

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

- Zelluläre Signaltransduktion -

des Zentrums für Experimentelle Medizin

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Georg W. Mayr

**Untersuchungen zur Funktion einer mutierten
Form der p85 α -Untereinheit der
Phosphatidylinositol-3-Kinase (p76 α) für das
Wachstum hämatopoetischer Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Elion Hoxha
aus Tirana, Albanien
Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 25.08.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Gunter Schuch

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Braulke

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	1
2. Einleitung	2
2.1. Phosphatidylinositol-Kinasen	3
2.2. Phosphatidylinositol-3-Kinasen	4
2.2.1. PI3K der Klasse I	4
2.2.1.1. PI3K der Klasse Ia	5
2.2.1.2. PI3K der Klasse Ib	6
2.2.1.3. Eigenschaften der PI3K der Klasse I	7
2.2.2. PI3K der Klasse II	8
2.2.3. PI3K der Klasse III	9
2.3. Regulatorische Untereinheit der PI3K Klasse Ia	10
2.3.1. Isoformen der regulatorischen Untereinheit der PI3K Klasse Ia	11
2.3.2. Interaktion mit der katalytischen Untereinheit der PI3K Klasse Ia	12
2.3.3. Funktion der regulatorischen Untereinheit	13
2.3.3.1. Regulation über die SH2-Domänen	13
2.3.3.2. Regulation über die prolinreichen Regionen	16
2.3.3.3. Regulation über die BH-Domäne	17
2.3.3.4. Weitere Regulationsmechanismen über die regulatorische Untereinheit	17
2.3.3.5. Inhibition der PI3K durch die regulatorische Untereinheit ...	19
2.4. Regulation der katalytischen Untereinheit der PI3K Klasse I	20
2.4.1. Aktivierungsmechanismen	20
2.4.2. Inhibitionsmechanismen	21

2.5. Inhibitoren der PI3K	22
2.5.1. Wortmannin	22
2.5.2. LY294002	22
2.6. Aktivierung der Signalkaskade	23
2.7. Deaktivierung der PI3K Signalkaskade	25
2.7.1. PTEN	26
2.7.2. SHIP	27
2.8. Effektoren der PI3K	28
2.8.1. Rekrutierung der Proteine an der Zellmembran	29
2.8.1.1. Das Akt Protein	30
2.8.2. Akt-abhängige Signalkaskade	32
2.8.2.1. Zellüberleben	33
2.8.2.2. Zellwachstum	35
2.8.2.3. Zellproliferation	36
2.8.2.4. Angiogenese	37
2.8.2.5. Zellmetabolismus	37
2.8.2.6. Zellmigration und Invasivität	38
2.8.2.7. Weitere Funktionen	38
2.8.2.8. Weitere Proteine der PI3K Signalkaskade	41
2.9. Änderung der Expression der PI3K	41
2.9.1. Änderung der Expression der katalytischen Untereinheit	41
2.9.2. Änderung der Expression der regulatorischen Untereinheit	42
2.9.2.1. Hemmung der Expression der regulatorischen Untereinheit ..	42
2.9.2.2. Überexpression der regulatorischen Untereinheit	44
2.10. Mutationen der PI3K und Neoplasien	45
2.10.1. Die PI3K-Aktivität in Neoplasien	45

2.10.2. Mutationen der Proteine der PI3K Signalkaskade bei Neoplasien	46
2.10.2.1. Mutationen der katalytischen Untereinheit	46
2.10.2.2. Mutationen der regulatorischen Untereinheit	48
2.11. Darstellung der Versuche	49
2.11.1. Untersuchungen an der Cole Zelllinie	49
2.11.2. Untersuchungen an der NIH3T3 Zelllinie	51
2.11.3. Untersuchungen an CD34 ⁺ Zellen	52
2.11.4. Weitere Untersuchungen	54
3. Material und Methoden	55
3.1. Material	55
3.1.1. Chemikalien	55
3.1.2. Puffer und Stammlösungen	55
3.1.3. Antikörper	58
3.1.3.1. Primäre Antikörper	58
3.1.3.2. Sekundäre Antikörper	59
3.1.4. Enzyme und Reaktionskits	60
3.1.5. Bakterienstämme	60
3.1.6. Zellen	60
3.1.6.1. Zelllinien	60
3.1.6.2. Primäre Zellen	66
3.1.7. Nukleinsäuren	66
3.1.7.1. Vektoren	66
3.1.7.2. DNA-Oligonukleotide	70
3.1.8. Geräte	70
3.1.9. Verbrauchsmaterialien	71

3.2. Methoden	72
3.2.1. Bakterienkulturen	72
3.2.1.1. Wachstum und Vermehrung	72
3.2.1.2. Anlegen von Glycerolstocks	73
3.2.1.3. Transformation von Bakterien	73
3.2.2. Isolation von Plasmid-DNA	73
3.2.2.1. Maxi-Präparation	73
3.2.2.2. Mini-Präparation	74
3.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA	75
3.2.4. Enzymreaktionen von Nukleinsäuren	76
3.2.4.1. Restriktion von DNA	76
3.2.4.2. Dephosphorylierung von DNA	76
3.2.4.3. Ligation von DNA	76
3.2.5. Gelelektrophorese	77
3.2.5.1. DNA-Agarosegele	77
3.2.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	78
3.2.6. PCR und Sequenzierung	78
3.2.7. Zellkultur	80
3.2.7.1. Stammhaltung und Subkultivierung	80
3.2.7.2. Einfrieren von Zellen	81
3.2.7.3. Auftauen von Zellen	81
3.2.7.4. Serumentzug und Stimulationsversuch	81
3.2.7.5. Wachstumskinetik	82
3.2.7.6. Untersuchung der Zellproliferation mittels BrdU (Bromodeoxyuridin)	83

3.2.7.7. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung	84
3.2.7.8. Transfektion von 293gp-Zellen	84
3.2.7.9. Virustitration	86
3.2.7.10. Transduktion der Zellen	87
3.2.7.11. Präparation der mononukleären Zellen	89
3.2.7.12. CD34 ⁺ - Aufreinigung	90
3.2.7.13. Transduktion der CD34 ⁺ -Zellen	90
3.2.7.14. Sortieren der transduzierten Zellen am FACSAria	92
3.2.7.15. Methylcellulose- und Flüssigkultur-Assay der CD34 ⁺ Zellen .	93
3.2.7.16. <i>In vitro</i> Transkription / <i>in vitro</i> Translation	94
3.2.8. Proteinbiochemische Arbeiten	94
3.2.8.1. Zell-Lyse mit NP40-Puffer und Proteinextraktion	94
3.2.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	95
3.2.8.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Coomassie- Färbung	95
3.2.8.4. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen	96
3.2.8.5. Western Blot-Analyse	97
4. Ergebnisse	100
4.1. Herstellung der Retroviren	100
4.2. Wirkung der Expression von p76 α bzw. p85 α	102
4.2.1. Expression von p76 α bzw. p85 α in Cole Zellen	102
4.2.1.1. Expressionsnachweis	103
4.2.1.2. Akt-Phosphorylierung nach p76 α -Expression und p85 α - Überexpression	107

4.2.1.3. Untersuchung zum Mechanismus der p85α–	
Expressionshemmung	108
4.2.2. Expression von p76α bzw. p85α in PG13 und NIH3T3 Zellen	109
4.2.2.1. Expressionsnachweis	110
4.2.2.2. Akt-Phosphorylierung nach p76α–Expression und p85α–	
Überexpression	114
4.2.2.3. EGF-Stimulationsabhängige Akt-Phosphorylierung nach	
p76α–Expression und p85α–Überexpression	115
4.2.3. Expression von p76α bzw. p85α in CD34 ⁺ Zellen	118
4.2.3.1. GM-CSF-abhängige Koloniebildung nach p76α– bzw.	
p85α–Expression	118
4.2.4. Expression von p76α bzw. p85α <i>in vitro</i>	120
4.3. Überexpression der p85α–Untereinheit und ihre Wirkung auf das Wachstum	
von normalen und leukämischen hämatopoetischen Zellen	121
4.3.1. Herstellung der Retroviren mit Helferzellen mit einer stabilen Expression	
der Konstrukte	121
4.3.2. GM-CSF-abhängige Koloniebildung der CD34 ⁺ Zellen nach	
p85α–Transduktion	124
4.3.2.1. Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach	
p85α–Transduktion	125
4.3.2.2. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen	
Koloniebildung nach p85α–Transduktion von der GM-CSF-	
Konzentration	126
4.3.2.3. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen	
Koloniebildung nach p85α–Transduktion von der Stärke	

der p85 α -Überexpression	127
4.3.2.4. GM-CSF-abhängige Proliferation nach p85 α -Transduktion .	128
4.3.2.5. GM-CSF-abhängige Akt-Phosphorylierung an Ser473 nach p85 α -Transduktion	129
4.3.2.6. p85 α -Transduktion von CD34 ⁺ -Zellen eines Patienten in der Blastenkrise eines myeloproliferativen Syndroms	130
4.3.3. Effekte der p85 α -Transduktion in Leukämie-Zelllinien	131
4.3.3.1. Effekte der p85 α -Transduktion in 293-gp Zellen	131
4.3.3.2. Expressionsnachweis der p85 α -Untereinheit in 293-gp Zellen	131
4.3.3.3. Akt-Phosphorylierung nach p85 α -Überexpression in 293-gp Zellen	133
4.3.3.4. PI3K-Abhängigkeit der Proliferation der Leukämie-Zelllinien	134
4.3.3.5. P-Akt in den Leukämie-Zelllinien	139
4.3.3.6. Transduktion der Leukämie-Zelllinien	139
4.3.3.7. Expressionsnachweis der p85 α -Untereinheit in Leukämie- Zelllinien	142
4.3.3.8. Akt-Phosphorylierung nach Transduktion der Leukämie- Zelllinien	145
4.3.3.9. Proliferation der Leukämie-Zelllinien nach Transduktion	146
4.3.3.10. Sortierung der Jurkat Zellen nach der Transduktionseffizienz .	147
4.3.3.11. Expression der p85 α -Untereinheit in stark EGFP-positiven Jurkat-Zellen	148
4.3.3.12. Akt-Phosphorylierung in stark EGFP-positiven Jurkat- Zellen	150
4.3.3.13. Proliferation der schwach oder stark EGFP-positiven	

Jurkat-Zellen	151
4.3.3.14. BrdU-Messung der Zellproliferation	151
5. Diskussion	155
5.1. Wirkung der Expression von p76 α und p85 α	156
5.1.1. Effizienz der Zelltransduktion mit dem p76 α - bzw. p85 α - Konstrukt .	156
5.1.2. Expression von p76 α und p85 α nach Transduktion von NIH3T3 und PG13 Zellen	157
5.1.2.1. Fehlende Expression von p85 α bei Überexpression von p76 α nach Transduktion der Cole Zellen	157
5.1.3. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion	161
5.1.3.1. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion in Cole Zellen .	161
5.1.3.2. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion in NIH3T3 Zellen	162
5.1.3.3. EGF-Stimulation der mit p76 α - bzw. p85 α -transduzierten NIH3T3 Zellen	165
5.1.3.4. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion in CD34 ⁺ Zellen	166
5.2. Überexpression der p85 α -Untereinheit und ihre Effekte	166
5.2.1. Effekte der p85 α -Transduktion in CD34 ⁺ Zellen	167
5.2.1.1. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der GM-CSF Konzentration	167
5.2.1.2. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der p85 α -	

Überexpressionsstärke	168
5.2.1.3. Hemmung der GM-CSF-abhängigen Proliferation nach p85α– Transduktion	169
5.2.1.4. Effekte der p85α–Transduktion in CD34 ⁺ Zellen eines Patienten mit MPS	169
5.2.2. Effekte der p85α–Transduktion in anderen Zelllinien	172
5.2.2.1. Effekte der p85α–Transduktion in 293 gp Zellen	172
5.2.2.2. Effekte der p85α–Transduktion in Leukämie-Zelllinien	173
5.3. Mögliche klinische Bedeutung dieser Ergebnisse	180
6. Zusammenfassung	183
7. Literaturverzeichnis	185
8. Anhang	223
Abkürzungsverzeichnis	223
Abbildungsverzeichnis.....	228
Danksagung	233
Publikationen	235
Lebenslauf	236
Eidesstattliche Versicherung	237

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In der menschlichen hämatopoetischen Zelllinie Cole wurde eine mutierte Form der regulatorischen p85 α -Untereinheit der PI3K nachgewiesen, kloniert und charakterisiert (Jücker et al., 2002). Das mutierte p85 α -Gen kodiert für ein Protein von 76 kDa (p76 α), dem aufgrund der Deletion einer Base und dem damit verbundenen Wechsel im Leserahmen und Auftreten eines Stop-Codons die c-terminal gelegene SH2-Domäne fehlt. Die c-terminale SH2-Domäne beinhaltet neben ihren Bindungseigenschaften für tyrosinphosphorylierte Proteine auch noch eine regulatorische Domäne, die die PI3K negativ reguliert und deren inhibitorische Funktion für eine Aktivierung der PI3K aufgehoben werden muss (Disinhibitionsmodell). Der Wegfall der c-terminalen SH2-Domäne in der p85 α /PI3K-Mutante könnte zu der konstitutiven Aktivierung der PI3K führen, die in Cole Zellen beobachtet wurde.

In dieser Arbeit soll nun der direkte Einfluss dieser p85 α /PI3K-Mutante auf die Regulation der PI3K-Aktivität und auf das Wachstum von Zellen untersucht werden. Hierzu werden etablierte Zelllinien, sowie primäre humane hämatopoetische Progenitorzellen mit einem retroviralen Vektor transduziert, der das mutierte p85 α -Gen zusammen mit einem EGFP-Gen trägt. Als Kontrolle dient das Wildtyp-p85 α -Gen sowie der Vektor ohne p85 α -Gen. Transduzierte Zellen werden mittels FACS sortiert und nachfolgend entweder biochemisch auf eine Aktivierung der PI3K untersucht oder das Wachstum in Flüssigkulturen gemessen.

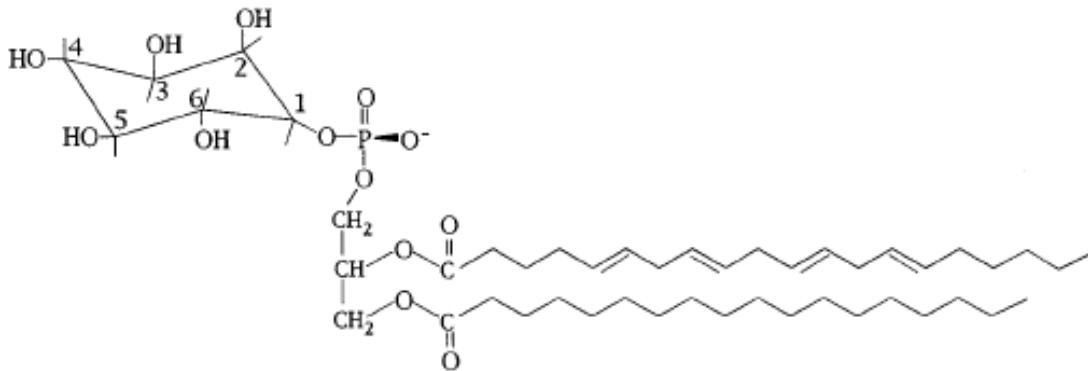
In Anlehnung an das Disinhibitionsmodell zur Regulation der PI3K Aktivität soll in einem zweiten experimentellen Ansatz untersucht werden, ob die Funktion der p85 α /PI3K-Mutante in Cole-Zellen durch die Expression des Wildtyp-p85 α -Gens aufgehoben werden kann. Hierzu soll das Wildtyp-p85 α -Gen in Cole Zellen exprimiert werden, die kein endogenes p85 α mehr exprimieren. Eine mögliche Erniedrigung der in diesen Zellen konstitutiv aktivierten PI3K Aktivität soll dann mittels PI3K-*in-vitro*-Kinase-Assay quantifiziert werden. Hierzu werden transduzierte Cole Zellen über die Expression von EGFP mittels FACS sortiert. Eine mögliche Auswirkung der p85 α -Expression auf die Proliferation oder Apoptose dieser Cole Zellen wird mittels Wachstumskurven analysiert.

2. Einleitung

Leukämien sind maligne Neoplasien hämatopoetischer Zellen, die durch unkontrolliertes Wachstum eines transformierten Zellklons gekennzeichnet sind. Die Expansion des malignen Zellklons führt zu einer generalisierten Ausbreitung im gesamten hämatopoetischen Gewebe, eventuell Infiltration extramedullärer Organe und Ausschwemmung leukämischer Zellen ins Blut. Die Expansion des malignen Zellklons auf Kosten der normalen Hämatopoese führt zu einer progredienten Knochenmarkinsuffizienz, woraus die klinische Symptomatik resultiert. Die Einteilung der Leukämien erfolgt nach klinischem Verlauf, Reifegrad und Abstammung der pathologisch veränderten Leukozyten. Leukämien werden in akute und chronische, sowie in lymphatische und myeloische eingeteilt. Die Entstehung einer Leukämie ist ein multifaktorieller Prozess, der durch die Akkumulation von Mutationen zur Fehlschaltung bestimmter Kontrollgene und dadurch zur malignen Transformation einer hämatopoetischen Zelle führt. Diese Gene können Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene sein, die für Proteine kodieren, die als Regulatoren des Zellwachstums dienen. Dies führte zu einem Modell, nach dem die Aktivierung von proliferationsfördernden oder die Inaktivierung von proliferationshemmenden Regulatoren des Zellwachstums, das unkontrollierte Wachstum der entarteten Zelle auslösen.

Wachstumsfaktoren vermitteln, über Interaktion mit ihren Rezeptoren, Signale über die Zellmembran, die unter anderem Wachstum, Proliferation und Differenzierung der Zellen regulieren. Eine sehr genaue Kontrolle dieser Vorgänge ist entscheidend für den ganzen Organismus, Fehlregulationen können zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Tumoren, Leukämien und Lymphome führen. Für die Signalübertragung in der Zelle und im Zellkern, wo die Transkription von Wachstums-, Proliferations- und Differenzierungs-steuernden Genen reguliert wird, spielt eine Vielzahl von Signalkaskaden eine Rolle. Die Moleküle dieser Kaskaden werden meistens durch reversible Phosphorylierungen reguliert. Das Verständnis der für die Regulation dieser Kaskaden verantwortlichen Mechanismen ist sehr wichtig für die Entwicklung

Phosphatidylinositol-Kinasen sind Enzyme, die den Transfer des γ -Phosphates von ATP an eine bestimmte Position von Phosphatidylinositolen katalysieren. Der Inositolring beinhaltet fünf Hydroxy-Gruppen, die phosphoryliert werden können (Abb. 1).



Verallgemeinert, können Phosphatidylinositole folgende Funktionen erfüllen (Fruman et al., 1998):

- 3

Die Phosphatidylinositol-Kinasen werden in drei Familien unterteilt: Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), Phosphatidylinositol-4-Kinasen (PI4K) und Phosphatidylinositol-5-Kinasen (PI5K). Proteine dieser Familien sind sowohl in Hefen und weiteren niedrigen Eukaryonten als auch in Säugern zu finden und die entsprechenden Enzyme zeigen Homologien zueinander. Diese Konservierung unterstreicht die Bedeutung dieser Enzyme für eukaryontische Zellen (Fruman et al., 1998).

2.2. Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) katalysieren den Transfer des γ -Phosphates von ATP an der D3-Position von Phosphatidylinositolen. Die PI3K wurde zum ersten Mal in Immunpräzipitaten von pp60^{v-src} (*phosphoprotein 60kDa*, das Produkt des v-src -rous sarkoma virus- Onkogens) (Sugimoto et al., 1984) und in dem „polyoma virus middle T Antigen“ gefunden (Whitman et al., 1985; Kaplan et al., 1986). Später wurde festgestellt, dass die PI3K mit cytoplasmatischen Tyrosinkinasen, sowie Rezeptortyrosinkinasen wie z. B. dem PDGF-Rezeptor (*platelet-derived growth factor*) assoziiert und die D3-Position des Inositolrings phosphoryliert (Whitman et al., 1988).

Zunächst wurde die PI3K als ein Heterodimer beschrieben (Ruiz-Larrea et al., 1993), das aus einer 110 kDa katalytischen Untereinheit (Hiles et al., 1992; Shibasaki et al., 1990) und einer 85 kDa regulatorischen Untereinheit (Escobedo et al., 1991; Skolnik et al., 1991) besteht. Es wurden zwei Isoformen der regulatorischen Untereinheit beschrieben (Otsu et al., 1991). Heute wird diese Proteinfamilie in drei Klassen unterteilt.

2.2.1. PI3K der Klasse I

Die PI3K der Klasse I phosphorylieren Phosphatidylinositol [PI], Phosphatidylinositol-4-phosphat [PI(4)P] und Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat [PI(4,5)P₂], wobei PI(4,5)P₂ das bevorzugte Substrat zu sein scheint (Carpenter und Cantley, 1990a). Die PI3K der Klasse I werden in Enzyme der Klasse Ia und Ib unterteilt.

2.2.1.1. PI3K der Klasse Ia

PI3K der Klasse Ia stellen die wichtigsten Formen dieser Enzymfamilie dar. Sie führen zur Produktion von an Position D3 phosphorylierten Phosphatidylinositolen (Fruman et al. 1998) (Abb. 2).

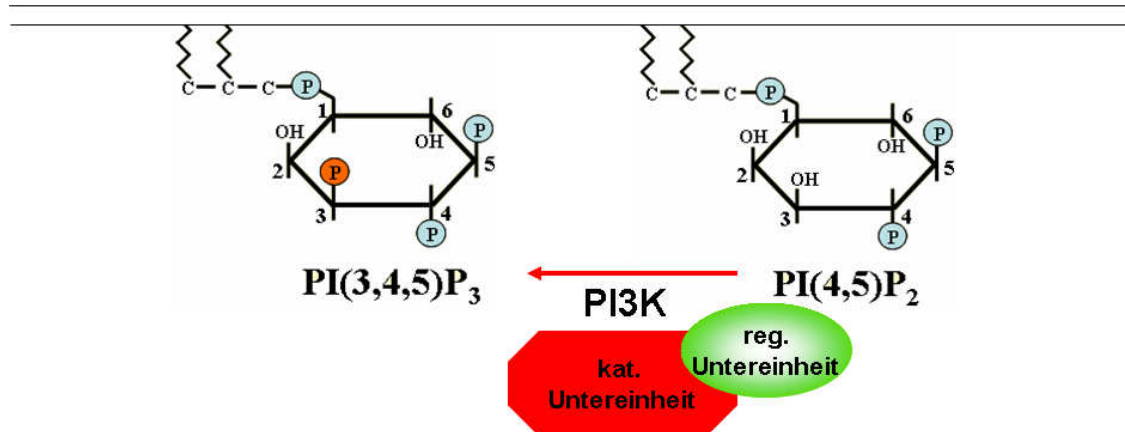


Abb. 2: Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat an der D3 Position durch die PI3K der Klasse I (Carpenter und Cantley, 1990a).

PI3K der Klasse Ia bestehen aus zwei Untereinheiten, die 110 kDa große katalytische Untereinheit und die 50-85 kDa große regulatorische Untereinheit (Roche et al., 1998). Es gibt drei bekannte Isoformen der katalytischen Untereinheit, p110 α (Hiles et al., 1992), p110 β (Hu et al., 1993) und p110 δ (Vanhaesebroeck et al., 1997b; Chantry et al., 1997), die von unterschiedlichen Genen exprimiert werden (PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD). Diese Isoformen zeigen Homologien von 42% zwischen p110 α und p110 β (Hu et al., 1993), 41% zwischen p110 α und p110 δ und 58% zwischen p110 β und p110 δ . p110 α und β sind in allen Geweben zu finden, während p110 δ in Zellen des Immunsystems gefunden wurde (Carpenter et al., 1990b; Vanhaesebroeck et al., 1997b). Es gibt mindestens 7 Isoformen der regulatorischen Untereinheit, kodiert in drei unterschiedlichen Genen (PIK3r1, PIK3r2, PIK3r3). Sie alle beinhalten zwei SH2-Domänen, die von der inter-SH2-Domäne getrennt werden. Die 85kDa großen Untereinheiten p85 α und p85 β beinhalten außerdem eine SH3-Domäne und eine BCR (*breakpoint cluster region*)-Homologie-Domäne, (BH-Domäne) am Aminoterminal. Die

kürzeren Untereinheiten haben am Aminoterminus stattdessen kurze Aminosäuresequenzen.

2.2.1.2. PI3K der Klasse Ib

Der erste Schritt zur Entdeckung der PI3K der Klasse Ib, PI3K γ , war die Beobachtung dass es nach Aktivierung von Rezeptoren mit 7 Transmembran-Domänen zu einer Ansammlung von an Position 3 phosphorylierten Phosphatidylinositolen kommt. So führte die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit dem chemotaktischen Peptid f-Met-Leu-Phe zu einer massiven Erhöhung der Menge an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat [PI(3,4,5)P₃] in Zellen (Di Virgilio et al., 1985; Traynor-Kaplan et al., 1988). Das Enzym PI3K γ wird durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteine aktiviert (Stephens et al., 1993; Stephens et al., 1994). Die PI3K der Klasse Ib, ähnlich wie PI3K der Klasse Ia, phosphoryliert PI, PI(4)P und PI(4,5)P₂ *in vitro* und ihr bevorzugtes Substrat *in vivo* ist PI(4,5)P₂ (Stoyanova et al., 1997). Die PI3K der Klasse Ib besteht ebenfalls aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit (Stephens et al., 1997). Die katalytische Untereinheit ist, wie bei den PI3K der Klasse Ia, ein 110 kDa Protein, p110 γ , das zu 36% homolog zu p110 α , 28% homolog zu p110 β und 35% homolog zu p110 δ ist. (Stoyanov et al., 1995; Hu et al., 1993; Stephens et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997b). Die p110 γ -Untereinheit unterscheidet sich von den katalytischen Untereinheiten der PI3K Klasse Ia unter anderem dadurch, dass ihr die n-terminale Bindungsstelle für die p85 regulatorische Untereinheit fehlt. Anstatt des p85-Proteins, bindet sie eine andere regulatorische Untereinheit, das 101 kDa große Protein p101. Diese regulatorische Untereinheit zeigt keine Ähnlichkeiten mit den regulatorischen Untereinheiten der PI3K der Klasse Ia und kann die aktivierende Wirkung der $\beta\gamma$ -Untereinheiten der aktivierten G-Proteine deutlich verstärken (um etwa das 50 fache) (Stephens et al., 1997). Der größte Teil der Liganden, die zu einer Aktivierung der PI3K Klasse Ib führen, spielen eine wichtige Rolle in der Koordination der Immunantwort auf Verletzungen und Infektionen durch Regulation mehrerer

Immunzelltypen. Mäuse, die keine PI3K Klasse Ib exprimieren, sind deutlich resistenter gegenüber pathologischen Entzündungszuständen (Andrews et al., 2007).

2.2.1.3. Eigenschaften der PI3K der Klasse I

PI3K der Klasse Ia und Ib werden durch ähnliche Konzentrationen des Hemmstoffes Wortmannin gehemmt. (Arcaro und Wymann, 1993; Wymann und Arcaro, 1994; Stoyanova et al., 1997). Die p110 katalytischen Untereinheiten beinhalten mehrere konservierte Regionen wie die Bindungsstellen für die regulatorische Untereinheit, für Ras, die PI-Kinase Region (deren Funktion nicht eindeutig geklärt ist), sowie die carboxy-terminale Kinasedomäne (Vanhaesebroeck et al., 1997a) (Abb. 3).

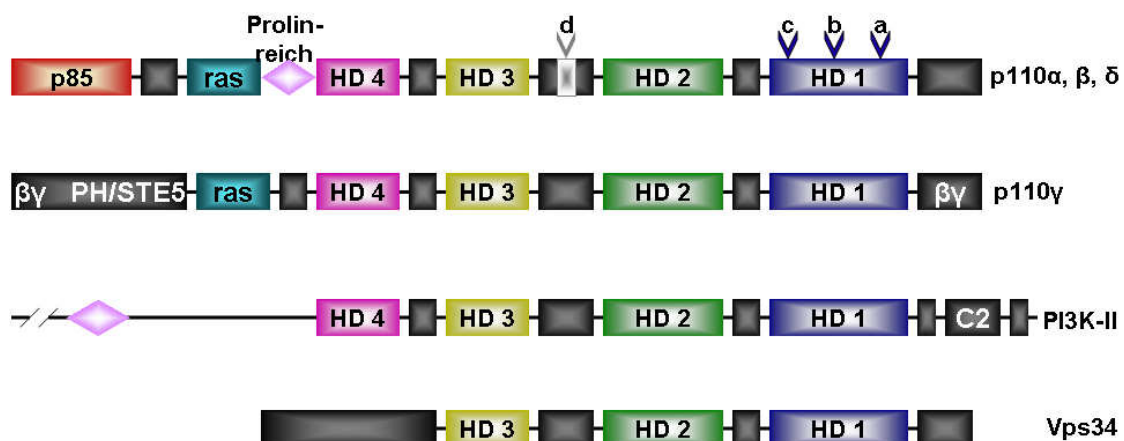


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur der katalytischen Untereinheiten der PI3K. Untersuchungen der Sequenzen der PI3K zeigen 4 Homologiedomänen (HD1-4). HD1 ist die am stärksten konservierte und beinhaltet die a) Substratbindungsstelle; b) die ATP-Bindungsstelle und c) die Wortmannin-Angriffsstelle (Lysin802). HD2 (auch PIK-Domäne genannt) ist stark konserviert, ihre Funktion ist nicht aufgeklärt. HD3 kommt nur in PI3K und nicht in anderen Lipidkinasen vor. HD4 kommt in PI3K der Klasse I und II vor. Nur PI3K der Klasse Ia zeigen eine p85-Bindungsdomäne; PI3K der Klasse I beinhalten eine Ras-Bindungsdomäne, alle PI3K der Klasse I und II haben prolinreiche Sequenzen, PI3K der Klasse Ia beinhalten d) eine bZIP (*basic-region followed by a leucine-zipper-like*)-Domäne; PI3K der Klasse Ib zeigen Bindungsstellen für $\beta\gamma$ -Untereinheiten, sowie eine PH-Domäne mit STE5 Homologie; nur PI3K der Klasse II zeigen eine C2-Domäne (nach Wymann und Pirola, 1998).

PI3K der Klasse I besitzen gleichzeitig auch Protein-Kinase-Aktivität. So führt die Phosphorylierung von p85 α an S608, möglicherweise durch die p110 α , zu einer Abnahme der PI3K-Aktivität (Dhand et al., 1993; Carpenter et al., 1993b). Autophosphorylierung von p110 δ an Serinresten führt ebenfalls zu einer starken Abnahme der Aktivität (Vanhaesebroeck et al., 1997b). Auf der anderen Seite führt die Autophosphorylierung von p110 γ an Serinresten zu keiner Änderung der Enzymaktivität (Stoyanova et al., 1997).

2.2.2. PI3K der Klasse II

In Drosophila-Fliegen wurde die PI3K der Klasse II entdeckt. Es handelt sich dabei um ein 170 - 210 kDa großes Protein, das zu 40-50% Sequenzähnlichkeit mit den PI3K der Klasse I zeigt, aber keine Sequenz besitzt, die eine Bindung mit der p85 regulatorischen Untereinheit ermöglichen würde. Das Protein zeigt eine prolinreiche Sequenz am Aminoende, die Bindung an SH3-Domänen vermittelt, sowie eine C2-Domäne am Carboxyende. An dieser C2-Domäne fehlen wichtige, stark konservierte Aspartatreste, die die Bindung von Ca²⁺ ermöglichen (Newton, 1995). Die PI3K der Klasse II kann deshalb unabhängig von Ca²⁺ an Lipide binden (MacDougall et al., 1995). Biochemische Analysen zeigen, dass dieses Protein *in vitro* spezifisch für PI und PI(4)P ist und kein PI(4,5)P₂ phosphorylieren kann (MacDougall et al., 1995). Da PI(3,4)P₂, das Produkt des Enzyms, in ruhenden Zellen nicht nachweisbar ist, ist das Enzym in diesen Zellen wahrscheinlich inaktiv. Es ist möglich, dass die PI3K der Klasse II wichtig für die Produktion von PI(3,4)P₂ nach Stimulation der Zellen ist (Fruman et al., 1998). Das Amino- und das Carboxyende des Proteins sind für ihre Aktivität wichtig. Es ist aber nicht klar, ob ihre Aktivität durch extrazelluläre Signale reguliert wird (Misawa et al., 1998). Es wurde berichtet, dass Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Zytokinrezeptoren und Integrine zur Aktivierung der PI3K Klasse II führen können (Katso et al., 2001). Die größten Mengen an PI3K der Klasse II können in Herz, Ovarien und Plazenta gefunden werden. Das Protein wird durch Hemmstoffe der PI3K der Klasse I wie Wortmannin und

LY294002 nur in sehr geringem Maß gehemmt (Wortmannin $IC_{50} = 420 \text{ nM}$, LY 294002 $IC_{50} = 18 \text{ }\mu\text{M}$) (Domin et al., 1997).

2.2.3. PI3K der Klasse III

Die erste entdeckte PI3K der Klasse III ist Vps34 (*vacuolar protein sorting defective 34*). Das Protein ist wichtig für den Transport neu gebauter Proteine vom Golgiapparat zu Vakuolen (diese Vakuolen entsprechen den Lysosomen in Säugern) und wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden. Das Protein zeigt hohe Sequenzähnlichkeiten mit der p110 katalytischen Untereinheit der PI3K der Klasse I und die Überexpression von VPS34 führt zu einer Steigerung der PI3K-Aktivität (Schu et al., 1993). Das Hefe-Protein phosphoryliert nur PI zu Phosphatidylinositol-3-Phosphat [PI(3)P] und ist sensibel gegenüber gängigen Inhibitoren der PI3K der Klasse I wie Wortmannin oder LY294002 (Stack und Emr, 1994). Das homologe humane Protein ist sensibel gegenüber Wortmannin ($IC_{50} = 2 - 10 \text{ nM}$) (Fruman et al., 1998). Die PI3K der Klasse III kommt als Heterodimer vor. Die katalytische Untereinheit assoziiert mit der 150 kDa großen regulatorischen Untereinheit, letztere besitzt Serin/Threonin-Kinase Aktivität. Die regulatorische Untereinheit bindet die katalytische Untereinheit *in vivo* und führt zu deren Rekrutierung an der Zellmembran und zur Aktivierung (Panaretou et al., 1997). Da die PI(3)P Menge in ruhenden und stimulierten Zellen ähnlich ist, kann angenommen werden, dass die PI3K der Klasse III wichtig für Membran-Transport-Prozesse, unabhängig von Stimulierungssignalen, ist (Fruman et al., 1998). Vps34 wird nicht direkt durch Insulin reguliert und gehört somit nicht zur Insulin-Signalkaskade. Sie wird aber durch verminderte Aminosäure- und Glukoseverfügbarkeit, sowie AMPK (*AMP-activated protein kinase*) -Aktivierung stimuliert und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums, u. a. durch Aktivierung von mTOR (Byfield et al., 2005; Nobukuni et al., 2005).

2.3. Regulatorische Untereinheit der PI3K Klasse Ia

Es gibt mindestens sieben Isoformen der regulatorischen Untereinheit der PI3K Klasse Ia, die von drei Genen kodiert werden (PIK3r1, PIK3r2, PIK3r3) (Abb. 4). Sie werden aufgrund der Größe von 85 kDa der ersten beiden entdeckten Isoformen, p85 α und p85 β (Carpenter und Cantley, 1990a; Escobedo et al., 1991; Skolnik et al., 1991; Otsu et al., 1991), meistens p85 genannt.

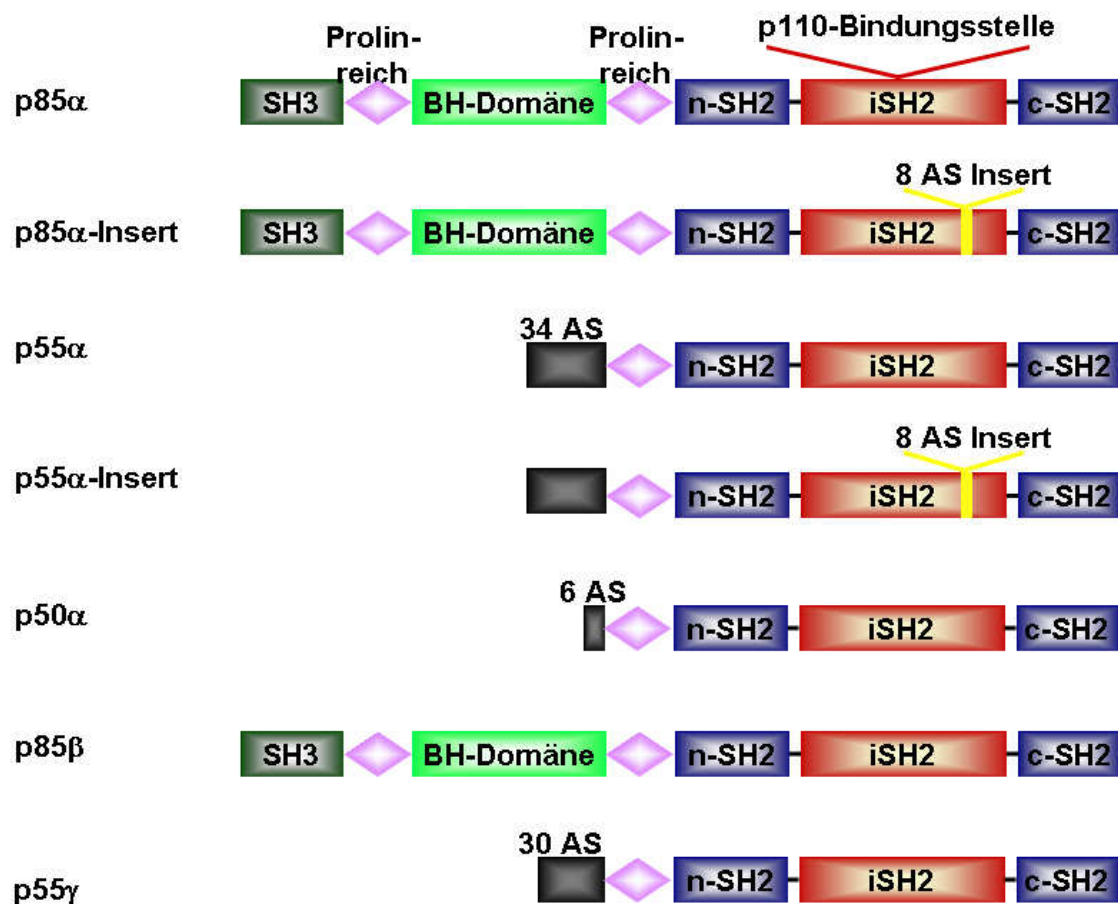


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur der regulatorischen Untereinheiten der PI3K Klasse Ia. Alle α -Untereinheiten werden vom selben Gen kodiert und entstehen durch alternatives Splicing der mRNA. SH3: *Src homology 3 domain*; BH: *breakpoint-cluster-region (BCR) homology domain*; n-SH2 und c-SH2: n- und c-terminale SH2-Domäne; iSH2, inter-SH2-Domäne. An der 8 Aminosäuren (AS)-Insert-Stelle ist ein Aspartatrest (Position 605) deletiert und mit neun neuen Aminosäuren ausgetauscht (nach Wymann und Pirola, 1998).

2.3.1. Isoformen der regulatorischen Untereinheit der PI3K Klasse Ia

Alle Isoformen beinhalten zwei SH2-Domänen, die von der inter-SH2-Domäne getrennt werden. Die iSH2-Domäne ist notwendig und ausreichend für die Bindung der regulatorischen Untereinheit an die katalytische Untereinheit. Die zwei Isoformen mit voller Länge, p85 α und p85 β sind auf Aminosäureebene zu 62% identisch (Otsu et al., 1991). Am Aminoterminus bestehen sie aus einer aminoterminalen SH3-Domäne und einer BH-Domäne (*BCR - breakpoint cluster region - homology domain*), die von prolinreichen Regionen flankiert wird (Escobedo et al., 1991; Skolnik et al., 1991; Otsu et al., 1991).

Es wurden auch kürzere Splicevarianten von p85 α entdeckt (Abb. 4). Ein etwa 50 kDa großes Protein (p50 α) wurde vor allem in Leberzellen gefunden. Es ist identisch mit der p85 α -Untereinheit, bis auf den Aminoterminus, wo anstatt der SH3- und BH-Domänen eine Sequenz von 6 Aminosäuren exprimiert wird (Fruman et al., 1996). Zwei weitere Splicevarianten von p85 α zeigen eine Größe von 55 kDa. Auch hier fehlen die aminoterminalen SH3- und BH-Domänen und an ihrer Stelle wird eine Sequenz von 34 Aminosäuren exprimiert. Die eine p55-Isoform (p55 α) ist bis auf den Aminoterminus identisch mit dem p85 α -Protein. Bei der anderen Isoform (p55 α -Insert) fehlt eine Aspartat-Aminosäure in der iSH2-Domäne (Position 605) und an ihrer Stelle werden neun neue Aminosäuren exprimiert. Eine weitere Variante der regulatorischen Untereinheit (p85 α -Insert) ist, bis auf das Fehlen einer Aspartat-Aminosäure in der iSH2-Domäne (Position 605), identisch mit dem p85 α -Protein. Auch hier werden anstelle des Aspartats neun neue Aminosäuren exprimiert (Antonetti et al., 1996). Die p55 α -Untereinheit wird vor allem in Skelettmuskel- und Gehirnzellen exprimiert, während p55 α -Insert vor allem in Herz- und Muskelzellen exprimiert wird (Inukai et al., 1996; Antonetti et al., 1996).

Die letzte Isoform der regulatorischen Untereinheit ist das p55 γ -Protein. Das Protein beinhaltet eine prolinreiche Sequenz, zwei SH2-Domänen, eine iSH2-Domäne und zeigt 70% Homologie zu p85 α . Am Aminoterminus gibt es eine Sequenz von 30

Aminosäuren, die bei p85 α nicht zu finden ist. Das Protein wird vor allem während der Entwicklung exprimiert. Bei ausgewachsenen Mäusen sind große Proteinmengen in Gehirn und Testis, sowie geringe Mengen in Nieren-, Herz- und Fettgewebe zu finden. Insulinstimulation führt zur Assoziation von p55 γ mit dem IRS-1 Adapterprotein, sowie zur Phosphorylierung von p55 γ (Pons et al., 1995).

2.3.2. Interaktion mit der katalytischen Untereinheit der PI3K Klasse Ia

Die unterschiedlichen Isoformen der regulatorischen Untereinheit der PI3K Ia können mit jeder der katalytischen Untereinheiten interagieren (Vanhaesebroeck et al., 1997a).

Für die Interaktion mit der katalytischen Untereinheit ist eine Sequenz von 187 Aminosäuren in der iSH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit zuständig (Hu et al., 1993). Die iSH2-Domäne zeigt eine *coiled-coil* Struktur zweier langen antiparallelen α -Helices (Panayotou et al., 1992). Weitere Untersuchungen an der iSH2-Domäne der p85 α -Untereinheit zeigten eine Sequenz von 35 Aminosäuren (Aminosäure 478-513), die für die Bindung unbedingt notwendig ist, sowie eine Sequenz von 104 Aminosäuren (Aminosäure 451-555), die für die Bindung eine Rolle spielt. Entsprechende Sequenzen wurden auch in der iSH2-Domäne der p85 β -Untereinheit festgestellt, wobei die 40 Aminosäuren 445-485 absolut notwendig sind und die 71 Aminosäuren 445-516 für die Interaktion eine Rolle spielen. Trotz der starken Bindung ist die iSH2-Domäne für die volle Aktivierung der katalytischen Untereinheit nicht ausreichend. Bindet die katalytische Untereinheit eine nur aus der iSH2-Domäne bestehenden trunkierten Form der regulatorischen Untereinheit, so zeigt sie nur etwa 30% der Aktivität der an komplette p85-Proteine gebundenen katalytischen Untereinheiten (Klippel et al., 1995). Interessant ist die Entdeckung, dass die p85 α -Untereinheit durch ihre iSH2-Domäne PI(4)P und PI(4,5)P₂ *in vitro* binden kann. Diese Bindung kann einen Mechanismus darstellen, wie die Substrate der katalytischen Untereinheit präsentiert werden oder wie das Enzym an Membranstellen lokalisiert wird, wo größere Mengen an Substrat vorhanden sind.

Bei der p110 katalytischen Untereinheit ermöglichen die Aminosäuren 20-108 die Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit (Dhand et al., 1994).

In Säugern hat die regulatorische Untereinheit zwei Funktionen: auf der einen Seite stabilisiert sie die katalytische Untereinheit und schützt sie vor einer thermischen Inaktivierung, wodurch ihre Halbwertszeit deutlich verlängert wird. Die regulatorische Untereinheit stabilisiert zwar die katalytische Untereinheit, die alleinige Bindung der iSH2-Domäne führt aber zu keiner Aktivierung der PI3K (Yu et al., 1998). Auf der anderen Seite wird die katalytische Untereinheit durch die regulatorische Untereinheit gehemmt, unabhängig von der Serin608-Phosphorylierung, beschrieben von Dhand et al., 1992.

2.3.3. Funktion der regulatorischen Untereinheit

Durch ihre Domänen kann die regulatorische Untereinheit der PI3K mit einer Vielzahl von Proteinen interagieren, wodurch ihre Regulation ermöglicht wird.

2.3.3.1. Regulation über die SH2-Domänen

Viele Rezeptor-Tyrosin-Kinasen können in einem aktivierten Zustand mit den SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit interagieren (direkt oder über Adapterproteine) und dadurch zur Aktivierung der PI3K führen. Ein Teil dieser Rezeptoren ist in der Tab. 1 vorgestellt.

2. Einleitung

Ligand	Rezeptor	Tyrosin-Kinase	Protein mit pYXXM-Motiv zur Interaktion mit der PI3K
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	EGFR	Rezeptor selbst	am ErbB3 und Cbl Adapterprotein
bFGF (<i>basic fibroblast growth factor</i>)	bFGFR	Rezeptor selbst	am Rezeptor
NGF (<i>nerve growth factor</i>)	NGFR	Rezeptor selbst	am Gab1-Adapterprotein
Insulin	IR	Rezeptor selbst	am IRS-1 und -2 Adapterprotein
IGF-1 (<i>insulin-like growth factor</i>)	IGF-1R	Rezeptor selbst	am IRS-1 und -2 Adapterprotein
PDGF (<i>platelet derived growth factor</i>)	PDGFR	Rezeptor selbst	am Rezeptor
CSF-1 (<i>colony simulating factor</i>)	CSF-1R	Rezeptor selbst	am Rezeptor, Grb2/Cbl/Gab2 Adapterprotein
SCF (<i>stem cell factor</i>)	SCFR	Rezeptor selbst	am Rezeptor
VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>)	VEGFR	Rezeptor selbst	Am Gab1 Adapterprotein
HGF (<i>hepatocyte growth factor</i>)	HGFR	Rezeptor selbst	Am Rezeptor, Gab1 Adapterprotein
Angiopoietin-1	Tic2	Rezeptor selbst	Am Rezeptor
B61/Eck	Eck	Rezeptor selbst	Am Rezeptor
GH (<i>growth hormone</i>)	GHR	Jak2	Am IRS-1, -2 und -3 Adapterprotein
PRL (<i>prolactin</i>)	PRLR	Jak2	Am IRS-1, -2 und -3 Adapterprotein
OSM (<i>oncostatin M</i>)	OSMR	Jak1 (Jak2 / Tyk2)	Am IRS-1 Adapterprotein
IL-2 (Interleukin-2)	IL-2R	Jak1 / Jak3	Am IRS-1 und -2 Adapterprotein
IL-3 und 6 (Interleukin-3 und 6)	IL-3R und IL-6R	Jak1 / Jak2	Am Tec und Gab1 Adapterprotein
IL-4 (Interleukin-4)	IL-4R	Jak1 (Jak2 / Tyk2)	Am IRS-1 Adapterprotein
IL-7 (Interleukin-7)	IL-7R	Jak1 / Jak3	Am Rezeptor, IRS-1 und -2 Adapterprotein
IFN α und β (Interferon α und β)	IFN α R und IFN β R	Jak1 / Tyk2	Am IRS-1 und -2 Adapterprotein
Epo (Erythropoetin)	EpoR	c-kit / Jak2	Am Rezeptor
G-CSF (<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)	G-CSFR	Jak1 / Jak2 / Tyk2	Am Rezeptor
GM-CSF (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)	GM-CSFR	Jak2	am Gab2 Adapterprotein
Thrombin	Thrombinrezeptor	pp60(c-src) pp59(fyn)	Am pp60(c-src) pp59(fyn)
Integrin	Integrinrezeptor	FAK	Am FAK

Tab. 1: Liganden, die zur Aktivierung der PI3K Klasse I führen (Wymann und Pirola., 1998; Gu et al., 2000; Dance et al., 2006; Soltoff et al., 1994; Soltoff und Cantley, 1996)

Die Bindung der PI3K an aktivierten Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase Aktivität erfolgt durch die regulatorische Untereinheit, die mit ihren SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste des pTyr-X-X-Met- (phosphorylierter Tyrosinrest - beliebige Aminosäure - beliebige Aminosäure - Methionin) Motivs der aktivierten Rezeptoren bindet (Songyang et al., 1993). Oft wird diese Bindung durch Adapterproteine ermöglicht. So fungiert das an Tyrosinresten phosphorylierte IRS-Protein (*insulin receptor substrate*) nach Insulinstimulation als Adapterprotein. Die regulatorische Untereinheit kann an pYXXM-Motive des IRS Proteins (ähnlich wie bei dem PDGF-Rezeptor und *Polyoma middle T-Antigen*) durch ihre SH2-Domänen binden und dadurch zur Aktivierung der PI3K führen (Backer et al, 1992; Carpenter et al., 1993a). Das IRS1-Protein beinhaltet auch sechs YXXM (Tyr-Met-beliebige Aminosäure-Met) Sequenzen, die in Tyrosin-phosphoryliertem Zustand eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion spielen.

Die p85-Untereinheit kann über ihre SH2-Domänen mit aktivierten PDGF-, EGF-, CSF (*colony stimulation factor*)- und SCF/Kit (*stem cell factor*) - Rezeptoren *in vivo* interagieren und dadurch zur Aktivierung der PI3K führen (McGlade et al., 1992; Reedijk et al., 1992; Hu et al., 1992).

Welche SH2-Domäne die wichtigere Rolle für die Bindung an aktivierte Rezeptoren spielt, ist umstritten. So wurde beschrieben, dass die c-terminale SH2-Domäne für die spezifische Bindung zum aktivierten PDGF-Rezeptor ausreichend ist. Die Bindung eines trunkierten p85-Proteins, das nur die c-terminale SH2-Domäne beinhaltet, an den aktivierten Rezeptor war gleich effizient wie die Bindung des intakten p85-Proteins. Das p85-Protein, das nur die n-terminale SH2-Domäne beinhaltet, konnte nur etwa 100-fach schwächer am PDGF-Rezeptor binden (Klippel et al., 1992). Es wurde aber ebenfalls beschrieben, dass beide SH2-Domänen der p85-Untereinheit am aktivierten PDGF-Rezeptor binden und dass diese Bindung stärker ist, als wenn jeweils nur eine der SH2-Domänen vorhanden ist (Hu et al., 1992).

EGF-Stimulation führt zur Bindung von ErbB3 an den aktivierten EGF-Rezeptor in A431 Zellen. ErbB3 fungiert als ein Adapterprotein zwischen der PI3K und dem aktivierten EGF-Rezeptor. Während der EGF-Rezeptor kein YXXM-Motiv beinhaltet, das die Bindung der regulatorischen Untereinheit ermöglichen würde, kann ErbB3 mit ihren

YXXM Motiven an die SH2-Domänen des p85-Proteins binden und damit zur Aktivierung der PI3K führen (Soltoff et al., 1994). Es wurde auch beschrieben, dass für diese Interaktion die n-SH2-Domäne die Hauptrolle spielt (Suenaga et al., 2005).

In PC12- und A549-Zellen fungiert ein anderes, 120 kDa Protein (das Cbl Protein), als Adapterprotein zwischen der PI3K und dem aktivierten EGF-Rezeptor. Nach Aktivierung des EGF-Rezeptors, kann Cbl an den zwei YXXM-Motiven phosphoryliert werden und dann an die c-terminale SH2-Domäne und an die SH3-Domäne der regulatorischen Untereinheit der PI3K binden. Diese Bindung führt dann zur Aktivierung der PI3K (Soltoff und Cantley, 1996).

Eine Aktivierung des VEGF-Rezeptors führt zur Rekrutierung von Grb2, das Gab1 binden und aktivieren kann. Die regulatorische Untereinheit der PI3K kann an Gab1 binden, was zur Aktivierung der PI3K führt (Dance et al., 2006).

Ähnlich wird die PI3K nach Zytokin-Stimulation aktiviert. So führt zum Beispiel die Aktivierung des GM-CSF-Rezeptors zur Bildung eines Komplexes aus aktiviertem Rezeptor, Adapterproteine (Shc, Grb2 und Gab2) und p85 an der Zellmembran, was zur Aktivierung der PI3K führt (Gu et al., 2000).

2.3.3.2. Regulation über die prolinreichen Regionen

Durch ihre prolinreichen Regionen kann p85 mit SH3-Domänen anderer Proteine (z.B. Abl, Lck, Fyn, p85 selbst v-Src, Lyn, Grb2) interagieren, was zur Aktivierung der Kinase führt (Kapeller et al., 1994; Liu et al., 1993; Pleiman et al., 1994; Wang et al., 1995). Gleichzeitig kann die intramolekulare Interaktion der SH3-Domäne mit der prolinreichen Region desselben Moleküls beide Partner daran hindern, in unstimulierten Zellen an andere Moleküle zu binden. Erst die Befreiung aus diesen intramolekularen Bindungen ermöglicht dem Protein, mit anderen Molekülen zu interagieren. Dieses Modell spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Interaktion von p85 mit Cbl. Erst die Bindung der c-SH2-Domäne von p85 an p-Tyr des Cbl führt zur Freilassung der SH3-Domäne von p85 aus der intrazellulären Bindung mit der prolinreichen Region. Dadurch kann die SH3-Domäne an prolinreichen Regionen des Cbl-Moleküls binden (Soltoff und Cantley, 1996).

Dieses Modell ist auch bekannt für andere Moleküle, wie Src (Xu et al., 1999).

Die prolinreichen Sequenzen der p85 β -Untereinheit unterscheiden sich von den prolinreichen Sequenzen der p85 α -Untereinheit. Außerdem beinhaltet p85 β ein drittes PPXP-Motiv, weiter c-terminal von der c-SH2-Domäne. Dadurch könnte sie *in vivo* mit SH3-Domänen weiterer Proteine interagieren. Alle anderen kürzeren Formen der regulatorischen Untereinheit (p50 α , p55 α , p55 γ) haben nur eine prolinreiche Sequenz. Außerdem fehlt ihnen die n-terminale Sequenz, die z. B. die Bindung an Src vermittelt (Fruman et al., 1998).

2.3.3.3. Regulation über die BH-Domäne

Die BCR-Homologie-Domäne zeigt hohe Homologie mit dem Produkt des *break-point-cluster* Gens. Es handelt sich dabei um ein GTPase-aktivierendes Protein für Angehörige der Rho-Familie (*ras homolog gene family*) der kleinen GTP-bindenden Proteine (Musacchio et al., 1996).

An der Rho-GAP (*Rho-GTPase activating protein*) Homologie-Domäne innerhalb der BH-Domäne von p85 kann das Ras-ähnliche GTPase Cdc42 (*cell division cycle 42*) Protein binden (Zheng et al. 1994). Auch Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) kann GTP-abhängig an der p85-Untereinheit der PI3K binden und diese Interaktion nimmt nach Stimulation mit PDGF zu (Tolias et al., 1995). Beide Interaktionen können zur Translokation der PI3K an der Zellmembran und zur Aktivierung der PI3K führen (Zheng et al. 1994).

Chan et al., 2002 berichten, dass Ras und Rac1 an der iSH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit binden können und dass diese Bindung für die Aktivierung der PI3K eine wichtige Rolle spielt.

2.3.3.4. Weitere Regulationsmechanismen über die regulatorische Untereinheit

Die meisten Moleküle, die die PI3K über Bindung von p85 an phosphorylierten YMXM-Sequenzen aktivieren, aktivieren auch Ras, seinerseits ebenfalls ein p110-

2. Einleitung

Aktivator. (Rodriguez-Viciana et al., 1994; Rodriguez-Viciana et al., 1996; Vanhaesebroeck et al., 1997a). So hat z.B. das *Polyoma middle T-Antigen* eine YMXM-Sequenz, über die es mit PI3K interagiert, sowie weitere Tyrosinreste, wodurch eine Interaktion und Aktivierung von Ras ermöglicht wird. Viele der Proteine mit YMXM-Sequenzen, die PI3K binden und aktivieren, sind an der Zellmembran lokalisiert. So führt die Rekrutierung der PI3K an die Zellmembran nicht nur zur Aktivierung durch z. B. Bindung an aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, sondern auch zur Translokation in die Nähe sowohl der Substrate, als auch des weiteren Aktivators Ras (Fruman et al., 1998). Rekrutierung von Grb2 an aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt gleichzeitig zur Aktivierung von PI3K (über das Adapterprotein Gab2) und von Ras (über das Adapterprotein SOS) (Gu et al., 2000).

Auch die BCR/ABL Tyrosinkinase, gefunden in CML (chronische myeloische Leukämie), kann die PI3K aktivieren. BCR/ABL bindet an die regulatorische Untereinheit der PI3K. Hemmung der Expression der p85 α -Untereinheit in BCR/ABL-abhängigen Zelllinien führt zur Hemmung der Proliferation und des Wachstums vom gesunden Knochenmark und erythro-myeloischen Zellen (Skorski et al., 1995).

Ein weiterer Aktivierungsmechanismus wurde für die TSH (Schilddrüse-stimulierendes Hormon – *thyroid stimulation hormone*) - abhängige Aktivierung der PI3K vorgeschlagen. Hierbei führt TSH-cAMP (TSH-zyklisches Adenosin-3':5'-monophosphat) zur Aktivierung der PKA (Proteinkinase A), die die p85 regulatorische Untereinheit an Serin 83 phosphoryliert. Dadurch wird die Bindung der PI3K an PKA (RII β -Untereinheit) verstärkt und der Komplex an die Zellmembran relokalisiert, wo die PI3K aktiviert wird (De Gregorio et al., 2007).

Interessant sind Daten die zeigen, dass die p85 α regulatorische Untereinheit mit ihren beiden SH2-Domänen an PI(3,4,5)P₃ spezifisch binden kann und dass diese Bindung die Interaktion zwischen den SH2-Domänen und aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen stört. So führt die Hemmung der Produktion von PI(3,4,5)P₃ durch Wortmannin oder LY294002 zu einer Stärkung der Interaktion der SH2-Domänen mit phosphorylierten Tyrosineresten von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, während Expression konstitutiv aktiver

p110 α zur Hemmung dieser Interaktion führt. Diese Interaktion könnte gegensätzliche Folgen haben:

- Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen würde zur Rekrutierung von PI3K an der Zellmembran, Aktivierung der PI3K und Entstehung von PI(3,4,5)P₃ führen. PI(3,4,5)P₃ interagiert mit den SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit und kann dadurch ihre Bindung am aktivierten Rezeptor stören und die Signalkaskade stoppen.
- Gleichzeitig können die produzierten PI(3,4,5)P₃-Moleküle mit SH2-Domänen anderer Adapterproteine wie Grb2 interagieren, dadurch diese Proteine an der Zellmembran rekrutieren und somit zu einer Verstärkung des Signals führen (Rameh et al., 1995).

2.3.3.5. Inhibition der PI3K durch die regulatorische Untereinheit

Es gibt auch Adapterproteine, die durch Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit zu einer Inhibition der PI3K führen. So kann Ruk mit seiner prolinreichen Region an die SH3-Domäne der regulatorischen Untereinheit der PI3K binden und dadurch zu einer Hemmung der PI3K *in vitro* und *in vivo* führen. Überexpression von Ruk führt zu vermehrter Apoptose, ein Effekt der durch co-Expression von konstitutiv aktiverter PI3K oder konstitutiv aktiviertem Akt aufgehoben wird (Gout et al., 2000).

Dynamin ist ein Protein mit GTPase-Aktivität und ist wichtig für die Endozytose von aktivierten Wachstumsfaktorrezeptoren. Das Protein hemmt dadurch die Aktivität der PI3K. Die p85 regulatorische Untereinheit der PI3K kann mit ihrer SH3-Domäne die GTPase-Aktivität von Dynamin stimulieren (Harrison-Findik et al., 2001).

Interessant ist die Feststellung, dass die Ausschaltung der p85 α -Expression zu einer verminderten JNK (*Jun N-terminal Kinase*) Aktivität führt. Expression von p85 α , p85 β oder einer mutierten Form des p85-Proteins, die nicht an p110 binden kann, führt zur Wiederherstellung der JNK Aktivität. Diese Daten sprechen für die Existenz einer p85-abhängigen, aber PI3K-unabhängigen Signalkaskade. P55 α und p50 α haben keine

Wirkung auf die JNK Aktivität, was dafür spricht, dass die n-terminalen Regionen der regulatorischen Untereinheit für die Regulation der JNK wichtig sind (Ueki et al., 2003).

2.4. Regulation der katalytischen Untereinheit der PI3K Klasse I

Die PI3K der Klasse I sind bezüglich der Signaltransduktion in hematopoetischen Zellen die am meisten untersuchten PI3K. Die PI3K Aktivität ist unter anderem mit Zellteilung (Roche et al. 1994), Inhibition der Apoptose (Yao und Cooper, 1996), Glukoseaufnahme (Rudermann et al. 1990) und Organisation des Zytoskeletts (Wennstrom et al., 1994) assoziiert. Deletion der regulatorischen oder der katalytischen Untereinheit führt zu einer embryonalen Letalität bei Mäusen (Fruman et al., 1999, Bi et al., 1999).

2.4.1. Aktivierungsmechanismen

Ein mögliches Modell für die Regulierung der PI3K geht davon aus, dass durch die regulatorische Untereinheit die katalytische Untereinheit in einem Zustand niedriger Aktivität gehalten wird (s.o.). Eine Stimulation durch Wachstumsfaktoren / Liganden von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt zur Translokation der PI3K an der Zellmembran, wo sie durch die SH2-Domänen ihrer regulatorischen Untereinheit mit aktivierten, an Tyrosinresten phosphorylierten Rezeptorkinasen assoziiert (Dhand et al., 1993). An der Zellmembran erfährt die PI3K Konformationsänderungen (Panayotou et al., 1992), hat Zugang zu ihren Substraten oder weiteren Aktivatoren (wie Ras) und zeigt eine höhere Aktivität als im Zytosol (Susa et al., 1992; Zhang et al., 1992). Weitere Phosphorylierungen an Tyrosin-, Threonin- und Serinresten wie z. B. an Tyrosin 688 (Chan et al., 2002) können ebenfalls das Aktivierungsniveau des Enzyms erhöhen oder die Affinität der SH2-Domänen zu den Rezeptoren ändern (Hayashi et al., 1992).

Alle PI3K der Klasse I interagieren mit aktiviertem, GTP-gebundenem Ras (Vanhaesebroeck et al., 1997a). Ras bindet direkt an der Ras-Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit und reguliert die Aktivität der PI3K. Die Produktion von an

Position D3 phosphorylierten Phosphatidylinositolen wird durch Expression von dominant negativen Ras-Mutanten *in vivo* inhibiert und durch Transfektion von Ras in COS Zellen stark erhöht (Rodriguez-Viciano et al. 1994). Stimulation des PDGF-Rezeptors führt zur Aktivierung der PI3K auch in Abwesenheit von Ras, diese Aktivierung ist aber schwächer. In Anwesenheit von GTP-Ras steigt die PI3K Aktivität auf mehr als das 4-fache. Nur GTP-gebundenes Ras zeigt eine Wirkung auf die PI3K Aktivität (Rodriguez-Viciano et al. 1996; Klinghoffer et al., 1996). Dominant negative Ras-Mutanten können die Aktivierung von Akt durch aktivierte PDGF-, EGF- und Insulinrezeptoren um 60-70% hemmen (Klinghoffer et al., 1996, Marte et al., 1997).

Ein Aminosäureaustausch an Position 227 der katalytischen Untereinheit der PI3K (Lysin zu Glutamat) führt zu einer Aufhebung der Bindungsfähigkeit von Ras an die PI3K. Durch diese Mutation entsteht ein Protein, dass mit Ras nicht interagieren kann, aber eine Konformationsänderung an der Ras-Bindungsstelle erfahren hat, die dem Ras-Bindungseffekt ähnelt. Die basale Aktivität dieser K227E PI3K-Mutante ist etwa 4-fach erhöht. Ras kann seine Wirkung nur dann entfalten, wenn es den zur Zellmembranbindung notwendigen Farnesylrest enthält (Rodriguez-Viciano et al. 1996).

Es wurde berichtet, dass Erythropoetin zu einer Aktivierung der PI3K Klasse Ib führt. Überraschenderweise führte diese Aktivierung zu einer PI3K-abhängigen Aktivierung von Ras und dessen Effektoren MEK und Erk (Schmidt et al., 2004).

2.4.2. Inhibitionsmechanismen

p53 spielt eine negative Rolle in der Aktivierung der PI3K, indem es die Expression von PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) reguliert. Induktion von p53 in primären Tumoren und Tumorzelllinien führt zur gesteigerten PTEN-Expression (Stambolic et al., 2001).

cAMP kann die PI3K / Akt Signalkaskade an mehreren Stellen negativ regulieren. cAMP kann die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und Serin 473 inhibieren und damit ihre Aktivität hemmen, die Kinaseaktivität der PI3K hemmen und die Translokation von PDK1 an die Zellmembran verhindern (Kim et al., 2001b).

Ein anderer Inhibitor des PI3K / Akt Signalwegs ist Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat. Dieses Molekül befindet sich im Zytosol und bindet an die PH-Domänen der Effektormoleküle, die für die Bindung an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ und somit für die Translokation der Effektormoleküle an der Zellmembran zuständig sind. Hemmung der Produktion von Inositol-1,3,4,5-Tetrakisphosphat führt in Neutrophilen zur verstärkten Translokation von PH-Domänen an die Zellmembran, und dadurch zur chemotaktischen Stimulation, vermehrten Super-Oxide-Produktion und Ansammlung der Zellen in entzündeten Bereichen (Jia et al., 2007).

2.5. Inhibitoren der PI3K

Zwei starke Inhibitoren der PI3K sind Wortmannin ($\text{IC}_{50} = 1 - 10 \text{ nM}$) (Arcaro und Wymann, 1993) und LY294002 ($\text{IC}_{50} = 1 \text{ }\mu\text{M}$) (Vlahos et al., 1994).

2.5.1. Wortmannin

Wortmannin bindet direkt an der p110 katalytischen Untereinheit und hemmt die PDGF-stimulierte 3-Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen, hat aber keine Wirkung auf die Phosphorylierung von Tyrosinresten in der p85-regulatorischen Untereinheit (Arcaro and Wymann, 1993). Wortmannin hemmt *in vivo* und *in vitro* irreversibel die PI3K, nicht aber andere Kinasen wie PI4K oder Lyn (Yano et al., 1993). Wortmannin führt zur Andockung des β -Phosphates von ATP und Transfer des γ -Phosphates an die L802-Stelle der p110 katalytischen Untereinheit die zu einer Schiff'schen Base kovalent modifiziert wird. Die L802-Stelle der p110 katalytischen Untereinheit ist in allen Phosphoinositid- und Proteinkinasen konserviert (Wymann et al. 1996).

2.5.2. LY294002

LY294002 (auch 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-l-benzopyran-4-1 oder 2-(4-morpholinyl)-8-phenylchromone genannt) hemmt die PI3K indem es die ATP-Bindung hemmt. Auch dieser Hemmstoff hemmt die PI3K spezifisch und zeigt keine Wirkung auf

anderen Serin/Threonin Kinasen wie Proteinkinase C, Proteinkinase A, MAPKinase und S6 Kinase, Tyrosin-Kinasen wie EGF Rezeptor und c-src Kinase, Lipidkinasen wie PI4K und Diacylglycerolkinase oder ATPasen wie die Kaninchen-Nieren-ATPase (Vlahos et al., 1994).

Es muss aber beachtet werden, dass diese Hemmstoffe in höheren Konzentrationen auch andere Enzyme der Signalkaskaden hemmen. So hemmt Wortmannin bei $IC_{50} = 120$ nM die PI4K β (Meyers et al., 1997) und bei $IC_{50} = 250$ nM die DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) (Hartley et al., 1995). Die Autophosphorylierung von mTOR, dessen Kinasedomäne Ähnlichkeiten zur Kinasedomäne der PI3K zeigt, wird ebenfalls durch Wortmannin ($IC_{50} = 200$ nM) und LY294002 ($IC_{50} = 5$ μ M) gehemmt (Brunn et al., 1996).

2.6. Aktivierung der Signalkaskade

Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität führt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten und Transphosphorylierung von Adapterproteinen an Tyrosinresten. Über die SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit bindet die PI3K an phosphorylierte Tyrosin-Reste der Wachstumsfaktorrezeptoren oder Adapterproteine. Das führt zur Rekrutierung der PI3K an der Zellmembran und ihrer Aktivierung. Die PI3K-Aktivierung kann auch durch Integrin-abhängige Zelladhäsion, sowie GPCR (*G protein-coupled receptors*) erfolgen. Die PI3K katalysiert dann den Transfer des γ -Phosphates von ATP an der D3 Position von Phosphatidylinositolen (Cantley, 2002; Steelmann et al. 2004).

