

**Die Bedeutung der Inositol-5-Phosphatase SHIP
für das Wachstum hämatopoetischer
Progenitorzellen von Patienten mit
myeloproliferativen Syndromen
und akuten myeloischen Leukämien**

Dissertation

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Anja Metzner

Hamburg, 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. G. W. MAYR
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 19. Oktober 2007

Hamburg, den 01. Oktober 2007



A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. Lieberei".

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Familie der Inositol-5-Phosphatasen	5
2.2. Struktur von SHIP-1	7
2.3. SHIP-Isoformen	8
2.4. Enzymatische Aktivität von SHIP-1	9
2.5. SHIP-Interaktionen	10
2.6. Funktionen von SHIP-1	12
2.6.1. B-Lymphozyten	12
2.6.2. Mastzellen	13
2.6.3. Leukämogenese	14
2.7. Zelluläre Lokalisation von SHIP-1	14
2.8. Die SHIP-1- <i>knockout</i> -Maus	16
2.9. Leukämien	18
2.9.1. Chronische myeloische Leukämie und andere myeloproliferative Syndrome	18
2.9.2. Akute myeloische Leukämie	20
2.10. Projektbeschreibung	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Material	23
3.1.1. Chemikalien	23
3.1.2. Puffer und Stammlösungen	23
3.1.3. Antikörper	24
3.1.4. Enzyme und Reaktionskits	25
3.1.5. Bakterienstämme	26
3.1.6. Zellen	26
3.1.6.1. Zelllinien	26
3.1.6.2. primäre Zellen	26

3.1.7. Nukleinsäuren.....	28
3.1.7.1. Vektoren.....	28
3.1.7.2. DNA-Oligonukleotide.....	29
3.1.8. Geräte.....	30
3.1.9. Verbrauchsmaterialien.....	31
3.2. Methoden.....	31
3.2.1. Bakterienkulturen.....	31
3.2.2. Transformation von Bakterien.....	32
3.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	32
3.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33
3.2.5. Enzymreaktionen an Nukleinsäuren.....	33
3.2.5.1. Restriktion von DNA.....	33
3.2.5.2. Dephosphorylierung von DNA.....	33
3.2.5.3. Ligation von DNA.....	33
3.2.6. Gelelektrophorese.....	34
3.2.6.1. DNA-Agarosegele.....	34
3.2.6.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	34
3.2.7. PCR.....	35
3.2.7.1 Sequenzierung.....	35
3.2.7.2. Quickchange-Mutagenese (QCM).....	36
3.2.8. Zellkultur.....	37
3.2.8.1. Stammhaltung und Vermehrung.....	37
3.2.8.2. Einfrieren von Zellen.....	37
3.2.8.3. Auftauen von Zellen.....	37
3.2.8.4. Trypanblau-Färbung.....	38
3.2.8.5. Transfektion von 293-Zellen.....	38
3.2.8.6. Virustitration.....	39
3.2.8.7. Präparation mononukleärer Zellen.....	39
3.2.8.8. CD34 ⁺ -Aufreinigung.....	40
3.2.8.9. Transduktion der CD34 ⁺ -Zellen.....	40
3.2.8.9.1. Retrovirale Transduktion.....	40
3.2.8.9.2. Lentivirale Transduktion.....	41
3.2.8.10. Sortieren der transduzierten Zellen am FACS Aria.....	42
3.2.8.11. Methylcellulose und Flüssigkultur.....	42

3.2.9. Kopplung von Antikörpern mit Fluorochromen	42
3.2.10. Zelllyse und Proteinextraktion	43
3.2.10.1. Zelllyse mit NP40-Puffer	43
3.2.10.2. TCA-Lyse	43
3.2.11. Proteinchemische Arbeiten	43
3.2.11.1. Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford	43
3.2.11.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	44
3.2.11.3. Färbung von Protein-Polyacrylamidgelen mit Coomassie- Blau	44
3.2.11.4. Western Blot-Analyse	45
3.2.12. Fluoreszenzfärbungen	46
4. Ergebnisse	48
4.1. Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von gesunden Spendern mit dem retroviralen Vektor SF91iGpre	48
4.2. Expression von SHIP-1 in CD34 ⁺ -Zellen von Patienten mit juvenilen myelomonozytären Leukämien mit dem VektorSF91iGpre	51
4.2.1. Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von einem JMM- Patienten# 2	52
4.2.2. Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von einem zweiten JMML Patienten#3	53
4.2.3. Untersuchungen zum SHIP-1-Gehalt	56
4.3. Immunfärbung mit SHIP-1 und p-AKT	57
4.4. Expression von SHIP-1 mittels eines lentiviralen Vektors pRRL. sinh.CMV.GFPpre	60
4.4.1. Untersuchungen des Wachstumsverhaltens durch SHIP-1 der CD34 ⁺ -Zellen von gesunden Spendern	61
4.4.2. Untersuchungen zur Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 an den Zellen verschiedener AML-Patienten	64
4.4.3. Zusammenfassung der untersuchten CD34 ⁺ -Zellen der 12 AML-Patienten	86
4.5. Myeloproliferatives Syndrom	87
4.5.1. Kultivierung ohne Zytokine	87
4.5.2. Kultivierung mit GM-CSF	89
4.5.3. Untersuchung zum SHIP-1- und p-AKT-Gehalt	90

4.5.3.1. Immunfärbung	90
4.5.3.2. SHIP-1- und p-AKT-Nachweis auf Proteinebene	91
5. Diskussion	93
5.1. Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums hämatopoetischer Zellen bei gesunden Spendern und JMML-Patienten mittels eines retroviralen Vektors	93
5.2. Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums hämatopoetischer Zellen bei gesunden Spendern und AML-Patienten mittels eines lentiviralen Vektors	96
5.3. Reduktion des Wachstums hämatopoetischer Zellen bei einem Patienten mit einem myeloproliferativen Syndrom	99
6. Literaturverzeichnis	102
7. Anhang	114
Abkürzungsverzeichnis	114
Abbildungsverzeichnis	117
Danksagung	119
Publikationsliste	120

1. Zusammenfassung

Leukämien sind bösartige Erkrankungen hämatopoetischer Zellen, die durch unkontrolliertes Wachstum eines transformierten Zellklons gekennzeichnet sind. In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf, dem Reifegrad und der Abstammung, der pathologisch veränderten Leukozyten, unterteilt man sie in akute und chronische sowie in lymphatische und myeloische Leukämien. Die Entstehung einer Leukämie ist ein multifaktorieller Prozess, der durch die Akkumulation von Mutationen zur malignen Transformation einer hämatopoetischen Zelle führt. Viele der von Protoonkogenen bzw. Tumorsuppressorgen codierten Proteine dienen als Regulatoren des Zellwachstums. Dies führte zu einem Modell, nach dem das unkontrollierte Wachstum der entarteten Zelle durch die Aktivierung von proliferationsfördernden oder durch die Inaktivierung von proliferationshemmenden Regulatoren des Zellwachstums ausgelöst wird.

Die Inositol-5-Phosphatase SHIP-1 gehört zu den negativen Regulatoren von Wachstums-vermittelnden Signalen in hämatopoetischen Zellen. Der Phänotyp der SHIP-1-*knockout*-Maus ist durch eine erhöhte Anzahl von myeloischen Vorläuferzellen in Knochenmark und Milz gekennzeichnet. Dies wird durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber hämatopoetischen Wachstumsfaktoren verursacht. Dieses Erscheinungsbild hat Ähnlichkeiten mit den myeloischen Erkrankungen des Menschen wie der akuten myeloischen Leukämie und den myeloproliferativen Syndromen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Überexpression von SHIP-1 das Wachstum von myeloischen Progenitorzellen von gesunden Spendern und von Leukämiepatienten *in vitro* hemmen kann. Es wurden 11 gesunde Spender, 2 Patienten mit einer juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML), 12 Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie und ein Patient mit einem myeloproliferativen Syndrom (MPS) analysiert. Die CD34⁺-Zellen der JMML-Patienten wurden mit einem retroviralen, die CD34⁺-Zellen der AML-Patienten mit einem lentiviralen Koexpressionsvektor transduziert, der EGFP und SHIP-1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) enthielt. Die EGFP⁺-Zellen wurden sortiert und analysiert. Die retroviral transduzierten CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern zeigten eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums durch SHIP-1 um 36% und in der Flüssigkultur um 69%. Durch die Verwendung des lentiviralen Vektors konnte das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern in der Flüssigkultur

sogar um 90% gehemmt werden. Die Expression von SHIP-1 bewirkte eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen eines JMML-Patienten, der eine Mutation im PTPN11-Gen hat, um 75% und eines JMML-Patienten, der eine Mutation im KRAS2-Gen besitzt, um 70%. Das GM-CSF-abhängige Wachstum konnte weder durch den Vektor alleine noch durch eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) gehemmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen der beiden untersuchten JMML-Patienten sowie der gesunden Spender durch SHIP-1 gehemmt werden kann und dass für diese Hemmung die enzymatische Aktivität von SHIP-1 notwendig ist.

Des Weiteren konnte bei allen 12 untersuchten AML-Patienten eine Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 gezeigt werden, die im Durchschnitt bei 85% lag. Von besonderem Interesse war die Analyse eines MPS-Patienten, dessen CD34⁺-Zellen ein autonomes Wachstum *in vitro* zeigten, das durch die Expression von SHIP-1 um 56% gehemmt werden konnte. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 lag bei diesem Patienten bei 75%.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Expression von SHIP-1 das GM-CSF-abhängige Wachstum sowie im Fall des MPS auch das autonome Wachstum von CD34⁺-Zellen von Leukämiepatienten *in vitro* signifikant hemmen kann und dass dieser Effekt abhängig von der enzymatischen Aktivität von SHIP-1 ist. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse könnte nun in weiterführenden Experimenten untersucht werden, ob sich SHIP-1 für eine gentherapeutische Behandlung von myeloischen Leukämiepatienten eignet. Hierzu müsste zunächst in einem Tiermodell untersucht werden, ob der Gentransfer von SHIP-1 in primäre myeloische Leukämiezellen deren Wachstum *in vivo* hemmen kann.

2. Einleitung

Die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung einer einzelnen Zelle spielt eine wichtige Rolle in einem lebenden Organismus. Auch die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit ihren spezifischen Liganden ist bei der Kontrolle zellulärer Proliferation und Differenzierung wichtig. Hierbei werden die Signale von der Cytoplasmamembran in den Zellkern weitergeleitet, wodurch die Transkription proliferations- und differenzierungssteuernder Gene gesteigert wird. Diese intrazelluläre Signalübertragung erfolgt größtenteils über reversible Phosphorylierungen von Proteinen und Inositiden durch Kinasen und Phosphatasen.

Ein System, das sich bestens für die Erforschung solcher Mechanismen eignet, ist die Hämatopoese, die Bildung der korpuskulären Bestandteile des Blutes. Dazu gehören die Erythrozyten, Lymphozyten (B- und T-Zellen), Thrombozyten, Granulozyten, Natürliche Killerzellen und Monozyten/Makrophagen. Diese entstehen aus einer kleinen Population, den so genannten hämatopoetischen Stammzellen, die im Knochenmark lokalisiert sind. Die hämatopoetische Stammzelle besitzt sowohl die Fähigkeit, sich in alle Richtungen der peripheren Blutzellen zu differenzieren als auch die Fähigkeit sich selbst zu erneuern. Während der Hämatopoese entwickeln sich aus der pluripotenten Stammzelle unterschiedliche Vorläuferzellen, die in ihrer Proliferation und Differenzierung eingeschränkt sind. Daraus ergibt sich eine hierarchische Einteilung in frühe und späte Vorläuferzellen. Durch diese Einteilung weiß jede Zelle, in welche Richtung sie sich entwickeln muss. Wahrscheinlich werden zehn bis 15 Teilungen benötigt bis eine vollständige Differenzierung durchgeführt ist [ZHU UND EMERSEN 2002]. Aus den hämatopoetischen Stammzellen gehen zuerst die Vorläufer der myeloischen Reihe, die so genannten CMPs (CMP: *common myeloid progenitor*), und die Vorläufer der lymphatischen Reihe, die so genannten CLPs (CLP: *common lymphoid progenitor*), hervor. Daraus entstehen dann über weitere Entwicklungsstadien die reifen myeloischen und lymphatischen Blutzellen. [WEISSMANN et al., 2001; PASSEGUÉ et al., 2004]. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen können in einem semi-soliden Medium wachsen, indem sie Kolonien bilden. Die gebildeten Kolonien werden als Kolonie-Formende Einheiten (CFU: *colony forming units*) bezeichnet. Eine frühe myeloische Vorläuferzelle kann sich zu neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten entwickeln. Sie wird daher als CFU-GEMM (*colony forming unit granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte*) bezeichnet. CFU-GM bezeichnet die

myeloischen Vorläuferzellen, aus denen neutrophile Granulozyten und Monozyten entstehen. Aus CFU-MEG entstehen die Thrombozyten und aus BFU-E die reifen Erythrozyten.

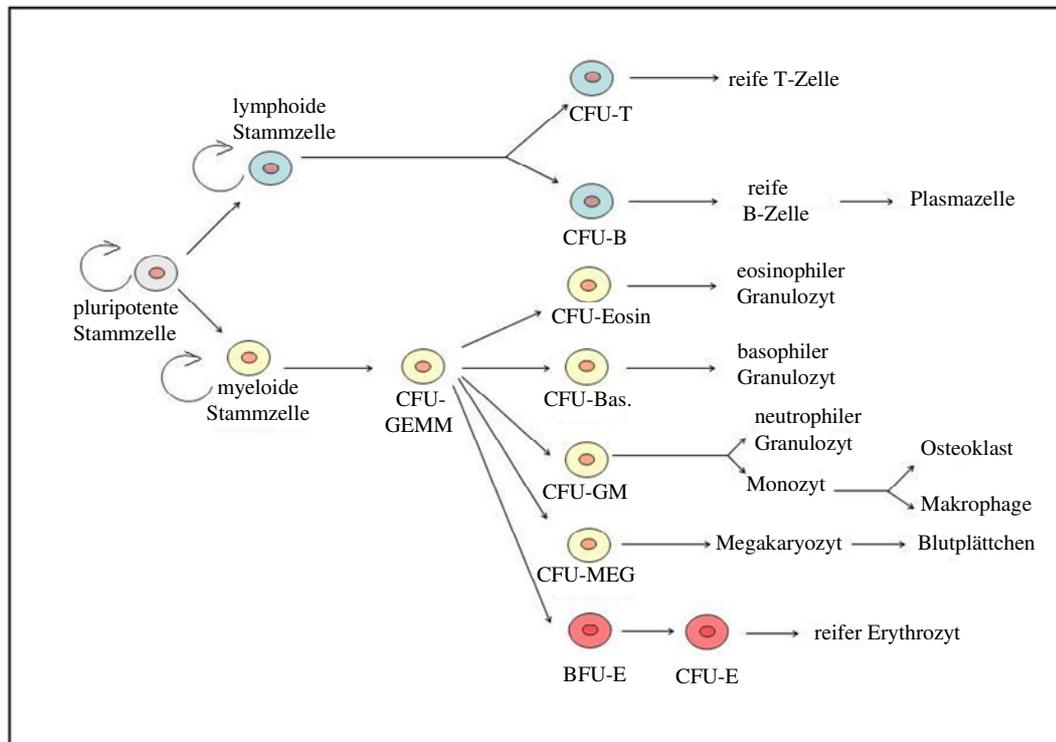


Abb.1: Schematische Darstellung der Hämatopoese

Hämatopoetische Zellen entwickeln sich aus einer pluripotenten Stammzelle. Aus dieser Stammzelle entwickeln sich die lymphoiden Vorläuferzellen, die dann zu den reifen T-Zellen und reifen B-Zellen entwickeln, während sich aus den myeloiden Vorläuferzellen die Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten (Blutplättchen) und Erythrozyten entwickeln. Die reifen B-Zellen entwickeln sich nach Antigenkontakt zur Plasmazelle. Aus dem Monozyt können sich Osteoklasten, die sich selbst erneuern können, und Makrophagen entwickeln. GEMM: Granulozyt, Erythrozyt, Monozyt, Megakaryozyt Basophil; basophil, GM: Granulozyten-Makrophagen, MEG: Megakaryozyt, BFU: *Burst forming unit* Eosin: eosinophil E: erythroid (Alberts et al., 1995, verändert)

Die hämatopoetischen Stammzellen bzw. die Progenitorzellen besitzen einen Oberflächenmarker, das so genannte CD34-Antigen. Für dieses Antigen gibt es spezielle Antikörper, mit denen diese Zellen aufgereinigt werden können. Die hämatopoetischen CD34⁺-Stammzellen sichern lebenslang die Versorgung des Organismus mit reifen Blutzellen in Abhängigkeit von den unterschiedlichen individuellen Bedürfnissen und Umständen, in denen sich der Organismus befindet. Die Regulation der Hämatopoese erfolgt durch eine komplexe Verknüpfung von Zytokinen sowie Zell-Zell-Interaktionen. Zytokine binden an Cytokinrezeptoren, die dadurch stimuliert werden und in der Zelle zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalproteine führen, die für das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen verantwortlich sind. Mehrere Proteine, die

nach Cytokinstimulation hämatopoetischer Zellen aktiviert werden, konnten in den letzten Jahren identifiziert und verschiedenen Signalwegen, wie z.B. dem Jak/STAT-, Ras/Raf/MAP-Kinase- und dem Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg, zugeordnet werden. Diese Signale werden durch negative Regulatoren abgeschaltet. Es wurden bisher vier verschiedene Gruppen dieser negativen Regulatoren beschrieben, die durch unterschiedliche Mechanismen in die negative Signalgebung eingreifen. Dabei deutet die Existenz einer Src-Homologie-Domäne-2 (SH2-Domäne) [SCHAFFHAUSEN 1995] bei allen Mitgliedern dieser vier Gruppen darauf hin, dass tyrosinphosphorylierte Proteine die Angriffspunkte dieser negativen Regulation darstellen. Die negativen Regulatoren der cytokinvermittelten Signalgebung wurden als Tyrosinphosphatasen (z.B. SHP-1/HCP) [YI et al., 1993], Kompetitoren der STAT-Bindung an den aktivierten Rezeptor (z.B. CIS) [YOSHIMURA et al., 1995; MATSUMOTO et al., 1997] und Inhibitoren der JAKs (z.B. JAB, SOCS oder SSI) [ENDO et al., 1997; STARR et al., 1997; NAKA et al., 1997] identifiziert.

Es wurde in den letzten Jahren ein neues Protein beschrieben, das dieser Gruppe von negativen Regulatoren der cytokinvermittelten Signalgebung in hämatopoetischen Zellen zugerechnet wird. Dieses Protein wurde wegen seiner strukturellen und enzymatischen Eigenschaften „**SH2**-Domäne beinhaltende **I**nositol-**5**-**P**hosphatase (**SHIP/SHIP-1**)“ genannt [DAMEN et al., 1996; KAVANAUGH et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996].

2.1. Familie der Inositol-5-Phosphatasen

SHIP-1 gehört zu einer Familie von Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasen (INPP5), die den Phosphatrest an der D5-Position des Inositolringes abspalten [DAMEN et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996; MAJERUS et al., 1999]. Die Inositol-5-Phosphatasen beinhalten zwei konservierte Aminosäuremotive, die die Gruppe dieser Enzyme definieren [MAJERUS et al., 1999]. Die Inositol-5-Phosphatasen, auch als INPP5 bezeichnet, werden aufgrund ihrer Substratspezifität in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Inositol-5-Phosphatasen werden auch als INPP5 bezeichnet. 5-Phosphatasen vom Typ I hydrolysieren $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_3$. Dazu gehört eine 40kD große Inositol-5-Phosphatase, die auch als INPP5A bezeichnet wird. Die Typ II Phosphatasen hydrolysieren alle vier möglichen Substrate. Dazu gehören die Synaptojanine 1 und 2 sowie OCRL. Die Synaptojanine 1 werden als INPP5G und Synaptojanine 2 als INPP5H bezeichnet. OCRL wird als INPP5F bezeichnet. Zu den 5-Phosphatasen vom Typ III gehört SHIP-1, das als INPP5D bezeichnet wird. Zu dieser Gruppe gehören außerdem noch eine 75 kD große Inositol-5-Phosphatase, die auch INPP5B genannt

wird. Diese Gruppe hydrolysiert Substrate, die an der 3-Position des Phosphatringes eine Phosphatgruppe tragen. Es gibt auch eine Gruppe von Typ IV Phosphatasen, die nur PtdIns(4,5)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ hydrolysieren. Zu dieser Gruppe gehört eine 72 kD große Inositolphosphatase, die auch als INPP5E bezeichnet wird [ERNEUX et al., 1998; MAJERUS et al., 1999; KISSELVA et al., 2000]. Zu der Gruppe der Inositol-5-Phosphatasen gehört auch das mit SHIP-1 verwandte SHIP-2, das die gleichen strukturellen Merkmale bei ungefähr 38% Gesamthomologie aufweist [PESESSE et al., 1997]. SHIP-2 wird im Gegensatz zu SHIP-1, das nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, ubiquitär exprimiert, z.B. auch in Skelettmuskel, Herz, Plazenta, Pankreas, Gehirn und Niere [PESESSE et al., 1997; WISNIEWSKI et al., 1999; DECKER UND SALTIEL 2005]. SHIP-2 ist ein wichtiger Regulator des Glucose-Haushaltes, denn es dient als negativer Regulator des Insulins [BIRNBAUM et al., 2005]. SHIP-2 hat eine Größe von 150kD. Ein weiterer Unterschied zwischen SHIP-1 und SHIP-2 besteht in der enzymatischen Aktivität. SHIP-1 spaltet sowohl Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat [PtdIns(3,4,5)P₃] zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat [PtdIns(3,4)P₂] als auch Inositol-1,3,4,5-tetrakis-phosphat [Ins(1,3,4,5)P₄] zu Inositol-1,3,4-trisphosphat [Ins(1,3,4)P₃]. Dabei benötigt es eine 3-Phosphatgruppe am Inositolring, um das 5-Phosphat abzuspalten. SHIP-2 spaltet lediglich das PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ [WISNIEWSKI et al., 1999; KALESNIKOFF et al., 2003; CHI et al., 2004]. Aus diesen Unterschieden lässt sich ableiten, dass die Funktionen von SHIP-1 und SHIP-2 nicht vollständig übereinstimmen, selbst wenn sie in der gleichen Zelle exprimiert werden.

Eine andere Isoform von SHIP-1 hat eine Größe von 104kD und wird als s-SHIP bezeichnet. Diese Isoform kommt in totipotenten embryonalen Stammzellen vor konnte auch in primitiven hämatopoetischen Stammzellen gefunden werden. In den embryonalen Stammzellen interagiert s-SHIP mit dem Adapterprotein Grb2, ohne dass s-SHIP tyrosinphosphoryliert wird und befindet sich hauptsächlich an der Zellmembran. s-SHIP besitzt keine SH2-Domäne, nur eine zentrale katalytische Domäne und die Fähigkeit zu Protein-Protein-Interaktionen, so dass s-SHIP an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist. Daraus lässt sich schließen, dass s-SHIP wahrscheinlich die Aktivierung von primitiven Stammzellpopulationen regelt [TU et al., 2001; KALESNIKOFF et al., 2003; DESPONTS et al., 2006].

Weitere Inositol-5-Phosphatasen sind die ubiquitär exprimierten Synaptojanine 1 und 2 sowie die OCRL-5-Phosphatase (Oculocerebrorenales-Lowe's-Syndrom), durch deren Defekt die gleichnamige X-chromosomal gekoppelte Krankheit entsteht. Bei dieser Erkrankung kommt es wegen einer Stoffwechselanomalie zu Funktionsstörungen und

Fehlbildungen von Augenlinsen, Gehirn und Nieren [KAWANO et al., 1998]. Die Synaptojanine bilden Komplexe mit Dynamin sowie Amphiphysin und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei dem synaptischen Vesikeltransport [MCPHERSON et al., 1996; CREMONA et al., 1999]. Beide Synaptojanine sind für das Gehirn spezifisch [MCPHERSON et al., 1996] und besitzen eine prolinreiche Sequenz, die mit einer SH3-Domäne interagieren kann.

Es gibt auch Phosphatasen, die an einer anderen Stelle als der 5-Position des Inositolringes wirken, zu denen das Tumorsuppressorgen PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) gehört [MAEHAMA UND DIXON 1999; KRYSTAL 2000; SLY et al, 2003]. Das Substrat von PTEN ist das PtdIns(3,4,5)P₃, welches durch Phosphorylierung des PtdIns(4,5)P₂ an der 3'-Position des Inositolringes durch die PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) gebildet wird. Daraus ergibt sich, dass PTEN im Gegensatz zu SHIP-1 das 3-Phosphat und nicht das 5-Phosphat abspaltet, wodurch es zu einer entgegengesetzten Wirkung zur PI3K kommt.

2.2. Struktur von SHIP-1

Das SHIP-1-Protein hat ein Molekulargewicht von 133kD und besteht aus 1189 Aminosäuren [DAMEN et al., 1996, LIOUBIN et al., 1996, KAVANAUGH et al., 1996; GEIER et al., 1997]. SHIP-1 enthält außerdem mehrere Strukturmodule, die für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sind. Dazu gehört die aminoterminal gelegene SH2-Domäne, die mit Phosphotyrosinresten interagieren kann. SHIP-1 enthält außerdem eine zentrale katalytische Domäne, die ungefähr 450 Aminosäuren umfasst (siehe Abb. 2).

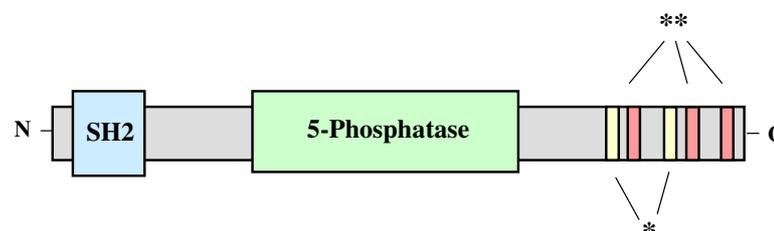


Abb. 2: Schematische Darstellung der 145 kD-Isoform von SHIP-1.

Die drei prolinreichen Sequenzen nahe dem C-Terminus sind mit „*“ markiert. Die beiden NPXY-Motive zur Bindung an PTB-Domänen sind hingegen mit nur einem Sternchen gekennzeichnet. SH2: Src-Homologie-Domäne-2; 5-Phosphatase: Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasedomäne. Das Schema wurde von Lioubin et al. adaptiert [LIOUBIN et al., 1996, modifiziert].

Diese SH2-Domäne spaltet spezifisch den Phosphatrest an der 5-Position von Inositolpolyphosphaten ab. Damit ist SHIP-1, neben der Isoform SHIP-2, die einzige bisher identifizierte Inositol-5-Phosphatase mit einer SH2-Domäne. Das carboxyterminale Ende, das ungefähr 350 Aminosäuren umfasst, enthält zwei NPXY-Motive, die nach Tyrosinphosphorylierung Bindungsstellen für PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domänen darstellen. Die Spezifität dieser Bindungsmotive wird durch die Sequenzumgebung des Tyrosinrestes bestimmt [SONGYANG et al., 1993]. So ist für eine Bindung der PTB-Domäne die von dem Phosphotyrosinrest N-terminal gelegene Aminosäuresequenz von Bedeutung, während für die Bindung der SH2-Domäne die C-terminal gelegene Aminosäuresequenz für die Bindung wichtig ist [SCHAFFHAUSEN 1995; VAN DER GEER UND PAWSON 1995]. Außerdem befinden sich im C-terminalen Bereich von SHIP-1 mehrere prolinreiche Sequenzen, die potentielle Bindungsstellen für eine SH3-Domäne darstellen. Einem ca. 300 Aminosäuren großen Abschnitt von SHIP-1, der im N-terminalen Bereich des Proteins liegt und die SH2-Domäne mit der katalytischen Domäne verbindet, konnte bisher noch keine Funktion zugeordnet werden.

2.3. SHIP-Isoformen

Mehrere SHIP-Isoformen sind in Polyacrylamidgelen detektiert worden [KAVANAUGH et al., 1996; GEIER et al., 1997; DAMEN et al., 1998]. Dabei wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 145kD nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um das komplette SHIP-1, das aus 1188 Aminosäuren besteht. Dieses Protein tritt hauptsächlich in reifen hämatopoetischen Zellen auf. Weiterhin wurden auch Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 135kD, sowie von 100kD bis 120kD detektiert [GEIER et al., 1997; DAMEN et al., 1998; ROHRSCHEIDER et al., 2000; HORN et al., 2001]. Aufgrund der Beobachtung, dass mit der Entwicklung der Zellen des blutbildenden Systems von der unreifen hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark, bis hin zu den ausgereiften Zellen des peripheren Blutes, zunehmend größere SHIP-Formen gefunden wurden [GEIER et al., 1997], stellte Rohrschneider die Vermutung auf, dass diese verschiedenen SHIP-Isomere in direktem Bezug zu dem Entwicklungsgrad der Zelle stehen und ihnen spezifische Funktionen bei der Entwicklung von hämatopoetischen Zellen zukommen könnten.

Mögliche Mechanismen für die Entstehung dieser Formen beinhalten alternatives Spleißen der mRNA, Proteolyse oder posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen. So konnte in myeloischen Zellen der Maus gezeigt werden, dass die 135

kD-Isoform durch alternatives Spleißen der SHIP-mRNA zustande kommt [LUCAS UND ROHRSCHEIDER 1999].

Das kleinste SHIP-Protein p110 wird mit dem Cytoskelett in Verbindung gebracht. Diese 110 kD-Form wurde auch in humanen Zellen beschrieben [KAVANAUGH et al., 1996]. Diese Form nennt man SIP-110, von der man vermutet, dass es sich um ein alternatives Spleißprodukt handelt.

Dieses SIP-110 wird nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren nicht tyrosinphosphoryliert. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass SIP-110 keine SH2-Domäne besitzt und somit nicht mit tyrosinphosphorylierten Proteinen interagieren kann und dadurch selbst nicht tyrosinphosphoryliert wird.

Die Beobachtung von C-terminal trunkierten SHIP-Isoformen mit apparenten Molekulargewichten von 100kD bis 120kD insbesondere in menschlichen und murinen Knochenmarkzellen, sowie deren Beobachtung in menschlichen mononukleären Zellen des peripheren Blutes konnten als *in vitro* Artefakte, die bei der Zelllyse entstehen, nachgewiesen werden. So konnte durch Lyse der Zellen mit heißem SDS-Puffer die Bildung dieser 100kD bis 120kD umfassenden SHIP-Isoformen verhindert werden [HORN et al., 2001]. Die Entstehung dieser C-terminal trunkierten SHIP-Isoformen ist wahrscheinlich auf die Freisetzung einer Serin-Protease aus Zellkompartimenten während der Zelllyse mit Detergentien zurückzuführen [HORN et al., 2001]. Diesen C-terminal trunkierten SHIP-Isoformen können somit keine physiologischen Bedeutungen zugerechnet werden.

2.4. Enzymatische Aktivität von SHIP-1

Die katalytische Domäne von SHIP-1 entfernt eine Phosphatgruppe an der 5-Position des Inositolringes, sowohl von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat [PtdIns(3,4,5)P₃] als auch bei Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat [Ins(1,3,4,5)P₄] [DAMEN et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996]. Bevor SHIP-1 den Inositolring an der 5-Position dephosphorylieren kann, muss die 3-Position des Inositolringes phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung wird von der PI3K durchgeführt wird [DAMEN et al., 1996]. In anderen Arbeiten hatte die Tyrosinphosphorylierung keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von SHIP-1, die nur durch Translokation des Proteins an die Membran reguliert wurde [PHEE et al. 2000].

2.5. SHIP-Interaktionen

Es sind mehrere Interaktionen von SHIP-Proteinen beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domäne von SHIP-1 an den Fc γ -Rezeptor von B-Zellen bindet und hierbei ein negatives Signal weiterleitet [ONO et al., 1997, AMAN et al., 2001]. Weiterhin bindet SHIP-1 an die Tyrosinphosphatase SHP-2. SHP-2 interagiert mit der SH2-Domäne von SHIP-1 [SATTLER et al., 1997; LIU et al., 1997b]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Onkogen bcr/abl die Assoziation von SHIP-1 mit SHP-2 begünstigt und dabei auch selbst in diesem Komplex vorliegt [SATTLER et al., 1997]. Neben der SH2-Domäne von SHIP-1 können auch das NPXY-Motiv und das prolinreiche C-terminale Ende von SHIP-1 Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen. So bindet die PTB-Domäne von Shc an ein tyrosinphosphoryliertes NPXY-Motiv von SHIP-1.

Weitere Interaktionen gibt es auch noch mit Grb2, das zwei SH3-Domänen besitzt, die wiederum mit prolinreichen Sequenzen an dem C-terminalen Ende von SHIP-1 interagieren können [DAMEN et al., 1996, JÜCKER et al., 1997]. Shc kann mit der SH2-Domäne von Grb2 interagieren, wodurch ein heterotrimerer Shc/Grb2/SHIP-Komplex entsteht, der wahrscheinlich in Konkurrenz zum Shc/Grb2/Sos-Komplex agiert [HARMER UND DEFRANCO 1999]. So spielt der Shc/Grb2/Sos-Komplex eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweg. SHIP-1 konkurriert mit Sos um die Bindung an Shc/Grb2, dadurch kann es zu einer Blockade der Ras-Aktivierung kommen [SAXTON et al., 1994; TRIDANDAPANI et al., 1997]. Der Beweis entstand dadurch, dass das Fc γ RII vermittelte negative Signal in den B-Zellen mit einer Abnahme der Ras-Aktivierung und gleichzeitigem Rückgang des Shc/Grb2/Sos-Komplexes verbunden ist. Eine weitere Hemmung der Signaltransduktion durch SHIP-1 entsteht dadurch, dass die SHIP-SH2-Domäne mit der Grb2-SH2-Domäne um die Bindung an tyrosinphosphoryliertes Shc konkurriert [TRIDANDAPANI et al., 1997].

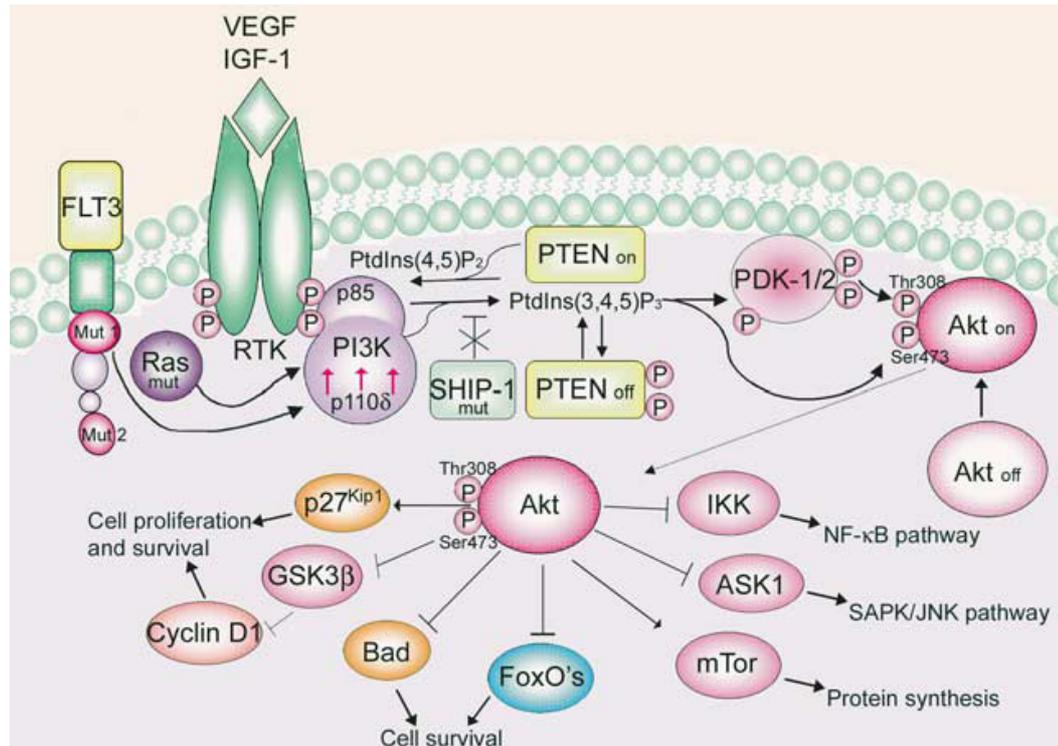


Abb. 3: Übersicht über die Signaltransduktionswege

Die Aktivierung von Rezeptorproteinkinasen von Wachstumsfaktoren führt zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten. Nach Tyrosinphosphorylierung wird die PI3K an die Membran rekrutiert und dort durch direkte Bindung an Phosphotyrosinresten aktiviert. PIP₃ rekrutiert wiederum Signalproteine mit einer PH-Domäne an die Membran, wo sie aktiviert werden. Dazu gehören AKT und PDK1. Diese wiederum aktivieren die Proliferation und das Überleben die Kinase p27^{Kip1}. Das phosphorylierte AKT stimuliert mTOR, dass für die Proteinsynthese der Zelle wichtig ist. Ist AKT phosphoryliert, so werden BAD, GSK3β inhibiert. Gleichzeitig werden durch das phosphorylierte AKT ASK1, das auf den JNK-Signalweg wirkt, gehemmt, so wie IKK, das über den NF-κB Signalweg initiiert wird (nach Martelli et al., 2006).

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) der Klasse IA sind heterodimere Enzyme, die aus einer katalytischen Untereinheit von 110 kD und kleineren regulatorischen Untereinheiten p85α, p85β, p50α, p55α, p50γ bestehen. Die p85α-Untereinheit besitzt zwei SH2-Domänen, die beide mit ähnlicher Bindungsspezifität für tyrosinphosphorylierte Proteine ausgestattet sind [SONGYANG et al., 1993]. Eine entsprechende Sequenz schließt sich direkt an den C-terminalen Tyrosinrest des ersten NPXY-Motivs von SHIP-1 an (NPXpYIGM). Experimente mit dem GST-p85-SH2-Fusionsprotein haben gezeigt, dass diese Domäne die komplett tyrosinphosphorylierte SHIP-1-Isoform p145 bindet, jedoch nicht die p135 SHIP-Isoform [GUPTA et al., 1999; LUCAS AND ROHRSCHEIDER et al., 1999]. Die Bildung eines solchen SHIP-1/p85/PI3K-Komplexes könnte für die Regulation von Proteinen von Bedeutung sein, die durch die Bildung von PtdIns(3,4)P₂ aus PtdIns(4,5)P₂ reguliert werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die PI3K durch die Bindung an SHIP-1 aus der Interaktion mit

einem aktivierten Rezeptor gelöst und dadurch inaktiviert wird. Dies könnte eine weitere Form der negativen Regulation der PI3K durch SHIP-1 darstellen.

