. (2002): „Regulation of Chromatin Remodeling by Inositol Polyphosphates“. In: *Science*. 299 (5603), S. 114–116.

Streb, H.; Irvine, R. F.; Berridge, M. J. u. a. (1983): „Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate“. In: *Nature*. 306 (5938), S. 67–69.

Sundqvist, Anders; Bengoechea-Alonso, Maria T; Ye, Xin; u. a. (2005): „Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7)“. In: *Cell Metabolism*. 1 (6), S. 379–391.

Togashi, S; Takazawa, K; Endo, T; u. a. (1997): „Structural identification of the myo-inositol 1,4,5-trisphosphate-binding domain in rat brain inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase“. In: *The Biochemical Journal*. 326 (Pt 1) , S. 221–225.

Vardiman, James W.; u.a. (2009): “The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes”. In: *Blood*. Jul 30;114(5):937-51.

Wander, Seth A; Zhao, Dekuang; Slingerland, Joyce M (2011): „p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies“. In: *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 17 (1), S. 12–18.

Weinberg, Olga K; Seetharam, Mahesh; Ren, Li; u. a. (2009): „Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system“. In: *Blood*. 113 (9), S. 1906–1908.

Wen, Peter J.; Osborne, Shona L.; Zanin, Mark; u. a. (2011): „Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate coordinates actin-mediated mobilization and translocation of secretory vesicles to the plasma membrane of chromaffin cells“. In: *Nature Communications*. 2 , S. 491.

Windhorst, Sabine; Fliegert, Ralf; Blechner, Christine; u. a. (2010): „Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase-A Is a New Cell Motility-promoting Protein That Increases the Metastatic Potential of Tumor Cells by Two Functional Activities“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 285 (8), S. 5541–5554.

Xu, Qing; Simpson, Serge-Emile; Scialla, Timothy J; u. a. (2003): „Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation“. In: *Blood*. 102 (3), S. 972–980.

Xu, Risheng; Snyder, Solomon H. (2013) "Gene transcription by p53 requires inositol polyphosphate multikinase as a co-activator". In: *Cell Cycle* June 15,12:12, S. 1819–1820.

Yamamoto Y. u.a. (2001): " Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies". In: *Blood*. Apr 15;97(8), S. 2434-9.

Yang, X; Shears, S B (2000): „Multitasking in signal transduction by a promiscuous human Ins(3,4,5,6)P(4) 1-kinase/Ins(1,3,4)P(3) 5/6-kinase“. In: *The Biochemical Journal*. 351 Pt 3, S. 551–555.

Yokota S., u.a. (1997): "Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines". In: *Leukemia*. Oct;11(10), S. 1605-9.

York, Sally J; Armbruster, Blaine N; Greenwell, Patricia; u. a. (2005): „Inositol diphosphate signaling regulates telomere length“. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (6), S. 4264–4269.

Yoshida, Y; Imai, S (1997): „Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor“. In: *Japanese Journal of Pharmacology*. 74 (2), S. 125–137.

Yuan, T L; Cantley, L C (2008): „PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme“. In: *Oncogene*. 27 (41), S. 5497–5510.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stoffwechsel der Inositolphosphate und Phosphatidylinositole. 9

Abb. 2: Entstehung der Second Messenger IP3 und DAG durch Phospholipase C vermittelte Spaltung von PIP2. 11

Abb. 3: Kristallstruktur der Hefe-IPMK. 13

Abb. 4: Funktionell wichtige Domänen der IPMK und Vergleich mit der IP3K. 14

Abb. 5: Lokalisationsstudien mit Vollängen-IPMK und einer Deletionsmutante ohne NLS. 15

Abb. 6: Alternative Synthesewege von InsP3 zu InsP5. 16

Abb. 7: Funktion von AKT-Substraten in der Zelle. 18

Abb. 8: Doxycyclininduzierte Expression von IPMK Mutanten in Jurkat Tet-On Zelllysaten. 53

Abb. 9: IPMK Expression in transient transfizierten HEK 293 T Zellen. 54

Abb. 10: Vergleich verschiedener Lyseprotokolle. 55

Abb. 11: Vergleich der Transfektionseffektivität von neuen und wiederverwendeten Elektroporationsküvetten. 56

Abb. 12: Expression von EGFP in 293T und Jurkat Tet-On Zellen. 57

Abb. 13: Nachweis von EGFP nach Elektroporation. 57

Abb. 14: Kein Nachweis von IPMK in H1299 und Jurkat-Zellen. 58

Abb. 15: Nachweis von IPMK in Blutproben von Leukämiepatienten und gesunden Spendern sowie in transfizierten Zelllinien. 60

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die French-American-British (FAB) Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie 22

Tabelle 2: Die WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien. (Modifiziert nach Vardiman, u.a. 2009) 23

10 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Manfred Jücker für die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Frau Wiebke Wegner danke ich für die geduldigen Erklärungen und die Unterstützung bei den Versuchen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Marcus Nalaskowski danke ich für die Bereitstellung der genutzten Antikörper und für die Hilfe bei der Auswertung der Versuchsergebnisse.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des Studiums im Besonderen und die Begleitung auf meinem Lebensweg im Allgemeinen.

Meinem Lebenspartner Mark danke ich für die fortwährende Bemühung, diese Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....