Es gibt mindestens vier Wege, die zu einer Aktivierung der PI3K der Klasse Ia beitragen (siehe auch oben):

a) Translokation an die Zellmembran. Die SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit interagieren mit pYXXM-Motive von aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder von an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gebundenen Adapterproteinen. So bindet Grb2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) gleichzeitig an pYXN-Motive der aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und an Gab (Grb2-associated binding protein), das dann mit der regulatorischen Untereinheit interagieren kann (Pawson, 2004, Abb. 5).

2. Einleitung

Bindung der regulatorischen Untereinheit mit ihren SH2-Domänen an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen könnte auch zur Phosphorylierung von p85 an Tyrosin 688 führen, ein weiterer möglicher Schritt zur Aktivierung der PI3K (Chan et al., 2002).

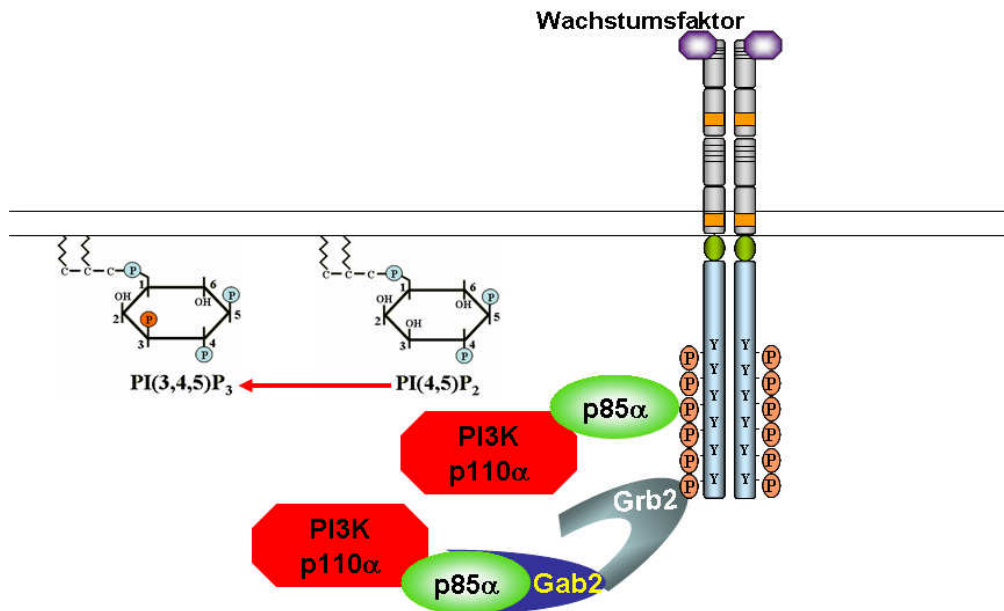


Abb. 5: Aktivierung der PI3K nach Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (adaptiert von Cully et al., 2006)

b) Bindung von GTP-Ras an die katalytische Untereinheit. Ras wird über die Interaktion GRB2 / SOS / Ras aktiviert (Ong et al., 2001) (Abb. 6).

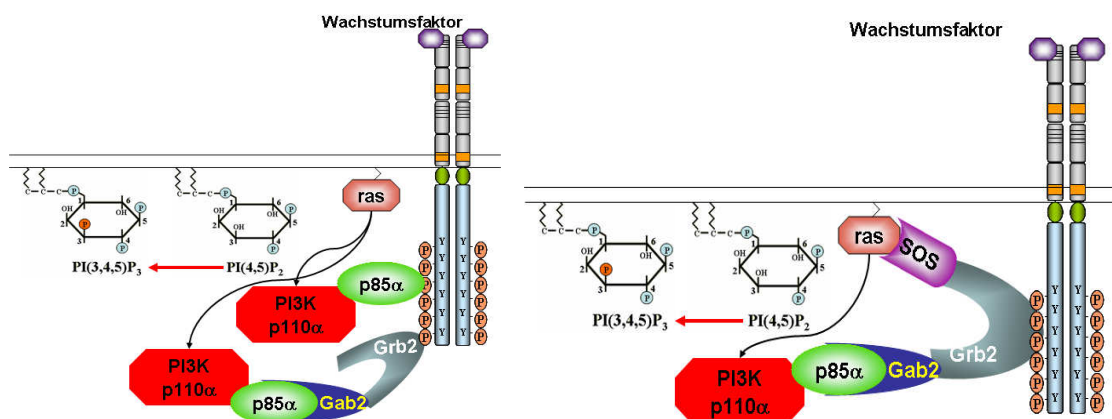


Abb. 6: Rolle von Ras für die Aktivierung der PI3K (adaptiert von Cully et al., 2006)

c) Bindung der regulatorischen Untereinheit über die SH3-Domäne an prolinreichen Regionen anderer Proteine wie Shc oder Cbl.

d) Bindung der prolinreichen Regionen der regulatorischen Untereinheit an die SH3-Domänen anderer Proteine wie Lyn, Fyn, Grb2, v-Src, Abl, Lck.

Andere Möglichkeiten werden diskutiert. Die GTPasen der Rho Familie Rac1 und Cdc42 binden an der Rho-GAP-Homologie-Domäne der BH-Domäne der regulatorischen Untereinheit und diese Bindung führt zur Aktivierung der PI3K (Zheng et al., 1994; Tolias et al., 1995). Chan et al., 2002 beschreiben in der iSH2-Domäne eine mögliche Bindungsstelle für Ras und Rac1, dass ebenfalls zu einer Aktivierung der PI3K führt. Es wird aber auch beschrieben, dass diese Interaktion kein Hauptsignalweg von Ras ist (Rodriguez-Viciana et al., 1997). Gleichzeitig kann Rho die PI3K in Thrombozyten aktivieren und dadurch zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führen (Zhang et al, 1993; Zhang et al., 1995). $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen können ebenfalls die PI3K aktivieren und Ca^{2+} /Calmodulin kann mit den SH2-Domänen der p85-Untereinheit interagieren und zur Aktivierung der PI3K führen (Zhang et al., 1995; Joyal et al., 1997).

2.7. Deaktivierung der PI3K Signalkaskade

PI(3,4,5)P₃ wird durch Phosphatasen abgebaut (Abb. 7).

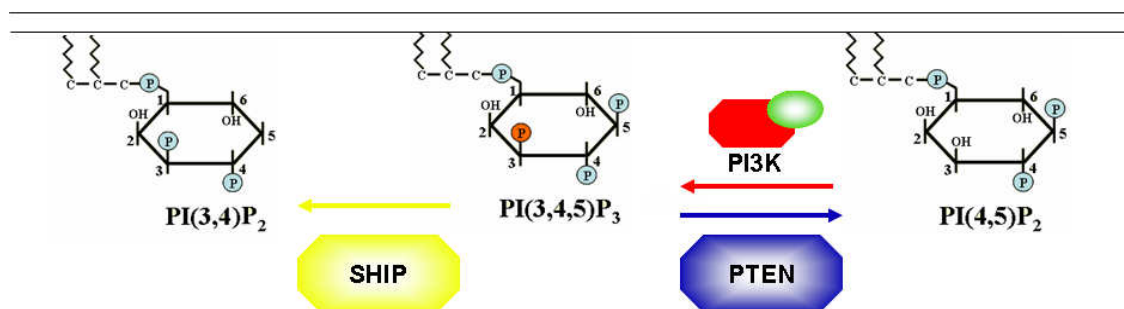


Abb. 7: Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat durch PTEN und SHIP

2.7.1. PTEN

Der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) dephosphoryliert das $PI(3,4,5)P_3$ an Position D3 des Inositolrings (Maehama und Dixon, 1998). PTEN-Mutationen wurden gehäuft in Tumoren festgestellt, wie Melanomen, Nierentumoren, Glioblastomen und Mammatumoren, sowie in Zelllinien, die aus Glioblastomen, Protatumoren und Mammatumoren abgeleitet wurden, mit einer Gesamthäufigkeit von 10% (Li et al., 1997; Teng et al., 1998). PTEN scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Cowden-Syndroms (*Multiple-Hamartome-Syndrom*; autosomal dominant vererbte Erkrankung) zu spielen. Die Inaktivierung von PTEN in Mäusen führt zu einer frühen embryonalen Letalität und Zellen verlieren ihre Fähigkeit sich zu differenzieren. Außerdem kommt es zu hyperplastischen und dysplastischen Veränderungen in Prostata-, Haut- und Kolongewebe (Di Cristofano et al., 1998). Mutationen im PTEN-Gen wurden auch in Zellen aus primären Leukämien (1,35%) und Non-Hodgkin-Lymphome (10%), sowie in leukämischen Zelllinien (40%) gefunden. Es wurde eine umgekehrte Korrelation zwischen PTEN-Menge und Akt-Phosphorylierung beobachtet (Dahia et al., 1999). PTEN hemmt die Aktivierung von Akt und die Phosphorylierung von 4E-BP1, ein Effektor von Akt (Wu et al., 1998). Fibroblasten, die kein funktionierendes PTEN exprimieren, zeigen konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, sowie herabgesetzte Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen. Expression von exogenem PTEN in mutierten Mäusezellen führt zur Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen, sowie zur Normalisierung des Akt-Phosphorylierungsniveaus. Mäuse, die für PTEN Mutationen heterozygot sind, entwickeln T-Zell-Lymphome nach Verlust der PTEN-Heterozygotität (Stambolic et al. 1998). Ein Verlust von PTEN wurde in einem großen Anteil der fortgeschrittenen Tumoren bei Menschen gefunden, was zur Annahme führt, dass unkontrollierte PI3K-Signalaktivität zur Entstehung von metastasierenden Tumoren beiträgt (Maehama und Dixon, 1999).

2.7.2. SHIP

Eine andere Phosphatase, die $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ dephosphoryliert und dadurch die PI3K-Signalkaskade hemmt, ist SHIP (*Src-homology 2 (SH2)-containing inositol phosphatase*). SHIP-1 und SHIP-2 dephosphorylieren die 5-Position des Inositolrings. SHIP-1 ist ein wichtiger negativer Regulator der Zytokin-abhängigen Signalkaskaden (Liu et al., 1997; Rohrschneider et al., 2000). SHIP-1 defiziente Mäuse haben eine verkürzte Lebenserwartung, zeigen Splenomegalie, massive Infiltration der Lungen mit myeloischen Zellen, eine stark erhöhte Anzahl von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im Blut und eine stark erhöhte Anzahl von CFU-GM (*granulocyte-macrophage colony forming units*), besonders in der Milz. Hämatopoetische Progenitorzellen zeigen eine Hypersensitivität gegenüber mehreren Zytokinen wie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) und IL-3 (Interleukin 3) (Helgason et al., 1998). Myeloische Zellen von SHIP-defizienten Mäusen zeigen geringere Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen, stärkere und längere PI3K-abhängige Akt-Phosphorylierung und -Aktivierung, sowie höhere basale Akt-Aktivität (Liu et al., 1999). Wiederherstellung der SHIP-1 Expression in den SHIP-defizienten Jurkat Zellen führt zu einer Abnahme der konstitutiven Phosphorylierung von Akt, niedrigeres $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ -Niveau und geringere Proliferation (Horn et al., 2004). Überexpression von SHIP-1 in hämatopoetischen Progenitorzellen bei gesunden Menschen oder Patienten mit juveniler myelomonozytärer Leukämie führt zur Hemmung der Proliferation und Kolonieformation (Metzner et al., 2007). In Zellen einer primären Leukämie wurde eine mutierte Form von SHIP gefunden, die geringere Aktivität aufweist. Diese Zellen zeigten eine stärkere Akt-Phosphorylierung (Luo et al., 2003). SHIP kann ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase von Glioblastoma-Zellen induzieren. Verlust von SHIP führt zu einer dramatischen Erhöhung der Insulinsensibilität und der Akt-Aktivität (Taylor et al., 2000; Clement et al., 2001). Diese Daten zeigen, dass SHIP eine wichtige Rolle in der Regulation der PI3K Signalkaskade spielt.

2.8. Effektoren der PI3K

Die Phosphorylierung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ an der D3-Position des Inositolrings führt zur Aktivierung mehrerer koordinierter Ereignisse, die Zellwachstum, Zellzyklus, Zellmigration und Zellüberleben beeinflussen. Viele Signalproteine wie Serin-Threonin Kinasen und Tyrosin-Kinasen besitzen PH-Domänen (Pleckstrin-Homologie-Domänen), mit denen sie spezifisch an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ binden können. Diese Signalproteine sind in unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert, können aber nach Zellstimulation über ihre PH-Domänen mit $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ assoziieren und dadurch an die Zellmembran relokaliert werden. An der Zellmembran werden diese Proteine aktiviert, führen zur Formierung von Signalkomplexen und setzen mehrere Protein-Kinase-Signalkaskaden in Gang. Lipid-Produkte der PI3K stellen somit einen Anker an der Zellmembran dar, der zur Relokalisierung der Signalproteine an spezifischen Stellen der Zellmembran nach Zellstimulation dient. Diese Signalproteine koordinieren komplexe Vorgänge, die zu Änderungen in Zellmetabolismus, Zellwachstum, Zellbewegung und Zellüberleben führen (Cantley, 2002).

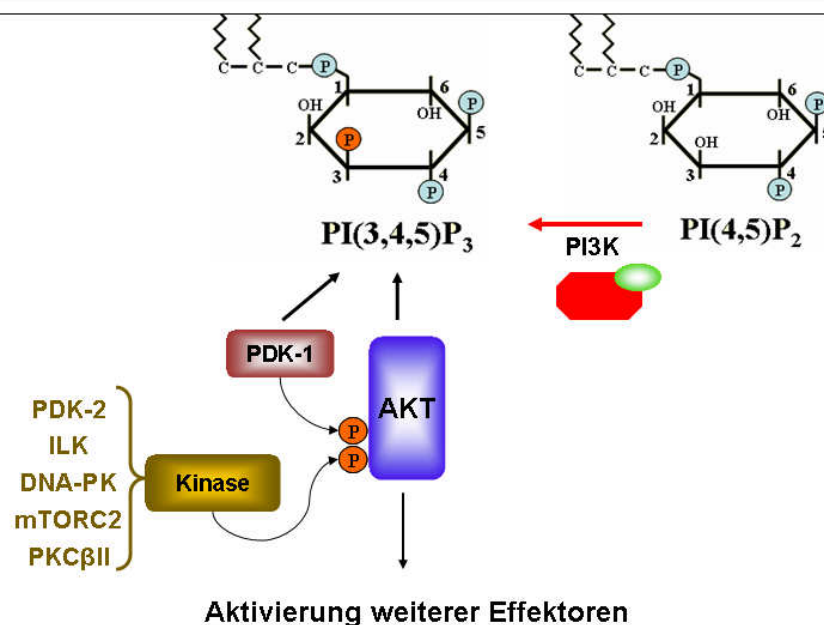


Abb. 8: Aktivierung von Akt (siehe Text für Einzelheiten).

In der Abbildung 8 ist die Phosphorylierung von $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ zu $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ an der Zellmembran durch die aktivierte PI3K, sowie die Rekrutierung der Signalproteine mit Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen und ihre Bindung an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ schematisch dargestellt.

2.8.1. Rekrutierung der Proteine an der Zellmembran

Besonders wichtige Proteine für die PI3K / Akt Signalkaskade sind die Serin-Threonin-Kinase Akt (auch Protein Kinase B (PKB) genannt) und PDK1 (Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1, *phosphoinositide-dependent kinase 1*). Diese Proteine besitzen PH-Domänen, wodurch sie an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ an der Zellmembran binden. Diese Bindung bringt die Proteine in räumliche Nähe zueinander und erleichtert somit die Phosphorylierung von Akt durch PDK1 (Lawlor und Alessi, 2001). Bindung von Akt1 an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ führt zu einer Konformationsänderung. Dadurch wird der Threoninrest 308 an der Aktivierungsschleife der Akt1 für die PDK1 präsentiert. Die Phosphorylierung von Akt1 an Threonin 308 findet nur in Anwesenheit von $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ oder $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ statt. Das monomere PDK1 Protein hat eine Kinasedomäne und eine carboxy-terminale PH-Domäne, die wichtig für die Bindung an $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ ist. Das Protein wird ubiquitär in allen Geweben exprimiert (Alessi et al., 1997).

Zur Aktivierung von Akt1 ist eine zweite Phosphorylierung notwendig. Diese Phosphorylierung an Serin 473 am Carboxy-Ende wird durch ein anderes Protein als PDK1 durchgeführt. Sowohl die Phosphorylierung an Threonin 308 als auch die an Serin 473 sind notwendig für die volle Aktivierung von Akt1. Während Alessi et al. berichten, dass diese Phosphorylierungen unabhängig von einander sind, zeigen Daten von Scheid et al., dass erst die Phosphorylierung an Serin 473, die Phosphorylierung durch PDK1 an Threonin 308 ermöglicht (Alessi et al., 1996, Scheid et al., 2002). Die Phosphorylierung an Serin 473 findet durch eine zweite Kinase statt, die immer noch nicht vollständig charakterisiert wurde. Diese Kinase wurde erst PDK2 genannt, zeigt aber keine Ähnlichkeiten zu PDK1. Später wurde sie sowohl als die ILK (*Intergrin-Linked-Kinase*) (Persad et al., 2001), als auch als die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Feng et al., 2004) identifiziert. Es gibt Arbeitsgruppen die berichten, dass die ILK für die Phosphorylierung von Akt an Serin

473 notwendig ist (Persad et al., 2001; Troussard et al., 2003) während andere Gruppen berichten, dass die ILK dafür keine Rolle spielt (Feng et al., 2004; Sakai et al., 2003; Grashoff et al., 2003). Auch die PKC β II (protein kinase C, isoform β II) wurde als eine mögliche Kinase beschrieben, die den Serinrest 473 von Akt phosphorylieren kann (Kawakami et al., 2004). Desweiteren wurde berichtet, dass auch der Komplex Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) - mTOR Akt an Ser473 phosphoryliert und damit zu seiner Aktivierung beiträgt (Sarbasov et al., 2005).

2.8.1.1. Das Akt Protein

Akt wurde zum ersten Mal aus Thymomzellen einer für Leukämie und Lymphome anfälligen Mauszelllinie (AKR) isoliert (Staal, 1987). Später wurde festgestellt, dass Akt ein Proto-Onkogen ist (Staal und Hartley, 1988a). Es gibt drei Isoformen von Akt, die von drei unterschiedlichen Genen exprimiert werden, Akt1, Akt2 und Akt3. Jede Isoform beinhaltet die n-terminale PH-Domäne, gefolgt von der katalytischen Domäne. In dieser Region befindet sich der Threoninrest (bei Akt1 Th308), dessen Phosphorylierung durch PDK1 für die Aktivierung des Enzyms unbedingt notwendig ist. Im hydrophoben c-terminalen Teil befindet sich der Serinrest (bei Akt1 Ser473), der für die Aktivierung des Enzyms ebenfalls phosphoryliert werden muss, aber nicht durch die PDK1 (Hill et al., 2001, siehe oben). Akt1 und Akt2 werden in allen Geweben exprimiert, vor allem aber im Gehirn, Thymus, Herz und Lunge. Eine starke Akt3-Expression ist im Gehirn und Testis zu finden (Steelman et al., 2004).

- Akt 1

Bei Mäusen spielt Akt1 eine Hauptrolle in der Regulation des Zellüberlebens und der Zellproliferation. In embryonalen Stammzellen, wo PTEN ausgeschaltet ist, führt die Akt1-Ausschaltung zu geringerer Aggressivität des Tumorstwachstums, was zur Annahme führt, dass Akt1 eine wichtige Rolle für die PTEN-abhängige Tumorigenese spielt (Stiles et al., 2002). Das Akt1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 14q32, eine Region in der häufig Translokationen bei Leukämien und Lymphomen beobachtet werden (Staal et al., 1988b). Eine 20-fache Überexpression von Akt1 wurde in einem primären gastrischen

Adenokarzinom gefunden (Staal, 1987). Außerdem, spielt Akt1 eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Skelettmuskelzellen (Wilson und Rotwein, 2007) und Entstehung von Mammatumoren, die aber stark differenziert sind und weniger Metastasen entwickeln (Hutchinson et al., 2004).

- Akt2

Mäuse mit einer Ausschaltung von Akt2 zeigen leichte Wachstumsdefizite, sowie Lipoatrophie, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Glukoseintoleranz. Die Wachstumsdefizite sind ähnlich wie bei Mäusen, wo Akt1 ausgeschaltet wurde. Dies führt zur Annahme, dass Akt2 eine wichtige Rolle für den Glukosemetabolismus spielt und mit Akt1 das Wachstum regulieren kann (Garofalo et al., 2003). Aber auch Akt2 spielt bei der Entstehung einiger Tumoren eine Rolle. Das Akt2-Gen befindet sich auf dem Chromosom 19q13.1–q13.2, eine Region die in Ovarial- und Pankreaskarzinomen häufig amplifiziert ist. Amplifikation und Überexpression von Akt2 wurde in 2 von 8 Ovarialkarzinom-Zelllinien und in 2 von 15 primären Ovarialtumoren gefunden (Cheng et al., 1992). In anderen Studien wurden in 16 von 132 (12,1%) Ovarialkarzinomen und in 3 von 106 (2,8%) Mammakarzinomen Akt2-Amplifikationen gefunden. Außerdem, wurde eine Amplifikation und Überexpression von Akt2 in 3 von 12 Pankreaskarzinom-Zelllinien und in 3 von 20 primären Pankreastumoren gefunden (Miwa et al., 1996). Akt2-Amplifikationen wurden besonders oft in undifferenzierten Tumoren (4 von 8) gefunden (Bellacosa et al., 1995). Yuan et al., 2000 beobachteten eine erhöhte Akt2 Aktivität in 33 von 91 Ovarialtumoren, meistens von Grad III oder IV. Von den 33 Tumoren, zeigten 15 eine erhöhte PI3K Aktivität und 3 eine erniedrigte PTEN-Aktivität.

Akt1 und Akt2 führen zur Aktivierung der Expression von IGF-IR (*Insulin-like growth factor I receptor*) und dadurch zu einer verstärkten Invasivität von Pankreastumoren (Tanno et al., 2001).

- Akt3

Eine Ausschaltung von Akt3 bei Mäusen zeigt keine Wirkung auf Wachstum oder Glukosemetabolismus. Bei diesen Tieren ist jedoch die Gehirngröße und das Gehirngewicht um etwa 25% verringert. Das Gehirnvolumen ist infolge einer Abnahme der Zell-

zahl und -größe verringert und die Ventrikel sind verschmälert, sodass Akt3 eine Schlüsselrolle in der postnatalen Entwicklung des Gehirns spielen kann (Tschopp et al., 2005).

2.8.2. Akt-abhängige Signalkaskade

Die Phosphorylierung von Akt führt zur Aktivierung des Proteins und der Kinase-Aktivität und dadurch zur Phosphorylierung einer Reihe anderer Proteine, die unter anderem Zellwachstum, Zellzykluseintritt, Zellüberleben, Apoptose, sowie Glukosemetabolismus (Abb. 9 und 10) beeinflussen. Die Phosphorylierung durch Akt führt meistens zu einer Hemmung der Effektorproteine (Tab. 2). Akt reguliert die Expression von bis zu 145 Genen (Porstmann et al., 2005).

Protein	Regulatorischer Effekt
FOXO1	Inhibition
FOXO3A	Inhibition
FOXO4	Inhibition
TSC2	Inhibition
GSK3 α/β	Inhibition
RAF1	Inhibition
PRAS40	Inhibition
AS160	Inhibition
BAD	Inhibition
WNK1	?
MDM2	Aktivierung
Chk1	Inhibition
eNOS	Aktivierung
ASK1	Inhibition
IKK α	Aktivierung
P21CIP1	Inhibition
P27KIP1	Inhibition
Casp9	Inhibition

Tab. 2: Einige Effektoren von P-Akt und die direkte Akt-Wirkung auf sie (Manning und Cantley, 2007)

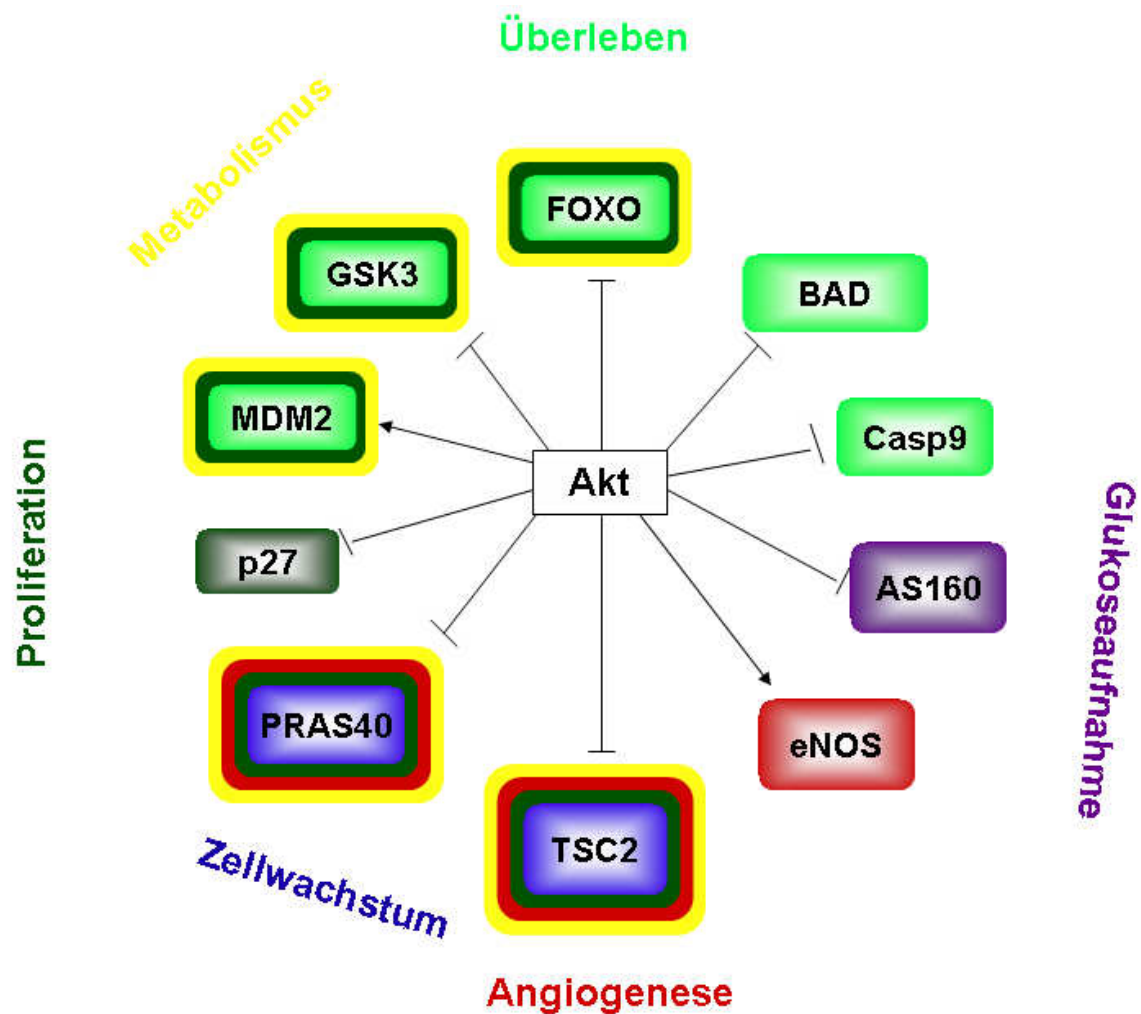


Abb. 9: Einige der Akt-Effektoren und ihre Rollen (nach Manning und Cantley, 2007). Dargestellt ist die direkte Wirkung von Akt auf die Aktivität des Effektors. Die Kästchenfarbe symbolisiert für welche Zellfunktion die Proteine eine Rolle spielen.

2.8.2.1. Zellüberleben

Phosphorylierung des Apoptose-induzierenden Proteins Bad durch Akt führt zur Entstehung einer Bindungsstelle für die 14-3-3 Proteine. Diese Bindung verhindert die Bindung von Bad an Proteine der Bcl-2 Familie (wie Bcl-2 und Bcl-XL), die wichtige Rollen in Signalwegen spielen, die das Zellüberleben regulieren (Brunet et al., 2001). So kann Bcl-XL proapoptotische Bax-Moleküle binden und verhindert dadurch die Entstehung von proapoptotischen Bax-Homodimeren. Unreife hämatopoetische Progenitorzellen

(CD34⁺ / 33⁻ / 13⁻) exprimieren Bcl-XL und die meisten CD34⁺ Zellen exprimieren Bcl-2, Bcl-XL und Bad. Während normale Promyelozyten (CD34-/33+) weder Bcl-2 noch Bcl-XL exprimieren, sind diese beiden anti-apoptotischen Proteine in leukämischen CD34⁺ Progenitorzellen und Promyelozyten zu finden. Auch bei AML ist die Bcl-2 Menge in CD34⁺ Zellen höher als in anderen Zellen. Während einer Chemotherapie erhöht sich die Menge von Bcl-2, was sich dadurch erklären lässt, dass die CD34⁺ Zellen, die große Mengen an Bcl-2 haben, einen Überlebensvorteil haben und dadurch verhältnismäßig mehr werden. In Residualzellen wurden sowohl Bcl-2 als auch Bcl-XL nachgewiesen (Andreeff et al., 1999).

Auch die Phosphorylierung von FKHR-L1 (*Forkhead-related transcription factor 1*) durch Akt führt zur Entstehung einer Bindungsstelle für 14-3-3 Proteine (Brunet et al., 2001). Die FKHR-L1 – 14-3-3 Komplexe akkumulieren im Zytosol und die durch FKHR-L1 stimulierte Transkription pro-apoptotischer Gene, wie das Fas-Ligand-Gen, wird blockiert (Brunet et al., 1999). Proteine dieser Familie sind mit der Entstehung von Neoplasien in Verbindung gebracht worden (Hromas und Costa, 1995).

Akt kann MDM2 binden und phosphorylieren. Diese Phosphorylierung führt zu einer nukleären Relokalisierung von MDM2, wo es mit p300 interagiert. Dadurch wird die Interaktion von p300 mit p19ARF gehemmt und als Folge kommt es zur verstärkten p53-Degradierung. P53 ist ein sehr wichtiges Protein für die Regulation von Zellwachstum und Apoptose (Zhou et al., 2001b).

Eine weitere Funktion von Akt ist die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3). GSK3 ist in unstimulierten Zellen konstitutiv aktiv und phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen (wie Glykogen Synthase und β -catenin), die dadurch inaktiviert und degradiert werden. Phosphorylierung beider Untereinheiten (α und β) der GSK3 durch Akt inaktiviert sie und führt zur Aktivierung der durch dieses Protein gehemmten Signalkaskaden. PI3K und Akt können durch Hemmung der GSK-3 und Phosphorylierung (und Aktivierung) von 6-Phosphofruktose-2-Kinase (PFK2) die Glukoseverwertung zu Glykogen und Glykolyse regulieren (Cross et al., 1995; Deprez et al., 1997). Inhibition der PI3K führt zu einer Hemmung des Glukosetransports in die Zelle, während Aktivierung der PI3K und Akt zu einer verstärkten Glukoseaufnahme in die Zellen

führt (Okada et al., 1994; Cheatham et al., 1994; Kohn et al., 1996). GSK-3 spielt auch eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung (Feyt et al., 2005). β -catenin reguliert, durch Interaktion mit LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor-T cell factor*), die Transkription verschiedener Gene wie cyclin D1 oder c-myc. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus (Fukumoto et al., 2001).

Akt phosphoryliert und inaktiviert Caspase-9 und hemmt die Cytochrome-C abhängige Aktivierung der Caspase-9, ein wichtiger Spieler der Apoptose-induzierenden Signalkaskaden (Cardone et al., 1998).

Ein anderer Effektor von Akt, wodurch die Transkription anti-apoptotischer Gene reguliert wird, ist NF- κ B. PI3K- gefolgt von Akt-Aktivierung durch TNF führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK (*IKB-kinase*), die NF- κ B-hemmende Proteine inaktiviert und dadurch zur Aktivierung von NF- κ B führt (Ozes et al., 1999). Überexpression von Her-2/neu führt zu einer konstitutiven Aktivierung der PI3K und Akt und dadurch zur Aktivierung von NF- κ B (Pianetti et al., 2001). Aktivierung von NF- κ B führt unter anderem zur Produktion von MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*). MMP-9 und die PI3K-abhängige Steigerung der Zellmotilität sind zwei Hauptwege, wie der PI3K / Akt Signalweg, die Invasivität der Tumoren steigt (Cheng et al., 2006).

2.8.2.2. Zellwachstum

Ein komplexer Vorgang ist die Aktivierung von mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Akt phosphoryliert und hemmt TSC2 (*tuberous sclerosis 2*), ein GTPase-aktivierendes Protein, das zusammen mit TSC1 (*tuberin*) das kleine G-Protein Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) hemmt (Manning et al., 2002; Zhang et al., 2003). Akt führt dadurch zur Aktivierung von Rheb, das seinerseits die Proteinkinase-Aktivität von mTOR aktiviert. mTOR funktioniert in einem Komplex mit dem Adapterprotein Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) und mLST8. Das mTOR / Raptor / mLST8 Komplex (mTORC1) ist Rapamycin-sensitiv und kann in Form einer negativen Rückkopplung Akt inhibieren. mTOR kann auch mit Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) und mLST8 einen Rapamycin-insensitiven Komplex (mTORC2)

bilden (Hay, 2005). Es wurde gezeigt, dass der Rictor - mTOR Komplex Akt an Ser473 phosphorylieren und damit zur Aktivierung von Akt beitragen kann (Sarbasov et al., 2005). Hemmung der mTOR-Komplexe mit Rapamycin-Derivaten führt zur Hemmung der Akt-Signalkaskade und den Effektoren 4E-BP1, P70 S6Kinase und FKHR in AML Zellen (Zeng et al., 2007). mTOR fungiert als eine Brücke zwischen unterschiedlichen Signalkaskaden, die Zellernährung, -wachstum, -proliferation und -überleben regulieren, was eine Koppelung dieser Kaskaden ermöglicht (Gingras et al., 2001). Die Wachstumsfaktor-Signalkaskaden Ras / ERK und PI3K / Akt aktivieren den mTORC1 Komplex, während geringe Nahrungsverfügbarkeit (z. B. Aminosäure- und Glukoseverfügbarkeit) zur Hemmung des Komplexes durch die LKB1 / AMPK (*AMP-activated protein kinase*) Kaskade führt (Inoki et al., 2003; Shaw et al., 2004). Gleichzeitig, kann Akt die AMPK hemmen und dadurch mTOR weiter aktivieren (Hahn-Windgassen et al., 2005). mTOR reguliert auch die Funktion von 4E-BP1 und p70 S6Kinase (Shaw und Canley, 2006).

Aktivierung von Akt führt zur Phosphorylierung und dadurch Inaktivierung von 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein*). Hemmung der Bindung von 4E-BP1 an eIF4E (Initiationsfaktor der Translation) verstärkt die eIF4E-abhängige Translationsrate (Gingras et al., 1998). Gleichzeitig, kann Phosphorylierung und Aktivierung der p70 S6Kinase zur verstärkten Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins, und damit zu erhöhter Proteinbiosynthese führen (Ueki et al., 1998). p70 S6Kinase reguliert nicht nur die Proteinbiosynthese, sondern auch Zellgröße und -proliferation (Kozma und Thomas, 2002). Akt phosphoryliert auch CREB (*cAMP-responsive element binding protein*), was zur Rekrutierung von CBP und Aktivierung der Genexpression führt (Du et al., 1998).

2.8.2.3. Zellproliferation

Durch Phosphorylierung rekrutiert Akt das Protein p27 im Zytosol und hemmt die Rückkehr in den Zellkern. Im Zellkern verursacht p27 einen G1-Zellzyklusarrest durch Hemmung von Cyclin D und Cdk (*cyclin-dependent kinase*). So führt Akt in diesem Fall zu einer Regulation des Zellzyklus und Stimulation von Zellteilung (Shin et al., 2005). Hemmung der Akt Aktivität in ALCA (*anaplastic large cell lymphoma*) führt zur

Hemmung der p27-Phosphorylierung und -Degradierung, höhere p27 Mengen und Zellzyklusarrest (Rassidakis et al., 2005).

Akt phosphoryliert auch die Cyclin-abhängige Kinase p21, die dadurch im Zytosol relokalisiert wird (Zhou et al, 2001). Interessant war die Beobachtung, dass Akt1 zur Phosphorylierung und Inhibierung von p21 führt, während Akt2 das p21 bindet und stabilisiert, was zum Zellzyklusarrest führt. Die Bindung von p21 an einer Akt-Isoform führt zur Hemmung der Bindung der anderen Isoform (Heron-Milhavet et al., 2006). Akt kann die p21-Expression auch durch Hemmung von p53 (über MDM2) hemmen (Zhou et al., 2001).

Akt kann die Zellproliferation auch durch die oben beschriebenen Signalkaskaden über GSK3 und mTOR regulieren.

2.8.2.4. Angiogenese

In Endothelzellen wird die PI3K durch VEGF (*vascular endothelial growth factor*) aktiviert (Olsson et al., 2006). Akt aktiviert die eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), die durch NO-Produktion die Vasodilatation, Angiogenese und Vasomodelierung reguliert (Morbideilli et al., 2003). Durch Aktivierung von mTOR führt Akt zur Aktivierung von HIF1 und dadurch zu verstärkter Expression und Sezernierung von VEGF und anderen Faktoren, die die Angiogenese weiter stimulieren (Phillips et al., 2005).

2.8.2.5. Zellmetabolismus

Der PI3K / Akt Signalweg spielt eine wesentliche Rolle in der Zellantwort auf Insulinstimulation, z. B. durch die Translokation von GLUT4 Transporter in der Zellmembran durch Regulation bestimmter GTPasen (Manning und Cantley, 2007; Calera et al., 1998). Auch mTOR und HIF1 spielen im Glukosemetabolismus eine Rolle.

Durch Aktivierung der Synthese von SREBP-1 (*Sterol-regulatory element binding protein*) und FAS (*fatty acid synthase*) kann Akt die Expression von Genen regulieren, die Cholesterol- und Fettsäuresynthese kontrollieren (Porstmann et al., 2005).

2.8.2.6. Zellmigration und Invasivität

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist das *in-vitro* Korrelat der Metastasierung. Autokrin aktivierte PDGF-R zusammen mit onkogenem Ras führen zu einer starken Aktivierung von PI3K und EMT (Jechlinger et al., 2005). Konstitutive Aktivierung von Akt führt zur Hemmung der Expression von Desmoplakin (wichtig für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Desmosomen), E-cadherin und β -catenin, sowie zur Hochregulation des mesenchymalen Markers Vimentin. Zellen verlieren die epitheliale Morphologie und gewinnen Fibroblasten-Eigenschaften. Sie zeigen reduzierte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, Verlust der apicobasalen Zellpolarität und verstärkte Motilität und Invasivität (Grille et al., 2003, Larue und Bellacosa, 2005).

Akt reguliert die Expression von IGF-IR (*Insulin-like growth factor I receptor*) und führt dadurch zu einer Zunahme der Invasivität von Pankreastumoren (Tanno et al., 2001).

Aktivierung der PI3K und ihrer Mediatoren Akt / mTOR führt zur Aktivierung von HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*) und dadurch zu einer verstärkten Expression von CXCR4 (*CXC chemokine receptor 4*), was die Metastasierung von Tumoren induziert (Phillips et al., 2005).

Insulinstimulation führt zur Aktivierung von Akt1 und Akt2. Akt 1 hemmt NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und ERK und verringert damit die Metastasierungs-, Migrations- und Invasivitätsfähigkeit von Mammaepithel- und Mammakarzinomzellen (Yoeli-Lerner et al., 2005). Akt2 hat genau die gegenteilige Wirkung und aktiviert NFAT und ERK (Toker und Yoeli-Lerner, 2006).

2.8.2.7. Weitere Funktionen

Durch den PI3K / Akt Signalweg aktiviert Erythropoetin den Transkriptionsfaktor GATA-1, der Proliferation, Überleben, Differenzierung und Entwicklung der Zellen der erythroiden Reihe reguliert (Zhao et al., 2006).

Eine weitere beschriebene Rolle der PI3K ist die Regulation der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen. Hierbei spielen LIF (*leukemia inhibitory factor*) und STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) eine wichtige Rolle. Hemmung der

PI3K reduziert die Fähigkeit der LIK, die Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler Stammzellen aufrecht zu erhalten (Paling et al., 2004). Gleichzeitig reicht die konstitutive Aktivierung von Akt aus, um embryonale Stammzellen, unabhängig von LIK, pluripotent zu erhalten (Watanabe et al., 2006). Die Expression von Akt wird ihrerseits von STAT3 reguliert (Park et al., 2005).

P110 δ wird in Zellen des Immunsystems exprimiert (Chantry et al., 1997; Vanhaesebroeck et al., 1997b). Diese Isoform scheint die Haupt-PI3K in der BCR (*B-cell receptor*) und TCR (*T-cell receptor*)-Signalkaskade zu sein. Inaktivierende Mutationen des für die Expression von p110 δ zuständigen Gens in B-Zellen führt zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung, Hemmung der Anti-IgM-stimulierten Signalkaskade, sowie Hemmung der Proliferation und der Immunantwort. In T-Zellen kommt es zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung, Hemmung der Reifung und des Überlebens der Zellen in der Peripherie, sowie zu einer Proliferationshemmung (Okkenhaug und Vanhaesebroeck, 2003). Im Unterschied dazu, ist der Phänotyp bei Ausschaltung dieses Gens milder, möglicherweise weil die Inaktiverung des für die Expression von p110 δ zuständigen Gens zu einer Hochregulation der für die Expression von p110 α und β zuständigen Gene führt (Clayton et al., 2002).

Akt wird durch PHLPP (*PH-domain leucine-rich repeat protein phosphatase*) dephosphoryliert (Brognard et al., 2007).

Die oben beschriebenen und in der Abb. 10 dargestellten Effektoren und Signalkaskaden, die von Akt reguliert werden, können nur einen Überblick des hoch komplexen Akt-Signalnetzwerkes verschaffen. Dieses Netzwerk, das noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden ist, beinhaltet hunderte von Effektoren und führt zur Regulation von hunderten von Genen, die ihrerseits quer vernetzt sind, miteinander interagieren und einander regulieren.

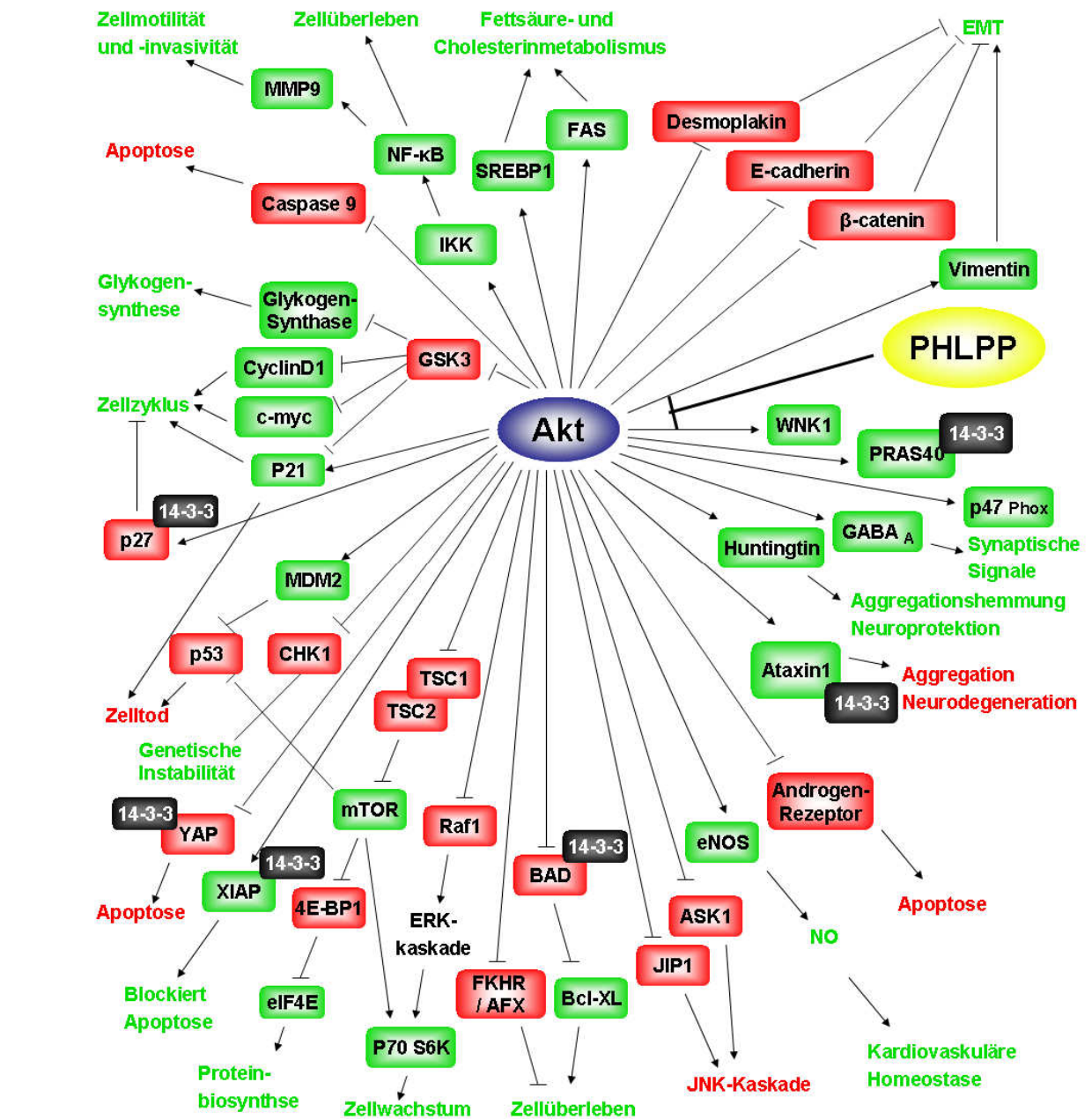


Abb. 10: Signalkaskade nach PI3K-induzierte Aktivierung von Akt.

Farbkodierung: rot bedeutet, dass Akt eine hemmende Wirkung auf das Protein oder die Zellfunktion ausübt; grün bedeutet, dass Akt eine aktivierende Wirkung auf das Protein oder die Zellfunktion ausübt. Für Einzelheiten und Referenzen, siehe Text.

2.8.2.8. Weitere Proteine der PI3K Signalkaskade

PDK1 phosphoryliert und aktiviert auch andere Proteinkinasen wie die p70 S6-Kinase, CISK (*cytokine-independent survival kinase*) und Proteinkinase Cz (PKCz) (Cantley, 2002). Die p70 S6-Kinase reguliert durch Aktivierung der Translation spezifischer Messenger das Zellwachstum und die Zellzyklus-Progression durch die G1-Phase (Alessi et al., 1998), CISK spielt eine Rolle in der Regulation des Zellüberlebens (Liu et al., 2000) und PKCz ist involviert in Zellantworten auf unterschiedliche Stimuli.

Andere Proteine mit PH-Domänen, die durch PI(3,4,5)P₃ aktiviert werden, sind Regulatorproteine für Rac und ARF6 (*adenosine diphosphate (ADP)-ribosylating factor 6*), sowie Tyrosinkinasen der Btk- (*Bruton's tyrosine kinase*) und Tec-Familien. Aktivierung von Rac (und möglicherweise von ARF6) durch lokal begrenzte PI(3,4,5)P₃-Produktion spielt eine sehr wichtige Rolle in der Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts bei durch Chemotaxis getriggelter gerichteter Motilität. Proteine der Tec-Familie spielen bei kurzfristigen (z. B. Änderung der Ca²⁺-Konzentration) und langfristigen (z. B. Änderung der Genexpression) Ereignissen eine Rolle (Cantley, 2002).

PI(3,4,5)P₃ kann auch durch die IPMK (*inositol polyphosphate multikinase*) produziert werden, die nur im Zellkern vorkommt und durch PI3K-Inhibitoren nicht beeinflusst wird (Resnick et al., 2005). Möglicherweise spielt IPMK eine Rolle in der Regulation von Vorgängen wie mRNA-Export und Transkriptionregulation (Resnick und Saiardi, 2008).

2.9. Änderung der Expression der PI3K

2.9.1. Änderung der Expression der katalytischen Untereinheit

Mäuse, die keine p110 katalytische Untereinheit der Klasse Ia exprimieren, zeigen schwere Proliferationsdefekte und versterben am 9.-10. Embryonaltag (Bi et al., 1999).

2.9.2. Änderung der Expression der regulatorischen Untereinheit

Es wurden viele Versuche unternommen, die Rolle der regulatorischen Untereinheit der PI3K zu untersuchen, in dem ihre Expression runterreguliert wurde. Eine Übersicht dieser Versuche ist in der Tabelle 3 gegeben.

Ausschaltung		Lebensfähigkeit	Metabolismus	Expression weiterer Untereinheiten
p50α, p55α, p85α	homozygote	perinatale Letalität	Hypoglykämie Hypoinsulinämie	p85β hoch p110α runter p110β runter
	heterozygote	lebensfähig	erhöhte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität	p85β hoch p110α unverändert p110β unverändert
p85α		lebensfähig	Hypoglykämie erhöhte Insulinsensitivität	p50α hoch p55α hoch p110α unverändert p110β unverändert
p50α, p55α		lebensfähig	erhöhte Insulinsensitivität	
p85β		lebensfähig	Hypoglykämie Hypoinsulinämie erhöhte Insulinsensitivität	alle Untereinheiten nicht verändert

Tab. 3: Folgen der Ausschaltung der Expression der regulatorischen Untereinheit (Vanhaesebroeck et al., 2005).

2.9.2.1. Hemmung der Expression der regulatorischen Untereinheit

Änderungen des Expressionsmusters der regulatorischen Untereinheit führen zu schweren Folgen in den Zellen. Mäuse mit einer homozygoten Deletion der p85-Bindungsstelle an der p110α–Untereinheit zeigen Entwicklungsverzögerungen und sterben am 9,5. – 10,5. Embryonaltag. Eine komplette Hemmung der Expression aller Isoformen von p85α führt zu schweren Entwicklungsstörungen in der embryonalen Phase und die meisten Tiere sterben in der perinatalen Phase (Fruman et al., 2000). Die Letalität und die schweren Entwicklungsdefekte waren bei Tieren, wo nur die Expression des ersten Exons

gestört wurde, nicht vorhanden. Diese Tiere exprimieren die kürzeren Isoformen der p85-Untereinheit, wobei p50 α effizienter als p55 α für die Produktion von PI(3,4,5)P₃ zu sein scheint. Diese Tiere zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Insulin und sind hypoglykämisch (Terauchi et al., 1999). Die Interaktion von p50 α mit IRS-1 ist mit der PI3K Aktivität, sowie mit erhöhter GLUT4 Translokation an der Zellmembran in Adipozyten und Muskelzellen assoziiert. Diese Daten stimmen mit den Daten überein die zeigen, dass p50 α eine wichtige Rolle in der Insulinantwort spielt (Inukai et al., 1997). Mäuse, in denen die Expression der p50 α und p55 α kürzeren Isoformen der p85 α regulatorischen Untereinheit gehemmt wurde, zeigen in Ruhe normales Wachstum und normale Blutglukosespiegel. Im Insulintoleranztest zeigen sie niedrigere Fasteninsulinspiegel, stärkere Insulinsensitivität und vermehrten Glukosetransport in Muskel- und Fettzellen (Chen et al., 2004).

Mäuse mit einer gezielten Hemmung der Expression der p85 α -Untereinheit zeigen eine Blockierung der B-Zell-Entwicklung in einer pro-B-Zell-Phase, sowie eine reduzierte Anzahl reifer B-Zellen, peritoneale CD5⁺ Ly-1 B-Zellen, reduzierte Proliferation von B-Zellen und keine T-Zell unabhängige Antikörperproduktion. Dieser Phänotyp ist fast identisch mit dem von Btk^{-/-} oder xid (*X-linked Immunodeficiency*) Mäusen, was zeigt dass p85 α eine wichtige Rolle in der Btk Signalkaskade spielt und eine Schlüsselrolle in der B-Zell-Entwicklung und Funktion einnimmt (Fruman et al., 1999; Suzuki et al., 1999). Außerdem, können die SH3- und BH-Domänen der regulatorischen Untereinheit spezielle Aufgaben für das Signaling in hämatopoetischen Zellen haben (Wymann und Pirola, 1998).

Hemmung der Expression der regulatorischen Untereinheit führt zu reduzierter Proliferation von Makrophagen nach Stimulation mit M-CSF und GM-CSF. Verlust der p85 regulatorischen Untereinheit war assoziiert mit reduzierter Aktivität von Akt und Rac (Munugalavadla et al., 2005).

Während in normalen Zellen die regulatorische Untereinheit im Überschuss gegenüber der katalytischen Untereinheit exprimiert wird (Ueki et al., 2002), werden in embryonalen Mausstammzellen keine freien, monomeren, regulatorischen Untereinheiten gefunden. Ausschaltung der p85-Expression führt zu verminderter Akt-Aktivität, verlangsamtem Wachstum, erhöhter Apoptoserate und gestörter Zellzyklusregulation mit

G0/G1 Zellzyklusarrest. Wiederexpression von p85 α machte diese Wirkungen rückläufig (Hallmann et al., 2002).

Ausschaltung der p85-Untereinheit führt zu weniger hämatopoetischen Progenitorzellen in Mäuseembryos. Hämatopoetische Stammzellen zeigten eine geringere Fähigkeit sich zu vermehren und c-kit⁺ Zellen eine geringere Proliferation nach Stimulation mit kit-Liganden (Haneline et al., 2006).

Verlust eines p85 α -Allels führt zu erhöhter Inzidenz intestinaler Polypen und in diesen Zellen ist die PI3K-Signalkaskade verstärkt aktiv (Luo et al., 2005b).

Reduzierung der p85 α -Menge durch Ausschaltung eines für die Expression von p85 α zuständigen Allels führt zu einer verstärkten Akt-Aktivierung nach Insulinstimulation, erhöhten Insulinsensitivität und Glukosetoleranz. Desweiteren schützt es die Tiere vor der Entwicklung eines Diabetes (Mauvais-Jarvis et al., 2001).

Es wurden Unterschiede nach Ausschaltung der für die Expression von p85 α und p85 β zuständigen Gene festgestellt (Ueki et al., 2003). Nach Hemmung der Expression der p85 α -Untereinheit konnte eine 60%-ige Reduzierung der p85-Menge, sowie eine Reduzierung der p110-Menge, PI3K Aktivität und Akt Aktivität beobachtet werden. Dies führte zu einer verminderten Glukoseaufnahme in den Zellen und einer stärkeren Apoptoserate. Nach Hemmung der Expression der p85 β -Untereinheit konnte nur eine 25%-ige Reduzierung der p85-Menge, und keine Reduzierung der p110-Menge und PI3K Aktivität beobachtet werden (Ueki et al., 2003).

Mäuse mit gezielter Ausschaltung der p85-Untereinheit in Muskelzellen zeigen verminderte Akt-Aktivität, die mit verringerter Herzgröße, veränderter Genexpression am Herzen und gestörter physiologischer Herzhypertrophie einhergeht (Luo et al., 2005a).

2.9.2.2. Überexpression der regulatorischen Untereinheit

Überexpression einer mutierten p85-Untereinheit, die nicht an der p110 katalytischen Untereinheit bindet, führt zur verminderten PI3K Aktivität und Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation (Hara et al., 1994). Überexpression der p85 α

und p55 α -Untereinheit führt zu einer Reduzierung der PI3K Aktivität und Hemmung der Aktivierung von zwei Effektoren der PI3K, Akt und p70 S6Kinase (Ueki et al., 2000). Sowohl Überexpression der p85-Untereinheit als auch der mutierten p85-Untereinheit, die nicht an der p110 katalytischen Untereinheit bindet, führt zur Hemmung der PI3K nach Stimulation durch Ras (Rodriguez-Viciano et al., 1997).

Die Behandlung mit Dexamethason führte zu einer 300%-igen Überexpression von p85 α , während die p110 katalytische Untereinheit nur zu 38% überexprimiert wurde und die Expression der p85 β -Untereinheit abnahm. Stimulation dieser Zellen mit Insulin führte zu einer um 50% schwächeren Aktivierung der PI3K (Giorgino et al., 1997).

2.10. Mutationen der PI3K und Neoplasien

Überaktivierung der PI3K Signalkaskade spielt eine Rolle in der Entstehung einer Vielzahl menschlicher Tumoren (s. auch oben) (Cantley, 2002). ASV16 (*avian sarcoma virus 16*) kodiert für das Onkogen v-p3k, welches ein potentes transformierendes Gen in Fibroblasten von Hühnerembryonen ist. Das Onkogen stammt von dem für die p110 α -Untereinheit kodierenden Gen (Chang et al., 1997). Auch das Akt-Gen wurde als ein Onkogen identifiziert (Staal und Hartley, 1988a).

2.10.1. Die PI3K-Aktivität in Neoplasien

Der PI3K Signalweg beeinflusst die Entstehung der ATLL (*adult T cell leukemia and lymphoma*), eine der aggressivsten Neoplasien. Sowohl die PI3K- als auch die PTEN-Aktivität zeigten eine Korrelation mit der Zellproliferation (Fukuda et al., 2005). Konstitutive Aktivierung der PI3K wird bei AML-Patienten beobachtet und die PI3K-Aktivität ist hierbei von prognostischer Bedeutung (Xu et al., 2003; Min et al., 2003). 50-70% der AML Patienten zeigen eine konstitutive Phosphorylierung von Akt sowohl an Thr308 als auch an Ser473 (Martelli et al., 2006). Besonders die p110 δ -Isoform zeigt eine starke Aktivierung bei AML (Sujobert et al., 2005). Die für CML charakteristische BCR/ABL Tyrosinkinase aktiviert ebenfalls die PI3K (Skorski et al., 1995). Das PI3K /

PTEN Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle für die durch NK-Zellen gewährleistete Schutzfunktion gegen Lungenmetastasierung vom Melanom (Kishimoto et al., 2007). Eine erhöhte PI3K-Aktivität wurde in 32 von 37 (86%) kolorektalen Tumoren festgestellt (Phillips et al., 1998). Benistant et al. beobachteten eine erhöhte Aktivität von p110 α und p110 β in 7 von 10 (70%) kolorektalen Tumoren, mehreren Adenokarzinom-Zelllinien (CaCo2, CO115, HCT 116, LS 174T und WiDr) und 8 von 9 (89%) Harnblasentumoren, wobei bei einem Harnblasentumor die Aktivität auf das 18-fache gestiegen war (Benistant et al., 2000). Auch Mammatumoren zeigen eine erhöhte PI3K Aktivität, die mit verstärkter Metastasierung und schlechterer Prognose assoziiert ist (Pérez-Tenorio und Stål, 2002).

2.10.2. Mutationen der Proteine der PI3K Signalkaskade bei Neoplasien

In verschiedenen Tumoren wurden Mutationen in den Genen gefunden, die für die katalytische und regulatorische Untereinheit der PI3K oder weitere Moleküle der PI3K Signalkaskade kodieren. (Tab. 4).

2.10.2.1. Mutationen der katalytischen Untereinheit

Mutationen der katalytischen Untereinheit wurden in einer Vielzahl von Tumoren gefunden, wobei die Prävalenz von Studie zu Studie abweicht. Mutationen wurden häufiger in hepatozellulären Karzinomen (36%), kolorektalen Tumoren (32%), Mammakarzinomen (8 - 40%), Gehirntumoren (27%), Magenkarzinomen (6 - 25%), Schilddrüsentumoren (5 – 25%, abhängig von der Morphoplogie), Ovarialtumoren (6 – 12%) und seltener in nicht kleinzelligen Lungentumoren (1,3%), sowie akuten Leukämien (1 von 88 / 1,1%) gefunden. Weitere Mutationen wurden in Zervixtumoren gefunden (Shayesteh et al., 1999; Ma et al., 2000; Samuels et al., 2004a und 2004b; Campbell et al., 2004; Lee et al., 2005, Wu et al., 2005; Levine et al., 2005; Saal et al., 2005). Während Campbell et al. keine Korrelation zwischen Genmutation und Prognose, Histologie, Östrogen-, Progesteron-rezeptorexpression, Her2/neu Rezeptorstatus, Lymphknotenmetastasierung, Grad und Stadium des Mammakarzinoms fanden, wurde von Saal et al., eine Korrelation zwischen

2. Einleitung

Genmutation und Lymphknotenmetastasierung, Östrogen-, Progesteronrezeptor-expression und Her2/neu Rezeptorstatus fanden (Campbell et al., 2004, Saal et al., 2005).

Molekül	Häufigkeit	Erkrankungen / Jahr (USA)	Tumorlokalisation
PI3K			
PIK3CA (p110α)	40%	16,480	Endometrium
	20-40%	30,000-60,000	Kolon
	30%	64,000	Mamma
	5-15%		Kopf, Hals, Ösophagus
	<5%	1,000	seröse epitheliale Ovarialtumoren
PIK3CB (p110β)	5%	1,000	seröse epitheliale Ovarialtumoren
	5%	13,000	Mamma
p85	selten		Ovar, Kolon, Gliom
Akt / PTEN / PDK1			
Akt1	8%	17,100	Mamma
	6%	9,000	kolorektal
	2%	400	Ovar
Akt2	selten		Ovar, Pankreas, Mamma
PTEN	>50%		Gliom, Melanom, Prostata, Endometrium, endometroide Ovarialtumoren
	>50%	85,000	Mamma, Leukämie
PDK1	20%	21,000	Mamma
Aktivatoren der Kaskade			
EGFRvIII	>80%		Gliom
	>50%	107,320	Mamma
	40%	69,800	nicht-kleinzelliger Lungenkarzinom
EGFR	10%	17,400	Lunge
Her2	variabel		Mamma, Kolon, Kopf und Hals
	10-20%	21,500-43,000	Mamma
	8%	1,600	Ovarialkarzinom hohen Grades
BCR/ABL	<10%	<17,500	Lunge
	>90%	>4,050	CML
	>80%		GIST
Kit	12%		Keimzelltumoren
	variabel		Sarkome
Ras	70-90%	23,650-30,400	Pankreas
	35%	56,000	Lunge
	<5%	10,700	Mamma
	30%		AML
	55%		Schilddrüse
	15%		Melanom

Molekül	Häufigkeit	Erkrankungen / Jahr (USA)	Tumorlokalisation
Aktivatoren der Kaskade			
PDGFR	selten		GIST
	>80%		Dermatofibrosarkoma protuberans
Met	10%	17,400	Lunge
	10%	14,900	Kolorektal
	27%		Kopf, Hals
FLT3	20-25%		AML
Östrogenrezeptor	60-70%	128,000-150,000	Mamma
Effektoren von P-Akt			
Forkhead Familie	>50%		alveoläres Rhabdomyosarkom
	niedrig		akute Leukämie
Ikb1	30%	52,300	Lunge
p70S6Kinase	<30%	64,000	Mamma
tcl1	Unklar		T-Zell-, chronische lymphatische Leukämie
TSC1 / 2	<5%		Nierenzellkarzinom

Tab. 4: Mutationen in Molekülen der PI3K Signalkaskade, die gehäuft in Tumoren auftreten (Brugge et al., 2007)

Der größte Teil dieser Mutationen (80%) befindet sich an zwei Stellen, die helicale Domäne (47%) und die Kinase-Domäne (33%). Weitere 8% befinden sich in der p85-Bindungsdomäne (Samuels et al., 2004a und 2004b). Die drei am häufigsten vorkommenden Mutationen E542K, E545K, und H1047R führen zu einer onkogenetischen Transformation der Zellen. Zellen, die durch diese Mutationen transformiert sind, zeigen konstitutive Aktivierung von PI3K, Akt, p70 S6Kinase und 4E-BP1 (Kang et al., 2005).

2.10.2.2. Mutationen der regulatorischen Untereinheit

Auch die regulatorische Untereinheit der PI3K zeigt in Tumoren verschiedene Mutationen. Mutationen im Exon 13 wurden in drei von dreizehn Zelllinien aus Kolontumoren und in einer von zwei Zelllinien aus Ovarialtumoren nachgewiesen. In drei von achtzig primären Ovarialkarzinomen und einem von sechszig primären

Kolonkarzinomen wurden Mutationen im Exon 12 oder 13 der regulatorischen Untereinheit gefunden (Philp et al., 2001). Es wurden auch drei Mutanten der regulatorischen Untereinheit beschrieben, die kürzer als das wildtyp Protein sind (siehe auch unten) (Jücker et al., 2002; Jimenez et al., 1998; Shi et al., 2006).

Viele Moleküle in der PI3K / Akt Signalkaskade zeigen Mutationen in unterschiedlichen Tumoren (Brugge et al., 2007).

2.11. Darstellung der Versuche

Eine Fehlregulation der PI3K und der damit verbundenen konstitutiven Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signalwege wird, wie oben beschrieben, in vielen menschlichen Tumoren und Leukämien beobachtet. Die Erforschung der molekularen Ursachen dieser Fehlregulation ist die Grundlage für die Entwicklung neuer Inhibitoren, Ansätzen und Mechanismen, die dann für eine spezifische Tumorthherapie eingesetzt werden können.

2.11.1. Untersuchungen an der Cole Zelllinie

Die humane hämatopoetische Zelllinie Cole wurde von einer Patientin etabliert, die an einem Hodgkin Lymphom erkrankt war (Jones et al., 1985). Das Hodgkin-Lymphom, oder auch Lymphgranulomatose genannt, ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, an der jährlich etwa 7.350 Menschen in den USA erkranken (Jemal et al., 2006). Die Krankheit ist charakterisiert durch die Reed-Sternberg Zellen, die dann besonders in Entzündungsbereichen vorkommen. Die Reed-Sternberg Zellen sind monoklonale lymphoide Zellen (meistens B-Zellen) (Küppers 2009). Das Epstein-Barr-Virus kann eine Rolle in der Pathogenese von mindestens einigen Subtypen vom Hodgkin-Lymphom spielen (Harris, 1999). Die meisten Patienten sind zwischen 15 und 30 Jahre oder über 55 Jahre alt (Ekstrand und Horning, 2002).

In der Zelllinie Cole wurde eine mutierte Form der p85 α -Untereinheit der PI3K nachgewiesen, kloniert und charakterisiert (Jücker et al., 2002). Bei der Mutation im p85 α -

2. Einleitung

Gen handelt es sich um die Deletion der Adenosinbase an Position 1907. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens nach der Aminosäure 635, sodass 25 neue Aminosäuren kodiert werden, bevor das Auftreten eines Stop-Codons zur Entstehung eines trunkierten p85 α -Proteins führt. Dieses 76 kDa große Protein (wird deshalb p76 α genannt) hat nur 635 von 724 Aminosäuren des Wildtyp p85 α -Proteins und es fehlt fast die ganze c-terminale SH2-Domäne (Abb. 11). P76 α bindet an der p110 katalytischen Untereinheit, die in Cole Zellen konstitutiv aktiviert ist (Jücker et al., 2002).

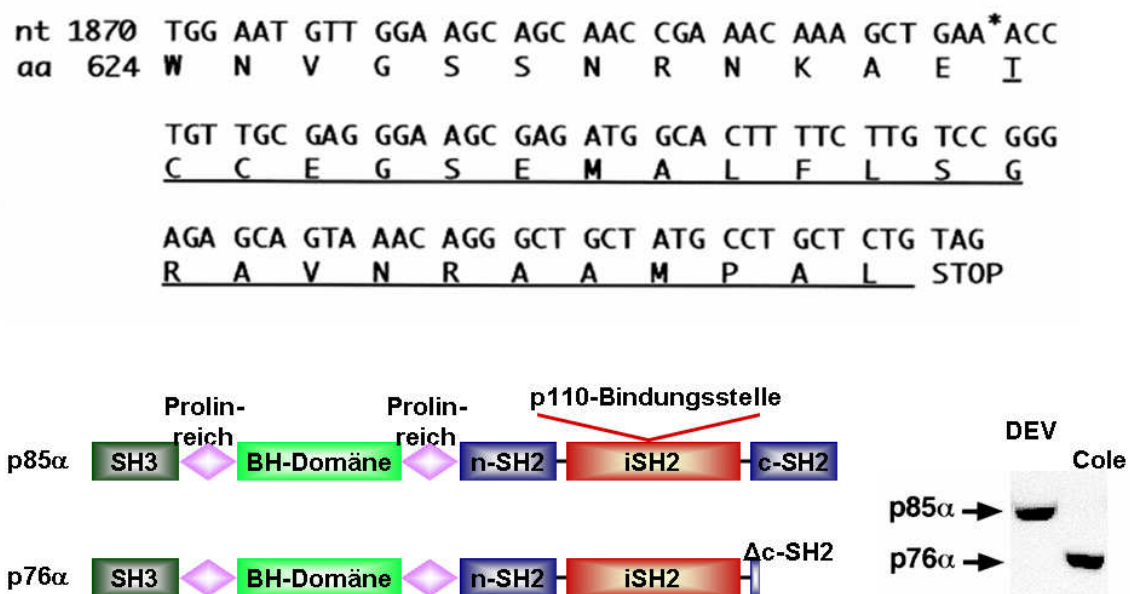


Abb. 11: Schematische Darstellung der Mutation und des mutierten p76 α -Proteins. An der mit (*) markierten Stelle fehlt die deletierte Base Adenin. Den darauf folgenden 25 neuen Aminosäuren folgt ein Stop-Codon. Dadurch fehlt dem mutierten p76 α -Protein fast die ganze c-terminale SH2-Domäne. In Cole Zellen kann nur das mutierte p76 α -Protein gefunden werden, während in den Kontroll-DEV-Zellen das Wildtyp-p85 α -Protein exprimiert wird (adaptiert von Jücker et al., 2002).