2.6. Funktionen von SHIP-1

SHIP-1 spielt eine wichtige Rolle als negativer Regulator von Proliferationssignalen und einer Vielzahl von Wachstumsfaktorrezeptorsystemen. Dies konnte durch Überexpressionsstudien an myeloischen Zelllinien nachgewiesen werden, weil es hierbei einer gesteigerten Apoptose und zur Hemmung des Zellwachstums kommt [LIOUBIN et al., 1996; LIU et al., 1997b]. Da sich die Mechanismen in den einzelnen hämatopoetischen Zellen unterscheiden, werden hier die wichtigsten beschrieben:

2.6.1. B-Lymphozyten

Werden die B-Lymphozyten durch die Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor (BCR) zur Proliferation angeregt, wird der cytoplasmatische Teil des BCR in einem so genannten ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*) tyrosinphosphoryliert [KUROSAKI 1999]. Dadurch kommt es zur Aktivierung der PI3K, die dann PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ umsetzt. Die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) der Tyrosinkinase Btk bindet an PtdIns(3,4,5)P₃ mit hoher Affinität und dadurch wird dann die Phospholipase C_γ tyrosinphosphoryliert und aktiviert, was zur Freisetzung von Diacylglycerol und Ins(1,4,5)P₃ führt [FUKUDA et al., 1996; SALIM et al., 1996]. Die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ an den Rezeptor des Endoplasmatischen Reticulums (ER) führt dazu, dass es zu einer Calciumfreisetzung aus dem Lumen des ER in das Cytoplasma kommt [FLUCKIGER et al., 1998]. Dies führt zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle, was zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung der B-Zelle in eine Plasmazelle führt, die dann Antikörper produziert [ONO et al., 1997]. Wurden von der Zelle genügend Antikörper produziert, um das Antigen zu neutralisieren, so wird das Proliferationssignal durch den Fc_γ-Rezeptor abgeschaltet [MUTA et al., 1994; DAERON et al., 1995]. Dieser bindet an das Fc-Fragment von Antikörpern, die ebenfalls das von dem BCR gebundene Antigen erkennen. Diese Quervernetzung des BCR mit dem Fc_γ-Rezeptor über den Antigen/Antikörper-Komplex führt zur Phosphorylierung eines ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) [UNKELESS UND JIN 1997] genannten Bereiches im cytoplasmatischen Teil des Fc_γ-Rezeptors,

an den die SH2-Domäne von SHIP bindet [ONO et al., 1996]. Es konnte weiter gezeigt werden, dass SHIP-1 an phosphorylierte Proteine bindet und mit besonders hoher Affinität an den Fc γ -Rezeptor. Die Fc γ RIIa vermittelte Phagozytose wird durch die Überexpression von dominant-negativen Formen von SHIP-1 stark erhöht. Dies zeigt, dass SHIP-1 die Fc γ R-vermittelte Phagozytose negativ reguliert [NAKAMURA et al. 2002].

2.6.2 Mastzellen

Die Mastzellen bilden die erste Verteidigungslinie gegen einen eindringenden Organismus oder Allergene. Sie besitzen cytoplasmatische Granula mit einer Mischung verschiedener Moleküle, zu denen auch Histamin gehört. Dadurch werden die lokalen Blutgefäße und das umgebende Gewebe durchlässiger, was zu einem schnellen Zufluss von Zellen aus dem Blut führt. Die Mastzellen werden zur Freisetzung ihrer Granula durch Antikörper veranlasst, die mit ihrem Fc-Teil an den Igel-spezifischen Rezeptor, den sogenannten Fc ϵ RI, binden. Die Fc-Rezeptoren assoziieren auf der Oberfläche der Mastzelle mit monomeren IgE-Antikörpern, die eine sehr hohe Affinität besitzen. Die Mastzellaktivierung entsteht dann, wenn gebundenes IgE durch die Anlagerung an multivalente Antigene quervernetzt wird. Der aktivierte Fc ϵ -Rezeptor führt zu einem starken Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum, wodurch es zu einer Degranulierung der Mastzelle kommt [HUBER et al., 1998]. Das Signal wird durch die Rekrutierung von SHIP-1 abgeschaltet, wobei wahrscheinlich eine dem Fc γ -Rezeptor ähnliche Signalkaskade ausgelöst wird. Dies führt folglich dazu, dass SHIP-1 die Mastzellaktivierung unterdrückt [OSBORNE et al., 1996; KIMURA et al., 1998; KALESNIKOFF et al., 2002].

Es wurde noch ein anderer Mechanismus der negativen Regulation durch SHIP-1 bei Mastzellen beschrieben. Eine Stimulierung der Mastzellen mit Interleukin-3 (IL-3) oder GM-CSF aktiviert die PI3K, wodurch dann PtdIns(3,4,5)P₃ entsteht. PtdIns(3,4,5)P₃ bindet an die PH-Domäne von PKB/Akt und PDK-1. Bei PDK-1 handelt es sich um eine Proteinkinase, die PKB/Akt an dem Threoninrest 308 phosphoryliert und damit zu dessen Aktivierung beiträgt. Eine Phosphorylierung von PKB/Akt an dem Serinrest 473 ist für dessen vollständige Aktivierung notwendig und führt dazu, dass phosphoryliertes PKB/Akt ein antiapoptotisches- und proliferationsförderndes Signal an die Zelle weiterleitet [HEMMINGS 1997].

Man hat bei der SHIP-1-*knockout*-Maus festgestellt, dass ihre Mastzellen eine höhere Aktivität von PKB/Akt aufweisen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nach Stimulation mit Zytokinen eine erhöhte PtdIns(3,4,5)P₃-Konzentration vorhanden ist. Deshalb

nimmt man an, dass die basale PtdIns(3,4,5)P₃-Konzentration durch die Phosphatidylinositol-3-Phosphatase PTEN und der durch Wachstumsfaktoren erhöhte Anteil dieses Phospholipids durch SHIP reguliert wird [MYERS et al., 1997].

2.6.3. Leukämogenese

SHIP-1 wird in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert, auch in den CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark [GEIER et al., 1997; LIU et al., 1998; HORN et al., 2001]. Bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) sind 90% der Patienten das so genannte Philadelphia-Chromosom positiv. Dies entsteht durch eine reverse Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 21. Sattler und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine reduzierte Expression von SHIP-1 in CML-Zellen von Patienten, die für das Philadelphia-Chromosom positiv getestet sind, durch BCR-ABL entsteht [SATTLETER et al., 1999]. Es konnte bei einer akuten myeloischen Leukämie (AML) eine dominant-negative Mutation von SHIP-1 gefunden werden. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine somatische Mutation am Codon 684, bei dem Valin durch Glutamat ausgetauscht wurde. Diese Mutation liegt in dem zweiten Signaturmotiv, welches Phosphataseaktivität besitzt. Durch diese Mutation konnte eine reduzierte katalytische Aktivität von SHIP-1 festgestellt werden [LUO et al., 2003]. Weitere Mutationsanalysen ergaben, dass bei Patienten mit AML 22% (7/32) eine SHIP-1-Mutation aufweisen und dass bei 12% (1/9) der Patienten mit akuten lymphatischen Leukämien (ALL) ebenfalls eine SHIP-1 Mutation nachgewiesen werden konnte [LUO et al., 2004].

2.7. Zelluläre Lokalisation von SHIP-1

SHIP-1 ist in NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und in B-Lymphozyten im Cytoplasma lokalisiert [GALANDRINI et al., 2002; PHEE et al., 2001]. Petrie und seine Mitarbeiter haben festgestellt, dass SHIP-1 an die Plasmamembran rekrutiert werden kann. Sie haben ferner gezeigt, dass SHIP-1 eine wichtige Rolle bei der Regulierung des BCR (B-Zell-Rezeptor) spielt. Vor der BCR-Stimulation trat SHIP-1 nur in geringen Konzentrationen in so genannten *lipid rafts* (*membrane microdomains*) auf, während nach der Stimulation eine deutlich höhere Konzentration festzustellen war. *lipid rafts* sind so genannte Membranmikrodomänen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Sie bestehen aus einem

speziellen Lipid/Cholesterin-Gemisch. In Epithelzellen findet man so genannte „GPI-AP“, dabei handelt es sich um Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine, die mit der Zellmembran assoziiert sind. Diese GPI-APs sind resistent gegen eine Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien. Die *lipid rafts* bestehen aus Glycosphingolipiden, freiem Cholesterin und gesättigten Phospholipiden [HARDER UND SIMONS 1997]. In den *lipid rafts* findet man verschiedene Proteine, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, heterotrimere G-Proteine, sowie Ick, ZAP70 (*ζ-chain-associated protein kinase of 70 kD*) und das Adapterprotein LAT (*linker for activation of T cells*). Die Größe der *lipid rafts* beträgt 70nm bis 370nm und da diese mikroskopisch nicht sichtbar sind, müssen die *lipid rafts* akkumuliert werden, indem sie durch einen Antikörper kreuzvernetzt werden. Es wird vermutet, dass SHIP-1 tyrosinphosphoryliert sein muss, damit es zu einer SHIP-1-Relokalisation kommt. Wie der genaue Mechanismus der SHIP-1-Relokalisation abläuft, ist noch unbekannt. Petrie und seine Mitarbeiter haben außerdem festgestellt, dass neben SHIP-1 auch die PI3K in diesen *lipid rafts* zu finden ist. Wie SHIP-1 wurde auch PI3K vor der Stimulation des BCRs nur in geringen Konzentrationen in den *lipid rafts* gefunden. Nach Stimulation war auch hier ein Anstieg zu erkennen. Dies zeigt also, dass eine BCR-Stimulierung zu einer Plasmamembranrelokation von SHIP-1 führt [PETRIE et al., 2000].

Aman und seine Mitarbeiter haben postuliert, dass sich SHIP-1 in die *lipid rafts* nach BCR- und FcγRIIB-Quervernetzung verlagert. Die FcγRIIB-abhängige Hemmung der BCR-Signaltransduktion benötigt den Komplex von FcγRIIB/SHIP-1. Einzeln findet man weder SHIP-1 noch FcγRIIB in den *lipid rafts*. Erst nach der Verbindung von BCR und FcγRIIB findet eine Verlagerung in die *lipid rafts* statt. Wichtig dazu ist eine Bindung von SHIP an den tyrosinphosphorylierten FcγRIIB, der SHIP-1 ermöglicht, vom Zytosol an die Plasmamembran zu gelangen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Coligation von BCR und FcγRIIB zu einer höheren Konzentration von SHIP-1 in den *lipid rafts* führt [AMAN et al., 2001].

Galandrini und ihre Mitarbeiter konnten zeigen, dass SHIP-1 in NK-Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach CD16-Stimulation konnte SHIP-1 in den so genannten *lipid rafts* nachgewiesen werden [GALANDRINI et al., 2002].

2.8. Die SHIP-1-*knockout*-Maus

Die SHIP-1-*knockout*-Maus ist lebensfähig und zeugungsfähig, besitzt aber eine verkürzte Lebenszeit [HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999]. Man findet bei ihr im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine enorm vergrößerte Milz und vergrößerte Lymphknoten. Der Unterschied der Milzgröße wird schon nach vierwöchiger Lebenszeit sichtbar. Sie nimmt nach sechs bis acht Wochen um das Vierfache zu, nach zehn Wochen um das Achtfache und nach 16 Wochen um mehr als das Zehnfache. Außerdem findet man eine erhöhte Anzahl von Vorläuferzellen der Granulozyten, Makrophagen und Monozyten im Knochenmark, in der Milz und in den Lymphknoten. Durch Infiltration der myeloischen Zellen in die Lunge ist nach 14 Wochen nur noch eine Überlebensrate von 40% zu beobachten. Diese erhöhte Zahl der Vorläuferzellen ist auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Wachstumsfaktoren GM-CSF (*granulocyte/makrophage colony stimulated factor*) und IL-3 (Interleukin-3) zurückzuführen. Dies führt dazu, dass die lymphoiden und erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark stark vermindert sind. Daraus kann man schließen, dass SHIP-1 ein negativer Regulator der GM-CSF- und IL-3-vermittelten Signaltransduktion ist [HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999].

Bei neueren Untersuchungen hat man aber auch festgestellt, dass bei der SHIP-1-*knockout*-Maus noch weitere Probleme auftreten. Osteoklasten entstehen aus mononukleären Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie, wofür M-CSF und RANKL (*receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) sind notwendig, damit aus diesen Vorläuferzellen Osteoklasten entstehen. Die intrazellulären Signale, welche die Osteoklasten-Vorläufer zur Differenzierung und zum Wachstum anregen, benötigen die Aktivierung der PI3K entweder durch M-CSF oder RANKL. Die Fähigkeit von SHIP-1 PtdIns(3,4,5)P₃ zu dephosphorylieren lässt vermuten, dass die Inositol-5-Phosphatase die Osteoklastenrekritierung und -funktion inhibieren könnte. Nach einigen Untersuchungen hat man festgestellt, dass die Tibia der SHIP-1-*knockout*-Maus weniger Calcium enthält und eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten aufweist. Dies deutet daraufhin, dass SHIP-1 auch ein negativer Regulator der Osteoklasten ist und wahrscheinlich die Osteoklasten-Vorläuferzellen in der SHIP-1-*knockout*-Maus eine höhere Sensitivität gegenüber RANKL und M-CSF besitzen. Wenn kein SHIP-1 vorhanden ist, kommt es daher zu einem erhöhten Abbau der Knochensubstanz, der Osteoporose zur Folge hat [TAKESHITA et al., 2002].

Dieser Phänotyp der SHIP-1-*knockout*-Maus ähnelt dem Phänotyp von Mäusen, die nach einer Überexpression von GM-CSF oder IL-3 in hämatopoetischen Zellen ebenfalls ein

myeloproliferatives Syndrom entwickeln [CHANG et al., 1989; JOHNSON et al., 1989]. Diese Fehlregulation der Proliferation der Granulozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen könnte ein transformierendes Ereignis darstellen, das nach weiteren Mutationen zur Manifestation einer myeloischen Leukämie führt. Ähnliche Vorgänge findet man auch bei der Chronischen myeloischen Leukämie (CML), bei der das transformierende Ereignis das Onkogen *bcr/abl* ist. Hierbei wird durch die Kinaseaktivität von ABL die Expression von SHIP-1 unterdrückt und dessen proteolytischer Abbau beschleunigt [SATTLER et al., 1999].

Des Weiteren konnte bei der SHIP-1-*knockout*-Maus eine große Anzahl von hämatopoetischen Störungen nachgewiesen werden, die eine verstärkte Cytokinantwort zur Folge hatte. Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Expansion der primitiven hämatopoetischen Zellen. Helgason und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass SHIP-1 eine wichtige Rolle bei der Regeneration von hämatopoetischen Stammzellen spielt. Sie konnten zeigen, dass SHIP-1 für die negative Cytokinregulation in der frühen Stadien der Hämatopoese und für das Gleichgewicht der hämatopoetischen Zellen wichtig ist [HELGASON et al., 2003].

Bei weiteren Untersuchungen an der SHIP-1-*knockout*-Maus konnten Nakamura und seine Mitarbeiter zeigen, dass bei einem Fehlen von SHIP-1 die frühen lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark signifikant erniedrigt sind und gleichzeitig eine deutliche Vermehrung der myeloischen Zellen zu finden ist. Dies ist von den unterschiedlichen IL-6-Konzentrationen abhängig. Weiter konnte gezeigt werden, dass IL-6 auf die hämatopoetischen Vorläuferzellen wirkt, in dem es direkt die frühen lymphoiden Vorläuferzellen hemmt [NAKAMURA et al., 2004; MAEDA et al., 2005].

Bei neuesten Untersuchungen der SHIP-1-*knockout*-Maus wurden dendritische Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die dendritischen Zellen beim Fehlen von SHIP-1 vermehrt vorkommen und einen anderen Phänotyp zeigen als die dendritischen Zellen, denen kein SHIP-1 fehlt. Sie weisen ferner eine erhöhte Anzahl an Vorläuferzellen auf und zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zytokinen. Hier spielt IL-6 eine wichtige Rolle. Das Fehlen von IL-6 hat einen Einfluss auf den Phänotyp und die Funktion der myeloischen dendritischen Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die myeloiden und plasmatischen dendritischen Vorläuferzellen eine unterschiedliche Sensitivität auf die Signalwege haben, in die SHIP-1 involviert ist [NIELL et al., 2007]

2.9. Leukämien

Bei den Leukämien handelt es sich um eine maligne Erkrankung der Zellen des hämatopoetischen Systems. Die Erkrankung beginnt schleichend, da es zuerst nur zu einer verstärkten Proliferation kommt, die dann zu einer Expansion des malignen Zellklons führt. Dabei kann es zu einer Ausbreitung in extramedulläre Organe bzw. Gewebe und der Ausschwemmung leukämischer Zellen in das periphere Blut kommen.

Die Leukämien werden in zwei Gruppen eingeteilt, in die chronische und die akute Leukämie. Die akuten Leukämien zeichnen sich durch einen Block in der Differenzierung aus, wobei man hauptsächlich Blasten-Vorstufen findet. Im Gegensatz dazu können in der chronischen Leukämie die Leukämiezellen meistens noch ausdifferenzieren, so dass eine erhöhte Zahl an reifen Blutzellen auftritt.

2.9.1. Chronische myeloische Leukämie und weitere myeloproliferative Syndrome

Unter dem Begriff des myeloproliferativen Syndroms versteht man eine Gruppe von Erkrankungen die ähnliche Symptome aufweisen. Dazu gehören die Polycythaemia vera, Osteomyelofibrose, essentielle Thrombozythämie und die chronische Erythroleukämie.

Chronische Myeloische Leukämie:

Die chronische myeloische Leukämie ist gekennzeichnet durch eine abnorm gesteigerte Proliferation der granulopoetischen Reihe, eine myeloische Metaplasie der fetalen Blutbildungsorgane Milz und Leber sowie einer starken Vermehrung der Leukozytenzahl im peripheren Blut mit Ausschwemmung aller Reifungsstufen der Granulozytopoese. Als charakteristischer Befund findet sich bei der zytogenetischen Untersuchung in 90% der Patienten das Philadelphia-Chromosom, eine Chromosomentranslokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 (t9;22), woraus das Onkogen bcr/abl resultiert. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten erfolgt nach einer mehrjährigen chronischen Phase eine Transformation der Erkrankung in eine akute Phase, den meist terminalen Blastenschub [JORGENSEN UND HOLYOAKE 2001; EAVES et al., 2003].

Polycythaemia vera (PCV):

Die Polycythaemia vera ist eine maligne, neoplastische Erkrankung, die durch ätiologisch nicht geklärte Vermehrung der Erythrozyten und des Hämoglobins, meistens auch

der Leukozyten und Thrombozyten charakterisiert ist. Ebenfalls typisch für diese Erkrankung ist die erhöhte Anzahl an eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Osteomyelofibrose (OMF):

Die wichtigsten Symptome der Osteomyelofibrose sind eine zunehmende Fibrosierung bzw. Sklerosierung des blutbildenden Knochenmarks und eine, infolge der metaplastischen Verlagerung der Blutbildung in Milz und Leber, manchmal gigantische Vergrößerung dieser Organe. Sie weist ferner charakteristische Veränderung des Blutbildes auf. Es handelt sich hierbei um eine „Linksverschiebung“ der Granulozyten, d.h. es werden sehr viele jugendliche Formen in das Blut ausgeschwemmt.

Essentielle Thrombozythämie:

Die essentielle Thrombozythämie ist eine chronische, klonale Erkrankung einer pluripotenten hämatopoetischer Stammzelle. Charakteristisch ist eine konstante, oft über Jahre nachweisbare Vermehrung der Blutplättchen ohne signifikante Leukozytose. Gleichzeitig liegt eine verstärkte Blutungsneigung an den Schleimhäuten vor, deren Ursache unbekannt ist.

Chronische Erythroleukämie:

Bei dieser Erkrankung finden sich außer den jungen Vorstufen der Granulopoese im Differentialblutbild auch konstant kernhaltige Vorstufen der Erythropoese. Der Unterschied zur CML liegt darin, dass nicht nur die Granulopoese, sondern auch die Erythropoese betroffen ist.

Juvenile myelomonozytäre Leukämie:

Die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) ist eine seltene klonale myeloproliferative Erkrankung der hämatopoetischen Stammzellen, die sich in den ersten Lebensjahren manifestiert. Es konnten einige chromosomale Auffälligkeiten festgestellt werden. Bei 20% der Patienten wurde eine Mutation in Chromosom 7 festgestellt, 15% der Patienten weisen eine Mutation im Ras-Weg auf, während es aber auch Patienten gibt, die eine Mutation im NF-1-Gen aufweisen. NF-1 ist ein Tumorsuppressorgen, das den Ras-Signalweg negativ reguliert. Dabei handelt es um Neurofibromatosis Typ-1, das für ein Ras-GTPase aktivierendes Protein kodiert, welches in den GM-CSF-Signalweg involviert ist. Es können aber auch Mutationen in PTPN11 vorliegen. PTPN11 kodiert für SHP2, eine nicht tyrosinphosphorylierte Tyrosinphosphatase. Diese vermittelt das Signal für aktivierte

Wachstumsfaktoren zu dem Ras-Weg. Eine Mutation im SHP2-Protein lässt vermuten, dass das myeloische Wachstum durch Ras dereguliert wird. Alle JMML-Patienten haben eine Hypersensitivität gegenüber GM-CSF. Man vermutet, dass sich die JMML aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle entwickelt, aber die molekularen Veränderungen sind denen der adulten myeloproliferativen Erkrankungen ähnlich. Die klinischen Symptome sind: Fieber, Husten, Infektionen, Unwohlsein, Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Ausschlag, Blutungen und Unterentwicklung. Das Blutbild zeigt eine Monozytosis, Anämie, Thrombozythopenie und eine Hypergammaglobulinämie. Es handelt sich hierbei um eine progressive Krankheit, die sehr häufig innerhalb von kurzer Zeit zum Tode führt. Für die Heilung der JMML kommt nur eine Knochenmarktransplantation in Frage. Alle anderen herkömmlichen Therapien zeigen keine Heilung. Bei nicht verwandten Spendern kommt es sehr häufig zu einem Rückfall. Die Heilungschancen der JMML nach Knochenmarktransplantation sind abhängig vom Alter der Kinder. Bei Kindern unter 2 Jahren gibt es eine Heilungschance von 80%, bei Zwei- bis Vierjährigen liegt sie bei 50% und bei Kindern über vier Jahren bei 16% [NATHAN UND OSKIS 2003; TARTAGLIA et al., 2003; LOH et al., 2004].

2.9.2. Akute Myeloische Leukämie (AML)

Akute Leukämien sind maligne monoklonale Erkrankungen der hämatopoetischen Zellen. Sie sind gekennzeichnet durch die Expansion eines malignen Zellklons auf Kosten der normalen Hämatopoese mit einem Block in der Differenzierung und einer autonomen Proliferation, die unabhängig von physiologischen Regulationsfaktoren ist. Durch die massive Beeinträchtigung der Hämatopoese kommt es zu einer Knochenmarkinsuffizienz, was dazu führt, dass der Organismus anfällig für Infektionen ist. Dies ist auch der Grund, dafür, dass die akute myeloische Leukämie innerhalb weniger Monate unbehandelt zum Tode führt. Die akuten myeloischen Leukämien werden aufgrund zytomorphologischer Charakteristika in mehrere Unterklassen (FAB: *French American British Cooperation Group*) eingeteilt.

M0: akute myeloische Leukämie mit minimaler myeloische Differenzierung, es können CD34⁺-Zellen und CD33 Zellen im Blut vorkommen.

M1: Myeloblastische Leukämie ohne weitere Reifungstendenz. Die Patienten dieses Subtyps können CD33-Zellen im Blut nachweisen werden. Sie haben auf jeden Fall CD34⁺-Zellen im Blut

- M2: Myeloblastische Leukämie mit Ausreifung, wobei mehr als 10% der Zellen Promyelozyten und reife Formen sind. Bei diesen Patienten können CD33-Zellen im Blut vorhanden sein. CD34⁺-Zellen findet man auf jeden Fall im Blut der Patienten.
- M3: Hypergranuläre promyelozytäre Leukämie mit atypischen Promyelozyten. Bei diesen Patienten findet man im Blut CD33⁺-Zellen, während kaum CD34⁺-Zellen im Blut zu nachweisbar sind.
- M4: Myelomonozytäre Leukämie mit granulozytärer und monozytärer Differenzierung der Zellen. Monozyten und Promonozyten machen mehr als 20% der Zellen im Knochenmark aus. Bei diesen Patienten kann man im Blut CD33-Zellen finden, CD34⁺-Zellen sind nachweisbar, müssen aber nicht vorhanden sein.
- M4_{Eo}: myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie. Es können CD33- und CD34-Zellen im Blut nachweisbar sein.
- M5: Monozytenleukämie mit entweder wenig differenzierter monoblastischer oder weiter differenzierter monozytischer Variante. Bei dieser Leukämieart wird zusätzlich zwischen einer Monoblastenleukämie (M5a) und einer Monozytenleukämie (M5b) unterschieden. Bei diesen Patienten können CD34⁺ Zellen im Blut nachweisbar sein. Dagegen sind auf jeden Fall CD33-Zellen im Blut nachweisbar.
- M6: Erythroleukämie. Mehr als 50% Erythroblasten im Knochenmark. Bizarre Morphologie mit dyserythropoetischen und megaloblastären Veränderungen. Variabler Anteil an Myeloblasten und Myelozyten. Bei diesen Patienten sollten wenig CD34⁺-Zellen nachweisbar sein. Es können CD33-Zellen nachweisbar sein, müssen es aber nicht.
- M7: Megakaryoblastenleukämie. Erhöhte Zahl unreifer Vorläufer der Thrombopoese im Knochenmark mit z.T. abnormer Morphologie. Die Patienten mit diesem Subtyp können im Blut CD33-Zellen aufweisen oder auch nicht. Dagegen findet man bei diesen Patienten keine CD34⁺-Zellen im Blut [BEGEMANN, 2004].

2.10. Projektbeschreibung

Die Inositol-5-Phosphatase SHIP-1 ist ein negativer Regulator von mehreren Signaltransduktionsprozessen. Die Expression von SHIP-1 wurde in allen bisher untersuchten Zellen des blutbildenden Systems nachgewiesen. Aufgrund des beschriebenen Phänotyps der SHIP-1-*knockout*-Maus, die eine myeloproliferative Erkrankung entwickelt, sollte in dieser Arbeit die Funktion von SHIP-1 für das Wachstum primärer myeloischer Leukämiezellen

untersucht werden. Hierzu sollte ein retroviraler Vektor SF91iG pre, in den SHIP-1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) eingefügt werden sollte, verwendet werden. Ein weiterer Vektor, der verwendet werden sollte, ist der lentivirale Vektor pRRL.sinh.CMV.GFP.pre, in den ebenfalls SHIP-1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) eingebaut werden sollte. Es sollten dann jeweils Virusüberstände des Vektors, des Vektors und SHIP-1 sowie dem Vektor und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 hergestellt werden. Nach der Aufreinigung von CD34⁺-Zellen aus Proben von gesunden Spendern und Leukämiepatienten sollten die Zellen für 48 Std. in einem Serum-freiem Medium mit Zytokinen kultiviert werden. Die Zytokine, die verwendet werden sollten, sind der humane Stammzellefaktor (hSCF), Thrombopoetin (TPO), Interleukin-6 (IL-6) und FLT-3-Ligand (*fms-like-tyrosine-kinase 3-ligand*). Nach dieser Inkubationszeit sollten die CD34⁺-Zellen mehrmals mit dem Virusüberstand transfiziert werden. Die transfizierten Zellen sollen dann am Sorter nach EGFP⁺ und EGFP⁻ sortiert werden. Die sortierten Zellen sollten dann in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Methylcellulose oder in Serum-freiem Medium mit jeweils 10ng/ml GM-CSF kultiviert werden. Die Flüssigkultur sollte nach 10 Tagen ausgezählt werden und nach 14 Tagen sollten die Kolonien, die in Methylcellulose wachsen, ausgezählt werden. Dies sollte mit verschiedenen Leukämien und mehreren gesunden Spendern durchgeführt werden. Die ausgezählten Zellen und Kolonien sollen dann statistisch ausgewertet werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Chemikalien

Soweit es nicht anders angegeben wird, wurden die Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Merck-Eurolab (Darmstadt) verwendet. Die Zusätze für die Bakterienmedien wie Bacto-Tryptone und Hefe-Extrakt stammten von der Firma Difco (Detroit, USA). Die Materialien für die Zellkultur, wie fötales Kälberserum und verschiedene Medienzusätze, wurden von GibcoBRL (Eggenstein) gekauft.

3.1.2. Puffer und Stammlösungen

1x PBS pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄
10x TBS	1,4 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,0
NP-40-Lysepuffer	50 mM HEPES pH 7,5 150 mM NaCl 1% NP40 2% Trasylol [®] 2 mM EDTA 50 mM NaF 10 mM Na-Pyrophosphat 10% Glycerin 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF

10%TCA	TCA Aceton 20 mM DTT
1x TAE	40 mM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
TE pH 7,5	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0
Für CD34 ⁺ -Aufreinigung: „Recommended Medium“	PBS 2% FCS 1 mM EDTA

3.1.3. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den Experimenten verwendet:

(In Klammern ist jeweils die Verdünnung angegeben, in welcher der Antikörper in der Westernblotanalyse eingesetzt wurde, angegeben.)

1. Primäre Antikörper:

- CD33-PE (Dianova, Bestellnr: CD34PE581); dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen humanes CD33 gerichtet und mit PE gekoppelt ist (Dianova).
- CD34-PE (Dianova, Bestellnr: CD33PEHIM3-4); dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen humanes CD34 gerichtet und mit PE gekoppelt ist (Dianova).
- Kontrollantikörper (Becton and Dickinson, 1:3000, BestellNr. 554721) der Subklasse IgG₁. Es handelt sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper.
- GAPDH (1:3000, Santa Cruz Technologie, sc32233); dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) gerichtet ist. Der Antikörper wurde aus Kaninchenmuskel aufgereinigt.

- p-AKT (Cell Signaling, BestellNr: 4058); hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen AKT gerichtet ist, das am Serinrest 473 phosphoryliert ist.
- p-AKT-Alexa-Fluor 647 (Cell Signaling, Bestellnr: 2337); hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen AKT gerichtet ist, das am dem Serinrest 473 phosphoryliert ist. Dieser Antikörper ist direkt mit Alexa-Fluor 647gekoppelt.
- Kontrollantikörper (Santa Cruz Technologie, sc3846) monoklonaler Kaninchen-Antikörper mit APC direkt gekoppelt.
- SHIP P1C1 (1:500, Santa Cruz Technologie, sc8425); hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper der Subklasse IgG₁, der gegen ein rekombinantes Protein gerichtet ist, das mit den AS 866 bis1020 am C-terminalen Ende von SHIP-1 der Maus übereinstimmt

2. Sekundäre Antikörper:

- Ziege-anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* HRP), gegen humanes und murines Serum präadsorbiert (Santa Cruz Technologie, sc2004).
- Ziege-anti-Maus-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* HRP), gegen humanes und murines Serum präadsorbiert (Santa Cruz Technologie, sc2060).
- Kaninchen-anti-Ziege-IgG mit Meerrettichperoxidase gekoppelt (HRP), gegen humanes und murines Serum präadsorbiert (Santa Cruz Technologie, sc2768).
- AlexaFluor488 (Mobytec, Bestellnr. A11001); Affinitätschromatographisch aufgereinigtes Ziegenserum gegen Maus-Ig, gekoppelt an einen fluoreszierenden Farbstoff AlexaFluor488.

3.1.4. Enzyme und Reaktionskits

Die zur Restriktion von Plasmid- und genomischer DNA benutzten Enzyme wurden sowohl von Roche Diagnostics (Mannheim) als auch von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen. Von MBI Fermentas stammte ferner die zur Dephosphorylierung von Vektorenden eingesetzte alkalische Phosphatase.

3.1.5. Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifikation von Plasmiden wurde in erster Linie der *E.coli*-Stamm DH10B verwendet.

3.1.6. Zellen

3.1.6.1. Zelllinien

Die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 wurde von einem 35jährigen Patienten aus der Biopsie eines Fibrosarkoms etabliert [RASHEED et al. 1974]. Der Jurkat SHIP#51 Klon wurde von S. Horn aus einer Jurkat-T-Zelllinie, die von einer T-Zell-Leukämie stammt, etabliert, die bereits einen Transaktivator besitzt (Jurkat-Tet-On). Durch die Zugabe von Doxycyclin kommt es zur Induktion der Expression von SHIP-1. Dieses als „Tet-On“ bezeichnete System benutzt einen reversen Transaktivator, welcher in der verwendeten Zelllinie stabil exprimiert wird. Nur in Gegenwart von Doxycyclin bindet er an ein Tetracyclin-responsives Element in einem Promotor. In den 3'-LTR wurde ein Tetracyclin-Response-Element (TRE) kloniert, das nach Transduktion der Zielzellen und Integration des retroviralen Genoms in dem 5'-LTR liegt und eine Doxycyclin-induzierbare SHIP-Expression ermöglicht.

Die 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die durch den Adenovirus E1A transformiert wurde. Eine besondere Form der 293-Zelllinie, die man als 293T-Zellen bezeichnet, das eine vom SV40-Virus abgeleitete, große T-Antigen, das eine episomale Replikation des Plasmids erlaubt. Diese 293T-Zellen exprimieren das von dem SV40 abgeleitete große T-Antigen, das eine episomale Replikation des Plasmids erlaubt. Diese 293T-Zellen verwendet man zur Produktion von lentiviralen Virusüberständen. Bei der Produktion von retroviralen Überstände wurde eine 293-gp-Zelllinie verwendet, die zusätzlich ein gagpol-Element besitzt und auch als Phönix-gp bezeichnet wird [MULLIGAN et al., 1993].

3.1.6.2. Primäre Zellen

Das Spektrum an humanen Leukämien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, umfasste Juvenile myelomonozytäre Leukämien (JMML) und akute myeloische Leukämien (AML) sowie ein myeloproliferatives Syndrom (MPS), insbesondere eine Osteomyelofibrose (OMF). Die Blutproben von Leukämiepatienten bzw. von gesunden Spendern wurden mir freundlicherweise von Prof. W. Fiedler von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie

des Universitäts-Klinikums Eppendorf, von Dr. M. Horstmann von der Abteilung für pädiatrische Onkologie des Universitäts-Klinikums Eppendorf, von Dr. G. Ortmeier von der Abteilung für Gynäkologie und Frauenheilkunde des Universitäts-Klinikums Eppendorf und von Prof. Gramatzki von der Medizinischen Klinik III des Universitäts-Klinikums Erlangen zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus den Blutproben gewonnen (s. 3.2.8.7.).

Tab.1 Liste der analysierten Patientenproben und deren Einteilung. Nabelschnurblut wurden mehrere Proben untersucht. Die Probennummern entsprechen den Beschriftungen der einzelnen Versuchsdiagramme bzw. den im Western Blot analysierten Daten. Alter: Gibt das Alter der Patienten bei Blutabnahme an. ?: Daten unbekannt. Bei den JMML-Patienten konnte bei der ersten Patientin eine Mutation in dem Gen PTPN11 detektiert werden und beim zweiten JMML-Patienten eine Mutation in KRAS2 (Untersuchungen von Dr. Horstmann, pädiatrische Onkologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Nr.	Bez.	Alter	Diagnose	Typisierung	Bemerkung
1	?	?			Nabelschnurblut, unterschiedliche Spender
2	jno	2	JMML		Mut. in PTPN11
3	lta	4	JMML		Mut. in KRAS2
4	7623	65	AML	M5	
5	7622	34	AML	M4	
6	6986	33	AML	M4	
7	7191	62	AML	M2	
8	7202	41	AML	M2	
9	7133	64	AML	M1	
10	6797	57	AML	M2	
11	6874	63	AML	M3	
12	6983	2 Monate	ML	M4	
13	jrh	68	AML	?	
14	gho	66	AML	?	
15	pst	?	AML	?	
16	?	?	MPS	OMF	Blastenkrise

3.1.7. Nukleinsäuren

3.1.7.1. Vektoren

- SF91iGpre: Bei diesem Vektor handelt es sich um einen retroviralen Vektor. Dieser Vektor besitzt eine IRES (*internal ribosome entry site*), EGFP und ein PRE (posttranskriptionelles regulatorisches Element). Dieses PRE erhöht den Transport der RNA aus dem Kern in das Zytoplasma. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Translation und somit zu einer erhöhten Expression. Über eine NotI-Restriktionsschnittstelle wurde sowohl SHIP-1 als auch die enzymatisch inaktive Form von SHIP (D672A) in den Vektor eingefügt. SHIP-1 oder die enzymatisch inaktive Form von SHIP wurden somit jeweils vor die IRES eingebaut. Nach der IRES befinden sich das EGFP und dann das PRE. Die IRES hat die Funktion eine von der 5'-Cap-Struktur und dem Cap-Bindungskomplex unabhängige Translation der eukaryotischen mRNA zu ermöglichen.

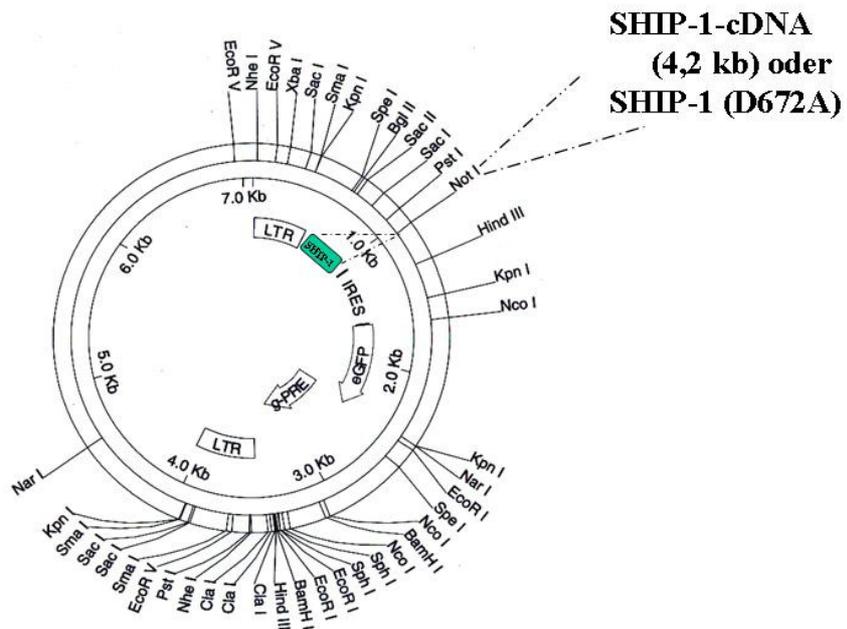


Abb. 4: Retroviraler Vektor SF91iGpre

Der retrovirale Vektor besitzt ein LTR: *long terminal repeat*, eGFP: *enhanced green fluorescence protein*; IRES: *Internal Ribosome entry site*

- pRRL.sinh.CMV.GFP.pre: Bei diesem Vektor handelt es sich um einen lentiviralen Vektor, der ein selbst inaktivierender Vektor ist. Der Vektor enthält eine deletierte U3-Region am 3'-Ende, so dass nach der Infektion der Zelle kein weiterer Virus mehr produziert werden kann. Der Vektor besitzt außerdem ein Ampicillinresistenzgen

sowie EGFP. Das SHIP-1 oder die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 wurden zwischen AgeI und BsrGI in den Vektor eingeführt.