Es sollte untersucht werden, ob das exogen zugeführte wildtyp p85 α -Gen in Cole Zellen exprimiert wird und ob dadurch die Wirkung der p85 α / PI3K-Mutante in Cole Zellen aufgehoben werden kann.

Die c-terminale SH2-Domäne beinhaltet neben ihren Bindungseigenschaften für tyrosinphosphorylierte Proteine auch noch eine regulatorische Domäne, die die PI3K

negativ reguliert und deren inhibitorische Funktion für eine Aktivierung der PI3K aufgehoben werden muss. Ein Modell wurde beschrieben, wonach zur Aktivierung der PI3K über die regulatorische Untereinheit zwei Ereignisse stattfinden müssen: kleine GTPasen der Ras-Familie (Rac1, Cdc42) binden an der regulatorischen Untereinheit und gleichzeitig wird der Tyrosinrest 688 an der c-SH2-Domäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu Konformationsänderungen der regulatorischen Untereinheit, dadurch zur Aufhebung der Inhibition der katalytischen Untereinheit durch die c-SH2-Domäne und somit zur Aktivierung der PI3K (Chan et al., 2002). Der Wegfall der c-terminalen SH2-Domäne in der p85 α / PI3K-Mutante könnte zu der konstitutiven Aktivierung der PI3K führen, die in Cole Zellen beobachtet wurde. Ein anderer Mechanismus, wie der Wegfall der c-SH2-Domäne in Cole-Zellen zu einer Aktivierung der PI3K / Akt Signalkaskade führen könnte, ist wie folgt: in Mäusen wurde beobachtet, dass die p85 α -Untereinheit mit ihrer c-SH2-Domäne an der Phosphatase SHIP binden kann (Gupta et al., 1999). Es ist möglich, dass p85 α im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus, Phosphatasen wie SHIP aktivieren kann. Dies würde zu einer Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ und zur Unterbrechung der PI3K / Akt-Signalkaskade führen. Durch das Fehlen der c-SH2-Domäne in der p76 α -Untereinheit in Cole Zellen, könnte so ein negativer Feed-back-Mechanismus teilweise ausfallen, und damit die PI3K / Akt Signalkaskade verstärkt aktiv sein. Eine Interaktion der regulatorischen Untereinheit der PI3K mit der Phosphatase PTEN wurde ebenfalls beschrieben (Geering et al., 2007).

2.11.2. Untersuchungen an der NIH3T3 Zelllinie

Weitere mutierte Formen der regulatorischen Untereinheit der PI3K wurden beschrieben, die kürzer als das Wildtyp-Protein sind. In der Kolonkarzinom-Zelllinie HCC2998 werden aufgrund von zwei Punktmutationen in den Allelen des p85 α -Gens nur regulatorische Untereinheiten mit Größen von 50 und 76 kDa exprimiert (Shi et al., 2006). Es ist aber nicht klar, ob und was für eine Rolle diese Mutanten in den Zellen spielen.

Eine weitere p85 α -Mutante wurde in der Thymus-Lymphom-Zelllinie CMN5, etabliert von Mäusen nach Bestrahlung, gefunden. Diese Zellen exprimieren nur ein 65

kDa großes Protein (p65 α), das an die katalytische p110-Untereinheit binden kann (Jimenez et al., 1998). Auch in dieser Zelllinie wird kein Wildtyp-Allel gefunden. Der p65 α -Untereinheit fehlt die ganze c-terminale SH2-Domäne. Sie zeigt eine stärkere Aktivität als das wildtyp Protein sowohl in einem unstimulierten, als auch in einem stimulierten Zustand. Während in einem unstimulierten Zustand der Unterschied gering ist, führt die Bindung von Ras an p65/p110-PI3K zu einer sehr viel stärkeren Aktivierung als bei p85/p110-PI3K (Jimenez et al., 1998; Jimenez et al., 2002). Dies könnte Folge des Wegfalls einer Inhibitionsfunktion der c-terminalen SH2-Domäne im mutierten p65 α -Protein sein. Nach einer gleichzeitigen Aktivierung durch Ras und phosphorylierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, ist der Aktivierungszustand von dem mutierten und wildtyp Protein wieder ähnlich, im Einklang mit dem Erklärungsmodell von Chan et al., 2002. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die p65 α -Untereinheit zu einer stärkeren und länger andauernden Aktivierung der PI3K führt (Jimenez et al., 2002).

In dieser Arbeit sollte weiter der direkte Einfluss der p76 α / PI3K-Mutante auf die Regulation der PI3K-Aktivität und auf das Wachstum von Zellen untersucht werden. Zunächst sollte untersucht werden, ob das mutierte p85 α -Gen nach Transduktion in murine NIH3T3 Zellen exprimiert wird und ob diese Expression zu einer erhöhten und länger andauernden PI3K-Aktivierung in diesen Zellen führt.

2.11.3. Untersuchungen an CD34⁺ Zellen

Gleichzeitig sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Expression des mutierten bzw. wildtyp p85 α -Gens in humanen primären hämatopoetischen CD34⁺ Zellen hat. CD34 ist ein Zellmarker, der auf der Oberfläche von sehr unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und deren Expression mit Reifung der Zellen abnimmt. Die p85 α regulatorische Untereinheit ist ein wichtiger Regulator der Funktion von hämatopoetischen Maus-Stammzellen *in vivo* und spielt unter anderem auch eine Rolle in der B-Zell-Entwicklung, Erythropoese, sowie M-CSF- und GM-CSF-abhängigen Makrophagenproliferation (Fruman et al., 1999; Huddleston et al., 2003; Munugalavadla et al., 2005; Haneline et al., 2006). CD34⁺ Zellen sollten aus Nabelschnurblut gesunder Spender

gewonnen werden und die Auswirkung der Expression des mutierten (p76 α -) und Wiltyp-p85 α -Gens auf die GM-CSF-Stimulation sollte untersucht werden. GM-CSF ist ein wichtiger Wachstumsfaktor der Hämatopoese und reguliert die Reifung, Proliferation und Differenzierung der CD34⁺-Zellen zu neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Megakaryozyten (Abb.12).

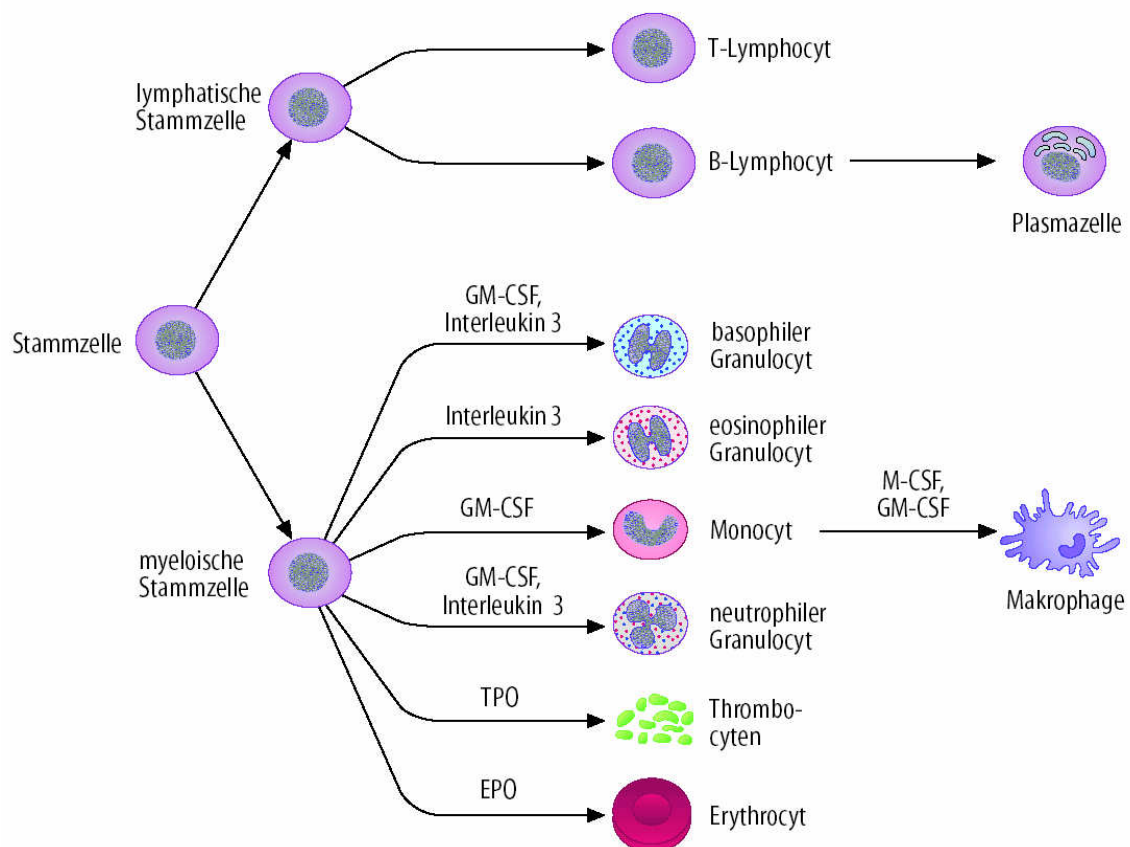


Abb. 12: Schematische Darstellung der Hämatopoese (nach Löffler / Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 6. Auflage).

Es wurde beobachtet, dass GM-CSF ein Wachstumsfaktor für leukämische Zellen aus Patienten mit AML (akute myeloische Leukämie) und JMML (juvenile myelomonozytäre Leukämie) ist (Young und Griffin, 1986; Emanuel et al., 1991). Eine Stimulation des GM-CSF-Rezeptors führt zur Aktivierung von Shc, das seinerseits Grb2 aktiviert. Grb2 bindet und aktiviert Gab-2 und SOS. An Gab-2 kann die p85 regulatorische

2. Einleitung

Untereinheit der PI3K binden, während an SOS das Ras-Protein (ein weiterer PI3K-Aktivator) binden kann (Gu et al., 2000) (Abb. 13).

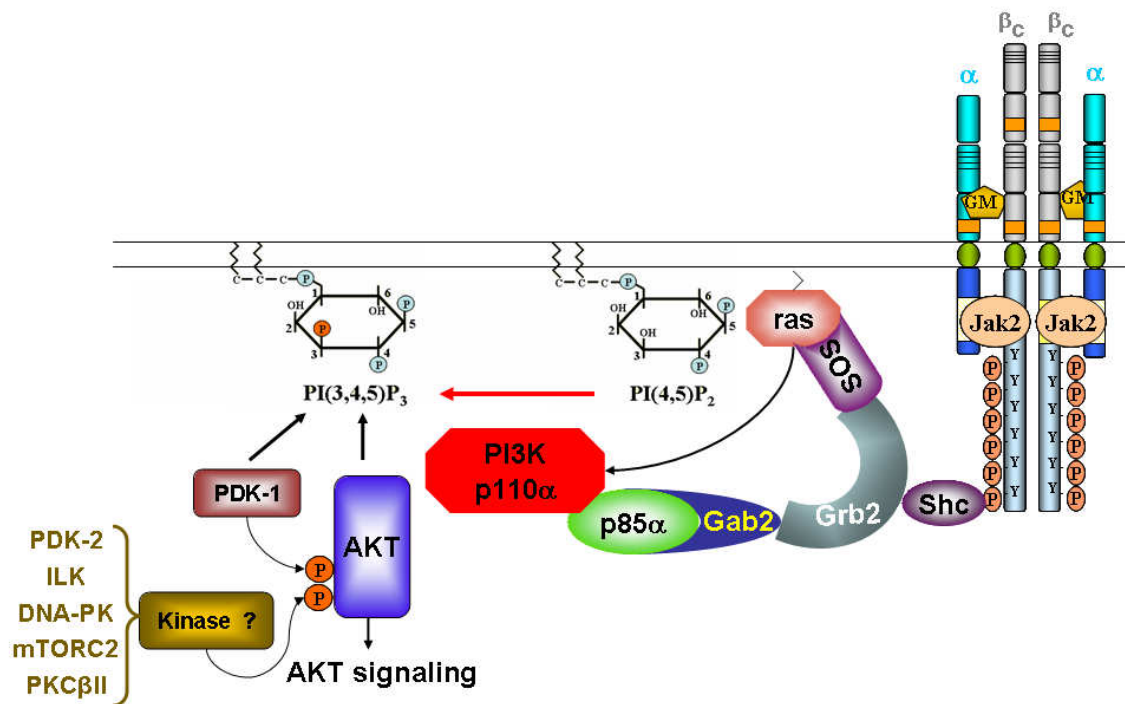


Abb. 13: Aktivierung der PI3K / Akt Signalkaskade durch GM-CSF (adaptiert von Cully et al., 2006 und Gu et al., 2000).

2.11.4. Weitere Untersuchungen

Als letztes sollten die Effekte der p85 α -Überexpression in anderen Zelllinien untersucht werden. Dafür sollten die humane 293gp (HEK293) Zelllinie, sowie die humanen Leukämie-Zelllinien Eol1, Jurkat, MV4-11, K562, Kasumi1 und die murine Leukämie-Zelllinie M1 untersucht werden. Diese Zelllinien beinhalten Mutationen, die häufig in menschlichen Leukämien vorkommen (s. a. 3.1.6.1.). Hier sollte festgestellt werden, in welchem Maße die Proliferation dieser Zelllinien PI3K-abhängig ist. Dann sollten die Überexpressionsmuster von p85 α , sowie die Auswirkungen dieser Überexpression auf die PI3K-Aktivität und Proliferation dieser Zelllinien untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Chemikalien

Soweit es nicht anders angegeben wird, wurden 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). Sämtliche Materialien für die Zellkultur wie Kulturmedien, fötales Kälberserum und weitere Medienzusätze wurden bei GibcoBRL (Eggenstein) und Invitrogen gekauft.

3.1.2. Puffer und Stammlösungen

LB-Medium:	1% Trypton
(<i>Lysogeny broth</i>)	0,5% Hefeextrakt
	1% NaCl
	pH 7,0 mit 1 M NaOH eingestellt

1x PBS pH 7,4:	137 mM NaCl
(<i>Phosphate buffered saline</i>)	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
(<i>Tris-buffered saline</i>)	0,1 M Tris-HCl pH 8,0

NP40-Lysepuffer:	50 mM Hepes pH 7,5 <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure</i> 150 mM NaCl 1% NP40 Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonident P 40) 2% Trasylol® 2 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) 50 mM NaF 10 mM NaPyrophosphat 10% Glycerin 1 mM Natriumorthovanadat 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)
1x TAE: (Tris-Acid-EDTA)	40 mM Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol) 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0 (Ethyldiamintetraessigsäure)
TE pH 7,5: (Tris-EDTA)	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0 (Ethyldiamintetraessigsäure)
1x Protein-Ladepuffer : (für PAGE) (Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese)	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 3% SDS (Sodiumdodecylsulfat) 10% Glycerol 0,01% Bromphenolblau
3x Protein-Ladepuffer:	180 mM Tris-HCl pH 6,8

(für PAGE)	6% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
(Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)	30% Glycerol
	0,01% Bromphenolblau
10x Laufpuffer:	144 g Glycin
(für PAGE)	30 g Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)
(Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)	
Transferpuffer:	1x Laufpuffer
(für Western Blot)	1/5 Volumen Methanol
	1% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
20x MOPS- Puffer:	1 M MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure)
(für Westen Blot)	1 M Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
	3 M SDS (Sodiumdodecylsulfat)
	0,5 M EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
1x DNA-Ladepuffer	5% Glycerin
(für Gelelektrophorese)	166,7 µM EDTA pH 8,0 (Ethyldiamintetraessigsäure)
	0,025% Bromphenolblau
	0,025% Xylencyanol
Für CD34 ⁺ -Aufreinigung:	2% FCS (fötales Kälberserum)
„Recommended Medium“	1 mM EDTA in PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>)

3.1.3. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den Experimenten verwendet (in Klammern ist jeweils die Verdünnung, in welcher der Antikörper in der Westernblotanalyse eingesetzt wurde, angegeben):

3.1.3.1. Primäre Antikörper

- *Anti-P-Akt (193H12)* (1:1000), Cell Signaling (Cell Signaling, MA, USA) #4058, monoklonaler Kaninchen-Antikörper IgG, der gegen Akt gerichtet ist, das am Serinrest 473 phosphoryliert ist.
- *Anti-P-Akt-Alexa-Fluor[®] 647 (193H12)* (1:1000), Cell Signaling (Cell Signaling, MA, USA) #2337, monoklonaler Kaninchen-Antikörper IgG, der gegen Akt gerichtet ist, das am Serinrest 473 phosphoryliert ist. Dieser Antikörper ist direkt mit Alexa-Fluor[®] 647 gekoppelt.
- *Anti-Akt1 (B-1)* (1:200), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-5298, monoklonaler Maus-Antikörper IgG₁, der gegen den Aminosäureresten 345-480 von Akt1 gerichtet ist.
- *Anti-p85 α -PI3K* (1:500), Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) #05-217, monoklonaler Maus-Antikörper IgG, der den n-terminalen Bereich (Aminosäuren 327-434) der regulatorischen Untereinheit der PI3K (p85 α und p76 α) erkennt.
- *Anti-P110-PI3K (D-4)* (1:200), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-8010, monoklonaler Maus-Antikörper IgG_{2 α} , der gegen die Aminosäurereste 800-1039 der katalytischen Untereinheit der PI3K (alle Isoformen der p110-PI3K) gerichtet ist.

- *Anti-P-Tyr (PY99)* (1:1000), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-7020, monoklonaler Maus-Antikörper IgG₂, der gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichtet ist.
- *Anti-GFP* (1:1000), Roche Applied Science (Mannheim), #11 814 460 001, Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern IgG₁, die gegen GFP (*green fluorescent protein*) gerichtet sind.
- *Anti-GAPDH (6C5)* (1:3000), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-32233, monoklonaler Maus-Antikörper IgG₁, der gegen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) gerichtet ist, zum Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen am Beispiel der GAPDH.
- *ERK-1 (K-23)* (1:2000), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-94, polyklonaler Kaninchen-Antikörper IgG, der gegen ERK1 und ERK2 (*extracellular regulated kinase 1 und 2*) gerichtet ist, zum Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen am Beispiel der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2.

3.1.3.2. Sekundäre Antikörper

- *Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-HRP* (1:5000), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-2004, Ziegen-Sekundärantikörper IgG, der gegen Kaninchen-Epitope gerichtet ist, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.
- *Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP* (1:5000), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) #sc-2055, Ziegen-Sekundärantikörper IgG, der gegen Maus-Epitope gerichtet ist, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.

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 Vektoren eingesetzte alkalische Phosphatase.

3.1.5. Bakterienstämme

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

3.1.6. Zellen

3.1.6.1. Zelllinien

- *Phoenix-293-gp Zellen* (auch HEK293 genannt): etabliert aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293).

Die 293-gp Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die durch den Adenovirus E1A transformiert wurden. Diese Zellen beinhalten ein gag-pol-Element (Mulligan, 1993) und wurden für die Produktion retroviraler Überstände (amphotrop-, ecotrop-, GALV-, RD114-pseudotypisierte Retroviren) verwendet. Diese Helferzelllinie wurde freundlicherweise von Dr. G. Nolan (Stanford University) zur Verfügung gestellt.

- *NIH3T3-Zellen*: aus embryonalen Mäusefibroblasten abgeleitet.

Bei den NIH3T3-Zellen handelt es sich um immortalisierte embryonale Mäusefibroblasten (Jainchill et al., 1969), die als Monolayer wachsen. Diese Zelllinie wurde vom ATCC (*American Type Culture Collection*) erhalten.

- *PG13*: aus der NIH3T3-Zelllinie abgeleitet.

Diese Retrovirus-Verpackungszelllinie produziert Retroviren, die das GALV (*gibbon ape leukemia virus*) -Hüllprotein tragen und die Infektion menschlicher Zellen ermöglichen (Miller und Rosman, 1989; Miller et al., 1991). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Boris Fehse (Knochenmarkstransplantationszentrum, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- *HT1080*: humane Fibrosarkom-Zelllinie.

Die aus der Biopsie eines Fibrosarkoms von einem 35-jährigen Patienten etablierte HT1080 Zelllinie (Rasheed et al., 1974) wurde als adhärente Kontrollzelllinie für die retrovirale Infektion mit amphotrop- und RD114-pseudotypisierten Retroviren genutzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- *TE671*: humane Muskelzelllinie.

Die humane Muskelzelllinie TE671, die einer Rhabdomyosarkomzelllinie ähnelt (Stratton et al., 1989), wurde als adhärente Kontrollzelllinie für die retrovirale Infektion mit GALV-pseudotypisierten Retroviren genutzt. Die Zelllinie wurde freundlicherweise

von Dr. Boris Fehse (Knochenmarkstransplantationszentrum, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- *Cole Zelllinie*: humane Zelllinie, abgeleitet von der Hodgkin-Krankheit.

Die Cole Zelllinie entspricht nicht ausdifferenzierten T-Zellen und stammt von einem Patienten, der an der Hodgkin-Krankheit erkrankt war (Jones et al., 1985). In der Cole-Zelllinie wurde eine mutierte Form der p85 α -Untereinheit der PI3K nachgewiesen, kloniert und charakterisiert (Jücker et al., 2002). Bei der Mutation am p85 α -Gen handelt es sich um die Deletion einer Adenosinbase an Position 1907. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserahmens nach der Aminosäure 635, sodass 25 neue Aminosäuren kodiert werden, bevor das Auftreten eines Stop-Codons zur Entstehung eines trunkierten p85 α -Proteins führt. Dieses 76 kDa große Protein (wird deshalb p76 α genannt) hat nur 635 von 724 Aminosäuren des wildtyp p85 α -Proteins und ihm fehlt fast die ganze c-terminale SH2-Domäne. P76 α bindet an der p110 katalytischen Untereinheit, die in Cole Zellen konstitutiv aktiviert ist (Jücker et al., 2002). Die Cole Zellen wurden freundlicherweise von Dr. H. Tesch (Universitätsklinikum Köln) zur Verfügung gestellt.

- *Jurkat SHIP Klon #51* (im Folgenden als Jurkat genannt): humane Zelllinie, aus der Jurkat-T-Zell-Leukämie-Zelllinie abgeleitet.

Diese Zelllinie wurde von Dr. S. Horn aus der Jurkat-T-Zelllinie etabliert, die aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Patienten stammt (Schneider et al., 1977). Die Zelllinie besitzt einen Transaktivator (Jurkat-Tet-On) und durch Zugabe von Doxycyclin kommt es zur Induktion der Expression von SHIP-1. Sie exprimiert große Mengen an (Ser473) P-Akt, es ist aber nicht vollständig klar, welcher Mechanismus und welches Enzym hierbei die primäre Rolle spielt.

- *Kasumi-1*: humane myeloische Zelllinie.

Diese Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankten 7-jährigen Patienten etabliert und zeigt eine t(8;21) chromosomale Translokation. Die Zelllinie zeigt eine myeloische Morphologie (Asou et al., 1991) und eine N822K Mutation im c-kit, die zu einer Aktivierung seiner Tyrosin-Kinase-Aktivität führt. Diese Aktivierung führt unter anderem zur Aktivierung der PI3K und Ser473-Phosphorylierung von Akt (Beghini et al., 2005). Aktivierende Mutationen an dem KIT-Rezeptor können zur Aktivierung von Signalkaskaden führen (z.B. PI3K-Signalkaskade), die Faktor-unabhängiges Wachstum und Tumorentstehung begünstigen (Tsujimura et al., 1999; Hashimoto et al., 2003). PI3K ist eine wichtige Signalkaskade, wodurch c-KIT und ihr Ligand SCF (*stem cell factor*) ihre Wirkung (z. B. Proliferation) entfalten (Serve et al., 1994; Lee et al., 2007). C-KIT Mutationen sind sehr häufig, bis zu 25%, in AML-Patienten anzutreffen (Care et al., 2003; Boissel et al., 2006). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- *MV4-11*: humane Zelllinie aus einer akuten myeloischen Leukämie (AML).

Diese Zelllinie zeigt die t(4;11)(q21;q23) Translokation, die typischerweise in biphenotypischen Leukämien beobachtet wird, wächst auch in Abwesenheit von GM-CSF und wurde aus peripherem Blut eines an einer B-Zell myeloischen Leukämie erkrankten Patienten etabliert (Lange et al., 1987). Die MV4-11 Zelllinie zeigt eine interne Tandemduplikation (*internal tandem duplication*) in dem FLT3-Gen (*fms-like tyrosine kinase*). Diese Mutation ist auf beiden Allelen vorhanden und in MV4-11 Zellen ist nur das mutierte Protein nachweisbar (Quentmeier et al., 2003). Diese Mutation im FLT3-Gen ist bei 20-28% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, sowie seltener bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und myelodysplastischem Syndrom nachweisbar (Gilliland und Griffin, 2002; Whitman et al., 2001). Mutationen im FLT3-Gen sind mit schlechterer Prognose assoziiert und kooperieren mit weiteren

leukämischen Onkogenen für einen aggressiveren Phänotyp. Die in MV4-11 Zellen gefundene interne Tandemduplikation führt zu einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Aktivität des Rezeptors (Gilliland und Griffin, 2002), Aktivierung der PI3K (Scheijen et al., 2004) und eine Ser473-Phosphorylierung von Akt (George et al., 2005). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. Justus Duyster (3. Medizinische Klinik, TUM) zur Verfügung gestellt.

- K562: humane erythroblastische Zelllinie.

Diese Zelllinie wurde von einer Patientin mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) in einer Blastenkrise etabliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Sie besitzt das typische Merkmal einer chronischen myeloischen Leukämie, das Philadelphiachromosom. Das Philadelphiachromosom entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22, t(9;22)(q34;q11). Hierbei wird das ABL Proto-Onkogen, das auf Chromosom 9 lokalisiert ist, mit BCR (*breakpoint cluster region*) auf Chromosom 22 fusioniert (Rowley, 1973; Groffen et al., 1993). BCR-ABL ist in über 95% der CML zu finden (Kurzrock et al., 1988). Das BCR-ABL Protein zeigt eine gesteigerte ABL-Tyrosin-Kinase-Aktivität und beeinflusst die Entstehung von Leukämien (Ilaria und Van Etten, 1995). Das Fusionsprotein führt zu einer Aktivierung der PI3K und Ser473-Phosphorylierung von Akt (George et al., 2005; Tringali et al., 2007). Die von uns verwendeten K562-Zellen zeigten kein Ser473-P-Akt in Western Blot Analysen. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Jutta Friel (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- Eo1-1: humane Zelllinie, abgeleitet von einer eosinophilen Leukämie.

Diese Zelllinie wurde aus peripherem Blut eines an akuter myeloischer (eosinophiler) Leukämie (AML) bei hypereosinophilem Syndrom erkrankten Patienten etabliert (Saito et al., 1985). Cools et al., 2003 beschreiben die Expression eines

Fusionogenes, bestehend aus dem *Fip1-like1-Gen* (FIP1L1) und dem PDGFR α -Gen (PDGFRA) in bis zu 56% der Patienten mit hypereosinophilem Syndrom. Dieses Fusionen entsteht durch eine interstitielle Deletion am Chromosom 4q12. FIP1L1-PDGFR α ist eine konstitutiv aktivierte Tyrosin-Kinase die zu einer Transformierung der hämatopoetischen Zellen führt. Die Eol1 Zelllinie exprimiert das Fusionsprotein FIP1L1-PDGFR α und es werden weder das wildtyp FIP1L1, noch das wildtyp PDGFR α gefunden (Cools et al., 2004). Das FIP1L1-PDGFR α Protein ist kein Membran-gebundenes Protein (wie PDGFR α), es ist aber konstitutiv aktiv (Gotlib et al., 2004). Der Mechanismus der konstitutiven Aktivierung ist nicht vollständig aufgeklärt, denkbar wäre aber, dass das FIP1L1-Protein zur Dimerisierung und damit Autophosphorylierung des Proteins führt. Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus der Beobachtung, dass durch die Fusion, das PDGFR α Protein die juxtamembranöse Domäne teilweise verliert. Es ist bekannt, dass ein Verlust dieser Domäne zu einer konstitutiven Aktivierung der entsprechenden Kinase führt (Gilliland et al., 2002; Hirota et al., 1998). Von Stover et al., 2006 wird beschrieben, dass nur dieser zweite Weg für die Aktivierung der Kinase eine Rolle spielt. PDGFR α ist ein Aktivator der PI3K und in Eol1-Zellen ist eine Ser473-Phosphorylierung von Akt vorhanden (Bäumer et al., 2007; Li et al., 2004). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. Justus Duyster (3. Medizinische Klinik, TUM) zur Verfügung gestellt.

- *M1*: Mauszelllinie, abgeleitet aus einer akuten myeloischen Leukämie (AML).

Zur Etablierung der Zelllinie wurde Knochenmark von einer an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankten Maus entnommen und in eine isogenische Maus implantiert. Aus den daraus entstandenen hyperplastischen Lymphknoten wurden Zellen isoliert und in Softagar kultiviert (Ichikawa, 1969). Diese Zellen exprimieren kein Tumorsuppressorgen p53 und lassen sich mit IL6 (Interleukin 6) in Wachstumsarrest, terminale Differenzierung zu Makrophagen und Apoptose treiben. Die PI3K ist essentiell für die IL-6 vermittelte Protektion gegen p53-induzierte Apoptose in diesen Zellen und

sie zeigen eine Ser473-Phosphorylierung von Akt (Vesely et al., 2006). Die M1 Zellen wurden untersucht um ein Modell zu etablieren, um die Ergebnisse dieser Arbeit in einem Tiermodell untersuchen zu können. Die trasduzierten M1 Zellen könnten in einer Maus injiziert werden, um eventuell die Wirkungen und Mechanismen der p85 α -Untereinheit *in vivo* untersuchen zu können. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. G. Schuh (Onkologie und Hämatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.6.2. Primäre Zellen

Die Nabelschnurblutproben von gesunden Spendern wurden freundlicherweise von Dr. G. Ortmeyer von der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg zur Verfügung gestellt. Das Leukaphereseprodukt eines Patienten in der Blastenkrise eines myeloproliferativen Syndroms wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W. Fiedler von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus den Blutproben gewonnen (s. 3.2.7.11.).

3.1.7. Nukleinsäuren

3.1.7.1. Vektoren

- *pMigRI*

Beim MigRI handelt es sich um einen retroviralen Vektor von 6,056 kb, der freundlicherweise von Dr. R. Feldmann (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor beinhaltet eine perfekte KOZAK-Sequenz, die die Bindung der mRNA an der kleinen ribosomalen Untereinheit vereinfacht. Der multiplen Klonierungsstelle (MCS,

multiple cloning site: Position 1406 (Bgl 2) bis 1424 (EcoRI); an der EcoRI 1424 Stelle wurden die p85 α - und p76 α -Fragmente hineinkloniert) folgt eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES, *internal ribosom entry side*) vom Encephalomyocarditis-Virus. Durch die IRES wird eine Koexpression des grünfluoreszierenden Proteins (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) ermöglicht.

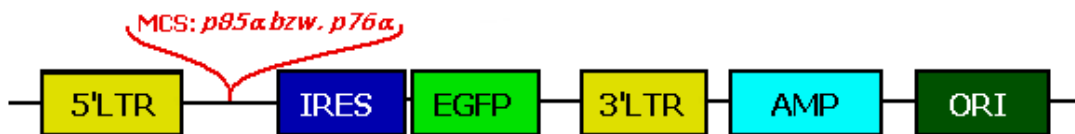


Abb. 14: Schematische Darstellung des linearisierten MigRI-Konstrukts. LTR: *long terminal repeat*, IRES: *internal ribosom entry side*, EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, AMP: Ampicillinresistenz, ORI: *origin of replication*, MCS: *multiple cloning site*.

- pHCMV-VSV-G (M75)

Dieser 6,0 kb große Vektor, der von M. von Laer (Frankfurt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, kodiert für das VSV-G-Protein (*vesicular stomatitis virus - glycoprotein*).

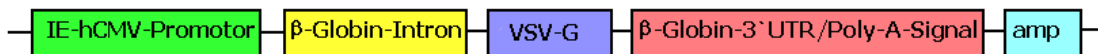


Abb. 15: Schematische Darstellung des linearisierten pHCMV-VSV-G -Konstrukts

- SVgp (M57)

Dieser 10,3 kb große Vektor, der von M. von Laer (Frankfurt) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, kodiert für das gag-pol-Konstrukt, das unter der Kontrolle eines SV40-Promotors liegt.

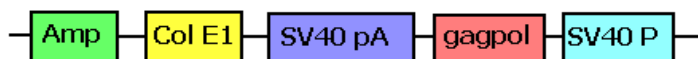


Abb. 16: Schematische Darstellung des linearisierten SVgp -Konstrukts

- *ecoenv-IRES-puro*

Dieser 9,8 kb große Vektor wurde für die ecotrope Pseudotypisierung der Retroviren verwendet und wurde freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.



Abb. 17: Schematische Darstellung des linearisierten *ecoenv-IRES-puro* –Konstrukts

- *pHCMV-A-MLVenv (K25-2)*

Dieser 6,8 kb große Vektor wurde für die amphotrope Pseudotypisierung der Retroviren verwendet und wurde freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

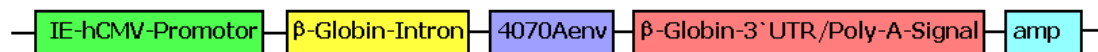


Abb. 18: Schematische Darstellung des linearisierten *pHCMV-A-MLVenv* –Konstrukts

- *GALV*

Der GALV (*Gibbon Ape Leukemia Virus*) Vektor wurde freundlicherweise von Dr. Boris Fehse (Knochenmarkstransplantationszentrum, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt und eignet sich für Pseudotypisierungen zur Transduktion humaner Leukämie-Zellen.

- *RD114*

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von F.-L. Cosset (London, UK) zur Verfügung gestellt und kodiert für ein Glykoprotein eines Katzen-endogenen Virus (RD114). Der Vektor eignet sich für Pseudotypisierungen zur Transduktion humaner hämatopoetischen Zellen.

- *p85 α -Insert*

Die *p85 α* -cDNA wurde freundlicherweise als 2,2 kb großes *EcoRI*-Fragment von PD Dr. Jücker zur Verfügung gestellt.

- *p76 α -Insert*

Die *p76 α* -cDNA mit der Deletion einer Adenosinbase an Position 1907, wurde freundlicherweise als *EcoRI*-Fragment von PD Dr. Jücker zur Verfügung gestellt. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu 25 neuen Aminosäuren-Codons, gefolgt von einem frühzeitigen Stop-Codon.

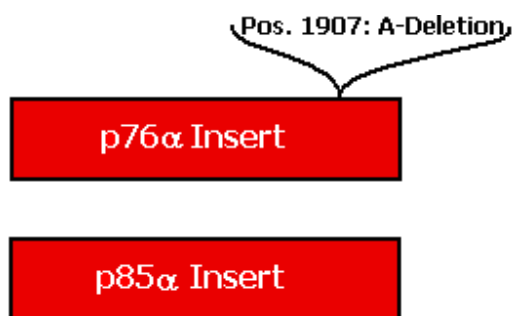


Abb. 19: Schematische Darstellung der *p85 α* - und *76 α* -Inserts

- *pBluescript II SK (+)*

Dieser 3,0 kb Vektor wurde verwendet zur *in-vitro* Transkription der p85 α - und 76 α -Inserts und wurde von PD Dr. E. Mohr (Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.



Abb. 20: Schematische Darstellung des linearisierten pBluescript II SK (+)-Konstrukts

3.1.7.2. DNA-Oligonukleotide

Für die Sequenzierung wurde folgender Primer verwendet:

DNA-Oligonukleotid-Sequenz: 5'→3'

p85#8 Antisense: caagggaggtgtgttggaatgtagc

Der Primer wurde bei MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

3.1.8. Geräte

Bakterienbrutschrank	Memmert (Schwabach)
Bakterienwerkbank	Intermed (Wiesbaden)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Elektrophorese-Kammer (horizontal)	MWG-Biotech
Elektrophorese-Kammer (vertikal)	Protean [®] IxiCell, BioRad
FACSAria	Becton & Dickinson
FACSCalibur	Becton & Dickinson
FACSCantor	Becton & Dickinson
FACSSCAN	Becton & Dickinson
Feinwaage	Sauter (Ebingen)
Flow Titertek [®] Multiskan Plus	ICN
Geldokumentationssystem CF8/1 FMC	Kappa Messtechnik

Heizrührer Typ 50301	Heidolph (Schwabach)
Horizontalschüttler Rocky [®]	Fröbel Labortechnik
Intelligent Dark Box	Fujifilm (Japan)
Luftgeltrockner	Bio Rad
Lyophyllisator: SpeedVac Concentrator	Savant
Mikroskop	Labovert Leitz
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss
Mikroskop Olympus	Japan
PCR-Gerät	Eppendorf
pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH
Power-Pac 1000	Bio Rad, USA
Power Supply EPS200	Amersham Pharmacia Biotech
Rührplatte	Heidolph
Schutron Schnipptherm	MS-Laborgeräte (Heidelberg)
Schüttelinkubator (Bakterien)	HAT Infors AG
Sterilbank	Heraeus HS 12
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Transfer-Kammer	Trans-Blot [®] , Bio Rad, USA
UV-Tisch (312 nm)	Bachofer (Reutlingen)
Vortexer IKAMAG [®] RH	IKA [®] -Labortechnik (USA)
Waage PM2000	Mettler (Giessen)
Wasserbad 1002/1012/1086	GFL (Hannover)
X Cell Sure Lock	Invitrogen
Zellkulturbrutschränke	Heraeus (Hanau)
Zellkulturwerkbank	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 540	Eppendorf
Zentrifuge Sorvall [®] RC-5B	Du Pont Instruments (Frankreich)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Varifuge K	Heraeus

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 Röhrchen	Becton & Dickinson
15 ml-Röhrchen	Falcon
25 ml-Weißkappenröhrchen	Sarstedt

50 ml- Röhrchen	Falcon
Bakterien-Petrischalen	Greiner, Sarstedt
96-Loch-Platten	Greiner
24-Loch-Platten	Greiner
6-Loch-Platten	Greiner
Gewebekulturflaschen T25	Greiner
Gewebekulturflaschen T175	Greiner
Nunc™ Gewebekulturflaschen T250	Nalgene
Nunc™ Plastikampullen	Nalgene
Pipettenspitzen	Sarstedt & Biozyme
SW-40-Polyallomer-Röhrchen	Beckman
0,45 µm- Filter	Pall Gelman Laboratory (Ann Arbor, MI)
Whatman® 3MM-Chromatografiepapier	Schleicher und Schuell
Nitrocellulose Membran (0,45 µm)	Schleicher und Schuell

3.2. Methoden

3.2.1. Bakterienkulturen

3.2.1.1. Wachstum und Vermehrung

Die Bakterienkulturen wurden im LB-Medium angezüchtet. Da alle verwendeten Plasmide ein Ampicillin-Gen besaßen, wurde dem Medium Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugefügt, um die Bakterien, die das gewünschte Plasmid beinhalten, positiv zu selektionieren. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C und unter Schütteln (220 UpM) inkubiert.

Um Bakterienkolonien auf festem Boden anzuzüchten, wurde dem Medium mit Ampicillin-Zusatz, 1,5% Agar zugefügt und Agarplatten in Petrischalen gegossen. Die entsprechenden Bakterien wurden auf die Agarplatten angeimpft und über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.1.2. Anlegen von Glycerolstocks

Die Bakterien wurden in Glycerolstocks bei -80°C gelagert. Dafür wurden einzelne Bakterienklone gepickt und über Nacht in 4 ml Medium (s. 3.2.1) herangezogen. Nach 12-16 Stunden wurde 1 ml Bakterienkultur in Nunc™-Plastikampullen mit Glycerin (Endkonzentration 15%) versetzt und eingefroren.

3.2.1.3. Transformation von Bakterien

100 µl kompetente Bakterien wurden von -80°C auf Eis aufgetaut, 100 pg – 100 ng Plasmid-DNA wurde hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis, erfolgte für 1 min ein Hitzeschock bei 42°C. Danach wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um sicherzustellen, dass einzelne Klone zu picken sind, wurden jeweils 100 µl und 900 µl der Bakterienkultur auf Agarplatten (s. 3.2.1) ausplattiert und über Nacht für 12-16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.2.2. Isolation von Plasmid-DNA

3.2.2.1. Maxi-Präparation

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden). Aus den Agarplatten wurden die einzelnen gewünschten Klone gepickt und in einer 4 ml Kultur für 4 - 8 Stunden bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) angezüchtet. Danach wurden 100 – 200 µl dieser Kultur in 100 – 200 ml LB-Medium (Verdünnung 1:1000) mit Ampicillinzusatz zugegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) für 12-16 Stunden inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Bakterienzellen bei 6000 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer P1 (10

mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Es wurden 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10 mal Invertieren gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit fand die Lyse der Bakterien statt. Anschließend wurden 10 ml 4°C kalter Puffer P3 (3 M KAc pH 5,5) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10 mal Invertieren gemischt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 20000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut bei 20000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden Membrantrümmer, Proteine und genomische DNA aus den Proben entfernt.

Eine Qiagen-Tip-500 Säule wurde mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand aus dem letzten Schritt wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml Puffer QF eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 10,5 ml propan-2-ol gefällt und bei 15000 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 15000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet im Lyophilisator getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen. Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurden durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 bzw. 280 nm (s. 3.2.3.), sowie durch Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5.1.) bestimmt.

3.2.2.2. Mini-Präparation

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden). Aus den Agarplatten wurden einzelne gewünschte Klone gepickt und in einer 4 ml Kultur für 4 - 8 Stunden bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) angezüchtet. Danach wurden 5 µl dieser Kultur in 5 ml LB-Medium (Verdünnung 1:1000) mit Ampicillinzusatz zugegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (300 UpM) für 12-16 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden aus dieser Kultur 4 ml abgenommen und

für 20 sek bei 5000 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl 4°C kalten Puffer P1 (10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mg/ml RNase A) resuspendiert. Es wurden 200 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10 mal Invertieren gemischt und für 5 min bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit fand die Lyse der Bakterien statt. Anschließend wurden 150 µl 4°C kalter Puffer P3 (3 M KAc pH 4,8) dazugegeben, der Ansatz wurde durch 5-10 mal Invertieren gemischt und für 5 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 5000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen. Dadurch wurden Membrantrümmer, Proteine und genomische DNA aus den Proben entfernt. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wurde dann mit 900 µl Ethanol absolut durch Inkubation für 30 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 5000 g für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 500 µl 70%-igem Ethanol 4°C gewaschen und erneut bei 5000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet im Lyophilisator getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Reinheit und Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurden durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 bzw. 280 nm (s. 3.2.3.), sowie durch Agarosegelelektrophorese (s. 3.2.5.1.) bestimmt.

3.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA wurde mittels Spektralphotometer die Extinktion gemessen. Ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz, wurde aus den Extinktionswerten bei 260 nm, unter Berücksichtigung der spezifischen Absorptionskonstante ($1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg/ml}$ doppelsträngige DNA), die Konzentration der DNA berechnet. Um die Verunreinigung mit Protein auszuwerten, wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm berechnet.

3.2.4. Enzymreaktionen von Nukleinsäuren

3.2.4.1. Restriktion von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden bezüglich Reaktionsbedingungen (z. B. Temperatur, Dauer der Reaktion, Pufferreagenzien), in Abhängigkeit des verwendeten Restriktionsenzym, die Angaben des Herstellers befolgt. Die DNA wurde in 20 µl Ansätzen mit dem entsprechenden Puffer (nach Angaben des Herstellers) und einem dreifachen Überschuss an Enzym (3 U / µg DNA) verdaut.

3.2.4.2. Dephosphorylierung von DNA

Bei der Ligierungsreaktion vom Vektor und Insert ist es möglich, dass die zwei Enden eines Vektors sich ligieren, ohne dass der Insert integriert wird. Diese Wiederverknüpfung führt zu geschlossenen Vektoren ohne Inserts. Um den Anteil dieser Reaktion zu minimieren (und dadurch den Anteil der Vektor-DNA, wo der Insert eingebaut wird, zu erhöhen), wurde die linearisierte Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* von MBI Fermentas, St. Leon-Rot) an dem 5'-Ende dephosphoryliert. Dafür wurde die Vektor-DNA (1 – 20 pmol DNA-Termini) mit 1 U Enzym in 1x Dephosphorylierungspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden weitere 1 U Enzym hinzugefügt und 45 min bei 55°C inkubiert.

3.2.4.3. Ligation von DNA

Die Ligation der DNA erfolgte mit dem Enzym T4-DNA-Ligase (von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit den Pufferreagenzien nach Angaben des Herstellers. 50 ng dephosphorylierte Vektor-

DNA wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA-Fragmente und 2 U Ligaseenzym bei 4°C für drei Tage inkubiert.

3.2.5. Gelelektrophorese

3.2.5.1. DNA-Agarosegele

Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte in der horizontalen Gelelektrophorese. Dafür wurden, in Anhängigkeit der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, 0,8% - 1,0% Agarose (von Biozyme) in TAE Laufpuffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60°C, wurden 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und das noch flüssige Gel wurde auf den Gelträger gegossen, wo es nach etwa 30 min erstarrte und für die Elektrophorese eingesetzt werden konnte. Die DNA-Proben wurden in 1x DNA-Ladepuffer aufgenommen und neben dem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Der Längenstandard, mit *Hind* III gespaltene λ -DNA (von MBI Fermentas), wurde kurz vor dem Auftragen für 5 min bei 65°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 – 16 V/cm (Kammer von MWG Biotech; Power Supply EPS200 von Amersham Pharmacia Biotech). Die DNA-Banden fluoreszierten aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids bei 312 nm und wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Gelelektrophorese, wurde die Fluoreszenz der zu messenden DNA-Banden mit der Fluoreszenz der DNA-Banden des mit *Hind* III gespaltene λ -DNA-Längenstandards verglichen. Bei bekannter DNA-Konzentration der Banden des mit *Hind* III gespaltene λ -DNA-Längenstandards konnte die DNA-Konzentration der anderen Banden bestimmt werden.

3.2.5.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

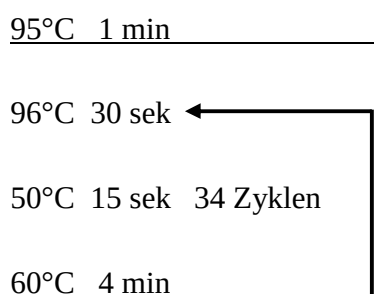
Zur Isolierung der DNA-Fragmente (z.B. nach der Restriktionsreaktion) aus präparativen Agarosegelen wurde der "QIAquick™ Gel Extraction Kit" (von Qiagen) verwendet. Die zu reinigende DNA wurde auf zwei Taschen des präparativen Gels aufgetragen, wobei 90% der DNA in die eine und 10% in die andere Tasche aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel geschnitten und nur die Spur, wo 10% der DNA aufgetragen worden war, wurde auf dem Transilluminator gebracht und unter UV-Licht beobachtet. Dadurch wurde festgestellt bis zu welcher Höhe das gewünschte DNA-Fragment gelaufen war. Auf genau der gleichen Höhe wurde das zu reinigende DNA-Fragment aus der Gelspur herausgeschnitten, wo die restlichen 90% der DNA aufgetragen worden waren. Dadurch wurde verhindert, dass die zu reinigende DNA unter UV-Licht kommt, was möglicherweise zu Schäden in der DNA führt. Das DNA-Fragment wurde dann mit dem dreifachen Volumen QG-Puffer versetzt und zur Auflösung der Agarose für 10 min bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend auf einer „QIAquick“-Säule geladen. Durch 1 min Zentrifugation bei 5000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge, wurde die DNA an die Silicagel-Matrix der Säule gebunden. Das Eluat wurde verworfen und 500 µl QG-Puffer wurden zum Waschen dazu gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 5000 g wurde das Eluat verworfen und 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule 1 min bei 5000 g zentrifugiert, das Eluat verworfen und 50 µl TE-Puffer auf die Säule dazugegeben. Durch Zentrifugation (1 min bei 5000 g) wurde die DNA eluiert.

3.2.6. PCR und Sequenzierung

Zur Sequenzierung im Zyklussequenzierverfahren wurde das "ABY PRISM™ Big Dye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing“-Kit (von Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet. Entsprechend der enzymatischen Sequenzierungsmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) wurden Didesoxynukleotide als Basenanaloga eingesetzt, die zum Abbruch der Sequenzreaktion führten. Alle vier Basenanaloga wurden gemeinsam in

einem einzigen Ansatz benutzt, wobei an den Didesoxynukleotiden in verschiedenen Farben fluoreszierende Gruppen gekoppelt waren. Dadurch konnten die Reaktionsprodukte in Polyacrylamidgelen detektiert und hinsichtlich des eingebauten Analogons identifiziert werden. Die Reaktion im PCR-Gerät fand unter wiederholtem Einsatz der DNA-Matrize statt.

Es wurden 300 ng Plasmid-DNA zusammen mit 15 pmol Primer (p85#8 Antisense: caaggagggtgtgttgtaatgtagc; synthetisiert bei MWG Biotech (Ebersberg)), 6 µl HT-Puffer (Endkonzentration 3x, PE Biosystems) und 4 µl "Big Dye Terminator Ready Mix", eine Lösung, die alle für die Synthese und Markierung der DNA benötigten Substanzen enthielt, in ein Volumen von 20 µl aufgenommen und die Reaktion im folgenden Temperaturprofil durchgeführt:



Nach der Reaktion wurden die Proben mit 80 µl 0,3 M Na-Ac und 250 µl Ethanol absolut, 4°C versetzt, in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt und 30 min bei 5000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%-igem Ethanol, 4°C gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13000 g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Die Aufarbeitung des Sequenzierungsgels, sowie die Analyse der fluoreszierenden Banden fanden unter Einsatz eines Sequenziergerätes (Applied Biosystems 373A) im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg statt.

3.2.7. Zellkultur

3.2.7.1. Stammhaltung und Subkultivierung

Die adhärent wachsenden Zelllinien (NIH3T3, Phönix 293-gp, PG13, HT1080, TE-671) wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (= DMEM-Vollmedium) kultiviert. Die Zellen wurden jeden 2. – 3. Tag subkultiviert und bei einer Konfluenz von 50-90% gehalten. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert: das alte Medium wurde abpipettiert und 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, sodass sie bedeckt wurden. Nach 1 min Inkubation wurde die Wirkung der Trypsin-Lösung durch Zugabe des zweifachen Volumens an Vollmedium blockiert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde der gewünschte Anteil der Zellen subkultiviert und in frischem Medium aufgenommen.

Die Suspensionszellen (Cole, Jurkat, Kasumi-1, MV4-11, K562, Eol-1) wurden als Suspensionskultur in RPMI-Medium 1640 mit Glutamax, 10 % FCS, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (= RPMI-Vollmedium) gehalten. Die Suspensionszellen M-1 wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (= DMEM-Vollmedium) kultiviert. Alle Suspensionszellen wurden jeden 2. – 3. Tag subkultiviert, in einem Verhältnis von 1:2 – 1:5 geteilt, und bei einer Dichte zwischen 1×10^5 – 1×10^6 Zellen / ml gehalten.

Alle Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.2.7.2. Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden trypsiniert (s. 3.2.7.1.). Nachdem die Trypsin-Lösung blockiert wurde, wurden $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen für 5 min bei 290 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 290 g bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 90%-igem FCS / 10%-igem DMSO aufgenommen.

$1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Suspensionszellen wurden für 5 min bei 290 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 290 g bei Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 90%-igem FCS / 10%-igem DMSO aufgenommen.

Die Zellen wurden langsam eingefroren (1°C pro Stunde im *Cryo 1°C Freezing Container*, Nalgene) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.7.3. Auftauen von Zellen

Die im Stickstoff gelagerten Zellen wurden rasch, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. 9 ml Vollmedium wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und die Zellen wurden, als nur noch ein kleiner Kristall zu sehen war, dazugegeben. Die Zellen wurden durch Invertieren gemischt und dann sofort für 5 min bei 290 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in den Inkubator gestellt.

3.2.7.4. Serumentzug und Stimulationsversuch

Um Stimulationseffekte besser sichtbar zu machen, wurden den NIH3T3 Zellen vor der Stimulation mit EGF (*epidermal growth factor*) bzw. GM-CSF (*granulocyte-*

macrophage colony stimulating factor), das hitzeinaktivierte fötale Kälberserum (FCS) entzogen.

Für die EGF-Stimulation wurde bei einer Konfluenz der NIH3T3 Zellen von 50% das Medium abpipettiert und Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit nur 0,5% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin (= DMEM-Hungermedium) dazugegeben. Nach 16 Stunden wurde den Zellen EGF dazugegeben (Endkonzentration 10 nM). Nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert (s. 3.2.8.1.).

Für die GM-CSF-Stimulation wurde bei einer Konfluenz der NIH3T3 Zellen von 50% das Medium abpipettiert und Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 0,1% BSA dazugegeben. Nach 2 Stunden wurde den Zellen GM-CSF dazugegeben (Endkonzentration 20 ng/ml). Nach entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen lysiert (s. 3.2.8.1.).

3.2.7.5. Wachstumskinetik

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zellen wurden Wachstumskinetik-Versuche durchgeführt. Hierbei erfolgten jeweils Dreifachbestimmungen. Die Zellen wurden gleich nach dem Aussäen (Tag 0) und dann in regelmäßigen Abständen (jeden 2. oder 3. Tag) gezählt (Zählung mittels Trypanblaufärbung, s. 3.2.7.6). Die Versuche fanden über 10 Tage statt, die Zellen wurden regelmäßig subkultiviert (jeden 4. oder 6. Tag), wobei darauf geachtet wurde, dass alle Ansätze gleich behandelt (subkultiviert) wurden und für sie die gleichen Bedingungen herrschten.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens der Zellen von der PI3K-Aktivität wurden Wachstumskinetik-Versuche mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 durchgeführt. Die Versuche erfolgten wie oben beschrieben, zu den Zellen

wurde LY294002, in 10 µl DMSO gelöst, in einer Endkonzentration von 25 µM hinzugegeben. Zu den Kontrollzellen wurden nur 10 µl DMSO hinzugegeben.

3.2.7.6. Untersuchung der Zellproliferation mittels BrdU (Bromodeoxyuridin)

Für den Zellproliferationsversuch mit BrdU wurden Reagenzien von BD Pharmingen™ (Cat. No. 552598) verwendet. Die BrdU-Lösung wurde auf den Zellen gegeben (10 µl BrdU 1 mM / ml Zellkultur). Die Zellen wurden für 16 Stunden in Kultur gehalten. Danach wurden 10^6 Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Staining Puffer (0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 8,0 g NaCl, 2,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, add 1 l H_2O . Der Lösung wurden 3% FCS sowie 0,09% NaAzid zugesetzt) aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl BD Cytofix/Cytoperm aufgenommen. Die Zellen wurden durch 30 min Inkubation bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100 µl BD Cytoperm Plus aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl BD Cytofix/Cytoperm aufgenommen. Die Zellen wurden durch Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur refixiert. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl DNase Lösung aufgenommen. Durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde die DNA abgebaut und dadurch die eingebaute BrdU freigesetzt. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Antikörper Lösung aufgenommen. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Staining Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse.

3.2.7.7. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Färbung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer. Durch die Trypanblaufärbung konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen werden erst nach längerer Zeit gefärbt, während tote Zellen aufgrund der geschädigten Zellmembran innerhalb kurzer Zeit (wenige Sekunden) gefärbt werden. Adhärenz Zellen wurden trypsinisiert (s. 3.2.7.1.). Die Trypsin-Lösung wurde blockiert und die Zellen wurden resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden 1:2 mit der Trypanblaulösung (gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich) verdünnt. Bei Suspensionszellen wurden die Zellen direkt aus der Kultur genommen und 1:2 mit der Trypanblaulösung verdünnt. Nach einer Inkubationsdauer von 1 min erfolgte die Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer.

3.2.7.8. Transfektion von 293gp-Zellen

Für die Produktion retroviraler Viren wurden die 293-gp- oder PG13-Zellen verwendet. Es wurden 3 Konstrukte verwendet. Der retrovirale Vektor MigRI mit einer Größe von 6,056 kb wurde von Dr. R. Feldmann (Baltimore, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. An der *EcoRI* Restriktionsstelle 1424 der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) wurde entweder die *p85 α* -cDNA oder die *p76 α* -cDNA mit der Deletion der Adenosinbase an Position 1907, hineinkloniert (2,2 kb große *EcoRI*-Fragmente, freundlicherweise von R. Feldman (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt).

- *Transiente CaP Transfektion*

Die 293-gp Zellen wurden 16 Stunden vor Transfektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 70% konfluent waren. Am nächsten Tag wurde das Medium abpipettiert und 10 ml frisches, mit Chloroquin (Endkonzentration 25 μ M) versetztes

DMEM-Vollmedium dazugegeben. 5 µg des Vektors (bzw. p85α- oder p76α-Konstrukt), 5 µg der pseudotypisierungs-DNA (ecotrop, RD114, GALV, amphotrop + 2 µg VSV-G) und 10 µg M57 (gagpol) Plasmid wurden in 250 µl einer 250 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und tropfenweise unter starkem Blubbern zu 250 µl 2x HEBS (*Hepes buffered saline*; 50 mM Hepes pH 7,1, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die sich in dieser Zeit gebildeten Calciumphosphat-DNA-Präzipitate wurden anschließend auf die 293-gp-Zellen pipettiert. Nach 6 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde das Medium durch 8 ml frisches DMEM-Vollmedium ersetzt. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand abgenommen, filtriert (Acrodiskfilter; 0,45µm; Pallman) und bei - 80°C gelagert.

- *Transiente LipofectamineTM-Transfektion*

Für die Lipofectamine-Transfektion der 293-gp-Zellen wurde das LipofectamineTM Reagenz von Invitrogen verwendet. Die Zellen wurden 16 Stunden vor Transfektion so ausgesäht, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion 70% konfluent waren. 5 µg des Vektors (bzw. p85α- oder p76α-Konstrukt), 5 µg der pseudotypisierungs-DNA (ecotrop, RD114, GALV, amphotrop + 2 µg VSV-G) und 10 µg M57 (gagpol) Plasmid wurden in 750 µl DMEM (ohne Zusätze) aufgenommen. 20 µl Plus Reagenz wurden hinzupipettiert und der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 30 µl LipofectamineTM Reagenz wurden in 750 µl DMEM (ohne Zusätze) aufgenommen. Nach der ersten Inkubationszeit wurden beide Ansätze gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium der Zellen mit 5 ml frischem Vollmedium ersetzt und der Lipofectamine-DNA-Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 3 ml Vollmedium dazu gegeben. Nach 16 - 20 Stunden wurde das Medium gewechselt. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurde

der Virusüberstand abgenommen, filtriert (Acrodiskfilter; 0,45µm; Pallman) und bei -80°C gelagert.

- *Stabile Expression der Konstrukte nach LipofectamineTM-Transfektion*

Um bessere Virustiter zu bekommen, wurden die transfizierten 293-gp Zellen nach der Virusernte für eine weitere Woche in Kultur gehalten und dann sortiert (s. 3.2.7.13.). Die Zellen, die EGFP⁺ waren, hatten das Konstrukt (Vektor, p85α- oder p76α-Konstrukt) stabil exprimiert d.h. sie wurden durch die produzierten Retroviren gleichzeitig transduziert. Diese Zellen wurden in Kultur genommen und nach 2 Wochen erneut sortiert. Die so gewonnenen 293-gp Zellen hatten das Konstrukt stabil integriert und wurden als Helferzelllinie benutzt. Dadurch wurden höhere Virentiter erreicht. Diese Methode wurde zur Produktion der RD114- und amphotrop + VSV-G-pseudotypisierten Viren verwendet. Ecotrop-pseudotypisierte Viren können nur Mauszellen transduzieren, und da die 293-gp Zellen menschliche Zellen sind, konnten sie durch diese Viren nicht transduziert werden. Ähnlich wurden GALV-pseudotypisierte Retroviren hergestellt, in dem die PG13 Helferzelllinie durch ecotrop-pseudotypisierte Retroviren transduziert wurde (s. 3.2.7.9.), die Zellen in Kultur genommen, über 3 Wochen 2 mal sortiert (s. 3.2.7.13.) und dann zur Virenproduktion verwendet wurden.

3.2.7.9. Virustitration

Der Virustiter der Überstände wurde mit Hilfe von HT1080 Zellen (für die RD114- und amphotrop + VSV-G-pseudotypisierten Viren), NIH3T3 Zellen (für die ecotrop pseudotypisierten Viren) und TE671 Zellen (für die GALV-pseudotypisierten Viren) bestimmt. 1×10^5 Zellen wurden in einem Well einer 24-well Platte ausgesät und 6 Stunden anwachsen lassen. Danach wurde das Medium von den Zellen abpipettiert und mit 500 µl DMEM-Vollmedium mit Protaminsulfat (Endkonzentration 4 µg/ml) ersetzt. Von jedem Virusüberstand wurden 3 Verdünnungen hergestellt: 10 µl, 25 µl und 50 µl

Überstand wurden in jeweils 490 µl, 475 µl und 450 µl DMEM-Vollmedium aufgenommen. Es wurde für jede Verdünnung eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert ausgerechnet. Zur Berechnung des Virustiters wurde dann der Mittelwert aus den 3 Verdünnungswerten errechnet. Die Virusüberstand-Verdünnungen wurden auf die Zellen gegeben und die 24-well Platten wurden für 90 min bei 290 g und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und frisches DMEM-Vollmedium dazu gegeben. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die Zellen trypsiniert (3.2.7.1.) und für 5 min bei 290 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min bei 290 g und Raumtemperatur). Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 200 µl PBS mit 1x Cellfix (Becton & Dickinson) aufgenommen und am FACS analysiert. Aus der Prozentzahl der positiv transduzierten Zellen konnte der Titer berechnet werden:

$$\text{Virustiter} = \frac{\text{Zellzahl am Tag der Transduktion} \times \text{Anteil positiv transduzierter Zellen} \times 2}{\text{Virusüberstandsvolumen (ml)}}$$

3.2.7.10. Transduktion der Zellen

Die unterschiedlichen Zellsorten wurden mit unterschiedlich pseudotypisierten Retroviren transduziert:

Zellsorte	Pseudotypisierung
CD34 ⁺	RD114
Phönix 293-gp	RD114, Amphotrop + VSV-G
NIH3T3	Ecotrop
PG13	Ecotrop
Cole	GALV
Jurkat SHIP Klon #51	Amphotrop + VSV-G
Kasumi-1	Amphotrop + VSV-G
MV4-11	Amphotrop + VSV-G
K562	Amphotrop + VSV-G
Eol-1	Amphotrop + VSV-G
M1	Amphotrop + VSV-G

Tab. 5: Die zur Transduktion verwendeten Pseudotypisierungen

- *Transduktion von adhärenenten Zellen:*

- Zur Transduktion von adhärenenten Zellen (NIH3T3, PG13), wurden 5×10^5 Zellen in einem Well einer 6-well Platte ausplattiert und über Nacht anwachsen lassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und 2 ml frisches DMEM-Vollmedium auf die Zellen gegeben. 2 ml Virusüberstand mit einem Titer von $1 - 5 \times 10^6$ infektiöse Partikel/ml wurden auf die Zellen gegeben. Die Platten wurden für 25 min bei 400 g, 32°C zentrifugiert, anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. In den folgenden 2 Tagen wurde die gleiche Prozedur (altes Medium wurde verworfen, frisches Vollmedium auf die Zellen gegeben, Virusüberstand dazupipettiert, Zentrifugation) wiederholt. Frühestens 24 Stunden und spätestens 48 Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen sortiert (s. 3.2.7.13.).
- Zur Transduktion von Phönix 293-gp Zellen s. 3.2.7.7.

- *Transduktion von Suspensionszellen:*

- Zur Transduktion von Suspensionszellen (Cole, Jurkat, Kasumi-1, MV4-11, K562, Eol-1, M1) wurden 5×10^5 Zellen abzentrifugiert (5 min, 290 g, Raumtemperatur), der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml frischem RPMI-Vollmedium (M1 Zellen in 2 ml frisches DMEM-Vollmedium) aufgenommen. 2 ml Virusüberstand mit einem Titer von $1 - 5 \times 10^6$ infektiöse Partikel/ml wurden auf das Well gegeben. Die Platten wurden für 25 min bei 400 g, 32°C zentrifugiert, anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. In den nächsten 2 Tagen wurde die gleiche Prozedur (Zellen wurden abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen, Virusüberstand dazugeben, Zentrifugation) wiederholt. Frühestens 24 Stunden und spätestens 48

Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen sortiert (s. 3.2.7.13).

- Zur Transduktion von CD34⁺ Zellen s. 3.2.7.12.

3.2.7.11. Präparation der mononukleären Zellen

Die mononukleären Zellen wurden aus Nabelschnurblut von gesunden Neugeborenen (von Hr. G. Ortmeyer von der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt), sowie aus dem Leukaphereseprodukt eines Patienten in der Blastenkrise eines Myeloproliferativen Syndroms (von Prof. W. Fiedler von der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt) aufgereinigt.

Die mononukleären Zellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mit LymphoprepTM (Nycomed, Oslo, Norwegen) aus den Blutproben gewonnen. Dazu wurden die Proben 1:2 mit 4°C kaltem PBS verdünnt. 15 ml LymphoprepTM-Lösung wurden mit 30 ml der Verdünnung vorsichtig überschichtet. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei 400 g und 20 °C zentrifugiert. Dies führte zur Bildung von 3 Phasen. Die mononukleären Zellen ordneten sich dabei ringförmig in der Interphase an und trennten sich dadurch von anderen zellulären Bestandteilen wie Erythrozyten und Granulozyten. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wurde abgenommen, mit 4°C kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 400 g und 20 °C zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und anschließend konnten die gewonnen Zellen zur CD34⁺ Aufreinigung eingesetzt werden.

3.2.7.12. CD34⁺-Aufreinigung

Aus den mononukleären Zellen wurden die CD34⁺ Zellen aufgereinigt. Die mononukleären Zellen wurden in „*recommended Medium*“ (Stemcell Technologies) bei einer Dichte von 2×10^8 Zellen / ml Medium aufgenommen. EasySepTM Positive Selection Cocktail (Stemcell Technologies) wurde dazugegeben (100 µl / ml Medium), die Zellen wurden gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden EasySepTM Magnetic Nanopartikel (Stemcell Technologies) zu den Zellen gegeben (50 µl / ml Medium) und der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser letzten Inkubation wurde der Ansatz mit „*recommended Medium*“ auf 2,5 ml aufgefüllt und für 5 min in den EasySepTM Magneten (Stemcell Technologies) gestellt. Anschließend wurde der Röhrcheninhalt in einem Schwung abgekippt, ohne das Röhrchen aus dem Magneten herauszunehmen. Dann wurde das Röhrchen aus dem Magneten genommen, die durch die magnetischen Nanopartikel an den Gefäßwänden haftenden CD34⁺ Zellen wurden in 2,5 ml „*recommended Medium*“ aufgenommen und das Gefäß wurde wieder für 5 min in den Magneten gestellt. Diese Schritte wurden insgesamt 5 mal wiederholt. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden die Zellen für 10 min bei 400 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml StemSpan Medium (Cellsystems), versetzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und den Zytokinen (Cellsystems) Interleukin-6 (20 ng/ml), Thrombopoetin (20 ng/ml), SCF (100 ng/ml) und Flt3-Ligand (100 ng/ml) aufgenommen und 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

3.2.7.13. Transduktion der CD34⁺-Zellen

Die CD34⁺-Zellen wurden mit Hilfe RD114-pseudotypisierten Viren transduziert. Dafür wurden unbeschichtete 6-well Platten mit RetroNectinTM (rekombinantes Fibronektinfragment (CH-296) von Takahara) beschichtet. Das in *E.coli* produzierte humane Fibronektin besteht aus 574 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 63kD und besitzt drei funktionale Domänen: eine zentrale Bindungsdomäne, eine

Heparinbindungsdomäne II und eine CS1-Seite mit einer alternativ gespleißten III CS1-Region. Ziel der Beschichtung der Platten mit RetroNectinTM ist die Verstärkung der retroviralen Gentransduktion. Die RD114-pseudotypisierten Viren können mit der Heparinbindungsdomäne von RetroNectinTM interagieren. Gleichzeitig können die CD34⁺-Zellen mit dem Fibronectinliganden der CS1-Seite von RetroNectinTM interagieren. Die gleichzeitige Bindung der Retroviren und der Zielzellen an RetroNectinTM führt zur Kolokalisation der retroviralen Partikel und der Zielzelle, und damit zu höherer Transduktionswahrscheinlichkeit der Zellen.

Zur Beschichtung der 6-Well Platte, wurde ein Well mit 2 ml Retronectinlösung (RetroNectinTM wurde in PBS gelöst, Endkonzentration 48 µg/ml) beschichtet, 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Retronectinlösung entfernt und das Well mit 2 ml 2%-igem BSA in PBS für 30 min bei 4°C blockiert. Anschließend wurde die Blockierlösung entfernt und das Well mit 3 ml HBSS (GibcoBRL) und 2,5% (v/v) 1 M HEPES gewaschen. Die HBSS / 2,5% (v/v) 1 M HEPES Lösung wurde gleich verworfen und 2 ml Virusüberstand mit einem Titer von 1 – 5 x 10⁶ infektiöse Partikel/ml wurden auf das Well gegeben. Die Platten wurden für 25 min bei 750 g, 4°C zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand verworfen und 2 ml frischer Überstand auf das Well gegeben. Die Prozedur wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden 5 x 10⁵ CD34⁺ Zellen (s. 3.2.7.11.) in 2 ml StemSpan-Medium (CellSystems) mit den Zytokinen (Cellsystems) Interleukin-6 (20 ng/ml), Thrombopoetin (20 ng/ml), SCF (100 ng/ml) und Flt3-Ligand (100 ng/ml) dazugegeben. Die Zellen wurden für 24 Stunden in den Inkubator gestellt. In den nächsten 2 Tage wurden die gleiche Prozedur (Beschichtung der Wells mit RetroNectinTM, Beladen der Retroviren und erneute Transduktion der gleichen Zellen) wiederholt. Frühestens 24 Stunden und spätestens 48 Stunden nach der letzten Transduktion wurden die Zellen sortiert.