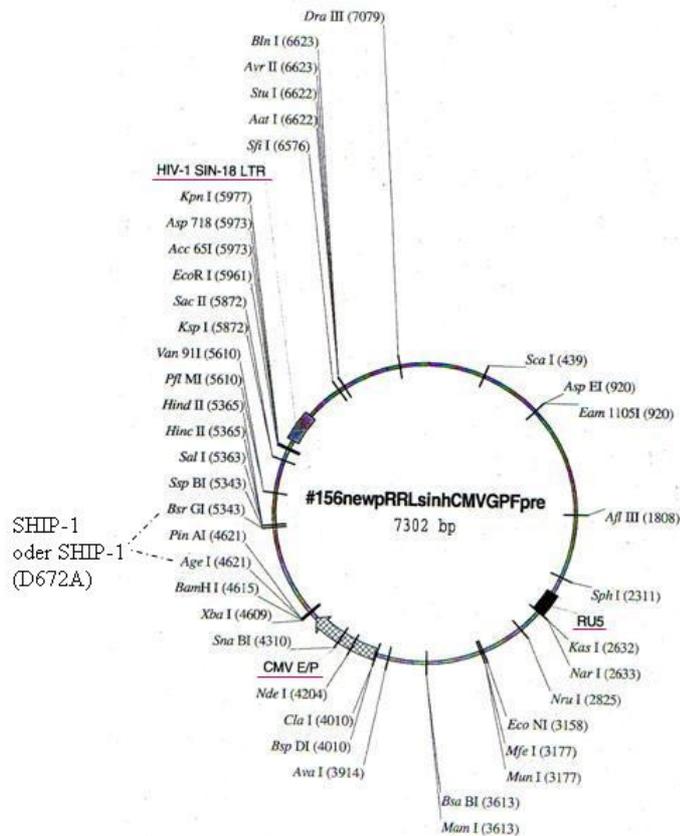


Abb. 5: Lentiviraler Vektor pRRL.sinh.CMV.GFP.pre

Bei dem Vektor handelt es sich um einen selbsti naktivierenden Vektor, der am U3-LTR deletiert ist. Dies ist gekennzeichnet durch „HIV-1 SIN-18 LTR“. SHIP-1 bzw. die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 wurde zwischen AgeI und BsrGI eingefügt.

3.1.7.2. DNA-Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden zur PCR bzw. Sequenzierung eingesetzt:

DNA-Oligonukleotid-Sequenz: 5'→3'	Primer
ctcatctacagggccgcaccgggtccaccatggtcccctgctgg	SF91+SHIPAgeI-FP
ccagcaggggaccatggtggaccgggtcggccgctgtagatgag	SF91+SHIPAgeI-RP

Die Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

3.1.8. Geräte

Zellkultur-Brutschränke	Heraeus
Elektrophorese-Kammern (horizontal)	MWG-Biotech
Elektrophorese-Kammern (vertikal)	Protean [®] IxiCell, BioRad
Luftgeltrockner	Bio Rad
Geldokumentationssystem CF8/1 FMC	Kappa Messtechnik
FACSAria	Becton & Dickinson
FACSSCAN	Becton & Dickinson
FACSCalibur	Becton & Dickinson
FACSCantor	Becton & Dickinson
Flow Titertek [®] Multiskan Plus	ICN
Horizontalschüttler Rocky [®]	Fröbel Labortechnik
Lyophyllisator: SpeedVac Concentrator	Savant
pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH
Power Supply EPS200	Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Eppendorf
Rührplatte	Heidolph
Schutron Schnippherm	MS-Laborgeräte
Schüttelinkubator (Bakterien)	HAT Infors AG
Sonifiziergerät B-12	Branson Sonic Power Company
Thermomixer 5436	Eppendorf
Wasserbad 1086	GFL
Multi-Imager Fluor-Smax	Fuji
Zentrifugen:	
• Ultrazentrifuge L-60 Optima-L	Beckman
• Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
• Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
• Zentrifuge 540	Eppendorf
• Zentrifuge Varifuge K	Heraeus
• Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus
• Sorvall-Zentrifuge RC-5B	DuPont Instruments
Mikroskope und Zubehör:	
• Axiovert 200	Zeiss

3.1.9. Verbrauchsmaterialien

0,2 ml-Reaktionsgefäße	Biolabs
0,5 ml-Reaktionsgefäße	Biolabs
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Sarstedt
2,0 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
5 ml Polystyren Röhren	Becton & Dickinson
15 ml-Röhren	Falcon
25 ml-Weißkappenröhren	Sarstedt
50 ml-Röhren	Falcon
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Sarstedt
96-Loch-Platten	Greiner
24-Loch-Platten	Greiner
6-Loch-Platten	Greiner
Gewebekulturflaschen T25	Greiner
Gewebekulturflaschen T175	Greiner
Nunc TM Gewebekulturflaschen T250	Nalgene
Nunc TM Plastikampullen	Nalgene
Pipettenspitzen	Sarstedt & Biozyme
SW-40-Polyallomer-Röhren	Beckman

3.2.Methoden

3.2.1. Bakterienkulturen

Die Bakterienkulturen wurden in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1% NaCl, pH 7,0) gehalten. Zur Anzucht von Bakterienkolonien auf festem Nährboden wurde das Medium mit 1,5% Agar versetzt und anschließend in Form von Agarplatten in Petrischalen gegossen. Um die Bakterien auf Antibiotikum-Resistenz hin zu selektionieren, wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 50µg/ml zugefügt. Die Bakterien wurden auf den Agarplatten über Nacht im Brutschrank bzw. in den Flüssigkulturen unter Schütteln (180 Upm) bei 37°C 12 bis 16 Std. inkubiert. Zum Anlegen von Glycerolstocks wurden Bakterienklone über Nacht in 3ml-Kulturen herangezogen, in NuncTM-Plastikampullen mit Glycerin versetzt (15% Endkonzentration). Ihre Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2. Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden aus der – 80°C-Kühltruhe direkt auf Eis gestellt. Nachdem die Bakterien aufgetaut waren, wurde die gewünschte DNA zugegeben und vorsichtig mit den Bakterien gemischt. Die Bakteriensuspension wurde 30 min im Eis stehen gelassen und dann für 75 sek in einem 42°C warmen Heizblock inkubiert. Im Anschluss an den Hitzeschock wurden die Bakterien zwei min in Eiswasser abgekühlt, mit 1ml LB-Medium versetzt und für eine Std. bei 37°C in den Inkubator gestellt. Je nach Transformationserwartung wurden entweder 100µl oder der gesamte Ansatz auf LB/Amp-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurden die Lösungen aus dem MaxiPräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Von 5 bis 8ml Übernachtskultur wurden 4ml abgenommen und 20 sek mit 5000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Die Bakterienpellets wurden in 100µl kaltem Puffer P1 (10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100µg/ml RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden 200µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) dazugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis, bei der die Lyse erfolgte. Nach Zugabe von 150µl Puffer P3 (3 M KAc pH 5,5) und vorsichtigem Mischen durch Invertieren, folgte erneut eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Membrantrümmer, Proteine und genomische DNA der Bakterien wurden daraufhin in zehn min bei 4°C mit 13000 g abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde mit dem zweifachen Volumen EtOH absolut (- 20°C) gefällt, mit 70%-igem EtOH gewaschen und je nach Pelletgröße in 20 bis 50µl TE aufgenommen. Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt (mehrere 100µg), erfolgte die Präparation mit Hilfe von Anionenaustauscher-Säulen von Qiagen. Sie wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurden durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 bzw. 280 nm (s. 3.2.4.) und durch Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.6.1.) bestimmt.

3.2.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der Extinktion in einem Spektralphotometer. Es wurde die Absorption der Proben bei 260 und bei 280 nm ermittelt. Aus den Extinktionswerten bei 260 nm konnten, ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz und unter Berücksichtigung der spezifischen Absorptionskonstanten ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$), die Nukleinsäurekonzentrationen berechnet werden. Das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm / 280 nm erlaubte zudem die Beurteilung der Nukleinsäureproben hinsichtlich ihrer Verunreinigung mit Protein.

3.2.5. Enzymreaktionen an Nukleinsäuren

3.2.5.1. Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von DNA richten sich die Reaktionsbedingungen, insbesondere Temperatur und Dauer der Reaktion sowie die verwendete Puffersubstanz, nach dem eingesetzten Restriktionsenzym und wurden somit nach den Angaben des Herstellers eingestellt. In der Regel wurde die DNA in 20 μl -Ansätzen mit 1x Puffer und einem zweifachen Überschuss an Enzym (2U/ μg) bei 37°C inkubiert.

3.2.5.2. Dephosphorylierung von DNA

Um geschnittene Vektor-DNA an den 5'-Enden zu dephosphorylieren und so einer Wiederverknüpfung der DNA ohne Einbau eines Inserts in der folgenden Ligationsreaktion vorzubeugen, wurde sie mit 0,01U/ μl bis 0,02U/ μl alkalischer Phosphatase ("*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*" von MBI Fermentas) in 1x Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl_2) für 30 min bei 37°C inkubiert.

3.2.5.3. Ligation von DNA

Die Ligation von DNA wurde in einem Volumen von 20 μl unter Verwendung der T4-DNA-Ligase von Roche durchgeführt. Hierbei wurden die DNA-Fragmente in dreifachen molaren Überschuss gegenüber der Vektor-DNA und unter Einsatz von 2U DNA-Ligase mit 50ng dephosphoryliertem Vektor (2,5ng/ μl) bei 4°C zwie bis drei Tage inkubiert.

3.2.6. Gelelektrophorese

3.2.6.1. DNA-Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA-Molekülen in der horizontalen Gelelektrophorese wurden je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 0,8% bis 1,0% Agarose von Biozyme in TAE-Laufpuffer aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und nach Zugabe von 1µg/ml Ethidiumbromid (2,5 µM Endkonzentration) in den Gelträger gegossen. In ca. 30 min war das Gel erstarrt und konnte in der Elektrophorese eingesetzt werden. Die DNA-Proben wurden in 1 x DNA-Ladepuffer (5% Glycerin; 166,7 µM EDTA pH 8; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol) aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandards wurde *Hind* III- gespaltene λ-DNA von MBI Fermentas verwendet. Der Standard wurde vor dem Auftragen fünf min bei 65°C im Thermomixer erhitzt. Die Elektrophorese wurde in Kammern von MWG Biotech bei 5 bis 16 V/cm betrieben (Power Supply EPS200, Amersham Pharmacia Biotech). Die aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids bei 312 nm fluoreszierenden DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

3.2.6.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten (Restriktionsfragmente) aus präparativen Agarosegelen wurde mit Hilfe des "QIAquick™ Gel Extraction Kits" von Qiagen durchgeführt. Das zu reinigende DNA-Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem dreifachen Volumen QX-1-Puffer versetzt. Eine zehnmünütige Inkubation bei 50°C im Thermomixer führte zur Auflösung der Agarose. Die DNA wurde auf eine "QIAquick-Spin"-Säule geladen und durch einminütiges Zentrifugieren bei 5000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge an die Silicagel-Matrix der Säule gebunden. Nach einem Waschschrift mit 750µl PE-Puffer und einer erneuten Zentrifugation konnte die DNA mit 50µl 60°C warmem H₂O abermals durch Zentrifugation von der Säule eluiert werden.

3.2.7 PCR

3.2.7.1. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde im Zyklussequenzierverfahren mit Hilfe des "ABY PRISM™ Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing“-Kits von Perkin Elmer Applied Biosystems durchgeführt. Dabei wurden entsprechend der enzymatischen Sequenzierungsmethode nach Sanger [SANGER et al. 1977] Didesoxynukleotide als zum Abbruch der Sequenzreaktion führende Basenanaloga eingesetzt. Im Unterschied zu herkömmlichen Techniken konnten alle vier Basenanaloga gemeinsam in einem einzigen Ansatz benutzt werden. Die Didesoxynukleotide waren außerdem mit in verschiedenen Farben fluoreszierenden Gruppen versehen, wodurch die Reaktionsprodukte in Polyacrylamidgelen detektiert und hinsichtlich des eingebauten Analogons identifiziert werden konnten. Die Reaktion wurde im PCR-Gerät unter wiederholtem Einsatz der DNA-Matrize vollzogen. 300ng Plasmid-DNA wurden zusammen mit 15pmol Primern und 4µl "Big Dye Terminator Ready Mix" in ein Volumen von 20µl aufgenommen. Das Temperaturprofil der Reaktion sah folgende Schritte vor:

95°C	1 min	
96°C	30 sek	
50°C	15 sek	34 Zyklen
60°C	4 min	

Die Proben wurden nach der Reaktion mit 80µl 0,3M Na-Ac und 250µl abs. EtOH versetzt, in 1,5ml Eppendorf Röhrchen überführt und 30 min bei 13000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70% EtOH gewaschen, in dem es 15 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Das Sequenzgel sowie die Analyse der fluoreszierenden Banden fanden unter Einsatz eines Sequenziergerätes (Applied Biosystems 373A) im Institut für Pathologie, Universitäts-Klinikum Eppendorf statt.

Quickchange-Mutagenese (QCM)

Die QCM-Methode wurde zum Einfügen von Mutationen (Insertion, Deletionen, Substitutionen, multiple Mutationen) verwendet. Bei der QCM wurden 2 separate PCRs durchgeführt. Die erste PCR besteht aus 2 Ansätzen mit jeweils nur einem Primer. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert:

H ₂ O	36µl
10xPfu-Pol-Puffer	5µl
10mM dNTPs	1,25µl
10µM Primer 1 oder 2	2µl
DNA (10ng/µl)	5µl
TurboPfu (2,5U)	1µl
Gesamt	50µl

Das Temperaturprofil sah folgende Schritte vor:

```

95°C 30 sek _____
95°C 30 sek
55°C 1 min      10 Zyklen
68°C 1 min/kb
  
```

Nach Beendigung der ersten PCR wurden beide Ansätze vereinigt und 1µl TurboPfu (2,5U) dazugegeben. Die zweite PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

```

95°C 30 sek _____
95°C 30 sek
55°C 1 min      18 Zyklen
68°C 1 min/kb
  
```

Nach der zweiten PCR wurden 10µl abgenommen und bei - 20°C eingefroren. Die restlichen 40µl wurden mit 0,5µl DpnI (10U) versetzt und eine Std. bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die 10µl, die vor der Restriktion abgenommen wurden, und 5µl nach dem DpnI-Verdau wurden zur Kontrolle in DNA-Agarosegelen aufgetragen und unter der UV-Lampe

angeschaut (siehe 3.2.6.1.). 20µl dieses Ansatzes wurden zur Transformation verwendet (siehe 3.2.2). Nachdem Klone auf der Agarplatte gewachsen sind, wurde die DNA im kleinen Maßstab isoliert (siehe 3.2.3).

3.2.8. Zellkultur

3.2.8.1. Stammhaltung und Vermehrung

Die Jurkat-Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium mit Glutamax gehalten (GibcoBRL). Dem Medium wurde 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin zugesetzt. Für die Kultivierung wurden kleine Kulturflaschen verwendet, in welche die Zellen in einer Dichte von ca. $4-5 \times 10^5$ Zellen / ml ausgesät und alle 2 bis 3 Tage geteilt und mit frischem Medium versetzt wurden. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 geteilt.

Die 293-Zellen wurden in DMEM-Medium gehalten, dem 10% hitzeinaktiviertes FCS, sowie 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden. Da die 293-Zellen adhärent wachsen, wurden sie in Zellkulturflaschen kultiviert. Diese Zellen wurden alle zwei bis drei Tagen in einem Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Dazu wurden sie je nach Flaschengröße mit ein bis zwei ml 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung behandelt, nach Ablösung von Oberfläche in Medium resuspendiert und geteilt.

Die HT1080-Zellen wurden in demselben Medium gehalten wie die 293-Zellen. Da auch sie adhärent wachsen wurden sie auch mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA behandelt. Die Zellen wurden in Trocken-Brutschränken von Heraeus bei 37°C und in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.2.8.2. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 90%-igem FCS/10%igem DMSO eingefroren (*Cryo 1°C Freezing Container*, Nalgene) und in Stickstoff aufbewahrt.

3.2.8.3. Auftauen von Zellen

Die im Stickstofftank eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis nur noch ein Kristall zu sehen ist. Die Zellen wurden dann in ein Falcon-Röhrchen, in dem

bereits 9ml des Mediums vorgelegt wurden, hinein pipettiert und sofort bei 290 g für sieben min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgekippt und die Zellen in 10ml Medium aufgenommen und in den Inkubator gestellt.

3.2.8.4. Trypanblau-Färbung

Die Trypanblau-Färbung diente zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nur nach längerer Inkubationszeit auf, während tote Zellen aufgrund der geschädigten Zellmembran innerhalb von Sekunden bis Minuten gefärbt werden. Zur Färbung wurden 20µl der Zellsuspension mit 20µl der Trypanblau-Lösung von der Firma SIGMA gemischt und nach einminütiger Inkubation der Anteil der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. In einer intakten Kultur sollten fast 100 % lebende Zellen vorkommen.

3.2.8.5. Transfektion von 293-Zellen

Für die Virusproduktion mit dem retroviralen Vektor wurden die 293-gp-Zellen verwendet und für den lentiviralen Vektor 293T-Zellen. Bei dem ersten Konstrukt (Vektor SF91) handelt es sich um einen retroviralen Vektor, in den entweder SHIP-1 oder eine SHIP-Mutante D672A, dabei handelt es sich um eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1, hinein kloniert wurde. Der Vektor SF91 wurde mir freundlicher Weise von Dr. Carol Stocking, Heinrich Pette-Institut Hamburg, zur Verfügung gestellt. Der Vektor mit SHIP-1 oder einer enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) wurden mir freundlicherweise von Wiebke Wegner zur Verfügung gestellt. Bei dem zweiten Konstrukt handelte es sich um einen lentiviralen Vektor, der mir freundlicher Weise von Prof. Dr. Luigi Naldini, Università Vita-Salute San Raffaele, Mailand, Italien, zur Verfügung gestellt wurde, in den entweder SHIP-1 oder eine inaktive Form von SHIP-1 (D672A) kloniert wurde. Um SHIP-1 sowie die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 in Viren exprimieren zu können, wurden die 293-Zellen mit Lipofectamine Reagenz von Invitrogen transfiziert. Dazu wurden die Zellen 24 Std. vor der Transfektion in einer frischen Kulturschale ausgesät. Optimalerweise waren die Schalen zum Zeitpunkt der Transfektion zu 70 % konfluent. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen mit 5ml frischem Medium versehen. Es wurden 5µg des Vektors, 5µg RD114 und 10µg M57 (gagpol) für den retroviralen Virus oder für den lentiviralen Virus 5µg des Vektors, 5µg des Rev-Plasmids, 2µg VSV-G und 12µg des gagpol-Plasmids in 750µl

OptiMEM-Lösung aufgenommen und 20µl Plus-Reagenz dazugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden 750µl der OptiMEM-Lösung und 30µl Lipofectamin zusammen pipettiert. Nach der ersten Inkubationszeit wurden beide Ansätze gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Lipofectamin-Plus-DNA-Mix auf die Zellen gegeben und drei Std. im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach drei Std. wurde das Medium auf neuen ml aufgefüllt. Nach 48 und 72 Std. wurde der Virusüberstand geerntet, filtriert (Acrodiskfilter; 0,45µm; Pallman) und dann bei - 80°C eingefroren.

3.2.8.6. Virustitration

Bei der Virustitration wurden 1×10^5 HT1080-Zellen pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät und für fünf Std zum Anwachsen in den Inkubator gestellt. Es wurden von den Virusüberständen jeweils Aliquots von 10µl, 25µl und 50µl in 500µl DMEM-Medium mit 10% FCS, 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin hergestellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach fünf Std. wurde das alte Medium entfernt und durch 500µl DMEM-Medium mit Protaminsulfat (4µg/ml) ersetzt. Dann wurde der Virus-DMEM-Mix zu den 500µl zugegeben und die Platte 90 min bei 800 g und 32°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Platten über Nacht in den Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ gestellt. Am nächsten Tag wurde das alte Medium durch ein ml frisches DMEM-Medium ersetzt. 48 Std. nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, zentrifugiert und in 200µl PBS mit 1 x Cellfix (Becton & Dickinson) aufgenommen. Danach konnten die Zellen am FACS analysiert werden.

3.2.8.7. Präparation mononukleärer Zellen

Mononukleäre Zellen wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation mit LymphoprepTM (Nycomed, Oslo, Norwegen) aus peripherem Blut bzw. Knochenmark gewonnen. Spender der Blutproben waren sowohl Gesunde als auch an Leukämie erkrankte Patienten. Die Blutproben wurden mit kaltem PBS verdünnt und vorsichtig auf 15ml der LymphoprepTM-Lösung geschichtet. Während der folgenden 30-minütigen Zentrifugation mit 400 g bei 20°C wurden die mononukleären Zellen, die eine Interphase im Dichtegradienten bilden, von den Erythrocyten und Granulocyten abgetrennt. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Dabei wurde

auf ein Volumen von 50ml mit PBS aufgefüllt und 10 min mit 400 g bei 20°C zentrifugiert. Anschließend konnten die aufgereinigten Zellen für die Herstellung von Proteinlysaten bzw. der Gewinnung von DNA und RNA oder zur CD34⁺-Aufreinigung eingesetzt werden.

3.2.8.8. CD34⁺- Aufreinigung

Aus den mononukleären Zellen können nun CD34⁺-Zellen aufgereinigt werden. Dazu wurden 1×10^7 bis 2×10^8 mononukleäre Zellen in 100µl bis 1ml „*recommended Medium*“ aufgenommen, 10µl bis 100µl EasySepTM Positive Selection Cocktail von Cellsystems dazugegeben, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die EasySepTM Magnetic Nanopartikel ebenfalls von Cellsystems, wurden vor Verwendung mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend 5 bis 50µl zu den Zellen gegeben. Dieses Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Volumen auf 2,5ml mit dem „*recommended Medium*“ aufgefüllt und für 5 min in den Magneten (Cellsystem) gestellt. Dann wurde der Überstand in einem Schwung abgekippt und das Röhrchen aus dem Magneten genommen. Es wurde wieder mit 2,5ml „*recommended Medium*“ aufgefüllt und für 5 min in den Magneten gestellt. Dies wurde fünfmal wiederholt, nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Zellen bei 400 g abzentrifugiert und in 2ml StemSpan Medium ohne FCS von Cellsystems mit den Zytokinen Interleukin-6 (20ng/ml), Trombopoetin (20ng/ml), Stammzellofaktor (100ng/ml) Flt3-Ligand (100ng/ml), 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin aufgenommen und 2 Tage bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.8.9. Transduktion der CD34⁺-Zellen

3.2.8.9.1. Retrovirale Transduktion

Vor der Transduktion der CD34⁺-Zellen mit RD114 wurden die 6-Loch-Platten mit RetroNectinTM (Takahara) beschichtet. Bei RetroNectinTM handelt es sich um ein rekombinantes Fibronektinfragment (CH-296). Dabei handelt es sich um ein humanes Fibronektin, das in *E.coli* produziert wurde. Es besitzt drei funktionale Domänen: eine zentrale Bindungsdomäne, eine Heparinbindungsdomäne II und eine CS1-Seite, die eine alternativ gespleißte III CS1-Region besitzt. Sie besteht aus 574 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 63kD. Durch RetroNectinTM wird die retrovirale Gentransduktion verstärkt. Diese Verstärkung ist auf die Kolokalisation der retroviralen Partikel und der Zielzelle zurückzuführen. Die Viruspartikel binden an RetroNectinTM, indem sie

hauptsächlich mit der Heparinbindungsdomäne interagieren. Die Zielzellen binden an das RetroNectin™ durch die Interaktion mit dem Fibronektinliganden der CS1-Seite. Für die RetroNectinbeschichtung wurde eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte mit 2ml der Retronectinlösung beschichtet. Die Vertiefung wurde zwei Std. bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Retronectinlösung verworfen und mit 2ml 2% BSA in PBS für 30 min bei 4°C blockiert. Die Blockierlösung wurde dann verworfen und die Platte einmal mit HBSS (GibcoBRL) und 2,5% (v/v) 1M HEPES gewaschen. Die Lösung wurde erst unmittelbar vor der Transduktion entfernt.

Vor der Transduktion wurden 5×10^5 CD34⁺-Zellen in 2ml StemSpan-Medium (CellSystems) mit den Zytokinen Interleukin-6 (20ng/ml), Trombopoetin (20ng/ml), Stammzellfaktor (100ng/ml) und Flt3-Ligand (100ng/ml) (alle Zytokine wurden von CellSystems bezogen) inkubiert. Nach 48 Std. konnte mit der Transduktion begonnen werden. Hierzu wurden Virusüberstände mit einem Titer von 1×10^5 bis 6×10^5 infektiöse Partikel / ml verwendet. Die mit RetroNectin beschichteten 6-Loch-Platten wurden mit einem ml Virusüberstand beladen und 20 min bei 750g, 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Virusüberstand verworfen und ein ml frischer Virusüberstand in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert. Die Platte wurde unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Diese Prozedur wurde je nach Titer 3 bis 4 x wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden 5×10^5 CD34⁺-Zellen in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert und mit zwei ml StemSpan-Medium mit Zytokinen versetzt. Die Platte wurde dann für 24 Std. in den Inkubator gestellt. Am nächsten Tag wurde die Prozedur von der Beschichtung mit RetroNectin™ bis zur Virusbeladung wiederholt. Nach 48 Std. sind die Zellen dann zum Sortieren bereit.

3.2.8.9.2. Lentivirale Transduktion

Bei dieser Transduktion wurden die Viren mit VSV-G pseudotypisiert. 5×10^5 CD34⁺-Zellen wurden in ein Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und mit 1ml Virusüberstand, der üblicherweise 3×10^5 bis 8×10^5 infektiöse Partikel / ml aufweist, aufgefüllt. Die Platte wurde dann 90 min bei 800 g und 37°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde dem Zellen-Virus-Mix 500µl StemSpan-Medium mit Zytokinen zugesetzt. Dann wurde die Platte für 24 Std. inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transduzierten Zellen abzentrifugiert und in einem ml Virusüberstand aufgenommen. Die Platte wurde wie am Vortag zentrifugiert. Nach

Ende der Zentrifugation wurden 500µl StemSpan-Medium mit den Zytokinen zugegeben und in den Inkubator gestellt. 48 Std. nach der ersten Transduktion wurden die Zellen sortiert und in Methylcellulose gesetzt.

3.2.8.10. Sortieren der transduzierten Zellen am FACS Aria

Die transduzierten CD34⁺-Zellen wurden bei 200 g, 20°C, 5 min abzentrifugiert, ein bis zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500µl PBS aufgenommen und filtriert (0,25µm, Macs). Danach konnten die Zellen am FACS Aria (Becton & Dickinson) sortiert werden. Hierbei wurden die Zellen an einem Laser vorbeigelenkt, wobei der Laser die Zellen nach grün leuchtend und nicht leuchtend unterscheiden kann und somit diese beiden Zellen in unterschiedliche Röhren sortieren kann. Es wurden jeweils 1000 Zellen der EGFP-positiven bzw. EGFP-negativen Zellen in 300µl StemSpan-Medium gesammelt.

3.2.8.11. Methylcellulose und Flüssigkultur

Nach dem Sortieren wurden die Zellen sowohl in Flüssigkultur als auch in Methylcellulose gesetzt. Es wurden jeweils 1ml Methylcellulose mit 50U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin, GM-CSF (400U) und 100µl StemSpan-Medium mit 1000 sortierten Zellen in eine 3,5cm-Schale mit Gitternetzlinien pipettiert. Es wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Diese wurden in eine feuchte Kammer gestellt und im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden dann die Kolonien gezählt, wobei eine Kolonie aus mehr als 20 Einzelzellen besteht. Gleichzeitig wurden jeweils 1000 Zellen in 100µl StemSpan-Medium mit 50U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin und GM-CSF in eine Vertiefung einer 96-Loch-Platte pipettiert. Diese Platte wurde für zehn bis zwölf Tage in den Inkubator gestellt. Nach zehn bis zwölf Tagen wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau gezählt (siehe 3.2.8.4.).

3.2.9. Kopplung von Antikörpern mit Fluorochromen

Es wurde der SHIP-Antikörper P1C1 mit dem Maus-Antikörper Alexa 488 direkt gekoppelt. Dazu wurden 1µg des SHIP-Antikörper in 20µl PBS aufgenommen und 5 µl Zenon-Maus-IgG-Bindungsreagenz. Das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden noch 5µl Blockierlösung dazugegeben und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der direkt gekoppelte Antikörper konnte für die Färbung verwendet werden.

3.2.10. Zell-Lyse und Proteinextraktion

3.2.10.1. Zell-Lyse mit NP40-Puffer

Die Zellen wurden für 7 min bei 290 g abzentrifugiert und unter kräftigem Auf- und Abpipettieren in NP40-Lysepuffer lysiert. Dabei wurden 5×10^7 Zellen in ein ml NP40-Puffer lysiert. Nach anschließender Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Lysate auf 1,5ml-Reaktionsgefäße verteilt und 10 min mit 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Nunc™-Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. 10µl Aliquots wurden für die Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen.

3.2.10.2. TCA-Lyse

Hierfür wurden 2×10^7 Zellen verwendet, die nach dem Waschen mit PBS in 1ml 10% TCA-Lösung mit 20 mM DTT aufgenommen und für eine Std auf Eis gefällt wurden. Die Lösung wurde bei 5000 g für 7 min zentrifugiert und dreimal mit einer Acetonlösung, die 20 mM DTT enthält, gewaschen. Damit das Aceton sich verflüchtigt, wurde das Zellpellet in einem Lyophilisator für 2 min getrocknet.

Danach wurde das Pellet in 1 x Ladepuffer ohne Bromphenolblau (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerin; 100 mM DTT) aufgenommen (2×10^7 Zellen in 500µl 1x Ladepuffer) und fünfmal 10 sek sonifiziert und dann bei -80°C gelagert

3.2.11. Proteinbiochemische Arbeiten

3.2.11.1. Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden in einer Mikrotiterplatte mit Reagentien des "DC Protein Assays" von BioRad nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe von BSA-Standard-Verdünnungen von Rinderserumalbumin

Fraktion V (Roche Diagnostics) im Bereich von 0,0mg/ml bis 1,75mg/ml. 5µl der Proteinlösung oder 5µl einer 1:5 bis 1:20-Verdünnung des Zelllysates wurden in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 25µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S / ml Reagenz A, eine alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) und 200µl Reagenz B (Folin-Reagenz) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Aus den Extinktionswerten der BSA-Standards, die in Form von Triplets bestimmt wurden, ließ sich eine Eichgerade erstellen, mit deren Hilfe die Konzentration der Proteine in den Lysatproben ermittelt werden konnte.

3.2.11.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen

Proteine wurden in vertikalen Polyacrylamidgelen in der Protean®IIxiCell-Apparatur von BioRad aufgetrennt. Dazu wurden 8,5%-ige Trenngele (370 mM Tris-HCl pH 8,8; 8,5% Acrylamid; 0,22% Bisacrylamid; 0,1% SDS; 0,035% APS; 0,035% TEMED) gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isobutanol abgegossen und die Gelkante mit deionisiertem Wasser gespült. Anschließend wurde das Sammelgel (370 mM Tris-HCl pH 6,7; 3,9% Acrylamid; 0,1% Bisacrylamid; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,05% TEMED), in dem es nach dem Prinzip der Isotachophorese zu einer Konzentrierung und einem Schärfen der in das Gel eingelaufenen Proteinbanden kommt [COOPER 1980], auf das Trenngel gegossen. Nach ca. einer Stunde war das Sammelgel polymerisiert. Das Gel wurde in die Apparatur eingesetzt und 1x Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS) eingefüllt. Proben von Gesamtzelllysaten (50 bis 100 µg) wurden mit 0,5 Volumen 3x Protein-Ladepuffer (180 mM Tris-HCl pH 6,8; 6% SDS; 28% Glycerin; 0,001% Bromphenolblau; 300 mM DTT) versetzt. TCA-Lysate wurden in 40µl 1x Protein-Ladepuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 3% SDS; 10% Glycerin; 0,001% Bromphenolblau; 100 mM DTT) aufgenommen und unmittelbar vor dem Auftragen bei 100°C für fünf min gekocht. Die Elektrophoresen wurden mit zehn bis fünfzehn mA pro Gel betrieben.

3.2.11.3. Färbung von Protein-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

Um Proteine in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden sie mit Coomassie Blau gefärbt. Hierbei wurde die ROTI-BLUE Coomassie Färbelösung von Roth verwendet. Das Gel wurde kurz in Gelfixierer inkubiert und anschließend für 14 Std. unter leichtem Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift in

deionisiertem Wasser, der je nach der Intensität des entstandenen Hintergrunds mindestens 30 min dauerte, konnte das Gel im Luftgeltrockner der Firma BioRad nach Angaben des Herstellers getrocknet werden.

3.2.11.4. Western Blot-Analyse

Auf Gelgröße zugeschnittene Protran[®] Nitrocellulosemembran (0,45 µm) von Schleicher & Schuell wurde in dd Wasser benetzt. In 1x Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS; 20% MeOH) äquilibriert und auf das Polyacrylamidgel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen zwei Whatman[®] 3MM-Chromatografiepapiere und zwei Scotch-Schwämmen in die Western Blot-Apparatur (Trans-Blot[™] Cell, Bio Rad) eingespannt. Die Proteine wurden im "Tankblotting"-Verfahren in zwei Std. bei 50 V auf die Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend kurz in 1x TBS gewaschen und mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für eine Std. geblockt. Der am Rand aufgetragene, biotinylierte Marker wurde als Streifen von der Membran abgeschnitten und über Nacht in der Block-Lösung bei 4°C belassen. Der primäre Antikörper wurde in 1x TBS / 0,5 % Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver / 0,01% Natriumazid verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Sie wurde am nächsten Tag dreimal für 10 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver gewaschen und eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase; nach Angaben des Herstellers in 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Der abgetrennte Streifen mit Markerproteinen wurde dreimal für 10 min in 1x TBS / 0,5% Tween 20 gewaschen und mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (1:3000 verdünnt in 1x TBS / 0,5% Tween 20, Amersham Pharmacia Biotech) für eine Stunde. Membran und Markerstreifen wurden zweimal mit 1x TBS gespült und wie folgt gewaschen:

- zweimal für 10 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20
- einmal für 10 min mit 1x TBS / 3% Tween 20
- zweimal für 15 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20
- zweimal für 30 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20
- zweimal für 30 min mit 1x TBS

Je 5ml der ECL-Lösungen I und II von Amersham-Pharmacia Biotech wurden in einer Plastikschaale miteinander gemischt. Membran und Markerstreifen wurden je eine min unter Schwenken in der Lösung inkubiert, auf Whatman[®]-Papier angetrocknet und zwischen zwei Plastikfolien im Imager entwickelt. Die Filter wurden nach der Exposition in 1x TBS bei 4°C gelagert. Sollten die Filter mit einem anderen, primären Antikörper inkubiert werden, so wurden sie für eine halbe Stunde in 62 mM Tris-HCl pH 6,7, 2% SDS und 100 mM β -Mercaptoethanol bei 70°C inkubiert und fünfmal für je 10 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 gewaschen. Das Protokoll wurde anschließend mit dem Blockieren der Filter fortgesetzt.

3.2.12. Fluoreszenzfärbungen

I. SHIP-1-Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa Fluor 488

Es wurden hierfür 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, indem sie bei 400 g für fünf min zentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden dann in 300 μ l PBS aufgenommen und in 700 μ l kaltes Methanol eingespritzt. Dies wurde nun für 40 min bei 4°C inkubiert und danach bei 460 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Methanolfixierung wurde noch zweimal mit PBS gewaschen, um das überschüssige Methanol zu entfernen. Bevor nun der erste Antikörper dazugegeben werden konnte, wurden die Zellen bei 4°C mit 1 % (w/v) BSA für ca. 30 min blockiert. Nachdem die Zellen noch einmal abzentrifugiert wurden, konnte nun der erste Antikörper für eine halbe Stunde auf die Zellen gegeben werden. Die Inkubation erfolgte bei 4°C. Der Antikörper wurde vorher 1:10 verdünnt und 50 μ l dieser Verdünnung auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen und danach mit dem zweiten Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Bei dem zweiten Antikörper handelt es sich um einen FITC gekoppelten Antikörper, der im Dunkeln inkubiert werden muß. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen und dann entweder an einem konfokalen Mikroskop vermessen oder am FACS analysiert.

II. SHIP-1-Immunfluoreszenzfärbung mit direkt gekoppeltem Alexa 488

Es wurden hierfür 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, indem sie bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden in 1ml 3,5% Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,1 % TritonX-100 in PBS 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und mit 1% (w/v) BSA in PBS für 30 min bei 4°C blockiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen abzentrifugiert und in 25µl des direkt gekoppelten SHIP-1-Antikörpers mit Alexa488 aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Damit der Antikörper auch nach dem Färben länger nachweisbar ist, wurden die Zellen noch einmal mit 3,5% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend konnten die Zellen am konfokalen Mikroskop vermessen werden bzw. am FACS analysiert.

III. p-AKT-AlexaFluor 647-Immunfluoreszenzfärbung

Es wurden hierfür 1×10^6 Zellen eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, indem sie bei 400 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Zellen wurden in 1ml 3,5% Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und bei 4°C fünf min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml 100 % Methanol aufgenommen und dann 6 min bei -20°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem ml 1% BSA in PBS aufgenommen und 30 min bei 4°C blockiert. Die Blockierlösung wurde abzentrifugiert und verworfen. Die Zellen wurden dann in 30µl p-AKT-APC aufgenommen und 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen am FACS Calibur am Institut für Knochenmarktransplantation II des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf analysiert.

4. Ergebnisse

Bei der SHIP-1-*knockout-Maus* konnte ein Phänotyp festgestellt werden, der dem der myeloproliferativen Erkrankungen des Menschen ähnelt. Da SHIP-1 ein negativer Regulator für das Wachstum von Signaltransduktionsprozessen ist, wurden Zellen von gesunden Spendern und verschiedenen Leukämiepatienten auf ihr Wachstumsverhalten bei einer Überexpression von SHIP-1 untersucht. Hierzu wurden die CD34⁺-Zellen der Patienten mit einem retroviralen bzw. einem lentiviralen Vektor infiziert, in den entweder SHIP-1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1, bei welcher die Aminosäure Asparaginsäure gegen Alanin an der Stelle 672 ausgetauscht ist, kloniert wurde. Die beiden Vektoren sind Koexpressionsvektoren, die EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) besitzen. Es wurden Virusüberstände hergestellt, die eine bestimmte Anzahl von infektiösen Partikeln/ml aufweisen. Mit diesen Überständen wurden CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern und Leukämiepatienten infiziert. Die Zellen der gesunden Spender wurden sowohl mit dem retroviralen Vektor SF91iGpre als auch mit dem lentiviralen Vektor pRRL.sinh.CMV.GFP.pre infiziert und analysiert. Die CD34⁺-Zellen der Patienten mit der juvenilen myelomonozytären Leukämie wurden mit dem retroviralen Vektor infiziert. Da die CD34⁺-Zellen von AML und MPS-Patienten sich mit dem retroviralen Vektor nicht infizieren ließen, wurde ein lentiviraler Vektor verwendet. Dieser hatte den Vorteil, dass er ruhende Zellen infizieren kann [NALDINI 1998] und somit die AML-Zellen besser infizieren kann.