3.2.7.14. Sortieren der transduzierten Zellen am FACSaria

Die transduzierten adhärenenten Zellen wurden trypsiniert (3.2.7.1.) und für 5 min bei 290 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min bei 290 g und Raumtemperatur). Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und filtriert (0,25 µm, MACS).

Suspensionszellen wurden für 5 min bei 290 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min bei 290 g und Raumtemperatur). Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und filtriert (0,25 µm, Macs).

Anschließend wurden die Zellen am FACSaria (Becton & Dickinson) sortiert. Hierbei wurden die Zellen an einem Laser vorbeigelenkt. Der Laser kann die Zellen nach grün leuchtend und nicht leuchtend (und daher nach positiv transduzierte und nicht transduzierte Zellen) unterscheiden. Somit wurden die positiv transduzierten und die nicht transduzierten Zellen in unterschiedlichen Röhrchen sortiert. In den Röhrchen, wo die Zellen hinein sortiert wurden, war das Medium vorgelegt worden, in dem die Zellen gehalten wurden. Außerdem wurde bei einigen Zelllinien (s. Ergebnisteil) auch nach der Stärke der grünen Fluoreszenz sortiert. Bei den CD34⁺ Zellen wurden jeweils 3000 EGFP-positive und 3000 EGFP-negative Zellen in 300 µl StemSpan Medium gesammelt, bei den anderen Zelllinien wurden alle positiven und bis zu 5 x 10⁶ negative Zellen sortiert. Die sortierten Zellen wurden für weitere Versuche (proteinbiochemische Versuche, Wachstumskinetik, Stimulationsversuche usw.) wieder in Kultur genommen. Für die weitere Arbeiten mit CD34⁺ Zellen, s. unten.

3.2.7.15. Methylcellulose- und Flüssigkultur-Assay der CD34⁺ Zellen

- *Methylcellulose-Assay der sortierten CD34⁺ Zellen*

1000 CD34⁺ Zellen wurden wie oben beschrieben in 100 µl StemSpan-Medium sortiert und anschließend in 1 ml Methylcellulose, versetzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und GM-CSF (0 ng/ml; 0,001 ng/ml; 0,01 ng/ml; 0,1 ng/ml; 1 ng/ml; 10 ng/ml) pipettiert und in eine 3,5 cm Schale mit Gitternetzlinien angelegt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Methylcellulosekulturen wurden in eine feuchte Kammer gestellt und im Inkubator (37°C, 5% CO₂) für 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Koloniezahl bestimmt, wobei jede Kolonie aus mehr als 20 Einzelzellen bestand (Zellansammlungen mit weniger als 20 Einzelzellen wurden nicht als Kolonien gewertet).

- *Flüssigkultur-Assay der sortierten CD34⁺ Zellen*

Es wurden jeweils 1000 Zellen in 100 µl StemSpan Medium, versetzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und GM-CSF (10 ng/ml), in einem Well einer 96-Well Platte pipettiert. Diese Zellen wurden für 14 Tage in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Anschließend wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau gezählt (siehe 3.2.7.6.).

3.2.7.16. *In vitro* Transkription / *in vitro* Translation

Zur *in vitro* Transkription / Translation des p76 α - und p85 α -Gens wurde das „TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ von Promega, Kat. Nr. L1170 verwendet. Zu 40 μ l TNT® Quick Master Mix wurden 2 μ l [³⁵S]Methionin (1,000 Ci/mmol bei 10m Ci/ml) und 1 μ g Plasmid-DNA zugesetzt. Der Ansatz wurde für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend durch PAGE und Western Blot Analyse untersucht.

3.2.8. Proteinbiochemische Arbeiten

3.2.8.1. Zell-Lyse mit NP40-Puffer und Proteinextraktion

5 x 10⁷ Suspensionszellen wurden für 7 min bei 290 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 4°C kaltem 1 mM Natriumorthovanadat Lösung in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Orthovanadat / PBS-Lösung entfernt und 1 ml NP40-Puffer auf das Pellet gegeben. Die Zellen wurden durch mehrfachem Auf- und Abpipettieren im NP40-Lysispuffer aufgenommen und für 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 5000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit dem Proteinextrakt wurde in ein Nunc™-Kryoröhrchen überführt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde von jeder Probe ein 10 μ l Aliquot abgenommen.

Adhärent wachsende Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% - 90% lysiert. Dazu wurde das alte Medium abpipettiert und 10 ml 4°C 1 mM Natriumorthovanadat Lösung in PBS auf die Zellen gegeben. Die Orthovanadat / PBS-Lösung wurde anschließend wieder entfernt und 800 μ l NP40-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach 5 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen in dem NP40-Puffer aus der Schale quantitativ in einem 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Nach mehrfachem Auf- und Abpipettieren, wurden die Ansätze für 10 min bei 5000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit dem Proteinextrakt wurde in ein Nunc™-Kryoröhrchen überführt und bis zum Gebrauch

bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde von jeder Probe ein 10 µl Aliquot abgenommen.

3.2.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry wurde mit Hilfe der Reagenzien des „DC Protein Assay“ (Biorad, München) durchgeführt. Die Lysatproben wurden 1:10 verdünnt und eine Konzentrationsstandardreihe mit BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V, Roche Diagnostics, Mannheim) in NP40-Puffer wurde hergestellt (BSA Konzentration von 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 und 1,5 mg/ml). 20 µl Reagenz S und 1 ml Reagenz A (enthält alkalische Kupfertartrat-Lösung) wurden gemischt. Dieser Ansatz wird im Folgenden Reagenz A' benannt. Von jeder Probe der Standardreihe und der 1:10 verdünnten Lysate wurden 10 µl auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Für jeden Ansatz wurden Drei- oder Vierfachbestimmungen durchgeführt. Zu jeder Probe wurden zuerst 25 µl Reagenz A' und anschließend 200 µl Reagenz B (enthält Folin) hinzupipettiert. Die Proben wurden vorsichtig gemischt, es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen und nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung am ELISA-Reader bei 595 nm. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysatproben erfolgte mit Hilfe der Eichgerade, die aus den Extinktionsdaten der BSA-Standardreihe erstellt wurde.

3.2.8.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Coomassie-Färbung

Zur Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamidgele in der Apparatur von Bio-Rad verwendet, die anschließend mittels Coomassie-Blau gefärbt wurden. Das 8,5% Trenngel wurde gegossen, mit Isobutanol überschichtet und eine Stunde auspolymerisieren lassen. Dann wurde das Isobutanol mit destilliertem H₂O abgegossen, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und eine Stunde auspolymerisieren lassen (s. 3.2.8.4.). Danach konnte das Gel in die Apparatur eingesetzt und die Proteinproben

aufgetragen werden. Es wurden Proteinproben mit 20 µg Protein mit NP40-Puffer auf 13,3 µl aufgefüllt. 6,7 µl 3x Protein-Ladepuffer mit 0,3 M DTT wurden dazu pipettiert. Kurz vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 100°C denaturiert. Durch die Bio Rad Apparatur wurden die Proteine eineinhalb Stunden bei 150V aufgetrennt. Nach der Proteinauftrennung wurde das Gel eine Stunde in eine Fixierlösung (20% Methanol, 1% o-Phosphorsäure 85%) inkubiert und im Anschluss über Nacht in die kolloidale Coomassie-Färbung (0,1% Coomassie-Blau R-250, 40% Methanol, 10% Essigsäure) gelegt. Am nächsten Tag wurde für zwei Stunden mit der Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure) entfärbt. Anschließend wurden die Gele in deionisiertem H₂O gewaschen und im Gel Air Dry System von BioRad (München) für drei Stunden getrocknet.

3.2.8.4. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophoresen

Es wurden zwei Systeme zur Auftrennung der Proteine in vertikalen Polyacrylamidgelen verwendet.

- *Auftrennung in der Protean[®] IxiCell-Apparatur von BioRad (München)*

Es 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 einer Stunde Polymerisierungszeit, wurde das Isobutanol abgegossen und die Geloberkante mit deionisiertem H₂O gespült. Zur Konzentrierung und Schärfen der in das Gel eingelaufenen Proteinbanden nach dem Prinzip der Isotachophorese, 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) auf das Trenngel gegossen. Nach einer weiteren Stunde Polymerisierungszeit wurde das Gel in die Apparatur eingesetzt und 1x Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1% SDS) eingefüllt. Proben von den Gesamtzelllysaten mit 100 µg Protein wurden auf 60 µl mit NP40-Puffer

aufgefüllt. Es wurden 30 µl 3x Protein-Ladepuffer (mit 0,3 M DTT versetzt) dazugegeben und die Proben wurden unmittelbar vor dem Auftragen für 5 min bei 100°C gekocht. 0,5 µl von dem „high range“ und 0,5 µl von dem „low range“ Marker (BioRad, München) wurden mit 49 µl 1x Protein-Ladepuffer (mit 0,1 M DTT versetzt) gemischt. Die Probe wurde unmittelbar vor dem Auftragen für 1 min bei 100°C gekocht. Die Elektrophoresen wurden mit 12 mA pro Gel betrieben.

- *Auftrennung mit NuPage® 10% Gele oder NuPage® 4-12% Gradientengele von Invitrogen in der „X Cell Sure Lock“-Apparatur von Invitrogen.*

Die Probenaufbereitung erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden geringere Mengen an Lysaten aufgetragen. Gesamtzelllysat-Proben mit 20 µg Protein wurden auf 13,3 µl mit NP40-Puffer aufgefüllt und 6,7 µl 3x Protein-Ladepuffer (mit 0,3 M DTT versetzt) wurden dazugegeben (s.o.). Die „X Cell Sure Lock“-Apparatur von Invitrogen besteht aus einer Innenkammer, wo die Gele eingespannt wurden, und einer Außenkammer. Die Innenkammer wurde mit 1x MOPS Lösung (versetzt mit 1mM DTT) gefüllt, die Außenkammer mit 1x MOPS-Lösung. Die Elektrophoresen wurden mit 150 V betrieben.

3.2.8.5. Western Blot-Analyse

Ein auf Gelgröße zugeschnittene Protran®-Nitrocellulosemembran (0,45 µm, Schleicher & Schuell) wurde in ddH₂O 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. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte im "Tankblotting-Verfahren" über zwei Stunden bei 50 V. Anschließend wurde die Apparatur abgebaut und der am Rand aufgetragene Marker als Streifen von der Membran abgeschnitten. Die

Membran und der Markerstreifen wurden kurz in 1x TBS gewaschen und mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für eine Stunde blockiert. Der primäre Antikörper wurde in 1x TBS / 0,5 % Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver / 0,01% Natriumazid nach Angaben des Herstellers verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Der Markerstreifen wurde über Nacht in der Blockierlösung bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal für 10 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (Ziegen-anti-Kaninchen-IgG-HRP oder Ziegen-anti-Maus-IgG-HRP, 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 3 mal für 10 min in 1x TBS / 0,5% Tween 20 gewaschen und mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (1:3000 in 1x TBS / 0,5% Tween 20 verdünnt, Amersham Pharmacia Biotech) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Membran und Markerstreifen wurden anschließend zweimal mit 1x TBS gespült und wie folgt gewaschen:

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

Je 3 ml der ECL-Lösungen I und II (Amersham-Pharmacia Biotech) wurden in einer Plastischale miteinander gemischt und Membran und Markerstreifen für je 1 min unter Schwenken in der Lösung inkubiert. Alternativ, wurden 750 µl der Lösungen „*SuperSignal® West Dura Stable Peroxid Buffer*“ und „*SuperSignal® West Dura Luminol / Enhacer Solution*“ (Pierce) miteinander gemischt und Membran und Markerstreifen für je 5 min in der Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran und der Markenstreifen zwischen zwei Plastikfolien im Imager („*Intelligent Dark Box*“,

FUJIFILM) entwickelt. Die Filter wurden nach der Entwicklung in 1x TBS bei 4°C gelagert. Sollten die Filter mit einem anderen, primären Antikörper inkubiert werden, so wurde das Protokoll mit dem Blockieren der Filter fortgesetzt.

4. Ergebnisse

In der menschlichen hämatopoetischen Zelllinie Cole kann nur die p76 α mutierte Form der p85 α regulatorischen Untereinheit gefunden werden. Dieser Form des Proteins fehlt fast die ganze c-terminale SH2-Domäne, sie kann jedoch an der p110 katalytischen Untereinheit binden. Die in Cole Zellen beobachtete konstitutive Aktivierung der PI3K (Jücker et al., 2002) kommt möglicherweise durch die Abwesenheit des Wildtyp-p85 α -Proteins zustande. Das Fehlen des Wildtyp-p85 α -Proteins führt demnach zu einer Aufhebung der durch die regulatorische Untereinheit vermittelten PI3K-Inhibition und dadurch zur konstitutiven Aktivierung der PI3K und ihrer Signalkaskade.

Um die Wirkung des mutierten p76 α -Proteins zu untersuchen, wurden die Zielzellen mit dem retroviralen MigRI-Vektor, in dem p85 α - oder die mutierte p76 α -Form hineinkloniert wurden, transduziert. Als Negativkontrolle, wurden die Zellen mit dem MigRI-Vektor transduziert. Der Vektor ist ein Koexpressions-Vektor, der ein EGFP-Gen (*enhanced green fluorescent protein*) besitzt. Die Mutation in der p76 α -DNA wurde mittels Sequenzierung bestätigt (Abb. 21). In dem p76 α -Plasmid fehlt eine Adenosinbase.

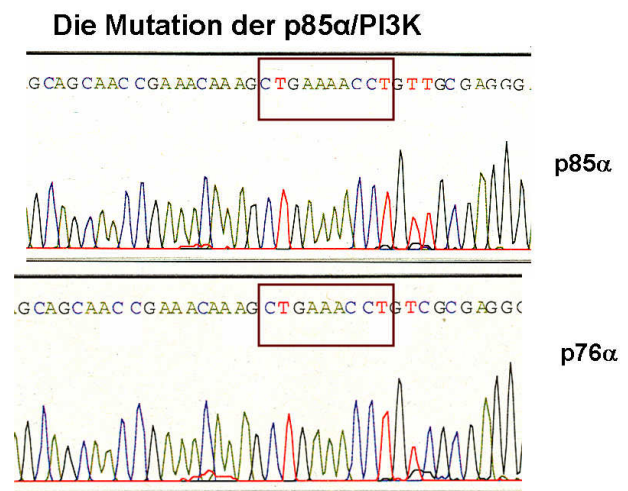


Abb. 21: Deletion der Adenin-Base in der mutierten p76 α -DNA.

4.1 Herstellung der Retroviren

Zur Transduktion der Zielzellen war die Herstellung von Retroviren mit bestimmten Pseudotypisierungen notwendig. Dafür wurden die Helferzellen 293-gp erst mit der Ca-Phosphat-Methode transfiziert.

Pseudotypisierung	Virentiter (Vektor) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p76 α) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p85 α) (inf. Partikel / ml)
Amphotrop+VSV-G	$5,3 \times 10^4$	0 (nicht messbar)	0 (nicht messbar)
Ecotrop	0 (nicht messbar)	0 (nicht messbar)	0 (nicht messbar)
RD114	$7,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$

Tab. 6: Virentiter nach Ca-Phosphat Transfektion

Dies führte zu sehr niedrigen Virentiter, die zur erfolgreichen Transduktion nicht ausreichend waren (Tab. 6). Deshalb erfolgte die Lipofectamine-Transfektion der Helferzellen, was zu höheren Titer der Virusüberstände führte (Tab. 7).

Pseudotypisierung	Virentiter (Vektor) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p76 α) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p85 α) (inf. Partikel / ml)
Amphotrop+VSV-G	$7,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
Ecotrop	$8,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$
RD114	$8,0 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$

Tab. 7: Virentiter nach Lipofectamine Transfektion

Zur Produktion der GALV-pseudotypisierten Retroviren, wurden die PG13-Helferzellen mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduziert. Die positiv transduzierten Zellen (Abb. 22) wurden sortiert, in Kultur genommen und als Helferzelllinie zur Herstellung von Überständen mit GALV-pseudotypisierten Retroviren verwendet (Tab. 8).

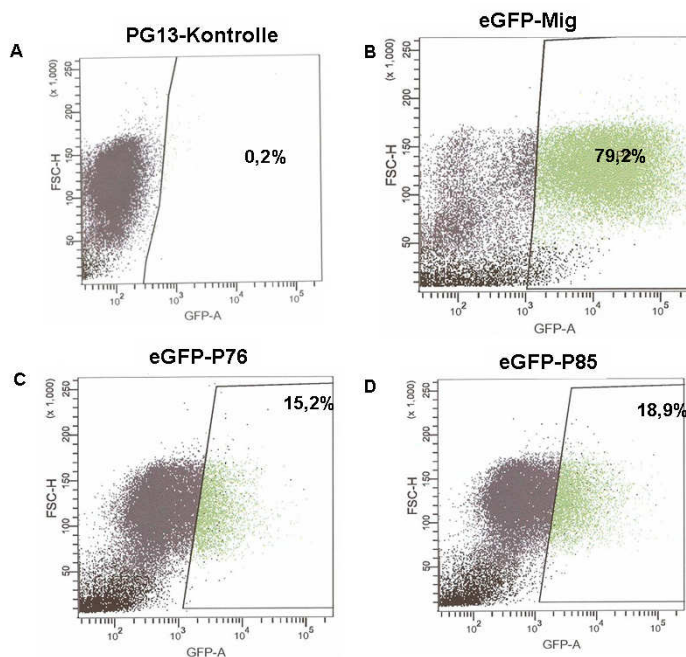


Abb. 22: Sorten der mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduzierten PG13 Zellen. Sowohl die mit dem Vektor, als auch die mit dem p76 α - oder p85 α -Konstrukt transduzierten Zellen waren fast alle positiv (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet). A) Nicht transduzierte Zellen exprimieren kein EGFP; B) 79,2% der mit Vektor-transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C) die 15,2% am stärksten positiven p76 α transduzierten Zellen wurden sortiert; D) die 18,9% am stärksten positiven p85 α transduzierten Zellen wurden sortiert.

Pseudotypisierung	Virentiter (Vektor) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p76 α) (inf. Partikel / ml)	Virentiter (p85 α) (inf. Partikel / ml)
GALV	$6,2 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$

Tab. 8: Virentiter der durch PG13-Zellen produzierten GALV-pseudotypisierten Virusüberstände

4.2 Wirkung der Expression von p76 α bzw. p85 α

Nach Herstellung der entsprechenden Virusüberstände, wurden die Zielzellen mit den entsprechend pseudotypisierten Viren transduziert, sortiert und weiter analysiert.

4.2.1. Expression von p76 α bzw. p85 α in Cole Zellen

Zuerst wurde untersucht, ob das Wachstum und die Proliferation der Cole Zellen PI3K-abhängig ist. Dafür wurde ein Proliferationshemmversuch mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 (Endkonzentration 25 μ M) durchgeführt.

Wie in der Abb. 23 zu sehen, konnte schon nach zwei Tagen ein Unterschied in der Proliferation der mit LY294002 behandelten zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Während die Zahl der Zellen, die nicht mit LY294002 behandelt worden waren, sich verdoppelt hatte, hatte sich die Zahl der Zellen, die mit LY294002 behandelt worden waren, kaum geändert. Bei den nicht behandelten Zellen konnte während des Versuches eine exponentielle Zunahme der Zellzahl beobachtet werden, während die Zellzahl der mit LY294002 behandelten Zellen abnahm. Nach zehn Tagen hatte die Zellzahl der unbehandelten Zellen um das $76,6 \pm 8,9$ fache ($7660\% \pm 890\%$) zugenommen, während von den mit LY294002 behandelten Zellen nur noch $34,6\% \pm 4,3\%$ lebten. Ein Unterschied konnte auch in der Anteil der abgestorbenen Zellen festgestellt werden. Die nicht behandelten Zellen zeigten nach vier Tagen nur einen Anteil von $1,4\% \pm 0,7\%$ toten Zellen, während bei den mit LY294002 behandelten Zellen dieser Anteil $27,9\% \pm 4,3\%$ betrug. Nach zehn Tagen waren $2,5\% \pm 1,2\%$ der nicht behandelten und $87,2\% \pm 6,5\%$ der mit LY294002 behandelten Zellen abgestorben.

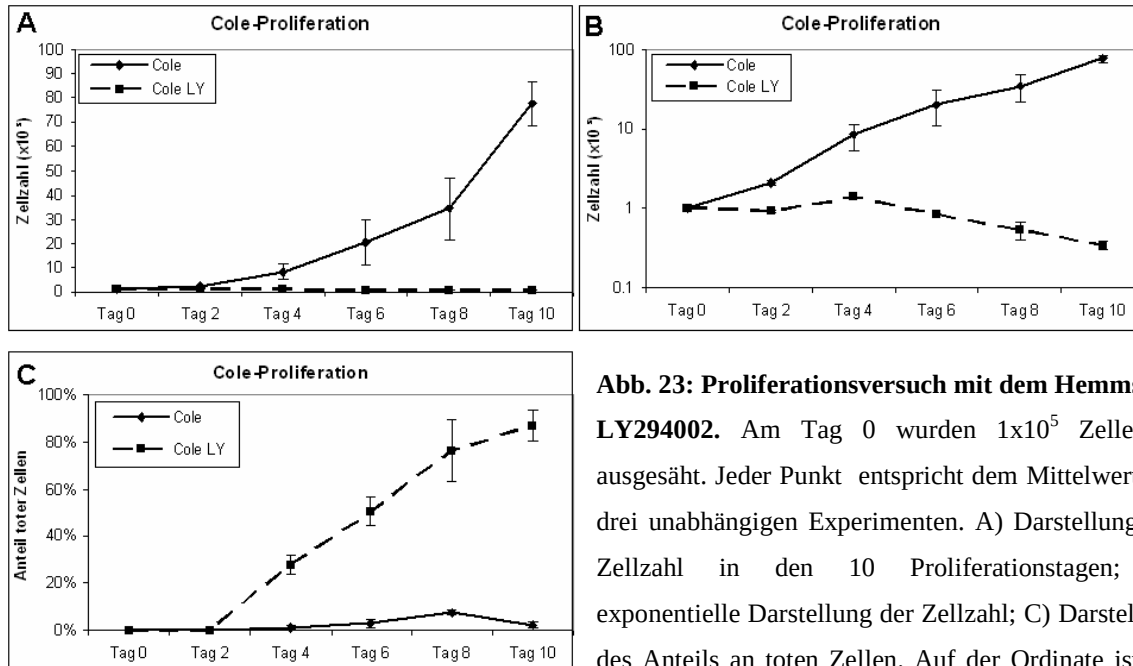


Abb. 23: Proliferationsversuch mit dem Hemmstoff LY294002. Am Tag 0 wurden 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. A) Darstellung der Zellzahl in den 10 Proliferationstagen; B) exponentielle Darstellung der Zellzahl; C) Darstellung des Anteils an toten Zellen. Auf der Ordinate ist die Zellzahl, bzw. der Anteil an toten Zellen aufgetragen. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Die Cole Zellen wurden mit GALV-pseudotypisierten Viren transduziert. Die positiv sortierten Zellen (Abb. 24) wurden in Kultur genommen und weiter analysiert.

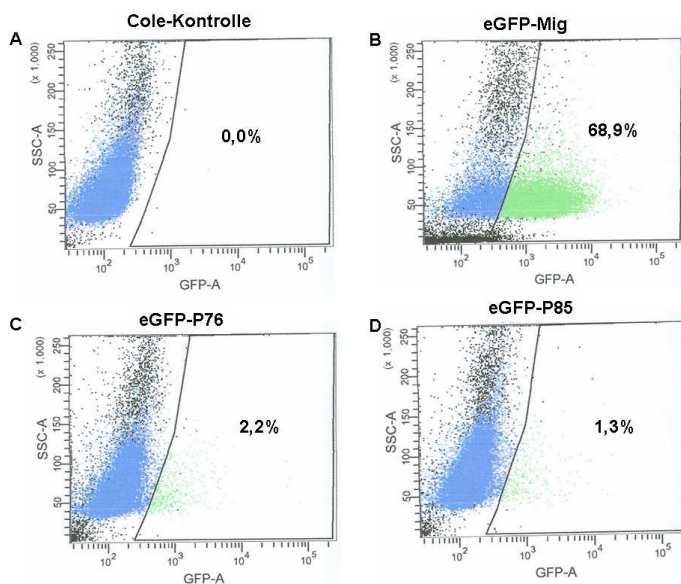


Abb. 24: Sorten der mit GALV-pseudotypisierten Viren transduzierten Cole Zellen. A) Nicht transduzierte Cole Zellen exprimieren kein EGFP; B) 68,9% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C) 2,2% der p76 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; D) 1,3% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet).

4.2.1.1. Expressionsnachweis

Aus den Zellen wurden Lysate hergestellt und Western Blot Analysen durchgeführt (Abb. 25).

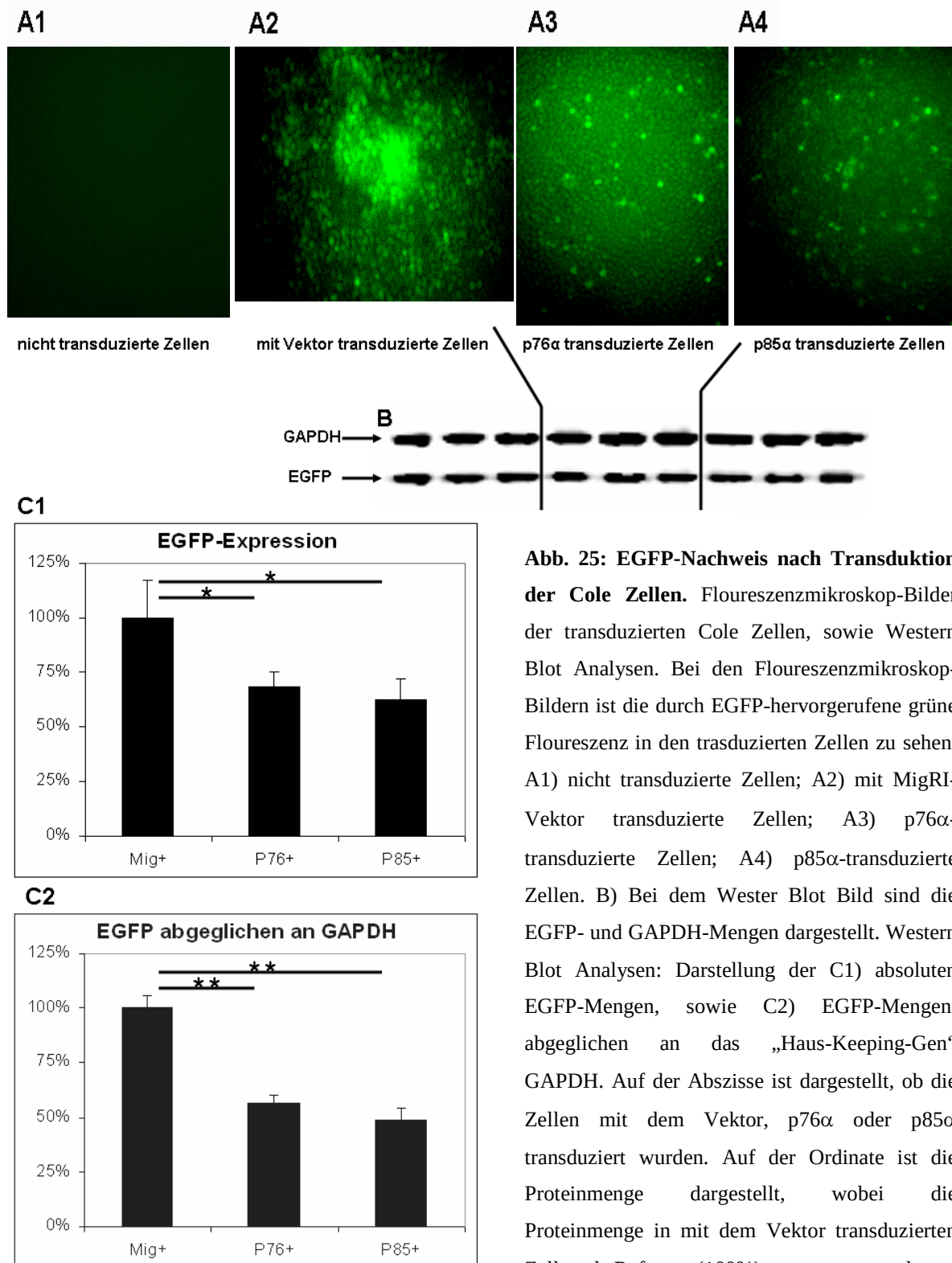


Abb. 25: EGFP-Nachweis nach Transduktion der Cole Zellen. Fluoreszenzmikroskop-Bilder der transduzierten Cole Zellen, sowie Western Blot Analysen. Bei den Fluoreszenzmikroskop-Bildern ist die durch EGFP-hervorgerufene grüne Fluoreszenz in den transduzierten Zellen zu sehen. A1) nicht transduzierte Zellen; A2) mit MigRI-Vektor transduzierte Zellen; A3) p76 α -transduzierte Zellen; A4) p85 α -transduzierte Zellen. B) Bei dem Western Blot Bild sind die EGFP- und GAPDH-Mengen dargestellt. Western Blot Analysen: Darstellung der C1) absoluten EGFP-Mengen, sowie C2) EGFP-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde.

Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gekennzeichnet; mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,0005$ gekennzeichnet. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis.

Zuerst wurde die Frage erläutert, ob nach Transduktion der Zellen, das retrovirale Konstrukt funktioniert und es zu einer Expression der Gene auf dem Vektor kommt. Da es sich beim MigRI um einen Ko-Expressionsvektor handelt, der das EGFP-Gen enthält, wurde die EGFP-Expression untersucht. Um die EGFP-Expression nachzuweisen, wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und im Western Blot die EGFP-Mengen quantifiziert (Abb. 25). Während in nicht transduzierten Zellen EGFP nicht vorhanden ist, können große Mengen an EGFP in transduzierten und sortierten Zellen nachgewiesen werden. Die EGFP-Menge ist in mit Vektor transduzierten Zellen signifikant größer als in Zellen, die mit p76 α oder p85 α transduziert wurden. p76 α transduzierte Zellen exprimieren $68\% \pm 7\%$ der EGFP-Menge ($56\% \pm 4\%$ nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Zellen. p85 α transduzierte Zellen exprimieren $62\% \pm 10\%$ der EGFP-Menge ($48\% \pm 6\%$ nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Zellen. Die mit p76 α oder p85 α transduzierten Zellen exprimieren ähnliche Mengen EGFP.

Als nächstes wurde untersucht, ob die positive Transduktion der Zellen mit der Expression des transduzierten p76 α - bzw. p85 α -Gens gekoppelt ist. Dafür wurden im Western Blot die Mengen an p76 α - bzw. p85 α -Protein gemessen (Abb. 26). Zur Quantifizierung wurden die p76 α - bzw. p85 α -Proteinmengen an der GAPDH-Menge abgeglichen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen). Während die Transduktion der Cole Zellen mit dem p76 α -Konstrukt zu einer statistisch signifikanten Zunahme der p76 α -Menge um $25,8\% \pm 10,3\%$ führt, führt die Transduktion dieser Zellen mit dem p85 α -Konstrukt zu einer nur bei sehr langer Exposition nachweisbaren Expression von p85 α . Die Menge des wildtyp p85 α -Proteins, das nach Transduktion exprimiert wird, ließ sich als etwa $1,8\% \pm 0,2\%$ des endogenen p76 α -Proteins quantifizieren. Die p76 α -Menge in p85 α transduzierten Zellen (endogenes Protein in B4, Abb. 26) ist gleich wie die p76 α -Menge in mit Vektor transduzierten Zellen. Außer den mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduzierten Cole Zellen wurden Jurkat-Zelllysate als Positivkontrolle für p85 α aufgetragen. Jurkatzellen exprimieren das Wildtyp-Protein p85 α , das aufgrund der Größe langsamer als p76 α läuft. In mit MigRI-Vektor- und p76 α transduzierten Zellen ist kein Wildtyp-Protein p85 α nachweisbar.

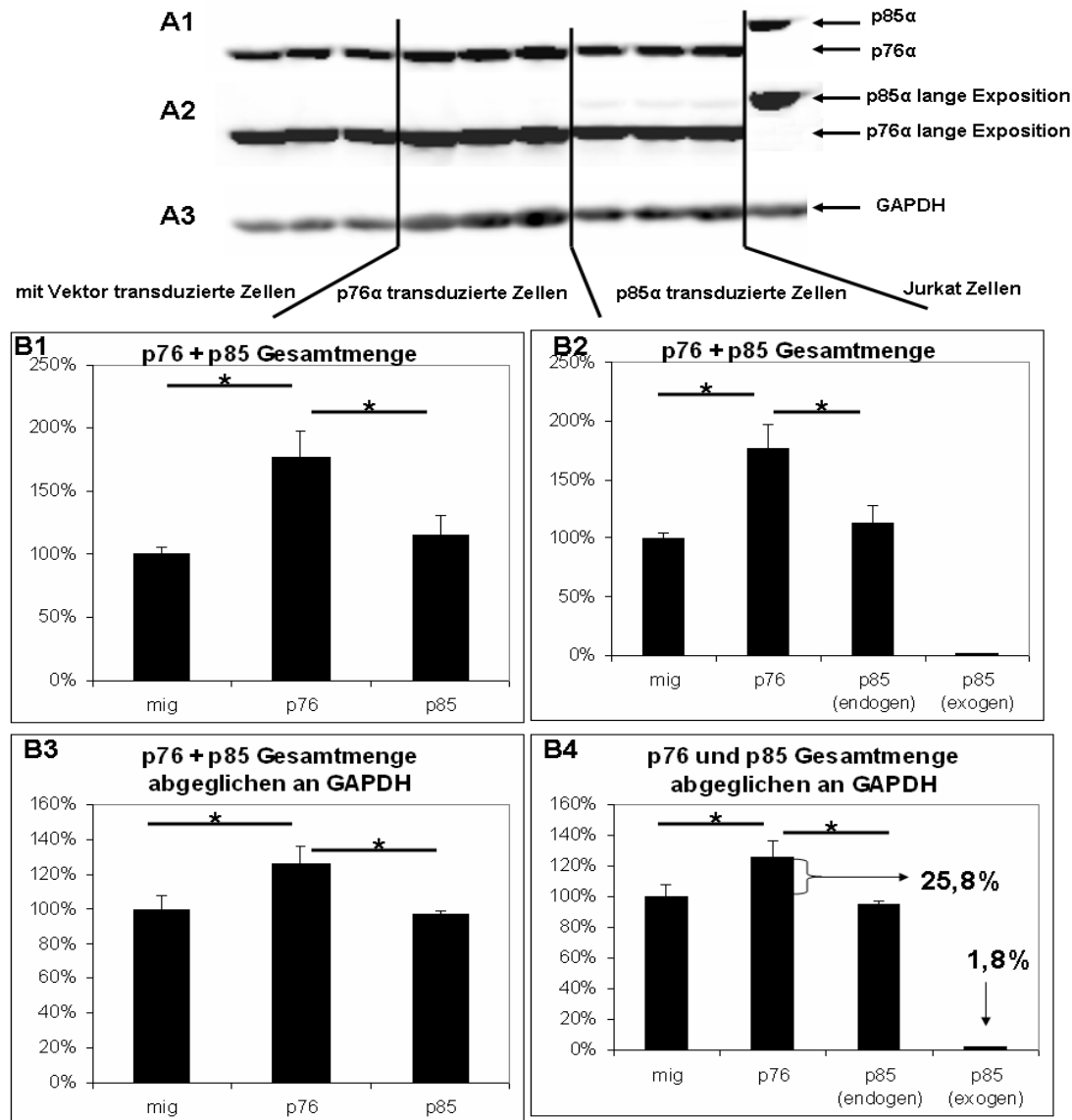


Abb. 26: Expression von p76α und p85α in Cole Zellen nach Transduktion. Western Blot Bilder: Darstellung der A1) Mengen an p76α bzw. p85α; A2) Mengen an p76α bzw. p85α nach einer sehr langen Expositionszeit (zur Festsetzung der p85α-Expression); A3) Mengen an GAPDH. Western Blot Analysen Darstellung der B1) absoluten p76α- bzw. p85α-Mengen, sowie B3) p76α- bzw. p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. In den Abbildungen B2 und B4 ist die Proteinmenge in mit p85α transduzierten Zellen in dem endogenen Proteinanteil (das mutierte p76α-Protein) und exogenen Proteinanteil (das wildtyp, durch Transduktion hinzugefügte p85α-Protein) aufgeteilt. In den Abbildungen B3 und B4 sind die p76α- und p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76α oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,05$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis. Für weitere Einzelheiten s. Text.

4.2.1.2. Akt-Phosphorylierung nach p76 α -Expression und p85 α -Überexpression

Als letztes wurde untersucht, ob der Gentransfer zu Unterschieden bei der Ser473-Phosphorylierung von Akt führt.

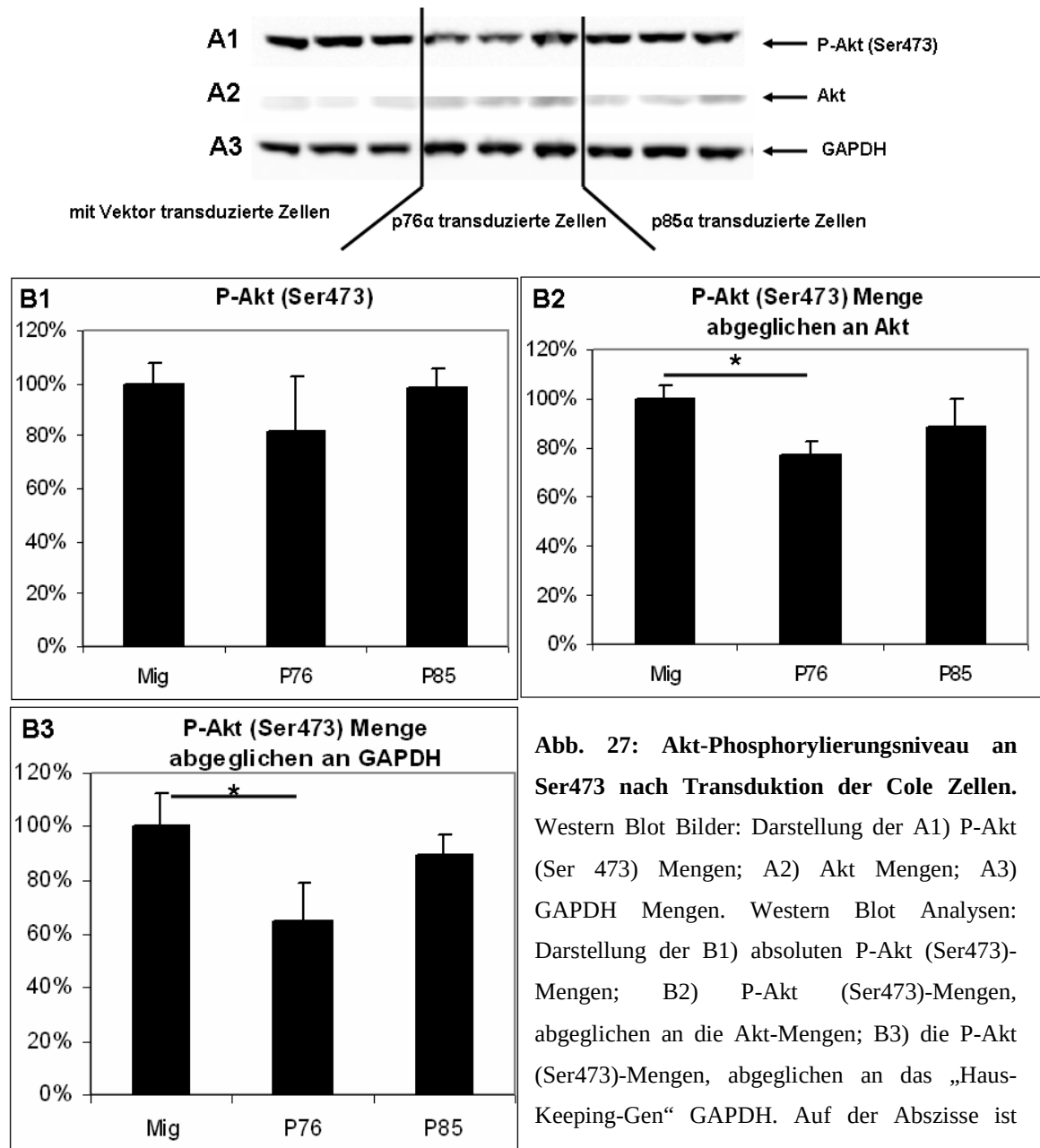


Abb. 27: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der Cole Zellen.
Western Blot Bilder: Darstellung der A1) P-Akt (Ser 473) Mengen; A2) Akt Mengen; A3) GAPDH Mengen. Western Blot Analysen: Darstellung der B1) absoluten P-Akt (Ser473)-Mengen; B2) P-Akt (Ser473)-Mengen, abgeglichen an die Akt-Mengen; B3) die P-Akt (Ser473)-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor,

p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,05$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Dafür wurden im Western Blot die Mengen von an Ser473 phosphoryliertem Akt gemessen und an der GAPDH- bzw. Akt-Menge abgeglichen, um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel bzw. eine Akt-Mengen-Regulation abzugleichen (Abb.27). Überexpression von p76 α führt zu einer Abnahme der Akt-Phosphorylierung um 35,1% $\pm$ 14,3% (nach Abgleich an GAPDH) (bzw. 23,0% $\pm$ 5,5% nach Abgleich der P-Akt Menge an Akt), verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Cole Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden. Transduktion der Zellen mit p85 α führt zu keiner signifikanten Abnahme der Akt-Phosphorylierung verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Cole Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden.

4.2.1.3. Untersuchung zum Mechanismus der p85 α -Expressionshemmung

Hierbei sollte die Frage erläutert werden, durch welchen Mechanismus die Translation der in Cole Zellen vorhandenen p85 α -mRNA zum p85 α -Protein gehemmt wird. Konkret sollte untersucht werden, ob es durch Bindung bestimmter Proteine an die Wildtyp-p85 α -mRNA und nicht an die mutierte p76 α -mRNA (oder umgekehrt) zu einem vermehrten Abbau oder Translationshemmung der wildtyp p85 α -mRNA kommt. Dafür wurde die p76 α - und p85 α -DNA aus dem MigRI-Vektor durch EcoRI herausgeschnitten und in dem pBluescript II SK (+) Vektor hineinkloniert. Die in diesem Vektor hineinklonierten p76 α - und p85 α -DNA wurden an PD Dr. E. Mohr (Institut für Anatomie I: Zelluläre Neurobiologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zum nachfolgenden Versuch weitergegeben: Der Vektor beinhaltet einen T7-Promotor und wurde zur *in vitro* Transkription der DNA verwendet. Die daraus entstandene mRNA wurde in Säulen fixiert, auf denen Cole-Zellen-Extrakte dazugegeben wurden. Die mRNA mit den daran bindenden Proteinen (und evtl. anderen Molekülen) aus den Cole-Zelllysaten wurden aus der Säule eluiert und mir von Dr. E. Mohr zu weiteren Untersuchungen übergeben. Die Proteinen in den Proben wurden durch eine SDS-PAGE getrennt und mit Hilfe einer Coomassie-Färbung untersucht (Abb. 28). Es konnte kein Unterschied bei den Proteinbanden zwischen den an p76 α - und p85 α -mRNA bindenden Proteine aus Cole Zelllysaten festgestellt werden. Sowohl die Banden in den Spuren 2 und 3, als auch die Banden in den Spuren 4 und 5 sind identisch. (Abb. 28).

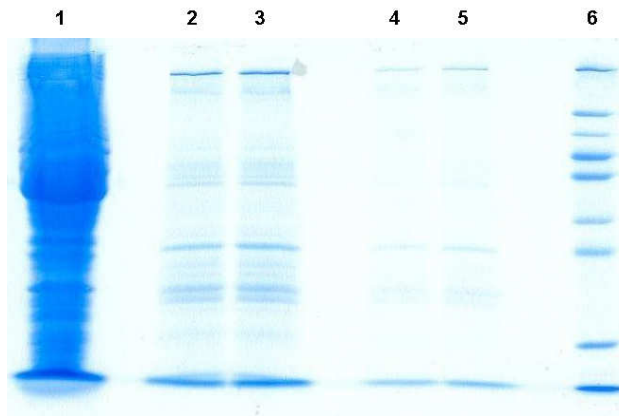


Abb. 28: Coomassie-Färbung der an p76 α - bzw. p85 α -mRNA bindenden Proteine aus Cole Zelllysaten. 1) Gesamtzelllysat aus Cole Zellen (20 μ g Protein); 2) an p76 α -mRNA bindende Proteine aus Cole Zelllysaten (10 μ l Protein); 3) an p85 α -mRNA bindende Proteine aus Cole Zelllysaten (10 μ l Protein); 4) an p76 α -mRNA bindende Proteine aus Cole Zelllysaten (2 μ l Protein); 5) an p76 α -mRNA bindende Proteine aus Cole Zelllysaten (2 μ l Protein); 6) Marker.

4.2.2. Expression von p76 α bzw. p85 α in PG13 und NIH3T3 Zellen

Die PG13 und NIH3T3 Zellen wurden mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduziert. Die positiv sortierten Zellen (Abb. 22 und 29) wurden in Kultur genommen und weiter analysiert.

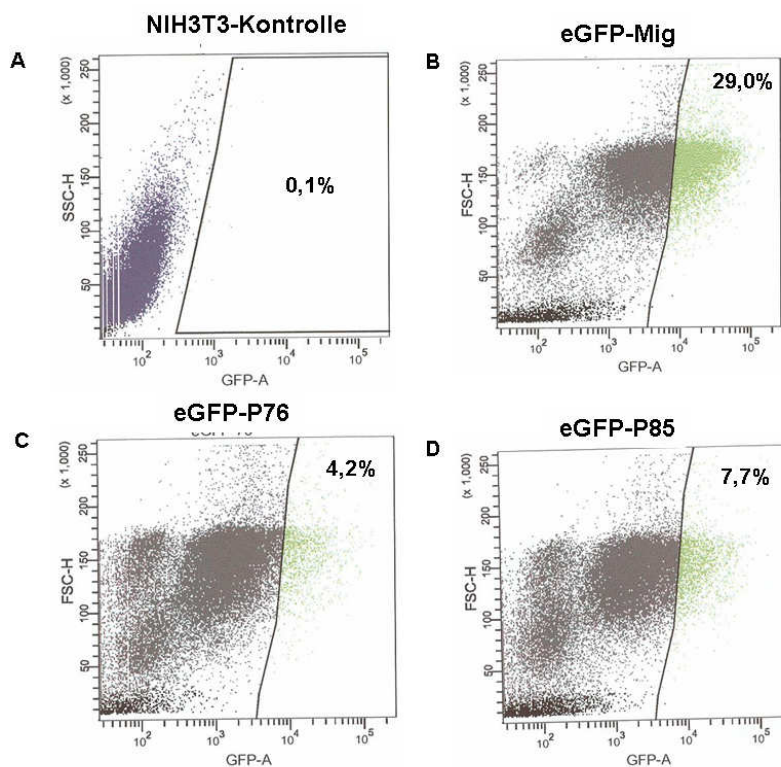


Abb. 29: Sorten der mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduzierten NIH3T3 Zellen. Sowohl die mit dem Vektor, als auch die mit dem p76 α - oder p85 α -Konstrukt transduzierten Zellen waren fast alle positiv (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet). A) Nicht transduzierte NIH3T3 Zellen exprimieren kein EGFP; B) die 29,0% am stärksten positiven Vektor-transduzierten Zellen wurden sortiert; C) die 4,2% am stärksten positiven p76 α -transduzierten Zellen

wurden sortiert; D) die 7,7% am stärksten positiven p85 α transduzierten Zellen wurden sortiert.

4.2.2.1. Expressionsnachweis

Aus den Zellen wurden Lysate hergestellt und Western Blot Analysen wurden durchgeführt. Als erstes wurde die Frage erläutert, ob nach der Transduktion der Zellen, das retrovirale Konstrukt funktioniert und es zu einer Expression der Gene auf dem Vektor kommt. Da es sich um einen Ko-Expressionsvektor handelt, der das EGFP-Gen enthält, wurde die EGFP-Expression untersucht. Um die EGFP-Expression nachzuweisen, wurden die Zellen unter einem Floureszenzmikroskop fotografiert und im Western Blot die EGFP-Mengen quantifiziert (Abb. 30).

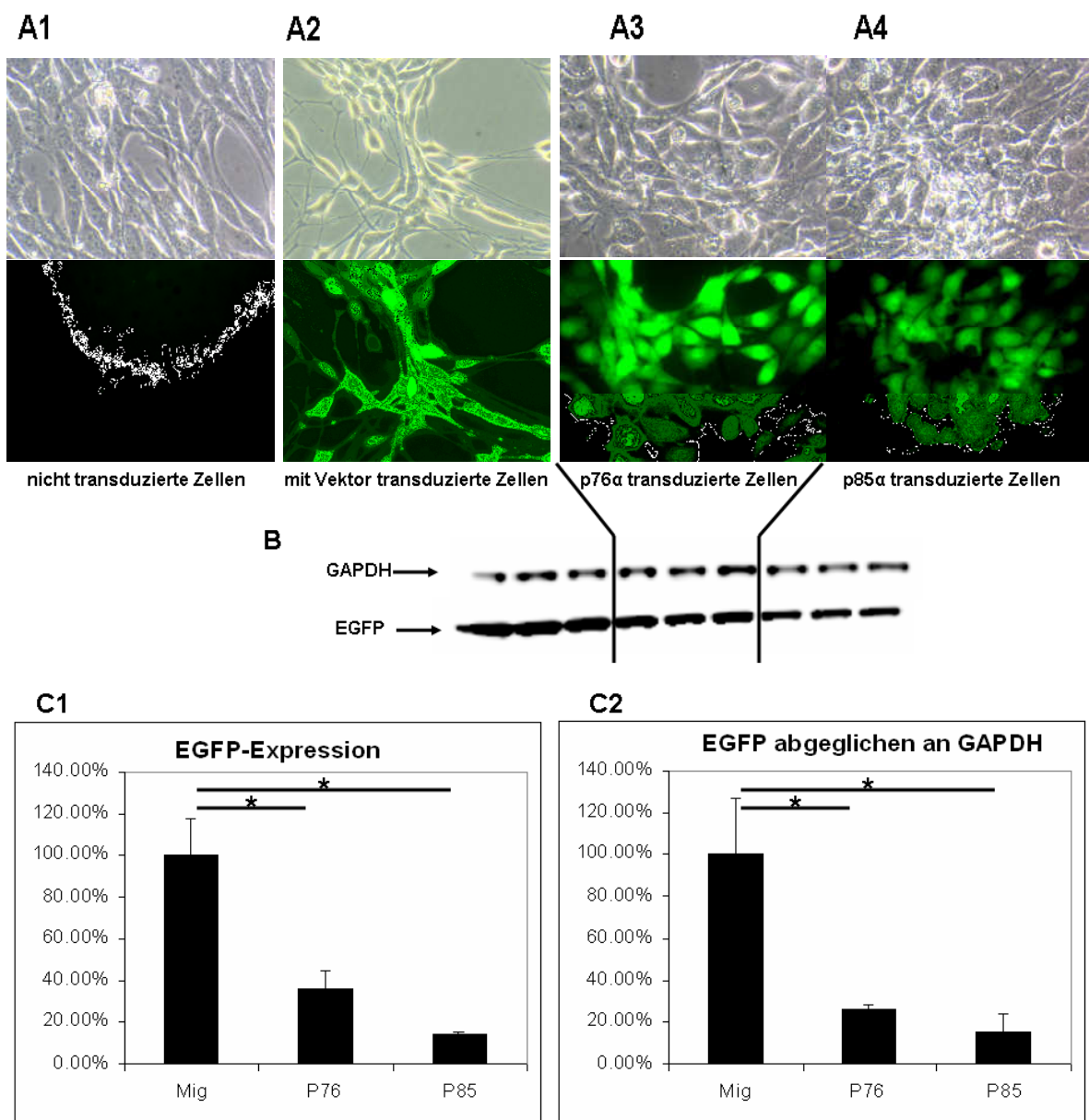


Abb. 30: EGFP-Nachweis nach Transduktion der NIH3T3 Zellen. Fluoreszenzmikroskop-Bilder der transduzierten NIH3T3 Zellen, sowie Western Blot Analysen. Bei den Fluoreszenzmikroskop-Bildern ist die durch EGFP-hervorgerufene grüne Fluoreszenz in den transduzierten Zellen zu sehen. A1) nicht transduzierte Zellen; A2) mit MigRI-Vektor transduzierte Zellen; A3) p76 α transduzierte Zellen; A4) p85 α transduzierte Zellen. B) Bei dem Western Blot Bild sind die EGFP- und GAPDH-Mengen dargestellt. Western Blot Analyse: Darstellung der C1) absoluten EGFP-Mengen, sowie C2) EGFP-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,01$). Dieser Versuch wurde über 15-mal wiederholt. Jede Wiederholung brachte das gleiche Ergebnis.

Während in nicht transduzierten Zellen EGFP nicht vorhanden ist, können große Mengen an EGFP in transduzierten und sortierten Zellen nachgewiesen werden. Die EGFP-Menge ist in mit Vektor transduzierten Zellen signifikant größer als in Zellen, die mit p76 α oder p85 α transduziert wurden. p76 α transduzierte Zellen exprimieren $36,6\% \pm 8,1\%$ der EGFP-Menge ($25,8\% \pm 2,2\%$ nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Zellen. p85 α transduzierte Zellen exprimieren $14,3\% \pm 1,2\%$ der EGFP-Menge ($15,3\% \pm 8,2\%$ nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Zellen. Die mit p76 α oder p85 α transduzierten Zellen exprimieren ähnliche Mengen EGFP.

Als nächstes wurde untersucht, ob die positive Transduktion der NIH3T3 Zellen mit der Expression des transduzierten p76 α - bzw. p85 α -Gens gekoppelt ist. Dafür wurden im Western Blot die Mengen an p76 α - bzw. p85 α -Proteine gemessen (Abb. 31). Zur Quantifizierung wurden die p76 α - bzw. p85 α -Proteinmengen an der GAPDH-Menge abgeglichen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen). Die Transduktion der NIH3T3 Zellen mit dem p85 α -Konstrukt führt zu einer Zunahme der p85 α -Menge auf etwa $254,9\% \pm 50,6\%$. Nach Transduktion der Zellen mit dem p76 α -Konstrukt, ist das mutierte p76 α -Protein nachweisbar, in einer Menge die etwa $93,7\% \pm 25,6\%$ der endogenen p85 α -Menge entspricht. Die p85 α -Menge in p76 α transduzierten Zellen (endogenes Protein in B4) ist ähnlich der p85 α -Menge in mit Vektor transduzierten Zellen.

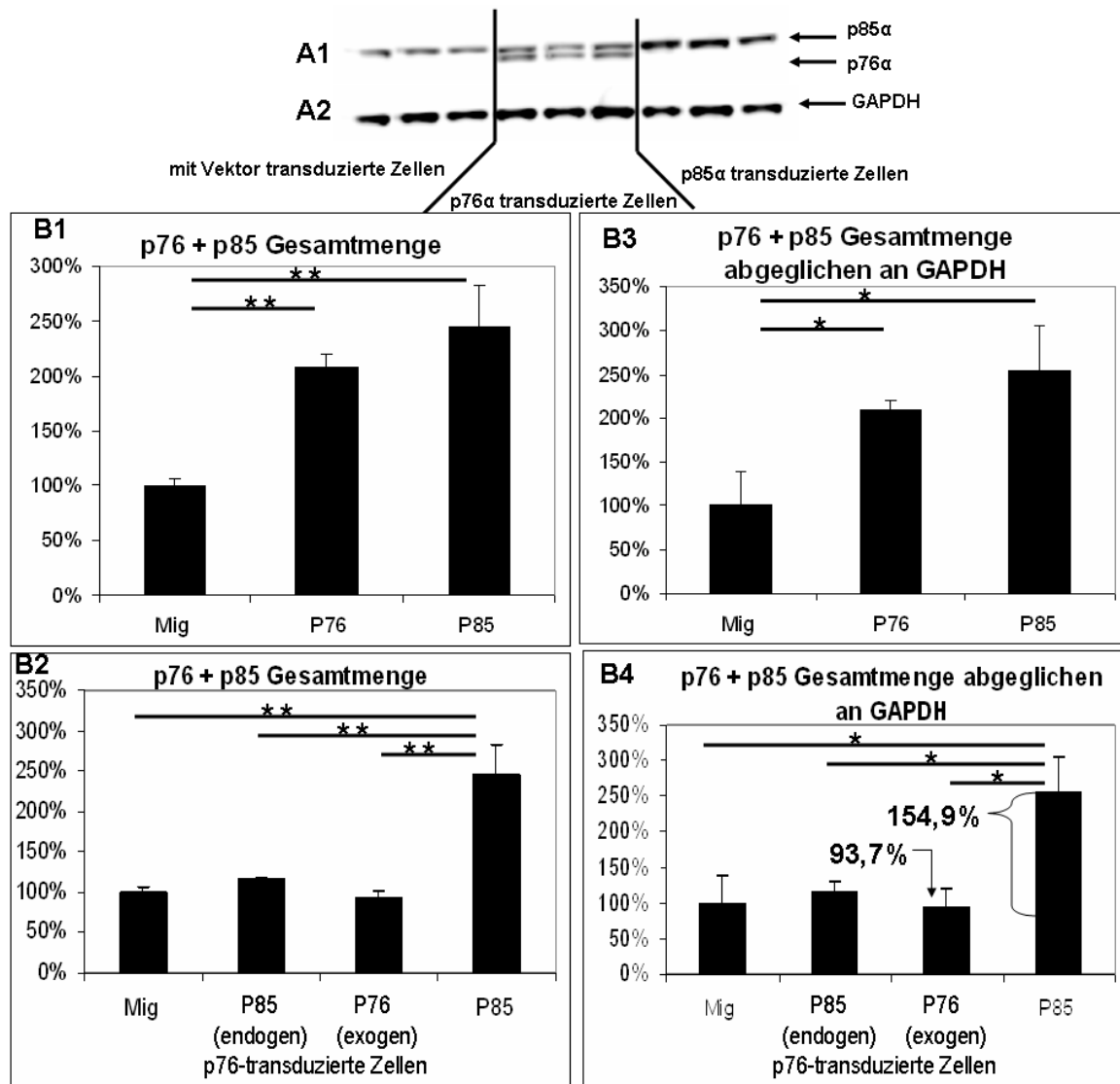


Abb. 31: Expression von p76α und p85α in NIH3T3 Zellen nach Transduktion. Western Blot Bilder: Darstellung der: A1) Mengen an p76α bzw. p85α; A2) Mengen an GAPDH. Western Blot Analysen: Darstellung der: B1) absoluten p76α- bzw. p85α-Mengen, sowie B3) p76α- bzw. p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. In den Abbildungen B2) und B4) ist die Proteinmenge der mit p76α transduzierten Zellen in dem endogenen Proteinanteil (das wildtyp p85α-Protein) und exogenen Proteinanteil (das mutierte, durch Transduktion hinzugefügte p76α-Protein) aufgeteilt. In den Abbildungen B3) und B4) sind die p76α- und p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76α oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gekennzeichnet. Mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,005$ gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Dieser Versuch wurde über 25-mal wiederholt. Jede Wiederholung brachte das gleiche Ergebnis. Für weitere Einzelheiten s. Text.

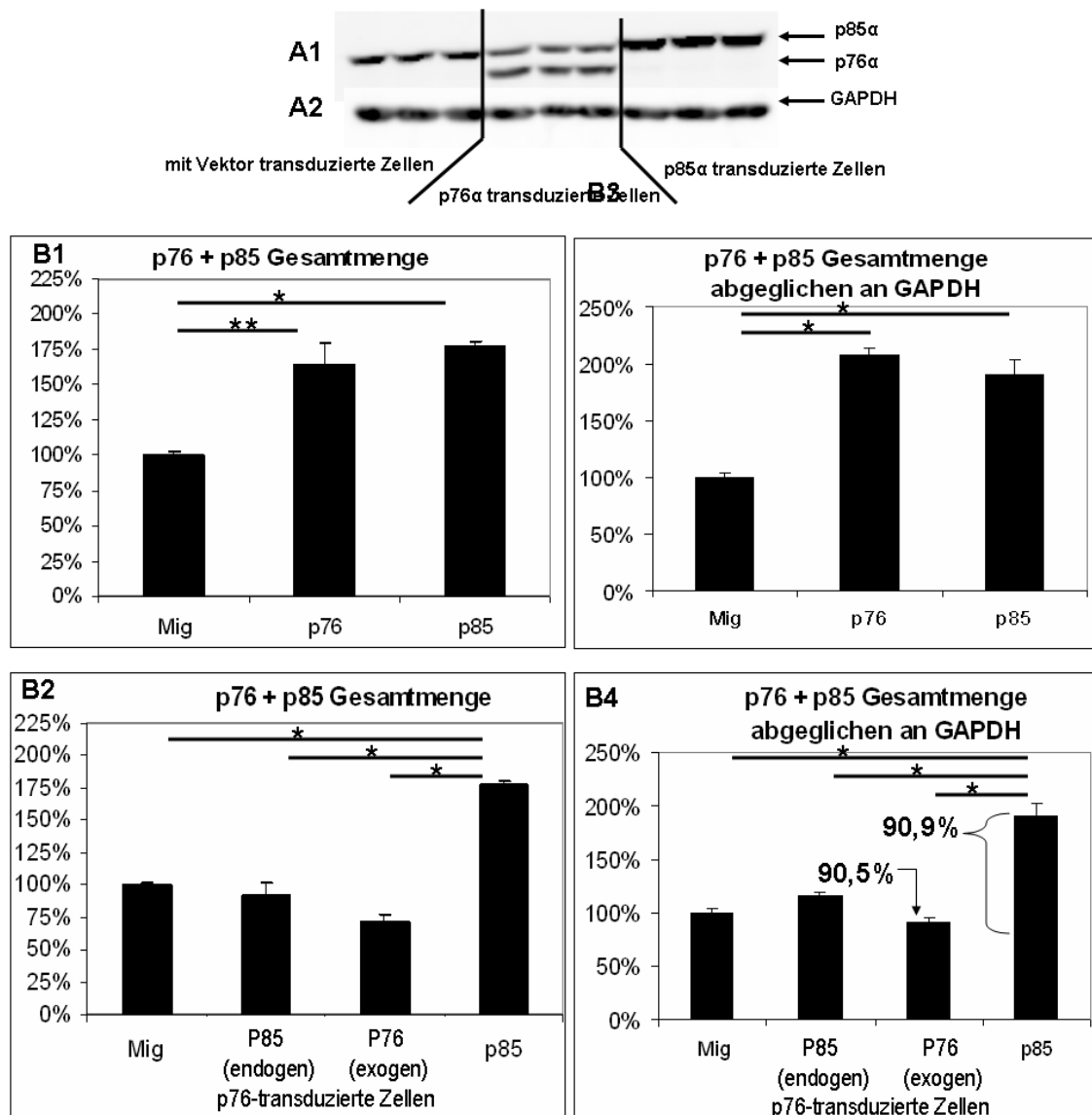


Abb. 32: Expression von p76α und p85α in PG13 Zellen nach Transduktion. Western Blot Bilder: Darstellung der: A1) Mengen an p76α bzw. p85α; A2) Mengen an GAPDH. Western Blot Analysen: Darstellung der: B1) absoluten p76α- bzw. p85α-Mengen, sowie B3) p76α- bzw. p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. In den Abbildungen B2) und B4) ist die Proteinmenge der mit p76α transduzierten Zellen in dem endogenen Proteinanteil (das wildtyp p85α-Protein) und exogenen Proteinanteil (das mutierte, durch Transduktion hinzugefügte p76α-Protein) aufgeteilt. In den Abbildungen B3) und B4) sind die p76α- und p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76α oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,0005$ gekennzeichnet. Mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,005$ gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Die Transduktion der PG13 Zellen mit dem p85 α -Konstrukt führt zu einer Zunahme der p85 α -Menge auf etwa 190,9% $\pm$ 12,1% (Abb. 32). Nach Transduktion der Zellen mit dem p76 α -Konstrukt, ist das mutierte p76 α -Protein nachweisbar, in einer Menge die etwa 90,5% $\pm$ 4,4% der endogenen p85 α -Menge entspricht. Die p85 α -Menge in p76 α transduzierten Zellen (endogenes Protein in B4) ist ähnlich der p85 α -Menge in mit Vektor transduzierten Zellen.

4.2.2.2. Akt-Phosphorylierung nach p76 α -Expression und p85 α -Überexpression

Als nächstes wurde untersucht, ob der Gentransfer zu Unterschieden bei der Ser473-Phosphorylierung von Akt führt.

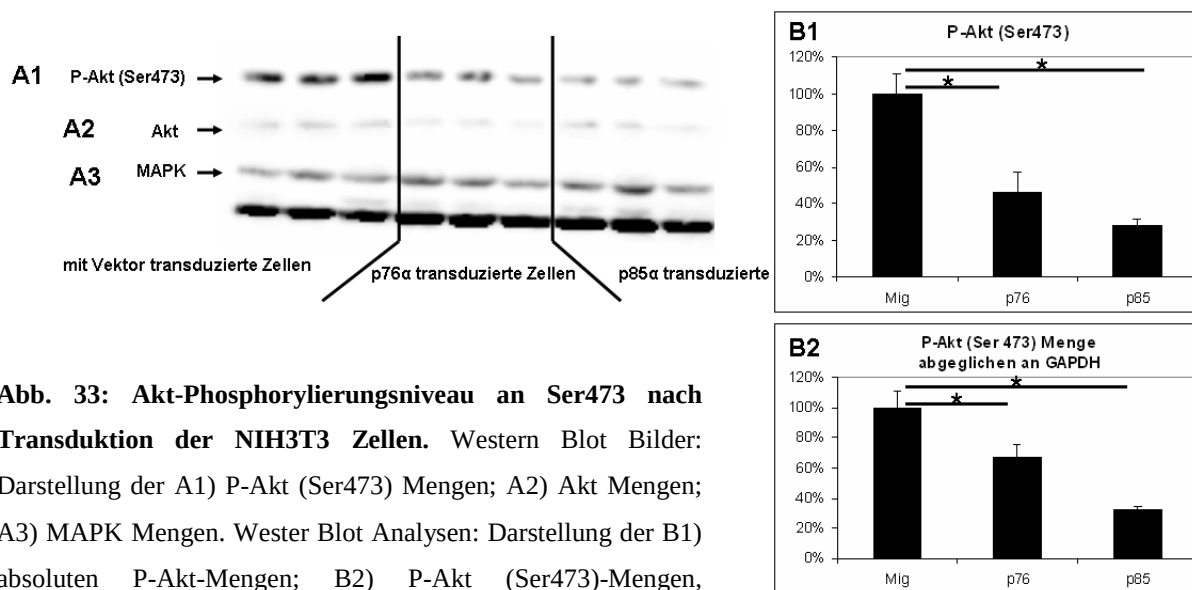


Abb. 33: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der NIH3T3 Zellen. Western Blot Bilder: Darstellung der A1) P-Akt (Ser473) Mengen; A2) Akt Mengen; A3) MAPK Mengen. Wester Blot Analysen: Darstellung der B1) absoluten P-Akt-Mengen; B2) P-Akt (Ser473)-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ MAPK.

Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,005$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis.

Dafür wurden im Western Blot die Mengen von an Ser473 phosphoryliertem Akt gemessen und an die MAPK-Mengen abgeglichenen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen) (Abb. 33). Überexpression von p76 α führt zu einer signifikanten Abnahme der Akt-Phosphorylierung an Ser473 um 32,9% $\pm$ 9% (nach

Abgleich an das „Haus-Keeping-Gen“ MAPK), verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in NIH3T3 Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden. Überexpression von p85 α führt zu einer Abnahme der Akt-Phosphorylierung um $66,5\% \pm 2,8\%$ (nach Abgleich an GAPDH), verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden.

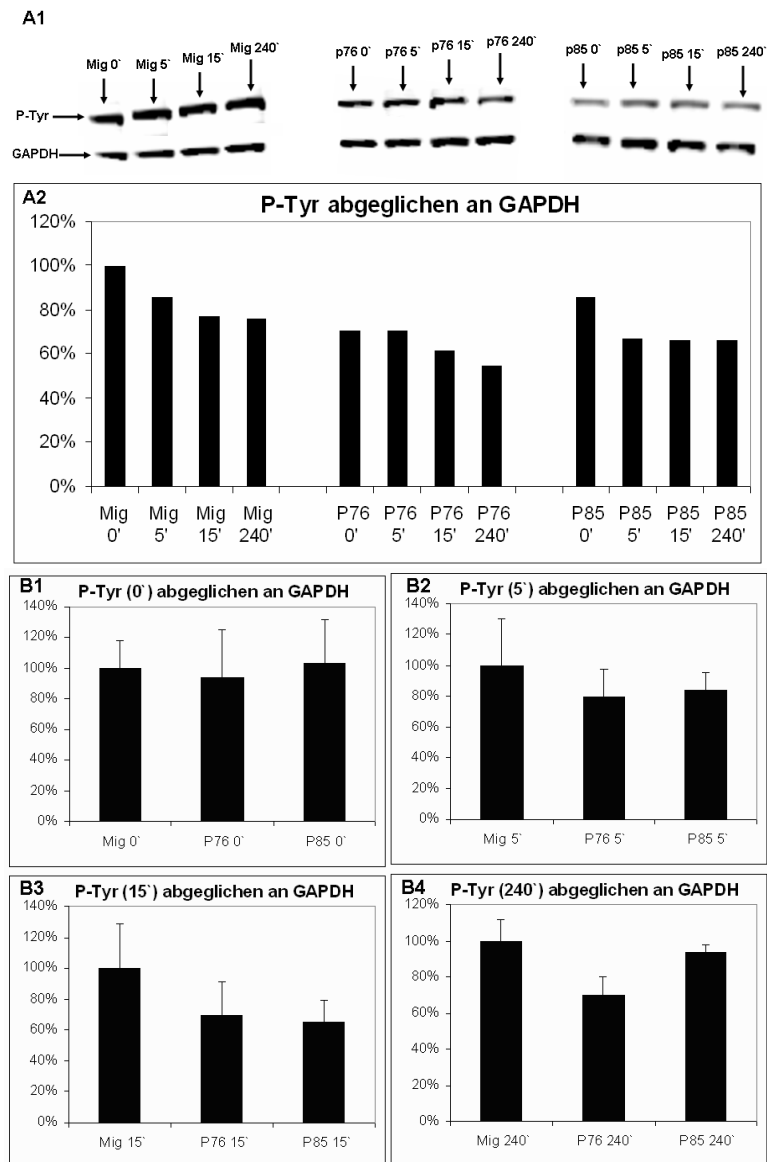
In PG13 Zellen zeigten die Versuche ähnliche Ergebnisse.