4.1 Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von gesunden Spendern mit dem retroviralen Vektor SF91iGpre

Hämatopoetische Zellen des Nabelschnurblutes wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und Antikörpern gegen CD34⁺ aufgereinigt. Danach wurden die CD34⁺-Zellen für 48 Std. in Serum-freiem Medium mit den Zytokinen Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-6 (IL-6), Thrombopoetin (TPO) und FLT3-Ligand (*fms-lik tyrosine kinase 3- Ligand*) gehalten. Danach wurden die Zellen mit dem Virusüberstand (1×10^5 bis 1×10^6 infektiöse Partikel/ml) infiziert. Die transduzierten Zellen wurden sortiert und die EGFP⁺-Zellen in Triplikaten von jeweils 1000 CD34⁺-Zellen in Methylcellulose kultiviert und mit einer Konzentration von 10ng/ml GM-CSF versetzt. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. In Abb. 6a konnte gezeigt werden, dass die CD34⁺-Zellen, die mit dem retroviralen

Koexpressionsvektor EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) keine Hemmung des Wachstums darstellen, während es bei der Expression von SHIP-1 zu einer signifikanten Erniedrigung des GM-CSF-abhängigen Wachstums kommt. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 liegt bei 36%.

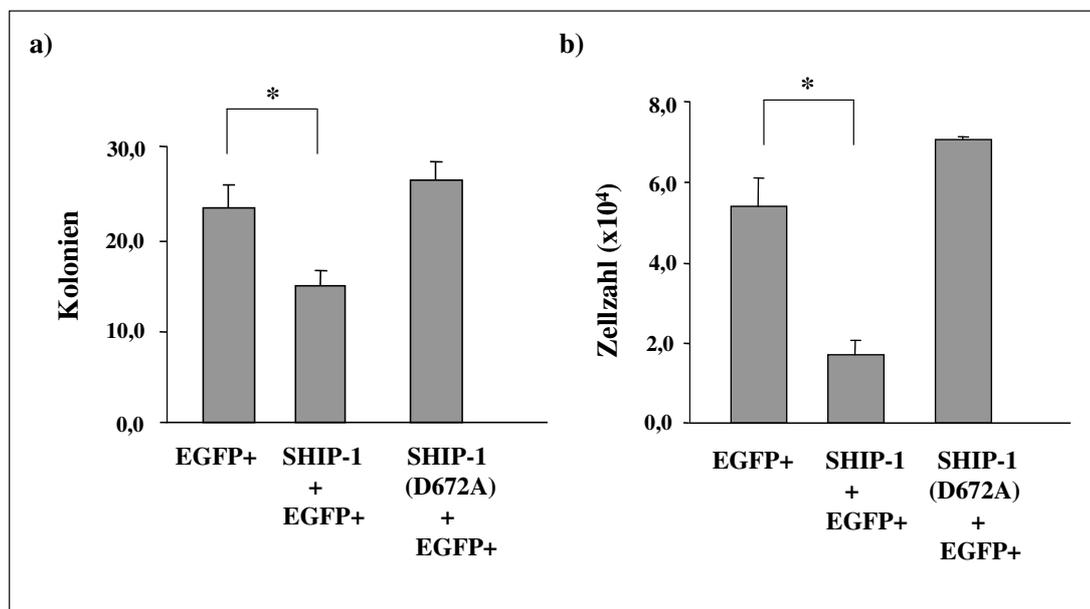


Abb. 6: Die Proliferation der CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut führt zu einer Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1.

a) Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern (Nabelschnurblut) wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert, sortiert und anschließend als Triplikate in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die Koloniezahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺-Zellen bestimmt. * bezeichnet die Signifikanz ($p \leq 0,003$). b) Die CD34⁺-Zellen genauso behandelt wie in a) nur wurden die Zellen nicht in Methylcellulose kultiviert, sondern in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF. Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten ausgesät. Die Ausgangszellzahl war 1000 Zellen/100 μ l Medium. Die Zellen wurden nach zehn Tagen ausgezählt und statisch ausgewertet. * bezeichnet die Signifikanz ($p \leq 0,001$) (Metzner et al., 2007 verändert).

In Abb. 6b wurden die CD34⁺-Zellen transduziert, sortiert und jeweils 1000 Zellen in Triplikaten in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach zehn Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums mit SHIP-1 führt zu einer Reduktion um 69% im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit dem retroviralen Vektor, der nur EGFP enthält, transduziert wurden. Die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) verhält sich wie der Vektor, der nur EGFP enthält. Dies ist ein Zeichen dafür, dass der hemmende Effekt von SHIP-1, von der enzymatischen Aktivität von SHIP-1 abhängig ist.

Um festzustellen, warum nur etwa 50% der mit SHIP-1 transduzierten Zellen Kolonien bilden, wurden die CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern (Nabelschnurblut) mit dem retroviralen Vektor, EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert. Die Zellen wurden dann nach EGFP negativ (G1), schwach EGFP positiv (G2) und hoch EGFP positiv (G3) sortiert (siehe Abb. 7a). Die sortierten CD34⁺-Zellen wurden in Triplikaten von jeweils 1000 Zellen in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Kolonien der 1000 eingesetzten Zellen ausgezählt. Wobei mehr als 20 Einzelzellen eine Kolonie bilden. Die Zahlen wurden dann statistisch ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt (siehe Abb. 7b). Es wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet. Bei dem Vektor mit EGFP konnte keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums festgestellt werden. Bei den CD34⁺-Zellen, die mit SHIP-1 transduziert wurden, konnte bei den schwach EGFP positiven SHIP-1-Zellen eine geringere Hemmung festgestellt werden als bei den hoch EGFP positiven SHIP-1-Zellen. Bei den hoch positiven konnte eine Hemmung von 81% gezeigt werden. Im Gegensatz dazu weisen die Zellen aus „G2“ nur eine Hemmung von 46% auf. Beide Hemmungen sind in Bezug auf die EGFP positiven Zellen statistisch signifikant erniedrigt. Diese Daten zeigen einen konzentrationsabhängigen Effekt von SHIP-1 auf die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Koloniewachstums. Dies lässt vermuten, dass das Wachstum der CD34⁺-Zellen abhängig von der Höhe der SHIP-1 Expression abhängig ist.

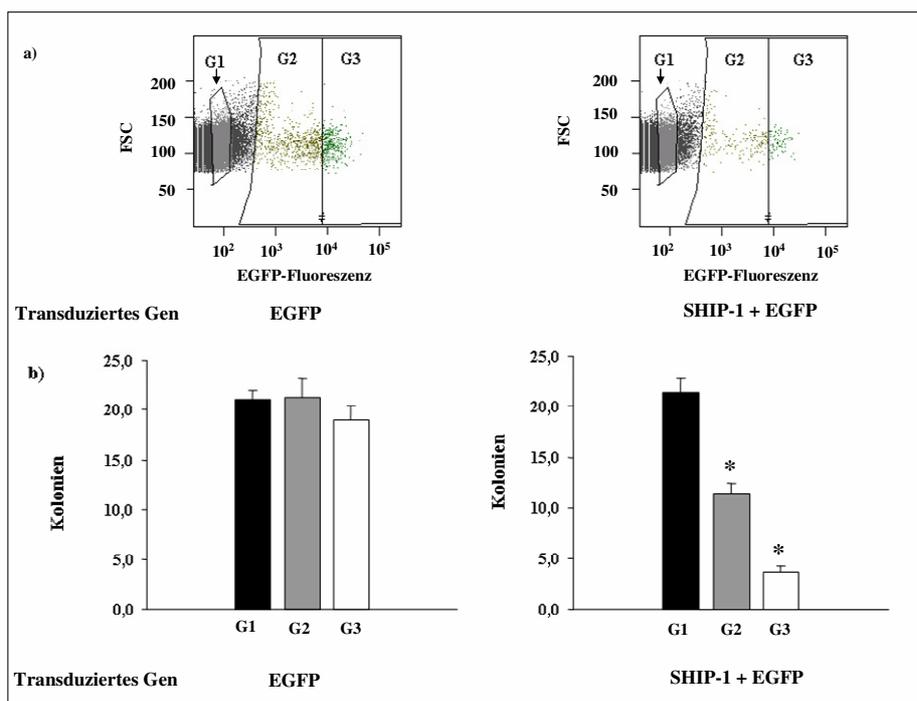


Abb. 7: Der hemmende Effekt von SHIP-1 auf die CFU-GM ist konzentrationsabhängig

a) Die aufgearbeiteten $CD34^+$ -Zellen von gesunden Spendern (Nabelschnurblut) wurden mit dem retroviralen Koexpressionsvektor mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert. Die Zellen wurden dann nach EGFP negativ (G1), schwach EGFP positiv (G2) und hoch EGFP positiv (G3) sortiert. b) Die sortierten Zellen wurden in Triplikaten in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt und die Kolonien nach 14 Tagen ausgezählt. * bezeichnet die hohe Signifikanz ($p \leq 0,001$) (Metzner et al. 2007).

4.2 Expression von SHIP-1 in $CD34^+$ -Zellen von Patienten mit juvenilen myelomonozytären Leukämien (JMML) mit dem Vektor SF91iGpre

Da Patienten mit juvenilen myelomonozytären Leukämien (JMML) Mutationen im Ras-Protein wie in KRAS, oder in Ras Regulatoren, wie im PTPN11-Gen aufweisen, sollten die $CD34^+$ -Zellen dieser Patienten bezüglich ihres Koloniewachstum und ihrer Zellzahl untersucht werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Zellen der JMML-Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern eine höhere Sensitivität gegenüber GM-CSF aufweisen.

4.2.1 Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von einem JMML-Patient#2

Bei dem ersten JMML (JMML-1) Patienten war bereits eine Mutation im PTPN11-Gen bekannt. Die CD34⁺-Zellen dieses Patienten sollten in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten untersucht werden. Hierzu wurden die Granulozyten mittels Ficoll Gradient gereinigt und anschließend CD34⁺ aufgearbeitet. Diese CD34⁺-Zellen wurden dann für 48 Std. in ein Serum-freies Medium mit einem Zytokin-Cocktail aus SCF, TPO, IL-6 und Flt3-Ligand, kultiviert. Nach diesen 48 Std. wurden die Zellen mit einem Virusüberstand, der 1 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ infektiöse Partikel/ml aufwies, mehrmals transduziert und nach zwei Tagen am Sorter nach EGFP positiven Zellen sortiert. Die sortierten Zellen wurden dann in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Methylcellulose kultiviert, der jeweils 10ng/ml GM-CSF zugesetzt wurde. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der *Student's t-Test* berechnet.

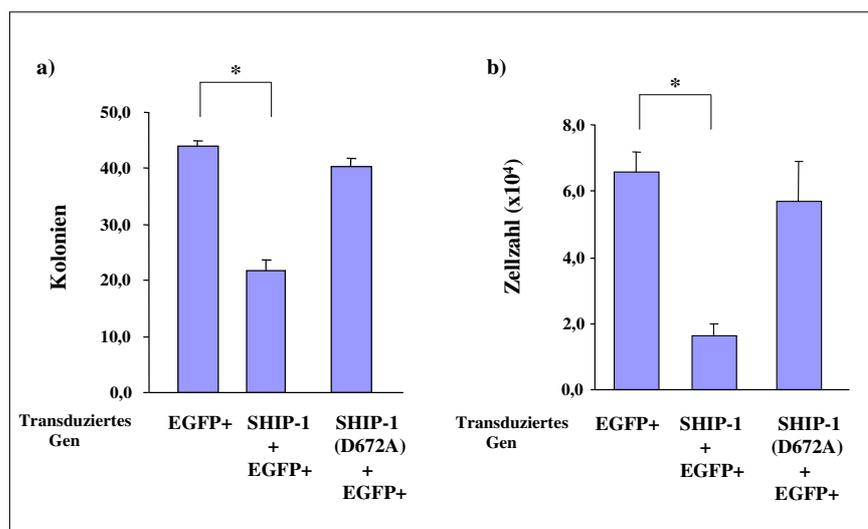


Abb. 8: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des JMML-Patient#2

a) Die CD34⁺-Zellen wurden mit einem retroviralen Vektor, der EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und die enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) besitzt, transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert. Die Zellen wurden in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Methylcellulose gesetzt und mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt, * bezeichnet die Signifikanz ($p \leq 0,01$). b) Die Zellen wurden genauso aufgereinigt wie in a). Die sortierten Zellen wurden in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt. Nach zehn Tagen wurden die Zellen gezählt und statistisch ausgewertet. Die Zellzahl wurde in Zahl x 10⁴ angegeben. Die signifikante Erniedrigung ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,01$) (Metzner et al. 2007, verändert).

Es konnte gezeigt werden, dass das GM-CSF-abhängige Wachstum bei den Zellen, die mit EGFP und SHIP-1 transduziert wurden, zu einer signifikanten Hemmung führt (Abb. 8a).

Im Vergleich dazu zeigten die Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Das GM-CSF-abhängige Wachstum konnte durch die Expression von SHIP-1 um 75% reduziert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch in der Flüssigkultur eine Erniedrigung des GM-CSF-abhängigen Wachstums zu finden ist (In Abb. 8b). Der Vektor EGFP und die Expression der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) zeigen keine signifikante Reduzierung des Wachstums der CD34⁺-Zellen. Eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums ist nur bei den CD34⁺-Zellen, die mit dem Vektor EGFP und SHIP-1 transduziert worden sind, darstellbar. Hier konnte durch SHIP-1 eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums von 75% erreicht werden. Die Hemmung bei diesem Patienten war höher als bei den gesunden Spendern. Es kann also mit SHIP-1 eine höhere Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums bei diesem JMML-Patienten erzielen.

4.2.2. Expression von SHIP-1 in hämatopoetischen Zellen von einem zweiten JMML-Patienten#3

Bei dem zweiten JMML-Patienten war eine Mutation im KRAS2-Gen bekannt. Hierbei handelt es sich um eine Mutation im Ras-Signalweg. Deshalb sollten die CD34⁺-Zellen des Patienten mit dem Vektor und SHIP-1 analysiert werden. Diese sollten in Bezug auf den Vektor EGFP und den Vektor EGFP mit der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672) als Kontrolle analysiert werden. Dazu wurden die CD34⁺-Zellen des JMML-Patienten#3 zuerst aufgereinigt und anschließend die CD34⁺-Zellen in Serum-freiem Medium mit Zytokinen, wie bereits in 4.2.1. beschrieben, für 48 Std. kultiviert. Nach 48 Std. wurden die Zellen mit dem Virusüberstand mehrmals an zwei Tagen mit einem Titer von 1×10^5 bis 1×10^6 infektiösen Partikeln/ml transduziert. Nach der Virustransduktion wurden die Zellen nach EGFP positiv sortiert. Die sortierten Zellen wurden dann in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt. Diese Zellen wurden dann in einer feuchten Kammer zehn bis 14 Tage im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Die ausgezählten Kolonien wurden statistisch ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt (siehe Abb.9a). In Abb. 9a konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums bei den Zellen, die mit EGFP und SHIP-1 transduziert wurden, gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, keine Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstum der Kolonien durch SHIP-1

festgestellt werden. Die Reduzierung der Koloniezahl ist statistisch signifikant. Das Wachstum der Zellen konnte um 51% gehemmt werden. Dies zeigt deutlich, dass durch SHIP-1 das Wachstum der CD34⁺-Zellen des JMML-Patienten gehemmt werden kann.

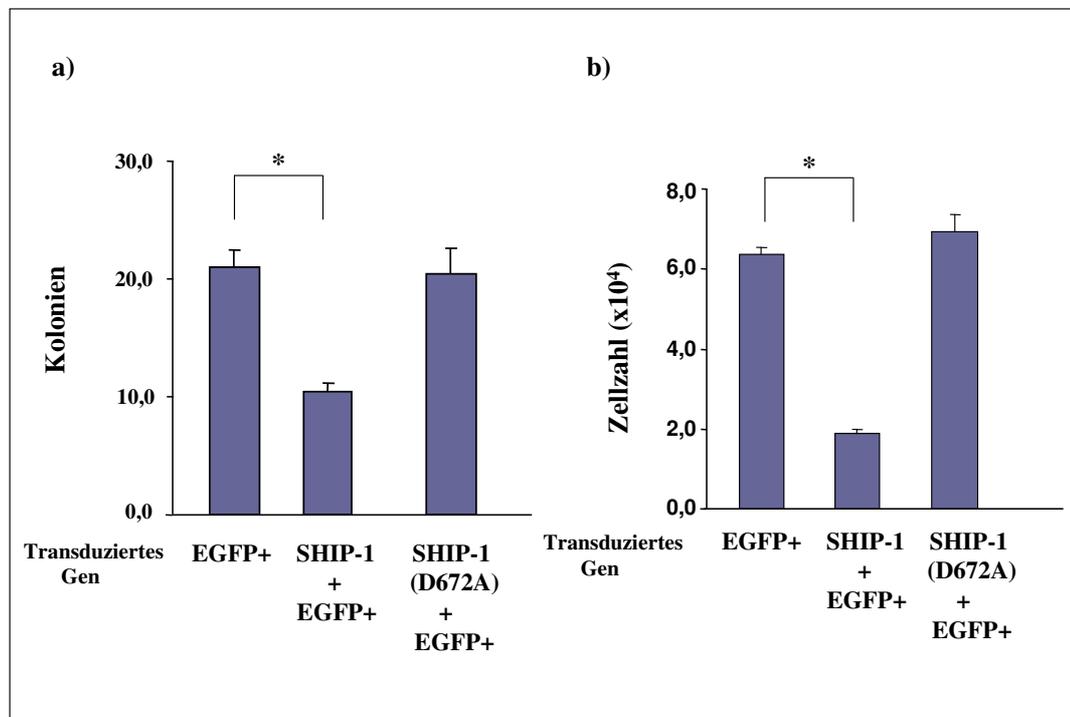


Abb. 9: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 bei einem zweiten JMML-Patienten#3

a) Die CD34⁺-Zellen wurden mit einem retroviralen Koexpressionsvektor, der EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1(D672A) besitzt, transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen am FACS Aria sortiert. Die Zellen wurden in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Methylcellulose gesetzt und mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. * signifikant ($p \leq 0,01$). b) hier wurden die Zellen genauso aufgereinigt wie in a). Die sortierten Zellen wurden dann in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Serum freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt. Nach zehn Tagen wurden die Zellen gezählt und statistisch ausgewertet. Die Zellzahl wurde in Zahl x 10⁴ angegeben. Die signifikante Erniedrigung ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,01$) (Metzner et al. 2007, verändert).

Es konnte bei den Zellen, die mit SHIP-1 transduziert worden sind, in der Flüssigkultur eine signifikante Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums gezeigt werden (Abb. 9b). Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums zeigte eine Reduktion von 70%. Bei den beiden Kontrollen, dem Vektor oder dem Vektor und die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) konnte keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums nachgewiesen werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Zellen des JMML-Patienten#3 auf unterschiedliche GM-CSF Konzentrationen unterschiedlich stark reagieren. Dies sollte zuerst an transduzierten Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden $CD34^+$ aufgereinigt und in Serum-freiem Medium mit Zytokinen für zwei Tage kultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte eine mehrmalige Virustransduktion über zwei Tage. Danach wurden die EGFP positiven Zellen am FACSaria sortiert. Nach dem Sortieren wurden die Zellen in Serum-freiem Medium mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen gesetzt. Es wurden Konzentrationen von 0ng/ml, 0,001ng/ml, 0,01ng/ml, 0,1ng/ml, 1ng/ml und 10ng/ml eingesetzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen, die mit SHIP-1 transduziert wurden, eine deutliche Verminderung des Wachstums zeigen (Abb. 10). Es konnte eine Hemmung um das Siebenfache erzielt werden. Ferner konnte festgestellt werden, dass mit der GM-CSF Konzentration auch die Zellzahl um das Doppelte ansteigt. Im Gegensatz dazu steigt das Wachstum der Zellen, die nur mit EGFP transduziert wurden, deutlich an. Dies zeigt, dass SHIP-1 effizient das GM-CSF-abhängige Wachstum der $CD34^+$ -Zellen dieses JMML- Patienten hemmt.

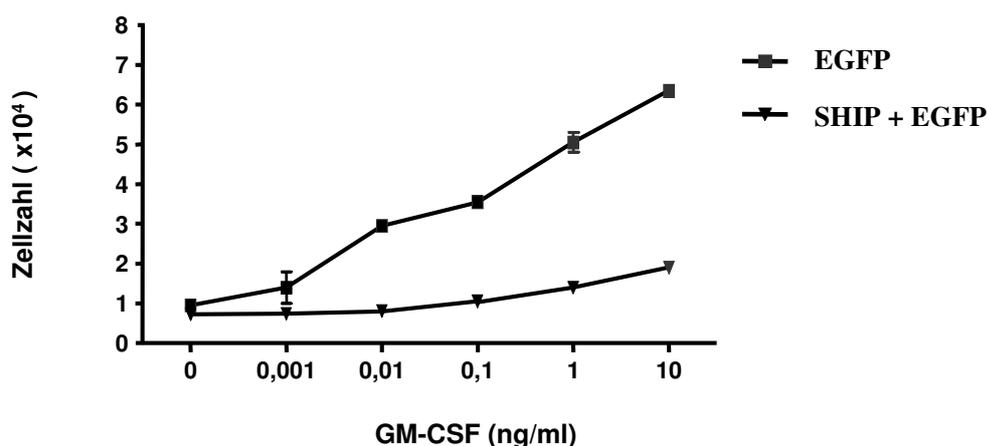


Abb.10: Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der $CD34^+$ -Zellen durch SHIP-1 mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen

Die $CD34^+$ -Zellen wurden mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert und anschließend in Serum-freiem Medium mit den GM-CSF Konzentrationen: 0ng/ml, 0,001ng/ml; 0,01ng/ml, 0,1ng/ml; 1,0ng/ml und 10ng/ml inkubiert. Die Zellzahl wurde in Zahl x 10^4 angegeben. Die Zellen wurden nach zehn Tagen ausgezählt und statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Mittelwert bestimmt, sowie die Standardabweichung. Dazu wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Die geringe Standardabweichung ist bei den meisten Punkten nicht zu sehen (Metzner et al., 2007).

Aufgrund der Ergebnisse, dass die $CD34^+$ -Zellen des zweiten JMML-Patienten#3 auch ohne GM-CSF in der Flüssigkultur wachsen, sollten die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) auf ihre Sensitivität gegenüber GM-CSF untersucht werden. Dazu wurden diese Zellen des JMML-Patienten#3 aufgereinigt und anschließend in Methylcellulose mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen kultiviert. Zur Kontrolle wurden die PBMC

eines gesunden Spenders mittels Ficollgradienten aufgereinigt und ebenfalls in Methylcellulose mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen kultiviert. Nach zehn bis 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt und statistisch ausgewertet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen des gesunden Spenders eine bestimmte Konzentration an GM-CSF benötigen, damit Kolonien wachsen. Das Minimum der GM-CSF Konzentration beträgt 0,01ng/ml. Das beste Wachstum zeigt sich allerdings bei 10ng/ml (Abb. 11). Bei den Zellen des JMML-Patienten#3 zeigt sich schon ein stärkeres Koloniewachstum ohne GM-CSF. Durch die Erhöhung der GM-CSF Konzentration konnte das Koloniewachstum ebenfalls erhöht werden. Bei einer Konzentration von 10ng/ml wurde eine Erhöhung der Koloniezahl um fast das Doppelte, im Vergleich zu der Koloniezahl, die ohne GM-CSF gewachsen ist, erreicht. Bei dem JMML-Patient#3 waren im Vergleich zu dem gesunden Spender ohne GM-CSF 20 Kolonien zu erkennen.

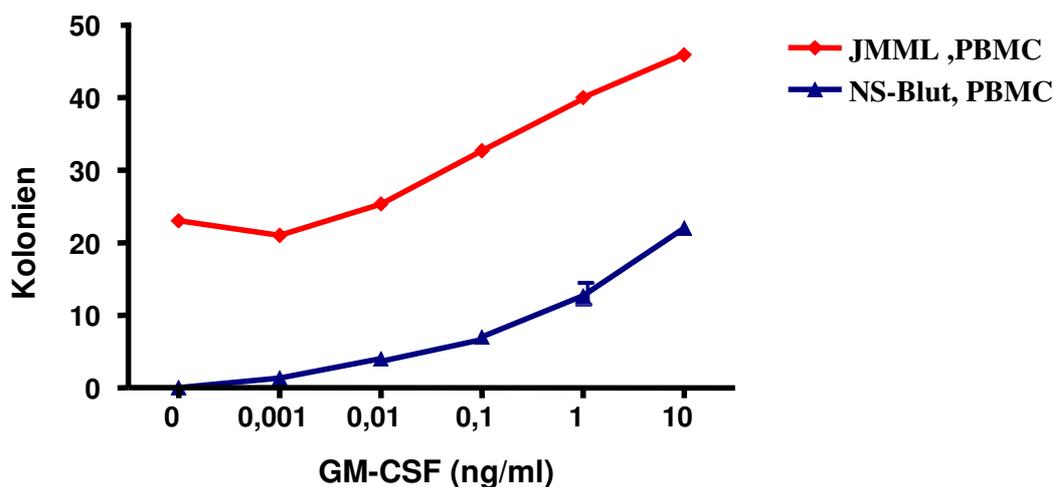


Abb.11: GM-CSF-abhängiges Wachstum nicht transduzierter Zellen eines gesunden Spenders und des JMML-Patienten#3

Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden in Methylcellulose mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen kultiviert. Die Konzentrationen waren: 0ng/ml; 0,001ng/ml; 0,01ng/ml; 0,1ng/ml; 1,0ng/ml und 10ng/ml. Die Blaue Kurve zeigt die PBMCs eines gesunden Spenders, während die rote Kurve die peripheren mononukleären Zellen des JMML-Patienten#3 darstellt.

4.2.3. Untersuchungen zum SHIP-1-Gehalt

Es wurden Western Blots zur Analyse von SHIP-1- und p-AKT (S473) durchgeführt. Hierzu wurde von den peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) der gesunden Spender und der beiden JMML-Patienten Lysate mit Trichloressigsäure hergestellt. Durch die Trichloressigsäure wird die Protease, welche das SHIP-1-Protein abbaut, sofort gehemmt. Im

Western Blot wurden der SHIP-1-Antikörper (P1C1) und ein p-AKT-Antikörper verwendet, der die Phosphorylierung am Serinrest 473 erkennt, verwendet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Zellen der gesunden Spender SHIP-1 besitzen, während wenig bis gar kein p-AKT nachweisbar ist. Bei den JMML-Patienten ist SHIP-1 detektiert worden, aber im Gegensatz zu den gesunden Spendern ist hier auch p-AKT nachweisbar (siehe Abb. 12). Als Positivkontrolle für SHIP-1 wurden TF-1-Zellen aufgetragen, die endogenes SHIP-1 besitzen. Die uninduzierten Jurkat#51-Zellen wurden sowohl als Negativkontrolle für SHIP-1 und als auch als Positivkontrolle für p-AKT verwendet.

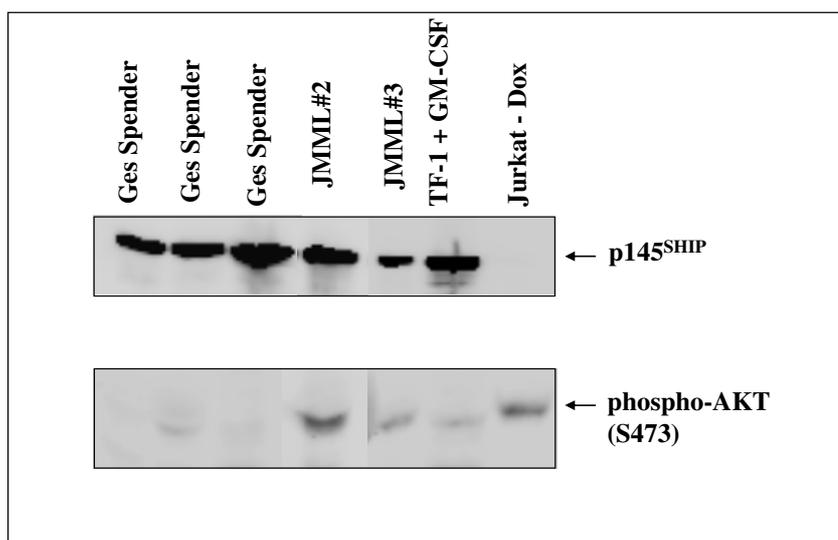


Abb. 12: Western Blot der Expression von SHIP-1 und p-AKT von gesunden Spendern und JMML-Patienten.

Es wurden jeweils 100µg Lysat aufgetragen. Gesunde Spender bezeichnen jeweils gesunde periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von Nabelschnurblut. TF-1 Zellen wurden als Positivkontrolle für SHIP-1 aufgetragen und Jurkat#51 Zellen ohne Doxycyclin als Negativkontrolle für SHIP-1 und als Positivkontrolle für p-AKT. Der Blot wurde mit einem SHIP-1 (P1C1) Antikörper und einem p-AKT Antikörper (S473) inkubiert.

4.3. Immunfärbungen mit SHIP-1 und p-AKT

Da bei den Leukämien, die noch analysiert werden sollten, auch eine SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-AlexaFluor647 (APC) Färbung durchgeführt werden sollte, wurde diese Doppelfärbung an den Jurkat#51-Zellen etabliert. Bei den Jurkat#51-Zellen handelt es sich um eine T-Zell-Leukämie-Zelllinie, die kein endogenes SHIP-1 Protein exprimiert. Um SHIP-1 in Jurkat-Zellen zu exprimieren, wurde der Jurkat#51-Klon von Dr. Stefan Horn aus einer Jurkat-Zelllinie etabliert, die bereits einen reversen Transaktivator besitzt (Jurkat-Tet-On). Durch die Zugabe von Doxycyclin kommt es zur Induktion der Expression von SHIP-1. Dieses als „Tet-On“ bezeichnete System benutzt einen reversen Transaktivator, der in der verwendeten Zelllinie stabil exprimiert wird. In Gegenwart von

Doxycyclin bindet er an ein Tetracyclin-Responsives-Element (TRE) in einem Promotor. In den 3'-LTR wurde ein TRE kloniert, das nach der Transduktion der Zielzellen und Integration des retroviralen Genoms im 5'-LTR liegt und eine Doxycyclin-induzierbare SHIP-1-Expression ermöglicht. Hierzu wurden die Jurkat#51 Zellen mit 0,8 μ g/ml Doxycyclin für 48 Std. kultiviert. Um zu zeigen dass die Antikörper funktionieren wurden zuerst Einzelfärbungen durchgeführt. Dazu wurden die Jurkat#51-Zellen mit SHIP-1-Alexa488 (SHIP-1-FITC) und mit p-Akt-AlexaFlour647 (p-AKT-APC) gefärbt. In Abb. 12a sind die uninduzierten Jurkat#51-Zellen dargestellt. Der APC-Kontrollantikörper zeigt keine Färbung, während 92,46% der Jurkat#51-Zellen, die mit dem p-AKT-APC-Antikörper gefärbt wurden, für p-AKT positiv sind. Die mit Doxycyclin induzierten Jurkat#51-Zellen wurden mit SHIP-1-FITC gefärbt und es waren 37,74% der Zellen SHIP-1 positiv. Dies zeigt, dass die Antikörper in den Einzelfärbungen sehr sensitiv sind.

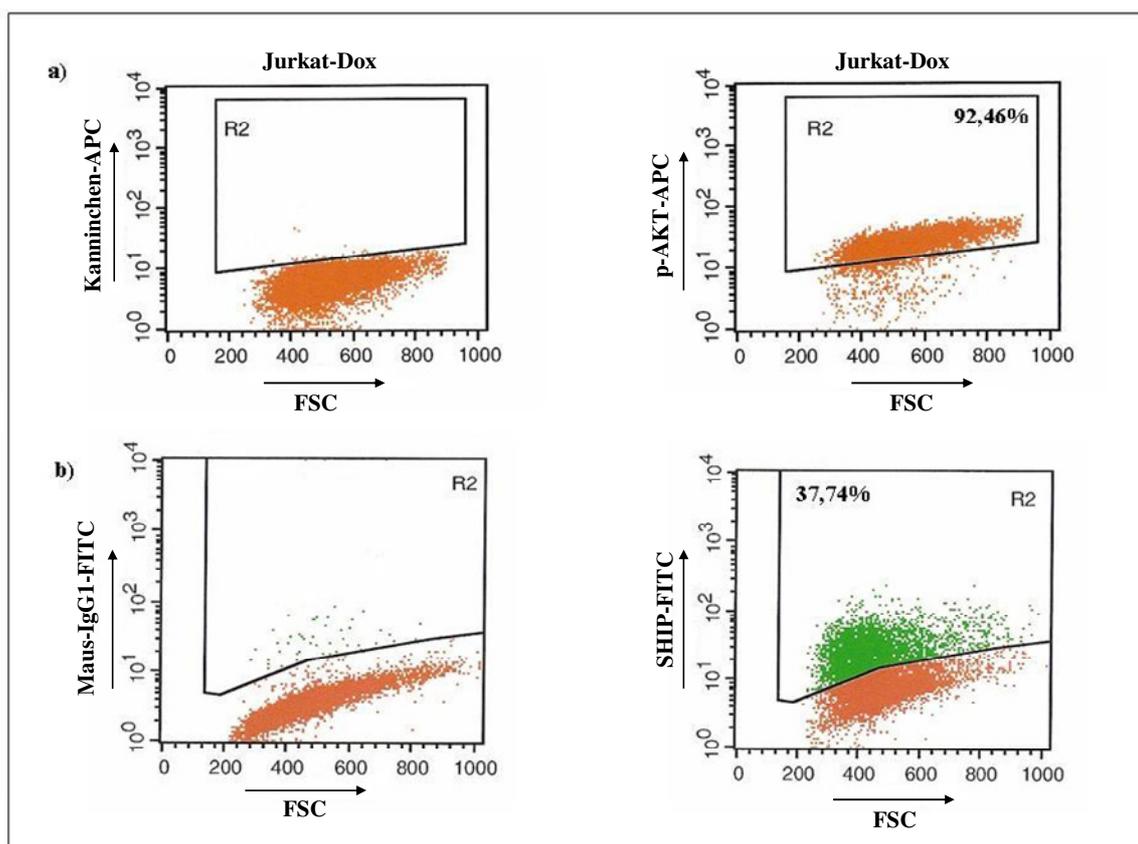


Abb. 13: Einzelfärbung der Jurkat#51-Zellen mit p-AKT-APC und SHIP-FITC

- a) Die uninduzierten Zellen wurden mit einem Kaninchen Kontrollantikörper, der direkt mit APC gekoppelt ist, gefärbt. Dies ist im linken Bild dargestellt. Im rechten Bild sind die Zellen dargestellt, die p-AKT positiv sind.
- b) Die Jurkat#51-Zellen wurden mit 0,8 μ g/ml Doxycyclin für 48 Std. induziert. In der linken Abb. wurden die Zellen mit einem Maus Kontrollantikörper, der mit Alexa488 (FITC) gekoppelt ist, gefärbt. In der rechten Abb. sind die Zellen gezeigt, die SHIP-1 positiv sind. FSC: *Forward scatter*

Dasselbe Experiment wurde dann noch einmal durchgeführt, indem die Zellen mit anti-SHIP-1-FITC und anti-p-AKT-APC gleichzeitig gefärbt wurden. Die Jurkat#51-Zellen wurden mit 0,8µg/ml Doxycyclin für 48 Std inkubiert. Die uninduzierten und induzierten Jurkat#51-Zellen wurden dann mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit 100% Methanol permeabilisiert. Dann wurden die Zellen erst mit anti-SHIP-1, dann mit Alexa488 und anschließend mit anti-p-AKT-APC gefärbt. In Abb. 14a sind die uninduzierten Jurkat#51-Zellen dargestellt. In der linken Abb. sind die Negativkontrollen für SHIP-1 mit Alexa488 und p-Akt-APC dargestellt. Die Abszisse wurde mit Maus IgG1-FITC und die Ordinate mit Kaninchen-APC bezeichnet. Es sind keine der uninduzierten Jurkat#51-Zellen sowohl SHIP-1 positiv als auch p-AKT positiv. In der rechten Abb. sind die Zellen dargestellt, die positiv für SHIP-1 und/oder für p-AKT sind. Dazu wurden in der Abb. die Abszisse mit SHIP-FITC und die Ordinate mit p-AKT-APC bezeichnet. 20% der uninduzierten Zellen zeigen p-AKT. SHIP-1 dagegen kann nicht detektiert werden. In Abb. 14b sind die Doxycyclin-induzierten Zellen gezeigt. In der linken Abb. ist die Kontrollfärbung mit einem Antikörper gleichen Klons sowohl für SHIP-1 als auch für p-AKT dargestellt. In der rechten Abb. sind die Zellen gezeigt, die SHIP-1 und/oder p-AKT positiv sind. Diese Färbung ist die Bestätigung dafür, dass die induzierten Jurkat#51-Zellen SHIP-1 besitzen, aber kaum p-AKT. Dies ist die Kontrolle dafür, dass die p-AKT-APC Färbung mit der SHIP-1Alexa488-Färbung funktioniert. Wobei allerdings die p-AKT Färbung etwas schwächer ausfällt als in Abb.13a.

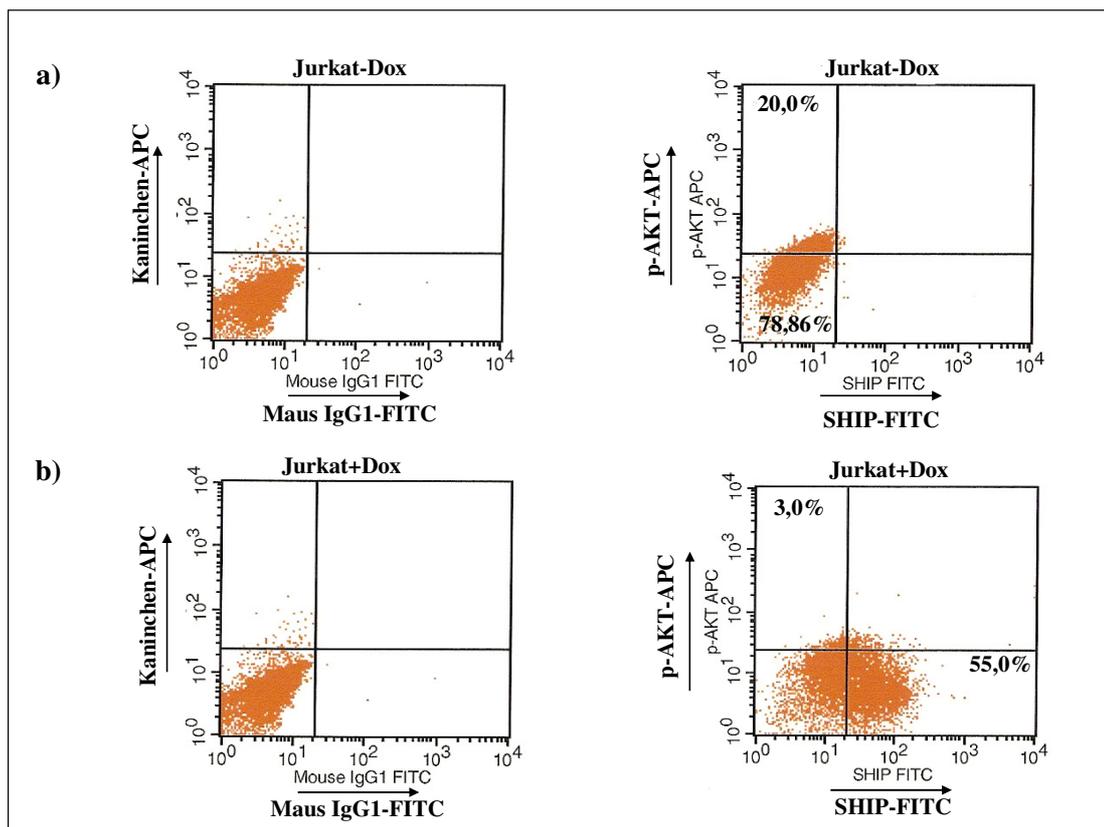


Abb.14: Immunfärbung der Jurkat#51-Zellen mit anti-SHIP-FITC und anti-p-AKT-APC

a) Die Jurkat#51-Zellen wurden mit 0,8 μ g/ml Doxycyclin für 48 Std. induziert. In der linken Abb. wurden die Zellen mit einem Kaninchen Kontrollantikörper, der direkt mit APC gekoppelt ist, und mit einem Maus IgG1 Antikörper, der mit AlexaFluor488 gekoppelt ist, gefärbt. In der rechten Abb. sind nach rechts die Zellen aufgetragen, die SHIP-1 positiv sind und nach oben die Zellen, die p-AKT positiv sind. In den einzelnen Quadranten sind die Prozentzahlen angegeben. In den Quadranten, in denen keine Prozentzahlen stehen, ist die Prozentzahl 0%. b) Die uninduzierten Zellen wurden mit einem Kaninchen Kontrollantikörper und einem Maus IgG1 Antikörper gefärbt. Dies ist im linken Bild dargestellt. Im rechten Bild sind nach rechts die Zellen dargestellt, die SHIP-1 positiv sind und nach oben die Zellen, die p-AKT positiv sind. APC: Allophycocyanin; FITC: Fluoresceinisothiocyanat

4.4. Expression von SHIP-1 mittels eines lentiviralen Vektors

pRRL.sinh.CMV.GFPpre

Da die SHIP-1-*knockout*-Maus ähnliche Symptome aufweist wie die Patienten mit myeloischen proliferativen Syndromen, sollten die Zellen von Patienten mit myeloproliferativen Syndromen und akuten myeloischen Leukämien untersucht werden, wie sich das Wachstum der Zellen mit SHIP-1 verhält. Da die Zellen von Patienten mit akuten myeloischen Leukämien und myeloproliferativen Syndromen nicht mit dem retroviralen Vektor transduziert werden konnten, musste hierfür ein lentiviraler Vektor verwendet werden, in den SHIP-1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672) kloniert wurde. Für

die Herstellung des lentiviralen Virusüberstands wurden 293T-Zellen verwendet. Der verwendete Virusüberstand besaß 1×10^5 - 5×10^6 infektiöse Partikel/ml. Es wurden insgesamt die Zellen von 12 AML-Patienten unterschiedlicher Untertypen und Zellen von einem MPS-Patienten (OMF) untersucht

4.4.1. Untersuchungen des Wachstumsverhaltens durch SHIP-1 der CD34⁺-Zellen von gesunden Spendern

Zuerst sollten Zellen von gesunden Spendern (Nabelschnurblut) auf ihr Wachstumsverhalten nach der SHIP-1 Expression untersucht werden. Dazu wurden die CD34⁺-Zellen der gesunden Spender aufgereinigt und anschließend für 2 Tage in Serumfreiem Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, Il-6 und Flt-3-Ligand kultiviert. Nach diesen 2 Tagen wurden die Zellen mit dem Virusüberstand an 3 aufeinander folgenden Tagen jeweils 90 min transduziert. Die Zellen wurden dann nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Triplikaten von je 1000 Zellen in Methylcellulose gesetzt, die mit SCF, Il-3 und GM-CSF versetzt war. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt, wobei eine Kolonie mindestens aus 20 Einzelzellen besteht. Anschließend wurden die Daten statistisch ausgewertet. Es wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der *Student's-t*-Test berechnet. Hier konnte gezeigt werden, dass die CD34⁺-Zellen, die mit SHIP-1 transduziert wurden, eine signifikante Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 zeigen. Während im Gegensatz dazu keine Hemmung bei den CD34⁺-Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden, zu erkennen war. Dies war auch bei den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672) transduziert wurden, der Fall. Dies zeigt, dass die Funktion von SHIP-1 von der Enzymaktivität abhängig ist. Die EGFP negativen Zellen zeigen ebenso keine Hemmung des Wachstums. (siehe Abb. 15). EGFP ist für die CD34⁺-Zellen nicht schädlich, da die nicht transduzierten Zellen genauso viele Kolonien bilden wie die mit EGFP transduzierten Zellen. Es konnte eine hoch signifikante Erniedrigung des Wachstums von 50% gezeigt werden.

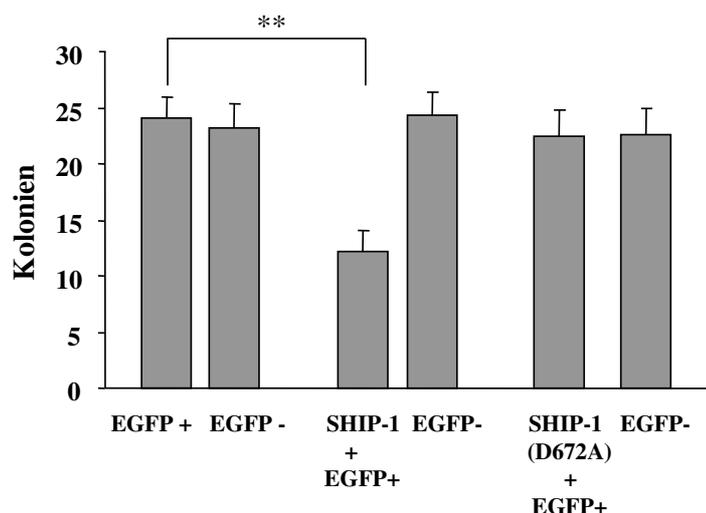


Abb. 15: Hemmung des Wachstums durch SHIP-1

Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672) transduziert und nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Methylcellulose, die bereits IL-3, SCF und GM-CSF beinhaltet, gesetzt und 14 Tage inkubiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt, statistisch ausgewertet und als Diagramm dargestellt. ** hoch signifikant ($p \leq 0,0001$).

Um zu überprüfen, ob das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen in Methylcellulose gehemmt werden konnte, wurden die sortierten Zellen für 14 Tage in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Hier wurden jeweils drei unterschiedliche gesunde Spender untersucht. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen ausgezählt und statistisch ausgewertet, wobei der Mittelwert, die Standardabweichung und der Students T-Test berechnet wurden. Die Daten sind in Abb. 16 als Diagramm dargestellt. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 ist hoch signifikant im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP transduziert wurden. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 beträgt 67%. Das GM-CSF-abhängige Wachstum kann mit SHIP-1 wesentlich besser gehemmt werden als mit den anderen Zytokinen zusammen (siehe Abb.15 und 16).

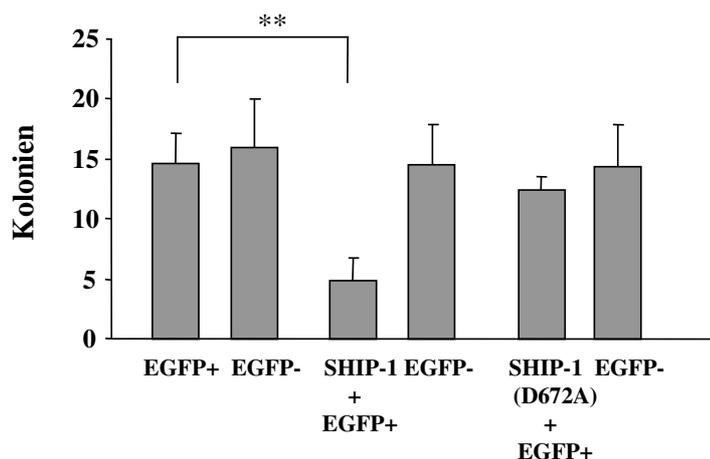


Abb. 16: Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstum durch SHIP-1 in semi-solidem Medium

Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert und 14 Tage inkubiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt, statistisch ausgewertet und als Diagramm dargestellt. Die Signifikanz ist durch ** gekennzeichnet ($p \leq 0,0001$).

Um zu sehen, ob die CD34⁺-Zellen auch mit dem lentiviralen Vektor in Serum-freien Medium mit GM-CSF wachsen, wurden die CD34⁺-Zellen nach der Transduktion mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672), nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden für 14 Tage in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt und statistisch ausgewertet, dabei wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Students T-Test berechnet. Die Daten wurden von drei unabhängigen gesunden Spendern (Nabelschnurblut) ermittelt. Die Auswertung wurde in Abb. 17 dargestellt. Auch hier ist eine signifikante Erniedrigung des GM-CSF-abhängigen Wachstums zu erkennen. Es wurden sowohl die EGFP positiven und die EGFP negativen Zellen ausgewertet. Dies wurde sowohl für den EGFP als auch für EGFP und SHIP-1 und EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) durchgeführt. Die EGFP negativen CD34⁺-Zellen zeigen keine Hemmung des Wachstums. Bei den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, konnte ebenfalls keine Reduktion des Wachstums festgestellt werden (siehe Abb. 17). Es konnte eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 von 90% nachgewiesen werden.

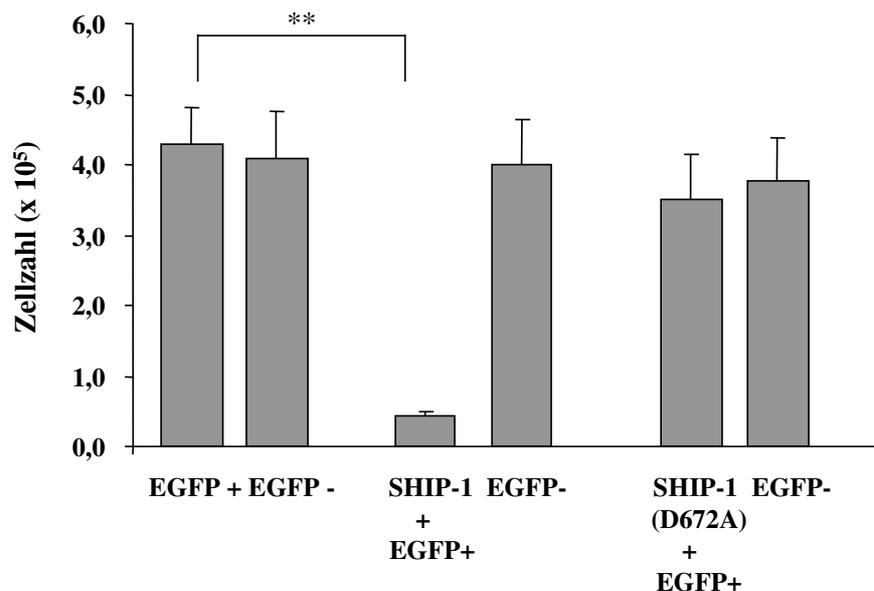


Abb. 17: Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 in der Flüssigkultur

Die CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672) transduziert und nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Triplikaten zu je 1000 Zellen in Serum-freies Medium mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt und nach 14 Tagen ausgezählt. Die Zellzahl wurde in Zellzahl x 10⁵ angegeben. ** hoch signifikant ($p \leq 0,0001$).

4.4.2. Untersuchungen zur Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 an den Zellen verschiedener AML-Patienten

I. AML-Patient#4

Bei der ersten AML handelt es sich um einen Patienten, bei dem eine AML mit der Unterklasse M5 festgestellt wurde. Bei der M5 handelt es sich um eine AML, bei der eine deutlich höhere Anzahl von mononukleären Zellen im Blut zu finden ist. Bei diesen mononukleären Zellen handelt es sich zum Teil um reife Monozyten oder unreife Monoblasten. Die aufgetauten PBMC des AML-Patienten#4 wurden CD34⁺ aufgereinigt und drei Tage in Serum-freiem Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, IL-6 und Flt3-Ligand kultiviert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit dem Virusüberstand an drei aufeinander folgenden Tagen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden am FACSaria nach EGFP positiven Zellen sortiert und jeweils in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF oder ohne GM-CSF gesetzt und für 14 Tage im Inkubator kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen, weder mit noch ohne GM-CSF.

Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da die Zellen, die in Methylcellulose und 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden, immer gewachsen sind. Die sortierten Zellen wurden außerdem in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF oder ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt. Es sind nur die Zellen gewachsen, die mit GM-CSF kultiviert wurden. Die CD34⁺-Zellen, die ohne GM-CSF gehalten wurden, sind nicht gewachsen. So konnten nur die Daten der CD34⁺-Zellen, die in Serum-freiem Medium mit GM-CSF gewachsen sind statistisch ausgewertet werden. Dabei wurde der Mittelwert, die Standardabweichung, sowie der Students T-Test ermittelt (siehe Abb. 18a).

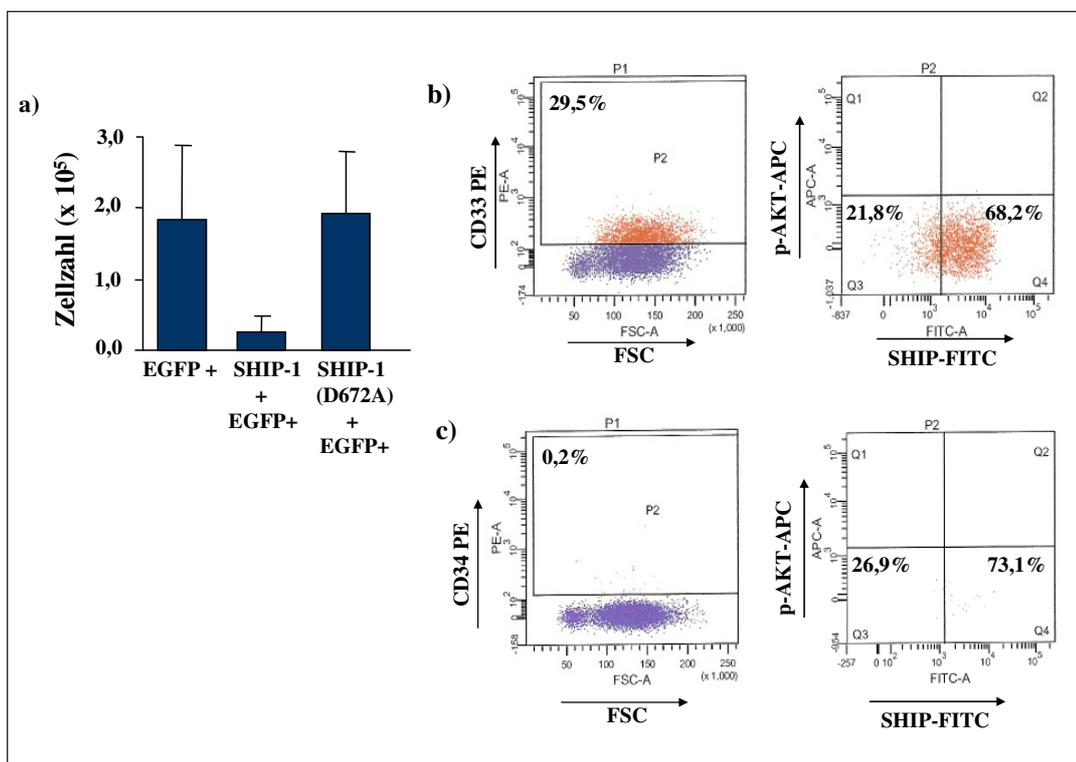


Abb.18: Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der Zellen durch SHIP-1 des AML-Patient#4 und Immunfärbung CD33-PE, CD34-PE, SHIP-FITC, p-AKT-APC

a) Die CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die Zellen wurden sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF inkubiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt und die Zellzahl x 10⁵ angegeben. b) Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden zuerst CD33-PE gefärbt und anschließend mit SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-Alexa647 (APC) gefärbt. Es wurde ein *Gate* auf die CD33 positiven Zellen gelegt. 29,5% der Zellen sind CD33 positiv. Davon sind 68,2% SHIP-1 positiv und keine p-AKT-APC positiv. Die untersuchten PBMCs, die weder SHIP-1 noch p-AKT-APC positiv sind, liegen bei 21,8%. c) Die PBMC wurden mit einem CD34-Antikörper gefärbt, der direkt mit Phycoerythrin gekoppelt ist. Anschließend wurden die Zellen noch mit SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-APC gefärbt. Dann wurden die PBMCs am FACS durchflußzytometrisch analysiert. Es wurde ein *Gate* auf die CD34⁺-Zellen gelegt. Es waren nur 0,2% der Zellen CD34 positiv. Von denen waren 73,1% SHIP-1 positiv und 26,9% waren für SHIP-1 und p-AKT negativ. Es waren keine Zellen p-AKT positiv. PE: Phycoerythrin; FITC: Fluoreszeinisothiocyanat.

Die CD34⁺-Zellen, die mit SHIP-1 transduziert worden sind, zeigen eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Diese Hemmung beträgt 73,8%. Die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder mit EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigten keine Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Dies zeigt auch hier, dass die Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 auf die enzymatische Aktivität von SHIP-1 zurückzuführen ist. Wäre nicht die Enzymaktivität dafür verantwortlich, würde auch die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) zu einer Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums führen. Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden nach dem Auftauen sofort mit 1% BSA in PBS blockiert. Nach dem Blockieren wurden die Zellen entweder mit CD33-PE oder CD34-PE (siehe Abb. 18b und 18c) gefärbt. Die so gefärbten Zellen wurden dann mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert und mit 100% Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit P1C1 (SHIP-1)-Alexa488 und p-AKT-APC gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS gemessen und ausgewertet. In Abb. 18b konnte gezeigt werden, wie viele von den CD33 positiven Zellen SHIP-1 positiv sind und wie viele p-AKT positiv sind. Es wurde auf die CD33 positiven Zellen ein *Gate* gesetzt und in der rechten Abb. in einem Quadrat, das in 4 Quadranten unterteilt ist, dargestellt, wie viele Zellen p-AKT, SHIP-1 positiv und wie viele Zellen sowohl p-AKT als auch SHIP-1 positiv sind. Im rechten oberen Quadranten sind die Zellen dargestellt, die sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv sind. In Abb. 17c wurde auf die CD34⁺-Zellen ein *Gate* gesetzt und dargestellt wie viele Zellen davon SHIP-1 positiv sind und wie viele p-AKT positiv sind. Im rechten oberen Quadranten befinden sich die Zellen, die sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv sind, rechts unten die SHIP-1 positiven, links unten die negativen Zellen und links oben die p-AKT positiven Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen dieses AML-Patienten in Serum-freiem Medium hemmbar ist. Allerdings wachsen in Methylcellulose keine Kolonien. Die Färbung zeigt, dass SHIP-1 vorhanden ist, p-AKT jedoch nicht.

II. AML-Patient#5

Bei der zweiten AML handelt es sich um eine AML des Subtyps M4. Dabei handelt sich um eine myelomonozytäre Leukämie, bei der der Anteil der Monozyten über 20% liegt. Die aufgetauten peripheren mononukleären Zellen wurden CD34⁺ aufgereinigt und

anschließend für 3 Tage in Serum-freiem Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, IL-6 und Flt3-Ligand kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und in Methylcellulose mit und ohne GM-CSF, sowie in Serum-freiem Medium mit und ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien gezählt, aber auch bei diesem Patienten sind keine Kolonien gewachsen. In der Flüssigkultur dagegen sind die CD34⁺-Zellen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden gewachsen, während die Zellen, die ohne GM-CSF kultiviert wurden nicht gewachsen sind. Es konnte gezeigt werden, dass die CD34⁺-Zellen, die mit SHIP-1 transduziert wurden, eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums zeigen (Abb. 19a). Es konnte eine Hemmung von 87,4% gezeigt werden. In Abb. 19b wurden die aufgetauten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) sofort mit einem anti-CD33-Antikörper, der direkt mit PE gekoppelt ist, inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem anti-SHIP-1-Antikörper, der direkt mit dem Farbstoff Alexa488 (FITC) gekoppelt wurde, und einem direkt gekoppelten p-AKT-APC-Antikörper gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden dann am FACS analysiert. Es wurde ein *Gate* auf die CD33 positiven Zellen gesetzt und dann konnten die Zellen in einem Quadrat mit vier verschiedenen Quadranten analysiert werden. Es sollte gezeigt werden, wie viele Zellen p-AKT positiv sind, wie viele SHIP-1 positiv und wie viele Zellen sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv sind. Nur 6,4% der Zellen sind CD33 positiv, davon sind 92,1% SHIP-1 positiv und keine Zelle p-AKT positiv. 7,7% sind weder SHIP-1 positiv noch p-AKT positiv.

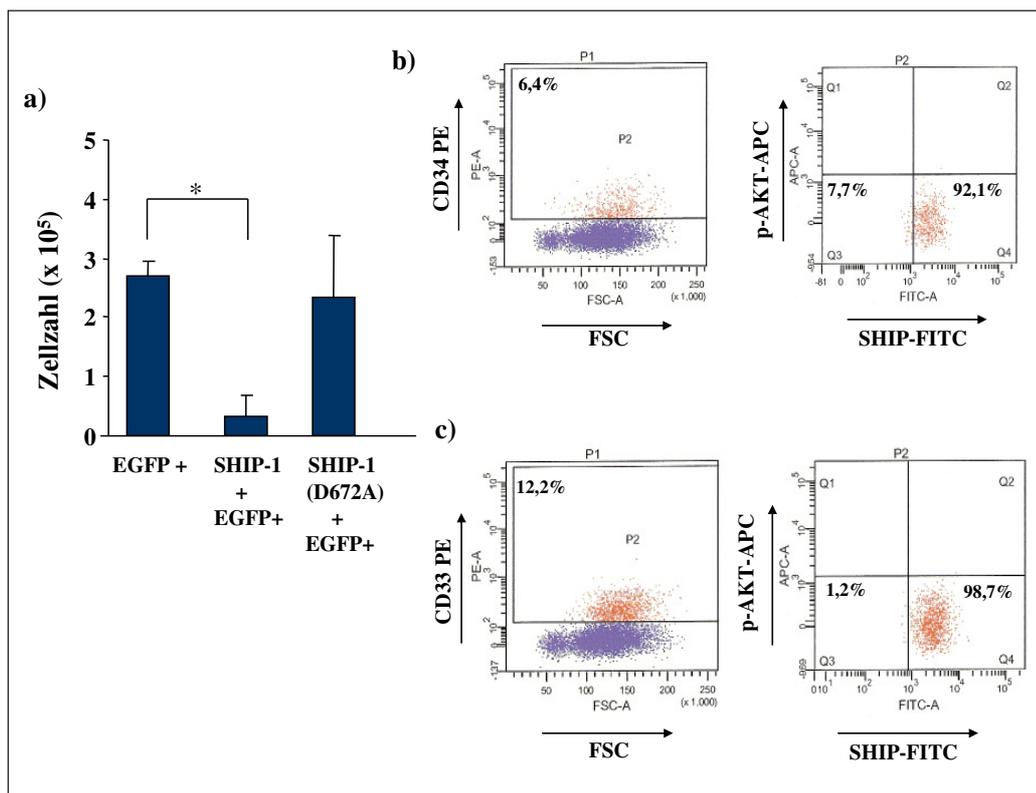


Abb. 19: Reduktion des GM-CSF abgängigen Wachstums der Zellen durch SHIP-1 des AML-Patient#5 und Immunfärbung CD33-PE und CD34-PE

a) Die CD34⁺ aufgereinigten Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF für 14 Tage inkubiert. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,001$). Die Zellzahl wurde in Zahl x 10⁵ angegeben. b) Die PBMCs wurden mit CD34-PE, SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-APC gefärbt. 6,4% der Zellen waren CD34⁺, SHIP-1 positiv waren 92,1% und 7,7% der Zellen waren weder p-AKT positiv noch SHIP-1 positiv. Es waren keine Zellen p-AKT positiv. c) Hier wurden die PBMCs nach dem Auftauen mit CD33-PE und anschließend mit SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-APC gefärbt. Es konnten 12,2% CD33 positive Zellen gezeigt werden. Es waren 98,7% SHIP-1 positive und 1,2% waren weder SHIP-1 noch p-AKT positiv.

In Abb. 19c wurden die aufgetauten PBMCs sofort mit einem anti-CD34-Antikörper inkubiert, anschließend mit einem p-AKT-APC-Antikörper und SHIP-1-Antikörper gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS durchflußzytometrisch bestimmt. Dabei wurde ein *Gate* auf die CD34⁺-Zellen gesetzt, um zu sehen, wie viele Zellen davon p-AKT-APC positiv und wie viele Zellen SHIP-1 positiv sind. Es waren 12,2% der Zellen CD34 positiv, davon waren keine Zellen p-AKT positiv, aber 98,7% SHIP-1 positiv. Dies zeigt, dass die CD34 positiven Zellen SHIP-1 besitzen, p-AKT findet man dagegen nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD34⁺-Zellen des Patienten#5 durch SHIP-1 signifikant gehemmt werden können. In der Färbung zeigen die Zellen SHIP-1, aber kein p-AKT.

III. AML-Patient#6

Bei der dritten AML handelt es sich um einen Patienten mit einer AML vom Subtyp M4, wie bereits in II. beschrieben. Die aufgetauten AML-Zellen wurden CD34⁺ aufgereinigt und anschließend mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert, anschließend in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF und ohne GM-CSF für 14 Tage kultiviert. Nach 14 Tagen sollten die Kolonien ausgezählt werden, aber es sind keine Kolonien gewachsen. Die sortierten CD34⁺ -Zellen wurden außerdem noch in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml und ohne GM-CSF kultiviert und ebenfalls nach 14 Tagen ausgezählt. Es sind nur die CD34⁺-Zellen gewachsen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Dies ist in Abb. 20a dargestellt, wobei der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet wurde. Hier konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden, in Bezug auf die Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden. Es handelt sich hier um eine Reduktion von 81,6%. Bei den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, konnte keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums gezeigt werden. In Abb. 20b wurden die aufgetauten PBMCs sofort mit einem anti-CD33-Antikörper inkubiert, der direkt mit Phycoerythrin gekoppelt ist. Anschließend wurden die Zellen mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert und mit 100% Methanol permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit einem anti-SHIP-1-Antikörper, der mit Alexa488 gekoppelt ist, und einem anti-p-AKT-Antikörper, der mit AlexaFluor647 gekoppelt ist, gefärbt. Die Zellen wurden am FACS vermessen und ausgewertet. Dabei wurde auf die CD33 positiven Zellen ein *Gate* gesetzt. In einer zweiten Abb. können dann die negativen, SHIP-1 positive, p-AKT positive und sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positive Zellen dargestellt werden. Es waren 11,0% der PBMCs CD33 positive. Es wurden keine p-AKT positiven Zellen detektiert. 3,5% der Zellen waren weder p-AKT positiv noch SHIP-1 positiv, dafür waren 96,3% SHIP-1 positiv. Dies zeigt, dass fast alle Zellen, die Blasten sind SHIP-1 enthalten, aber kein p-AKT.

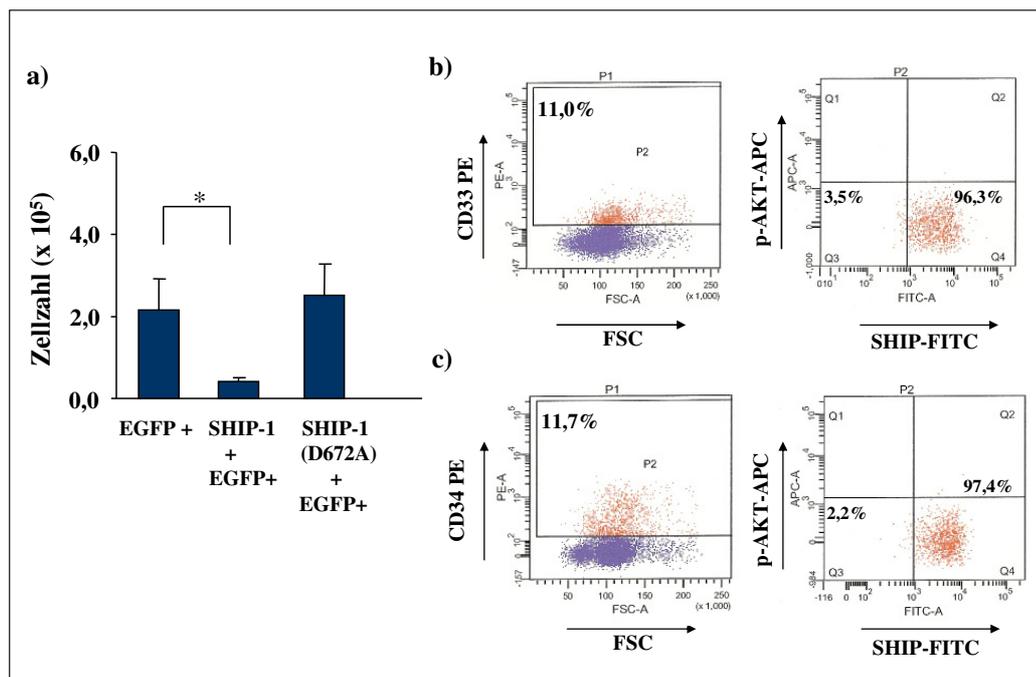


Abb. 20: Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des AML-Patient#6

a) Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die sortierten Zellen wurden dann in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF für 14 Tage inkubiert. Die CD34⁺-Zellen wurden dann statistisch ausgewertet. Die Signifikanz ist durch „*“ gekennzeichnet ($p \leq 0,02$). Die Zellzahl wurde $\times 10^5$ angegeben. b) Die PBMCs wurden mit anti-CD33-PE gefärbt, anschließend mit anti-p-AKT-APC und anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC). PE: Phycorythrin, APC: Allophycocyanin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat. c) Die Zellen wurden mit einem anti-CD34 Antikörper gefärbt und anschließend mit einem anti-SHIP-1-Antikörper und dann einen anti-p-AKT-Antikörper. Es wurde auf die CD34⁺-Zellen ein *Gate* gesetzt.

Die aufgetauten PBMCs wurden sofort mit dem anti-CD34-Antikörper gefärbt, der direkt mit Phycoerythrin gekoppelt ist, und anschließend mit einem anti-SHIP-1-Antikörper, der mit Alexa488 und einem anti-p-AKT-Antikörper, der direkt mit Allophycocyanin gekoppelt ist, inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. Das *Gate* wurde auf die CD34⁺-Zellen gelegt und in einem zweiten Quadrat sollten die p-AKT positiven, SHIP-1 positiven, die Zellen, die sowohl SHIP-1 positiven als auch p-AKT positiven oder die negativen Zellen gezeigt werden (Abb. 20c). Es konnten 11,7% CD34⁺-Zellen, davon 97,6% SHIP-1 positive Zellen, dargestellt werden. Es konnten keine p-AKT positiven Zellen detektiert werden. Es gab keine Zellen, die sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit SHIP-1 das GM-CSF-abhängige Wachstum signifikant gehemmt werden kann. Die SHIP-1 Färbung hat ergeben, dass bei diesem Patienten SHIP-1, p-AKT dagegen nicht vorhanden ist.

IV. AML-Patient#7

Bei diesem AML-Patienten handelt es sich um eine AML von Typ M2. Bei dieser Art der AML sind mehr als 50% der Zellen myeloblastisch bzw. promyelozytär, d.h. es finden sich viele Vorläuferzellen im Blut, die sich auch ausdifferenzieren können. Bei diesem Patienten wurden die aufgetauten Zellen CD34⁺ aufgereinigt. Nach drei tägiger Inkubation mit den Zytokinen SCF, Il-6, TPO und Flt3-Ligand, wurden die CD34⁺-Zellen mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Diese Zellen wurden dann nach EGFP positiv sortiert und in Methylcellulose mit 10ng/ml und ohne GM-CSF gesetzt. Da die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, nur sehr schlecht den Vektor und die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) aufgenommen hatten, konnten nicht genug EGFP positive Zellen sortiert werden. Somit konnten diese sortierten Zellen nicht in Methylcellulose bzw. Serum-freies Medium gesetzt werden. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien der Zellen, die mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert wurden, ausgezählt. Aber es sind keine Kolonien gewachsen. Die CD34⁺-Zellen, die in Serum-freiem Medium mit und ohne GM-CSF gesetzt wurden, wurden ebenfalls nach 14 Tagen ausgezählt. Es sind nur die Zellen gewachsen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Diese konnten ausgezählt und statistisch ausgewertet werden. Es wurde immer eine dreifache Bestimmung durchgeführt. Bei diesem Patienten konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 festgestellt werden. Die CD34⁺-Zellen zeigten eine Reduktion des Wachstums der Zellen um 92,6%. Im Gegensatz dazu konnte bei den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP transduziert wurden, keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums dargestellt werden (siehe Abb. 21a).

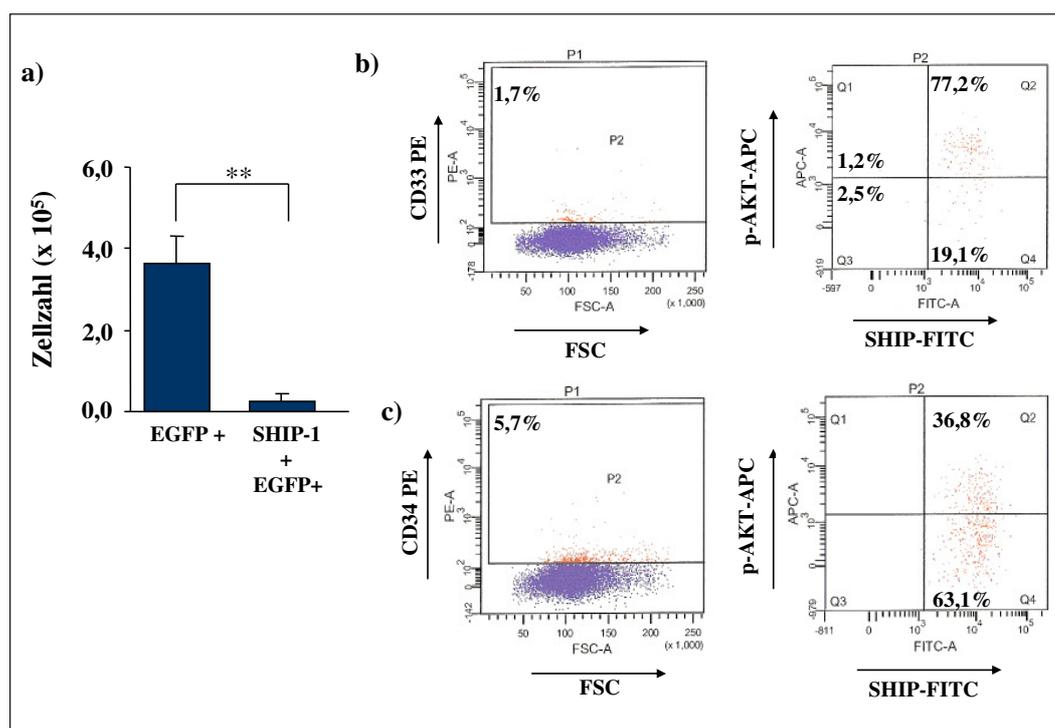


Abb. 21: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des AML-Patienten#7

a) Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP positiven Zellen in Serum freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF gesetzt und für 14 Tage bei 37°C inkubiert. Die Zellzahl wurde in Zahl x 10⁵ angegeben. Die hoch signifikante Hemmung ist durch ** gekennzeichnet (p ≤ 0,00001). b) Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden mit CD33-PE, p-AKT-APC und SHIP-1-Alexa488 (FITC) gefärbt. c) Die PBMCs wurden mit CD34-PE, SHIP-1-Alexa488 und p-AKT-APC gefärbt. FSC: Forward Scatter.

Die aufgetauten PBMCs wurden direkt mit CD33-PE gefärbt und anschließend mit anti-p-AKT-APC und anti-SHIP-1-Antikörper inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden am FACS durchflußzytometrisch analysiert und ausgewertet. Dazu wurde ein *Gate* auf die CD33 positiven Zellen gesetzt. In der rechten Abb. konnte gezeigt werden, wie viele Zellen p-AKT und wie viele SHIP-1 positiv sind (Abb. 21b). Es sind 1,7% der peripheren mononukleären Blutzellen CD33 positiv. Es sind außerdem 19,1% der PBMCs SHIP-1 positiv und 77,2% sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv, nur 1,2% sind weder SHIP-1 noch p-AKT positiv. Es zeigt sich, dass nur wenig Blasten vorhanden sind, die sind aber fast alle SHIP-1 positiv und ein Drittel p-AKT positiv. Die aufgetauten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden sofort mit einem anti-CD34-PE-Antikörper gefärbt und anschließend noch mit anti-p-AKT-APC und anti-SHIP-1-Alexa488 inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden anschließend im FACS durchflußzytometrisch analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 21c dargestellt. 5,7% der PBMCs sind CD34+-Zellen, davon sind 63,1% nur SHIP-1 positiv, während 36,8% der PBMCs sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 signifikant gehemmt werden konnte. Dieser Patient konnte sowohl SHIP-1 als auch p-AKT nachgewiesen werden.

V. AML-Patient#8

Bei dem nächsten AML-Patienten handelt es sich um eine AML mit dem Subtyp M2. Dies wurde in IV beschrieben. Bei diesen Patienten wurden die CD34⁺-Zellen aufgereinigt und anschließend mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert. Anschließend wurden die Zellen in Methylcellulose mit und ohne GM-CSF gesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es konnten keine Kolonien gezählt werden, da weder mit noch ohne GM-CSF Kolonien gewachsen sind. Die sortierten Zellen wurden außerdem in Serum-freiem Medium mit und ohne GM-CSF inkubiert. Es sind nur die CD34⁺-Zellen gewachsen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Diese Daten konnten statistisch ausgewertet werden und sind in Abb. 22a dargestellt. Dabei wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet. Es konnte gezeigt werden, dass das GM-CSF-abhängige Wachstum durch SHIP-1 signifikant gehemmt werden. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums betrug 93,0%. Diese Hemmung ist im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP transduziert wurden, hoch signifikant.