4.2.2.3. EGF-Stimulationsabhängige Akt-Phosphorylierung nach p76 α -Expression und p85 α -Überexpression

Als nächster Schritt wurde die Akt-Phosphorylierung an Ser473 nach EGF-Stimulation mit 10 nM EGF Endkonzentration untersucht. Es wurde eine Zeitkinetik untersucht, wo gehungerte (über 16 Stunden in Medium mit nur 0,5%-igem fötalem Kälberserum / FCS) NIH3T3 Zellen 0', 5', 15' und 240' nach Stimulation mit EGF, lysiert und im Western Blot analysiert wurden. Zuerst sollte die EGF-Stimulation anhand der Phosphorylierung der Tyrosinreste am EGF-Rezeptor untersucht werden (Abb. 34). Überraschenderweise ist der EGF-Rezeptor in den NIH3T3 Zellen auch vor Stimulation mit EGF (0') in einem phosphorylierten Zustand. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors vor der Stimulation und zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation mit EGF beobachtet. Es wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors zwischen den Vektor-, p76 α - und p85 α -transduzierten Zellen beobachtet. Die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors war in allen Proben weitgehend gleich.

Abb. 34: Tyr-Phosphorylierungsniveau des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation positiv

transduzierter NIH3T3 Zellen. A1) Western Blot Bilder: Darstellung der P-Tyr und GAPDH Mengen von Mig-, p76- und p85 transduzierten Zellen, jeweils 0', 5', 15' und 240' nach Stimulation mit EGF. Die entsprechenden Western Blot Analysen sind in A2 dargestellt. Western Blot Analysen: Darstellung der P-Tyr Mengen, abgeglichen an GAPDH Mengen: B1) vor EGF-Stimulation (0' nach Stimulation mit EGF); B2) 5' nach Stimulation mit EGF; B3) 15' nach Stimulation mit EGF; B4) 240' nach Stimulation mit EGF. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge



dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert in B1) - B4) entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis.

Als nächstes wurde die Phosphorylierung von Akt an Ser473 untersucht (Abb. 35). Das P-Akt Niveau ist in gehungerten (über 16 Stunden in Medium mit nur 0,5%-igem fötalem Kälberserum / FCS) NIH3T3 Zellen deutlich geringer, als in mit normalem Medium kultivierten NIH3T3 Zellen. In den in normalem Medium gehaltenen Zellen zeigt sich die oben beschriebene signifikante Abnahme der Akt-Phosphorylierung an Ser473 um $72,1\% \pm 5,3\%$ nach Überexpression von p76 α und um $54,9\% \pm 2,0\%$ nach Überexpression von p85 α (nach Abgleich an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH) verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in NIH3T3 Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden.

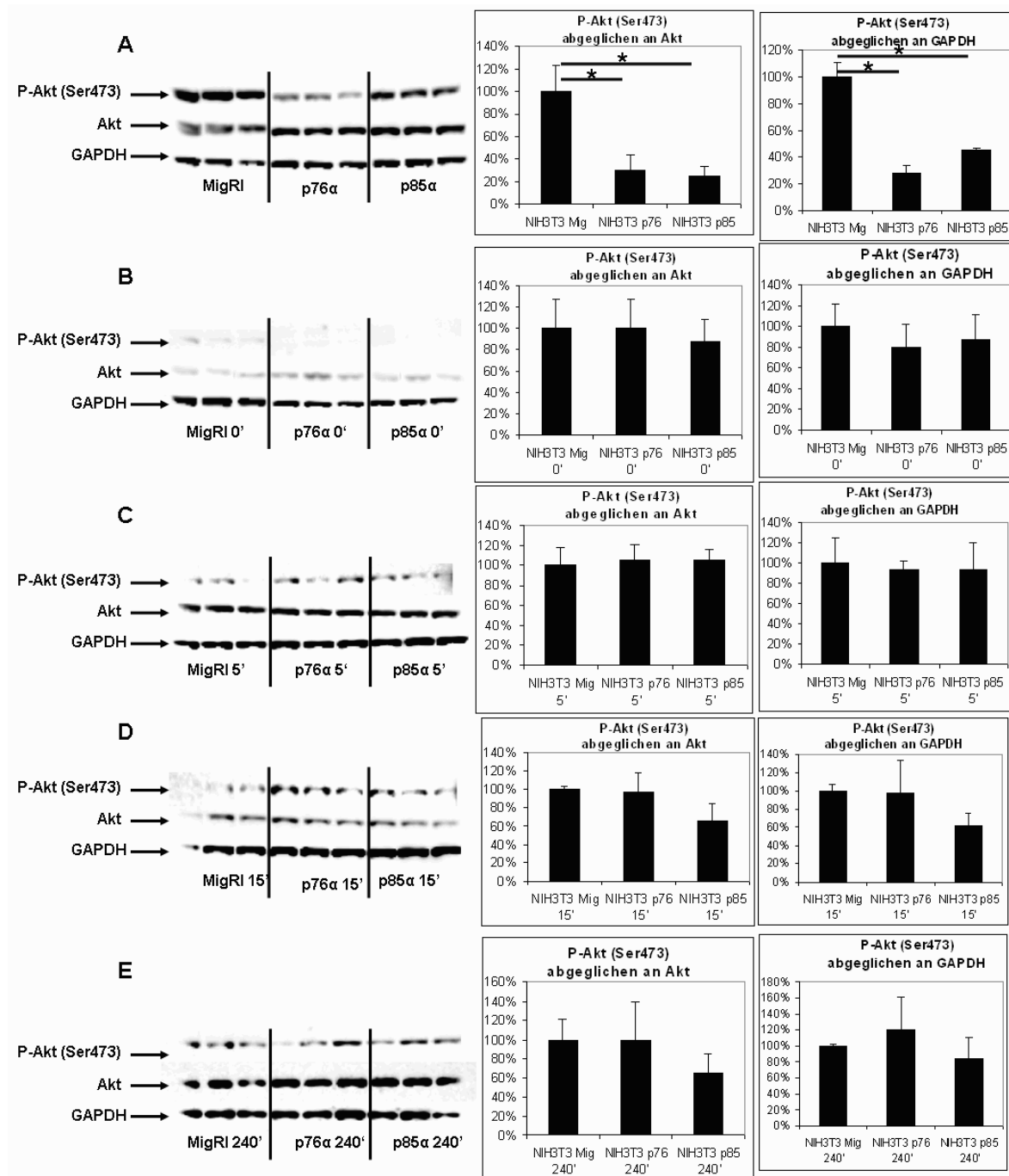


Abb. 35: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach EGF-Stimulation positiv transduzierter NIH3T3 Zellen. Dargestellt sind die Western Blot Bilder von P-Akt (Ser 473), Akt und GAPDH, sowie die Analysen der P-Akt (Ser473) Mengen, abgeglichen an Akt und GAPDH. A) positiv sortierte NIH3T3 Zellen; B) gehungerte (s. Text), NIH3T3 Zellen vor EGF-Stimulation (0' nach Stimulation mit EGF); C) NIH3T3 Zellen 5' nach Stimulation mit EGF; D) NIH3T3 Zellen 15' nach Stimulation mit EGF; E) NIH3T3 Zellen 240' nach Stimulation mit EGF. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76α oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen jeweils als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Diese Unterschiede der Menge an P-Akt (Ser473) sind in gehungerten NIH3T3 Zellen (0' Stimulation) nicht mehr nachweisbar. Auch nach EGF-Stimulation (5', 15' und 240' nach Stimulation) bleibt der Unterschied der P-Akt (Ser473) Menge in mit Vektor-, p76 α - und p85 α transduzierten Zellen nicht signifikant.

4.2.3. Expression von p76 α bzw. p85 α in CD34⁺ Zellen

Die CD34⁺ hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut wurden aufgereinigt, für 48 Stunden in Serum-freien Medium mit den Zytokinen Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-6 (IL-6), Thrombopoetin (TPO) und FLT3-Ligand (*fms-lik tyrosine kinase 3-Ligand*) gehalten und danach mit RD114 pseudotypisierten Retroviren transduziert (Abb. 36).

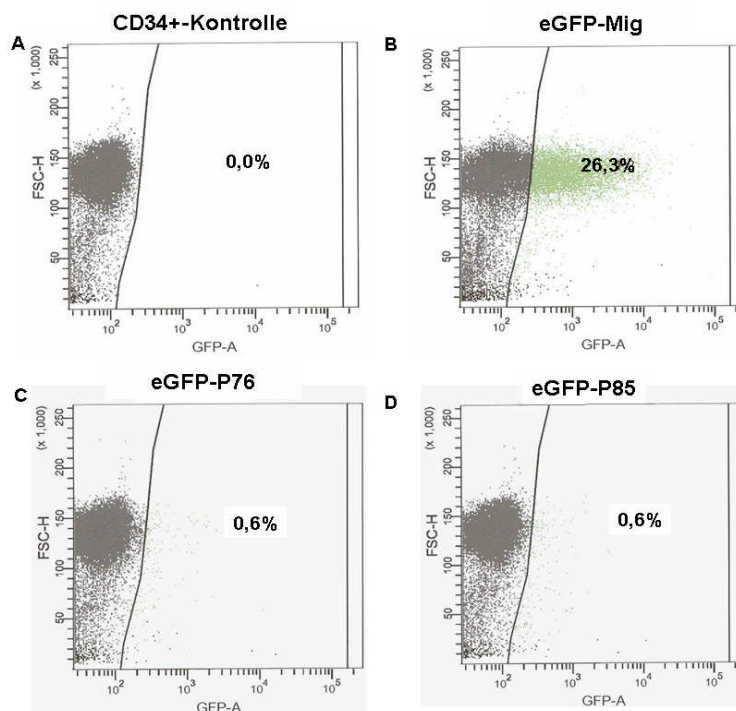


Abb. 36: Sorten der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34⁺ Zellen. A) Nicht transduzierte CD34⁺ Zellen exprimieren kein EGFP; B) 26,3% der mit dem Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C) 0,6% der mit p76 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; D) 0,6% der mit p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert. (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet).

4.2.3.1. GM-CSF-abhängige Koloniebildung nach p76 α - bzw. p85 α -Expression

Jeweils 1000 EGFP⁺ sortierte CD34⁺ Zellen wurden in Methylzellulose, versetzt mit einer Konzentration von 10 ng/ml GM-CSF, kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt, wobei eine Kolonie aus mindestens 20 Einzelzellen bestand.

Erwartungsgemäß zeigen die Kolonien der positiv sortierten Zellen eine grüne Fluoreszenz (Abb. 37).

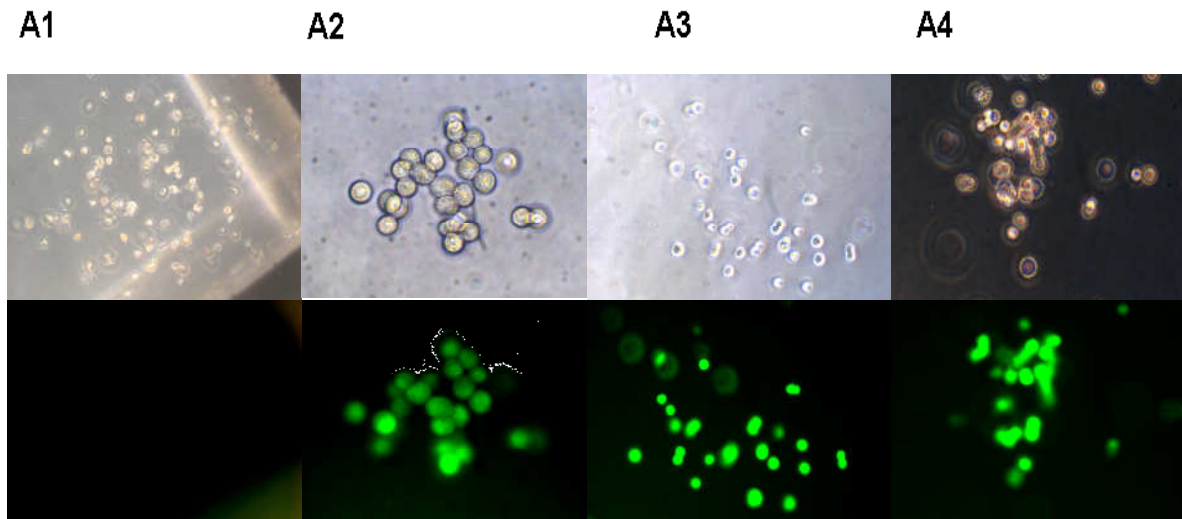


Abb. 37: GM-CSF-abhängige Koloniebildung der CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Transduktion. Fluoreszenzmikroskop-Bilder der transduzierten CD34⁺ Zellen. Dargestellt sind die Kolonien nach 14 Tagen. Zu sehen ist die durch EGFP-hervorgerufene grüne Fluoreszenz in den transduzierten Zellen. A1) in nicht transduzierten Zellen ist kein EGFP vorhanden; A2) mit MigRI-Vektor transduzierte Zellen; A3) p76 α transduzierte Zellen; A4) p85 α transduzierte Zellen.

Es wurde beobachtet, dass die mit dem retroviralen Koexpressionsvektor transduzierten CD34⁺ Zellen, keine Hemmung des Wachstums darstellten, während es bei den mit p76 α oder p85 α transduzierten Zellen zu einer signifikanten Erniedrigung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung, um 87,0% $\pm$ 19,0% bzw. 76,8% $\pm$ 6,6% kommt (Abb. 38).

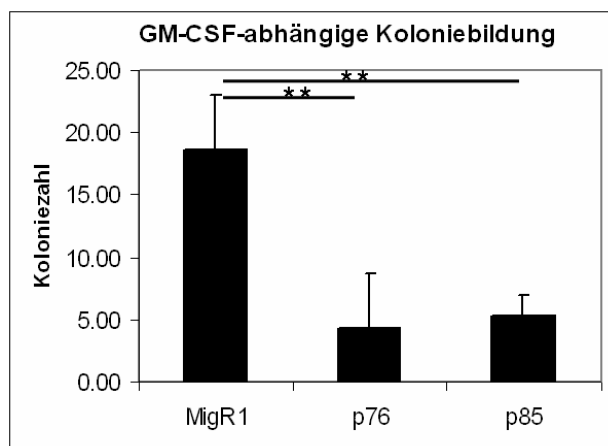


Abb. 38: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34⁺ Zellen. Dargestellt ist die Zahl der Kolonien nach 14 Tagen. Die Koloniezahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺ Zellen, kultiviert in Methyllzellulose, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, bestimmt. Mit (*) sind signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor, p76 α oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Koloniezahl dargestellt.

Wenn die transduzierten CD34⁺ Zellen in Methylzellulose, verstimmt mit GM-CSF, SCF, IL-6, Flt3-Ligand und Thrombopoetin kultiviert wurden (Vollmedium), zeigten sie ein ähnliches Koloniebildung-Verhalten. So bildeten die 1000 mit Vektor transduzierten CD34⁺ Zellen 29 Kolonien, während die mit p76 α oder p85 α transduzierten Zellen nur 13, bzw. 3 Kolonien bildeten.

4.2.4. Expression von p76 α bzw. p85 α *in vitro*

Zur *in vitro* Transkription / Translation des p76 α - und p85 α -Gens wurde das „TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ von Promega verwendet. Das p76 α - und p85 α -Gen wurden im pBluescript II SK (+)-Vektor umklontiert, wo sie der Regulation eines T7-Promotors unterliegen. Die *in vitro* Transkription / Translation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde das hergestellte Protein durch PAGE aufgetrennt und durch eine Western Blot Analyse untersucht.

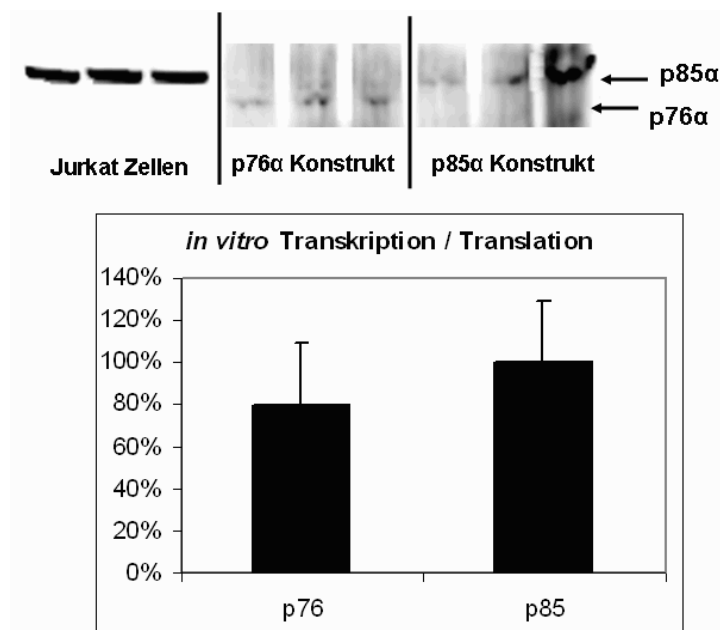


Abb. 39: Western Blot Analyse nach *in vitro* Transkription und Translation des p76 α - und p85 α -Konstrukts. Links sind Proteinlysate aus Jurkat Zellen aufgetragen; in der Mitte ist das Produkt nach *in vitro* Transkription und Translation des p76 α -Konstrukts aufgetragen; rechts ist das Produkt nach *in vitro* Transkription und Translation des p85 α -Konstrukts aufgetragen. Beide Konstrukte wurden im gleichen Maße transkribiert und translatiert (die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant). Auf der Abszisse ist

dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge nach *in vitro* Transkription und Translation des p85 α -Konstrukts als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Links wurden Proteinlysate aus Jurkat Zellen aufgetragen, da in diesen Zellen nur p85 α exprimiert wird. Es ist zu sehen, dass in den p76 α - und p85 α -Reaktionsansätze Proteine hergestellt wurden, die eine Größe von 76 kDa und 85 kDa haben. Daher ist es davon auszugehen, dass es sich dabei um das p76 α - und p85 α -Protein handelt. Beide Konstrukte wurden im gleichen Maße transkribiert und translatiert, sodass am Ende die Menge an p76 α - und p85 α -Protein ähnlich war (die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant).

4.3 Überexpression der p85 α -Untereinheit und ihre Wirkung auf das Wachstum von normalen und leukämischen hämatopoetischen Zellen

Um die Auswirkungen der Überexpression der p85 α -Untereinheit in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden CD34⁺ Zellen von gesunden Spendern, CD34⁺ Zellen von einem Patienten mit OMF in einer Blastenkrise, humane embryonale Nierenzellen HEK293-gp, sowie diverse Leukämie-Zelllinien untersucht, die Mutationen zeigen, die häufig in menschlichen Tumoren und Leukämien vorkommen.

4.3.1. Herstellung der Retroviren mit Helferzellen mit einer stabilen Expression der Konstrukte

Zur Herstellung von Überständen mit hohen Virentiter, wurden 293-gp Zellen mit RD114- oder Amphi-VSV-G-pseudotypisierten Retroviren transduziert. Die Zellen, die eine stabile Expression der Konstrukte nach LipofectamineTM-Transfektion zeigten, wurden sortiert und in Kultur genommen (Abb. 40).

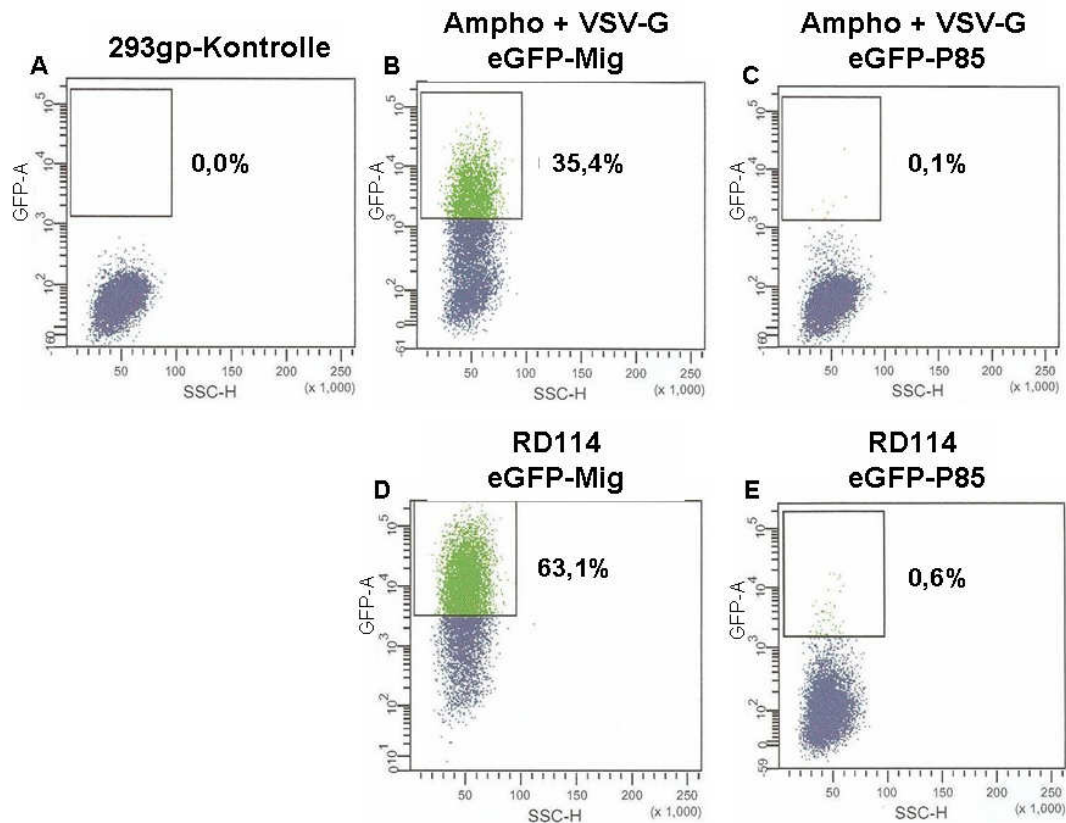


Abb. 40: 1. FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114- oder amphotrop+VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten 293-gp Zellen. A) Nicht transduzierte 293-gp Zellen exprimieren kein EGFP; B) 35,4% der mit den amphotrop+VSV-G pseudotypisierten MigRI-Viren transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C) 0,1% der mit den amphotrop+VSV-G pseudotypisierten p85 α -Viren transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; D) 63,1% der mit den RD114 pseudotypisierten MigRI-Viren transduzierten Zellen, wurden positiv sortiert; E) 0,6% der mit den RD114 pseudotypisierten p85 α -Viren transduzierten Zellen, wurden positiv sortiert. Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

Die Zellen wurden ein zweites mal sortiert und nur die stark positiven Zellen wurden als Helferzellen verwendet (Abb. 41). Wie in Tab. 9 zu erkennen ist, konnte durch das zweimalige Sortieren der Helferzelllinie auf die am stärksten EPFG-positiven Zellen der Titer der Viren um 10-fach (Vektor) bzw. 40-fach (p85) gesteigert werden.

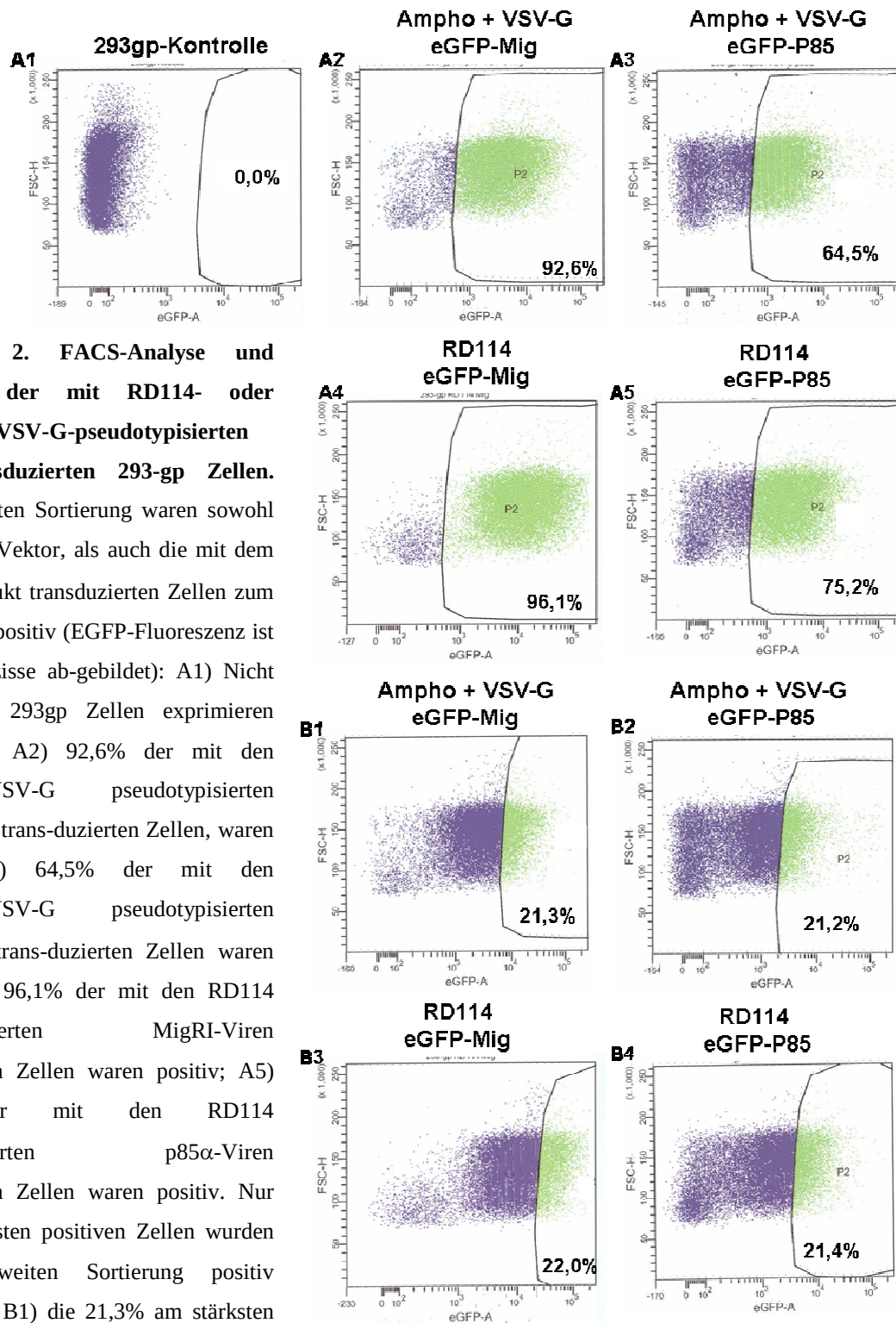


Abb. 41: 2. FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114- oder amphotrop+VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten 293-gp Zellen.

Nach der ersten Sortierung waren sowohl die mit dem Vektor, als auch die mit dem p85 α -Konstrukt transduzierten Zellen zum größten Teil positiv (EGFP-Fluoreszenz ist auf der Abszisse ab-gebildet): A1) Nicht transduzierte 293gp Zellen exprimieren kein EGFP; A2) 92,6% der mit den amphotrop+VSV-G pseudotypisierten MigRI-Viren trans-duzierten Zellen, waren positiv; A3) 64,5% der mit den amphotrop+VSV-G pseudotypisierten p85 α -Viren trans-duzierten Zellen waren positiv; A4) 96,1% der mit den RD114 pseudo-typisierten MigRI-Viren transduzierten Zellen waren positiv; A5) 75,2% der mit den RD114 pseudotypisierten p85 α -Viren transduzierten Zellen waren positiv. Nur die am stärksten positiven Zellen wurden bei der zweiten Sortierung positiv selektioniert: B1) die 21,3% am stärksten positiven, mit amphotrop+VSV-G

pseudotypisierten MigRI-Viren transduzierten Zellen, wurden sortiert; B2) die 21,2% am stärksten positiven, mit amphotrop+VSV-G pseudotypisierten p85 α -Viren transduzierten Zellen wurden sortiert; B3) die 22,0% am stärksten positiven, mit RD114 pseudotypisierten MigRI-Viren transduzierten Zellen wurden sortiert; B4) die 21,4% am stärksten positiven, mit RD114 pseudotypisierten p85 α -Viren transduzierten Zellen wurden sortiert. Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

Pseudotypisierung	Virentiter (Vektor) (inf. Partikel / ml)		Virentiter (p85 α) (inf. Partikel / ml)	
Sortierung der Helferzelllinie	Ohne Sortierung	Nach 2 Sortierungen	Ohne Sortierung	Nach 2 Sortierungen
Amphotrop+VSV-G	$7,1 \times 10^5$	$7,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$8,6 \times 10^6$
RD114	$8,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$8,0 \times 10^6$

Tab. 9: Titer der Virusüberstände, produziert mit Hilfe 293-gp Zellen mit stabiler Expression der Konstrukte

4.3.2. GM-CSF-abhängige Koloniebildung der CD34⁺ Zellen nach p85 α -Transduktion

Die CD34⁺ hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut wurden, wie oben beschrieben (s. 4.2.3.), aufgereinigt, für 48 Stunden in Serum-freien Medium mit den Zytokinen Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-6 (IL-6), Thrombopoetin (TPO) und FLT3-Ligand (*fms-lik tyrosine kinase 3- Ligand*) gehalten und danach mit RD114 pseudotypisierten Retroviren transduziert (Abb. 42).

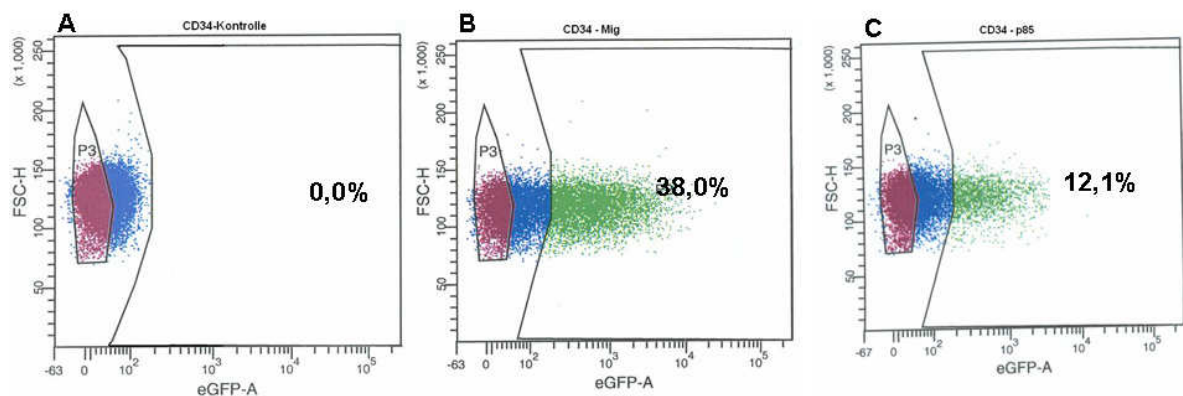


Abb. 42: FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34⁺ Zellen. A) Nicht transduzierte CD34⁺ Zellen exprimieren kein EGFP; B) 38,0% der mit dem Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C) 12,1% der mit p85 α transduzierten Zellen sind EGFP-positiv und wurden positiv sortiert. Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

4.3.2.1. Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion

Jeweils 1000 EGFP⁺ sortierte CD34⁺ Zellen wurden in 100 μ l Stemsan Medium, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, kultiviert. Nach 14 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Die CD34⁺ Zellen, die mit dem p85 α -Konstrukt transduziert wurden, bildeten $76,8\% \pm 3,5\%$ weniger Kolonien als die CD34⁺ Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden (Abb. 43A). Um die Ergebnisse zu bestätigen, wurde das Experiment zwei Mal wiederholt. CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut von weiteren gesunden Spendern wurden gereinigt, mit RD114-pseudotypisierten Viren transduziert und sortiert (Sortbilder sind nicht abgebildet). Die Ergebnisse dieser zwei Versuche bestätigen die Hemmung der Koloniebildung nach p85 α -Transduktion (um $58,7\% \pm 5,9\%$, bzw. $54,2\% \pm 1,5\%$) (Abb. 43B und C).

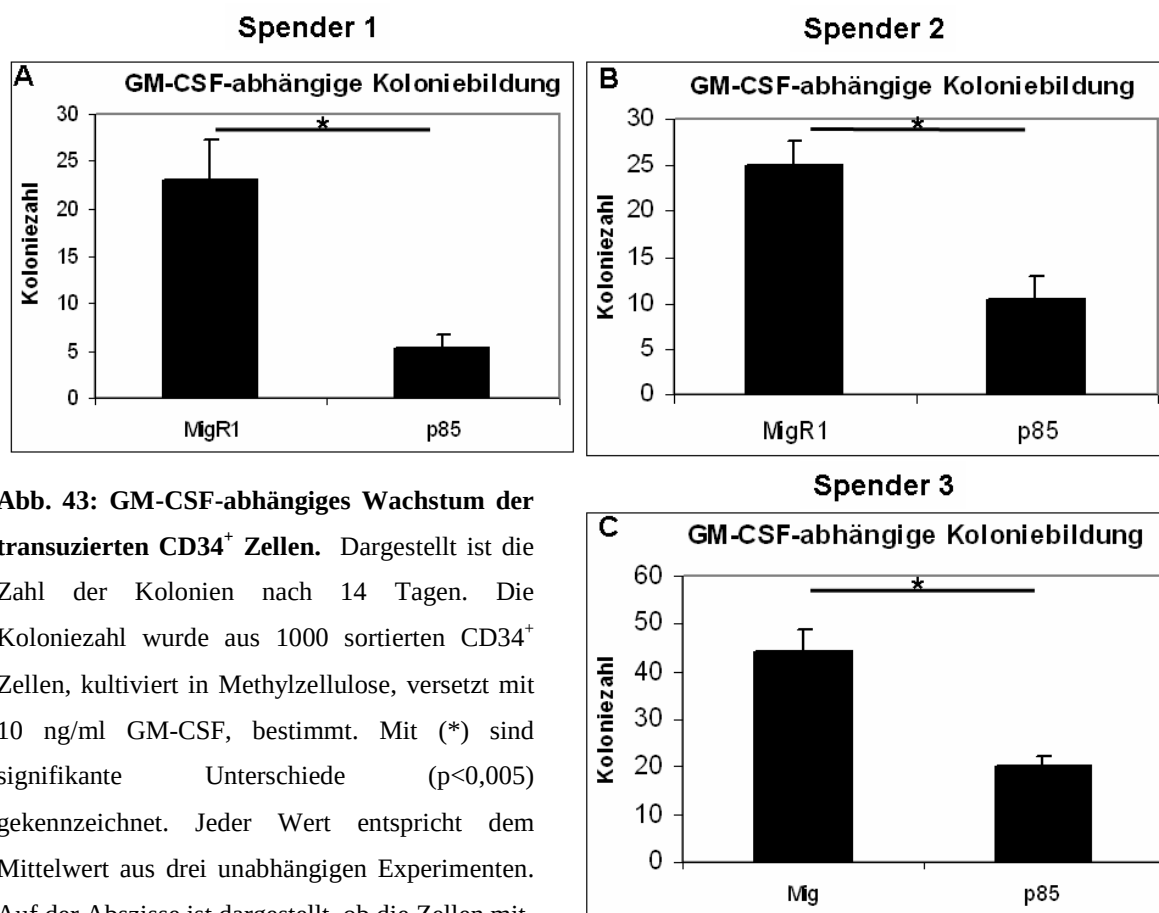


Abb. 43: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34⁺ Zellen. Dargestellt ist die Zahl der Kolonien nach 14 Tagen. Die Koloniezahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺ Zellen, kultiviert in Methylzellulose, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, bestimmt. Mit (*) sind signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Koloniezahl dargestellt.

4.3.2.2. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der GM-CSF-Konzentration

Als nächstes sollte die Abhängigkeit der Hemmung der Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der GM-CSF-Konzentration untersucht werden. Dafür wurden CD34⁺ Zellen transduziert und sortiert (s. oben). Jeweils 1000 von diesen EGFP⁺ sortierten CD34⁺ Zellen wurden in 100 μ l Stemsan Medium, versetzt mit unterschiedlichen GM-CSF-Konzentrationen, kultiviert (0 ng/ml, 0,001 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml GM-CSF). Nach 14 Tagen wurde die Koloniezahl bestimmt. Während bei sehr niedrigen GM-CSF-Konzentrationen kaum Kolonien zu sehen waren, konnte bei steigenden GM-CSF-Konzentrationen eine vermehrte Koloniebildung beobachtet werden. Auch hier zeigte sich eine Hemmung der Koloniebildung nach p85 α -Transduktion. Bis zu einer GM-CSF-Konzentration von 0,1 ng/ml sind nur einzelne Kolonien entstanden. Bei 1 ng/ml und 10 ng/ml GM-CSF sind deutlich mehr Kolonien entstanden, in beiden Fällen ist die Koloniezahl nach p85 α -Transduktion signifikant kleiner. Bei 1 ng/ml GM-CSF zeigt sich eine Hemmung um 57,4% $\pm$ 8,5%, bei 10 ng/ml GM-CSF zeigt sich eine Hemmung um 57,2% $\pm$ 0,7%. Die mit p85 α transduzierten CD34⁺ Zellen brauchen etwa die 10-fache GM-CSF-Konzentration um die gleiche Koloniezahl zu bilden, wie die mit dem Vektor transduzierten Zellen (Abb. 44).

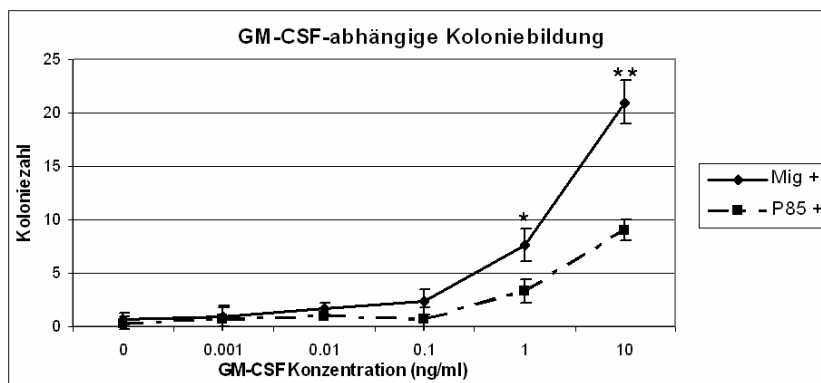


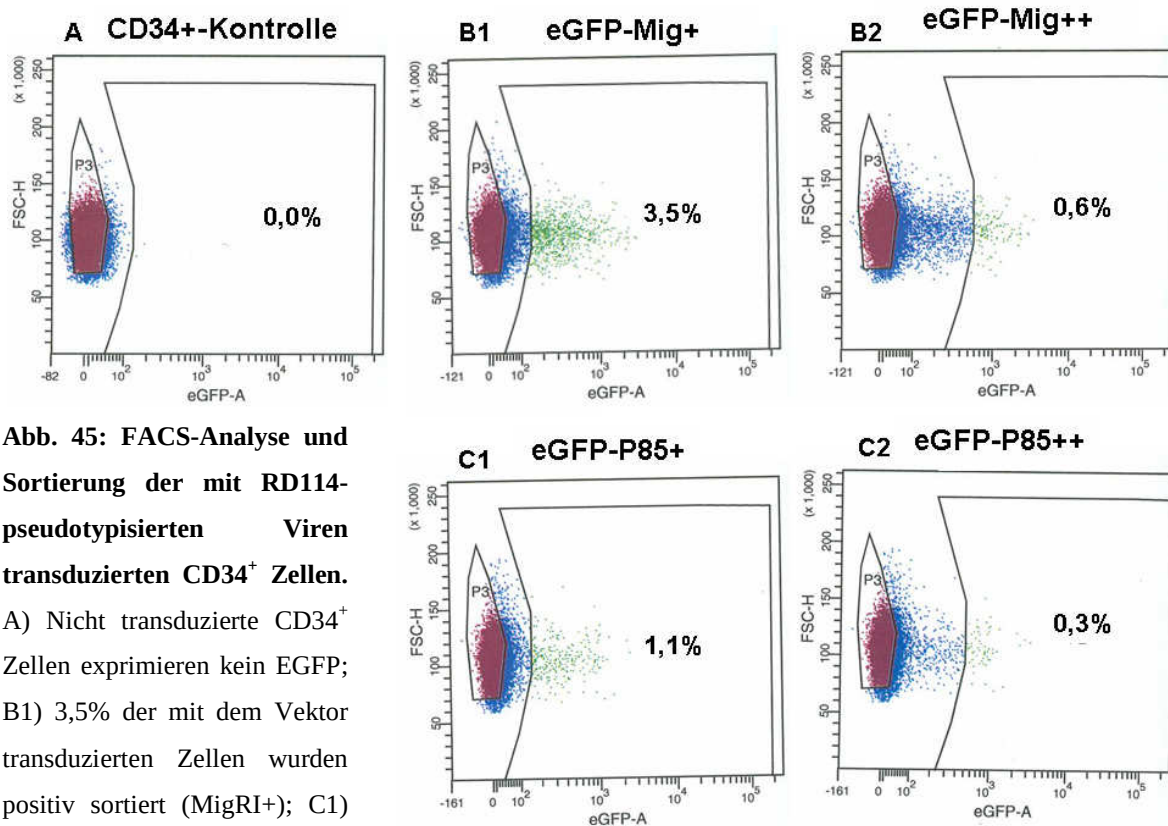
Abb. 44: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34⁺ Zellen bei unterschiedlichen GM-CSF-Konzentrationen.

Dargestellt ist die Zahl der Kolonien nach 14

Tagen. Die Koloniezahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺ Zellen, kultiviert in Methylzellulose, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen von GM-CSF (0 ng/ml, 0,001 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml GM-CSF), bestimmt. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,01$ gekennzeichnet. Mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,001$ gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Abszisse ist die GM-CSF-Konzentration dargestellt, in der die Zellen kultiviert wurden, auf der Ordinate ist die Koloniezahl dargestellt.

4.3.2.3. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der Stärke der p85 α -Überexpression

Als nächstes sollte untersucht werden, ob diese Hemmung der Koloniebildung von der Stärke der p85 α -Überexpression abhängig ist. Dafür wurden die CD34⁺ Zellen nach der Transduktion so sortiert, dass eine Zellpopulation mit hoch-EGFP-positiven Zellen (im Folgenden als MigRI⁺⁺ bzw. p85⁺⁺ genannt) und eine mit niedrig-EGFP-positiven Zellen (im Folgenden als MigRI⁺ bzw. p85⁺ genannt) gewonnen wurde. (Abb. 45).



p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (p85⁺); B2) die 0,6% am stärksten positiven Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden, wurden sortiert (MigRI⁺⁺); C2) die 0,3% am stärksten positiven Zellen, die mit p85 α transduziert wurden, wurden sortiert (p85⁺⁺). Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

Jeweils 1000 von diesen EGFP⁺ sortierten CD34⁺ Zellen wurden in 100 μ l Stemspan Medium, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, kultiviert. Nach 14 Tagen wurde die Zellzahl bestimmt. Es konnte erneut die Hemmung der Koloniebildung nach p85 α -Transduktion beobachtet werden. Die hoch-p85-positiven CD34⁺ Zellen zeigten jedoch nur eine geringfügig und statistisch nicht signifikant stärkere Hemmung der

Koloniebildung (um $13,4\% \pm 11,2\%$) im Vergleich zu den niedrig-p85-positiven Zellen (Abb. 46).

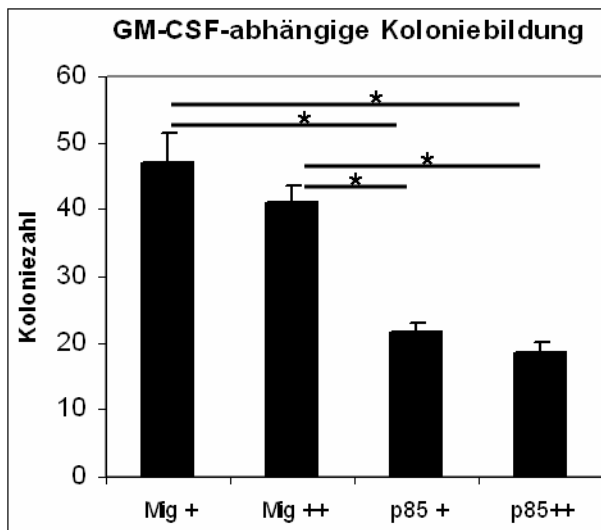


Abb. 46: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34⁺ Zellen. Dargestellt ist die Zahl der Kolonien nach 14 Tagen. Die Koloniezahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺ Zellen, kultiviert in Methylzellulose, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, bestimmt. Mit (*) sind signifikante Unterschiede ($p < 0,005$) gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinate ist die Koloniezahl dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden, unterteilt in hoch- und niedrig-EGFP-positiven Zellen. Für Einheiten s. Text.

4.3.2.4. GM-CSF-abhängige Proliferation nach p85 α -Transduktion

Als letztes wurde die Proliferation der CD34⁺ Zellen untersucht. Auch hier zeigte sich eine Hemmung der Proliferation nach p85 α -Transduktion um $60,9\% \pm 82,8\%$ zu CD34⁺ Zellen, die mit dem Vektor transduziert wurden. Aufgrund der großen Schwankungen in der Zellzahl, waren diese Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 47).

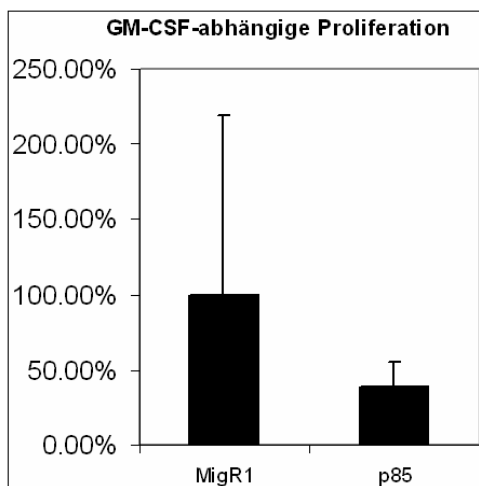


Abb. 47: GM-CSF-abhängige Proliferation der transduzierten CD34⁺ Zellen. Die Zellzahl wurde aus 1000 sortierten CD34⁺ Zellen, kultiviert in StemSpan Medium, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, nach 14 Tagen bestimmt. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Zellzahl dargestellt, wobei die Zahl der mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde.

4.3.2.5. GM-CSF-abhängige Akt-Phosphorylierung an Ser473 nach p85 α -Transduktion

Um die GM-CSF-abhängige Hemmung der (Ser473)Akt-Phosphorylierung nach p85 α -Transduktion festzustellen, wurden NIH3T3-Zellen verwendet, die auf der Oberfläche den GM-CSF-Rezeptor exprimieren und über diesen Rezeptor mit GM-CSF stimulierbar sind (Areces et al., 1993). Die Zellen wurden über 2 Stunden in Serum-freiem Medium mit 0,1% BSA gehungert und anschließend mit 20 ng/ml GM-CSF stimuliert. Dann wurden Lysate hergestellt und Western Blot Analysen durchgeführt. Nach p85 α -Transduktion war eine leichte p85 α -Überexpression festzustellen. Nach Hungern der Zellen war ein Unterschied in der (Ser473) Akt-Phosphorylierung von $59,6\% \pm 22,1\%$ zwischen den mit MigRI- und p85 α -transduzierten Zellen zu sehen. Nach GM-CSF-Stimulation ist dieser Unterschied auf $85,5\% \pm 39,2\%$ gestiegen (Abb. 48).

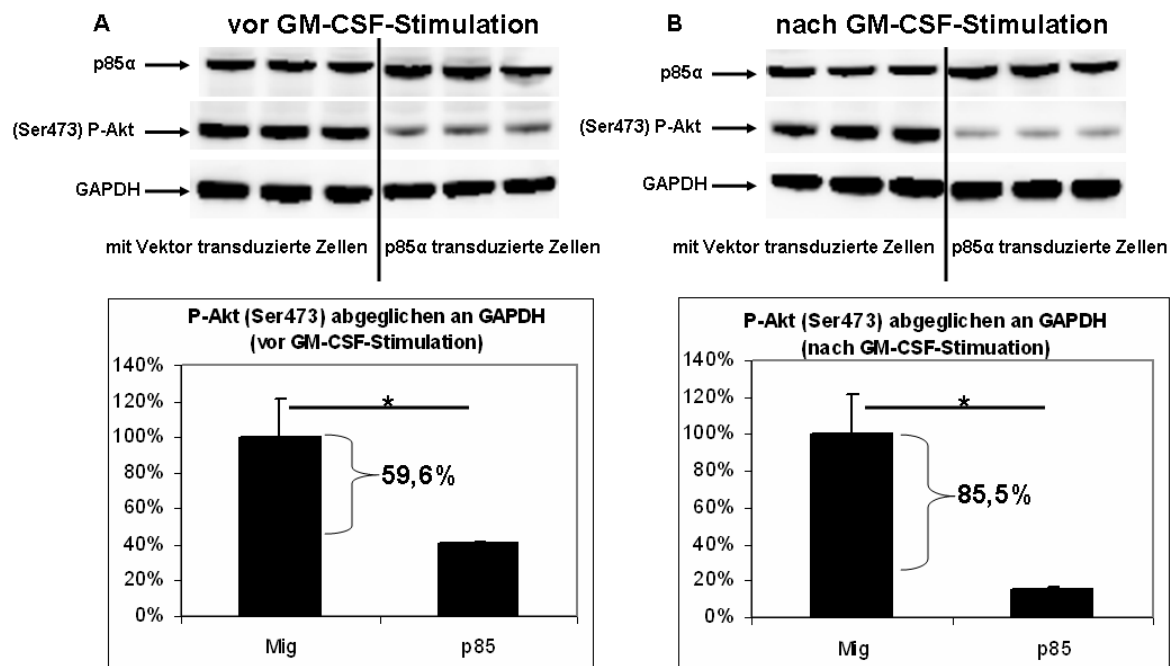


Abb. 48: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 vor und nach GM-CSF-Stimulation positiv transduzierter NIH3T3 Zellen. Dargestellt sind die Western Blot Bilder von p85 α , P-Akt (Ser 473) und GAPDH, sowie die Analysen der P-Akt (Ser473) Mengen, abgeglichen an GAPDH. A) vor GM-CSF-Stimulation; B) nach GM-CSF-Stimulation. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen jeweils als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.3.2.6. p85 α -Transduktion von CD34⁺ Zellen eines Patienten in der Blastenkrise eines myeloproliferativen Syndroms

Die CD34⁺ Zellen wurden aus dem Leukaphereseprodukt gereinigt, transduziert und sortiert (s. oben). Die positiv sortierten Zellen (Abb. 49) wurden in Methylzellulose, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, kultiviert.

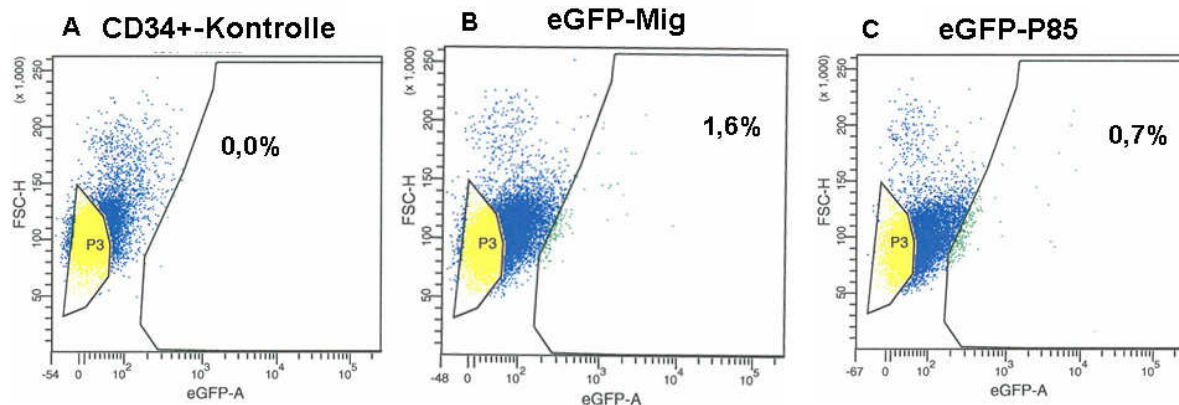


Abb. 49: Sorten der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34⁺ Zellen. A) Nicht transduzierte CD34⁺ Zellen exprimieren kein EGFP; B) 1,6% der mit dem Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; B2) 0,7% der mit p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert. Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

Eine Bestimmung von Koloniezahlen war jedoch nicht möglich, weil die Zellen keine Koloniebildung in Anwesenheit von GM-CSF zeigten. Auch in Stemsan Medium, versetzt mit 10 ng/ml GM-CSF, zeigten diese CD34⁺ Zellen aus dem Leukaphereseprodukt kein Wachstum und starben nach 14 Tagen (Abb. 50).

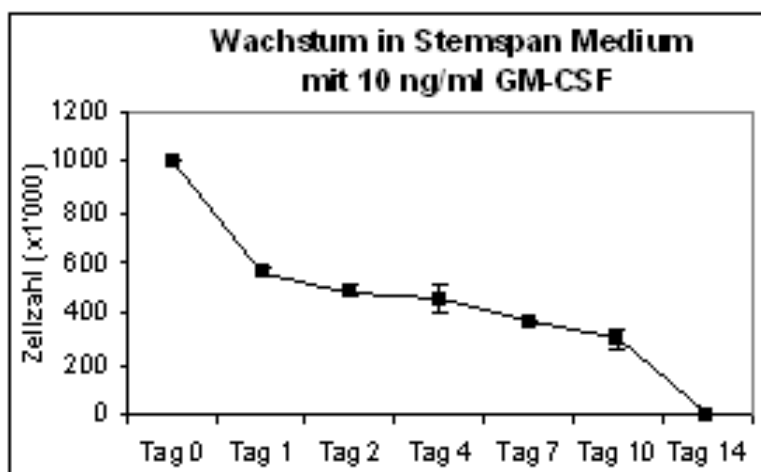


Abb. 50: Proliferation der CD34⁺ Zellen in Stemsan-Medium mit 10 ng/ml GM-CSF. Am Tag 0 wurden 1x10⁶ Zellen/ml ausgesät. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinate ist die Zellzahl (x1'000) dargestellt.

4.3.3. Effekte der p85 α -Transduktion in Leukämie-Zelllinien

Die Überexpression der p85 α -Untereinheit wurde in Leukämie-Zelllinien untersucht, die Mutationen zeigen, die häufig in menschlichen Tumoren und Leukämien vorkommen.

4.3.3.1. Effekte der p85 α -Transduktion in 293-gp Zellen

Die Transduktion und das Sortieren der 293-gp Zellen fand im Rahmen der Herstellung von Zellen mit stabiler Expression der Konstrukte, benutzt zur Herstellung von Virusüberständen, statt (s. 4.3.1.). Es wurden die mit den RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten 293-gp Zellen benutzt.

4.3.3.2. Expressionsnachweis der p85 α -Untereinheit in 293-gp Zellen

Aus den 293-gp Zellen wurden Lysate hergestellt und Western Blot Analysen durchgeführt. Als erstes wurde die Frage erläutert, ob nach der Transduktion der Zellen, das retrovirale Konstrukt funktioniert und es zu einer Expression der Gene auf dem Vektor kommt. Da es sich um einen Ko-Expressionsvektor handelt, der das EGFP-Gen enthält, wurde die EGFP-Expression untersucht. Um die EGFP-Expression nachzuweisen, wurden im Western Blot die EGFP-Mengen quantifiziert (Abb. 51).

Es können große Mengen an EGFP in transduzierten und sortierten Zellen nachgewiesen werden. Die EGFP-Menge ist in mit Vektor transduzierten Zellen signifikant größer als in Zellen, die mit p85 α transduziert wurden. p85 α transduzierte Zellen exprimieren $23,0\% \pm 4,3\%$ der EGFP-Menge ($13,0\% \pm 2,3\%$ nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Zellen.

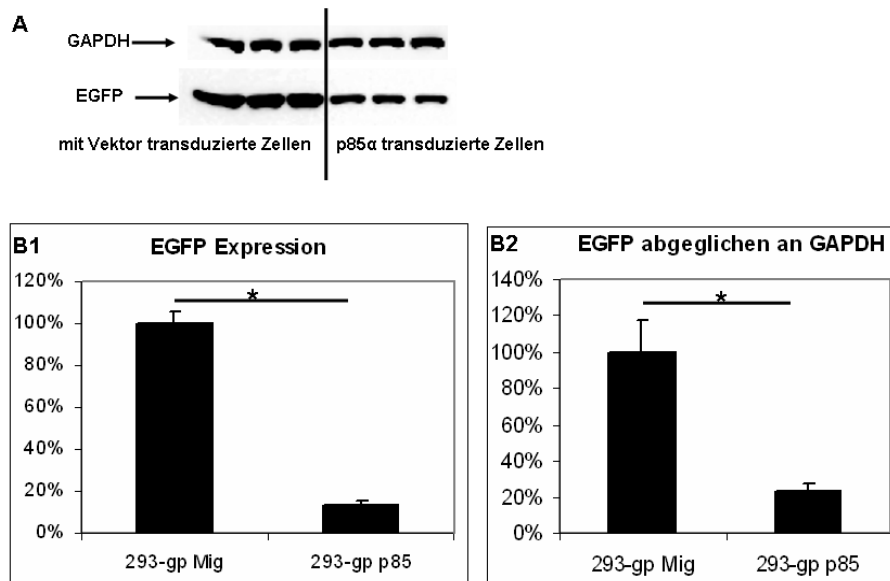


Abb. 51: EGFP-Nachweis nach Transduktion der 293-gp Zellen. A) Bei dem Western Blot Bild sind die EGFP- und GAPDH-Mengen dargestellt. Western Blot Analysen: Darstellung der B1) absoluten EGFP-Mengen, sowie B2) EGFP-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,005$). Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis.

Als nächstes wurde untersucht, ob die positive Transduktion der Zellen mit der Expression des transduzierten p85α-Gens gekoppelt ist. Dafür wurde im Western Blot die Menge an p85α-Protein gemessen (Abb. 52). Zur Quantifizierung wurden die p85α-Proteinmengen an die GAPDH-Mengen abgeglichen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen). Die Transduktion der 293-gp Zellen mit dem p85α-Konstrukt führt zu einer Zunahme der p85α-Menge auf etwa $221,6\% \pm 19,5\%$. (nach Abgleich an GAPDH).

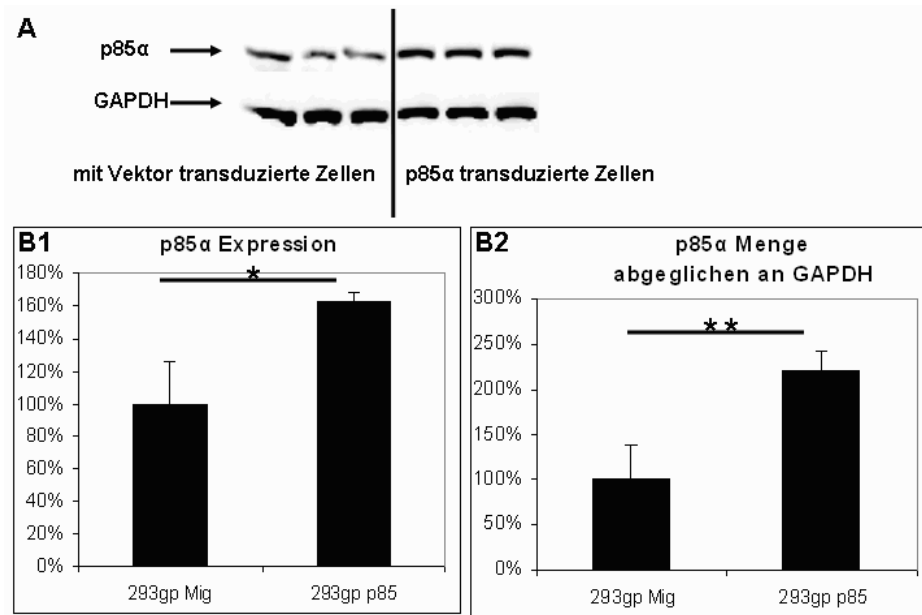


Abb. 52: Expression von p85α in 293-gp Zellen nach Transduktion. A) Bei den Western Blot Bildern sind die Menge an p85α und die Mengen an GAPDH dargestellt. Western Blot Analysen: Darstellung der B1) absoluten p85α-Mengen, sowie B2) p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gekennzeichnet. Mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,005$ gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Eine Wiederholung dieses Versuches brachte das gleiche Ergebnis.

4.3.3.3. Akt-Phosphorylierung nach p85α-Überexpression in 293-gp Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob der Gentransfer zu Unterschieden bei der Ser473-Phosphorylierung von Akt führt.

Dafür wurden im Western Blot die Mengen von an Ser473 phosphoryliertem Akt gemessen und an der GAPDH- bzw. Akt-Menge abgeglichen, um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel bzw. eine Akt-Mengen-Regulation abzugleichen (Abb. 53). Überexpression von p85α führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Akt-Phosphorylierung um $64,9\% \pm 4,1\%$ (nach Abgleich an GAPDH) (bzw. $77,0\% \pm 4,4\%$ nach Abgleich an Akt), verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden

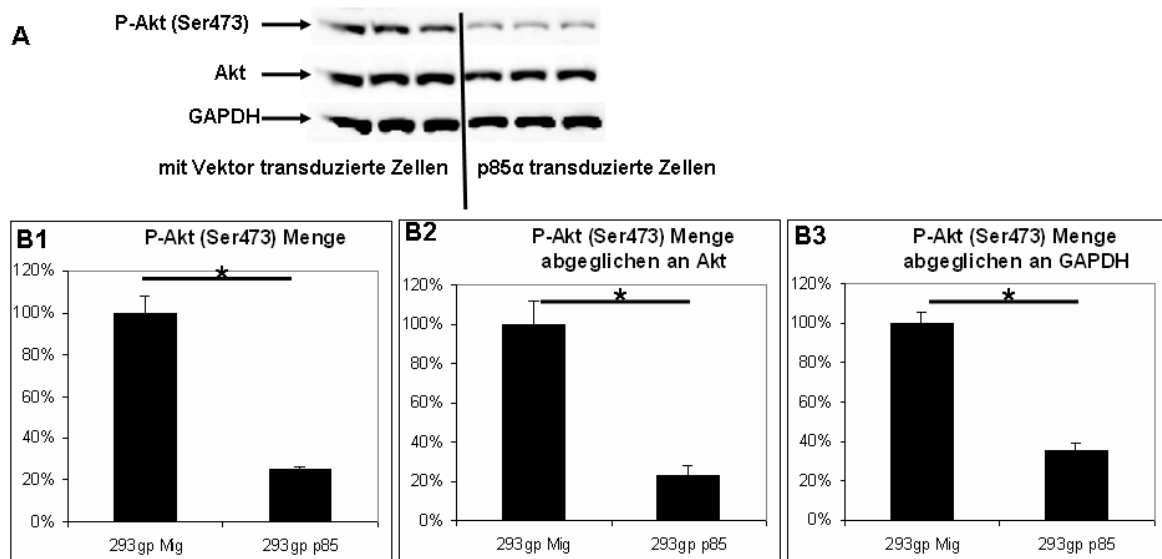


Abb. 53: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der 293-gp Zellen. A) Bei den Western Blot Bildern sind die P-Akt (Ser473) Menge; die Akt Menge und die GAPDH Menge dargestellt. Western Blot Analysen: Darstellung der B1) absoluten P-Akt (Ser473)-Mengen; B2) P-Akt (Ser473)-Mengen, abgeglichen an die Akt-Menge; B3) P-Akt (Ser473)-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,0005$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.3.4. PI3K-Abhängigkeit der Proliferation der Leukämie-Zelllinien

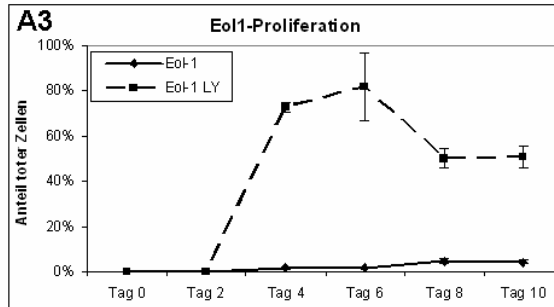
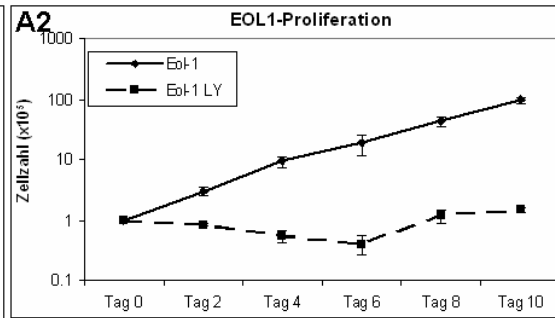
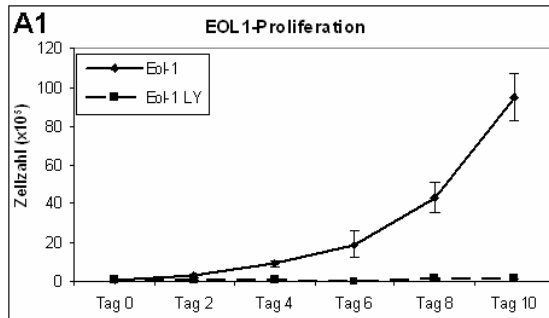
Es wurde untersucht, ob das Wachstum und die Proliferation der Leukämie-Zelllinien PI3K-abhängig ist. Dafür wurde ein Proliferationshemmversuch mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 (Endkonzentration 25μM) durchgeführt (Abb. 54). Der LY294002-Hemmversuch wurde ähnlich durchgeführt wie in 4.2.1. beschrieben. Schon nach zwei Tagen konnte ein Unterschied in der Proliferation der mit LY294002 behandelten zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Bei den nicht behandelten Zellen konnte während des Versuches eine exponentielle Zunahme der Zellzahl beobachtet werden, während die Zellzahl der mit LY294002 behandelten Zellen eher abnahm. Ein Unterschied konnte auch im Anteil der abgestorbenen Zellen festgestellt werden. Die nicht behandelten Zellen zeigten nach zwei Tagen nur einen geringen Anteil an toten Zellen, der konstant blieb,

während bei den mit LY294002 behandelten Zellen dieser Anteil höher war und weiter zunahm.

Wie in der Abb. 23 zu sehen (s. 4.2.1.), zeigten die Cole Zellen, die nicht mit LY294002 behandelt wurden, zwei Tage nach Versuchsbeginn eine Zunahme der Zellzahl auf $208,5\% \pm 19,3\%$. Von den mit LY294002 behandelten Zellen lebten noch $92,5\% \pm 4,7\%$. Nach zehn Tagen hatte die Zellzahl bei den nicht behandelten Zellen um $7660\% \pm 890\%$ zugenommen, während nur noch $34,6\% \pm 4,3\%$ der mit LY294002 behandelten Zellen lebten. Zu diesem Zeitpunkt war die Zahl der nicht behandelten Zellen 224,3 fach größer als die Zahl der behandelten Zellen. Der Anteil der abgestorbenen Zellen bei den nicht behandelten Zellen war nach vier Tagen $1,4\% \pm 0,7\%$ und blieb bis zum zehnten Tag weitgehend unverändert (am Tag 10, $2,5\% \pm 1,2\%$ tote Zellen). Bei den mit LY294002 behandelten Cole Zellen waren nach vier Tagen $27,9\% \pm 4,3\%$ abgestorben. Nach zehn Tagen war dieser Anteil auf $87,2\% \pm 6,5\%$ gestiegen. In der unten stehenden Tabelle sind die Ergebnisse des LY204002-Hemmversuches für die Cole Zellen zusammengefasst.