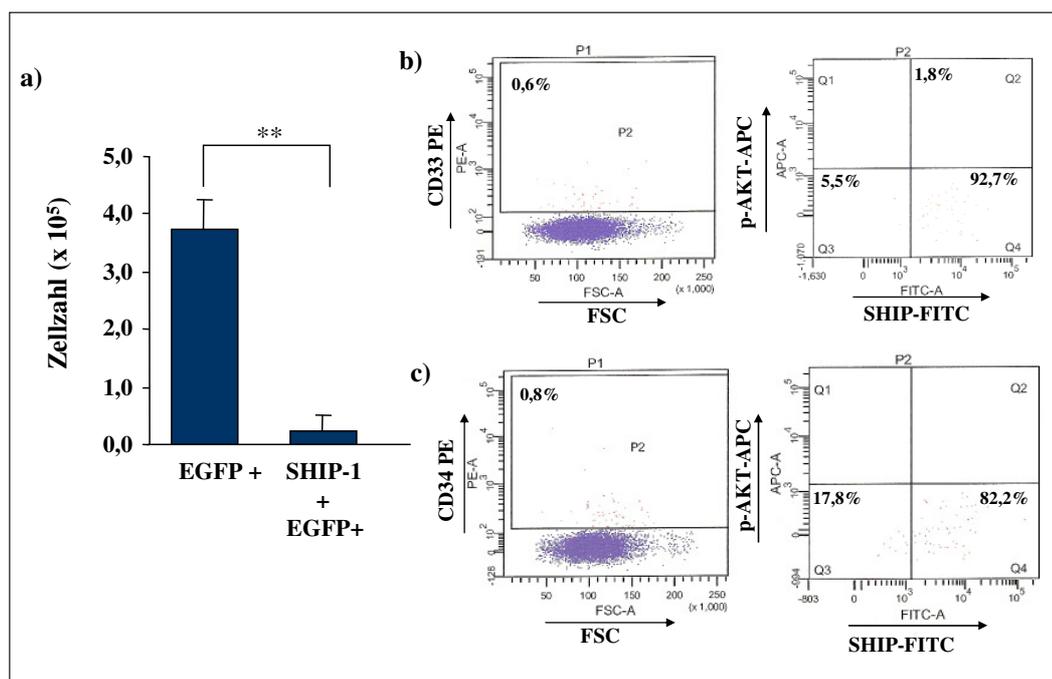


Abb. 22: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des AML-Patienten#8

a) Die angereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert und nach EGFP positiv sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert und dann ausgezählt. Die Zellzahl wurde in Zahl x 10⁵ angegeben. Die hohe Signifikanz ist durch ** gekennzeichnet ($p \leq 0,00001$). b) die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurden mit CD33-PE gefärbt und anschließend mit SHIP-1-FITC und p-AKT-APC nachgefärbt. Die Prozentzahlen, geben die Zahlen in den jeweiligen Quadranten an. In den Quadranten, wo keine Zahlen stehen ist die Prozentzahl 0,0% c) Hier wurden die Zellen mit CD34-PE gefärbt. Da es sich um eine dreifache Färbung handelt wurden die Zellen noch mit p-AKT-APC und SHIP-1-FITC gefärbt.

Des Weiteren wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) des AML-Patienten#8 mit einem anti-CD33-Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die Zellen noch mit einem anti-SHIP-1-Alexa488-Antikörper und einem anti-p-AKT-APC-Antikörper gefärbt. Diese gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert. Es wurde ein *Gate* auf die CD33 positiven Zellen gesetzt und das rechte Bild zeigt, wie viele Zellen SHIP-1 und wie viele Zellen p-AKT positiv sind (Abb. 22). Dieser Patient besitzt nur sehr wenig CD33 positive Zellen, aber fast alle Zellen sind SHIP-1 positiv, nämlich 92,7%. Sowohl p-AKT und als auch SHIP-1 positiv sind nur 1,8% der Zellen, während es keine Zellen gibt, die nur p-AKT positiv sind. 5,5% der Zellen sind weder p-AKT noch SHIP-1 positiv (siehe Abb. 22b). Weiter wurden die Zellen CD34-PE gefärbt. Dazu wurden die Zellen anschließend noch mit anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC) und anti-p-AKT-APC gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert. Die ausgewerteten Zellen sind in Abb. 22c dargestellt. Hier wurde auf die CD34⁺-Zellen ein *Gate* gelegt. Es wurden 0,8% CD34⁺-Zellen detektiert. Von diesen Zellen waren 82,2% SHIP-1

positiv und 17,8% waren weder p-AKT-APC noch SHIP-1 positive. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es keine erhöhte Zahl an CD34⁺-Zellen im Blut des Patienten gibt. SHIP-1 ist in der Färbung nachweisbar, p-AKT dagegen nicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit SHIP-1 das GM-CSF-abhängige Wachstum signifikant reduziert werden kann im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden. Bei der SHIP-1 Färbung konnte gezeigt werden, dass SHIP-1 reduziert ist und auch kein p-AKT vorhanden ist. Bei diesem Patienten konnten fast keine CD33 und keine CD34⁺-Zellen im Blut nachgewiesen werden.

VI. AML-Patient#9

Bei dem AML-Patienten#9 wurde eine AML mit dem Subtyp M1 festgestellt. Dies ist eine AML, die eher unreife Formen aufweist. Bei diesem Patienten wurden die aufgetauten peripheren mononukleären Blutzellen CD34⁺ aufgereinigt und dann mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A). Die CD34⁺-Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und in Methylcellulose mit und ohne GM-CSF gesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen, weder mit 10ng/ml GM-CSF noch ohne GM-CSF. Die sortierten Zellen wurden außerdem in Serum-freiem Medium mit und ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Es sind nur die Zellen, die mit 10ng/ml GM-CSF inkubiert wurden, gewachsen. Diese Zellen konnten dann statistisch ausgewertet werden. Dies ist in Abb. 23 dargestellt, dazu wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet. Hier konnte eine hoch signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte weder eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch EGFP noch durch EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) gezeigt werden. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums beträgt 90,6%. Die CD33- und CD34-Färbungen, sowie SHIP-1 und p-AKT-Färbungen konnten nicht durchgeführt werden, da nicht genug Zellen vorhanden waren.

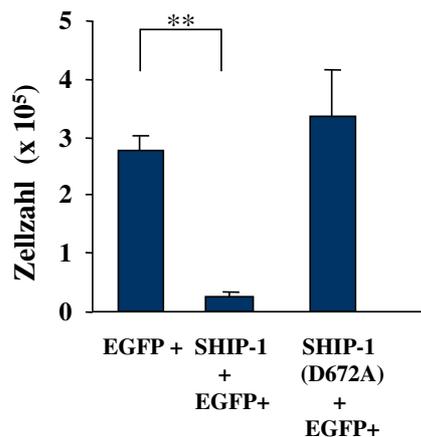


Abb. 23: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#9

Die CD34⁺-aufgereinigten Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP+ sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF inkubiert. Die hohe Signifikanz ist durch ** gekennzeichnet ($p \leq 0,0008$). Die Zellezahl ist in 10⁵ angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten ebenfalls das GM-CSF-abhängige Wachstum durch SHIP-1 hochsignifikant gehemmt werden konnte.

VII. AML-Patient# 10

Bei dem nächsten AML-Patienten#10 ist eine AML mit dem Untertyp M2 bekannt. Wie in V. wurden die Zellen des Patienten CD34⁺ aufgereinigt und mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und anschließend in Triplikaten in Methylcellulose sowohl mit 10ng/ml GM-CSF als auch ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es konnten keine Kolonien ausgezählt werden, da weder mit noch ohne GM-CSF Kolonien gewachsen sind. Die sortierten Zellen wurden auch in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF und ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Die einzigen Zellen, die ausgezählt werden konnten waren die, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Diese Daten wurden statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test ermittelt (Abb. 24a). Es konnte eine deutliche Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden. Diese Hemmung ist statistisch signifikant im

Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 beträgt 92,6%. Die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigen keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums.

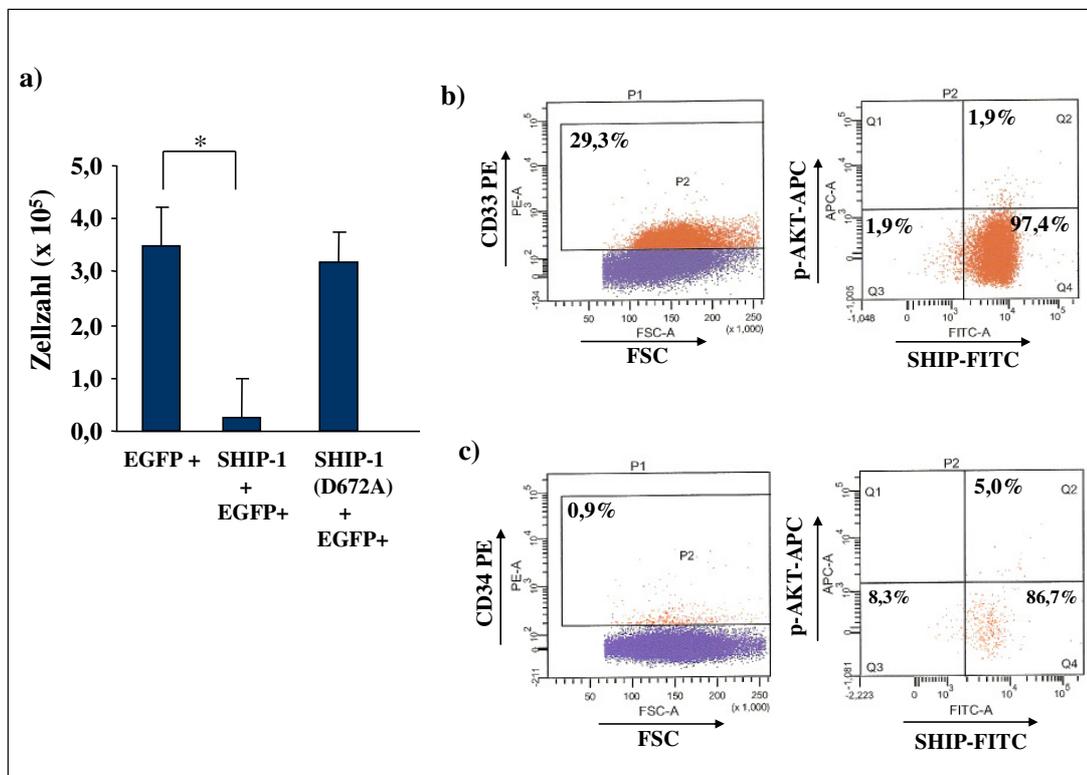


Abb.24: Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#10

a) Die CD34⁺ aufgereinigten Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die EGFP⁺-Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,002$). Die Zellzahl wurde in Zellzahl x 10⁵ angegeben. b) Die PBMCs wurden mit anti-CD33-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC) und p-AKT-APC gefärbt. Die Prozentzahlen sind in den einzelnen Quadranten angegeben. c) PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC) und anti-p-AKT-APC-Antikörper gefärbt. Die Prozentzahlen sind in den einzelnen Quadranten angegeben.

Des Weiteren wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit einem anti-CD33-PE-Antikörper gefärbt und gleichzeitig noch mit einem anti-SHIP-1-Alexa488-Antikörper und einem anti-p-AKT-APC-Antikörper inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert. Es wurde ein *Gate* auf die CD33 positiven Zellen gesetzt und dabei konnte gezeigt werden, wie viele Zellen SHIP-1 positiv sind und wie viele Zellen p-AKT positiv sind. Es sind 29,3% CD33 gefärbten PBMCs positiv. 97,4% der PBMC sind SHIP-1 positiv und 0,7% sind p-AKT und SHIP-1 positiv. 1,9% der Zellen sind weder SHIP-1 noch p-AKT positiv (siehe Abb. 24b). Die PBMCs wurden mit einem anti-CD34-PE-Antikörper gefärbt und anschließend mit einem anti-SHIP-1-FITC und p-AKT-APC-Antikörper gefärbt.

Die so gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. Dazu wurde ein *Gate* auf die CD34⁺-Zellen gelegt und dann die SHIP-1 und p-AKT positiven Zellen in der rechten Abb. der Abb. 24c dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 gezeigt werden konnte. Die Zellen dieses Patienten weisen SHIP-1 auf, aber wenig p-AKT.

VIII. AML-Patient#11

Bei diesem AML-Patienten handelt es sich um eine AML mit dem Unterklasse M3. Dabei handelt es sich um eine AML, die sehr viele Blasten enthält, von denen aber viele abnorme Promyelozyten sind. Die aufgetauten Zellen dieses Patienten wurden CD34⁺ aufgereinigt und anschließend mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden dann nach EGFP positiven Zellen sortiert. Da die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, nicht genug EGFP und das Gen aufgenommen hatten, konnten diese Zellen nicht weiter verwendet werden. Die sortierten Zellen wurden in Methylcellulose mit und ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen, weder mit GM-CSF noch ohne GM-CSF. Die sortierten CD34⁺-Zellen wurden außerdem in Serum-freiem Medium mit oder ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Die einzigen Zellen, die gewachsen sind, sind die, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Die Daten sind in Abb. 25a dargestellt, wobei der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet wurde. Es konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden im Vergleich zu den Zellen, die mit EGFP transduziert wurden. Die Zellen, die mit EGFP transduziert wurden, zeigen keine Wachstumshemmung. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 liegt bei 91,0%.

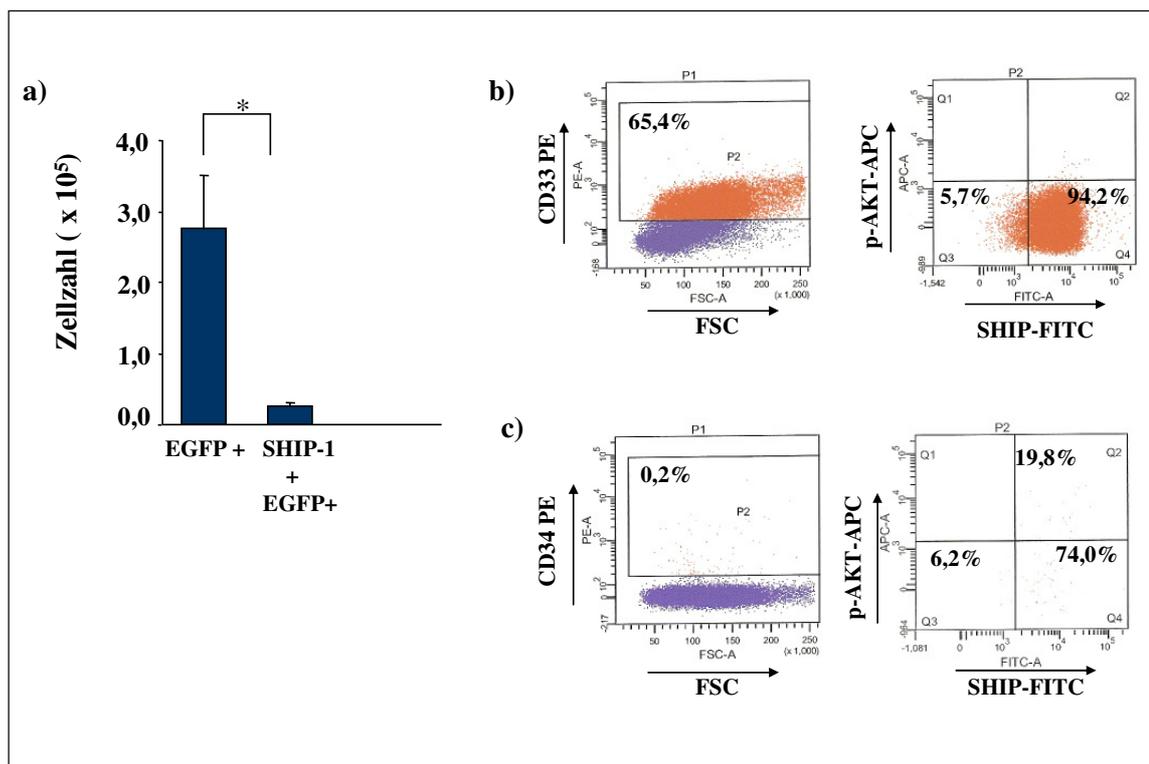


Abb. 25: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#11

a) Die aufgearbeiteten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt. Die signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 ist durch „*“ gekennzeichnet ($p \leq 0,005$). Die Zellzahl wurde mal 10^5 angegeben. b) PBMCs wurden mit anti-CD33-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC. Die Prozentzahlen wurden in den einzelnen Quadranten angegeben. 0,0% sind nicht angegeben. c) PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC. Die Prozentzahlen sind in den Quadranten angegeben.

Die PBMC wurden mit anti-CD33-PE-Antikörper gefärbt und anschließend noch mit anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC) und anti-p-AKT-APC-Antikörper gefärbt. Diese gefärbten Zellen wurden dann am FACS analysiert und ausgewertet. Dies ist in Abb. 25b dargestellt. Es wurde auf die CD33 positiven Zellen ein *Gate* gesetzt, so dass man sieht, wie viele Zellen davon SHIP-1 positiv und wie viele Zellen p-AKT positiv sind (siehe Abb. 25b, rechtes Bild). Es konnten 65,4% CD33 positive Zellen detektiert werden, davon waren 94,9% SHIP-1 positiv, keine Zellen waren p-AKT positiv und weder SHIP-1 noch p-AKT positiv waren 5,7% der Zellen. Die PBMCs wurden mit einem anti-CD34-PE-Antikörper gefärbt. Gleichzeitig wurden die Zellen noch mit anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC)-Antikörper und anti-p-AKT-APC-Antikörper nachgefärbt. Die PBMCs wurden dann am FACS vermessen und ausgewertet. Dazu wurde auf die CD34 positiven Zellen ein *Gate* gelegt, um zu sehen wie viele Zellen davon SHIP-1 positiv und wie viele Zellen p-AKT positiv sind. Es wurden nur 0,2% CD34

positive Zellen detektiert. Aber von diesen Zellen sind 74,0% SHIP-1 positiv, 19,8% sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv, 6,2% komplett negativ und keine der CD34 positiven Zellen ist nur p-AKT positiv.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patient eine deutliche Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 zu erkennen ist. Bei diesem Patienten konnte sowohl SHIP-1 als auch p-AKT nachgewiesen werden.

IX. AML-Patient#12

Bei diesem AML-Patienten handelt es sich um eine AML mit dem Subtyp M4 festgestellt. Dies wurde in II. beschrieben. Bei diesem Patienten wurden die aufgetauten peripheren mononukleären Blutzellen CD34⁺ aufgereinigt und anschließend mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert und hinterher in Methylcellulose mit und ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen, weder die, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden, noch die ohne GM-CSF. Die sortierten Zellen wurden auch in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF und in Serum-freiem Medium ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden, gezählt. Die Zellen, die ohne GM-CSF kultiviert wurden, sind nicht gewachsen. Die mit 10ng/ml GM-CSF kultivierten CD34⁺-Zellen, wurden gezählt und statistisch ausgewertet. Hier konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1, im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit EGFP transduziert wurden, gezeigt werden (siehe Abb. 26a). Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums beträgt 89,8%. Die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigen keine Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Hier konnte gezeigt werden, dass die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) keine enzymatische Aktivität mehr besitzt.

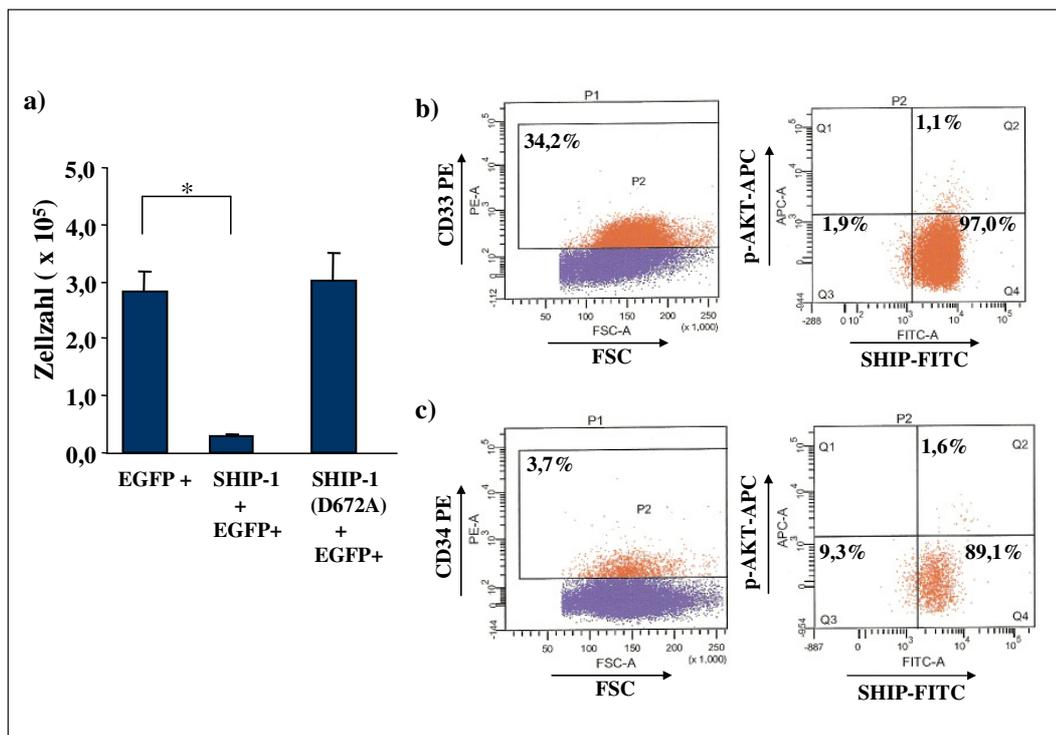


Abb. 26: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#12

a) Die CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP⁺ und EGFP⁻ sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,002$). Die Zellzahl wurde in Zellzahl $\times 10^5$ angegeben. b) Die PBMCs wurden mit anti-CD33-PE Antikörper, anti-SHIP-1-Alexa488 (FITC) Antikörper und anti-p-AKT-APC Antikörper. Das linke Bild: CD33 positive Zellen; das rechte Bild zeigt wie viele Zellen SHIP-1 positiv, wie viele p-AKT positiv, p-AKT negativ und wie viele sowohl SHIP-1 als auch p-AKT positiv sind. c) PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt. In der linken Abb. sieht man die CD34⁺-Zellen und in der rechten Abb. sieht man wie viele Zellen davon SHIP-1 positiv (Q4), p-AKT positiv (Q2), negativ (Q1) und sowohl SHIP-1 positiv als auch p-AKT positiv (Q3) sind.

Des Weiteren wurden von dem Patienten die peripheren mononukleären Blutzellen auf das Vorhanden sein von SHIP-1, p-AKT und CD33 untersucht. Hierzu wurde eine dreifache Färbung durchgeführt. Es wurden die Zellen zuerst mit anti-CD33-PE, dann mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert und mit 100% Methanol permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen noch mit anti-p-AKT-APC und anti-SHIP-1-Alexa488 inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden am FACS gemessen und ausgewertet. Dazu wurde auf die CD33 positiven Zellen ein Gate gesetzt, um zu sehen wie viele Zellen davon SHIP-1 und wie viele p-AKT positiv sind. Es konnten 34,2% CD33 positive Zellen detektiert werden. Von diesen Zellen sind 97,0% SHIP-1 positiv und 1,1% der Zellen sind doppelt positiv. 1,7% der Zellen sind weder SHIP-1 noch p-AKT positiv (siehe Abb. 26b). Die PBMCs wurden noch mit einem anti-CD34-PE-Antikörper gefärbt. Dazu wurden noch anti-SHIP-1-Alexa488-Antikörper und anti-p-AKT-

APC-Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden dann ebenfalls am FACS vermessen und ausgewertet. Hier konnte eine CD34 positive Population von 3,7% detektiert werden. Davon waren 89,1% SHIP-1 positiv, 1,6% doppelt positiv und 9,3% sind weder SHIP-1 noch p-AKT positiv (siehe Abb. 26c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten das GM-CSF-abhängige Wachstum der CD34⁺-Zellen signifikant gehemmt werden konnte. Es konnte in den Zellen des Patienten SHIP-1 und wenig p-AKT detektiert werden.

X. AML-Patient#13

Bei dem Patienten#13 handelt es sich um einen AML-Patienten, bei dem der genaue Subtyp nicht bekannt ist. Bei diesem Patienten wurden die CD34⁺-Zellen aufgereinigt und anschließend mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF und ohne GM-CSF gesetzt. Nach 14 Tagen sollten die Zellen ausgezählt werden, aber es sind weder Kolonien mit 10ng/ml GM-CSF noch ohne GM-CSF gewachsen. Die sortierten Zellen wurden auch in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF oder ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt. Es konnten nur Zellen gezählt werden, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden, da die anderen alle abgestorben waren oder nicht gewachsen sind. Hier konnte eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 nachgewiesen werden. Die Daten wurden in Abb. 27a dargestellt, wobei der Mittelwert, die Standardabweichung und der *Student's t*-Test berechnet wurden. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums liegt bei 88,2% im Vergleich zu den CD34⁺-Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden. Die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder EGFP und SHIP-1 transduziert wurden, zeigten keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums.

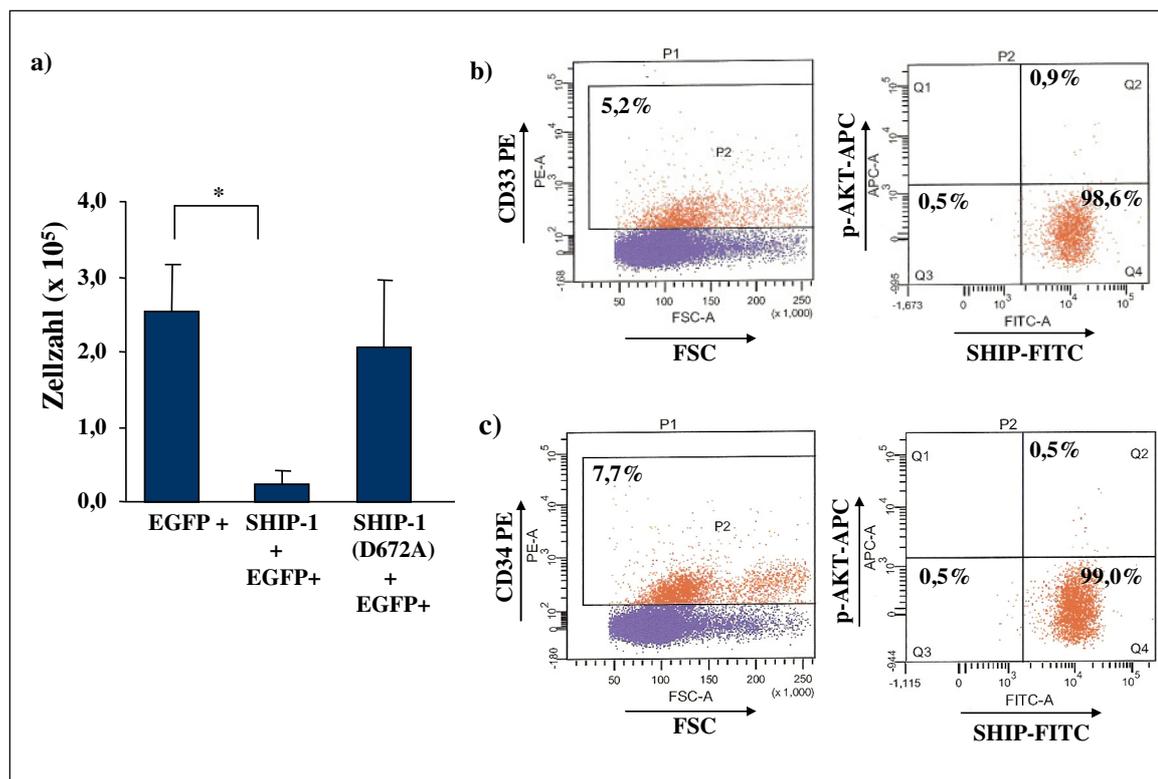


Abb. 27: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#13

a) die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit einem lentiviralen Koexpressionsvektor, der EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) beinhaltet, transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die gezählt. Die Zellzahl wurde in 10⁵ angegeben. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,004$). b) Die PBMCs wurden mit anti-CD33-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und p-AKT APC gefärbt. c) PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und p-AKT-APC gefärbt.

Des Weiteren wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) mit anti-CD33-PE gefärbt, sowie mit anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. In Abb. 27b konnte gezeigt werden, wie viele Zellen CD33 positiv sind. In der rechten Abb. wurden dann gezeigt wie viele Zellen SHIP-1 positiv sind und wie viele Zellen p-AKT positiv sind, wie viele Zellen sowohl SHIP-1 als auch p-AKT besitzen und wie viele Zellen weder SHIP-1 noch p-AKT besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass 5,2% der PBMCs CD33 positiv sind. 98,6% sind SHIP-1 positiv und 0,9% sind doppelt positiv und 0,5% sind komplett negativ. In Abb. 27c wurden die PBMCs mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1 und anti-p-AKT-APC gefärbt. Die Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. Es waren 7,7% der Zellen CD34 positiv und 99,0 % SHIP-1 positiv, nur 0,5 % der Zellen waren doppelt positiv. Alle Zellen, die CD34 positiv sind, sind auch SHIP-1 positiv.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesem Patienten das GM-CSF-abhängige Wachstum durch SHIP-1 gehemmt werden kann. Bei diesem Patienten konnte gezeigt werden, dass er SHIP-1 besitzt, aber kein p-AKT. Im Blut sind sowohl CD33-Zellen als auch CD34⁺-Zellen.

XI. AML-Patient#14

Bei diesem AML-Patienten war der Subtyp nicht bekannt. Es wurden die Zellen CD34⁺ aufgereinigt und mit einem lentiviralen Koexpressionsvektor, der EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und die inaktive Form von SHIP-1 (D672A) enthält, transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert und in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF oder ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen, weder mit GM-CSF noch ohne GM-CSF. Die sortierten Zellen wurden auch in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF und in Serum-freiem Medium ohne GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Es konnten aber nur die Zellen gezählt werden, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Die CD34⁺-Zellen, die ohne GM-CSF kultiviert wurden sind nicht gewachsen bzw. abgestorben. Die CD34⁺-Zellen, die mit dem EGFP und SHIP-1 transduziert wurden zeigen eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Die Zellen, die mit dem EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigen keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen mit SHIP-1 beträgt 92,1 % (siehe Abb. 28a). Des Weiteren wurden die PBMCs mit anti-CD34-PE-Antikörper, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC-Antikörper gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. Die Daten wurden in Abb. 28b dargestellt. Weiter wurden die Zellen mit anti-CD33-PE-Antikörper, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt und ebenfalls am FACS ausgewertet (siehe Abb. 28c).

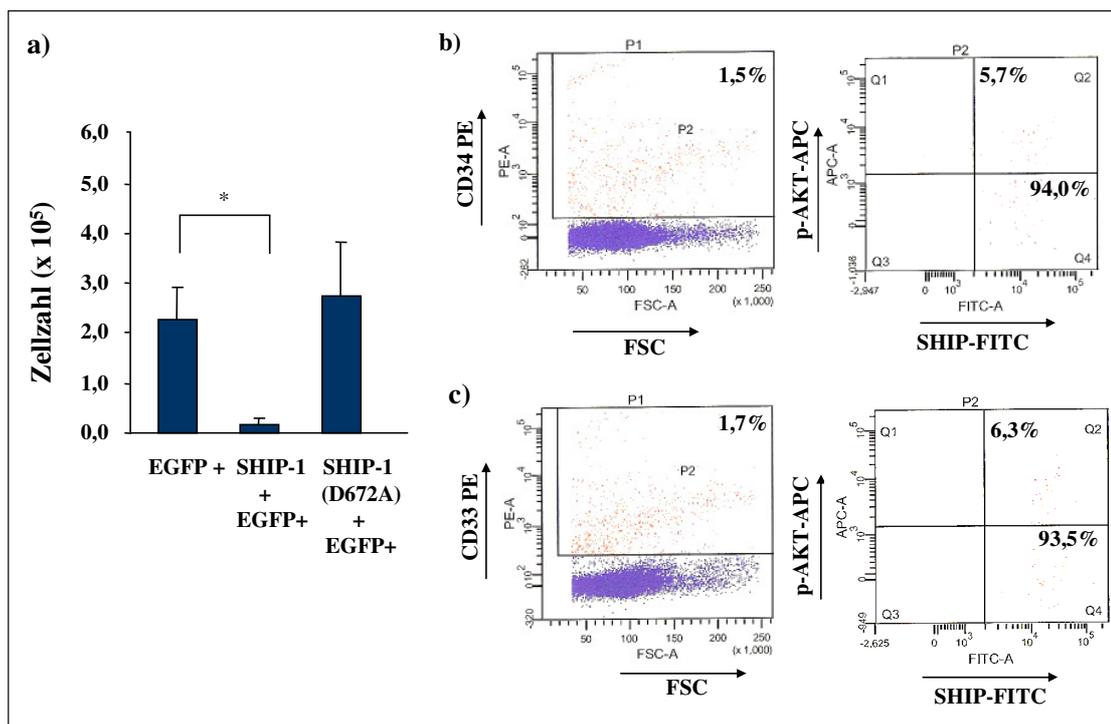


Abb. 28: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#14

a) Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF für 14 Tage inkubiert. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,005$). b) Die PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt. Die Anzahl der Zellen werden in Prozent angegeben. In den Quadranten, wo keine Zahl steht bedeutet dies, dass die Zahl 0,0% beträgt. c) PBMCs wurden mit anti-CD33-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch hier das GM-CSF-abhängige Wachstum gehemmt werden konnte. Bei den Färbungen konnte gezeigt werden, dass der Patient wenig CD33 und CD34⁺-Zellen besitzt, kein p-AKT, aber einen normalen SHIP-1 Gehalt.

XII. AML-Patient# 15

Bei dem AML-Patienten war nicht bekannt, welcher AML Subtyp es war. Die CD34⁺-Zellen wurden aufgereinigt und dann anschließend 3 Tage in Serum-freiem Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, IL-6 und Flt3-Ligand kultiviert. Nach diesen Tagen wurden die CD34⁺-Zellen an drei aufeinander folgenden Tagen mit dem EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten CD34⁺-Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert und in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF und in Methylcellulose ohne GM-CSF gesetzt. Nach 14 Tagen sollten die

Kolonien der CFU-GM ausgezählt werden. Es sind weder Kolonien mit GM-CSF noch ohne GM-CSF gewachsen. Die sortierten Zellen wurden in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF und in Serum-freiem Medium ohne GM-CSF gesetzt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen gezählt. Die einzigen Zellen, die ausgezählt werden konnten waren die Zellen, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Die Zellen, die ohne GM-CSF kultiviert worden sind, sind nicht gewachsen. Es wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet und ist in Abb. 29 dargestellt. Bei diesem Patienten konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden. Die Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigten keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums. Die Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums liegt bei 72,6%.

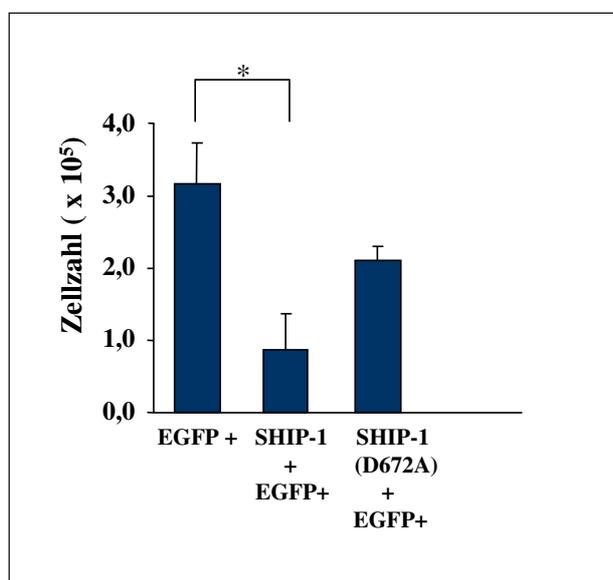


Abb. 29: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 des Patienten#15

Die aufgereinigten CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiven Zellen sortiert und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Die Zellzahl wurde in Zellzahl x 10⁵ angegeben. Die Signifikanz ist durch * gekennzeichnet ($p \leq 0,002$).

4.4.3. Zusammenfassung der untersuchten CD34⁺-Zellen der 12 AML-Patienten

Bei den untersuchten AML-Patienten konnte fast immer eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden. Diese sind, wenn man alle 12 untersuchten AML-Patienten zusammenfasst, hoch signifikante Hemmungen, die in Abb. 30 dargestellt sind. Es kommt bei allen AML-Patienten zu einer durchschnittlichen

Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums von 85,7%. Die geringste Hemmung von 72,6% konnte bei dem AML-Patienten#15 und die größte Hemmung von 93,0% konnte bei dem AML-Patienten#8. Dies zeigt deutlich, dass alle untersuchten AML Zellen mit GM-CSF hemmbar sind. Im Gegensatz dazu konnte bei den Zellen, die mit EGFP und EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, keine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums gezeigt werden.

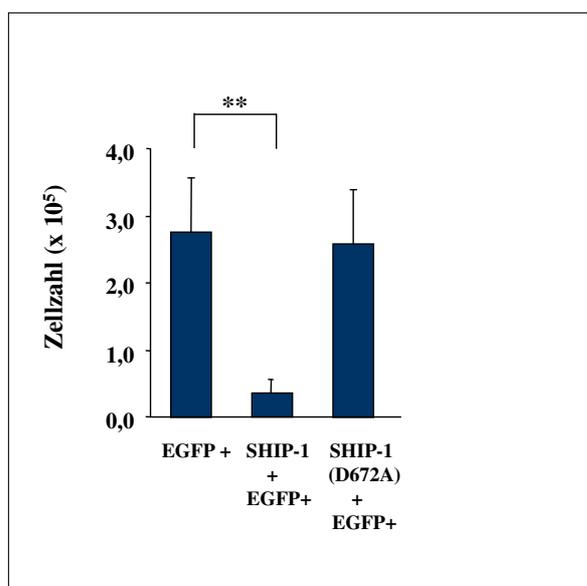


Abb. 30: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 von allen AML-Patienten
 Hier wurden alle Werte aller ausgezählten CD34⁺-Zellen, die jeweils mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, statistisch ausgewertet. Dazu wurde der Mittelwert, die Standardabweichung und der Student's T-Test berechnet. Der Student's T-Test ergab eine hoch signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums ($p \leq 0,0001$). Dies ist durch ** gekennzeichnet. Die Zellzahl wurde in Zellzahl x 10⁵ angegeben.

4.5. Myeloproliferatives Syndrom

4.5.1. Kultivierung ohne Zytokine

Da es sich bei dem Patienten mit dem myeloproliferativen Syndrom um eine Osteomyelofibrose handelt, die ähnliche Symptome aufweist wie die SHIP-1-*knock-out*-Maus, sollten Zellen dieses Patienten analysiert werden. Der Patient hat eine Blastenkrise, das bedeutet, dass der Patient sehr viele unreife Leukozyten in seinem Blut besitzt. So sollte an den Zellen dieses Patienten untersucht werden, ob diese Zellen ohne GM-CSF wachsen und ob sie durch SHIP-1 gehemmt werden können. Dazu wurden die CD34⁺-Zellen des Patienten

aufgereinigt und anschließend wurde ein Teil der CD34⁺-Zellen für drei Tage in Serum-freiem Medium mit den Zytokinen SCF, TPO, IL-6 und Flt3-Ligand kultiviert und der andere Teil wurde in Serum-freiem Medium ohne Zytokine für 3 Tage kultiviert. Nach diesen Tagen wurden die Zellen, die ohne Zytokine kultiviert wurden, da gut gewachsen sind, mit dem EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) an drei aufeinander folgenden Tagen transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden in Methylcellulose ohne GM-CSF kultiviert und nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Es sind keine Kolonien gewachsen. Die sortierten Zellen wurden auch in Serum-freiem Medium ohne GM-CSF kultiviert. Die CD34⁺-Zellen wurden nach 14 Tagen ausgezählt. Es konnte auch hier eine Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden (Abb. 31). Es konnte eine hoch signifikante Hemmung des Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden, während die Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, keine Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums zeigen. Die EGFP negativen CD34⁺-Zellen zeigen ebenfalls keine Wachstumshemmung. Die Reduktion des Wachstums durch SHIP-1 liegt bei 55,9%.