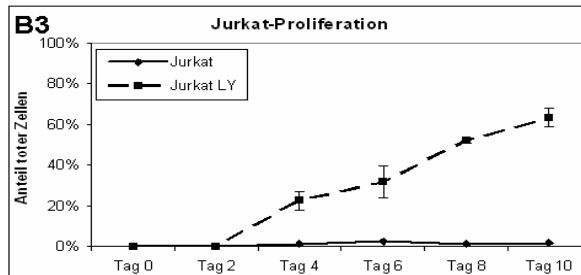
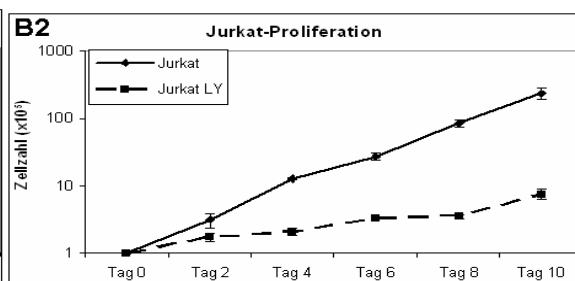
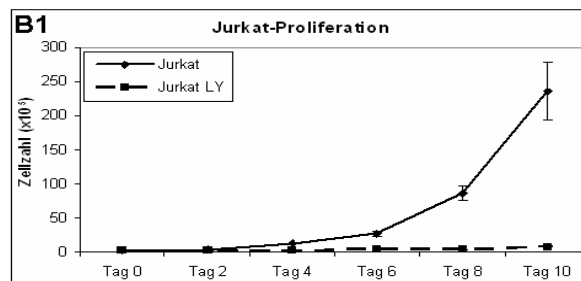
Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
Cole (ohne LY)	$208,5\% \pm 19,3\%$	$7760\% \pm 890\%$	$1,4\% \pm 0,7\%$	$2,5\% \pm 1,2\%$
Cole (mit LY)	$92,5\% \pm 4,7\%$	$34,6\% \pm 4,3\%$	$27,9\% \pm 4,3\%$	$87,2\% \pm 6,5\%$
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 224,3 : 1 (nach 10 Tagen)				

Die Ergebnisse der Analyse der anderen Zelllinien sind unten dargestellt (Abb. 54).



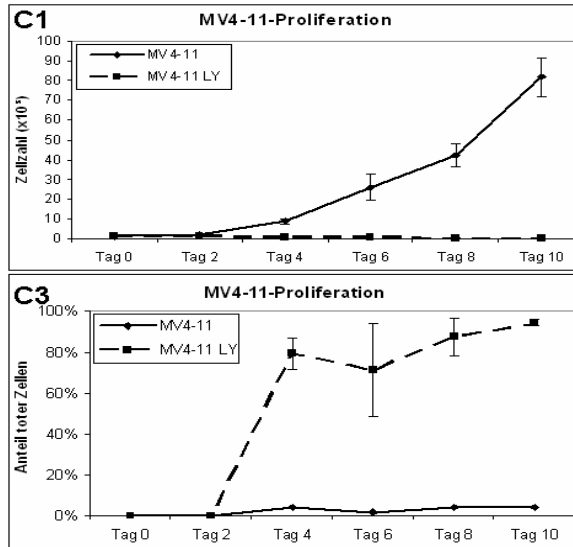
Eol1-Zelllinie: A1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; A2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; A3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
Eol1 (ohne LY)	299,2% ± 46,0%	9492% ± 1215%	1,8% ± 0,6%	4,4% ± 1,1%
Eol1 (mit LY)	82,4% ± 4,1%	146,5% ± 10,1%	72,8% ± 2,2%	50,9% ± 4,8%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 64,8 : 1 (nach 10 Tagen)				



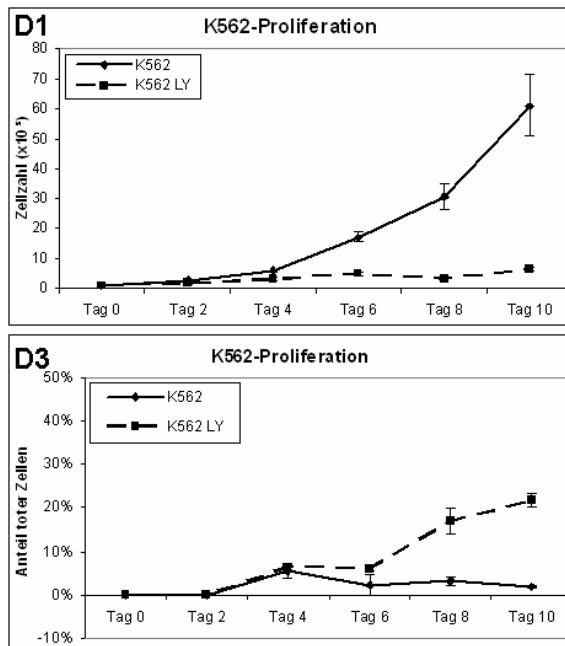
Jurkat-Zelllinie: B1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; B2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; B3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
Jurkat (ohne LY)	315,7% ± 75,7%	23549% ± 4341%	1,5% ± 0,5%	1,5% ± 0,3%
Jurkat (mit LY)	176,5% ± 22,7%	762,1% ± 116,6%	22,5% ± 4,4%	63,6% ± 4,4%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 30,9 : 1 (nach 10 Tagen)				



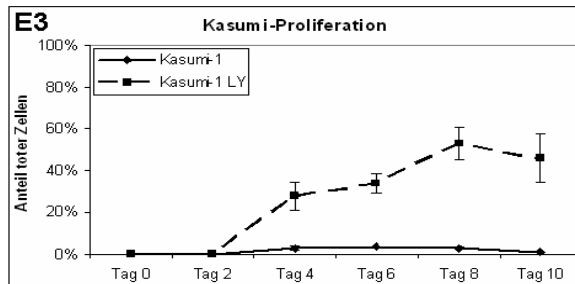
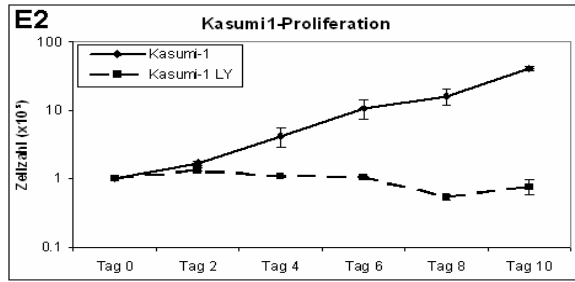
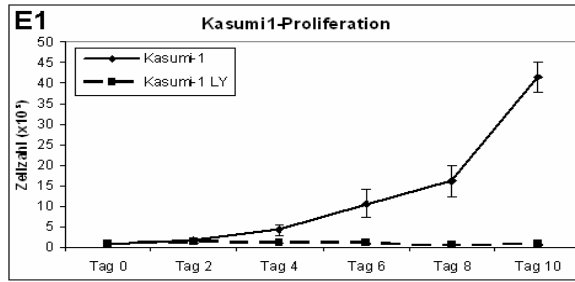
MV4-11-Zelllinie: C1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; C2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; C3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
MV4-11 (ohne LY)	166,6% ± 18,4%	8176% ± 961%	4,3% ± 1,0%	4,0% ± 1,5%
MV4-11 (mit LY)	93,4% ± 4,4%	17,5% ± 3,1%	79,5% ± 7,5%	94,3% ± 1,3%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 467,9 : 1 (nach 10 Tagen)				



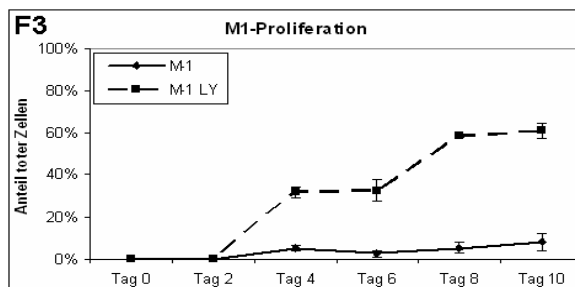
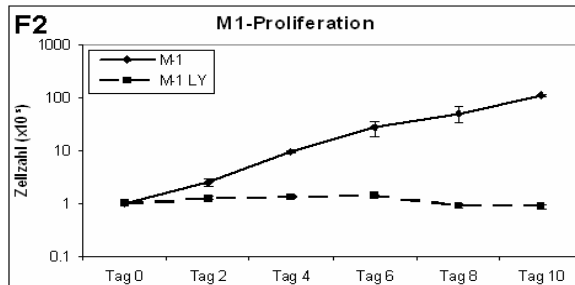
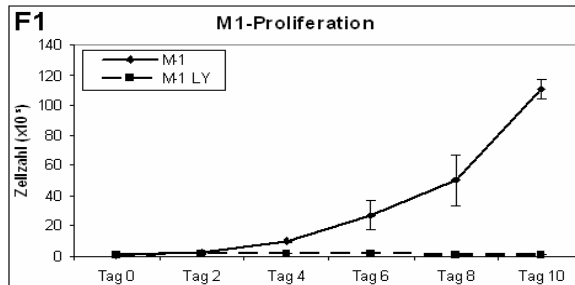
K562-Zelllinie: D1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; D2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; D3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
K562 (ohne LY)	266,3% ± 29,2%	6101% ± 1031%	5,3% ± 1,6%	1,9% ± 0,2%
K562 (mit LY)	168,5% ± 21,5%	625,3% ± 44,3%	6,4% ± 0,8%	21,7% ± 1,7%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 9,8 : 1 (nach 10 Tagen)				



Kasumi-Zelllinie: E1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; E2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; E3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
Kasumi (ohne LY)	169,8% ± 8,2%	4134% ± 362%	2,9% ± 1,2%	1,0% ± 0,0%
Kasumi (mit LY)	135,4% ± 7,9%	77,3% ± 18,3%	27,9% ± 6,9%	45,9% ± 11,6%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 53,4 : 1 (nach 10 Tagen)				



M1-Zelllinie: F1) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; F2) exponentielle Darstellung der Zellzahlen; F3) Darstellung des Anteils an toten Zellen.

Zelllinie	Zellzahl im Vergleich zur ausplattierten Zellzahl (Tag 0)		Anteil toter Zellen	
	Tag 2	Tag 10	Tag 4	Tag 10
M1 (ohne LY)	246,8% ± 38,6%	11056% ± 674%	5,1% ± 1,1%	8,1% ± 4,1%
M1 (mit LY)	125,5% ± 9,6%	87,6% ± 9,1%	31,8% ± 2,5%	61,2% ± 3,6%
Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelten Zellen 126,2 : 1 (nach 10 Tagen)				

Abb. 54 Proliferationsversuch mit dem Hemstoff LY294002. Am Tag 0 wurden 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinate ist die Zellzahl, bzw. der Anteil an toten Zellen aufgetragen. Die Ergebnisse der Analysen für die entsprechenden Zelllinien wurde in den neben stehenden Tabellen zusammengestellt. Für weitere Einzelheiten s. Text und Tabellen.

4.3.3.5. P-Akt in den Leukämie-Zelllinien

Um die Aktivität der PI3K nachzuweisen, wurde als nächstes die Ser473-Phosphorylierung von Akt in den Zelllinien untersucht (Abb. 55). In allen Zelllinien konnte P-Akt (Ser473) nachgewiesen werden, wobei in manchen Zelllinien (Jurkat, M1 und MV4-11) die P-Akt (Ser473) – Banden deutlich stärker waren als in den anderen Zelllinien (Eol1, Kasumi, K562). Da Jurkat-Zellen große Mengen an P-Akt (Ser473) zeigen, wurden Proteinlysate aus Jurkat-Zellen als Kontrolle aufgetragen.

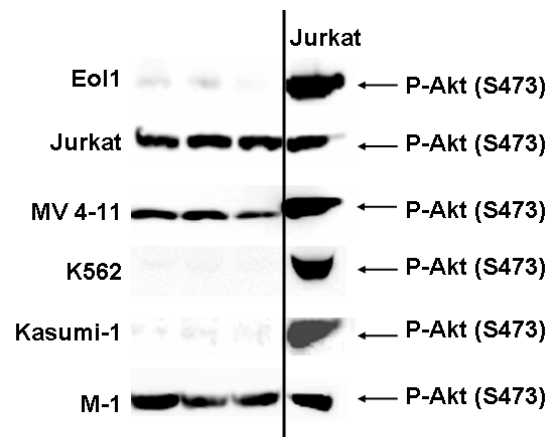


Abb. 55: Akt-Phosphorylierung an Ser473 in Leukämie-Zelllinien. Dargestellt sind die P-Akt (Ser473) Mengen. Rechts ist zur Kontrolle Proteinlysate von Jurkat-Zellen aufgetragen.

4.3.3.6. Transduktion der Leukämie-Zelllinien

Alle Zelllinien wurden mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduziert. Die positiv sortierten Zellen (Abb. 56-1, 56-2) wurden in Kultur genommen und weiter analysiert.

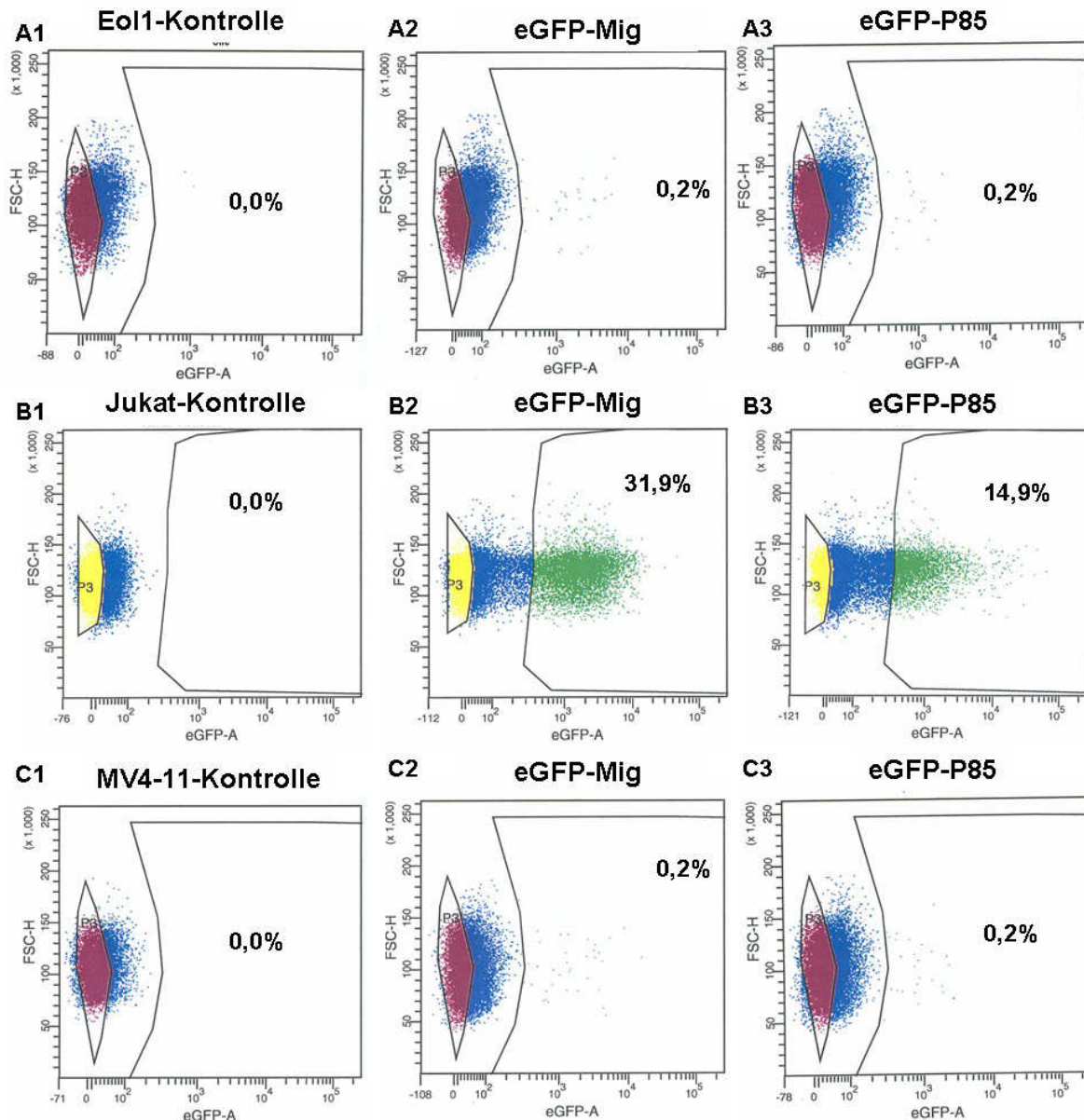


Abb. 56-1: FACS-Analyse und Sortierung der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Leukämie- Zelllinien. A) Eol1-Zelllinie: A1) nicht transduzierte Eol1-Zellen exprimieren kein EGFP; A2) 0,2% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; A3) 0,2% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet). B) Jurkat-Zelllinie: B1) nicht transduzierte Jurkat-Zellen exprimieren kein EGFP; B2) 31,9% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; B3) 14,9% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet). C) MV4-11-Zelllinie: C1) nicht transduzierte MV4-11-Zellen exprimieren kein EGFP; C2) 0,2% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; C3) 0,2% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet).

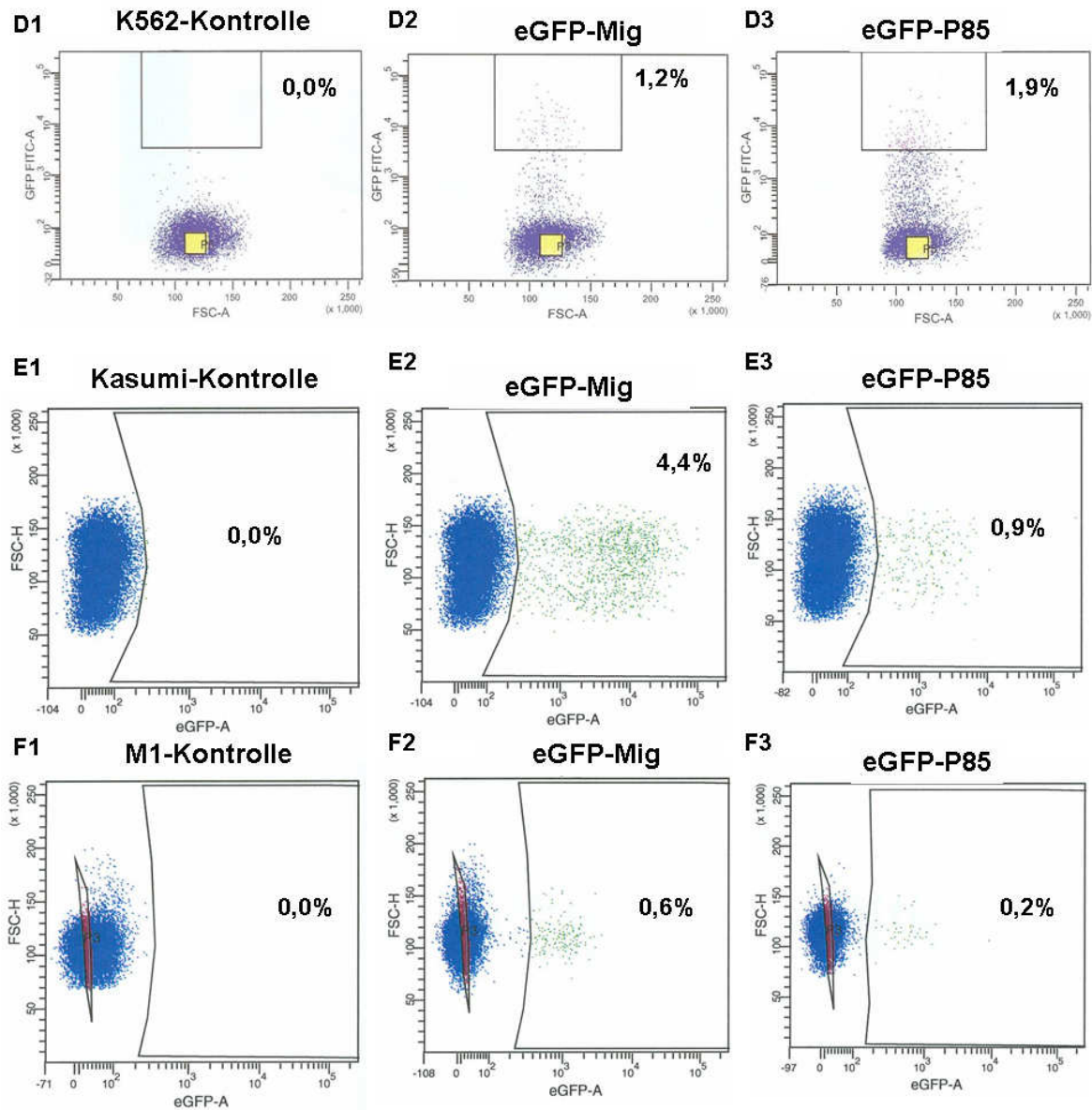


Abb. 56-2: FACS-Analyse und Sortierung der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Leukämie- Zelllinien. D) K562-Zelllinie: D1) nicht transduzierte K562-Zellen exprimieren kein EGFP; D2) 1,2% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; D3) 1,9% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die EGFP-Fluoreszenz, auf der Abszisse die Zellgröße abgebildet). E) Kasumi-Zelllinie: E1) nicht transduzierte Kasumi-Zellen exprimieren kein EGFP; E2) 4,4% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; E3) 0,9% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet). F) M1-Zelllinie: F1) nicht transduzierte M1-Zellen exprimieren kein EGFP; F2) 0,6% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen wurden positiv sortiert; F3) 0,2% der p85 α transduzierten Zellen wurden positiv sortiert (auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet).

4.3.3.7. Expressionsnachweis der p85 α -Untereinheit in Leukämie-Zelllinien

Aus den sortierten Zellen wurden Lysate hergestellt und Western Blot Analysen wurden durchgeführt (Abb. 57).

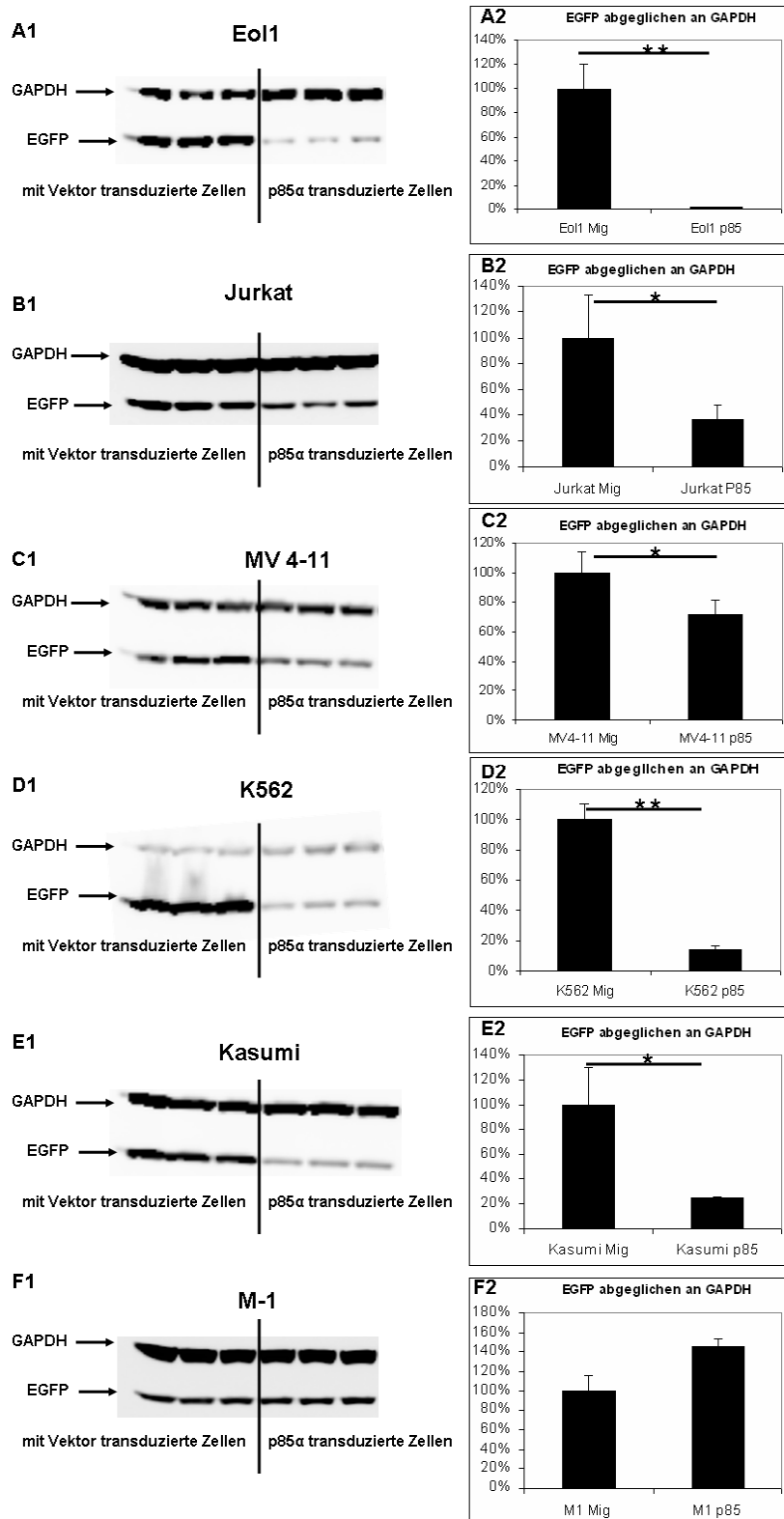


Abb. 57: EGFP-Nachweis nach Transduktion der Leukämie-Zelllinien.

- A) Eo1-Zelllinie;
B) Jurkat-Zelllinie;
C) MV4-11-Zelllinie;
D) K562-Zelllinie;
E) Kasumi-Zelllinie;
F) M1-Zelllinie.

Bei den Western Blot Bildern (A1-F1) sind die EGFP- und GAPDH-Mengen dargestellt. Bei den Western Blot Analysen (A2-F2) sind die EGFP-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ gekennzeichnet. Mit (**) sind signifikante Unterschiede mit $p < 0,005$ gekennzeichnet. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Zuerst wurde die Frage untersucht, ob nach Transduktion der Zellen, das retrovirale Konstrukt funktioniert und es zu einer Expression der Gene auf dem Vektor kommt. Da es sich um einen Ko-Expressionsvektor handelt, der das EGFP-Gen enthält, wurde die EGFP-Expression untersucht. Um die EGFP-Expression nachzuweisen, wurden im Western Blot die EGFP-Mengen quantifiziert (Abb. 57). EGFP ist sowohl in mit Vektor transduzierten Zellen als auch in Zellen, die mit p85 α transduziert wurden, nachweisbar. Die EGFP-Menge ist meistens in mit Vektor transduzierten Zellen signifikant größer als in Zellen, die mit p85 α transduziert wurden. p85 α transduzierte Eol1-Zellen exprimieren nur $1,7\% \pm 0,4\%$ der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Eol1-Zellen. p85 α transduzierte Jurkat-Zellen exprimieren $36,9\% \pm 11,1\%$ der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Jurkat-Zellen. p85 α transduzierte MV4-11-Zellen exprimieren $71,6\% \pm 9,1\%$ der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten MV4-11-Zellen. p85 α transduzierte K562-Zellen exprimieren $13,9\% \pm 2,5\%$ der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten K562-Zellen. p85 α transduzierte Kasumi-Zellen exprimieren $24,3\% \pm 1,8\%$ der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) der mit Vektor transduzierten Kasumi-Zellen. Der Unterschied in der EGFP-Expression (nach Abgleich an GAPDH) in p85 α transduzierten und mit Vektor transduzierten M1-Zellen war statistisch nicht signifikant.

Als nächstes wurde untersucht, ob die positive Transduktion der Zellen mit der Überexpression des transduzierten p85 α -Gens gekoppelt ist. Dafür wurden im Western Blot die Mengen an p85 α -Protein gemessen (Abb. 58). Zur Quantifizierung wurden die p85 α -Proteinmengen an die GAPDH-Menge abgeglichen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen). Die Transduktion der K562 Zellen mit dem p85 α -Konstrukt führte zu einer Zunahme der p85 α -Menge auf $255,8\% \pm 32,1\%$, verglichen mit der p85 α -Menge in mit Vektor transduzierten K562-Zellen. Bei den anderen Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied der p85 α -Menge nach Transduktion mit dem p85 α -Konstrukt oder mit dem MigRI-Vektor festgestellt werden.

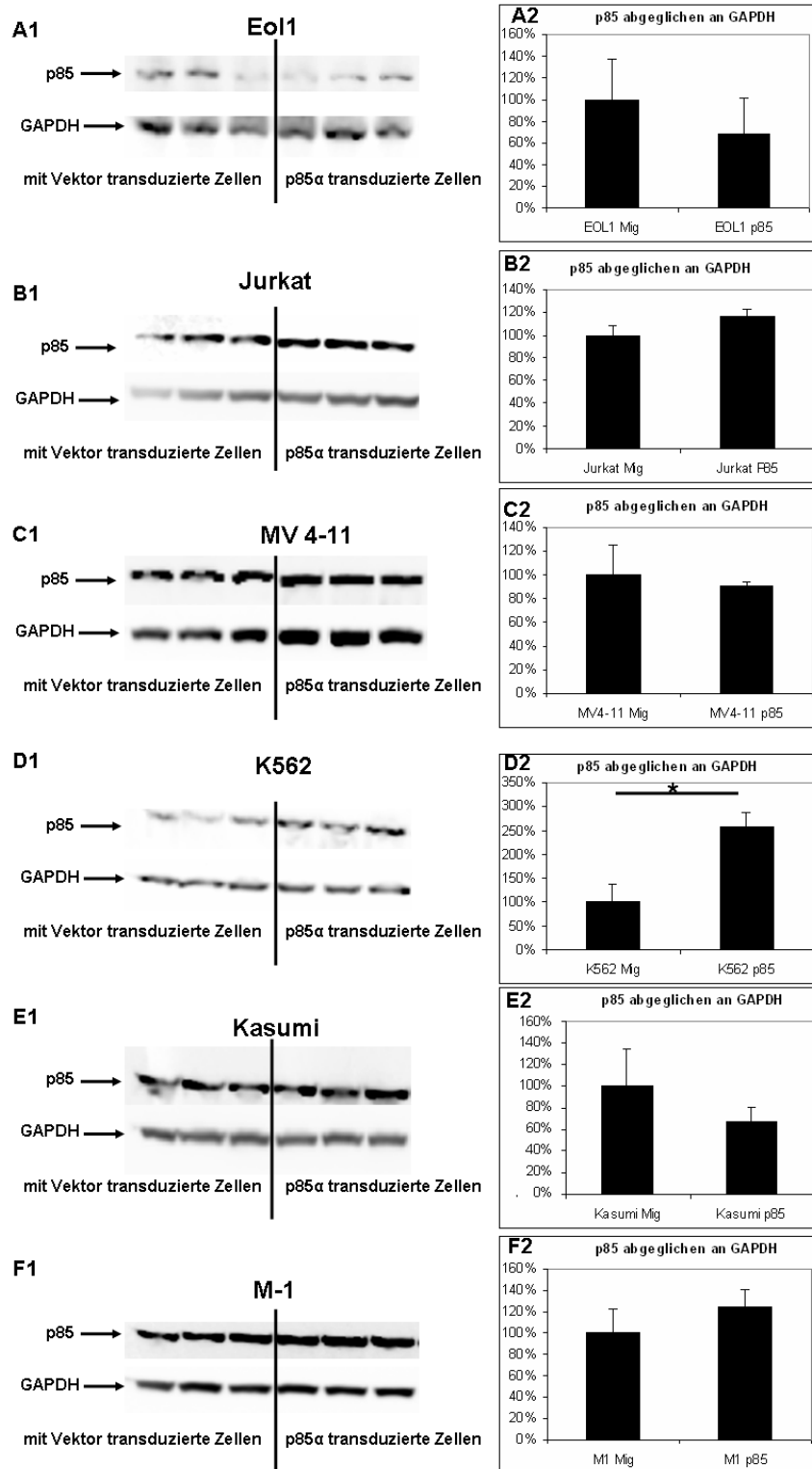


Abb. 58: Expression von p85α in Leukämie-Zelllinien nach Transduktion.

- A) Eo1-Zelllinie;
B) Jurkat-Zelllinie;
C) MV4-11-Zelllinie;
D) K562-Zelllinie;
E) Kasumi-Zelllinie;
F) M1-Zelllinie.

A1-F1) Bei den Western Blot Bildern sind die Mengen an p85α und die Mengen an GAPDH dargestellt. A2-F2) Bei den Western Blot Analysen sind die p85α-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,05$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text.

4.3.3.8. Akt-Phosphorylierung nach Transduktion der Leukämie-Zelllinien

Dann wurde untersucht, ob der Gentransfer zu Unterschieden bei der Ser473-Phosphorylierung von Akt führt (Abb. 59).

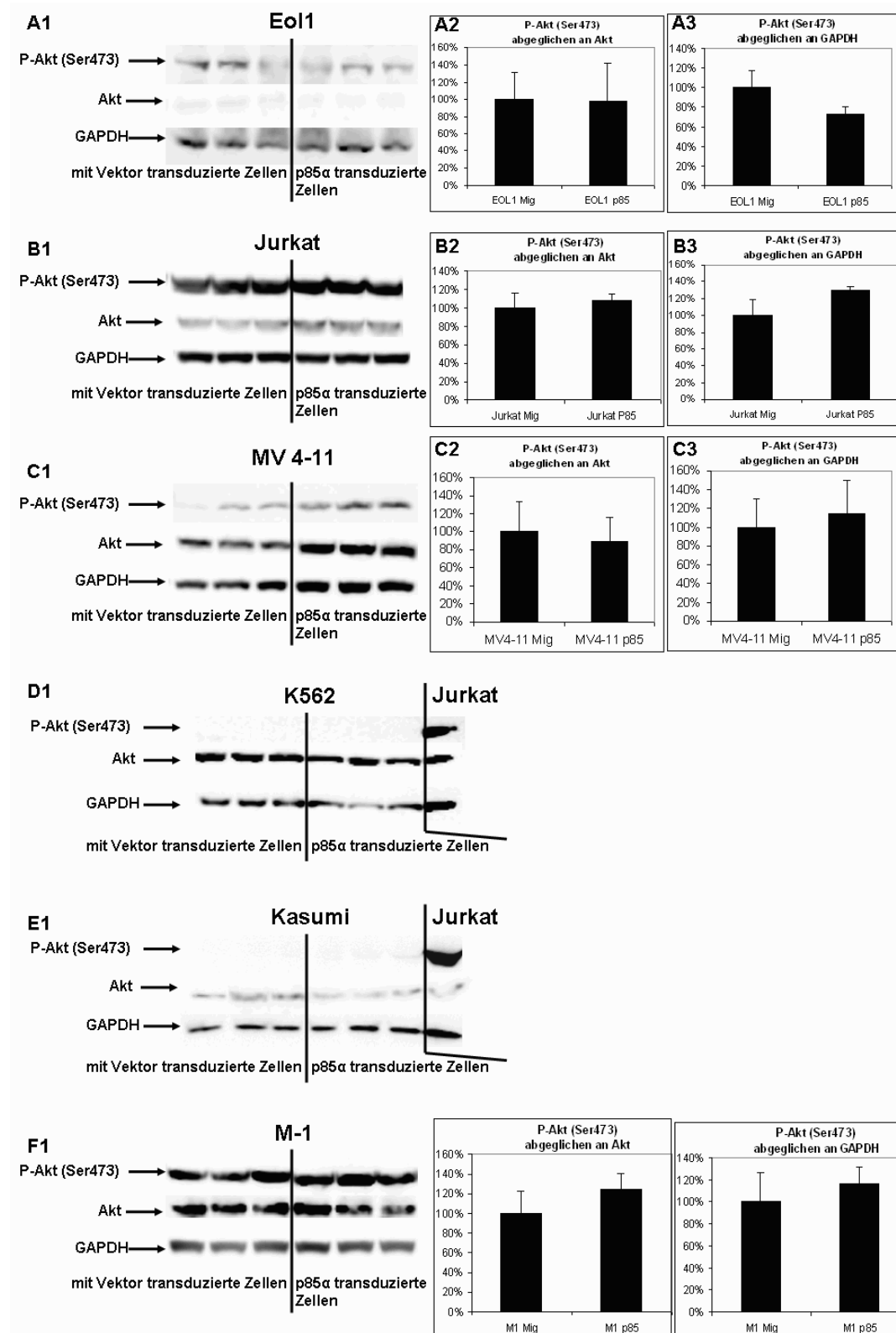


Abb. 59: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der Leukämie-Zelllinien. A) Eol1-Zelllinie; B) Jurkat-Zelllinie; C) MV4-11-Zelllinie; D) K562-Zelllinie; E) Kasumi-Zelllinie; F) M1-Zelllinie. A1-F1): Bei den Western Blot Bildern sind die Mengen an P-Akt (Ser 473), Akt und GAPDH dargestellt. A2-C2 und F2): Bei den Western Blot Analysen sind die P-Akt (Ser 473)-Mengen, abgeglichen an Akt dargestellt. A3-C3 und F3): Bei den Western Blot Analysen sind die P-Akt (Ser 473)-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. In K562- und Kasumi-Zellen war das P-Akt Niveau zu niedrig, um ausgewertet zu werden. Hier ist zur Kontrolle Proteinlysate von Jurkat-Zellen aufgetragen. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob die Zellen mit dem Vektor oder p85 α transduziert wurden. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in mit dem Vektor transduzierten Zellen als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text.

Dafür wurden im Western Blot die Mengen von an Ser473 phosphoryliertem Akt gemessen und an der GAPDH- bzw. Akt-Menge abgeglichen, um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel bzw. eine Akt-Mengen-Regulation abzugleichen (Abb. 59). Transduktion der Zelllinien mit dem p85 α -Konstrukt führt zu keiner signifikanten Änderung der Akt-Phosphorylierung verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden (weder nach Abgleich an Akt, noch nach Abgleich an GAPDH). In K562- und Kasumi Zellen war das P-Akt Niveau so niedrig, dass die Mengen kaum auszuwerten waren. Da Jurkat-Zellen große Mengen an P-Akt (Ser473) zeigen, wurden Proteinlysate aus Jurkat-Zellen als Kontrolle aufgetragen.

4.3.3.9. Proliferation der Leukämie-Zelllinien nach Transduktion

Als nächstes wurde die Proliferation der positiv sortierten Zellen nach Transduktion mit dem MigRI Vektor oder p85 α -Konstrukt untersucht (Abb. 60). Die Unterschiede zwischen der Zahl der mit dem Vektor und mit dem p85 α -Konstrukt transduzierten Zellen waren statistisch nicht signifikant.

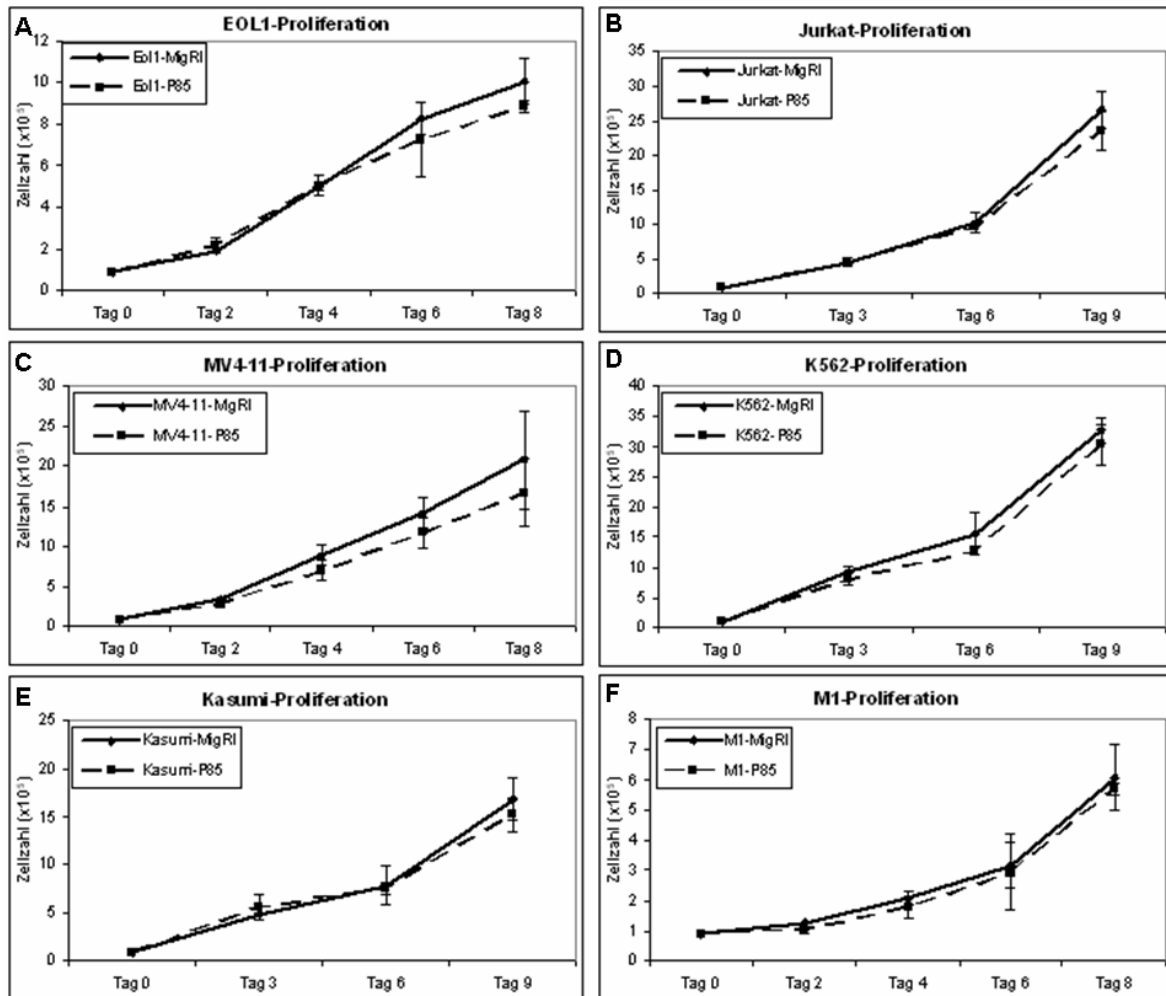


Abb. 60: Proliferation der Leukämie-Zelllinien nach Transduktion. A) Eol1-Zelllinie; B) Jurkat-Zelllinie; C) MV4-11-Zelllinie; D) K562-Zelllinie; E) Kasumi-Zelllinie; F) M1-Zelllinie. Am Tag 0 wurden 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Auf der Ordinate ist die Zellzahl aufgetragen. Für weitere Einzelheiten s. Text.

4.3.3.10. Sortierung der Jurkat Zellen nach der Transduktionseffizienz

Um festzustellen, ob die fehlende Überexpression von p85 α mit der Transduktionseffizienz in Verbindung steht, wurden Jurkat Zellen nach Transduktion mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Retroviren in drei Zellpopulationen sortiert, EGFP-negative Zellen (EGFP⁻), schwach EGFP-positive Zellen (EGFP⁺) und stark EGFP-positive Zellen (EGFP⁺⁺) (Abb. 61). Die sortierten Zellen wurden in Kultur genommen und weiter analysiert.

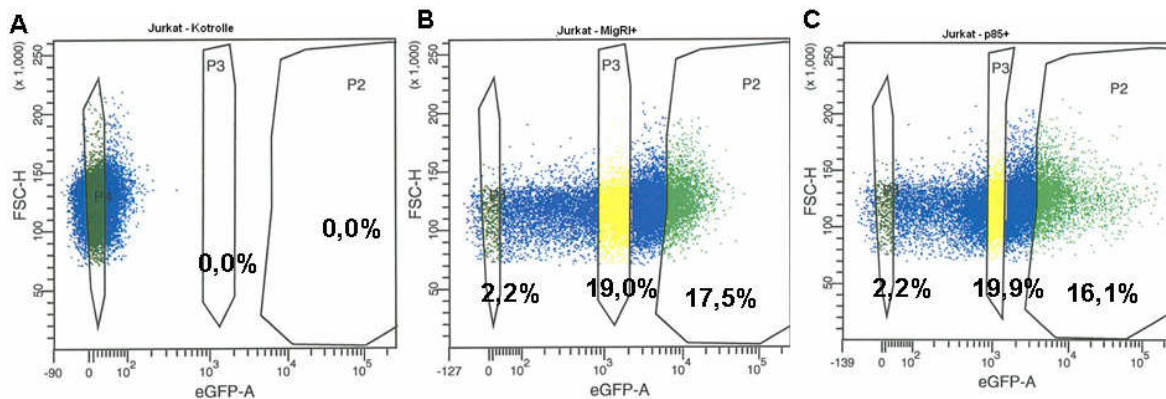
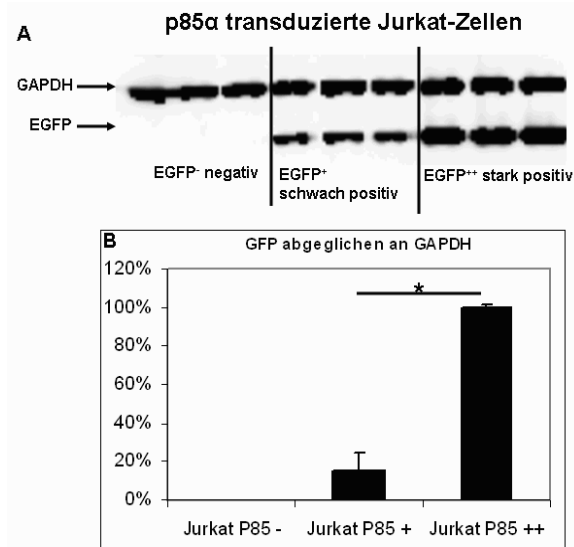


Abb. 61: FACS-Analyse und Sortierung der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Jurkat-Zellen. Jurkat Zellen wurden nach Transduktion in drei Zellpopulationen sortiert, EGFP-negative Zellen (P1 - EGFP⁻), schwach EGFP-positive Zellen (P2 - EGFP⁺) und stark EGFP-positive Zellen (P3 - EGFP⁺⁺). A) nicht transduzierte Jurkat-Zellen exprimieren kein EGFP; B) 2,2% der mit dem MigRI-Vektor transduzierten Zellen waren EGFP-negativ (P1 - EGFP⁻), 19,0% schwach EGFP-positiv (P2 - EGFP⁺) und 17,5% stark EGFP-positiv (P3 - EGFP⁺⁺); C) 2,2% der p85 α transduzierten Zellen waren EGFP-negativ (P1 - EGFP⁻), 19,9% schwach EGFP-positiv (P2 - EGFP⁺) und 16,1% stark EGFP-positiv (P3 - EGFP⁺⁺). Auf der Ordinate ist die Zellgröße, auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

4.3.3.11. Expression der p85 α -Untereinheit in stark EGFP-positiven Jurkat-Zellen

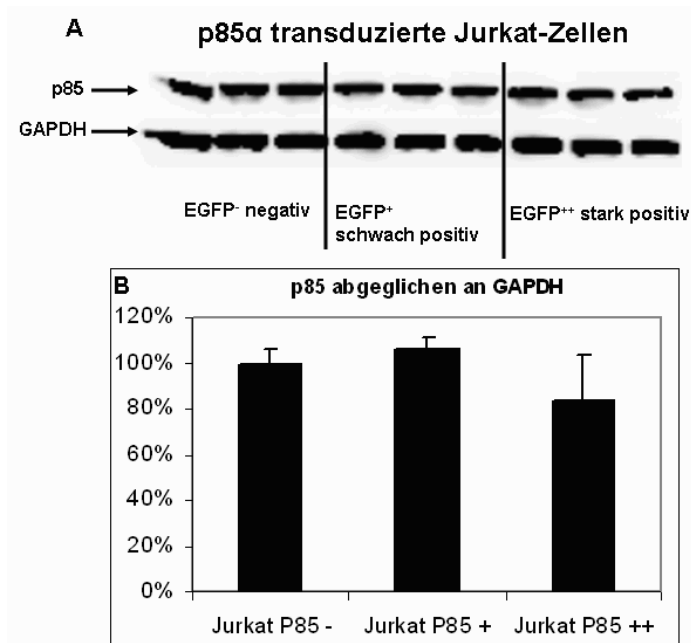
Aus den sortierten Zellen wurden nach 2 bis 3 Tage Lysate hergestellt und Western Blot Analysen wurden durchgeführt. Zuerst wurde die Frage erläutert, ob nach Transduktion der Zellen das retrovirale Konstrukt funktioniert und es zu einer Expression der Gene auf dem Vektor kommt. Da es sich um einen Ko-Expressionsvektor handelt, der das EGFP-Gen enthält, wurde die EGFP-Expression untersucht. Um die EGFP-Expression nachzuweisen, wurden im Western Blot die EGFP-Mengen quantifiziert (Abb. 62). Nach Transduktion mit p85 α ist EGFP sowohl in schwach EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺), als auch in stark EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺⁺), aber nicht in EGFP-negativen Zellen (EGFP⁻) nachweisbar. Die EGFP-Menge ist in stark EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺⁺) signifikant größer als in schwach EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺) Zellen. Nach p85 α -Transduktion exprimieren schwach EGFP-positive Jurkat Zellen (EGFP⁺) 15,7% $\pm$ 8,3% der EGFP-Menge (nach Abgleich an GAPDH) von stark EGFP-positiven Jurkat Zellen (EGFP⁺⁺). EGFP-negativ sortierte Zellen (EGFP⁻) exprimieren kein EGFP.

Abb. 62: EGFP-Nachweis nach p85 α -

Transduktion der Jurkat-Zellen. A) Dargestellt sind die EGFP- und GAPDH-Mengen B) Bei den Western Blot Analysen sind die EGFP-Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob es sich um EGFP-negative Zellen (Jurkat P85-), schwach EGFP-positive Zellen (Jurkat P85+) oder stark EGFP-positive Zellen (Jurkat P85++) nach Transduktion mit p85 α handelt. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in stark EGFP-positiven Zellen (Jurkat P85++) als Referenz (100%) genommen

wurde. Mit (*) sind signifikante Unterschiede gekennzeichnet ($p < 0,01$). Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Transduktionseffizienz eine Rolle in der Überexpression des p85 α -Gens spielt. Dafür wurden im Western Blot die Mengen an p85 α -Protein gemessen (Abb. 63). Zur Quantifizierung wurden die p85 α -Proteinmengen an die GAPDH-Menge abgeglichenen (um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel abzugleichen).

Abb. 63: Expression von p85 α nach p85 α -Transduktion der Jurkat-Zellen.

A) Dargestellt sind die Mengen an p85 α und GAPDH. B) Bei den Western Blot Analysen sind die p85 α -Mengen, abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob es sich um EGFP-negative Zellen (Jurkat P85-), schwach EGFP-positive Zellen (Jurkat P85+) oder stark EGFP-positive Zellen (Jurkat P85++) nach Transduktion mit p85 α handelt. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in EGFP-negativen Zellen (Jurkat P85-) als

Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach Transduktion mit dem p85 α -Konstrukt konnte kein signifikanter Unterschied in der p85 α -Menge in EGFP-negativen Zellen (EGFP⁻), schwach EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺) und stark EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺⁺) beobachtet werden.

4.3.3.12. Akt-Phosphorylierung in stark EGFP-positiven Jurkat-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Transduktionseffizienz eine Rolle in der Phosphorylierung von Akt an Ser473 spielt. Dafür wurden im Western Blot die Mengen von an Ser473 phosphoryliertem Akt gemessen und an der GAPDH- bzw. Akt-Menge abgeglichen, um Fehler beim Auftragen der Proteinlysate auf dem Gel bzw. eine Akt-Mengen-Regulation abzugleichen (Abb. 64). Nach Transduktion mit dem p85 α -Konstrukt konnte kein signifikanter Unterschied in der Akt-Phosphorylierung an Ser473 in EGFP-negativen Zellen (EGFP⁻), schwach EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺) und stark EGFP-positiven Zellen (EGFP⁺⁺) beobachtet werden.

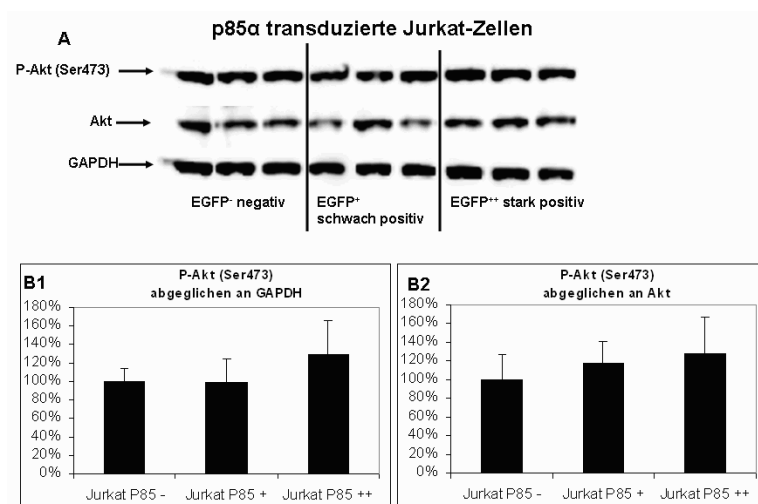


Abb. 64: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach p85 α -Transduktion der Jurkat-Zellen. A) Bei den Western Blot Bildern sind die Mengen an P-Akt (Ser 473), Akt und GAPDH dargestellt. B) Bei den Western Blot Analysen sind die P-Akt (Ser 473)-Mengen, B1) abgeglichen an das „Haus-Keeping-Gen“ GAPDH und B2) abgeglichen an Akt dargestellt. Auf der Abszisse ist dargestellt, ob es sich um EGFP-negative Zellen (Jurkat P85-), schwach EGFP-positive Zellen (Jurkat P85+) oder stark EGFP-positive Zellen (Jurkat P85++) nach Transduktion mit p85 α handelt. Auf der Ordinate ist die Proteinmenge dargestellt, wobei die Proteinmenge in EGFP-negative Zellen (Jurkat P85-) als Referenz (100%) genommen wurde. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3.3.13. Proliferation der schwach oder stark EGFP-positiven Jurkat-Zellen

Als letztes wurde die Proliferation der EGFP-negativen (EGFP⁻), schwach EGFP-positiven (EGFP⁺) und stark EGFP-positiven (EGFP⁺⁺) Jurkat-Zellen nach Transduktion mit dem MigRI Vektor oder p85 α -Konstrukt untersucht (Abb. 65). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Proliferation der EGFP-negativen (EGFP⁻), schwach EGFP-positiven (EGFP⁺) und stark EGFP-positiven (EGFP⁺⁺) Jurkat-Zellen nach Transduktion mit dem MigRI-Vektor oder dem p85 α -Konstrukt festgestellt werden. In allen 6 Ansätzen waren die Unterschiede in der Zellzahl über allen Tagen statistisch nicht signifikant.

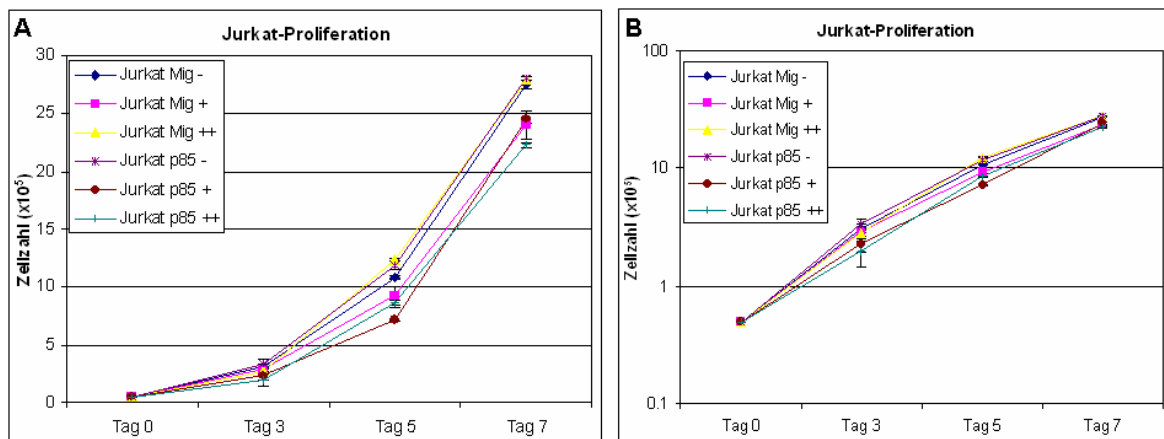


Abb. 65: Proliferation der Jurkat-Zellen nach Transduktion. A) Darstellung der Zellzahlen in den 10 Proliferationstagen; B) exponentielle Darstellung der Zellzahl. Am Tag 0 wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Auf der Ordinate ist die Zellzahl aufgetragen. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten. Farbkodierung: Jurkat Mig-: mit dem Vektor transduzierte, EGFP-negative Zellen; Jurkat Mig+: mit dem Vektor transduzierte, schwach EGFP-positive Zellen; Jurkat Mig++: mit dem Vektor transduzierte, stark EGFP-positive Zellen; Jurkat p85-: mit dem p85 α -Konstrukt transduzierte, EGFP-negative Zellen; Jurkat p85+: mit dem p85 α -Konstrukt transduzierte, schwach EGFP-positive Zellen; Jurkat p85++: mit dem p85 α -Konstrukt transduzierte, stark EGFP-positive Zellen.

4.3.3.14. BrdU-Messung der Zellproliferation

Um die Zellproliferation sofort nach der Transduktion der Zellen zu untersuchen, wurde eine BrdU-Messung der Zellproliferation durchgeführt (Abb. 66).

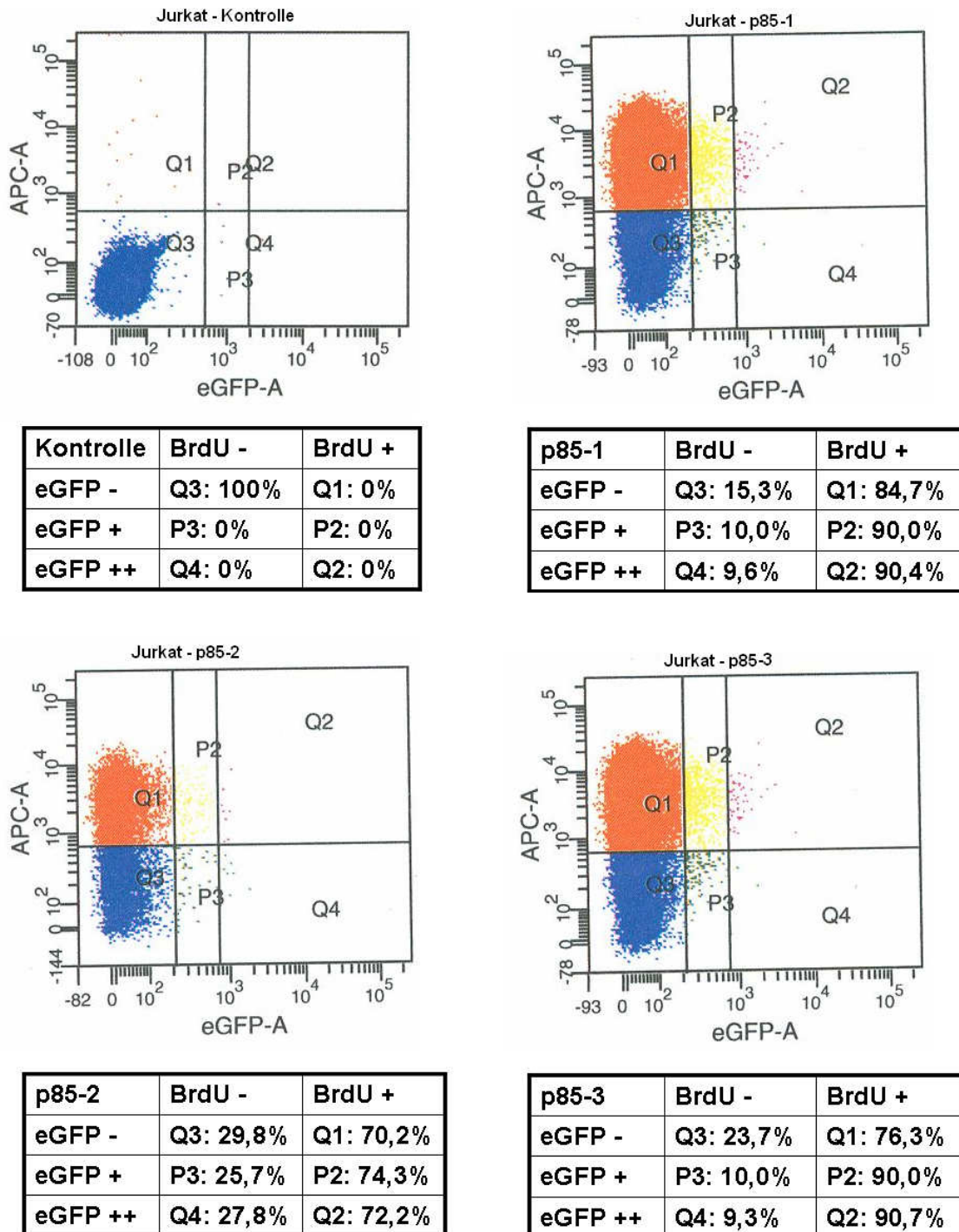


Abb. 66: BrdU-Messung der Proliferation der p85 α -transduzierten Jurkat-Zellen. In der Kontrollfärbung ist weder eine BrdU-Färbung, noch eine EGFP-Fluoreszenz festzustellen. Die p85 α -transduzierten Zellen wurden nach Stärke der EGFP-Fluoreszenz geteilt: Q1 und Q3 EGFP-negative Zellen; P2 und P3 schwach EGFP-positive Zellen; Q2 und Q4 stark EGFP-positive Zellen. Die negativen-, schwach positiven- und stark positiven-EGFP Zellen wurden dann in BrdU-negative und -positive Zellen geteilt. In den Tabellen sind die Anteile der Zellen dargestellt. Auf der Abszisse ist die EGFP-Fluoreszenz dargestellt. Auf der Ordinate ist die BrdU-Färbung dargestellt. Jedes Bild entspricht einem unabhängigen Experiment.

In der Abb. 66 sind die FACS-Analyse-Daten von Jurkat-Zellen dargestellt. Die Prozentzahlen geben die entsprechende Anteile der Brdu +/- und EGFP +/- Zellen an: Q3: EGFP negative, BrdU negative Zellen; Q1: EGFP negative, BrdU positive Zellen; P3: EGFP schwach positive, BrdU negative Zellen; P2: EGFP schwach positive, BrdU positive Zellen; Q4: EGFP stark positive, BrdU negative Zellen; Q2: EGFP stark positive, BrdU positive Zellen;. Die durch BrdU-Einbau gemessene Proliferation der Jurkat Zellen (nicht transduzierte, schwach positiv und stark positiv transduzierte Zellen) ist in der Abb. 67A dargestellt. Für die K562-Zelllinie wurde die gleiche Analyse durchgeführt, jeweils als Dreifachbestimmung, und die Ergebnisse sind in der Abb. 67B zusammenfassend dargestellt.

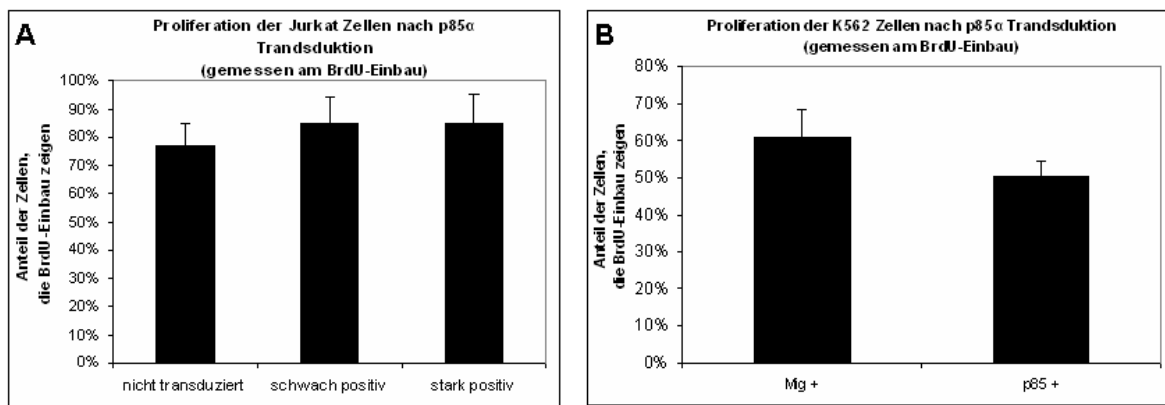


Abb. 67: Proliferation der Zelllinien nach p85α-Transduktion. A) Jurkat Zellen. Auf der Abszisse ist dargestellt ob die Zellen transduziert wurden (schwach oder stark positiv) oder nicht. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen, die nach der BrdU-Färbung positiv waren, dargestellt. B) K562 Zellen. Auf der Abszisse ist dargestellt ob die Zellen mit dem MigRI-Vektor oder p85α-Konstrukt transduziert wurden. Auf der Ordinate ist der Anteil der Zellen, die nach der BrdU-Färbung positiv waren, dargestellt.

In Jurkat Zellen zeigte sich eine Proliferation von $77,1\% \pm 7,3\%$ bei den EGFP-negativen Zellen, von $84,8\% \pm 9,1\%$ bei den schwach EGFP-positiven Zellen, von $84,4\% \pm 10,6\%$ bei den stark EGFP-positiven Zellen. Die Unterschiede der Proliferationsrate nach p85α-Transduktion waren somit nicht signifikant, unabhängig von der Stärke der EGFP-Fluoreszenz.

In K562 Zellen zeigte sich eine Proliferation von $60,8\% \pm 7,5\%$ bei den MigRI-transduzierten Zellen und von $50,3\% \pm 4,1\%$ bei den p85 α -transduzierten Zellen. Dieser Unterschied der Proliferationsrate von etwa 10% nach p85 α -Transduktion war zwar statistisch nicht signifikant, es ist aber ein Hinweis auf eine hemmende Wirkung der p85 α -Überexpression auf die Proliferation der K562 Zellen.

5. Diskussion

Die PI3K der Klasse IA spielt eine wichtige Rolle in der Regulation einer Vielzahl von Zellfunktionen, einschließlich Proliferation, Zellwachstum, Apoptose, Metabolismus, Zellmotilität und Angiogenese. In der menschlichen hämatopoetischen Zelllinie Cole kann nur die p76 α mutierte Form der p85 α regulatorischen Untereinheit der PI3K gefunden werden. Durch die Deletion einer Adeninbase an Position 1907 (Abb. 21) und der dadurch entstandenen Verschiebung des Leserasters, kommt es zu einem frühzeitigen Auftreten eines Stop-Codons und zur Entstehung eines trunkierten p85 α -Proteins. Dieses 76 kDa große Protein (wird deshalb p76 α genannt) hat nur 635 von 724 Aminosäuren des Wildtyp-p85 α -Proteins und es fehlt fast die ganze c-terminale SH2-Domäne (Abb. 11). p76 α bindet an die 110 katalytische Untereinheit, die in Cole Zellen konstitutiv aktiviert ist (Jücker et al., 2002).

Von Chan et al., 2002 wurde ein Modell beschrieben, wonach zur Aktivierung der PI3K über die regulatorische Untereinheit, zwei Ereignisse stattfinden müssen: kleine GTPasen der ras-Familie (Rac1, Cdc42) binden an die regulatorischen Untereinheit und gleichzeitig wird der Tyrosinrest 688 in der c-SH2-Domäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu Konformationsänderungen der regulatorischen Untereinheit, dadurch zur Aufhebung der durch die c-SH2-Domäne vermittelten Inhibition der katalytischen Untereinheit, und somit zur Aktivierung der PI3K (Chan et al., 2002). Der Wegfall der c-terminalen SH2-Domäne in der p85 α / PI3K-Mutante könnte zu der konstitutiven Aktivierung der PI3K führen, die in Cole Zellen beobachtet wurde.

Von den weiteren beschriebenen Fällen, wo Zellen nur eine mutierte Form der p85 α regulatorischen Untereinheit exprimieren, zeigt die Thymus-Lymphom-Zelllinie CMN5, nur ein 65 kDa großes Protein (p65 α), das an die p110 katalytische Untereinheit binden kann (Jimenez et al., 1998). Auch dieser p65 α -Untereinheit fehlt die ganze c-terminale SH2-Domäne und sie zeigt eine stärkere und länger andauernde Aktivität als das Wildtyp-Protein, sowohl im unstimulierten, als auch im stimulierten Zustand. Während im unstimulierten Zustand der Unterschied geringfügig ist, führt die Bindung von Ras an p65/p110-PI3K zu einer sehr viel stärkeren Aktivierung als bei p85/p110-PI3K (Jimenez et al., 1998; Jimenez et al., 2002). Dies könnte Folge vom Wegfall einer Inhibitionsfunktion

der c-terminalen-SH2-Domäne im mutierten p65 α -Protein sein. Nach gleichzeitiger Aktivierung durch Ras und phosphorylierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist der Aktivierungszustand des mutierten und Wildtyp-Proteins wieder ähnlich, in Einklang mit dem Erklärungsmodell von Chan et al., 2002.

In dieser Arbeit wurde zum einen der direkte Einfluss der p76 α / PI3K-Mutante auf die Regulation der PI3K-Aktivität und auf das Wachstum von Zellen untersucht. Auf der anderen Seite wurde untersucht, ob das exogen zugeführte Wildtyp-p85 α -Gen in Cole Zellen exprimiert wird und ob dadurch die Funktion der p85 α / PI3K-Mutante in Cole Zellen aufgehoben werden kann. Gleichzeitig wurde die Überexpression der p85 α -Untereinheit, sowie ihre Auswirkung auf die PI3K-Aktivität und die PI3K / Akt abhängigen Signalkaskaden in normalen hämatopoetischen Zellen und Leukämie-Zellen untersucht.

5.1. Wirkung der Expression von p76 α und p85 α

Die Wirkung der p76 α -Expression wurde in den Zelllinien NIH3T3, PG13 und Cole, sowie in humanen primären hämatopoetischen CD34⁺ Zellen untersucht. Diese Zellen wurden mit dem p85 α -Konstrukt (das für das wildtyp Protein kodiert) oder zur Kontrolle mit dem MigRI-Vektor transduziert.