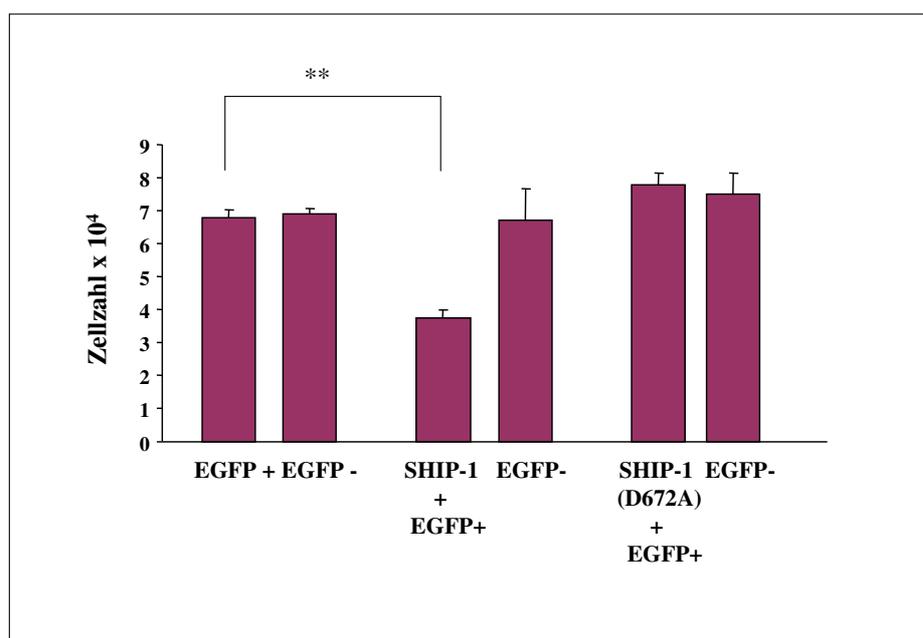


Abb. 31: Reduktion des autonomen Wachstums der CD34⁺-Zellen durch SHIP-1 eines MPS-Patienten#16

Die aufgereinigten und ohne Zytokine kultivierten CD34⁺-Zellen wurden mit dem Vektor EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und die enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Die transduzierten Zellen wurden nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert und dann für 14 Tage ohne Zytokine kultiviert. Die Zellen wurden gezählt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Signifikanz ist durch „**“ gekennzeichnet ($p \leq 0,0001$). Die Zellzahl in 10⁴ angegeben. Die EGFP negativen Zellen und die Zellen mit EGFP oder EGFP und einer inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) zeigen keine Hemmung des Wachstums.

4.5.2. Kultivierung mit GM-CSF

Des Weiteren wurden die Zellen, die ohne Zytokine kultiviert wurden, mit EGFP, EGFP und SHIP-1 oder EGFP und der enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert. Es sollte untersucht werden, ob das GM-CSF-abhängige Wachstum durch SHIP-1 stärker gehemmt werden kann. Dazu wurden die sortierten Zellen in Methylcellulose mit 10ng/ml GM-CSF und in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Es konnten nur die Zellen ausgezählt werden, die in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Kolonien sind keine gewachsen. Die statisch ausgewerteten Daten wurden in einem Balkendiagramm in Abb. 32 dargestellt. Es konnte eine hoch signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 gezeigt werden. Die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums liegt bei 75,4%. Diese Hemmung ist deutlich höher, als die Hemmung ohne Zytokine, die bei 55,9% lag. Die CD34⁺-Zellen sind außerdem besser gewachsen, denn hier konnte die Zellzahl x 10⁵ angegeben werden, während sie ohne GM-CSF bei 10⁴ lag. Dies zeigt, dass GM-CSF auf das Wachstum der CD34⁺-Zellen besser wirken kann. Die CD34⁺-Zellen, die mit EGFP oder EGFP und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigen keine Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums.

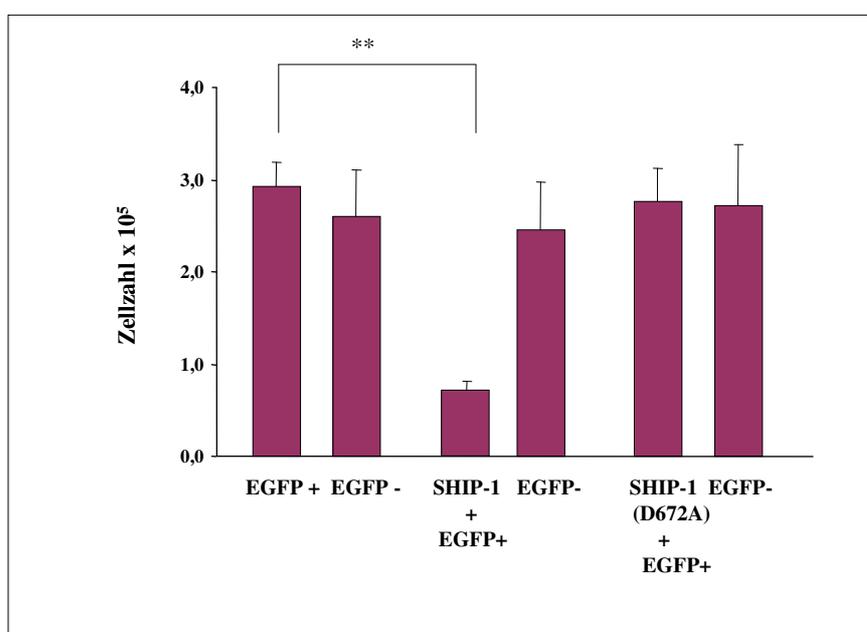


Abb. 32: Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1

Die CD34⁺-Zellen wurden mit EGFP, EGFP und SHIP-1, EGFP und eine enzymatisch inaktive Form von SHIP-1 (D672A) transduziert und nach EGFP positiv und EGFP negativ sortiert. Die sortierten Zellen wurden dann in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert und nach 14 Tagen gezählt. Die Signifikanz ist durch „***“ gekennzeichnet ist ($p \leq 0,0001$). Die Zellzahl ist x 10⁵ angegeben.

4.5.3. Untersuchung des SHIP-1- und p-AKT-Gehaltes

4.5.3.1. Immunfärbung

Die peripheren mononukleären Blutzellen des Patienten#16 sollten auf ihren SHIP-1 Gehalt untersucht werden. Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden zuerst mit einem anti-CD33-PE Antikörper gefärbt, dann wurden die Zellen mit 3,5% Paraformaldehyd fixiert, mit 100% Methanol permeabilisiert und anschließend mit einem anti-SHIP-1-Alexa488 Antikörper und einem anti-p-AKT-APC Antikörper gefärbt. Mit dieser Färbung sollte gezeigt werden, wie viele Blasten der Patient besitzt und wie viele Zellen davon SHIP-1 und p-AKT positiv sind (siehe Abb. 33a).

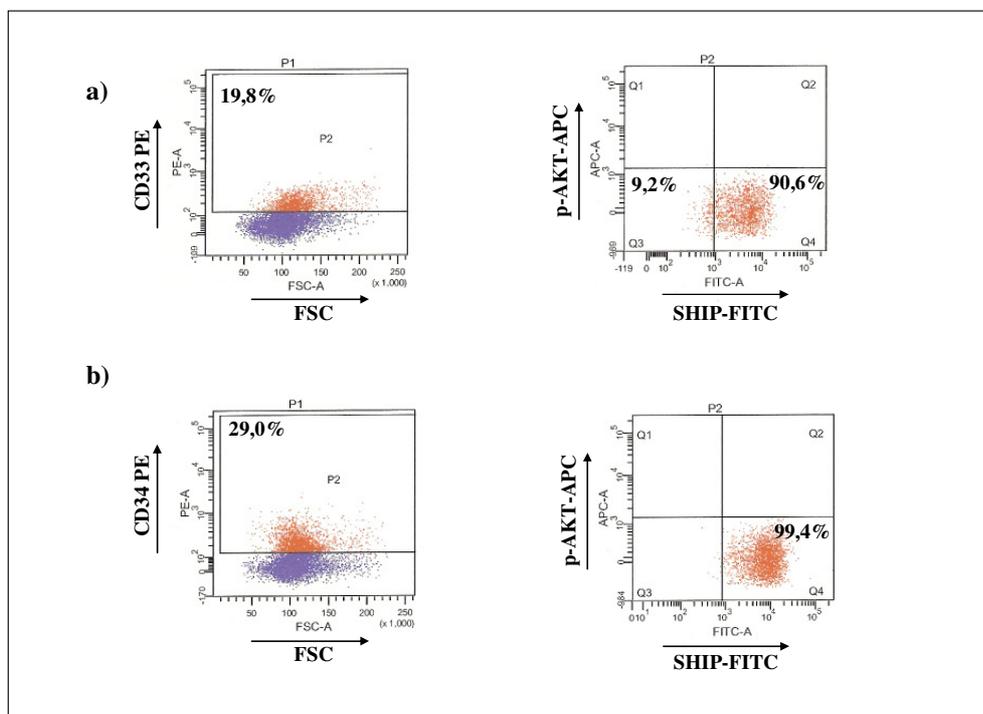


Abb. 33: Immunfärbung der peripheren mononukleären Zellen des MPS-Patienten#16

a) Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden mit anti-CD33-PE, anti-SHIP-1-Alexa488 und anti-p-AKT-APC gefärbt. Es wurde ein *Gate* P2 auf die CD33 positiven Zellen gesetzt. Es sind 19,8% der Zellen sind CD33 positiv. In der rechten Abb. sind nach rechts SHIP-FITC und nach oben p-AKT-APC aufgetragen. Im linken unteren Quadrat Q3 sieht man die negativen Zellen und im rechten unteren Quadrat Q4 die SHIP-1 positiven Zellen. Q2 zeigt die Zellen, die sowohl SHIP-1 positiv sind als auch die Zellen, die p-AKT positiv sind. Im Quadrat Q1 sieht man die Zellen, die nur p-AKT positiv sind. b) Die PBMCs wurden mit anti-CD34-PE, anti-SHIP-1-FITC und anti-p-AKT-APC gefärbt. Es wurde ein „Gate“ P2 auf die CD34 positiven Zellen gesetzt. In der rechten Abb. sieht man im Quadrat Q1 wie viele Zellen p-AKT positiv sind, im Quadrat Q2 wie viele Zellen sowohl p-AKT als auch SHIP-1 positiv sind, im Quadrat Q3 wie viele Zellen weder SHIP-1 noch p-AKT positiv sind.

In Abb. 33b wurden die PBMCs mit einem anti-CD34-PE Antikörper gefärbt, mit 3,5% Paraformaldehyd und 100% Methanol fixiert und dann mit anti-SHIP-1-Alexa488 Antikörper und anti-p-AKT-APC Antikörper gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden am FACS analysiert und ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass 29% der gefärbten Zellen CD34 positiv sind. Von diesen sind fast alle Zellen SHIP-1 positiv, während die Zellen kein p-AKT besitzen.

4.5.3.2. SHIP-1- und p-AKT-Nachweis auf Proteinebene

Auf Proteinebene sollten die Daten des MPS-Patienten#16, die bei den Färbungen erhalten wurden, bestätigt werden. Mittels TCA Lyse bzw. NP40 Lyse wurden die peripheren mononukleären Blutzellen lysiert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf SHIP-1 und p-AKT hin untersucht werden. Dazu wurden 20µg der Lysate aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden die Jurkat#51-Zellen aufgetragen, die nach Doxycyclin Gabe SHIP-1 exprimieren. Diese dienen gleichzeitig als Negativkontrolle für p-AKT. Als Positivkontrolle für p-AKT wurde ein Lysat der uninduzierten Jurkat#51-Zellen aufgetragen, das gleichzeitig als Negativkontrolle für SHIP-1 dient.

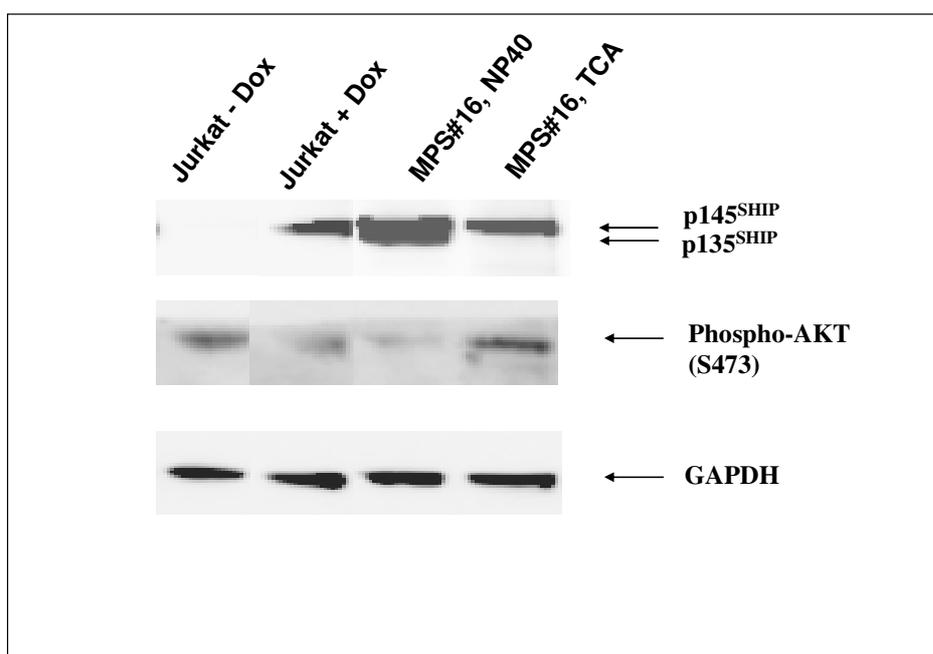


Abb. 34: Western Blot-Analyse der Expression von SHIP-1 und p-AKT der PBMCs des Patienten#16

Proteinextrakte von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), von uninduzierten und mit 0,8µg/ml Doxycyclin induzierten Jurkat#51-Zellen wurden mit NP40-Puffer oder mit TCA hergestellt. 20µg Gesamtzelllysate wurden in SDS-Polyacrylamidgelen und im Western Blot mit einem SHIP-1-Antikörper (P1C1) und einem p-AKT-Antikörper (S473) analysiert. Der untere Teil wurde mit einem GAPDH-Antikörper inkubiert, um zu zeigen, dass vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden.

Die Lysate wurden im Western Blot analysiert und anschließend im Imaging-Gerät quantifiziert. Die Lichtimpulse, die von dem Gerät gemessen wurden, wurden dann den entsprechenden Proteinen zugeordnet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der NP 40-Lyse eine Doppelbande bei SHIP-1 zu finden ist, während dieses bei dem TCA Lysat nicht der Fall war (Abb. 34). Bei dem TCA Lysat konnte nur eine Bande bei SHIP-1 detektiert werden. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass bei dem NP40 Lysat eine Protease das SHIP-1 Protein leicht abgebaut hat, während dies bei der TCA Lyse nicht der Fall ist. Im Falle von p-AKT konnte bei dem NP40 Lysat eine schwächere Bande detektiert werden als bei dem TCA Lysat. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass bei dem TCA Lysat das komplette Lysat aufgetragen wurde, während bei dem NP40 Lysat nur der Überstand aufgetragen wurde, da die unlöslichen Bestandteile verworfen wurden.

5. Diskussion

SHIP-1 gehört zur Gruppe der Inositol-5-Phosphatasen und spielt in hämatopoetischen Zellen eine wichtige Rolle bei der negativen Regulation antiapoptotischer- und proliferationsfördernder Signale. Aufgrund der Ähnlichkeit des Phänotyps der SHIP-1-*knockout*-Maus zu einigen menschlichen myeloischen Erkrankungen, insbesondere zu den myeloproliferativen Syndromen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Leukämiepatienten auf das Wachstumsverhalten ihrer Leukämiezellen nach SHIP-1-Expression untersucht. Diese Patienten wurden außerdem auf ihren endogenen SHIP-1 Gehalt sowie auf den *p-AKT* (Ser473) Gehalt als Maß der Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges untersucht.

5.1. Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums hämatopoetischer Zellen bei gesunden Spendern und JMML-Patienten mittels eines retroviralen Vektors

Bei den gesunden Spendern konnte im Kolonie-Assay eine Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 um 36% gezeigt werden, während die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 in der Flüssigkultur wesentlich höher ausfiel. Sie beträgt hier 69% (siehe Abb. 6a und 6b). Dies ist ein Hinweis dafür, dass SHIP-1 in der Lage ist, das GM-CSF-abhängige Wachstum von normalen hämatopoetischen Zellen zu hemmen. Durch das Cytokin GM-CSF wird der GM-CSF-Rezeptor aktiviert und damit kommt es zu einer Tyrosinphosphorylierung z.B. von Shc, dadurch kann SHIP-1 mit seiner SH2-Domäne an das tyrosinphosphorylierte Shc binden und mit Grb2 um die Bindung an Shc konkurrieren. Damit kann dann der Ras/Raf/MAP-Kinase-Signalweg gehemmt werden [LIU et al., 1994, LIU et al., 1999, ROHRSCHEIDER et al., 2000]. Dadurch übt SHIP-1 seine negative Wachstumsregulation aus.

Bei den beiden JMML-Patienten konnte ebenfalls mit SHIP-1 eine deutliche Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34⁺-Zellen gezeigt werden. Bei den CD34⁺-Zellen der JMML-Patienten könnte es sich um die leukämischen Zellen handeln. Passegue und seine Mitarbeiter konnte zeigen, dass bei den myeloischen Leukämien die Leukämiezellen aus einer Population der hämatopoetischen Stammzellen hervorgeht [PASSEGUE et al., 2003]. Bei diesen Zellen handelt es sich um CD34⁺-Zellen, die sich immer

wieder selbst erneuern [PASSEGUE et al., 2003]. Bei den CD34⁺-Zellen des JMML-Patienten#2 konnte eine Hemmung um 75% sowohl in dem Kolonie-Assay als auch in der Flüssigkultur gezeigt werden. Bei den CD34⁺-Zellen des zweiten JMML-Patienten#3 konnte im Kolonie-Assay eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums von 51% nachgewiesen werden, während die Hemmung in der Flüssigkultur bei 70% lag.

Bei diesem GM-CSF-vermittelten Signalweg ist durch die Mutationen im PTPN11-Gen bzw. im KRAS2-Gen eine konstitutive Aktivierung des Ras/Raf/MAP Kinase Signalweges gegeben [GUTHRIDGE et al., 1998; BOLLAG et al., 1996]. Dies lässt vermuten, dass der hemmende Effekt von SHIP-1 bestens für die Gentherapie von JMML-Patienten einsetzbar ist. Dies ist vor allem darin zu sehen, dass SHIP-1 auf die GM-CSF hypersensitiven Zellen der JMML-Patienten wirkt. Da es zu einer Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 bei den CD34⁺-Zellen der gesunden Spender kommt, könnte dies ein Hinweis sein, dass SHIP-1 evtl. toxisch auf gesunde Zellen wirken könnte. Normalerweise kann eine JMML nur mit einer Knochenmarktransplantation behandelt werden [NATHAN UND OSKIS 2003]. Damit werden zur Zeit 50% der Kinder geheilt [LOCATELLI et al., 2005]. Vielleicht könnte aber die Therapie mit SHIP-1 dazu führen, dass wieder genug hämatopoetische Zellen im Stande sind ein funktionierendes Blutsystem zu bilden. Dies müsste allerdings in Kombination mit einer Chemotherapie oder einer anderen Therapie, z.B. mit einem Ras-Hemmstoff, durchgeführt werden.

Dass die JMML-Zellen auch ohne GM-CSF wachsen, konnte in einem Versuch mit verschiedenen GM-CSF Konzentrationen gezeigt werden (siehe Abb. 10 und 11). In diesem Experiment wurden verschiedene GM-CSF Konzentrationen 0,0ng/ml; 0,001ng/ml; 0,01ng/ml; 0,1ng/ml; 1ng/ml und 10ng/ml verwendet. Die mit SHIP-1 transduzierten Zellen zeigten im Vergleich zu den Zellen, die mit dem Vektor EGFP transduziert wurden, eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums (Abb. 10). SHIP-1 hemmt das GM-CSF-abhängige Wachstum und das autonome Wachstum der CD34⁺-Zellen. Die CD34⁺-Zellen, die mit dem Vektor und dem Vektor und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, zeigen keine Hemmung. Bei den mit SHIP-1 transduzierten Zellen ist die Wachstumsrate verlangsamt. Mit der GM-CSF Konzentration von 10ng/ml konnte das Wachstum der CD34⁺-Zellen nur etwa verdoppelt werden, während die Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden, mit einer GM-CSF Konzentration von 10ng/ml fast um das siebenfache zu nimmt. Dieses Ergebnis könnte eine Möglichkeit sein, SHIP-1 zur

Gentherapie einzusetzen. Derselbe Versuch wurde mit nicht transduzierten Zellen eines gesunden Spenders und des JMML-Patienten#3 durchgeführt. Hierbei wurden die peripheren mononukleären Blutzellen von einem gesunden Spender und dem JMML-Patienten#3 miteinander verglichen und in Methylcellulose mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen kultiviert (Abb. 11). Das Ergebnis war, dass die Zellen des JMML-Patienten, die ohne GM-CSF kultiviert wurden, bereits ein Koloniewachstum von 20 Kolonien zeigten. Die Zellen des gesunden Spenders zeigten dagegen ohne GM-CSF kein Wachstum. Dies verdeutlicht, dass Zellen von gesunden Spendern ohne Zugabe von Wachstumshormonen nicht wachsen können. Dies zeigt, dass die JMML Zellen autonom, folglich ohne Zugabe von GM-CSF, wachsen können. Dies konnten bereits Emanuel und seine Mitarbeiter 1991 zeigen [EMANUEL et al., 1991]. Keine Arbeitsgruppe konnte bislang zeigen, dass die Zugabe von SHIP-1 zu einer Wachstumshemmung führt.

Die Untersuchungen der JMML-Patienten und gesunden Spendern auf die natürlich vorhandene SHIP-1 bzw. p-AKT Mengen haben gezeigt, dass SHIP-1 bei allen untersuchten Proben vorhanden ist und speziell bei den JMML-Patienten nicht erniedrigt ist (Abb. 9). Die Aktivierung des AKT-Signalweges läuft über die Phosphorylierung am Threoninrest 308 und Serinrest 473 ab [ALESSI et al., 1996]. Die Phosphorylierung am Threoninrest erfolgt durch die PDK1 (*phosphoinositid-dependent protein kinase*). Über welchen Mechanismus die Phosphorylierung am Serinrest 473 abläuft ist noch nicht genau bekannt. Vermutlich läuft die Phosphorylierung über die PDK2 ab. Interessanterweise konnte bei den JMML-Patienten p-AKT im Western Blot detektiert werden, während bei den gesunden Spendern kein p-AKT nachweisbar war. Dies könnte daran liegen, dass bei den JMML-Patienten der PI3-Kinase/AKT-Signalweg konstitutiv aktiviert ist. Die Aktivierung von AKT hat eine höhere Proliferationsrate zur Folge, da sie anti-apoptotische Signale vermittelt [CHANG et al., 2003].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein erster Hinweis darauf, dass SHIP-1 als negativer Wachstumsregulator für die Bekämpfung der JMML eingesetzt werden kann. Allerdings müsste zuerst überprüft werden, ob SHIP-1 einen toxischen Effekt auf die gesunden Zellen hat. Die in dieser Arbeit über die JMML-Patienten erzielten Ergebnisse müssten zudem in Tierversuchen untersucht werden.

5.2. Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums hämatopoetischer Zellen bei gesunden Spendern und AML-Patienten mittels eines lentiviralen Vektors

Zuerst wurden die gesunden Spender untersucht. Dazu wurde ein Kolonie-Assay mit GM-CSF und ein Kolonie-Assay mit den Zytokinen IL-3, GM-CSF und SCF durchgeführt. Dabei konnte jeweils eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums bzw. des Wachstums mit mehreren Zytokinen, wie IL-3, SCF und GM-CSF gezeigt werden. Wobei das GM-CSF-abhängige Wachstum stärker gehemmt werden konnte (67%) als das Wachstum mit den Zytokinen SCF, IL-3 und GM-CSF (50%) (Abb. 15 u. 16). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die CD34⁺-Zellen durch das Cytokin SCF besser wachsen und deswegen SHIP-1 seine Wirkung nicht voll entfalten kann. In der Flüssigkultur hingegen war die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums deutlich stärker als im Kolonie-Assay (90%) (Abb. 17), was ein Hinweis darauf sein könnte dass SHIP-1, bei einer Aktivierung durch GM-CSF alleine, seine negativen wachstumsregulatorischen Eigenschaften besser einsetzen kann, als wenn die Stimulierung des Wachstums durch mehrere Zytokine gesteuert wird. Bei der Verwendung des lentiviralen Vektors konnte eine höhere Hemmung des GM-CSF abhängigen Wachstums gezeigt werden sowohl bei den Zellen der gesunden Spender als auch bei den Zellen der AML-Patienten. Bei den gesunden Spendern konnte mit dem retroviralen Vektor in dem Koloniewachstum mit GM-CSF eine Hemmung von 35% gezeigt werden, während mit dem lentiviralen Vektor im Koloniewachstum eine von 67% erzielt werden konnte. In der Flüssigkultur ist der Unterschied interessanterweise ähnlich. Bei den Zellen, die mit dem retroviralen Vektor transduziert wurden, konnte eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums von 69% gezeigt werden. Die CD34⁺-Zellen des gesunden Spenders, die mit dem lentiviralen Vektor transduziert wurden, wiesen eine Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums von 90% auf. Es konnte zudem ein Unterschied zwischen dem retroviralen und lentiviralen Vektor bei den Zellen der beiden JMML-Patienten und den AML-Patienten gezeigt werden. Bei den CD34⁺-Zellen der AML-Patienten, die mit dem lentiviralen Vektor transduziert wurden, konnte eine Hemmung des GM-CSF-abhängige Wachstums durch SHIP-1 von durchschnittlich 85% dargestellt werden. Bei den CD34⁺-Zellen der beiden JMML-Patienten konnte mit dem retroviralen Vektor nur eine Hemmung von 75% und 70% in der Flüssigkultur gezeigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die CD34⁺- Zellen mit dem lentiviralen Vektor besser hemmen lassen als mit dem retroviralen Vektor. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der lentivirale Vektor ruhende Zellen

infizieren kann [NALDINI 1998] und deswegen die Zellen den Vektor besser aufnehmen können und so ihre Wirkung besser entfalten können.

Bei den Zellen der 12 verschiedenen AML-Patienten konnte bei fast allen eine signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 in Serum-freiem Medium mit 10ng/ml GM-CSF gezeigt werden. Die signifikante Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums lag zwischen 72,6% und 93,0%. Diese Hemmung konnte nur in der Flüssigkultur gezeigt werden. Ein Einsatz von SHIP-1 wäre dann auch bei akuten myeloischen Leukämien als Mittel zur Gentherapie möglich. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse müssten in Tierversuchen bestätigt werden und man müsste eventuell überprüfen, ob SHIP-1 auch einen toxischen Effekt auf die Zellen hat.

Dagegen zeigten keine der 12 untersuchten AML-Patienten ein Koloniewachstum bei den Zellen von allen AML-Patienten festgestellt werden. Dies war weder mit 10ng/ml GM-CSF noch ohne GM-CSF der Fall. Lowenberg und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die autonome Proliferation abhängig von der FAB (*French American British Cooperation Group*) Klassifizierung ist [LOWENBERG et al., 1993]. Bei Patienten mit dem Subtyp M1 oder M2 ist die Proliferationsrate eher gering, während sie bei den Patienten mit der AML vom Subtyp M4 oder M5 wesentlich höher ist [LOWENBERG et al., 1993]. Aber es gibt auch Patienten mit der Subklasse M1 oder M2, die besonders gut wachsen, dementsprechend gibt es ebenso Zellen von Patienten mit der Subklasse M4 oder M5, die schlecht wachsen [LOWENBERG et al., 1993]. Die Zellen von AML-Patienten wachsen sehr oft autonom und wenn sie ein sehr starkes autonomes Wachstum zeigen, dann handelt es sich um eine sehr aggressive AML [BEGEMANN UND BEGEMANN 2004]. Dies war ein Grund, warum die CD34⁺-Zellen der AML-Patienten ohne GM-CSF kultiviert werden sollten. Die Zellen von 11 Patienten waren eingefroren, bei einem Patienten waren die Zellen nicht eingefroren. Die daraus gewonnenen CD34⁺-Zellen wurden sofort in Kultur genommen. Aber es sind bei keinem Patienten Kolonien in semi-solidem Medium gewachsen. Gegen die Vermutung, dass die Zellen nicht mehr richtig gewachsen sind, weil sie eingefroren waren, spricht die Tatsache, dass die Zellen aber in der Flüssigkultur gewachsen sind. Es könnte aber auch daran liegen, dass die Zellen der Patienten, die hier untersucht wurden, zu jenen Zellen zählen, die im Kolonie-Assay ohne ersichtlichen Grund schlechter wachsen, wie Lowenberg und seine Mitarbeiter zeigen konnten. Wiederum könnte die vorhandene Flt3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*)-Mutation für diese Unstimmigkeit in dem Wachstumsverhalten der Zellen verantwortlich sein. Es wurden bereits

zwei Mutationen von Flt3 bei AML-Patienten gefunden [LI et al., 2007]. Bei der einen Mutation handelt es sich um eine Interne Tandem Duplikation (ITD) an der Juxtamembran, und die andere ist eine Punktmutation in der Kinasedomäne [LI et al., 2007]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Flt3 wichtig für die Entwicklung der Hämatopoese ist [WEISEL et al., 2007]. Kommt es zu einer Störung der Hämatopoese durch Flt3, so können Leukämien entstehen [GILLILAND UND GRIFFIN 2002]. Gilliland und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Flt3-ITD Mutation in 24% der AML-Patienten auftritt und unabhängig von ihrer FAB-Klassifikation ist [GILLILAND UND GRIFFIN 2002]. Durch diese Flt3-ITD Mutation kann es bei AML-Patienten zu einer erhöhten Aktivierung von STAT5 kommen [CHOUHDARY et al., 2007]. Choudhary und seine Mitarbeiter konnten mit dem protein SOCS1, einem hemmstoff der JAK-Kinasen, die STAT5-Aktivierung schlecht hemmen. [CHUODHARY et al., 2007]. Es könnte sein, dass die Zellen eine oder mehrere Mutationen aufweisen und deswegen in semi-solidem Medium nicht mehr wachsen. Es könnte aber auch sein, dass alle AML-Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden zu den wenigen Patienten gehören, die laut Lowenberg wenige bis keine Kolonien bilden.

Es könnte aber auch eine Mutation im c-kit Rezeptor (CD117, c-kit) vorliegen. C-kit wird häufig als Marker für eine AML verwendet, ist aber nicht spezifisch für einen bestimmten Subtyp der AML [CASCAVILLA et al., 1998]. C-kit ist der Rezeptor für SCF und ist bei 80% der AML-Patienten nachweisbar [STIREWALT UND RADICH et al., 2003]. Bei vielen AML-Patienten bei denen kein c-kit nachweisbar ist, konnten verschiedene monocytische Marker nachgewiesen werden [AUEWARAKUL et al., 2005].

Des weitern wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) der AML-Patienten auf das Vorkommen von CD33-Zellen, CD34⁺-Zellen, SHIP-1 sowie p-AKT mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei allen AML-Patienten SHIP-1 und bis auf einen Patienten alle AML-Patienten wenig bzw. kein p-AKT nachweisbar war. Tamburini und seine Mitarbeiter konnten bei der Hälfte der AML-Patienten eine konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges feststellen [TAMBURINI et al., 2006]. Die Arbeitsgruppe von Kubota konnte zeigen, dass die konstitutive Aktivierung der PI3-Kinase im spontanen Wachstum höher war als bei denen, die nur mit GM-CSF, SCF oder Trombopoetin wachsen [KUBOTA et al., 2004]. Kubota und seine Mitarbeiter konnten außerdem nachweisen, dass bei einer Aktivierung der PI3-Kinase sowohl eine Phosphorylierung am Threoninrest 308 als auch eine Phosphorylierung am Serinrest 473 nachzuweisen war [KUBOTA et al., 2004]. Die konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-

Signalweges ist essentiell für das Überleben der AML Zellen [XU et al., 2003]. Man vermutet, dass Mutationen in PTEN und in SHIP-1 in AML Zellen zu einer Missregulation der PI3-Kinase führt und zwar durch den Verlust der negativen Regulatoren des PI3-Kinase Signalweges [STEELMAN et al., 2004]. Dies könnte auf den Patienten#7 zu treffen. Bei diesem Patienten war SHIP-1 in der Färbung nachweisbar, aber es konnte auch p-AKT nachgewiesen werden (Abb. 21a). Dies könnte dafür sprechen, dass SHIP-1 mutiert ist und deshalb der PI3-Kinase/AKT-Signalweg konstitutiv aktiviert ist. Es könnte aber genauso gut eine Mutation in PTEN vorliegen. PTEN ist ein negativer Regulator des PI3-Kinase/AKT-Signalweges [KRYSTAL et al., 2000; SLY et al., 2003].

5.3. Reduktion des Wachstums hämatopoetischer Zellen bei einem Patienten mit einem myeloproliferativen Syndrom

Bei diesem MPS-Patienten wurden die CD34⁺-Zellen, die mit Vektor, Vektor und SHIP-1 oder Vektor und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP-1 (D672A) transduziert wurden, sowohl mit 10ng/ml GM-CSF und als auch ohne GM-CSF kultiviert. In Serumfreiem Medium sind die Zellen sowohl mit als auch ohne GM-CSF gewachsen. Es konnte mit SHIP-1 sowohl das GM-CSF-abhängige Wachstum als auch das autonome Wachstum gehemmt werden (Abb. 31 und 32). Die Hemmung des autonomen Wachstums durch SHIP-1 lag bei 55,9%, während die Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 bei 75,4% lag. Dies zeigt, dass die Zellen des MPS-Patienten auch ohne Wachstumshormone und somit autonom wachsen. SHIP-1 hat aber interessanterweise einen größeren Einfluss auf die Zellen, die mit GM-CSF gewachsen sind, denn diese Zellen lagen in ihrer Wachstumsrate um eine Zehnerpotenz höher als die CD34⁺-Zellen, die ohne GM-CSF kultiviert wurden. Dies könnte ein Hinweis auf die Funktion von SHIP-1 nach GM-CSF Stimulation sein. SHIP-1 kann dort als negativer Wachstumsregulator seine Funktion besser ausfüllen, als dies bei den Zellen der Fall ist, die ohne GM-CSF kultiviert wurden. Dass die Zellen ohne GM-CSF gewachsen sind, könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese durch einen Signalweg konstitutiv aktiviert sind und dementsprechend sehr gut wachsen können. Dies könnte z.B. eine Flt3-Mutation oder eine Mutation in c-kit (CD117) sein, oder aber evtl. auch eine Mutation im PI3/AKT Signalweg. Dies müsste dann in weiteren Versuchen untersucht werden. Bei einer Flt3-Mutation könnte es dann zu einer STAT5-Aktivierung kommen, wie Choudhary und seine Mitarbeiter zeigen konnten [CHOUDHARY et al., 2007]. In weiter

führenden Versuchen müssten verschieden AML-Patienten auf verschiedene Mutationen untersucht werden und evtl. müsste man diese gefundenen Mutationen dann erst *in vitro* und später *in vivo* detaillierter untersuchen.

Dagegen sind von den CD34⁺-Zellen des MPS-Patienten keine Kolonien in der Methylcellulose gewachsen, weder mit noch ohne GM-CSF. Dies war etwas überraschend, da die Zellen aus einer Blutprobe des Patienten gewonnen und sofort in Kultur genommen wurden. Es sollten, da sich der Patient in einer Blastenkrise befand, viele unreife Zellen so genannte Blasten im Blut nachweisbar sein. Normalerweise würde man davon ausgehen, dass zumindest die Kolonien wachsen müssten, die mit 10ng/ml GM-CSF kultiviert wurden. Dass die Kolonien nicht gewachsen sind, könnte daran liegen, dass die Zellen schon zu ausdifferenziert waren.

Bei den Färbungen mit CD33, CD34⁺, SHIP-1 und p-AKT konnte gezeigt werden, dass SHIP-1 vorhanden, p-AKT dagegen nicht nachweisbar ist (Abb. 33). Es konnten bei dem Patienten 29,0% CD34⁺-Zellen und 19,8% CD33 positive Zellen nachgewiesen werden. Dies sind ungewöhnlich viele CD34⁺-Zellen, normalerweise findet man bei gesunden Menschen im Blut nur 0,01% der CD34⁺-Zellen [SIEGENTHALER 1987]. Dies könnte ein Zeichen dafür sein, dass die CD34⁺-Zellen die leukämischen Zellen darstellen. Aber auch die Blasten sind wahrscheinlich leukämische Zellen.

Bei den Untersuchungen im Western Blot konnte interessanterweise im Gegensatz zu der Färbung der Zellen p-AKT detektiert werden (Abb. 34), und zwar im TCA-Lysat wesentlich stärker als im NP40-Lysat. Dies könnte darauf zurückzuführen zu sein, dass bei dem TCA-Lysat auch die Kerne und andere Zellbestandteile mit lysiert wurden, während bei dem NP40-Lysat die festen Bestandteile verworfen wurden. Dass p-AKT detektiert wurde, könnte daran liegen, dass von den „frischen Zellen“ sofort ein Lysat gemacht wurde, während die Zellen, die gefärbt wurden erst eingefroren waren, bevor sie gefärbt wurden. Es könnte aber auch daran liegen, dass der Antikörper, der in der Färbung eingesetzt wurde nicht so sensitiv ist, wie der Antikörper, der für den Western Blot verwendet wurde. Interessanterweise konnte im dem Western Bot bei diesem Patienten eine große Menge an SHIP-1 detektiert werden (Abb. 34). Dies könnte für eine konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges sprechen. Tarazzi und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die AML Zellen bezüglich ihres p-AKT Levels keinen Unterschied zeigen zwischen „frischen

Zellen“ und Zellen, die für eine Woche in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden [TAZZARI et al., 2004]. Es könnte aber einen Unterschied ausmachen, wenn die Zellen länger in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Die Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren länger als eine Woche in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es gab in der Literatur keine Arbeiten über AKT und myeloproliferative Syndrome, aber es konnte in früheren Arbeiten bei akuten myeloischen Leukämien eine konstitutive Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges gezeigt werden [TAZZARI et al., 2004,]. Da myeloproliferative Syndrome eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems darstellen, könnte man diese Theorie auch auf diesen Patienten anwenden. Durch die Bildung von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ kommt es durch die PI3-Kinase zu einer Translokation von AKT an die Plasmamembran, was zu einer Phosphorylierung an dem Threoninrest 308 und Serinrest 473 führt [ZENG et al., 2006]. Diese Phosphorylierung entsteht durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PKD1), die durch $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ an die Plasmamembran rekrutiert wird [ZENG et al., 2006]. Diese Phosphorylierung ist wichtig für die komplette AKT Aktivierung [ZENG et al., 2006]. Die AKT-Aktivierung ist ein wichtiger Überlebensfaktor für die Zelle [ZENG et al., 2006]. Der Gegenspieler dazu ist PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*), der der negative Regulator des PI3K Signalweges ist. Der Verlust von PTEN, z.B. durch eine Mutation, führt zu einem Ansteigen von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und somit zu einem gesteigert AKT Signal durch den PI3-Kinase-Signalweg [KRYSTAL et al., 2000, SLY et al., 2003]. Diese Möglichkeit könnte bei diesem Patienten vorliegen. Es könnte aber auch eine Mutation in SHIP-1 sein, was ebenfalls eine konstitutive Aktivierung des AKT Signalweges zur Folge hätte, da SHIP-1 die Funktion eines negativen Wachstumsregulators besitzt.