5.1.1. Effizienz der Zelltransduktion mit dem p76 α bzw. p85 α -Konstrukt

Die erfolgreiche Transduktion der Zellen wurde sowohl mittels EGFP-Fluoreszenz (im Fluoreszenz-Mikroskop) als auch mittels Western Blot Analyse (Nachweis des EGFP-Proteins) nachgewiesen (wie z. B. in Abb. 25, 30, 37). In dem retroviralen Konstrukt liegt das EGFP-Gen an 2. Stelle nach dem p76 α - bzw. p85 α -Gen. Die Expression von EGFP wird durch das vorgeschaltete IRES-Element ermöglicht, ist aber schwächer als die Expression des an 1. Stelle stehenden p76 α - bzw. p85 α -Gens. Deshalb ist die Menge von EGFP in p76 α - bzw. p85 α transduzierten Zellen kleiner, als in mit dem Vektor MigRI-transduzierten Zellen, wo das EGFP-Gen als alleiniges Gen auf dem Vektor exprimiert

wird. Gleichzeitig, ist die Menge von EGFP in p76 α bzw. p85 α transduzierten Zellen ähnlich. Da die Zellzahl der positiv sortierten CD34⁺ Zellen unter 3×10^4 lag, war es hier nicht möglich eine Western Blot Analyse durchzuführen, um die Expression von p85 α zu analysieren.

5.1.2. Expression von p76 α und p85 α nach Transduktion von NIH3T3 und PG13 Zellen

Nach der Transduktion ist in NIH3T3 und PG13 Zellen eine Überexpression von p85 α (um $154,9\% \pm 50,6\%$ bzw. $90,9\% \pm 12,1\%$) zu beobachten (Abb. 31 und 32). Ebenfalls kann eine Expression des mutierten-p76 α -Proteins ($93,7\% \pm 25,6\%$ bzw. $90,5\% \pm 4,4\%$ der endogenen p85 α -Menge) beobachtet werden. Diese Ergebnisse ließen sich auf einer Vielzahl von Western Blot Analysen (n=25) bestätigen, wobei die Mengen an mutiertem p76 α -Protein und überexprimiertem p85 α -Protein in den NIH3T3 und PG13 Zellen immer ähnlich waren.

5.1.2.1. Fehlende Expression von p85 α bei Überexpression von p76 α nach Transduktion der Cole Zellen

In den Cole Zellen waren die Expressionsmuster dieser zwei Konstrukte anders (Abb. 26). Hier konnte nur eine Überexpression des p76 α -Proteins, nicht aber des p85 α -Proteins festgestellt werden, obwohl die EGFP-Mengen in den mit p76 α und p85 α transduzierten Zellen ähnlich waren. Die Überexpression des p76 α -Proteins betrug $25,8\% \pm 10,3\%$, während das p85 α -Protein nur in einem Umfang von $1,8\% \pm 0,2\%$ exprimiert wurde.

Anhand der Daten von den NIH3T3 und PG13 Zellen würde nach einer gleichen EGFP-Expression auch eine ähnliche Expressionsrate von p76 α und p85 α zu erwarten. Da EGFP in den p85 α transduzierten Zellen ähnlich stark wie in p76 α transduzierten Zellen exprimiert wird, muss die mRNA in p85 α transduzierten Zellen in ähnlichen Mengen wie die mRNA in p76 α transduzierten Zellen vorkommen. Das Fehlen des p85 α -Proteins lässt

in diesem Fall auf einen post-transkriptionellen Mechanismus der Hemmung der p85 α -Expression nach p85 α -Transduktion der Cole Zellen schließen. In dem verwendeten Vektor sind keine *Splice-Donor*- oder *-Acceptor*-Stellen beschrieben.

Cole-Zellen beinhalten auf DNA-Ebene sowohl das wildtyp Allel für p85 α als auch das mutierte p85 α -Allel für p76 α . Auf mRNA Ebene können ebenfalls beide mRNAs gefunden werden, wobei das mutierte p76 α -mRNA in größeren Mengen zu finden ist (ein Verhältnis von p76 α -mRNA : p85 α -mRNA von 85% : 15%) (Daten aus der Diplomarbeit von Katrin Schulz). Auf Proteinebene ist aber in diesen Zellen ausschließlich das mutierte p76 α -Protein zu finden (Jücker et al., 2002). Das spricht dafür, dass auch in nicht transduzierten Cole Zellen Mechanismen vorhanden sein müssen, die eine Hemmung der p85 α -Expression bewirken.

Untersuchungen von Katrin Schulz im Rahmen ihrer Diplomarbeit konnten die Lysemethode, die DNA-Methylierung und Histondeacetylierung, den proteasomalen Abbau, sowie posttranslationale Regulationsmechanismen wie Tyrosinphosphorylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung von p85 α bzw. p76 α in Cole-Zellen als mögliche Ursache der p85 α -Expressionshemmung ausschließen.

In NIH3T3 und PG13 Zellen waren die Mengen an endogenem p85 α -Protein in mit p76 α -Konstrukt transduzierten Zellen gleich der p85 α -Mengen in nicht transduzierten Zellen, sodass die p76 α -Expression an sich zu keiner Hemmung der p85 α -Expression führt. Die p76 α - und p85 α -mRNA unterscheiden sich im ORF an einer einzigen Base. Es ist dennoch möglich, dass es zu einer unterschiedlich starken Bindung verschiedener Moleküle an diese mRNAs kommt, was zu unterschiedlichen Halbwertszeiten beider mRNAs führen kann. Diese Möglichkeit wurde untersucht in dem beide mRNAs *in vitro* transkribiert wurden und mit Cole-Zellextrakten inkubiert wurden (4.2.1.3.). Coomassie-Färbungen der Proteine aus den Ansätzen, welche an die p76 α -mRNA bzw. p85 α -mRNA binden (Abb. 28) zeigen keine Unterschiede in dem Bandenmuster, sodass in diesem Experiment kein Hinweis auf eine differentielle Bindung von Proteine an die p76 α - bzw. p85 α -mRNA gefunden werden konnte.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Expression von p76 α und p85 α ist eine Regulation im Bereich des nukleoplasmatischen Transports, Kernexports und der Plasmalokalisation der RNA. Dafür spielen RNA-Bindungsproteine wie Stau2 und ADAR (*adenosine deaminases that act on RNA*) eine wichtige Rolle. Diese Proteine werden zusammen mit RNA-Vorläufern, weiteren nukleolären Proteinen, zytoplasmatischen Faktoren (wie zusätzliche RNA-Bindungsproteine) und molekularen Motorproteinen zu Ribonukleoproteinpartikeln (RNP) zusammengebaut (Kiebler et al., 2005). Differentielle Bildung einer oder mehrerer dieser Proteine an p85 α -mRNA, bzw. p76 α -mRNA könnten dazu führen, dass die p76 α -mRNA zu den Ribosomen transportiert wird, während die p85 α -mRNA an einen anderen Ort in der Zelle transportiert wird, wo sie nicht translatiert bzw. degradiert wird. Es bleibt aber die interessante Beobachtung zu klären, dass in den Cole Zellen die mutierte p76 α -mRNA translatiert wird und die wildtyp p85 α -mRNA nicht. Es wäre zu erwarten, dass Zellen eher Mechanismen haben, um die Translation mutierter mRNA zu hemmen und nicht umgekehrt. Wie oben beschrieben, konnte gezeigt werden, dass *in vitro* transkribierte p76 α -mRNA und p85 α -mRNA gleiche Bindungsmuster an Proteine aus Cole-Extrakten zeigen. Es ist aber möglich, dass in diesen Extrakten Kernproteine, die differentiell an p76 oder p85-mRNA binden, ungenügend aufgereinigt wurden. Auf der anderen Seite, wurde die mRNA in diesem Versuch *in vitro* hergestellt, wodurch die Prozessierung zum nukleoplasmatischen Transport, Kernexport, und der Plasmalokalisation der RNA entfielen.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung der unterschiedlichen Expressionseffizienz von p76 α und p85 α nach Transduktion der Cole Zellen (wo nur die offenen Leserahmen transduziert werden) wären unterschiedliche mRNA Sekundärstrukturen, durch die sich die p85 α -mRNA von der p76 α -mRNA unterscheiden. Auch hier wäre zu klären, durch welchen Mechanismus in den Cole Zellen die Translation der wildtyp p85 α -mRNA gehemmt wird, während die mutierte p76 α -mRNA weiter translatiert wird. Auf der anderen Seite, unterscheiden sich die nach der Transduktion hergestellten mRNA-Moleküle in einer einzigen Base (die transduzierten Konstrukte beinhalten nur den offenen Leserahmen *ORF*). Es müsste daher an dieser Stelle ein Regulationsmechanismus postuliert werden, der in der Lage wäre, die mRNA-Moleküle an einem einzigen Basenunterschied zu erkennen.

Die mRNA-Translation ist durch Bindung von Proteinen an den 5'- und 3'-nicht translatierten Bereichen (5'-UTR und 3'-UTR: *untranslated region*) der mRNA maßgeblich reguliert. Diese Bereiche der mRNA werden, anders als die für ein Protein kodierende Sequenz, nicht translatiert. Es ist nicht auszuschließen, dass es in Cole Zellen, durch Mutationen in diesen Bereichen, zu einer Änderung der Translationsregulation der p76 α - bzw. p85 α -mRNA kommt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, sollten diese Bereiche in den Cole Zellen sequenziert werden, um mögliche Unterschiede in der Sequenz der p76 α - und der p85 α -mRNA festzustellen. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls möglich, dass translationsregulierende Proteine in den Cole Zellen mutiert sind, sodass sie eine unterschiedliche Bindungsaffinität zu der p76 α - bzw. p85 α -mRNA haben. Dies würde zu unterschiedlichen Translationseffizienzen der p76 α - bzw. p85 α -mRNA führen.

Eine Möglichkeit, diese Mechanismen zu untersuchen, ist die Durchführung einer *in vitro* Transkription und Translation des p76 α - bzw. p85 α -Gens. In diese Reaktionen können Extrakte der Cole Zellen hinzugefügt werden. Wenn in den Cole Zellen Moleküle vorhanden sind, die die Translation von p85 α hemmen, würden diese Moleküle auch *in vitro* zu einer Hemmung der p85 α -Translation führen. Durch weitere Auftrennung und Aufreinigung der Cole-Extrakte könnte eine Isolierung dieses / -r Moleküls / -e erreicht werden. Einen guten Ansatzpunkt für diese weiteren Untersuchungen geben die bereits begonnenen Versuche der *in vitro* Transkription / Translation der zwei Konstrukte (s. 4.2.4.). So zeigte der erste Ansatz, dass beide Konstrukte *in vitro* exprimiert werden und, dass beide Konstrukte in ähnlicher Stärke exprimierbar sind. Dadurch könnte weiter untersucht werden, ob und welche Moleküle genau eine mögliche Rolle in dem Expressionsmuster von p76 α , bzw. p85 α in Cole Zellen spielen.

Eine weitere posttranskriptionelle Regulationsmöglichkeit kann in kurzen RNA-Molekülen, die Genexpression regulieren, gefunden werden. Diese kurze mRNA bindet durch komplementäre Interaktion an die Ziel-mRNA und führt zu ihrer Degradierung. So führen siRNAs (*small interfering RNA*) zum Abbau der Ziel-mRNA durch zelluläre Nukleasen (Haley et al., 2004). Der genaue Mechanismus der Funktion der miRNA ist nicht endgültig geklärt, aber ihre Rolle in der Translationsregulation könnte im Rahmen einer Hemmung der Translationselongation oder -termination, sowie in einem faktorvermittelten Ablösen der Ribosomen von der zu translatierenden mRNA erfolgen

(Petersen et al., 2006). Ob siRNA- oder miRNA-Moleküle an der Hemmung der Translation der p85 α -mRNA in der Cole-Zelllinie beteiligt sind, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Wie oben beschrieben, müssten auch in diesem Fall von den kurzen RNA-Molekülen auf der einen Seite Unterschiede von einer einzigen Base in der Ziel-RNA-Sequenz erkannt werden (es sei denn, es sind in den 5'UTR und 3'UTR weitere Mutationen vorhanden, was aber trotzdem die unterschiedlichen Expressionsmuster nach Transduktion nicht erklärt) und auf der anderen Seite, müssten sie zu einem Abbau der Wildtyp-p85 α -mRNA und nicht der mutierten p76 α -mRNA führen.

5.1.3. Effekte der p76 α -bzw. p85 α -Transduktion

Zur Feststellung der PI3K / Akt Aktivität nach p76 α - bzw. p85 α -Transduktion wurde in NIH3T3, PG13 und Cole Zellen die Phosphorylierung von Akt an Ser473 untersucht (Abb. 27 und 33). Bei den CD34⁺ Zellen wurde die GM-CSF-abhängige Koloniebildung untersucht. Außerdem wurde die Aktivität der PI3K nach EGF-Stimulation in p76 α bzw. p85 α transduzierten NIH3T3 Zellen untersucht.

5.1.3.1. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion in Cole Zellen

Als erstes wurde in Cole Zellen die PI3K-Abhängigkeit der Proliferation untersucht werden. Dafür wurde ein Proliferationsversuch mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002 (Endkonzentration 25 μ M) durchgeführt (Abb. 23). Hier wurde festgestellt, dass die Hemmung der PI3K sowohl zu einer sehr starken Hemmung der Proliferation (nach 10 Tagen war die Zellzahl bei den nicht behandelten Zellen 224,2 fach größer als bei den mit LY294002 behandelten Zellen), als auch zum Absterben der Cole Zellen (nach zehn Tage war der Anteil der toten Zellen bei den nicht behandelten Zellen 2,5% $\pm$ 1,2%; bei den mit LY294002 behandelten Zellen 87,2% $\pm$ 6,5%) führte.

Zur Feststellung der PI3K / Akt Aktivität wurde die Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach p76 α - bzw. p85 α -Transduktion untersucht (Abb. 27). Transduktion mit dem p85 α -Konstrukt führte zu keiner Expression von p85 α . Auch die P-Akt (Ser473) Mengen

blieben in diesen Zellen unverändert im Vergleich zu mit dem Vektor transduzierte Zellen. Dies war zu erwarten, da p85 α auch nach der Transduktion nicht vorhanden war. p76 α transduzierte Zellen zeigen eine signifikante Abnahme der Akt-Phosphorylierung.

Ueki et al., 2000 beschreiben ein Modell zur Wirkung der p85 α -Überexpression auf die Insulin-Signalkaskade. Nach diesem Modell, sind in Zellen sowohl p85 α / p110 α -Heterodimere (in Form von PI3K) als auch freie, monomerische p85 α -Untereinheiten vorhanden. Diese freien Untereinheiten können mit aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Komplexe bilden, die zu keiner Aktivierung der PI3K / Akt Signalkaskade führt, weil die p110 α katalytische Untereinheit der PI3K fehlt. Überexpression von p85 α führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Menge an freien p85 α -Untereinheiten zu p85 α / p110 α -Heterodimeren zugunsten der freien p85 α -Untereinheiten, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden und dadurch die Signalkaskade inhibieren (Abb. 68B).

Anhand dieses Modells läßt sich die Abnahme der Akt-Phosphorylierung nach p76 α -Transduktion erklären. p76 α -Überexpression führt zu einer Zunahme des Kompetitionszustandes zwischen p76 α / p110 α -Heterodimeren und freien p76 α -Untereinheiten in Cole Zellen, dadurch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass freie p76 α -Untereinheiten an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden und dadurch die Signalkaskade inhibieren.

5.1.3.2. Effekte der p76 α - bzw. p85 α -Transduktion in NIH3T3 Zellen

Auch hier wurde zur Feststellung der PI3K / Akt Aktivität die Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach p76 α - bzw. p85 α -Transduktion untersucht (Abb. 33). In NIH3T3 Zellen führt die Überexpression sowohl von p76 α , als auch p85 α zu einer signifikanten Abnahme der Akt-Phosphorylierung.

- p76 α -Überexpression:

Überexpression von p76 α führt gleichzeitig zu zwei wichtigen Änderungen in den Zellen. Auf der einen Seite sind in den Zellen gleichzeitig p76 α - und p85 α -

Untereinheiten vorhanden. Die katalytischen Untereinheiten können beide diese Untereinheiten binden. Die Interaktion findet über die iSH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit statt, die in der p76 α -Untereinheit vorhanden ist. Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass das Fehlen der c-SH2-Domäne zu einer Konformationsänderung der p76 α -Untereinheit führt und damit zu einer veränderten Bindungsstärke zur katalytischen Untereinheit. Bindung der p76 α -Untereinheit an der katalytischen Untereinheit der PI3K führt wahrscheinlich zu einer verstärkten Aktivierung der PI3K, aufgrund des Fehlens der inhibitorischen c-SH2-Domäne (Disinhibitionsmodell von Chan et al., 2002). Gleichzeitig hat sich aber nach p76 α -Transduktion auch die Gesamtmenge an regulatorischen Untereinheiten in der Zelle etwa verdoppelt. Das führt, wie oben beschrieben, zu einer Zunahme des Kompetitionszustandes zwischen p85 α (p76 α) / p110 α -Heterodimeren und freien p85 α (p76 α)-Untereinheiten, und dadurch zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass freie p85 α (p76 α)-Untereinheiten an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden und dadurch die Signalkaskade inhibieren.

Die PI3K-Aktivität, gemessen an der P-Akt Menge, die wir in diesen p76 α transduzierten Zellen sehen, ist demnach ein Mischzustand zwischen Aktivierung durch p76 α -Untereinheiten und Hemmung durch Zunahme der Mengen an freien regulatorischen Untereinheiten. Es ist schwierig, diese zwei Mechanismen auseinanderzuhalten, weil die in p76 α fehlende c-SH2-Domäne sowohl für die Bindung an aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und Aktivierung der PI3K, als auch für die Inhibition der katalytischen Untereinheit eine wichtige Rolle spielt.

Welche dieser beiden Mechanismen der Wichtigere ist und die stärkere Rolle spielt, ist nicht vollständig klar, aber in unseren Experimenten war das Gesamtergebnis eher eine Hemmung der PI3K / Akt Signalkaskade. Durch weitere Versuche können diese zwei Mechanismen getrennt voneinander untersucht werden. Die Hemmung durch Kompetition der freien regulatorischen Untereinheiten wurde in dieser Arbeit weiter untersucht, in dem die Zellen mit dem wildtyp p85 α -Gen transduziert wurden (s.u.). Die aktivierende Wirkung der p76 α -Untereinheiten kann untersucht werden, in dem die endogene wildtyp p85 α -Expression ausgeschaltet wird (z.B. mit siRNA). Diese Zellen, die kein p85 α exprimieren, können dann mit p76 α transduziert werden (wobei die p76 α -Menge der endogenen p85 α -Menge in normalen Zellen entsprechen soll). Damit kann die Wirkung

der Mutation dieses Proteins untersucht werden, ohne dass die Überexpression zu dem oben beschriebenen Mischzustand der Aktivierung führt.

- *p85 α -Überexpression:*

Überexpression vom Wildtyp-p85 α führte zu einer Hemmung der Ser473-Phosphorylierung von Akt (somit zu einer Hemmung der PI3K / Akt Signalkaskade). Eine Erklärung dafür, ist der oben beschriebene Kompetitionsmechanismus (nach Ueki et al., 2000) (Abb. 68B). p85 α kann die Aktivierung der Signalkaskade auch auf anderem Wege regulieren (Abb. 68C und 68D).

Bei Mäusen wurde beobachtet, dass die p85 α -Untereinheit mit ihrer c-SH2-Domäne an die Inositolphosphatase SHIP binden kann (Gupta et al., 1999). Eine Interaktion der regulatorischen Untereinheit der PI3K mit der Phosphatase PTEN wurde ebenfalls beschrieben (Geering et al., 2007). Es ist möglich, dass p85 α im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus Phosphatasen wie SHIP aktivieren kann. Dies würde zu einer Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ und zur Unterbrechung der PI3K / Akt Signalkaskade führen. Es ist möglich, dass p85 α diese Funktion als freie Untereinheit, unabhängig von der katalytischen p110-Untereinheit der PI3K ausüben kann. Der p85 α regulatorischen Untereinheit wurden schon PI3K-unabhängige Funktionen zugeschrieben (Ueki et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, wie p85 α die Aktivität der Signalkaskade regulieren kann, ist mittels der JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*). Die Insulin-induzierte JNK-Aktivität wird durch Hemmung der p85 α -Expression gehemmt. Gleichzeitig führt Reexpression von p85 in p85^{-/-} Knockout-Zellen zur Wiederherstellung der JNK-Aktivität, was zur Annahme führt, dass JNK durch das p85-Protein, unabhängig von der PI3K-Aktivität aktiviert wird (Ueki et al., 2003). Diese Aktivierung läuft weder durch direkte Bindung, noch über die Signalkaskade Ras / Rac1 / Cdc42 / MEKK1 / SEK1, sondern über eine weitere Signalkaskade *downstream* von ras oder durch Hemmung eines JNK-hemmenden Proteins. JNK seinerseits kann die PI3K Signalkaskade hemmen, was den negativen Feedback-Zyklus vervollständigt (Ueki et al., 2003).

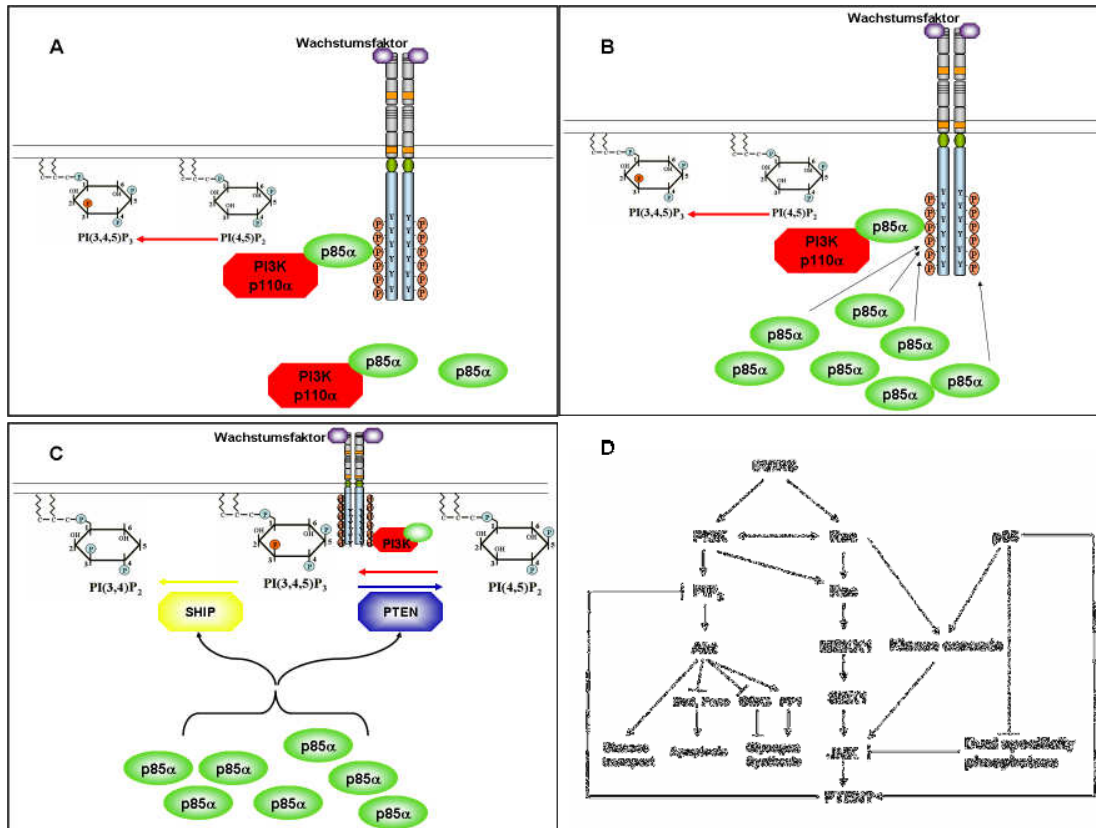


Abb. 68: Modelle über die Wirkung der p85α-Überexpression. A) in normalem Zustand sind sowohl p85 / p110 Heterodimere als auch freie p85α-Untereinheiten in den Zellen vorhanden (Ueki et al., 2000); B) freie p85α-Untereinheiten können mit aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Komplexe bilden, die zu keiner Aktivierung der PI3K / Akt Signalkaskade führen, weil die p110α katalytische Untereinheit der PI3K fehlt. Überexpression von p85α führt zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Menge an p85α / p110α-Heterodimeren zu freien p85α-Untereinheiten zugunsten der freien p85α-Untereinheiten, die mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen binden und dadurch die Signalkaskade inhibieren (Ueki et al., 2000); C) es ist möglich, dass freie p85α-Untereinheiten mit Phosphatasen wie SHIP und PTEN interagieren und durch deren Aktivierung die Signaltransduktion inhibieren (Gupta et al., 1999; Geering et al., 2007); D) p85α kann die Aktivität der Signalkaskade auch über die JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) regulieren (Ueki et al., 2003).

5.1.3.3. EGF-Stimulation der mit p76α- bzw. p85α-transduzierten NIH3T3 Zellen

Auch hier wurde zur Feststellung der PI3K / Akt Aktivität die Phosphorylierung von Akt an Ser473 nach p76α- bzw. p85α-Transduktion untersucht (Abb. 35). Während in NIH3T3 Zellen eine Hemmung der Ser473-Phosphorylierung nach p76α- und p85α-Transduktion beobachtet werden kann, wird diese Hemmung aufgehoben, wenn die Zellen

für 16 Stunden in 0,5%-igem FCS Medium gehungert werden. Durch das Hungern werden Signalkaskaden in diesen Zellen inaktiviert, die normalerweise über PI3K ihre Wirkungen ausüben. In den gehungerten Zellen kann beobachtet werden, dass die P-Akt (Ser473) Menge deutlich abgenommen hat und in mit dem Vektor, p76 α und p85 α transduzierten Zellen gleich ist. Nach EGF-Stimulation ändern sich die P-Akt (Ser473) Mengen nicht und es entstehen ebenfalls keine Unterschiede in den P-Akt (Ser473) Mengen in mit dem Vektor, p76 α und p85 α transduzierten Zellen. Die Begründung dieser Daten findet sich in den Western Blot Analysen der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in diesen Zellen. Schon in den nicht stimulierten Zellen ist eine deutliche Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors zu sehen, was bedeutet, dass in diesen Zellen der EGF-Rezeptor konstitutiv aktiv ist. Auch nach Stimulierung mit 10 nM EGF Endkonzentration kommt es zu keiner stärkeren Aktivierung des EGF-Rezeptors, was ebenfalls für eine konstitutive Aktivierung des EGF-Rezeptors in diesen Zellen spricht.

5.1.3.4. Effekte der p76 α – bzw. p85 α –Transduktion in CD34⁺ Zellen

Hierbei wurde die GM-CSF-abhängige Koloniebildung von CD34⁺ Zellen nach Transduktion mit p76 α bzw. p85 α untersucht (Abb. 38). Sowohl nach Transduktion mit p76 α als auch mit p85 α ist die Anzahl der gebildeten Kolonien um 87,0% $\pm$ 19,0% bzw. 76,8% $\pm$ 6,6% kleiner. Die Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung entspricht der Hemmung der Ser473-Phosphorylierung beobachtet in NIH3T3 Zellen. PI3K wird nach Stimulation mit GM-CSF aktiviert (Gu et al., 2000). Die Ergebnisse mit den CD34⁺ Zellen entsprechen den Ergebnissen bei den NIH3T3 Zellen und lassen sich ebenfalls mit den oben beschriebenen Kompetitionsmechanismus, Aktivierung von Phosphatasen oder Regulation anderer Signalkaskaden durch p85 α erklären (s.o. 5.1.3.2.). Die Hemmung der Koloniebildung durch p85 α –Überexpression wurde weiteruntersucht (s. u. 5.2.).

5.2. Überexpression der p85 α –Untereinheit und ihre Effekte

Bei der Untersuchung der Effekte der p76 α –Expression in NIH3T3, PG13, Cole und humanen primären hämatopoetischen CD34⁺ Zellen wurden die Zellen zur Kontrolle

mit dem MigRI-Vektor oder mit dem p85 α -Konstrukt (das für das Wildtyp-Protein kodiert) transduziert. Dabei wurde beobachtet (s.o.), dass eine Überexpression der p85 α -Untereinheit mit einer Hemmung der Ser473-Phosphorylierung in NIH3T3 und PG13 Zellen, sowie einer Hemmung der Koloniebildung von CD34⁺ Zellen einhergeht, während in Cole Zellen die Expression vom transduzierten p85 α -Gen durch einen posttranskriptionellen Mechanismus gehemmt wird.

Dies leitete uns dazu, die Effekte der p85 α -Überexpression weiter zu untersuchen. Zum einen, wurden die Effekte der p85 α -Transduktion in CD34⁺ Zellen bestätigt und die Abhängigkeit der GM-CSF-abhängigen Hemmung der Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der GM-CSF-Konzentration untersucht. Zum anderen, wurden die Effekte der p85 α -Transduktion in Leukämie-Zelllinien untersucht, die Mutationen aufweisen, die zur Aktivierung der PI3K führen und häufig in humanen Leukämien vorkommen.

Die Überexpression der p85-Untereinheit in nicht hämatopoetischen Zellen ist beschrieben (Hara et al., 1994; Rodriguez-Viciano et al., 1997; Ueki et al., 2000), aber Daten über die Überexpression in hämatopoetischen Zellen fehlen.

5.2.1. Effekte der p85 α -Transduktion in CD34⁺ Zellen

Als erstes wurde die in 5.1.3.4. beobachtete Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion in drei Experimenten untersucht (Abb. 43). In allen drei Versuchen war eine deutliche Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung, jeweils um 76,8% $\pm$ 3,5%, 58,7% $\pm$ 5,9%, und 54,2% $\pm$ 1,5% zu sehen.

5.2.1.1. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der GM-CSF-Konzentration

Die Anzahl der gebildeten Kolonien steigt mit Zunahme der GM-CSF-Konzentration (Abb. 44). Zu beobachten ist, dass bei sehr geringen GM-CSF-Konzentrationen kaum Kolonien gebildet werden, was die Abhängigkeit der

Koloniebildung von der GM-CSF-Stimulation bestätigt. Bei höheren GM-CSF-Konzentrationen ist die bereits oben beschriebene Hemmung der Koloniebildung durch p85 α -Transduktion zu beobachten (um 57,4% $\pm$ 8,5% bei 1 ng/ml GM-CSF und um 57,2% $\pm$ 0,7% bei 10 ng/ml GM-CSF). Die Anzahl der gebildeten Kolonien in mit Vektor transduzierten Zellen ist ähnlich der Anzahl der gebildeten Kolonien in mit p85 α transduzierten Zellen, wenn letztere in der 10-fachen GM-CSF-Konzentration kultiviert wurden. Dies bedeutet, dass die Hemmung der Koloniebildung durch p85 α -Transduktion durch eine Zunahme der GM-CSF-Konzentration um den Faktor 10 aufgehoben werden kann.

5.2.1.2. Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der p85 α -Überexpressionsstärke

Die transduzierten CD34⁺ Zellen wurden nach der Stärke der EGFP-Fluoreszenz sortiert. Während die Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung durch p85 α -Transduktion erneut bestätigt werden konnte, konnte ein nur sehr geringfügiger, statistisch nicht signifikanter Unterschied in der Koloniebildung zwischen den schwach und stark positiven p85 α transduzierten CD34⁺ Zellen festgestellt werden (Abb. 46). Der Grund dafür könnte sein, dass der Unterschied in der Stärke der p85 α -Überexpression in den schwach und stark positiven p85 α transduzierten CD34⁺ Zellen nicht groß genug ist, um zu einer statistisch signifikanten Hemmung der PI3K und damit der Koloniebildung zu führen. So könnte die Überexpression der p85 α -Untereinheit auch in den schwach positiven CD34⁺ Zellen so stark sein, dass es zu einer Hemmung der PI3K Aktivität durch die oben genannten Mechanismen kommt und eine noch stärkere Überexpression zu keiner weiteren Hemmung führt. Um eine Abhängigkeit der Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung nach p85 α -Transduktion von der p85 α -Überexpressionsstärke genau zu untersuchen, können zum einen die Zellen in sehr schwach, schwach, mittel, stark und sehr stark positive CD34⁺ Zellen sortiert werden. Auf der anderen Seite, kann die zur Transduktion der CD34⁺ Zellen Titer der RD114-pseudotypisierten Viren so geändert werden, dass die Stärke der p85 α -Überexpression vermindert werden kann.

5.2.1.3. Hemmung der GM-CSF-abhängigen Proliferation nach p85 α -Transduktion

Hierbei wurde die GM-CSF-abhängige Proliferation der CD34⁺ Zellen nach Transduktion mit p85 α untersucht (Abb. 47). Nach Transduktion mit p85 α ist die Zellzahl um 60,9% $\pm$ 82,8% geringer, wobei aufgrund starker Zahlenschwankungen dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

5.2.1.4. Effekte der p85 α -Transduktion in CD34⁺ Zellen eines Patienten mit MPS

Die aus einer Leukapherese gereinigten CD34⁺ Zellen wurden nach Transduktion und Sortierung in Methylzellulose oder StemSpan-Medium, jeweils versetzt mit 10 ng/ml GMCSF, kultiviert. Es war aber weder eine Bestimmung von Koloniezahlen noch ein Proliferationsversuch möglich, weil die Zellen kein Wachstum zeigten und nach 14 Tagen starben (Abb. 50). Die CD34⁺ Zellen wurden in diesem Fall direkt aus dem Blut des Patienten gewonnen (während es sich in den anderen Versuchen immer um aus Nabelschnurblut gereingte CD34⁺ Zellen handelte). Es ist möglich, dass obwohl der Patient sich in einer Blastenkrise befand, die aus dem Knochenmark ausgeschwemmten Zellen nicht mehr unreife Zellen waren, sodass diese Zellen möglicherweise schon so weit ausdifferenziert waren, dass die GM-CSF-Stimulierung nicht mehr zum Wachstum und zur Proliferation ausführte.

Die in den CD34⁺ Zellen gezeigten Effekte der p85 α -Transduktion entsprechen den Ergebnissen, die in NIH3T3 Zellen beobachtet wurden, wo es zu einer Hemmung der Ser473-Phosphorylierung von Akt kommt. Während in NIH3T3 Zellen die PI3K Aktivität an der (Ser473) p-Akt Menge durch Western Blot Analysen untersucht werden kann, ist in CD34⁺ Zellen eine Western Blot Analyse nicht möglich. Die Zahl der positiv sortierten CD34⁺ Zellen lag zwischen 1×10^4 und 3×10^4 und war damit nicht ausreichend, um Western Blot Analysen durchzuführen und die p-Akt Mengen dadurch zu bestimmen. Hier wäre eine (Ser473) p-Akt-Immunfluoreszenzfärbung z.B. mit AlexaFluor 647 zur Bestimmung der p-Akt Mengen in CD34⁺ Zellen sinnvoll.

Eine GM-CSF-Stimulation führt zur Aktivierung der PI3K und Phosphorylierung von Akt (Gu et al., 2000). Um die Hemmung der GM-CSF-Signalkaskade durch p85 α -Überexpression weiter zu untersuchen, wurden NIH3T3-Zellen verwendet, die den GM-CSF-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren und GM-CSF stimulierbar sind (s. 4.3.2.6.). Die Zellen wurden vor dem Versuch gehungert, um das Phosphorylierungsniveau von Akt zu verringern. Nach dem Hungern konnte trotzdem eine immer noch deutliche (Ser473) Akt-Phosphorylierung in den Mig-transduzierten Zellen festgestellt werden (Abb. 49). Das Hungern über 2 Stunden war anscheinend nicht lange genug, um die Akt-Phosphorylierung ganz auszuschalten. Vor Stimulation ist eine statistisch signifikante Hemmung der (Ser473) Akt-Phosphorylierung nach p85 α -Transduktion um $59,6\% \pm 22,1\%$ zu beobachten. Nach GM-CSF-Stimulation ist eine Zunahme dieser Hemmung auf $85,5\% \pm 39,2\%$ zu beobachten. Die Zunahme ist am ehesten dadurch zu erklären, dass die Mig-transduzierten Zellen stärker durch GM-CSF stimuliert werden als die p85 α -transduzierten Zellen, wo p85 α eine hemmende Rolle spielt. Dies ist ein sehr starker Hinweis auf einer hemmenden Rolle von p85 α auf Zytokin-Signalkaskaden wie die GM-CSF-Signalkaskade.

Diese Zellen können verwendet werden, um in weiterführenden Experimente, auch die Mechanismen der Zytokin-abhängigen PI3K Aktivierung über die p85 α -Untereinheit weiter zu untersuchen.

Ein Weg, diese Mechanismen zu untersuchen, ist bestimmte Mutationen an der p85 α -Untereinheit einzuführen. Die p85 α -Untereinheit wird aktiviert, in dem sie über FLVR-Motive in ihren zwei SH2-Domänen mit den phosphorylierten Tyrosinresten der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder Adaptermoleküle interagiert. Durch Herstellung von mutierten p85 α -Untereinheiten, wo die FLVR Bindungsstelle an der n-SH2-, c-SH2 oder gleichzeitig beiden SH2-Domänen mutiert ist, sodass sie nicht mehr zur Aktivierung der PI3K beitragen können, kann untersucht werden, welche der SH2-Domänen eine wichtigere Rolle in der Zytokin-abhängigen PI3K-Aktivierung spielt (Mutation 1, 2 oder 3, Abb. 69). Gleichzeitig, kann die Bindungsstelle der p110 α katalytischen Untereinheit an der p85 α -Untereinheit mutiert werden (Mutation 4 und 5, Abb 69). Durch diese Mutanten kann dann auch der Kompetitionsmechanismus der freien p85 α -Untereinheiten zu den p85 α / p110 α -Heterodimeren näher untersucht werden. So kann z. B. untersucht werden,

ob ein Kompetitionszustand entsteht, in dem: a) p85 α -Untereinheiten, die nicht an der p110 α -Untereinheit binden können, an den aktivierten Rezeptorkomplexen binden und damit die Bindung der PI3K daran hemmen; b) p85 α -Untereinheiten, die nicht an den aktivierten Rezeptorkomplexen binden können, an der p110 α -Untereinheit binden, sodass die PI3K nicht an den aktivierten Rezeptorkomplexen gebunden werden kann; c) beide Mechanismen eine Rolle spielen.

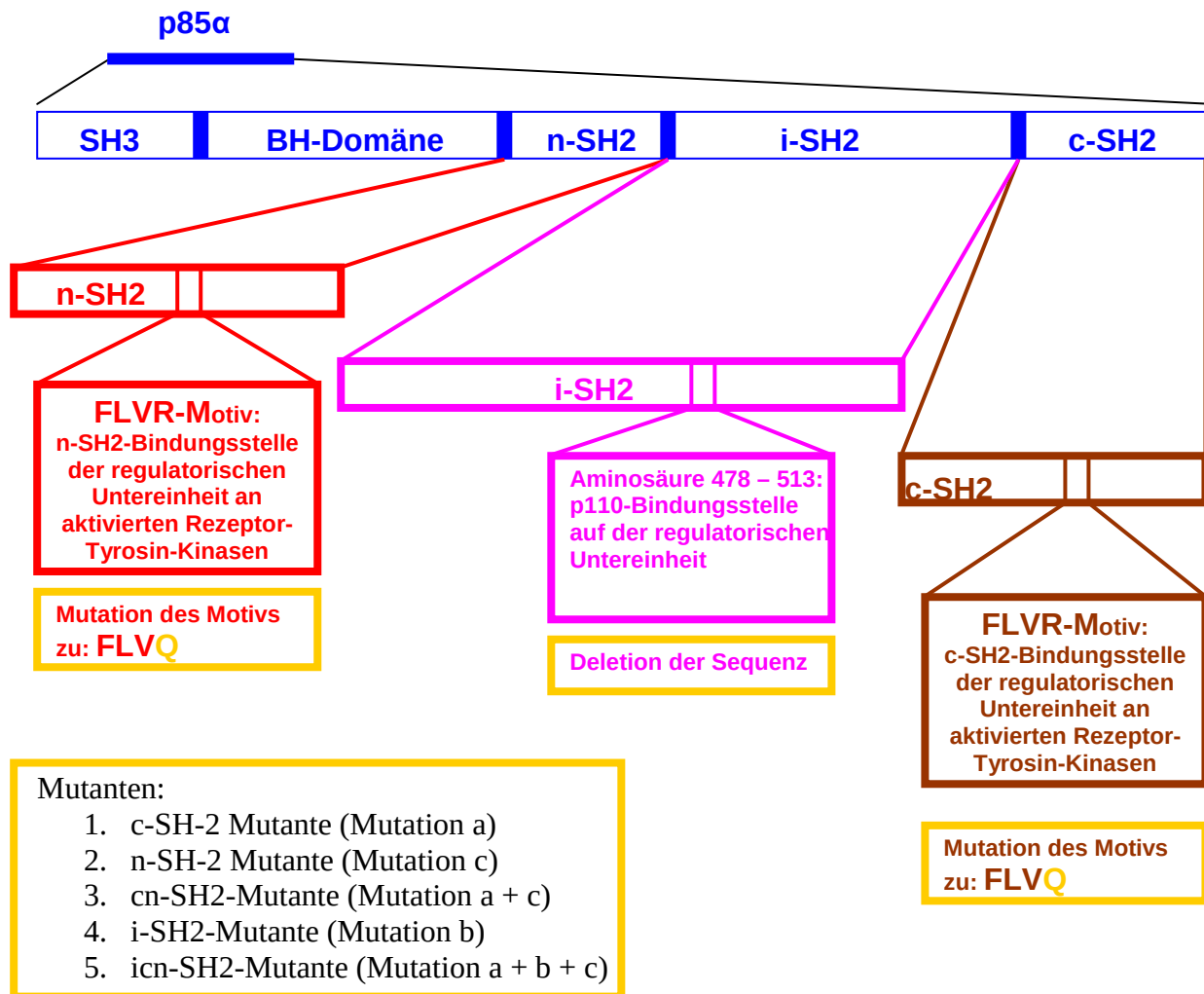


Abb. 69: Mutatione zu weiteren Untersuchungen über den Kompetitionsmechanismus der freien p85 α -Untereinheiten zu den p85 α / p110 α -Heterodimeren

Die Ergebnisse mit den CD34⁺ Zellen lassen sich ebenfalls mit dem oben beschriebenen Kompetitionsmechanismus, Aktivierung von Phosphatasen oder Regulation anderer Signalkaskaden durch p85 α erklären (s.o. 5.1.3.2.). Die Feststellung, dass p85 α die Aktivität der Zytokin-abhängigen Singalkaskaden (als negativer Wachstumsregulator) reguliert, könnte hilfreich in der Entwicklung von Gentherapien sein (s. auch 5.3.). Hierbei

ist eine eventuell Zytotoxizität von p85 α auf gesunden Zellen zu beachten. Um dies zu untersuchen sind weitere Untersuchungen an Zelllinien und an Tiermodellen notwendig.

5.2.2. Effekte der p85 α -Transduktion in anderen Zelllinien

Weiterhin wurden die Effekte der p85 α -Überexpression in anderen Zelllinien untersucht. Es wurden die humane 293gp (HEK293) Zelllinie, sowie die Leukämie-Zelllinien Eol1, Jurkat, MV4-11, K562, Kasumi1 und M1 untersucht.

5.2.2.1. Effekte der p85 α -Transduktion in 293 gp Zellen

Die humane Zelllinie 293 gp (HEK 293) wurde mit dem MigRI Vektor oder dem p85 α -Konstrukt transduziert. Die erfolgreiche Transduktion der Zellen wurde sowohl mittels EGFP-Fluoreszenz (im Fluoreszenz Mikroskop) als auch mittels Western Blot Analyse (Nachweis des EGFP-Proteins) nachgewiesen (Abb. 51). Auch hier, wie bei den NIH3T3 und PG13 Zellen, ist die EGFP-Expression in den mit p85 α transduzierten Zellen (wo das EGFP-Gen an 2. Stelle, nach dem p85 α -Gen liegt) kleiner als in den mit dem Vektor transduzierten Zellen (wo das EGFP-Gen an 1. Stelle liegt).

Nach der Transduktion ist in den 293 gp Zellen eine Überexpression von p85 α um $121,6\% \pm 19,5\%$ zu beobachten (Abb. 52). Zur Feststellung der PI3K / Akt Aktivität nach p85 α -Transduktion wurde die Phosphorylierung von Akt an Ser473 untersucht (Abb. 53). Die Überexpression von p85 α führt zu einer signifikanten Abnahme der Akt-Phosphorylierung um $64,9\% \pm 4,1\%$ (nach Abgleich an GAPDH) (bzw. $77,0\% \pm 4,4\%$ nach Abgleich an Akt), verglichen mit der Akt-Phosphorylierung in Zellen, die nur mit dem Vektor transduziert wurden. Diese Daten stimmen mit den an der NIH3T3-Zelllinie (s.o.) gewonnenen Daten überein. Die möglicherweise dafür zuständigen Mechanismen wurden oben beschrieben.

5.2.2.2. Effekte der p85 α -Transduktion in Leukämie-Zelllinien

Für die Untersuchungen der Effekte der p85 α -Überexpression in Leukämie-Zelllinien, wurden Zelllinien ausgesucht, die eine Aktivierung der PI3K – Akt Signalkaskade aufweisen und deren Mutationen relativ häufig in humanen Leukämien vorkommen. Die Leukämie-Zelllinien, die untersucht wurden, waren: Eol1 (PDGFR-Mutation), Jurkat (starke Aktivierung der PI3K mit großen Mengen (Ser473) P-Akt), MV4-11 (FLT3R-Mutation), K562 (BCR-ABL Protein), Kasumi (c-kit Mutation) und M1 (s. a. 3.1.6.1.).

- PI3K-Abhängigkeit der Zellproliferation und Apoptose

Als erstes wurde untersucht, in welchem Maße die Proliferation dieser Zelllinien PI3K-abhängig ist. Dafür wurde ein Proliferationsversuch dieser Zellen mit und ohne den PI3K Hemmstoff LY294002 (Endkonzentration 25 μ M) durchgeführt. (Abb. 54). Hierbei zeigte sich, dass in allen Zelllinien die Hemmung der PI3K sowohl zu einer Hemmung der Proliferation (nach zehn Tagen war die Zellzahl bei den nicht behandelten Zellen deutlich größer als bei den mit LY294002 behandelten Zellen), als auch zu einem stärkeren Absterben (nach zehn Tagen war der Anteil der toten Zellen bei den nicht behandelten Zellen deutlich niedriger als bei den mit LY294002 behandelten Zellen) führte (Tab. 10).

Zelllinie	Verhältnis Zellzahl nicht behandelter Zellen : Zellzahl mit LY294002 behandelte Zellen (nach 10 Tagen)	Anteil toter Zellen (Tag 10)	
		Ohne LY	Mit LY (25 μ M)
Eol1	64,8 : 1	4,4% $\pm$ 1,1%	50,9% $\pm$ 4,8%
Jurkat	30,9 : 1	1,5% $\pm$ 0,3%	63,6% $\pm$ 4,4%
MV4-11	467,9 : 1	4,0% $\pm$ 1,5%	94,3% $\pm$ 1,3%
K562	9,8 : 1	1,9% $\pm$ 0,2%	21,7% $\pm$ 1,7%
Kasumi	53,4 : 1	1,0% $\pm$ 0,0%	45,9% $\pm$ 11,6%
M1	126,2 : 1	8,1% $\pm$ 4,1%	61,2% $\pm$ 3,6%

Tab. 10: Proliferationsversuch mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Für weitere Einzelheiten s. Text und 4.3.3.4.

Die Aktivität der PI3K wurde anhand der Ser473-Phosphorylierung von Akt nachgewiesen (Abb. 56). Abgesehen von der K562-Zelllinie, konnte in allen Zelllinien P-Akt (Ser473) nachgewiesen werden, wobei in manchen Zelllinien (Jurkat, M1 und MV4-11) die P-Akt (Ser473) – Mengen deutlich stärker waren als in den anderen Zelllinien (Eol1, Kasumi). Zu beobachten ist ein Zusammenhang zwischen der beobachteten

Proliferationshemmung / Absterben durch LY294002 und der PI3K Aktivität / P-Akt (Ser473) Menge. Zelllinien, die große P-Akt (Ser473) Mengen zeigen (M1 und MV4-11), zeigen eine starke Proliferationshemmung (126,2 bzw. 467,9 fach mehr Zellen nach zehn Tagen Proliferation ohne LY294002 als mit LY294002) und hohe Sterberaten (nach zehn Tagen 61,2% $\pm$ 3,6% bzw. 94,3% $\pm$ 1,3% tote Zellen nach Behandlung mit LY294002). Zelllinien, die schwächere P-Akt (Ser473) Mengen im Western Blot zeigen (Eol1, Kasumi und K562), zeigen eine nicht so starke Proliferationshemmung (64,8, 53,4 bzw. 9,8 fach mehr Zellen nach zehn Tagen Proliferation ohne LY294002 als mit LY294002) und nicht so hohe Sterberaten (nach zehn Tagen 50,9% $\pm$ 4,8%, 45,9% $\pm$ 11,6% bzw. 21,7% $\pm$ 1,7% tote Zellen nach Behandlung mit LY294002). Dies spricht dafür, dass in diesen Zelllinien die PI3K nicht gleich aktiv ist, und ihr Wachstum nicht im gleichen Maße PI3K-abhängig ist. Hierbei zeigen sich die MV4-11 und K562 Zelllinien als die zwei Extreme: die MV4-11 Zelllinie zeigt große Mengen an P-Akt (Ser473) im Western Blot, durch LY294002 wird ihre Proliferation am stärksten gehemmt und ihre Sterberate am stärksten gesteigert; die K562 Zelllinie zeigt sehr geringe Mengen an P-Akt (Ser473) im Western Blot, durch LY294002 wird ihre Proliferation am wenigsten gehemmt und ihre Sterberate am geringsten gesteigert.

Aus diesem Schema fällt die Jurkat-Zelllinie raus. Sie zeigt durchgehend große P-Akt (Ser473) Mengen im Western Blot, während sie sich in diesem Proliferationsversuch so verhält, wie die Zelllinien die geringe Mengen P-Akt (Ser473) im Western Blot zeigen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Beobachtung, dass auch nach der Hemmung mit LY294002, in Jurkat Zellen durch eine Western Blot Analyse immer noch deutliche Mengen P-Akt (Ser473) nachgewiesen werden können (Abb. 71). Dies zeigt, dass die PI3K Aktivität und die damit zusammenhängende Ser473-Phosphorylierung von Akt in den Jurkat Zellen so stark ist, dass auch eine Hemmung der PI3K mit 25 μ M LY294002 nicht ausreicht, um diese Phosphorylierung vollständig auszuschalten. Diese Restaktivität von PI3K könnte dazu führen, dass die Jurkat Zellen auch nach Hemmung mit LY294002 weiter proliferieren und ihre Sterberate nicht so stark wie in der MV4-11 Zelllinie ist.



Abb. 70: Akt-Phosphorylierung an Ser473 in Jurkat Zellen nach Hemmung mit 25 µM LY294002. Dargestellt sind die P-Akt (Ser473) Mengen; die Akt Mengen und die GAPDH Mengen. Links sind Proteinlysate von Jurkat Zellen, die in normalem Medium (ohne LY294002) kultiviert wurden, aufgetragen. Rechts sind Proteinlysate von Jurkat Zellen, die in mit 25 µM LY294002 versetzten Medium kultiviert wurden, aufgetragen. Für weitere Einzelheiten s. Text.

- Transduktion und p85α-Überexpression

Die erfolgreiche Transduktion der Zellen wurde mittels Western Blot Analyse (Nachweis des EGFP-Proteins) nachgewiesen (Abb. 58). Auch hier ist die oben beschriebene schwächere EGFP-Expression in den mit p85α-transduzierten Zellen als in den mit dem Vektor transduzierten Zellen zu beobachten.

Die Untersuchung der Überexpression von p85α zeigte ein gemischtes Bild (Abb.59). Die K562 Zellen zeigten eine Überexpression von p85α um $155,8\% \pm 32,1\%$, ein Wert der den Überexpressionswerten in den NIH3T3, PG13 und 293 gp Zellen ähnelt. In den anderen Zelllinien war keine Überexpression von p85α nachweisbar.

Wie oben beschrieben, wäre nach einer erfolgreichen Transduktion (EGFP Fluoreszenz beim Sorten) und Nachweis der Expression des transduzierten Konstrukts (anhand der EGFP-Expression) eine Überexpression von p85α in den mit p85α transduzierten Zellen zu erwarten. Das Fehlen des p85α-Proteins läßt in diesen Fällen auf zwei mögliche Mechanismen schließen: A) ein post-transkriptioneller Mechanismus führt zur Hemmung der p85α-Überexpression nach p85α-Transduktion von leukämischen Zellen (wie bei den Cole Zellen). In diesem Fall wäre dieser Mechanismus in den K562 Zellen gehemmt oder nicht existent. B) In diesen Zelllinien kommt es zunächst zu einer Überexpression von p85α. Diese Überexpression könnte in unterschiedlicher

Weise im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus zu einer Hemmung der p85 α -Überexpression führen. P85 α -Überexpression könnte zu einer Hemmung des Wachstums und der Proliferation dieser Zellen führen, z.B. über den für die NIH3T3 Zellen oben beschriebenen, PI3K-abhängigen Wettbewerbsmodell (s. auch 5.1.3.2.). P85 α könnte jedoch auch unabhängig der PI3K zur Aktivierung einer Signalkaskade führen, die zur Hemmung der p85 α -Expression führt. Auch in diesem Fall wäre dieser Mechanismus in den K562 Zellen gehemmt oder nicht existent. Durch diesen Feedback-Mechanismus haben die Zellen, die p85 α Überexprimieren ein Wachstumsnachteil (Selektionsnachteil). Nach dem Sortieren wurden die Zellen für 3-4 Wochen in Kultur gehalten, bis genügend Zellen vorhanden waren, um die beschriebenen Versuche durchzuführen. Diese Zeit ist ausreichend für diesen eventuellen Selektionsnachteil, sodass die p85 α -überexprimierenden Zellen von den anderen Zellen überwachsen werden können und die Überexpression (und ihre Effekte) nicht mehr nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang, würde die Überexpression von p85 α in K562-Zellen dadurch zu erklären sein, dass diese Zellen die geringste PI3K-Abhängigkeit für Proliferations- und Überlebensverhalten zeigen. Deshalb führt eine p85 α -Überexpression in K562 Zellen zu keinem Selektionsnachteil, die p85 α -überexprimierenden Zellen werden nicht von den anderen Zellen überwachsen und die p85 α -Überexpression bleibt nachweisbar.

- Weitere Untersuchungen zum Umgehen eines evntuell. vorhandenen Selektionsmechanismus

Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, muss nach der Transduktion bzw. dem Sortieren sofort eine Analyse der positiv sortierten p85 α -transduzierten Zellen erfolgen. Da die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt keine Western Blot Analyse zulässt, wurde hierfür ein anderer Versuch durchgeführt. Die Proliferation der Zellen sollte sofort nach der Transduktion untersucht werden. Dafür erfolgte ein Versuch mit BrdU (Bromodeoxyuridin, ein Thymidinanalogon). BrdU ist ein Analogon von Thymidin und wird in neusynthetisierten DNA-Molekülen eingebaut. Dann wird das eingebaute BrdU mithilfe von anti-BrdU-Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt. Die Fluoreszenz entspricht demnach der Menge an eingebautem BrdU und der Zellproliferation. Die Zellen erhielten BrdU als Zusatz, proliferierende Zellen bauen BrdU in ihre DNA ein und das eingebaute BrdU kann

mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern detektiert werden. Der BrdU-Einbau ist dann ein Maß für die Zellproliferation. Da dieser Versuch direkt im Anschluß nach der Transduktion der Zellen durchgeführt wurde, ist keine Zeit für einen eventuell vorhandenen Selektionsmechanismus durch das zusätzlich exprimierte p85 α seine Expression negativ regulieren könnte, bzw. die p85 α -überexprimierenden Zellen von den anderen Zellen überwachsen werden können.

Jurkat Zellen:

In Jurkat Zellen zeigten sich keine signifikante Unterschiede der Proliferationsrate nach p85 α -Transduktion, unabhängig von der Stärke der EGFP-Fluoreszenz. Nach Sortierung der Jurkat-Zellen korrelierte die Stärke der grünen Fluoreszenz mit der Expressionsstärke des transduzierten Konstrukts, gemessen an der EGFP-Menge (Abb. 62). Weder in den stark-, noch in den schwach-positiven p85 α transduzierten Jurkat Zellen war eine p85 α -Überexpression nachweisbar (Abb. 63). Auch die PI3K / Akt Aktivität, gemessen an der Phosphorylierung von Akt an Ser473 und die Proliferationsrate nach p85 α -Transduktion zeigte keinen Unterschied, unabhängig von der Stärke der Expression der Konstrukte (Abb. 64 und 65). Dieses Ergebniss, zusammen mit den anderen Versuchen an Jurkat Zellen geben einen sehr starken Hinweis darauf, dass die p85 α -Untereinheit in diesen Zellen nach erfolgreicher Transduktion nicht überexprimiert wird. Die Mechanismen, die zu dieser Hemmung führen, wurden oben beschrieben und müssen in weiterführenden Experimente untersucht werden.

K562 Zellen:

In K562 Zellen zeigte sich eine Hemmung der Proliferation nach p85 α -Überexpression um etwa 10%. Dieser Unterschied war zwar statistisch nicht signifikant, stellt aber ein Hinweis auf eine hemmende Wirkung der p85 α -Überexpression auf die Proliferation der K562 Zellen dar. Die Hemmung der Proliferation durch p85 α -Überexpression ist möglicherweise, anders als in den anderen Zelllinien, so geringfügig, dass die p85 α -Überexpression noch nachweisbar ist.

Die K562 Zelllinie ist die einzige von sieben Leukämie-Zelllinien, in der eine p85 α -Überexpression nachweisbar ist. Dies zwei Gründe haben: A) ein post-

transkriptioneller Mechanismus führt zur Hemmung der p85 α -Expression nach p85 α -Transduktion, wie bei den anderen Leukämie-Zelllinien. In den K562 Zellen wäre dieser Mechanismus gehemmt und nicht existent. B) In den Leukämie-Zelllinien kommt es zunächst zu einer Überexpression von p85 α . Diese Überexpression führt zu einer Hemmung des Wachstums und der Proliferation dieser Zellen, wodurch die Zellen, die p85 α überexprimieren ein Wachstumsnachteil (Selektionsnachteil) haben. Da die K562-Zellen die geringste Proliferationshemmung und die geringste Sterberate in dem Proliferationsversuch mit LY294002 zeigten, wäre es denkbar, dass die K562-Zelllinie eine sehr schwach ausgeprägte PI3K-Abhängigkeit hat. Dies würde zum einen dazu führen, dass diese Zellen nur einen geringen Wachstumsnachteil (und Selektionsnachteil) nach p85 α -Überexpression haben, da die p85 α -Überexpression in diesen Zellen die für diese Zellen nicht so wichtige PI3K hemmt. Deshalb kommt es in diesem Fall zu einem geringfügigen Selektionsdruck, die p85 α überexprimierenden Zellen werden nicht überwachsen und die Überexpression ist nachweisbar. Auf der anderen Seite hat dadurch die p85 α -Überexpression in diesen Zellen einen minimalen Effekt auf Proliferation, Überleben und (Ser473) Akt-Phosphorylierung.

- *Weitere Überlegungen zum Fehlen der p85 α -Überexpression*

Das Fehlen einer p85 α -Überexpression, unabhängig davon, welche der oben genannten Mechanismen dafür zuständig ist, deutet darauf hin, dass die Menge des p85 α -Proteins in diesen Zellen sehr streng reguliert ist. Geering et al., 2007 beobachten, dass in den Zellen die Summe der Mengen aller regulatorischen Untereinheiten gleich der Summe der Mengen aller katalytischen Untereinheiten der PI3K ist. Dies führt zu der Annahme, dass in diesen Zellen kein „Überschuss“ an freien regulatorischen Untereinheiten vorhanden ist. Eine strenge Regulation der p85 α -Menge in den Zellen würde unsere Beobachtungen und die von Geering et al., 2007 erklären. In unseren Versuchen mit Leukämie-Zelllinien ist nicht klar, durch welchen der beschriebenen Mechanismen die Überexpression von p85 α gehemmt wird. Unter anderem könnte auch eine geringere Halbwertszeit der freien (überexprimierten) regulatorischen Untereinheiten eine Rolle spielen (Brachmann et al., 2005), die vorhandene Überexpression in K562 Zellen würde in diesem Fall aber dagegen sprechen.

- *Das Gleichgewicht zwischen freien p85 α -Untereinheiten und p85 α – p110 α -Heterodimeren*

Da es nach den Beobachtungen von Geering et al., 2007 möglich ist, dass die Mengen von p85 streng an den Mengen von p110 angepasst werden, muss in unseren Überlegungen, sowie in den Versuchen, wo eine p85 α -Überexpression nachweisbar war (z. B. in den NIH3T3, PG13 und 293gp-Zellen) geklärt werden, ob eine p85 α -Überexpression gleichzeitig zu einer p110-Überexpression führt. Dies war in unseren Versuchen nicht der Fall (Abb. 71).

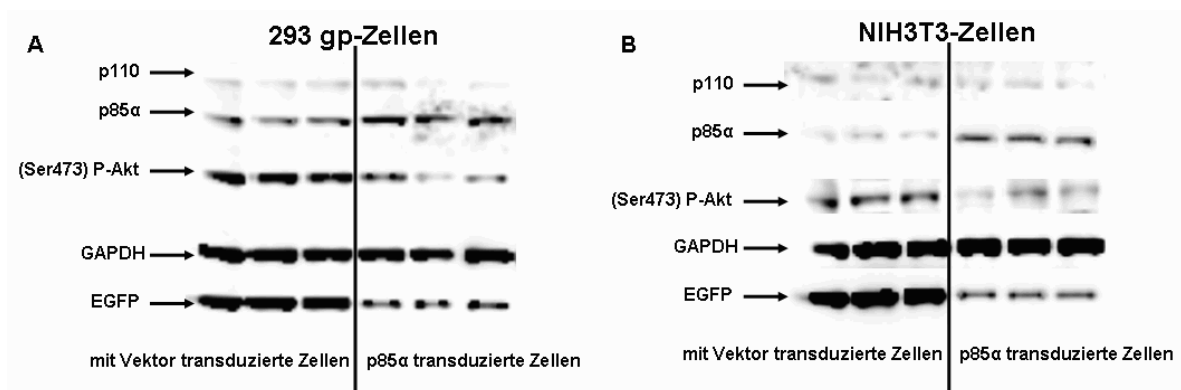


Abb. 71: Expression von p110 nach p85 α -Überexpression in 293-gp und NIH3T3 Zellen. Dargestellt sind: die p110-Mengen, die p85 α -Mengen, die P-Akt (Ser473) Mengen, die GAPDH Mengen und die EGFP Mengen in A) 293gp Zellen und B) NIH3T3 Zellen nach Transduktion mit dem MigRI-Vektor oder p85 α -Konstrukt. In beiden Zelllinien sind die schon beschriebene p85 α -Überexpression und EGFP-Expression nach Transduktion, sowie die Abnahme der P-Akt (Ser473) Menge nach p85 α -Überexpression zu sehen. p85 α -Überexpression führt zu keiner Änderung der p110-Mengen.

- *(Ser473) P-Akt Mengen und Proliferation nach p85 α -Transduktion*

Obwohl in den meisten Zelllinien keine Überexpression von p85 α nachweisbar war, wurden die Ser473 Phosphorylierung von Akt und die Proliferation in diesen Zelllinien nach Transduktion mit p85 α untersucht. Transduktion mit dem p85 α -Konstrukt führte zu keiner Änderung der P-Akt (Ser473) Mengen in den Zelllinien. In den K562 (wo p85 α überexprimiert werden konnte) und den Kasumi Zellen waren die P-Akt (Ser473) Mengen so niedrig, dass eine sinnvolle nicht möglich war (Abb. 59). Die Untersuchung der

Proliferation der Zelllinien nach Transduktion mit dem Vektor und p85 α zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied, obwohl in fast allen Fällen die Proliferation der mit p85 α transduzierten Zellen leicht schwächer erscheint (Abb. 61). Das Fehlen statistisch signifikanter Unterschiede lässt sich mit dem oben beschriebenen Fehlen einer p85 α -Überexpression erklären.

5.3. Mögliche klinische Bedeutung dieser Ergebnisse

Die Bedeutung der PI3K für die Tumor- und Leukämogenese (Horn et al., 2008), sowie die Progredienz maligner Erkrankungen ist in einer Vielzahl von Publikationen gezeigt worden (s. Einleitung). In Tumoren wie hepatozelluläre Karzinome, kolorektale Tumore, Mammakarzinome, Gehirntumore, Magenkarzinome, Schilddrüsentumore, Ovarialtumore, nicht kleinzellige Lungentumore, akute Leukämien, Zervixtumore (Shayesteh et al., 1999; Ma et al., 2000; Samuels et al., 2004; Campbell et al., 2004; Lee et al., 2005; Wu et al., 2005; Levine et al., 2005; Saal et al., 2005) wurden aktivierende Mutationen der katalytischen Untereinheit beschrieben. Der größte Teil dieser Mutationen befindet sich an zwei Stellen, der helicalen Domäne und der Kinase-Domäne. Weitere Mutationen befinden sich in der p85-Bindungsdomäne (Samuels et al., 2004). Die drei am häufigsten vorkommenden Mutationen E542K, E545K, und H1047R führen zur onkogenetischen Transformation der Zellen und konstitutiver Aktivierung von PI3K, Akt, p70 S6Kinase und 4E-BP1 (Kang et al., 2005).

Es gibt viele Studien über Mutationen der katalytischen Untereinheit der PI3K in humanen Neoplasien. In den letzten Jahren sind immer mehr Mutationen der regulatorischen Untereinheit in Tumoren gefunden worden (Jimenez et al., 1998; Philp et al., 2001; Jücker et al., 2002; Mizoguchi et al., 2004; Shi et al., 2006). In dieser Arbeit wurde das p76 α -Protein untersucht. Dieser mutierten Form der p85 α regulatorischen Untereinheit fehlt die c-terminale SH2-Domäne. Wie oben erwähnt, gibt es in der Literatur keine systematische Suche nach ähnlichen Mutationen der regulatorischen Untereinheit der PI3K, sodass es nicht möglich ist, festzustellen wie oft diese Art von Mutation in menschlichen Leukämien und Tumoren vorkommt. Es gibt, außer den Cole Zellen (die nur das p76 α -Protein exprimieren), zwei weitere Publikationen, wo beschrieben wird, dass in

Zellen nur eine kürzere Version und keine Wildtyp-Form des p85 α -Proteins exprimiert wird. Zum einen, werden in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCC2998 aufgrund von zwei Punktmutationen in den Allelen des p85 α -Gens regulatorische Untereinheiten mit den Größen von 50 und 76 kDa exprimiert (Shi et al., 2006). Zum anderen wird in der Thymus-Lymphom-Zelllinie CMN5, etabliert von Mäusen nach Bestrahlung, nur ein 65 kDa großes Protein (p65 α) exprimiert (Jimenez et al., 1998). Auch dieser Mutante fehlt die ganze c-terminale SH2-Domäne, sie kann dennoch (ähnlich wie das p76 α -Protein in Cole Zellen) an der p110 katalytischen Untereinheit binden. Die CMN5 Zellen zeigen eine stärkere PI3K Aktivität und die p65 α -Untereinheit führt zu einer stärkeren und länger andauernden Aktivierung der PI3K (Jimenez et al., 2002).

In allen oben beschriebenen Fällen fehlt beim Vorhandensein einer mutierten p85 α -Untereinheit die Expression der Wildtyp-p85 α -Untereinheit. Unter dem Gesichtspunkt, dass p85 α -Überexpression zu einer Hemmung der PI3K-Aktivität (z.b. in NIH3T3 und 293 gp Zellen) und der Koloniebildung (in CD34⁺ Zellen) führt, weist das Fehlen der Expression der Wildtyp-p85 α -Untereinheit in Tumor bzw. Leukämiezellen mit mutierten p85 α darauf hin, dass das p85 α -Protein eine Rolle als Tumorsuppressor spielen könnte. Diese Rolle muss im Laufe der Onkogenese verloren gehen, damit die mutierte Form aktivierend und möglicherweise transformierend wirken kann. Nicht nur die Präsenz des Wildtyp-p85 α -Proteins in den Zellen, sondern auch die Menge dieses Proteins wird in den Zellen streng reguliert und ein Verlust oder Störung dieser Regulation könnte einen weiteren Schritt in dem Prozess der Tumor- und Leukämogenese darstellen. Die damit verbundene Fehlregulation der PI3K könnte zu einer Fehlregulation oder konstitutiven Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signalwege führen, die in vielen menschlichen Tumoren und Leukämien beobachtet werden. Die Erforschung der molekularen Ursachen dieser Fehlregulation ist die Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren, die dann für eine spezifische Tumorthherapie eingesetzt werden könnten.