Die in dieser Arbeit für den Patienten mit MPS erzielten Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass SHIP-1 als gentherapeutisches Mittel gegen MPS eingesetzt werden könnte. SHIP-1 könnte zusätzlich zu einer Chemotherapie eingesetzt werden. Diese Ergebnisse müssten aber in Tierversuchen noch detaillierter analysiert werden.

6. Literaturverzeichnis

AGLIETTA M, DE VINCENTIIS A, LANATA L, LANZA F, LEMOLI RM, MENICHELLA G, TAFURI A, ZANON P, TURA S (1996). Peripheral blood stem cells in acute myeloid leukemia: biology and clinical applications. *Haematologica* 81(1): 77-92.

AI J, MATURU A, JOHNSON W, WANG Y, MARSH CB, TRIDANDAPANI S (2006). The inositol phosphatase SHIP-2 down-regulates Fc γ R-mediated phagocytosis in murine macrophages independently of SHIP-1. *Blood* 107(2): 813-820.

ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio VCH 1995.

ALESSI DR, ANDJELKOVIC M, CAUDWELL B, CRON P, MORRICE N, COHEN P, HEMMINGS BA (1996). Purification characterisation of a phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate dependent protein kinase (PDK1) that phosphorylates and activates protein kinase B α . *EMBO J*. 15: 6451-6551.

AMAN MJ, TOSELLO-TRAMPONT AC, RAVICHANDRAN K (2001). Fc γ RIIB1/SHIP-mediated Inhibitory signaling in B cells involves lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 276: 46371-46378.

AUEWARAKUL CU, LAUHAKIRTI D, PROMSUWICHA O, MUNKHETVIT C (2005): C-kit receptor tyrosine kinase (CD117) expression and its positive predictive value for the diagnosis of Thai adult acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 85(2):108-112.

BARAN CP, TRIDANDAPANI S, HELGASON CD, HUMPHRIS RK, KRYSTAL G, MARSH CB (2003). The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J. Biol. Chem.* 278(40): 38628-38636.

BASSO G, LANZA F, ORFAO A, MORETTI S, CASTOLDI G (2001). Clinical and biological significance of CD34 expression in acute leukaemia. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 15(1): 68-78.

BEGEMANN M: *Praktische Hämatologie*. 12.Auflage 2002, Thieme Verlag Stuttgart.

BIRNBAUM MJ (2005). SHIPing news: a new way to keep your weight down. *Cell. Metab.* 1(2): 90-92.

BOLLAG G, CLAPP DW, SHIH S, ADLER F, ZHANG YY, THOMPSON P, LANGE BJ, FREEDMAN MH, MCCORMICK F, JACKS T, SHANNON K (1996). Loss of NF-1 results in activation of the Ras signaling pathway and leads to aberrant growth in hematopoietic cells. *Nat. Genet.* 12(2): 144-148.

CASCAVILLA N, MUSTO P, D'ARENA G, MELILLO L, CARELLA AM, PETRILLI MP, SSANPAOLO G, CAROTENUTO M (1998). CD117 (c-kit) is a restricted antigen of acute myeloid leukemia and characterizes early differentiative levels of M5 FAB subtype. *Haematologica* 83(5): 392-397.

CHANG JM, METCALF D, LANG RA, GONDA TJ, JOHNSON GR (1989). Non neoplastic hematopoietic myeloproliferative syndrome induced by dysregulated multi-CSF (IL-3) expression. *Blood* 73: 1487-1497.

CHANG F, LEE JT, NAVOLANIC PM, STEELMAN JG, SHELTON JG, BLALOCK WL, FRANKLIN RA, MCCUBREY JA (2003). Involvement of PI3K/AKT pathway in cell progression, apoptosis and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17: 590-603.

CHOUDHARY C, BRANDTS C, SCHWABLE J, TICKENBROCK L, SARGIN B, UECKER A, BOHMER FD, BERDEL WE, MULLER-TIDOW C, SERVE H (2007). Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood* 110(1): 370-374.

COGGESHALL KM, NAKAMURA K, PHEE H (2002). How do inhibitory phosphatases work? *Mol. Immunol.* 39(9): 521-529.

CREMONA O, DI PAOLO G, WENK MR, LUTHI A, KIM WT, TAKEI K, DANIELL L, NEMOTO Y, SHEARS SB, FLAVELL RA (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell.* 99: 179-188.

CULLY M, YOU H, LEVINE AJ, MAK TW (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6(3): 184-192.

DAERON M, MALBEC O, LATOUR S, AROCK M, FRIDMAN WH (1995). Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J. Clin. Invest.* 95: 577-585.

DAIGLE I, YOUSEFI S, COLONNA M, GREEN DR, SIMON HU (2002). Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat. Med.* 8(1):61-67.

DAMEN JE, LIU L, ROSTEN P, HUMPHRIES RK, JEFFERSON AB, MAJERUS PW, KRYSTAL G (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1689-1693.

DAMEN JE, LIU L, WARE MD, ERMOLAEVA M, MAJERUS PW, KRYSTAL G (1998). Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase SHIP are generated by c-terminal truncation. *Blood* 92: 1199-1205.

DECKER SJ UND SALTIEL AR (2005). Staying in SHIP shape *Nat. Med.* 11(2): 123-124.

DÉLÈRIS P, BACQUEVILLE D, GAYRAL S, CHARREZ L, SALLES JP, PERRET B, BRETON-DOUILLON M (2003). SHIP-2 and PTEN are expressed and active in vascular smooth muscle cell nuclei, but only SHIP-2 is associated with nuclear speckles. *J. Biol. Chem.* 278 (40): 38884-38891.

DESPONTS C, NINOS JM, KERR WG (2006). s-SHIP associates with receptor complexes essential for pluripotent stem cell growth and survival. *Stem Cells Dev.* 15(5): 641-646.

- DEXTER TM, GARLAND J, SCOTT D, SCOLNICK E, METCALF D (1980). Growth of factor-dependent hematopoietic precursor cell lines. *J. Exp. Med.* 152: 1036-1047.
- DICK JE (2005). Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1044:1-5.
- DONG S, CORRE B, FOULON E, DUFOUR E, VEILLETTE A, ACUTO O, MICHEL F (2006). T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203(11): 2509-2518.
- ENDO TA, MASUHARA M, YOKOUCHI M, SUZUKI R, SAKAMOTO H, MITSUI K, MATSUMOTO A, TANIMURA S, OHTSUBO M, MISAWA H, MIYAZAKI T, LEONOR N, TANIGUCHI T, FUJITA T, KANAKURA Y, DOMIYA S, YOSHIMURA A (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387: 921-924.
- EMANUEL PD, BATES LJ, CASTLEBERRY RP, GUALTIERI RJ, ZUCKERMANN KS (1991). Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* 77: 925-929.
- FLUCKIGER AC, LI Z, KATO RM, WAHL MI, OCHS HD, LONGNECKER R, KINET JP, WITTE ON, SCHARENBERG AM, RAWLINGS KJ (1998). Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *EMBO J.* 17: 1973-1985.
- FREEDMAN MH, HITZLER JK, BUNIN N, GRUNBERGER T, SQUIRE J (1996). Juvenile chronic myelogenous leukemia multilineage CD34+ cells: aberrant growth and differentiation properties. *Stem Cells* 14(6): 690- 701.
- FUKUDA M,, KOJIMA T, KABAYAMA H, MIKOSHIBA K (1996). Mutation of the pleckstrin homology domain of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficiency impaired inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate binding capacity. *J. Biol. Chem.* 271: 30303-30306.
- GALANDRINI R, TASSI I, MATTIA G, LENTI L, PICOLLI M, FRATI L, SANTONI A (2002). SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells. *Blood* 100: 4581-4589.
- GANESAN LP, JOSHI T, FANG H, KUTALA VK, RODA J, TROTTA R, LEHMANN A, KUPPUSAMY P, BYRD JC, CARSON WE CALIGIURI MA, TRIDANDABANI S (2006). FcγR-induced production of superoxide and inflammatory cytokines is differentially regulated by SHIP through its influence on PI3K and/or Ras/Erk pathways. *Blood* 108(2): 718-725.
- GEIER SJ, ALGATE PA, CARLBERG K, FLOWERS D, FRIEDMANN C, TRASK B, ROHRSCHEIDER LR (1997). The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood* 89: 1876-1885.
- GILLILAND DG, GRIFFIN JD (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 100(5): 1532-1542.
- GLEBOV OO, NICHOLS BJ (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat. Cell. Biol.* 6(3): 238-243.

- GUPTA N, SCHARENBERG AM, FRUMAN DA, CANTLEY LC, KINET JP, LONG EO (1999). The SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) recruits the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase during FcγRIIb1-mediated inhibition of B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 274: 7489-7494.
- GUTHRIDGE MA, STOMSKI FC, THOMAS D, WOODCOCK JM, BAGLEY CJ, BERNDT MC, LOPEZ AF (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 16: 301-313.
- HARDER KW, QUILICI C, NAIK E, INGLESE M, KOUNTOURI N, TURNER A, ZLATIC K, TARLINTON DM, HIBBS ML (2004). Perturbed myelo/erythropoiesis in Lyn-deficient mice is similar to that in mice lacking the inhibitory phosphatases SHP-1 and SHIP-1. *Blood* 104(13): 3901-3910.
- HARDER T UND SIMONS K (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9(4): 534-542.
- HARMER SL UND DEFRANCO AL (1999). The src homology domain 2-containing inositol phosphatase SHIP forms a ternary complex with Shc and Grb2 in antigen receptor-stimulated B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274: 12183-12191.
- HELGASON CD, DAMEN JE, ROSTEN P, GREWAL R, SORENSEN P, CHAPPEL SM, BOROWSKI A, JIRIK F, KRYSTAL G, HUMPHRIES RK (1998). Targeted disruption of *SHIP* leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes & Development* 12: 1610-1620.
- HELGASON CD, ANTONCHUK J, BODNER C, HUMPHRIES RK (2003). Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice. *Blood* 102(10): 3541-3547.
- HEMMINGS BA (1997). Akt Signaling: Linking Membrane Events to Life and Death Decisions. *Science* 275: 628-630.
- HORN S, MEYER J, HEUKESHOVEN J, FEHSE B, SCHULZE C, LI S, FREY J, POLL S, STOCKING C, JÜCKER M (2001). The inositol 5-phosphatase SHIP is expressed as 145 and 135 kDa proteins in blood and bone marrow cells in vivo, whereas carboxyl-truncated forms of SHIP are generated by proteolytic cleavage in vitro. *Leukemia*. 15:112-120.
- HUBER M, HELGASON CD, DAMEN JE, KIU K, HUMPHRIES RK, KRYSTAL G (1998). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 11330-11335.
- HUNTER MG, JACOB A, O'DONNELL LC, AGLER A, DRUHAN LJ, COGGESHALL KM, AVALOS BR (2004). Loss of SHIP and CIS recruitment to the granulocyte colony-stimulating factor receptor contribute to hyperproliferative responses in severe congenital neutropenia/acute myelogenous leukaemia. *J. Immunol.* 173(8): 5036-5045.
- ISNARDI I, LESOURNE R, BRUHNS P, FRIDMAN WH, CAMBIER JC, DAERON M (2004). Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor FcγRIIb to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J. Biol. Chem.* 279(50): 51931-51938.

JIANG X, STUIBLE M, CHALANDON Y, LI A, CHAN WY, EISTERER W, KRYSTAL G, EAVES A, EAVES C (2003). Evidence for a positive role of SHIP in the BCR-ABL-mediated transformation of primitive murine hematopoietic cells and in human chronic myeloid leukaemia. *Blood* 102(8): 2976-2984.

JOHNSON GR, GONDA TJ, METCALF D, HARIHARAN IK, CORY S (1989). A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J.* 8: 441-448.

JORGENSEN HG, HOLYOAKE TL (2001). A comparison of normal and leucemic stem cell biology in chronic myeloid leukemia. *Hematol. Oncol.* 19: 89-106.

KALESNIKOFF J, LAM V, KRYSTAL G (2002). SHIP represses mast cell activation that IgE alone triggers signaling pathways which enhance normal mast cell survival. *Mol. Immunol.* 38 (16-18):1201-

KALESNIKOFF J, SLY LM, HUGHES MR, BUCHSE T, RAUH MJ, CAO LP, LAM V, MUI A, HUBER M, KRYSTAL G (2003). The role of SHIP in cytokine-induced signaling. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149: 87-103.

KARLSSON P, DOENCKE D, KOOLMAN J: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage 1994, Thieme Verlag, Stuttgart.

KASHIWADA M, CATTORETTI G, McKEAG L, ROUSE T, SHOWALTER BM, AL-ALEM U, NIKI M, PANDOLFI PP, FIELD EH, ROTHMAN PB (2006). Downstream of tyrosine kinases-1 and Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase are required for regulation of CD4+CD25+ T cell development. *J. Immunol.* 176(7): 3958-3965.

KAVANAUGH WM, POT DA, CHIN SM, DEUTER-REINHARD M, JEFFERSON AB, NORRIS FA, MASIARZ FR, COUSENS LS, MAJERUS PW, WILLIAMS LT (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Current Biology* 4: 438-445.

KAWANO T, INDO Y, NAKAZATO H, SHIMADZU M, MATSUDA I (1998). Oculocerebrorenal syndrome of Lowe: Three mutations in the OCRL1 gene derived from three patients with different phenotypes. *Am J. Med. Genet.* 77: 348-355.

KIMURA T, SAKAMOTO H, APPELLA E, SIRAGANIAN RP (1997). The negative signaling molecule SH2 domain-containing inositol-polyphosphate 5-phosphatase (SHIP) binds to the tyrosine-phosphorylated beta subunit of the high affinity IgE receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 13991-13996.

KITAMURA T, TANGE T, TERASAWA T, CHIBA S, KUWAKI T, MIYAGAWA K, PIAO Y, MIYAZONO K, URABE A, TAKAKU F (1989). Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell. Physiol.* 140: 323-334.

KRAUSS G: Biochemistry of signal transduction and regulation. 2. Edition 2001, Wiley-VCH Verlag Weinheim.

- KRYSTAL G (2000). Lipid phosphatases in the immune system. *Semin. Immunol.* 12(4):397-403.
- KUBOTA Y, OHNISHI H, KITANAKA A, ISHIDA T, TANAKA T (2004). Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation. *Leukemia* 18(8): 1438-1440.
- KUROSAKI T (1999). Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 555-592.
- LAMKIN TD, WALK SF, LIU L, DAMEN JE, KRYSTAL G, RAVICHANDRAN KS (1997). Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphate (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J. Biol. Chem.* 272(16): 10396-10401.
- LE DT, KONG N, ZHU Y, LAUCHLE JO, AIYIGARI A, BRAUN BS, WANG E, KOGAN SC, LE BEAU MM, PARADA L, SHANNON KM (2004). Somatic inactivation of Nf1 in hematopoietic cells results in a progressive myeloproliferative disorder. *Blood* 103(11): 4243-4250.
- LEGITIMO A, CONSOLINI R, COCITO MG, BUFFONI R, BASSO G, MACCHIA P (1999). The c-kit receptor and its ligand stem cell factor in childhood malignant lymphoid precursors. *J. Interferon Cytokine Res.* 19(9): 981-987.
- LI L, PILOTO O, KIM KT, YE Z, NGUYEN HB, YU X, LEVIS M, CHENG L, SMALL D (2007). FLT3/ITD expression increases expansion, survival and entry into cell cycle of human haematopoietic stem/progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 137(1): 64-75.
- LIUBIN MN, ALGATE PA, TSAI S, CARLBERG K, AEBERSOLD R, ROHRSCHEIDER LR (1996). p150^{SHIP}, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes & Development* 10:1084-1095.
- LIU L, DAMEN JE, CUTLER RL, KRYSTAL G (1994). Multiple Cytokines Stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6926-6935.
- LIU L, DAMEN JE, WARE MD, KRYSTAL G (1997a). Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *J. Biol. Chem.* 272: 10998-11001.
- LIU L, DAMEN JE, HUGHES MR, BABIC I, JIRIK FR, KRYSTAL G (1997b). The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 8983-8988.
- LIU Q, SASAKI T, KOZIERADZKI I, WAKEHAM A, ITIE A, DUMONT DJ, PENNINGER JM (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes & Development* 13: 786-791.
- LOTTSPEICH F, ZORBAS H: *Bioanalytik*. 1. Auflage 1998, Spektrum Akadem. Verlag Berlin, Heidelberg.

- LOWENBERG B, VAN PUTTEN WL, TOUW IP, DELWEL R, SANTINI V (1993). Autonomous proliferation of leukemic cells in vitro as a determinant of prognosis in adult acute myeloid leukaemia. *N. Engl. J. Med.* 328(9): 614-619.
- LOZZIA CB UND LOZZIO BB. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334.
- LUCAS DM UND ROHRSCHEIDER LR (1999). A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase SHIP is expressed during myeloid development. *Blood* 93: 1922-1933.
- LUO JM, YOSHIDA H, KOMURA S, OHISHI N, PAN L, SHIGENO K, HANAMURA I, MIURA K, IIDA S, UEDA R, NAOE T, AKAO Y, OHNO R, OHNISHI K (2003). Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17: 1-8.
- LUO JM, LIU ZL, HAO HL, WANG FX, DONG ZR, OHNO R (2004). Mutation analysis of SHIP gene in acute leukaemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12(4): 420-426.
- MAEDA K, BABA Y, NAGAI Y, MIYAZAKI K, MALYKIN A, NAKAMURA K, KINCADE PW, SAKAGUCHI N, COGGESGALL KM (2005). IL-6 blocks a discrete early step in lymphopoiesis. *Blood* 106(3): 879-885.
- MAEHAMA T UND DIXON JE (1999). PTEN: A tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* 9: 125-128.
- MAJERUS PW, KISSELEVA MV, NORRIS FA (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* 274: 10669-10672.
- MALBEC O, ATTAL JP, FRIDMAN WH, DAERON M (2002). Negative regulation of mast cell proliferation by Fc γ RIIB. *Mol. Immunol.* 38(16-18): 1295-1299.
- MARISAVLJEVIC D, ROLOVIC Z, SEFER D, BASARA N, ILIC D, BOSKOVIC D, COLOVIC M (2002). Biological and clinical significance of clonogenic assays in patients with myelodysplastic syndromes. *Med. Oncol.* 19(4): 249-259.
- MARTELLI AM, NYAKERN M, TABELLINI G, BORTUL R, TAZZARI PL, EVANGELISTI C, COCCO L (2006). Phosphoinositid-3'-kinase AKT signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20: 911-928.
- MATSUMOTO A, MASUHARA M, MITSUI K, YOKOUCHI M, OHTSUBO M, MISAWA H, MIYAJIMA A, YOSHIMURA A (1997). Cis, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89: 3148-3154.
- MCPHERSON PS, GARCIA EP, SLEPNEV VI, DAVID C, ZHANG X, GRABS D, SOSSIN WS, BAUERFEIND R, NEMETO Y, DE CAMILLI P (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379: 353-357.
- METZNER A, HORSTMANN MA, FEHSE B, ORTMAYER G, NIEMEYER CM, STOCKING C, MAYR GW, JUCKER M (2007). Gene transfer of SHIP-1 inhibits proliferation of juvenile myelomonocytic leukemia cells carrying KRAS2 or PTPN11 mutations. *Gene Ther.* 14(8): 699-703.

- MODROW S, FALKE D, TRUYEN U (2003). Molekulare Virologie. G. Fischer Spektrum Akadem. Verlag Heidelberg, Berlin.
- MOELLING K, SCHAD K, BOSSE M, ZIMMERMANN S, SCHWENEKER M (2002). Regulation of Raf-Akt cross talk. *J. Biol. Chem.* 277: 31099-31106.
- MOODY JL, PEREIRA CG, MAGIL A, FRITZLER MJ, JIRIK FR (2003). Loss of a single allele of SHIP exacerbates the immunopathology of Pten heterozygous mice. *Genes Immun.* 4(1): 60-66.
- MOODY JL, XU L, HELGASON CD, JIRIK FR (2004). Anemia, thrombocytopenia, leukocytosis, extramedullary hematopoiesis, and impaired progenitor function in Pten^{+/-}/SHIP^{-/-} mice: a novel model of myelodysplasia. *Blood* 103(12): 4503-4510.
- MOORE MA, DORN DC, SCHURINGA JJ, CHUNG KY, MORRONE G (2007). Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 35(4 Suppl. 1): 105-116.
- MULLIGAN RC (1993): The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932.
- MUTA T, KUROSAKI T, MISULOVIN Z, SANCHEZ M, NUSSENZWEIG MC, RAVETCH JV (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signaling. *Nature* 368: 70-73.
- MYERS MP, STOLAROV JP, ENG C, LI J, WANG SI, WIGLER MH, PARSONS R, TONKS NK (1997). PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9052-9057.
- NAKA T, NARAZAKI M, HIRATA M, MATSUMOTO T, MINAMOTO S, AONO A, NISHIMOTO N, KAJITA T, TAGA T, YOSHIZAKI K, AKIRA S, KISHIMOTO T (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387: 924-928.
- NAKAMURA K, MALYKHIN A, COGGESHALL KM (2002). The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosin-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood* 100: 3374-3382.
- NAKAMURA K, KOURO T, KINCADE PW, MALYKHIN A, MAEDA K, COGGESHALL KM (2004). Src homology 2-containing 5-inositol phosphatase (SHIP) suppresses an early stage of lymphoid cell development through elevated interleukin-6 production by myeloid cells in bone marrow. *J. Exp. Med.* 199(2): 243-254.
- NALDINI L (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(5): 457-463.
- NATHAN UND OSKIS (2003). Hematology of infancy and childhood. W. B. Saunders Company 6. Auflage, 2: 1167-1189.

- NYAKERN M, TAZZARI PL, FINELLI C, BOSI C, FOLLO MY, GRAFONE T, PICCALUGA PP, MARTINELLI G, COCCO L, MARTELLI AM (2006). Frequent elevation of Akt kinase phosphorylation in blood marrow and peripheral blood mononuclear cells from high-risk myelodysplastic syndrome patients. *Leukemia* 20(2): 230-238.
- OH SY, ZHENG T, BAILEY ML, BARBER DL, SCHROEDER JT, KIM YK, ZHU Z (2007). Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 deficiency leads to a spontaneous allergic inflammation in the murine lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119(1): 123-131.
- ONO M, BOLLAND S, TEMPST P, RAVETCH J (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc γ RIIb. *Nature* 383: 263-266.
- ONO M, OKADA H, BOLLAND S, YANAGI S, KUROSAKI T, RAVETCH J (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 Reveals Two Distinct Pathways for Inhibitory Signaling. *Cell* 90: 293-301.
- OSBORNE MA, ZENNER G, LUBINUS M, ZHANG X, SONGYANG Z, CANTLEY LC, MAJERUS P, BURN P, KOCHAN JP (1996) The inositol 5'-Phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J. Biol. Chem.* 271: 29271-29278.
- PARSA KV, GANESAN LP, RAJARAM MV, GAVRILIN MA, BALAGOPAL A, MOHAPATRA NP, WEWERS MD, SCHLESINGER LS, GUNN JS, TRINDANDAPANI S (2006). Macrophage pro-inflammatory response to *Francisella novicida* infection is regulated by SHIP. *PLoS. Pathog.* 2(7): 71
- PASSEGUES E, JAMIESON CH, AILLES LE, WEISSMAN IL (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 11842-11849.
- PASSEGUE E UND WEISMAN IL (2005). Leukemic stem cells: where do they come from? *Stem Cell Rev.* 1(3): 181-188.
- PESESE X, DELEU S, DE SMEDT F, DRYER L, ERNEUX C (1997). Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239: 697-700.
- PESESE X, MOREAU C, DRAYER AL, WOSCHOLSKI R, PARKER P, ERNEUX C (1998). The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity. *FEBS Lett.* 437(3): 301-303.
- PETRIE RJ, SCHNETKAMP PPM, PATEL KD, AWASTHI-KALIA M, DEANS JP (2000). Transient translocation of the B cell receptor and Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase to lipid rafts: evidenc toward a role in calcium regulation. *J. Immunol.* 165: 1220-1227.
- PHEE H, RODGERS W, COGGESHALL KM (2001). Visualization of negative signaling in B cells by quantitative confocal microscopy. *Mol. Cell. Biol.* 24: 8615-8625.

- POLLARD JA, ALONZO TA, GERBING RB, WOODS WG, LANGE BJ, SWEETSER DA, RADICH JP, BERNSTEIN ID, MESHINCHI S (2006). FLT3 internal tandem duplication in CD34+/CD33-precursors predicts poor outcome in acute myeloid leukaemia. *Blood* 108(8): 2764-2769.
- RASHED S, NELSON-REES W, TOTH EM, ARNSTEIN P, GARDNER MB (1974). Characterisation of a newly derived sarcoma cell line (HT1080). *Cancer* 33(4): 1027-1033.
- ROBSON JD, DAVIDSON D, VEILLETTE A (2004). Inhibition of the Jun N-terminal protein kinase pathway by SHIP-1, a lipid phosphatase that interacts with the adaptor molecule Dok-3. *Mol. Cell. Biol.* 24(6): 2332-2343.
- SALIM K, BOTTOMLEY MJ, QUERFURTH E, ZVELEBIL MJ, GOUT I, SCAIFE R, MARGOLIS RL, GIGG R, SMITH CIE, DRISCOLL PC (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* 15: 6241-6250.
- SATTLER M, VERMA S, BYRNE CH, SHRIKHANDE G, WINKLER T, ALGATE PA, ROHRSCHEIDER LR, GRIFFIN JD (1999). BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, a SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 19(11): 7473-7480.
- SANGER F, NICKLEN S, COUSON AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SAXTON TM, VAN OOSTVEEN I, BOWTELL D, AEBERSOLD R, GOLD MR (1994). B Cell Antigen Receptor Cross-Linking Induces Phosphorylation of the p21^{ras} Oncoprotein Activators SHC and mSOS1 As Well As Assembly of Complexes Containing SHC, GRB-2, mSOS1, and a 145-kDa Tyrosine-Phosphorylated Protein. *J. Immunol.* 153: 623-636.
- SCHAFFHAUSEN B (1995). SH2 domain structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1242: 61-75.
- SCHEID MP, HUBER M, DAMEN JE, HUGHES M, KANG V, NEILSEN P, PRESTWICH GD, KRYSTAL G, DURONIO V (2002). Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P₂ is required for PKB phosphorylation at Ser-473. *J. Biol. Chem.* 277: 9027-9035.
- SIEGENTHALER W, KAUFMANN W, HORNBOSTEL H, WALLER HD: Lehrbuch der inneren Medizin, 2.Auflage 1987, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- SLY LM, RAUH MJ, KALESNIKOFF J, BUCHSE T, KRYSTAL G (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp. Hematol.* 31(12): 1170-1181.
- SLY LM, HO V, ANTIGNANO F, RUSCHMANN J, HAMILTON M, LAM V, RAUH MJ, KRYSTAL G (2007). The role of SHIP in macrophages. *Front. Biosci.* 12: 2836-2848.
- SONGYANG Z, SHOELSON SE, CHAUDHURI M, GISH G, PAWSON T, HASER WG, KING F, ROBERTS T, RATNOFSKY S, LECHLEIDER RJ (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767-778.

- STARR R, WILLSON TA, VINEY EM, MURRAY LJL, RAYNER JR, JENKINS BJ, GONDA TJ, ALESADER WS, METCALF D, NICOLA NA, HILTON DJ (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387: 917-921.
- STEELMAN LS, BERTRAND FE, McCubrey JA (2004). The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert. Opin. Ther. Targets* 8(6):537-550.
- STIREWALT DL UND RADICH JP (2003). The role of FLT3 in hematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 3: 650-665.
- SWEENEY MC, WAVEREILLE AS, PARK J, BUTCHAR JP, TRIDANDAPANI S, PEI D (2005). Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry* 44(45): 14932-14947.
- TAKESHITA S, NAMBA N, ZHAO J, JIANG Y, GENANTI HK, SILVA MJ, BRODT MD, HELGASON CD, KALESNIKOFF J, RAUH M, HUMPHRIES RK, KRYSAL G, TEITELBAUM SL, ROSS FP (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat. Med.* 8 (9): 943-949.
- TAMBURINI J, ELIE C, BARDET V, CHAPUIS N, PARK S, BROET P, CORNILLET-LEFEBVRE P, LIOURE B, UGO V, BLANCHET O, IFRAH N, WITZ F, DREYFUS F, MAYEUX P, LACOMBE C, BOUSCARY D (2006). Phosphoinositid-3Kinase/AKT activation represents a favourable prognostic factor in *de novo* AML patients.
- TAZZARI PL, CAPPELLINI A, GRAFONE T, MANTOVANI I, RICCI F, BILLI AM, OTTAVIANI E, CONTE R, MARTINELLI G, MARTELLI AM (2004). Detection of serine 473 phosphorylated Akt in acute myeloid leukaemia blasts by flow cytometry. *Br J Haematol* 126(5): 675-681.
- TOMLINSON MG, HEATH VL, TURCK CW, WATSON SP, WEISS A (2004). SHIP family inositol phosphatases interact with and negatively regulate the Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 279(53): 55089-55096.
- TRIDANDAPANI S, CHACKO GW, VAN BROCKLYN JR, COGGESHALL KM (1997). Negative signalling in B cells causes reduced Ras activity by reducing Shc-Grb2 interactions. *J. Immunol.* 158: 1125-1132.
- TU Z, NINOS JM, MA Z, WANG JW, LAMOS MP, DESPONTS C, GHANSAH T, HOWSON JM, KERR WG (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* 98: 2028-2038.
- UNKELESS JC und JIN J (1997). Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 338-343.
- VAN DER GEER P UND PAWSON T (1995). The PTB domain: A new protein module implicated in signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 20: 277-280.
- WAIN CM, WESTWICK J, WARD SG (2005). Heterologous regulation of chemokine receptor signaling by the lipid phosphatase SHIP in lymphocytes. *Cell. Signal.* 17(10): 1194-1202.

- WAGENER C. (1999). Molekulare Onkologie. Thieme Verlag Stuttgart.
- WANG JW, HOWSON JM, GHANSAH T, DESPONTS C, NINOS JM, MAY SL, NGUYEN KH, TOYAMA-SORIMACHI N, KERR WG (2002). Influence of SHIP on the NK repertoire and allogenic bone marrow transplantation. *Science* 295(5562): 2094-2097.
- WEISEL KC, YILDIRIM S, SCHWEIKLE E, KANZ L, MOEHLE R (2007). Effect of FLT3 Inhibition on Normal Hematopoietic Progenitor Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell. Dev. Bio.* 17: 387-403.
- WISNIEWSKI D, STRIFE A, SWENDEMAN S, ERDJUMENT-BROMAGE H, GEROMANOS S, KAVANAUGH WM, TEMPST P, CLARKSON B (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93: 2707-2720.
- XU Q, SIMPSON SE, SCIALLA TJ, BAGG A, CARROLL M (2003). Survival of acute myeloid leukaemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 102(3):972-980.
- YI T, MUI AL, KRYSTAL G, IHLE JN (1993). Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin - 3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7577-7586.
- YOSHIMURA A, OHKUBO T, KIGUCHI T, JENKINS NA, GILBERT DJ, COPELAND NG, HARA T, MIYAJIMA A (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2 - containinprotein that binds to tyrosinephosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* 14: 2816-2826.
- ZENG Z, SAMUDIO IJ, ZHANG W, ESTROV Z, PELICANO H, HARRIS D, FROLOVA O, HAIL N, JR.CHEN W, KORNBLAU SM, HUANG P, LU Y, MILLS GB, ANDREEF M, KONOPLEEVA M (2006). Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukaemia. *Cancer Res.* 66(7): 3737-3746.
- ZHANG H, SHAO Z, CHEN G, WANG L, ZHANG Y, LI K, LI L, SUN J, HAO Y (2000). Study of the expression and function of c-kit receptor on the bone marrow mononuclear cells of the patients with myelodysplastic syndromes. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 21(4): 176-178.
- ZHU J, EMERSON SG (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21(21): 3295-3313.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
Bis	Bisacrylamid (N,N'-methylen-bisacrylamid)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CFU	Kolonie-bildende Einheit (<i>colony forming units</i>)
CML	Chronische Myeloische Leukämie
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-6-indolcarbamidin dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Minimalmedium (<i>Dulbeccos minimal essential medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grünfluoreszierendes Protein (<i>enhanced fluorescence protein</i>)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötale Kälberserum [<i>fetal calf serum</i>]
Flt3	(<i>fms like tyrosin kinase 3</i>)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (<i>Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GM-CSF	Granulocyten/Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor
Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor bindendes Protein 2 (<i>growth factor receptor binding protein 2</i>)

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ins	Inositol
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Side</i>
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LAT	<i>Linker for activation of T cells</i>
LTR	<i>(long terminal repeat)</i>
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minute
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	milliliter
mM	millimolar
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NP40	Nonylphenylpolyethylenglykol
OMF	Osteomyelofibrose
OCRL	oculo-cerebro-renales / Lowe-Syndrom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	Polycythaemia vera
PDK	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase (<i>phosphoinositid-dependent protein kinase</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B

PMSF	Phenylmethansulfonyl fluorid
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphat
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PE	Phycoerythrin
PRE	Posttranskriptionelles regulatorisches Element
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (<i>phosphotyrosine binding domain</i>)
PTEN	(<i>phosphatase and tensin homologue deletetd on chromosome ten</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SH-Domäne	Src-Homologiedomäne (<i>Src homology domain</i>)
Shc	(<i>SH2-containing collagen-related protein</i>)
SHIP	Src-Homologie-2 beinhaltende Insositol-5'-Phosphatase
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichlor acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPO	Thrombopoetin
TRE	(<i>tetracycline-response-element</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
VSV	Vesiculo Stomtitis Virus
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Hämatopoese	4
Abb. 2:	Schematische Darstellung der 145 kD-Isoform durch SHIP-1.....	7
Abb. 3:	Übersicht über die Signaltransduktion	11
Abb. 4:	Retroviraler Vektor SF91iGpre	28
Abb. 5:	Lentiviraler Vektor pRRL.sinh.CMV.GFP.pre	29
Abb. 6:	Die Proliferation der CD34 ⁺ -Zellen aus Nabelschnurblut führt zu einer Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1	49
Abb. 7:	Der hemmende Effekt von SHIP-1 auf die CFU-GM ist Konzentrationsabhängig	51
Abb. 8:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des JMML-Patienten#2	52
Abb. 9:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 bei einem zweiten JMML-Patienten#3	54
Abb. 10:	Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 mit unterschiedlichen GM-CSF Konzentrationen	55
Abb. 11:	GM-CSF-abhängiges Wachstum nicht transduzierter Zellen eines gesunden Spenders und des JMML-Patienten#3	56
Abb. 12:	Western Blot der Expression von SHIP-1 und p-AKT von gesunden Spendern und JMML-Patienten	57
Abb. 13:	Einzelfärbung der Jurkat#51-Zellen mit p-AKT-APC und SHIP-FITC	58
Abb. 14:	Immunfärbung der Jurkat#51 Zellen mit anti-SHIP-FITC und anti-p-AKT-APC	60
Abb. 15:	Hemmung des Wachstums durch SHIP-1	62
Abb. 16:	Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstum durch SHIP-1 in semi- solidem Medium	63
Abb. 17:	Reduzierung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 in der Flüssigkultur	64
Abb. 18:	Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1 des AML-Patient#4 und Immunfärbung CD33-PE, CD34-PE, SHIP-FITC und p-AKT-APC	65
Abb. 19:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der Zellen durch SHIP-1 des AML-Patient#5 und Immunfärbung mit CD33-PE und CD34-PE	68

Abb. 20:	Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des AML-Patient#6	70
Abb. 21:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des AML-Patienten#7	72
Abb. 22:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des AML-Patienten#8	74
Abb. 23:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#9	76
Abb. 24:	Hemmung des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#10	77
Abb. 25:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#11	79
Abb. 26:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstum der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#12	81
Abb. 27:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#13	83
Abb. 28:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#14	85
Abb. 29:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des Patienten#15	86
Abb. 30:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen von allen AML-Patienten	87
Abb. 31:	Reduktion des autonomen Wachstums der CD34 ⁺ -Zellen durch SHIP-1 des MPS-Patienten#16	88
Abb. 32:	Reduktion des GM-CSF-abhängigen Wachstums durch SHIP-1	89
Abb. 33:	Immunfärbung der peripheren mononukleären Blutzellen des MPS-Patienten#16	90
Abb. 34:	Western Blot-Analyse der Expression von SHIP-1 und p-AKT der PBMCs des MPS-Patienten#16	91

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2003 bis März 2007 in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefertigt. Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei PD Dr. M. Jücker für die Anleitung und Betreuung sowie für die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. G. W. Mayr möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich meine Arbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie durchführen konnte. Ebenso möchte ich mich für seine Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. K. Wiese möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und der Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Herrn Prof. Dr. W. Fiedler, Abteilung für Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Bereitstellung der Blut- und Knochenmarkproben von Leukämiepatienten danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. B. Fehse, Abteilung für Knochenmarktransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Möglichkeit der FACS-Analyse danken, insbesondere Melanie Engel, die immer wieder meine Zellen am FACS analysiert hat.

Frau Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie Hamburg, möchte ich für die Bereitstellung des retroviralen Vektors danken. Arne Düsedau möchte ich dafür danken, dass er die Zellen sortiert hat.

Für das gute Arbeitsklima und die praktische Anleitung möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion, insbesondere bei Dr. Lizet Garcia-Palma, Wiebke Wegner und Dr. Stefan Horn bedanken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mein Studium und die anschließende Doktorarbeit durch ihre Unterstützung erst möglich gemacht haben. Deswegen ist diese Arbeit ihnen gewidmet.

Publikationen

Aus dieser Arbeit sind während der Promotionszeit folgenden Publikationen hervorgegangen:

Originalarbeiten

- 2007** **A. Metzner**, M.A. Horstmann, B. Fehse, G. Ortmeier, C.M. Niemeyer, C. Stocking, G.W. Mayr, M. Jucker. Gene transfer of SHIP-1 inhibits proliferation of juvenile myelomonocytic leukemia cells carrying KRAS2 or PTPN11 mutations. *Gene Ther.* 14(8):699-703.

Poster- und Kongressebeiträge

- 2004** **A. Metzner**, W. Wegner, B. Fehse, K. Hecher, G. Ortmeier, C. Stocking, G. W. Mayr und M. Jücker. Reduced proliferation and colony formation of CD34⁺ cells from patients with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) after expression of the Inositol-5-Phosphatase SHIP-1 (Vortrag). 8th Signaltransduction meeting, Weimar.
- 2005** **A. Metzner**, W. Wegner, B. Fehse, K. Hecher, G. Ortmeier, C. Stocking, G. W. Mayr und M. Jücker. Reduced proliferation and colony formation of CD34⁺ cells from patients with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) after expression of the Inositol-5-Phosphatase SHIP-1 (Poster). Wilsede Meeting, Wilsede.
- 2007** **A. Metzner**, W. Fiedler, G. Ortmeier, B. Fehse, C. Stocking, M. Gramatzki, G.W. Mayr und M. Jücker. Gene transfer of the inositol-5-Phosphatase SHIP-1 inhibits proliferation of acute myeloid leukemia cells. GBM Tagung, Hamburg.