Einen interessanten Ansatzpunkt zur Entwicklung von Gentherapien geben Daten von Miled et al., 2007. Hierbei wurden die an der katalytischen Untereinheit vorkommenden Mutationen E542K, E545K, und H1047R untersucht. Diese Mutationen führen zur onkogenetischen Transformation der Zellen und konsitutiver Aktivierung von PI3K, Akt, p70 S6Kinase und 4E-BP1 (Kang et al., 2005). Bei der E545K Mutante kommt

es durch den Austausch der Glutaminsäure (negativ geladen) mit Lysin (positiv geladen) zu einem Wechsel der Ladung an Position 545. Die p85 α -Untereinheit hat keine inhibitorische Wirkung auf die E545K Mutante, während sie die Aktivität des wildtyp p110 α -Proteins inhibiert. Ein Austausch einzelner Aminosäuren an der p85 α -Untereinheit führte zur Identifizierung von zwei Aminosäuren der p85 α -Untereinheit, die für die Inhibition der p110 α -Untereinheit eine wichtige Rolle spielen: Lysin 379 und Arginin 340. Ein Austausch dieser zwei Aminosäuren zu Glutaminsäure (R340E, K379E) führt zu einem Verlust der inhibitorischen Wirkung der p85 α -Untereinheit gegenüber der Wildtyp-p110 α -Untereinheit. Während die R340E und K379E mutierten p85 α -Untereinheiten die E545K Mutante inhibieren können, zeigen sie keine Wirkung auf die wildtyp p110 α -Untereinheit (Miled et al., 2007).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Neoplasien mit Mutationen der PI3K sorgfältig hinsichtlich der Sensitivität gegenüber PI3K Inhibitoren untersucht werden sollen. Bestimmte mutierte Formen der PI3K (wie die E545K) könnten eine andere Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren (Therapien) zeigen als das Wildtyp-Protein, was zu weniger unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie führen würde. Bestimmte aktivierende Mutationen der PI3K (wie die E545K) können der inhibitorischen Funktion der p85 α -Untereinheit entgehen. Bestimmte Mutationen der p85 α -Untereinheit können dazu führen, dass zum einen diese inhibitorische Funktion wieder hergestellt wird und zum anderen, dass die nicht mutierte PI3K nicht betroffen wird. Dies eröffnet die Möglichkeit, dass im Falle des Vorhandenseins einer PI3K-Mutante wie die E545K in einem Tumor eine gentherapeutische Behandlung mit einer p85 α -Mutante wie R340E oder K379E denkbar erscheint. Da die Wildtyp-p110-PI3K dann von der Inhibition nicht betroffen wäre, könnte die normale Funktion der PI3K in anderen Zellen des Patienten aufrecht erhalten werden und dadurch möglicherweise toxische Nebenwirkungen für den Patienten gering gehalten werden.

6. Zusammenfassung

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation einer Vielzahl von Zellfunktionen wie Proliferation, Zellwachstum, Apoptose, Metabolismus, Zellmotilität und Angiogenese. Die PI3K der Klasse IA sind Heterodimere, die aus einer katalytischen Untereinheit (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85, p55 oder p50) bestehen. Fehlregulationen der PI3K werden häufig in menschlichen Tumoren und Leukämien beobachtet und führen zur konstitutiven Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signalwege.

In dieser Arbeit wurden die Effekte der Überexpression der regulatorischen p85 α -Untereinheit der PI3K sowie die Funktion einer mutierten Form der p85 α -Untereinheit der PI3K (p76 α) für das Wachstum hämatopoetischer Zellen untersucht.

Die Transduktion von primären humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34⁺) aus Nabelschnurblut mit einem retroviralen p85 α /EGFP-Koexpressionsvektor führte zu einer Hemmung der GM-CSF-abhängigen Koloniebildung, die durch Kultivierung der transduzierten Zellen (EGFP⁺) in Gegenwart einer 10-fach erhöhten GM-CSF-Konzentration ausgeglichen werden konnte (Hoxha et al., 2008). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Überexpression von p85 α in hämatopoetischen Zellen eine inhibierende Funktion auf die GM-CSF-abhängige Signaltransduktion und das Wachstum der Kolonie-bildenden Progenitorzellen hat. Dies steht im Einklang mit einem Modell zur negativ regulatorischen Funktion von überexprimiertem p85 α für die Insulin-Signaltransduktion in nicht-hämatopoetischen Zellen. Nach diesem Modell konkurriert monomeres p85 α mit p85 α /p110 Heterodimeren um die Bindung an aktivierte Rezeptoren und blockiert somit die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Überexpression von p85 α auch zur Hemmung einer konstitutiv aktivierten PI3K/Akt-Signaltransduktion in Leukämiezellen führt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von p85 α in murinen

6. Zusammenfassung

Fibroblasten-Zelllinien (NIH3T3, PG13) und in einer humanen Nierenzelllinie (HEK293gp) zur Hemmung der konstitutiven PI3K/Akt-Signaltransduktion in diesen Zellen führt. Im Gegensatz dazu führte die Transduktion von 7 Leukämie-Zelllinien (Jurkat, Cole, Eol1, Kasumi, K562, MV4-11 und M1) mit dem p85 α /EGFP-Koexpressionsvektor nur in der chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie K562 zu einer Überexpression von p85 α , während die anderen Zelllinien zwar mit dem p85 α /EGFP-Koexpressionsvektor transduziert werden konnten (EGFP⁺), aber von der retroviralen RNA keine nachweisbaren Mengen an p85 α translatiert wurden. Interessanterweise zeigt die Zelllinie K562 von den 7 untersuchten Leukämie-Zelllinien die geringste PI3K-Proliferationsabhängigkeit in einem Hemmversuch mit dem PI3K-Hemmstoff LY294002. Diese Ergebnisse deuten auf einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus zur Hemmung der p85 α -Expression in solchen Leukämiezellen hin, deren Proliferation in besonderem Maße abhängig von einer PI3K-vermittelten Signaltransduktion ist.

Die Untersuchung einer in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie identifizierten mutierten Form der p85 α -Untereinheit der PI3K (p76 α), der die inhibitorische c-terminale SH2-Domäne fehlt, ergab keinen Hinweis dafür, dass diese Mutante alleine zu einer Aktivierung der PI3K/Akt-Signaltransduktion führt, wie es für andere c-terminal trunkierte p85 α -Mutanten beschrieben ist.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit eine inhibitorische Funktion der p85 α -Untereinheit der PI3K auf die GM-CSF-abhängige Signaltransduktion und Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen. In weiterführenden Experimenten müsste nun der in dieser Arbeit ebenfalls beschriebene posttranskriptionelle Mechanismus zur Regulation der p85 α -Expression in Leukämiezellen analysiert werden.

7. Literaturverzeichnis

Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal* **15**: 6541-6551.

Alessi, D. R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F. B., Morrice, N., Norman, D. G., Gaffney, P., Reese, C. B., MacDougall, C. N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Current Biology* **7**: 776-789.

Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N., Avruch, J. (1998). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Current Biology* **8**: 69-81.

Andreeff, M., Jiang, S., Zhang, X., Konopleva, M., Estrov, Z., Snell, V. E., Xie, Z., Okcu, M. F., Sanchez-Williams, G., Dong, J., Estey, E. H., Champlin, R. C., Kornblau, S. M., Reed, J. C., Zhao, S. (1999). Expression of Bcl-2 related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* **11**: 1881-1892.

Andrews, S., Stephens, L. R., Hawkins, P. T. (2007). PI3K class IB pathway. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **407**.

Antonetti, D. A., Algenstaedt, P., Kahn, C. R. (1996). Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 2195-2203.

Areces, L. B., Jücker, M., San Miguel, J. A., Mui, A., Miyajima, A., Feldman, R. A. (1993). Ligand-dependent transformation by the receptor for human granulocyte / macrophage colony-stimulating factor and tyrosine phosphorylation of the receptor beta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 3963-3967.

Arcaro, A., Wymann, M. P. (1993). Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *The Biochemical Journal* **296**: 297-301.

Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K., Kamada, N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;2 chromosome translocation. *Blood* **77**: 2031-2036.

Backer, J. M., Myers Jr, M. G., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X-J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessingerl, J., White, M. F. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO Journal* **11**: 3469 – 3479.

Bäumer, A. T., Freyhaus, H. T., Sauer, H., Wartenberg, M., Kappert, K., Schnabel, P., Konkol, C., Hescheler, J., Vantler, M., Rosenkranz, S. (2007). Pi3 kinase-dependent membrane recruitment of rac-1 and p47phox is critical for alpha PDGF receptor-induced production of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 7864-7876.

Beghini, A., Bellini, M., Magnani, I., Colapietro, P., Cairoli, R., Morra, E., Larizza, L. (2005). STI 571 inhibition effect on KITAsn822Lys-mediated signal transduction cascade. *Experimental Hematology* **33**: 682–688.

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q. Altomare, D. A. Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti Panici, P., Mancuso, S., Neri, G., Testa, J. R. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International Journal of Cancer* **64**: 280–285.

Bénistant, C., Chapuis, H., Roche, S. (2000). A specific function for phosphatidylinositol 3-kinase alpha (p85alpha-p110alpha) in cell survival and for phosphatidylinositol 3-kinase beta (p85alpha-p110beta) in de novo DNA synthesis of human colon carcinoma cells. *Oncogene* **19**: 5083-5090.

Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A., Nussbaum, R. L. (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 10963–10968.

Boissel, N., Leroy, H., Brethon, B., Philippe, N., de Botton, S., Auvrignon, A., Raffoux, E., Leblanc, T., Thomas, X., Hermine, O., Quesnel, B., Baruchel, A., Leverger,

G., Dombret, H., Preudhomme, C. (2006). Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia* **20**: 965-970.

Borlado, L. R., Redondo, C., Alvarez, B., Jimenez, C., Criado, L. M., Flores, J., Marcos, M. A., Martinez-A, C., Balomenos, D., Carrera, A. C. (2000). Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation in vivo. *The FASEB Journal* **14**: 895-903.

Brachmann, S. M., Ueki, K., Engelman, J. A., Kahn, R. C., Cantley, L. C. (2005). Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 1596-1607.

Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T., Newton, A. C. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular Cell* **25**: 917-931.

Brugge, J., Hung, M. C., Mills, G. B. (2007). A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* **12**: 104-107.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**: 857-868.

Brunet, A., Datta, S. R., Greenberg, M. E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* **11**: 297-305.

Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence Jr., J. C., Abraham, R. T. (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *The EMBO Journal* **15**: 5256-5267.

Byfield, M. P., Murray, J. T., Backer, J. M. (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 33076-33082.

Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J., Pilch, P.F. (1998). Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 7201–7204.

Campbell, I. G., Russell, S. E., Choong, D. Y., Montgomery, K. G., Ciavarella, M. L., Hooi, C. S., Cristiano, B. E., Pearson, R. B., Phillips, W. A. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Research* **64**: 7678-7681.

Cantley, L. C. (2002). The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* **296**: 1655-1657.

Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**: 1318–1321.

Care, R. S., Valk, P. J., Goodeve, A. C., Abu-Duhier, F. M., Geertsma-Kleinkoort, W. M., Wilson, G. A., Gari, M. A., Peake, I. R., Löwenberg, B., Reilly, J. T. (2003). Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *British Journal of Haematology* **121**: 775-777.

Carpenter, C. L., Cantley, L. C. (1990a). Phosphoinositide kinases. *Biochemistry*. **29**: 11147-11156.

Carpenter, C. L., Duckworth, B. C., Auger, K. R., Cohen, B., Schaffhausen, B. S., Cantley, L. C. (1990b). Purification and Characterization of Phosphoinositide 3-Kinase from Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 19704-19711.

Carpenter, C. L., Auger, K. R., Chanudhuri, M., Yoakim, M., Schaffhausen, B., Shoelson, S., Cantley, L. C. (1993a). Phosphoinositide 3-kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 9478-9483.

Carpenter, C. L., Auger, K. R., Duckworth, B. C., Hou, W. M., Schaffhausen, B., Cantley, L. C. (1993b). A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 1657–1665.

Chan, T. O., Rodeck, U., Chan, A. M., Kimmelman, A. C., Rittenhouse, S. E., Panayotou, G., Tsichlis, P. N. (2002). Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* **1**: 181-191.

Chang, H. W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K. R., Bellacosa, A., Tsichlis, P. N., Cantley, L. C., Roberts, T. M., Vogt, P. K. (1997). Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* **276**: 1848-1850.

Chantry, D., Vojtek, A., Kashishian, A., Holtzman, D. A., Wood, C., Gray, P. W., Cooper, J. A., Hoekstra, M. F. (1997). p110 δ , a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit That Associates with p85 and Is Expressed Predominantly in Leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 19236–19241.

Cheatham, B., Vlahos, C. J., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., Kahn, C. R. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 4902–4911.

Chen, D., Mauvais-Jarvis, F., Bluher, M., Fisher, S. J., Jozsi, A., Goodyear, L. J., Ueki, K., Kahn, C. R. (2004). p50 α /p55 α phosphoinositide 3-kinase knockout mice exhibit enhanced insulin sensitivity. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 320-329.

Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N., Testa, J. R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 9267–9271.

Cheng, J. C., Chou, C. H., Kuo, M. L., Hsieh, C. Y. (2006). Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene* **25**: 7009-7018.

Clayton, E., Bardi, G., Bell, S. E., Chantry, D., Downes, C. P., Gray, A., Humphries, L. A., Rawlings, D., Reynolds, H., Vigorito, E., Turner, M. (2002). A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *The Journal of Experimental Medicine* **196**: 753-763.

Clément, S., Krause, U., Desmedt, F., Tanti, J. F., Behrends, J., Pesesse, X., Sasaki, T., Penninger, J., Doherty, M., Malaisse, W., Dumont, J. E., Le Marchand-Brustel, Y., Erneux, C., Hue, L., Schurmans, S. (2001). The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* **409**: 92-97.

Cools, J., DeAngelo, D. J., Gotlib, J., Stover, E. H., Legare, R. D., Cortes, J., Kutok, J., Clark, J., Galinsky, I., Griffin, J. D., Cross, N. C., Tefferi, A., Malone, J., Alam, R., Schrier, S. L., Schmid, J., Rose, M., Vandenberghe, P., Verhoef, G., Boogaerts, M., Wlodarska, I., Kantarjian, H., Marynen, P., Coutre, S. E., Stone, R., Gilliland, D. G. (2003). A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *The New England journal of medicine* **348**: 1201-1214.

Cools, J., Quentmeier, H., Huntly, B. J. P., Marynen, P., Griffin, J. D., Drexler, H. G., Gilliland, D. G. (2004). The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukaemia. *Blood* **103**: 2802-2805.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785–789.

Cully, M., You, H., Levine, A. J., Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* **6**: 184-192.

Dahia, P. L., Aquiar, R. C., Alberta, J., Kum, J. B., Caron, S., Sill, H., Marsh, D. J., Ritz, J., Freedman, A., Stiles, C., Eng, C. (1999). PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanism in haematological malignancies. *Human Molecular Genetics* **8**: 185–193.

Dance, M., Montagner, A., Yart, A., Masri, B., Audigier, Y., Perret, B., Salles, J. P., Raynal, P. (2006). The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 23285-23295.

De Gregorio, G., Coppa, A., Cosentino, C., Ucci, S., Messina, S., Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Di Pardo, A., Avvedimento, E. V., Porcellini, A. (2007). The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene* **26**: 2039-2047.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., Rider, M. H. (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 17269–17275.

Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M. J., Gout, I., Totty, N. F., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Kasuga, M., Courtneidge, S. A., Waterfield, M. D. (1993). PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *The EMBO Journal* **13**: 522-533.

Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fryl, M. J., Yonezawa, K., Kasuga, M., Waterfieldl, M. D. (1994). PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions. *The EMBO Journal* **13**: 511–521.

Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P. P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nature Genetics* **19**: 348–355.

Di Virgilio, F., Vicentini, L. M., Treves, S., Riz, G., Pozzan, T. (1985). Inositol phosphate formation in fMet-Leu-Phe-stimulated human neutrophils does not require an increase in the cytosolic free Ca²⁺ concentration. *The Biochemical Journal* **229**: 361-367.

Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S. E., Zvelebil, M. J., Stein, R. C., Waterfield, M. D. (1997). Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *The Biochemical Journal* **326**: 139-147.

Du, K., Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 32377-32379.

Ekstrand, B. C., Horning, S. J. (2002). Hodgkin's disease. *Blood Reviews* **16**: 111-117.

Emanuel, P. D., Bates, L. J., Castleberry, R. P., Gualtieri, R. J., Zuckerman, K. S. (1991). Selective hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by juvenile chronic myeloid leukemia hematopoietic progenitors. *Blood* **77**: 925-929.

Escobedo, J. A., Navankasattusas, S., Kavanaugh, W. M., Milfay, D. Fried, V. A., Williams, L. T. (1991). cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF beta-receptor. *Cell* **65**: 75-82.

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., Hemmings, B. A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 41189-41196.

Feyt, C., Kienlen-Campard, P., Leroy, K., N'Kuli, F., Courtoy, P. J., Brion, J. P., Octave, J. N. (2005). Lithium chloride increases the production of amyloid-beta peptide independently from its inhibition of glycogen synthase kinase 3. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 33220-33227.

Fruman, D. A., Cantley, L. C., Carpenter, C. L. (1996). Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics*. **37**: 113-121.

Fruman, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 481-507.

Fruman, D. A., Snapper, S. B., Yballe, C. M., Alt, F. W., Cantley, L. C. (1999). Phosphoinositide 3-kinase knockout mice: role of p85alpha in B cell development and proliferation. *Biochemistry Society Transactions* **27**: 624-629.

Fruman, D. A., Mauvais-Jarvis, F., Pollard, D. A., Yballe, C. M., Brazil, D., Bronson, R. T., Kahn, C. R., Cantley, L. C. (2000). Hypoglycaemia, liver necrosis and

perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nature Genetics* **26**: 379-382.

Fukuda, R., Hayashi, A., Utsunomiya, A., Nukada, Y., Fukui, R., Itoh, K., Tezuka, K., Ohashi, K., Mizuno, K., Sakamoto, M., Hamanoue, M., Tsuji, T. (2005). Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**: 15213-152138.

Fukumoto, S., Hsieh, C. M., Maemura, K., Layne, M. D., Yet, S. F., Lee, K. H., Matsui, T., Rosenzweig, A., Taylor, W. G., Rubin, J. S., Perrella, M. A., Lee, M. E. (2001). Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 17479–17483.

Garofalo, R. S., Orena, S. J., Rafidi, K., Torchia, A. J., Stock, J. L., Hildebrandt, A. L., Coskran, T., Black, S. C., Brees, D. J., Wicks, J. R., McNeish, J. D., Coleman, K. G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *The Journal of Clinical Investigation* **112**: 197–208.

Geering, B., Cutillas, P. R., Vanhaesebroeck, B. (2007). Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits? *Biochemical Society Transactions* **35**: 199–203.

George, P., Bali, P., Annavarapu, S., Scuto, A., Fiskus, W., Guo, F., Sigua, C., Sondarva, G., Moscinski, L., Atadja, P., Bhalla, K. (2005). Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* **105**: 1768-1776.

Gilliland, D. G., Griffin, J. D. (2002). The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* **100**: 1532-1542.

Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O'Leary, M. A., Sonenberg, N., Hay, N. (1998). 4EBP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt (PKB) signaling pathway. *Genes and Development* **12**: 502–513.

Gingras, A C., Raught, B., Soneberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes & Development* **15**: 807–826.

Giorgino, F., Pedrini, M. T., Matera, L., Smith, R. J. (1997). Specific increase in p85alpha expression in response to dexamethasone is associated with inhibition of insulin-like growth factor-I stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity in cultured muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 7455-7463.

Gotlib, J., Cools, J., Malone III, J. M., Schrier, S. L., Gilliland, D. G., Coutre, S. E. (2004). The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood* **103**: 2879-2891.

Gout, I., Middleton, G., Adu, J., Ninkina, N. N., Drobot, L. B., Filonenko, V., Matsuka, G., Davies, A. M., Waterfield, M., Buchman, V. L. (2000). Negative regulation of PI 3-Kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO Journal* **19**: 4015–4025.

Grashoff, C., Aszódi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B., Fässler, R. (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Reports* **4**: 432-438.

Grille, S. J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A. J., van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tschlis, P. N., Larue, L. (2003). The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Research* **63**: 2172-2178.

Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., De Klein, A., Bartram, C. R., Grosveld, G. (1993). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**: 93-99.

Gu, H., Maeda, H., Moon, J. J., Lord, J. D., Yoakim, M., Nelson, B. H., Neel, B. G. (2000). New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 7109-7120.

Gupta, N., Scharenberg, A. M., Fruman, D. A., Cantley, L. C., Kinet, J-P., Long, E. O. (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. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 7489–7494.

Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C. C., Skeen, J. E., Sonenberg, N., Hay, N. (2005). Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 32081-32089.

Haley, B., Zamore, P. D. (2004) Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**: 599-606.

Hallmann, D., Tru, K., Trusheim, H., Ueki, K., Kahn, C. R., Cantley, L. C., Fruman, D. A., Hörsch. (2002). Altered Signaling and Cell Cycle Regulation in Embryonal Stem Cells with a Disruption of the Gene for Phosphoinositide 3-Kinase Regulatory Subunit p85α. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 5099–5108.

Haneline, L. S., White, H., Yang, F. C., Chen, S., Orschell, C., Kapur, R., Ingram, D. A. (2006). Genetic reduction of class IA PI-3 kinase activity alters fetal hematopoiesis and competitive repopulating ability of hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* **107**: 1375-1382.

Hara, K., Yonezawa, K., Sakaue, H., Ando, A., Kotani, K., Kitamura, T., Kitamura, Y., Ueda, H., Stephens, L., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., Dhand, R., Clark, A. E., Holman, G. D., Waterfield, M. D., Kasuga, M. (1994). 1-Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for insulin-stimulated glucose transport but not for RAS activation in CHO cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 7415-7419.

Harris, N. L. (1999). Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Modern Pathology* **12**: 159-175.

Harrison-Findik, D., Misra, S., Jain, S. K., Keeler, M. L., Powell, K. A., Malladi, C. S., Varticovski, L., Robinson, P. J. (2001). Dynamin inhibits phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1538**: 10–19.

Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M. A., Admon, A., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W., Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent

protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* **82**: 849–856.

Hashimoto, K., Matsumura, I., Tsujimura, T., Kim, D. K., Ogihara, H., Ikeda, H., Ueda, S., Mizuki, M., Sugahara, H., Shibayama, H., Kitamura, Y., Kanakura, Y. (2003) Necessity of tyrosine 719 and phosphatidylinositol 3'-kinase-mediated signal pathway in constitutive activation and oncogenic potential of c-KIT receptor tyrosine kinase with the Asp814Val mutation. *Blood* **101**: 1094–1102.

Hay, N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **8**: 179–183.

Hayashi, H., Kamohara, S., Nishioka, Y., Kanai, F., Miyake, N., Fukui, Y., Shibasaki, F., Takenawa, T., Ebina, Y. (1992). Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the alpha-type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 22575-22580.

Helgason, C. D., Damen, J. E., Rosten, P., Grewal, R., Sorrensen, P., Chappel, S. M. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemapoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes & Development* **12**: 1610-1620.

Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B. A., Fernandez, A., Lamb, N. J. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 8267-8280.

Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N. F., et al. (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*. **70**: 419-29.

Hill, M. M., Andjelkovic, M., Brazil, D. P., Ferrari, S., Fabbro, D., Hemmings, B. A. (2001). Insulin-stimulated protein kinase B phosphorylation on Ser-473 is independent of its activity and occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 25643-25646.

Hirota, S., Isozaki, K., Moriyama, Y., Hashimoto, K., Nishida, T., Ishiguro, S., Kawano, K., Hanada, M., Kurata, A., Takeda, M., Muhammad Tunio, G., Matsuzawa, Y., Kanakura, Y., Shinomura, Y., Kitamura, Y. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**: 577-580.

Horn, S., Endl, E., Fehse, B., Weck, M. M., Mayr, G. W., Jucker, M. (2004). Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/GSK3 β signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle. *Leukemia* **18**: 1839-1849.

Horn, S., Bergholz, U., Jücker, M., McCubrey, J. A., Trümper, L., Stocking, C., Bäsecke, J. (2008). Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene* **27**: 4096-4106.

Hoxha, E., Fehse, B., Ortmeyer, G., Stocking, C., Mayr, G. W., Jücker, M. (2008). Overexpression of the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits GM-CSF-dependent colony formation of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia and Lymphoma* **49**: 1206-1208.

Hromas, R., Costa, R. (1995). The hepatocyte nuclear factor-3/forkhead transcription regulatory family in development, inflammation, and neoplasia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **20**: 129–140.

Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Lammers, R., Ullrich, A., Schlessinger, J. (1992). Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 981-990.

Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J. (1993). Cloning of a Novel, Ubiquitously Expressed Human Phosphatidylinositol 3-Kinase and Identification of Its Binding Site on p85. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 7677-7688.

Huddleston, H., Tan, B., Yang, F. C., White, H., Wenning, M. J., Orazi, A., Yoder M. C., Kapur, R., Ingram, D. A. (2003). Functional p85 α gene is required for normal murine fetal erythropoiesis, *Blood* **102**: 142-145.

Hutchinson, J. N., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., Muller, W. J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Research* **64**: 3171-3178.

Ichikawa, Y. (1969). Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *Journal of Cellular Physiology* **74**: 223-234.

Ilaria, R. L., Van Etten, R. A. (1995). The SH2 domain of P210BCR-ABL is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood* **86**: 3897-3904.

Inoki, K., Zhu, T., Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**: 577-590.

Inukai, K., Anai, M., Van Breda, E., Hosaka, T., Katagiri, H., Funaki M, Fukushima Y, Ogihara T, Yazaki Y, Kikuchi , Oka Y, Asano T. (1996). A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK Is generated by alternative splicing of the p85alpha gene. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 5317–5320.

Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B. C., Takata, K., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T. (1997). p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 7873-7882.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *Journal of Virology* **4**: 549-553.

Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Donovan, M., Cordon-Cardo, C., Beug, H., Grünert, S. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *The Journal of Clinical Investigation* **116**: 1561-1570.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M. J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA A Cancer Journal for Clinicals* **56**: 106–130.

Jia, Y., Subramanian, K. K., Erneux, C., Pouillon, V., Hattori, H., Jo, H., You, J., Zhu, D., Schurmans, S., Luo, H. R. (2007). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate negatively regulates phosphatidylinositol-3,4,5- trisphosphate signaling in neutrophils. *Immunity* **27**: 453-467.

Jimenez, C., Jones, D. R., Rodríguez-Viciano, P., Gonzalez-García, A., Leonardo, E., Wennström, S., von Kobbe, C., Toran, J. L., R-Borlado, L., Calvo, V., Copin, S. G., Albar, J. P., Gaspar, M. L., Diez, E., Marcos, M. A., Downward, J., Martinez-A, C., Mérida, I., Carrera, A. C. (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The EMBO Journal* **17**: 743-753.

Jimenez, C., Hernandez, C., Pimentel, B., Carrera, A. C. (2002). The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 41556-41562.

Jones, D. B., Scott, C. S., Wright, D. H., Stein, H., Beverley, P. C., Payne, S. V., Crawford, D. H. (1985). Phenotypic analysis of an established cell line derived from a patient with Hodgkin's disease (HD). *Hematological Oncology* **3**: 133–145.

Joyal, J. L., Burks, D. J., Pons, S., Matter, W. F., Vlahos, C. J., White, M. F., Sacks, D. B. (1997). Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 28183-28186.

Jücker, M., Südel, K., Horn, S., Sickel, M., Wegner, W., Fiedler, W., Feldman, R. A. (2002). Expression of a mutated form of the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia* **16**: 894-901.

Kang, S., Bader, A. G., Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**: 802-807.

Kapeller, R., Prasad, K. V., Janssen, O., Hou, W., Schaffhausen, B. S., Rudd, C. E., Cantley L. C. (1994). Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 1927–1933.

Kaplan, D. R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Raptis, L., Garcea, R. L., Pallas, D., Roberts, T. M., and Cantley, L. (1986). Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **83**: 3624-3628.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M. D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**: 615-675.

Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R. M., Littman, D. R., Leitges, M., Rawlings, D. J., Kawakami, T. (2004). Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 47720-47725.

Kiebler, M. A., Jansen, R-P., Dahm, R., Macchi, P. (2005) A putative nuclear function for mammalian Staufen. *Science* **30**: 228-231.

Kim, S., Jee, K., Kim, D., Koh, H., Chung, J. (2001). Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 12864–12870.

Kishimoto, H., Ohteki, T., Yajima, N., Kawahara, K., Natsui, M., Kawarasaki, S., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, Y., Arase, S., Taniguchi, M., Vanhaesebroeck, B., Mak, T. W., Nakano, T., Koyasu, S., Sasaki, T., Suzuki, A. (2007). The Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of Valpha14iNKT cells. *Blood* **109**: 3316-3324.

Klinghoffer, R. A., Duckworth, B., Valius, M., Cantley, L. C., Kazlauskas, A. (1996). PDGFdependent activation of PI3 kinase is regulated by receptor binding of SH2 domain-containing proteins which influence Ras activity. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 5905–5914.

Klippel, A., Escobedo, J. A., Fantl, W. J., Williams, L. T. (1992). The C-Terminal SH2 Domain of p85 Accounts for the High Affinity and Specificity of the Binding of Phosphatidylinositol 3-Kinase to Phosphorylated Platelet-Derived Growth Factor β Receptor. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 1451-1459.

Klippel, A., Escobedo, J. A., Hu, Q., Williams, L. T. (1993). A region of the 85-kilodalton (kDa) subunit of phosphatidylinositol 3-kinase binds the 110-kDa catalytic subunit in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 5560-5566.

Kohn, A. D., Summers, S. A., Birnbaum, M. J., Roth, R. A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry* **271**: 31372–31378.

Kozma, S. C., Thomas, G. (2002). Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. *Bioessays* **24**: 65-71.

Küppers, R. (2009). The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nature Reviews Cancer*. **9**: 15-27.

Kurzrock, R., Gutterman, J. U., Talpaz, M. (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine* **319**: 990–998.

Lange, B., Valtieri, M., Santoli, D., Caracciolo, D., Mavilio, F., Gemperlein, I., Griffin, C., Emanuel, B., Finan, J., Nowell, P., Rovera, G. (1987). Growth Factor Requirements of Childhood Acute Leukemia: Establishment of GM-CSF-Dependent Cell Lines. *Blood* **70**: 192-199.

Larue, L., Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**: 7443-7454.

Lawlor, M. A., Alessi, D. R. (2001) PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *Journal of Cell Science* **114**: 2903-2910.

Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Lee, H. W., Park, W. S., Nam, S. W., Kim, S. H., Lee, J. Y., Yoo, N. J., Lee, S. H. (2005). PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **24**: 1477-1480.

Lee, J. Y., Engelman, J. A., Cantley, L. C. (2007). PI3K charges ahead. *Science*. **317**: 206-207.

Lee, S. J., Yoon, J. H., Song, K. S. (2007). Chrysin inhibited stem cell factor (SCF)/c-Kit complex-induced cell proliferation in human myeloid leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* **74**: 215–225.

Levine, D. A., Bogomolny, F., Yee, C. J., Lash, A., Barakat, R. R., Borgen, P. I., Boyd, J. (2005). Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clinical Cancer Research* **11**: 2875–2878.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**: 1943–1947.

Li, Y., Li, H., Wang, M. N., Lu, D., Bassi, R., Wu, Y., Zhang, H., Balderes, P., Ludwig, D. L., Pytowski, B., Kussie, P., Piloto, O., Small, D., Bohlen, P., Witte, L., Zhu, Z., Hicklin, D. J. (2004). Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody. *Blood* **104**: 1137-1144.

Liu, D., Yang, X., Songyang, Z. (2000). Identification of CISK, a new member of the SGK kinase family that promotes IL-3-dependent survival. *Current Biology* **10**: 1233-1236.

Liu, L., Damen, J. E., Ware, M., Hughes, M., Krystal, G. (1997). SHIP, a new player in cytokine-induced signalling. *Leukemia* **11**: 181-184.

Liu, Q., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D.J. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes & Development* **13**: 786-791.

Liu, X., Marengere, L. E. M., Koch, A., Pawson, T. (1993). The v-Src SH3 Domain Binds Phosphatidylinositol 3'-Kinase. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 5225-5232.

Lozzio, C. B., Lozzio B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-334.

Luo, J. M., 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, J., McMullen, J. R., Sobkiw, C. L., Zhang, L., Dorfman, A. L., Sherwood, M. C., Logsdon, M. N., Horner, J. W., DePinho, R. A., Izumo, S., Cantley, L. C. (2005a). Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 9491-9502.

Luo, J., Sobkiw, C. L., Logsdon, N. M., Watt, J. M., Signoretti, S., O'Connell, F., Shin, E., Shim, Y., Pao, L., Neel, B. G., Depinho, R. A., Loda, M., Cantley, L. C. (2005b). Modulation of epithelial neoplasia and lymphoid hyperplasia in PTEN^{+/-} mice by the p85 regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**: 10238-10243.

Ma, Y. Y., Wei, S. J., Lin, Y. C., Lung, J. C., Chang, T. C., Whang-Peng, J., Liu, J. M., Yang, D. M., Yang, W.K., Shen, C. Y. (2000). PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* **19**: 2739-2744.

Maehama, T., Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 13375–13378.

Maehama, T., Dixon, J. E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in cell biology* **9**: 125-128.

MacDougall, L. K., Domin, J., Waterfield, M. D. (1995). A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Current Biology* **5**: 1404-1415.

Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., Cantley, L. C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular Cell* **10**: 151–162.

Manning, B. D., Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.

Marte, B. M., Rodriguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H., Downward, J. (1997). R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Current Biology* **7**: 63-70.

Martelli, A. M., Nyåkern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P. L., Evangelisti, C., Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**: 911-928.

Mauvais-Jarvis, F., Ueki, K., Fruman, D. A., Hirshman, M. F., Sakamoto, K., Goodyear, L. J., Iannaccone, M., Accili, D., Cantley, L. C., Kahn, C. R. (2002). Reduced expression of the murine p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* **109**: 141-149.

McGlade, C. J., Ellis, C., Reedik, M., Anderson, D., Mbamalu, G., Reith, A. D., Panyotou, G., End, P., Bernstein, A., Kazlauskas, A., Waterfield, M. D., Pawson, T. (1992). SH2 domains of the p85 α subunit of phosphatidylinositol 3-kinase regulate binding to growth factor receptors. *Molecular and Cellular Biology* **12**: 991-997.

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

Meyers, R., Cantley, L. C. (1997). Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 4384–4390.

Miller, A. D., Rosman, G. J. (1989). Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* **7**: 980-990.

Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *Journal of Virology* **65**: 2220-2224.

Min, Y. H., Eom, J. I., Cheong, J. W., Maeng, H. O., Kim, J. Y., Jeung, H. K., Lee, S. T., Lee, M. H., Hahn, J. S., Ko, Y. W. (2003). Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* **17**: 995-997.

Miled, N., Yan, Y., Hon, W. C., Perisic, O., Zvelebil, M., Inbar, Y., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H. J., Backer, J. M., Williams, R. L. (2007). Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* **317**: 239-242.

Misawa, H., Ohtsubo, M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Yoshimura, A. (1998). Cloning and characterization of a novel class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**: 531-539.

Miwa, W., Yasuda, J., Murakami, Y., Yashima, K., Sugano, K., Sekine, T. Kono, A., Egawa, S., Yamaguchi, K., Hayashizaki, Y., Sekiya, T. (1996). Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **225**: 968-974.

Mizoguchi, M., Nutt, C. L., Mohapatra, G., Louis, D. N. (2004). Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathology* **14**: 372-377.

Morbidelli, L., Donnini, S., Ziche, M. (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Current Pharmaceutical. Design* **9**: 521-530.

Mulligan, R. C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* **260**: 926-932.

Munugalavadla, V., Borneo, J., Ingram, D. A., Kapur, R. (2005). p85 α subunit of class IA PI-3 kinase is crucial for macrophage growth and migration. *Blood* **106**: 103-109.

Musacchio, A., Cantley, L. C., Harrison, S. C. (1996). Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 14373–14378.

Newton, A. C. (1995). Protein kinase C. Seeing two domains. *Current Biology* **5**: 973-976.

Nobukuni, T., Joaquiun, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., Zwartkruis, F. J., Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**: 14238-14243.

Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O., Ui, M. (1994). Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 3568–3573.

Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B. (2003). PI3K-signalling in B- and T-cells: insights from gene-targeted mice. *Biochemical Society Transactions* **31**: 270-274.

Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**: 359-371.

Ong, S. H., Hadari, Y. R., Gotoh, N., Guy, G. R., Schlessinger, J., Lax, I. (2001) Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 6074–6079.

Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N., et al. (1991). Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell* **65**: 91-104.

Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**: 82–85.

Paling, N. R., Wheadon, H., Bone, H. K., Welham, M. J. (2004). Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 48063-48070.

Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., Waterfield, M. D. (1997). Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150. Ptdins 3-kinase complex. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 2477-2485.

Panayotou, G., Bax, B., Gout, I., Federwisch, M., Wroblowski, B., Dhand, R., Fry, M. J., Blundell, T. L., Wollmer, A., Waterfield, M.D. (1992). Interaction of the p85 subunit of PI 3-kinase and its N-terminal SH2 domain with a PDGF receptor phosphorylation site: structural features and analysis of conformational changes. *The EMBO Journal* **11**: 4261–4272.

Park, S., Kim, D., Kaneko, S., Szewczyk, K. M., Nicosia, S. V., Yu, H., Jove, R., Cheng, J. Q. (2005). Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up-regulation by the Src/Stat3 pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 38932-38941.

Pawson, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191–203.

Pérez-Tenorio, G., Stål, O. (2002). Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *British Journal of Cancer* **86**: 540-545.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 27462–27469.

Petersen, C.P., Bordeleau, M-E., Pelletier, J., Sharp, P.A. (2006). Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. *Molecular Cell* **21**: 533-542.

Phillips, R. J., Mestas, J., Gharaee-Kermani, M., Burdick, M. D., Sica, A., Belperio, J. A., Keane, M. P., Strieter, R. M. (2005). Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXCR4 chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 22473-22481.

Phillips, W. A., St Clair, F., Munday, A. D., Thomas, R. J., Mitchell, C. A. (1998). Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer* **83**: 41-47.

Philp, A. J., Campbell, I. G., Leet, C., Vincan, E., Rockman, S. P., Whitehead, R. H., Thomas, R. J., Phillips, W. A. (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Research* **61**: 7426-7429.

Pianetti, S., Arsura, M., Romieu-Mourez, R., Coffey, R. J., Sonenshein, G. E. (2001). Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* **20**: 1287-1299.

Pleiman, C. M., Hertz, W. M., Cambier, J. C. (1994). Activation of phosphatidylinositol-3 kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* **263**: 1609-1612.

Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y. T., Fisher, T. L., Myers Jr., M. G., Sun, X., White, M. F. (1995). The Structure and Function of p55PIK Reveal a New Regulatory Subunit for Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 4453-4465.

Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y. L., Delpuech, O., Griffiths, J. R., Downward, J., Schulze, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**: 6465-6481.

Quentmeier, H., Reinhardt, J., Zaborski, M., Drexler, H. G. (2003). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* **17**: 120-124.

Rameh, L. E., Chen, C.-S., Cantley, L. C. (1995). Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* **83**: 821–830.

Rasheed, S., Nelson-Rees, W., Toth, E. M., Arnstein, P., Gardner, M. B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT1080). *Cancer* **33**: 1027-1033.

Rassidakis, G. Z., Feretzaki, M., Atwell, C., Grammatikakis, I., Lin, Q., Lai, R., Claret, F. X., Medeiros, L. J., Amin, H. M. (2005). Inhibition of Akt increases p27Kip1 levels and induces cell cycle arrest in anaplastic large cell lymphoma. *Blood* **105**: 827-829.

Resnick, A. C., Snowman, A. M., Kang, B. N., Hurt, K. J., Snyder, S. H., Saiardi, A. (2005). Inositol polyphosphate multikinase is a nuclear PI3-kinase with transcriptional regulatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**: 12783-12788.

Resnick, A. C., Saiardi, A. (2008). Inositol polyphosphate multikinase: metabolic architect of nuclear inositides. *Frontiers in Bioscience* **13**: 856-866.

Roche, S., Koegl, M., Courtneidge, S. A. (1994). The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **91**: 9185–9189.

Roche, S., Downward, J., Raynal, P., Courtneidge, S. A. (1998). A Function for Phosphatidylinositol 3-Kinase β (p85 α -p110 β) in Fibroblasts during Mitogenesis: Requirement for Insulin- and Lysophosphatidic Acid-Mediated Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 7119–7129.

Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**: 527-532.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., Downward, J. (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *The EMBO Journal* **15**: 2442-2451.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A., Downward, J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**: 457-467.

Rohrschneider, L. R., Fuller, J. F., Wolf, I., Liu, Y., Lucas, D. M.. (2000). Structure, function and biology of SHIP proteins. *Genes & Development* **14**: 505-520.

Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**: 290-293.

Ruderman, N. B., Kapeller, R., White, M. F., and Cantley, L. C. (1990). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**: 1411-1415.

Ruiz-Larrea, F., Vicendo, P., Yaish, P., End, P., Panayotou, G., Fry, M. J., Morgan, S. J., Thompson, A., Parker, P. J., Waterfield, M. D. (1993). Characterization of the bovine brain cytosolic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *The Biochemical Journal* **290**: 609-616.

Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J. S., Malmstrom, P. O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A., Parsons, R. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Research* **65**: 2554–2559.

Saito, H., Bourinbaiar, A., Ginsburg, M., Minato, K., Ceresi, E., Yamada, K., Machover, D., Breard, J., Mathe, G. (1985). Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* **66**: 1233-1240.

Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D., Fässler, R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required

for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes & Development* **17**: 926-940.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. (2004a). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**: 554.

Samuels, Y., Velculescu, V. E. (2004b). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* **3**: 1221-1224.

Sanger, F., Nicklein, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **74**: 5463-5467.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**: 1098-1101.

Scheid, M. P., Marignani, P. A., Woodgett, J. R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 6247-6260.

Schmidt, E. K., Fichelson, S., Feller, S. M. (2004). PI3 kinase is important for Ras, MEK and Erk activation of Epo-stimulated human erythroid progenitors. *BMC Biology* **2**: 7.

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

Scheijen, B., Ngo, H. T., Kang, H., Griffin, J. D. (2004) FLT3 receptors with internal tandem duplications promote cell viability and proliferation by signaling through Foxo proteins. *Oncogene* **23**: 3338-3349.

Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., Emr, S. D. (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**: 88-91.

Schulz, K. Diplomarbeit an der Universität Hamburg (2007). Seite 78-82.

Serve, H., Hsu, Y. C., Besmer, P. (1994). Tyrosine Residue 719 of the c-kit Receptor Is Essential for Binding of the P85 Subunit of Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase and for c-kit-associated PI 3-Kinase Activity in COS-1 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 6026-6030.

Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R. A., Cantley, L. C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**: 91-99.

Shaw, R. J., Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**: 424-430.

Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W. L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G. B., Gray, J. W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genetics* **21**: 99-102.

Shi, B. H., Nashimoto, T., Andoh, R., Konishi, H., Kobayashi, M., Xu, Q., Ihara, S., Fukui, Y. (2006). Mutation of the PI3' kinase gene in a human colon carcinoma cell line, HCC2998. *DNA and Cell Biology* **25**: 399-405.

Shibasaki, F., Homma, Y., Takenawa, T. (1990). Two Types of Phosphatidylinositol 3-Kinase from Bovine Thymus. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 8108-8114.

Shin, I., Rotty, J., Wu, F. Y., Arteaga, C. L. (2005). Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 6055-6063.

Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A., Schlessinger, J. (1991). Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a

novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* **65**: 83-90.

Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., Calabretta, B. (1995). Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* **86**: 726-736.

Soltoff, S. P., Carraway, K. L., Prigent, S. A., Gullick, W. G., Cantley, L. C. (1994). ErbB3 Is Involved in Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by Epidermal Growth Factor. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 3550–3558.

Soltoff, S. P., Cantley, L. C. (1996). p120cbl Is a Cytosolic Adapter Protein That Associates with Phosphoinositide 3-Kinase in Response to Epidermal Growth Factor in PC12 and Other Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**: 563-567.

Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., and Cantley, L. C. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**: 767–778.

Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**: 5034–5037.

Staal, S. P., Hartley, J. W. (1988a). Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *Journal of Experimental Medicine* **167**: 1259–1264.

Staal, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z., Testa, J. R. (1988b). The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **2**: 96–98.

Stack, J. H., Emr, S. D. (1994). Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase activities. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 31552-31562.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P., Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**: 29-39.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular Cell* **8**: 317–325.

Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., McCubrey, J. A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and Leukemogenesis. *Leukemia* **18**: 189-218.

Stephens, L., Eguinoal, A., Corey, S., Jackson, T., Hawkins, P. T. (1993). Receptor stimulated accumulation of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells. *The EMBO Journal* **12**: 2265-2273.

Stephens, L., Smrcka, A., Cooke, F. T., Jackson, T. R., Sternweis, P. C., Hawkins, P. T. (1994). A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell* **77**: 83-93.

Stephens, L. R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A. S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., Hawkins, P. T. (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**: 105-114.

Stiles, B., Gilman, V., Khanzenzon, N., Lesche, R., Li, A., Qiao, R., Liu, X., Wu, H. (2002). Essential role of AKT-1/protein kinase B α in PTEN-controlled tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 3842–3851.

Stover, E. H., Chen, J., Folens, C., Lee, B. H., Mentens, N., Marynen, P., Williams, I. R., Gilliland, D. G., Cools, J. (2006). Activation of FIP1L1-PDGFR α requires disruption of the juxtamembran domain of PDGFR α and is FIP1L1-independent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**: 8078-8083.

Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nürnberg, B., et al. (1995). Cloning and

characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**: 690-693.

Stoyanova, S., Bulgarelli-Leva, G., Kirsch, C., Hanck, T., Klinger, R., Wetzker, R., Wymann, M. P. (1997). Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ : structure–activity analysis and interactions with wortmannin. *The Biochemical Journal* **324**: 489-495.

Stratton, M. R., Reeves, B. R., Cooper, C. S. (1989). Misidentified cell. *Nature* **337**: 311-312.

Suenaga, A., Takada, N., Hatakeyama, M., Ichikawa, M., Yu, X., Tomii, K., Okimoto, N., Futatsugi, N., Narumi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Konagaya, A., Taiji, M. (2005). Novel mechanism of interaction of p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase and ErbB3 receptor-derived phosphotyrosyl peptides. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 1321-1326.

Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L. C., Erikson, R. L. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **81**: 2117-2121.

Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J. S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N., Hunault-Berger, M., Berthou, C., Villemagne, B., Jourdan, E., Audhuy, B., Solary, E., Witz, B., Harousseau, J. L., Himberlin, C., Lamy, T., Lioure, B., Cahn, J. Y., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C., Bouscary, D. (2005). Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* **106**: 1063-1066.

Susa, M., Keeler, M., Varticovski, L. (1992). Platelet-derived growth factor activates membrane-associated phosphatidylinositol 3-kinase and mediates its translocation from the cytosol. Detection of enzyme activity in detergent-solubilized cell extracts. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 22951-22956.

Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T., Koyasu, S. (1999). Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* **283**: 390-392.

Tanno, S., Tanno, S., Mitsuuchi, Y., Altomare, D. A., Xiao, G. H., Testa, J. R. (2001). AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Research* **61**: 589-593.

Taylor, V., Wong, M., Brandts, C., Reilly, L., Dean, N. M., Cowser, L. M., Moodie, S., Stokoe, D. (2000). 5'-phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 6860-6871.

Teng, D. H.-F., Hu, R., Lin, H., Davis, T., Iliev, D., Frye, C., Swedlund, B., Hansen, K. L., Vinson, V. L., Gumpfer, K. L., Ellis, L., El-Naggar, A., Frazier, M., Jasser, S., Langford, L. A., Lee, J., Mills, G. B., Pershouse, M. A., Pollack, R. E., Tornø, C., Troncoso, P., Yung, W. K., Fujii, G., Berson, A., Bookstein, R., Bolen, J. B., Tavtigian, S. V., Steck, P. A. (1998). MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Research* **57**: 5221-5225.

Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Minoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Nakajima, H., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Sekihara, H., Yin, Y., Barrett, J. C., Oda, H., Ishikawa, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Suzuki, M., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Yamamura, K., Kodama, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Aizawa, S., Tobe, K., Fukui, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. (1999). Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nature Genetics* **21**: 230-235.

Toker, A., Yoeli-Lerner, M. (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Research* **66**: 3963-3966.

Tolias, K. F., Cantley, L. C., Carpenter, C. L. (1995). Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 17656-17659.

Traynor-Kaplan, A. E., Harris, A. L., Thompson, B.L., Taylor, P., Sklar, L.A (1988). An inositol tetrakisphosphate-containing phospholipid in activated neutrophils. *Nature*. **334**: 353-356.

Tringali, C., Lupo, B., Anastasia, L., Papini, N., Monti, E., Bresciani, R., Tettamanti, G., Venerando, B. (2007). Expression of sialidase Neu2 in leukemic K562 cells induces apoptosis by impairing Bcr-Abl/Src kinases signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 14364-14372.

Troussard, A. A., Mawji, N. M., Ong, C., Mui, A., St –Arnaud, R., Dedhar, S. (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 22374-22378.

Tschopp, O. Yang, Z. Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., Hemmings, B. A. (2005). Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**: 2943–2954.

Tsujimura, T., Hashimoto, K., Kitayama, H., Ikeda, H., Sugahara, H., Matsumura, I., Kaisho, T., Terada, N., Kitamura, Y., Kanakura, Y. (1999). Activating mutation in the catalytic domain of c-KIT elicits hematopoietic transformation by receptor self-association not at the ligand-induced dimerization site. *Blood* **93**: 1319–1329.

Ueki, K., Yamamoto-Honda, R., Kaburagi, Y., Yamauchi, T., Tobe, K., Burgering, B. M. Coffey, P. J., Komuro, I., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. (1998). Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 5315–5322.

Ueki, K., Algenstaedt, P., Mauvais-Jarvis, F., Kahn, C. R. (2000). Positive and Negative Regulation of Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Signaling Pathways by Three Different Gene Products of the p85 α Regulatory Subunit. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 8035–8046.

Ueki, K., Fruman, D. A., Brachmann, S., Tseng, Y-H., Cantley, L. C., Kahn, C. R. (2002). Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of

Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 965–977.

Ueki, K., Fruman, D. A., Yballe, C. M., Fasshauer, M., Klein, J., Asano, T., Cantley, L. C., Kahn, C. R. (2003). Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 48453-48466.

Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S. J., Panayotou, G., Waterfield, M. D. (1997a). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 267-272.

Vanhaesebroeck, B., Welham, M. J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P. H., Zvelebil, M. J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., Waterfield, M. D. (1997b). p110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 4330–4335.

Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., Foukas, L. C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends in Biochemical Sciences*. **30**: 194-204.

Vesely, D. L., Hoffman, B., Liebermann, D. A. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates interleukin-6 protection against p53-induced apoptosis in M1 myeloid leukemic cells. *Oncogene* **26**: 3041-3050.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 5241–5248.

Wang, J., Auger, K. R., Jarvis, L., Shi, Y., Roberts, T. M. (1995). Direct association of Grb2 with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 12774–12780.

Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., Nakano, T. (2006). Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**: 2697-2707.

Wennstrom, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Current Biology* **4**: 385–393.

Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L. C., Roberts, T. M. (1985). Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* **315**: 239-242.

Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T., Cantley, L. C. (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* **332**: 644-646.

Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., Mro'zek, K., Vardiman, J. W., George, S. L., Kolitz, J. E., Larson, R. A., Bloomfield, C. D., Caligiuri, M. A. (2001). Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study1. *Cancer Research* **61**: 7233–7239.

Wilson, E. M., Rotwein, P. (2007). Selective control of skeletal muscle differentiation by Akt1. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 5106-5110.

Wu, X., Senechal, K., Neshat, M. S., Whang, Y. E., Sawyers, C. L. (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 15587–15591.

Wu, G., Mambo, E., Guo, Z., Hu, S., Huang, X., Gollin, S. M., Trink, B., Ladenson, P. W., Sidransky, D., Xing, M. (2005). Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90**: 4688–4693.

Wymann, M. P., Arcaro, A. (1994). Platelet-derived growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation mediates actin rearrangements in fibroblasts. *The Biochemical Journal* **298**: 517-520.

Wymann, M. P., Bulgarelli-Leva, G., Zvelebil, M. J., Pirola, L., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., Panayotou, G. (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 1722-1733.

Wymann, M. P., Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1436**: 127-150.

Xu, Q., Simpson, S. E., Scialla, T. J., Bagg, A., Carroll, M. (2003). Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* **102**: 972-980.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular Cell* **3**: 629-638.

Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y., Matsuda, Y. (1993). Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 25846–25856.

Yao, R., Cooper, G. M. (1996). Growth factor-dependent survival of rodent fibroblasts requires phosphatidylinositol 3-kinase but is independent of pp70S6K activity. *Oncogene* **13**: 343–351.

Yoeli-Lerner, M., Yiu, G. K., Rabinovitz, I., Erhardt, P., Jauliac, S., Toker, A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Molecular Cell* **20**: 539-550.

Young, D. C., Griffin, J. D. (1986). Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood* **68**: 1178-1181.

Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G. A., Backer, J. M. (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 1379-1387.

Yuan, Z. Q., Sun, M., Feldman, R. I., Wang, G., Ma, X., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S. V., Cheng, J. Q. (2000). Frequent activation of AKT2 and induction of

apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* **19**: 2324-2330.

Zeng, Z., Sarbassov, D. D., Samudio, I. J., Yee, K. W., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., Giles, F. J., Sabatini, D. M., Andreeff, M., Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* **109**: 3509-3512.

Zhang, J., Fry, M. J., Waterfield, M. D., Jaken, S., Liao, L., Fox, J. E. B., Rittenhouse, S. E. (1992). Activated phosphoinositide 3-kinase associates with membrane skeleton in thrombin-exposed platelets. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 4686-4692.

Zhang, J., King, W. G., Dillon, S., Hall, A., Feig, L., Rittenhouse, S. E. (1993). Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 22251-22254.

Zhang, J., Zhang, J., Benovic, J. L., Sugai, M., Wetzker, R., Gout, I., Rittenhouse, S. E. (1995). Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of Rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 6589-6594.

Zhang, Y., Gao, X., Saucedo, L. J., Ru, B., Edgar, B. A., Pan, D. (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology* **5**: 578-581.

Zhao, W., Kitidis, C., Fleming, M. D., Lodish, H. F., Ghaffari, S. (2006). Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood* **107**: 907-915.

Zheng, Y., Bagrodia, S., Cerione, R. A. (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 18727-18730.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., Hung, M. C. (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nature Cell Biology* **3**: 245-252.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., Hung, M. C. (2001b). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology* **3**: 973–982.

8. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

10x	zehnfach
1x	einfach
3x	dreifach
Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BH-Domäne	BCR-Homologie-Domäne (<i>BCR-homology Domain</i>)
Bis	Bisacrylamid (N,N'-methylen-bisacrylamid)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bZIP	<i>basic-region followed by a leucine-zipper-like</i> Domäne
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc42	Zellteilungszyklus 42 (<i>cell division cycle 42</i>)
cm	Zentimeter
CML	chronische myeloische Leukämie
cDNA	komplementäre DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CSF	Koloniestimulierender Faktor (<i>colony stimulation factor</i>)
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Minimalmedium (<i>Dulbeccos minimal essential medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DTT	Dithiothreitol

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EGFP	verstärkt grünfluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Flt3	<i>fms like tyrosin kinase 3</i>
g	Erdbeschleunigung
Gab	Grb2 assoziierter Binder (<i>Grb2 associated binding protein</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (<i>Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase</i>)
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony stimulation factor</i>)
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
ILK	<i>Integrin-Linked-Kinase</i>
Ins	Inositol
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Side</i>
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat (<i>insulin receptor substrate</i>)
iSH2	inter-SH2-Domäne
Jun N Kinase	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertami
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-l-benzopyran-4-1
M	molar
mA	Milliampere

min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
MPS	myeloproliferatives Syndrom
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonident P 40)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (<i>phosphoinositid-dependent protein kinase 1</i>)
pH	pH-Wert (<i>potentia hydrogenii</i>)
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie (<i>pleckstrin homology</i>)-Domäne
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI4K	Phosphatidylinositol-4-Kinase
PI5K	Phosphatidylinositol-5-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-(3)-phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-(4)-phosphat
PI(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pp60 ^{v-src}	Phosphoprotein 60kDa (Produkt des <i>rous sarkoma virus</i> Onkogens)
PTEN	(<i>phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten</i>)
p-Tyr	Phosphotyrosin
Rac1	ras-bezogenes C3-Botulinumtoxin-Substrat 1 (<i>Ras-related C3 botulinum</i>

	<i>toxin substrate 1)</i>
Rho	ras-homologe Genfamilie (<i>ras homolog gene family</i>)
Rho-GAP	Rho-GTPase aktivierendes Protein (<i>Rho-GTPase activating protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
sek	Sekunde
Ser473	Serinrest 473
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 (<i>Src-homology 2 (SH2)-containing phosphatase</i>).
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
s.o.	siehe oben
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
s.u.	siehe unten
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH308	Threoninrest 308
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

Vps34	<i>vacuolar protein sorting defective 34</i>
VSV	Vesiculo-Stomtitis-Virus (<i>Vesicular-Stomtitis-Virus</i>)
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur von Phosphatidylinositol	3
Abb. 2: Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat an der D3-Position durch die PI3K der Klasse I	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur der katalytischen Untereinheiten der PI3K	7
Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur der regulatorischen Untereinheiten der PI3K Ia	10
Abb. 5: Aktivierung der PI3K nach Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen	24
Abb. 6: Rolle von Ras für die Aktivierung der PI3K	24
Abb. 7: Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat durch PTEN und SHIP	25
Abb. 8: Aktivierung von Akt	28
Abb. 9: Einige der Akt-Effektoren und ihre Rollen	33
Abb. 10: Signalkaskade nach PI3K-induzierte Aktivierung von Akt	40
Abb. 11: Schematische Darstellung der Mutation und des mutierten p76 α -Proteins	50
Abb. 12: Schematische Darstellung der Hämatopoese	53
Abb. 13: Aktivierung der PI3K / Akt Signalkaskade durch GM-CSF	54
Abb. 14: Schematische Darstellung des linearisierten MigRI-Konstrukts	67
Abb. 15: Schematische Darstellung des linearisierten pHCMV-VSV-G-Konstrukts .	67
Abb. 16: Schematische Darstellung des linearisierten SVgp-Konstrukts	67
Abb. 17: Schematische Darstellung des linearisierten ecoenv-IRES-puro-Konstrukts .	68
Abb. 18: Schematische Darstellung des linearisierten pHCMV-A-MLVenv-Konstrukts	68
Abb. 19: Schematische Darstellung der p85 α - und 76 α -Inserts	69
Abb. 20: Schematische Darstellung des linearisierten pBluescript II SK (+)-Konstrukts	70
Abb. 21: Deletion der Adenin-Base in der mutierten p76 α -DNA	100
Abb. 22: Sorten der mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduzierten PG13 Zellen .	101

Abb. 23: Proliferationsversuch mit dem Hemstoff LY294002	103
Abb. 24: Sorten der mit GALV-pseudotypisierten Viren transduzierten Cole Zellen ..	103
Abb. 25: EGFP-Nachweis nach Transduktion der Cole Zellen	104
Abb. 26: Expression von p76 α und p85 α in Cole Zellen nach Transduktion	106
Abb. 27: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der Cole Zellen .	107
Abb. 28: Coomassie-Färbung der an p76 α - bzw. p85 α -mRNA bindenden Proteine aus Cole Zelllysaten	109
Abb. 29: Sorten der mit ecotrop-pseudotypisierten Viren transduzierten NIH3T3 Zellen	109
Abb. 30: EGFP-Nachweis nach Transduktion der NIH3T3 Zellen	110
Abb. 31: Expression von p76 α und p85 α in NIH3T3 Zellen nach Transduktion	112
Abb. 32: Expression von p76 α und p85 α in PG13 Zellen nach Transduktion	113
Abb. 33: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der NIH3T3 Zellen	114
Abb. 34: Tyr-Phosphorylierungsniveau des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation positiv transduzierter NIH3T3 Zellen	116
Abb. 35: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach EGF-Stimulation positiv transduzierter NIH3T3 Zellen	117
Abb. 36: Sorten der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34 ⁺ Zellen .	118
Abb. 37: GM-CSF-abhängige Koloniebildung der CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut nach Transduktion	119
Abb. 38: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34 ⁺ Zellen	119
Abb. 39: Western Blot Analyse nach <i>in vitro</i> Transkription und Translation des p76 α - und p85 α -Konstrukts	120
Abb. 40: 1. FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114- oder amphotropen+VSV-G- pseudotypisierten Viren transduzierten 293-gp Zellen	122

Abb. 41: 2. FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114- oder amphotrop +VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten 293-gp Zellen	123
Abb. 42: FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34 ⁺ Zellen	124
Abb. 43: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34 ⁺ Zellen	125
Abb. 44: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34 ⁺ Zellen bei unterschiedlichen GM-CSF-Konzentrationen	126
Abb. 45: FACS-Analyse und Sortierung der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34 ⁺ Zellen	127
Abb. 46: GM-CSF-abhängiges Wachstum der transduzierten CD34 ⁺ Zellen	128
Abb. 47: GM-CSF-abhängige Proliferation der transduzierten CD34 ⁺ Zellen	128
Abb. 48: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 vor und nach GM-CSF-Stimulation positiv transduzierter NIH3T3 Zellen	129
Abb. 49: Sorten der mit RD114-pseudotypisierten Viren transduzierten CD34 ⁺ Zellen .	130
Abb. 50: Proliferation der CD34 ⁺ Zellen in Stemspan Medium mit 10 ng/ml GM-CSF .	130
Abb. 51: EGFP-Nachweis nach Transduktion der 293-gp Zellen	132
Abb. 52: Expression von p85 α in 293-gp Zellen nach Transduktion.....	133
Abb. 53: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der 293-gp Zellen	134
Abb. 54: Proliferationsversuch mit dem Hemstoff LY294002	136-138
Abb. 55: Akt-Phosphorylierung an Ser473 in Leukämie-Zelllinien	139
Abb. 56-1: FACS-Analyse und Sortierung der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Leukämie- Zelllinien	140
Abb. 56-2: FACS-Analyse und Sortierung der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Leukämie- Zelllinien	141
Abb. 57: EGFP-Nachweis nach Transduktion der Leukämie-Zelllinien	142
Abb. 58: Expression von p85 α in Leukämie-Zelllinien nach Transduktion	144
Abb. 59: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach Transduktion der	

Leukämie-Zelllinien	145
Abb. 60: Proliferation der Leukämie-Zelllinien nach Transduktion	147
Abb. 61: Sorten der mit amphotrop- + VSV-G-pseudotypisierten Viren transduzierten Jurkat-Zellen	148
Abb. 62: EGFP-Nachweis nach p85 α -Transduktion der Jurkat-Zellen	149
Abb. 63: Expression von p85 α nach p85 α -Transduktion der Jurkat-Zellen	149
Abb. 64: Akt-Phosphorylierungsniveau an Ser473 nach p85 α -Transduktion der Jurkat-Zellen	150
Abb. 65: Proliferation der Jurkat-Zellen nach Transduktion	151
Abb. 66: BrdU-Messung der Proliferation der p85 α -transduzierten Jurkat-Zellen.	152
Abb. 67: Proliferation der Zelllinien nach p85 α -Transduktion	153
Abb. 68: Modelle über die Wirkung der p85 α -Überexpression	165
Abb. 69: Mutationen zur weiteren Untersuchungen über den Kompetitionsmechanismus der freien p85 α -Untereinheiten zu den p85 α / p110 α -Heterodimeren	171
Abb. 70: Akt-Phosphorylierung an Ser473 in Jurkat Zellen nach Hemmung mit 25 μ M LY294002	175
Abb. 71: Expression von p110 nach p85 α -Überexpression in 293gp und NIH3T3 Zellen	179

Tab. 1: Liganden, die zur Aktivierung der PI3K Klasse I führen	14
Tab. 2: Einige Effektoren von P-Akt und die direkte Akt-Wirkung auf sie	32
Tab. 3: Folgen der Ausschaltung der Expression der regulatorischen Untereinheit	42
Tab. 4: Mutationen in Molekülen der PI3K Signalkaskade, die gehäuft in Tumoren Auftreten	47-48
Tab. 5: Die zur Transduktion verwendeten Pseudotypisierungen	87
Tab. 6: Virentiter nach Ca-Phosphat Transfektion	101
Tab. 7: Virentiter nach Lipofectamine Transfektion	101
Tab. 8: Virentiter der durch PG13 Zellen produzierten GALV-pseudotypisierten Virenüberstände	102
Tab. 9: Titer der Virenüberstände, produziert mit Hilfe 293-gp Zellen mit stabiler Expression der Konstrukte	124
Tab. 10: Proliferationsversuch mit dem PI3K-Hemstoff LY294002	173

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2004 bis April 2008 in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unter der Anleitung von PD Dr. Manfred Jücker angefertigt. Am Ende meiner Arbeit danke ich denjenigen ganz herzlich, die mich während dieser Zeit besonders unterstützt und gefördert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. M. Jücker für die hervorragende Anleitung, kompetente und ausgesprochen hilfsbereite Betreuung, die stets vorhandene und unermüdliche Diskussionsbereitschaft, sowie die engagierte Förderung während der gesamten Zeit der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg W. Mayr danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie I.

Herrn Gerhard Ortmeyer, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Pränatalmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Bereitstellung von Nabelschnurblutproben danken.

Frau Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, möchte ich für die Bereitstellung von Plasmiden und Zelllinien danken. Ebenfalls gilt mein ausgesprochener Dank Arne Düsedau für die Zellsortierung.

Herrn PD Dr. Boris Fehse, Abteilung für Knochenmarktransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Bereitstellung von Zelllinien und Plasmiden, sowie der Möglichkeit der FACS-Analyse danken, insbesondere gilt mein Dank Melanie Engel für die umfangreiche Unterstützung bei der FACS-Analyse der Zellen.

Herrn Prof. Dr. Walter Fiedler, II. Medizinische Klinik und Poliklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, möchte ich für die Bereitstellung der Blutproben von Leukämiepatienten danken.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Justus Duyster, 3. Medizinische Klinik, TUM, Herrn Dr. G. Nolan, Stanford University, Herrn Dr. H. Tesch, Universitätsklinikum Köln, Fr. Dr. Jutta Friel, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg

und Dr. G. Schuh, Onkologie und Hämatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg für die Bereitstellung von Zelllinien bedanken.

Herrn Dr. Feldmann, Baltimore, USA, Dr. M. von Laer, Frankfurt, Dr. F.-L. Cosset, London, UK und Fr. PD Dr. E. Mohr, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg möchte ich für die Bereitstellung von Plasmiden danken.

Für das gute Arbeitsklima, freundliche Zusammenarbeit und die praktische Anleitung bei zahlreichen Experimenten möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen, insbesondere bei Wiebke Wegner und Dr. Anja Metzner bedanken.

Anschließend möchte ich meinen Eltern ganz herzlich dafür danken, dass sie mir immer mit Tat und Rat zur Seite gestanden haben, mich in jeglicher Hinsicht meines Werdegangs unterstützt und bestärkt haben und mein Studium und diese Doktorarbeit durch ihre Unterstützung erst möglich gemacht haben.

Deswegen ist diese Arbeit ihnen gewidmet.

Publikationen

Aus dieser Arbeit sind während der Promotionszeit folgende Publikationen hervorgegangen:

Originalarbeiten

2008 Hoxha E, Fehse B, Ortmeyer G, Stocking C, Mayr GW, Jucker M.

Overexpression of the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase inhibits GM-CSF-dependent colony formation of CD34+ hematopoietic progenitor cells. Leukemia & Lymphoma 49 (6): 1206-1208 (2008).

Posterpräsentation und Kongresse

2007 **GBM Fall Meeting 2007**

Vortrag: Overexpression of the p85 α subunit of PI3-kinase inhibits GM-CSF-dependent proliferation and colony formation of hematopoietic cells.

2007 **GBM Fall Meeting 2007 (Poster) 16.09-19.09**

Overexpression of the p85 α subunit of PI3-kinase inhibits GM-CSF-dependent proliferation and colony formation of hematopoietic cells.

E. Hoxha, G. Ortmeyer, B. Fehse, C. Stocking, G. W. Mayr und M. Jücker.

Lebenslauf

Name	Elion Hoxha	Adresse	Olewischtwiet 22, 22177
Geburtsdatum	20.07.1982		Hamburg
Geburtsort	Tirana, Albanien	Telefon	0173 179 89 89
Nationalität	albanisch	e-mail	elionissb@yahoo.com
Familienstand	ledig		
Sprachkenntnisse	Albanisch (Mutterspache), Deutsch (fließend), Englisch (fließend), Italienisch (fließend)		

Arbeitserfahrung

Seit 01/2009	Assistenzarzt an der III. Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
--------------	---

Medizinstudium

04/2002-10/2008	Am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg
04/2004	Ärztliche Vorprüfung Note „gut“
10/2008	Ärztliche Prüfung Note „gut“

Weitere Qualifikationen

2003-2004	„Zusatzqualifikation in den Grundlagen der Molekularen Medizin“ am Zentrum für Experimentelle Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
10/2006-10/2008	Aufbaustudium Molekularbiologie („Graduate Study in Molecular Biology“) am ZMNH (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg), Universität Hamburg Note „Exzellent“

Schulausbildung

1988-2000	Grundschule und Gymnasium in Tirana, Albanien
07/2000	Schulabschluss: Abitur am Gymnasium „Ismael Qemali“ Note „1,0“
07/2000	Teilnahme an der XXXI. Weltolympiade im Fach Physik in Leicester, England als Vertreter für Albanien
01/2001-12/2001	Studienkolleg für ausländische Studierende an der Universität Hamburg. Abschluss: Feststellungsprüfung Durchschnittsnote „1,0“

Stipendien

09/2004-08/2005	Leistungsstipendium von der Universität Hamburg
2004	2. Platz des DAAD-Preises für hervorragende Leistungen ausländischer Studierende

Hamburg, den 24.03.2009

Elion Hoxha

Eidesstattliche Versicherung:

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

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

Hamburg, April 2009

Elion Hoxha