

**Untersuchungen zur biologischen Funktion von
Mutationen in der Inositol-5-Phosphatase
SHIP1 bei Patienten mit akuter myeloischer
Leukämie**

Dissertation

**zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Helena Brauer

aus Aurich

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. G. W. MAYR
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Prof. Dr. T. BURMESTER
Tag der Disputation: 26. November 2010

Hamburg, den 11. November 2010



A. Temming
Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhalt

1.....Zusammenfassung.....	1
2.....Einleitung.....	4
2.1.....Die Hämatopoese.....	4
2.2.....Akute myeloische Leukämie.....	6
2.2.1.....Definition.....	6
2.2.2.....Symptome und Pathophysiologie.....	6
2.2.3.....Klassifikation.....	7
2.2.4.....Epidemiologie.....	8
2.2.5.....Risikofaktoren.....	9
2.2.6.....Pathogenese.....	10
2.2.7.....Molekulare Ursachen von AML.....	10
2.2.8.....Therapie von AML.....	14
2.3.....Der PI3K-Akt-Signalweg, seine Bedeutung bei AML und die Rolle von SHIP1	15
2.4.....Struktur von SHIP1.....	20
2.5.....Expression von SHIP1.....	22
2.6.....Enzymatische Aktivität von SHIP1.....	23
2.7.....SHIP1-Homologe: Die Familie der Inositol-5-Phosphatasen.....	23
2.8.....Interaktionspartner von SHIP1.....	24
2.8.1.....Interaktion von SHIP1 mit Grb2.....	26
2.9.....Modifikation von SHIP1.....	29
2.10....Signalwege mit SHIP1.....	29
2.10.1.....Mastzellen.....	29
2.10.2.....B-Lymphozyten.....	33
2.10.3.....T-Lymphozyten.....	35
2.10.3.1.....Calcium-Signaltransduktion in T-Lymphozyten.....	40
2.10.4.....Basophile Granulozyten.....	41
2.10.5.....Monozyten und Makrophagen.....	42
2.10.6.....Osteoklasten.....	44
2.11....Regulation von SHIP1.....	44

2.11.1.....Enzymatische Aktivität.....	44
2.11.2.....Lokalisation.....	45
2.11.3.....Proteinmenge.....	46
2.11.3.1.....Proteasomaler Abbau.....	47
2.11.3.2.....microRNA.....	47
2.12....Die SHIP1- <i>Knockout</i> -Maus.....	50
2.13....SHIP1 in Leukämien.....	54
2.13.1.....Herunterregulation von SHIP1 in chronischer myeloischer Leukämie.....	54
2.13.2.....Mutationen von SHIP1 in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.....	56
2.14.... <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> in SHIP1.....	59
2.15....Haploinsuffizienz.....	60
2.16....Die Jurkat-Zelllinie als Modell.....	61
2.17....Aufgabenstellung.....	62
3....Material und Methoden.....	63
3.1....Material.....	63
3.1.1.....Chemikalien.....	63
3.1.2.....Antikörper.....	63
3.1.2.1.....Primäre Antikörper.....	63
3.1.2.2.....Sekundäre Antikörper.....	65
3.1.3.....Genomische DNA von AML-Proben und gesunden Spendern.....	66
3.1.4.....Zelllinien.....	66
3.1.4.1.....Phoenix (ΦNX) Ampho-Zellen und Phoenix gp-Zellen.....	66
3.1.4.2.....Jurkat und Jurkat Tet-On.....	67
3.1.4.3.....TF-1 I33-5.....	67
3.1.4.4.....FDC-P1.....	67
3.1.5.....Bakterienstämme.....	68
3.1.5.1.....DH10B.....	68
3.1.5.2.....XL10-Gold ultrakompetent.....	69
3.1.5.3.....BL21 (DE3) pLysS pREP4.....	69
3.1.6.....Vektoren.....	69
3.1.7.....Primer.....	71
3.1.7.1.....Mutagenese-Primer.....	71

3.1.7.2.....Sequenzierungs-Primer.....	73
3.1.7.3.....Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung genomischer DNA.....	74
3.1.8.....Geräte.....	77
3.1.9.....Gefäße und Verbrauchsmaterial.....	79
3.2.....Methoden.....	81
3.2.1.....Gelelektrophorese.....	81
3.2.1.1.....Agarosegelelektrophorese von DNA.....	81
3.2.1.2.....Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen.....	81
3.2.2..... <i>Western Blot</i>	82
3.2.3..... <i>Stripping</i> von <i>Western Blots</i>	83
3.2.4.....Kolloidale Coomassie Brilliant Blue-Färbung von Proteinen inPolyacrylamidgelen.....	84
3.2.5.....Mutagenese.....	84
3.2.6.....Transformation von Vektoren in Bakterien.....	85
3.2.7.....Plasmidpräparation.....	85
3.2.7.1.....Plasmidminipräparation.....	85
3.2.7.2.....Plasmidmaxipräparation.....	86
3.2.8.....Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung.....	86
3.2.9.....Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR).....	87
3.2.10.....Sequenzierung von DNA.....	88
3.2.11...Zellkultur.....	89
3.2.11.1.....Stammhaltung und Vermehrung.....	89
3.2.11.2.....Bestimmung der Zellzahl.....	90
3.2.11.3.....Einfrieren von Zellen.....	90
3.2.11.4.....Auftauen von Zellen.....	90
3.2.11.5.....Stimulation von Zellen.....	90
3.2.11.5.1.....Stimulation von TF-1 I33-5-Zellen mit GM-CSF.....	90
3.2.11.5.2.....Stimulation von FDC-P1-Zellen mit Pervanadat und IL-3.....	91
3.2.11.5.3.....Stimulation von Jurkat Tet-On-Klonen mit OKT3.....	91
3.2.11.6...Transfektion und γ -retrovirale Transduktionvon Jurkat Tet-On-Zellen.....	92
3.2.11.7...Einzelzellklonierung durch Endpunktverdünnung.....	94
3.2.11.8...Induzierbare Expression mit dem Tet-On-System.....	94

3.2.11.8.1...Induktion der SHIP1-Expression in Jurkat Tet-On-Klonen mit ...Doxycyclin.....	96
3.2.12...Zelllyse mit Nonidet P40-Puffer.....	97
3.2.13...Protein-Konzentrationsbestimmung.....	97
3.2.14...Isolation genomischer DNA.....	98
3.2.15...SHIP1-5-Phosphatase-Assay.....	99
3.2.16...Expression und Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine.....	100
3.2.16.1..... <i>Strep</i> -tag II-Fusionsproteine.....	100
3.2.16.2.....GST-Fusionsproteine: SHIP1-SH2 WT/F28L/R31Q,Grb2-SH3(N)/(C).....	102
3.2.17... <i>Pull-Down</i> mit GST-Fusionsproteinen.....	103
3.2.17.1..... <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domänen.....	103
3.2.17.2..... <i>Pull-Down</i> mit Grb2-SH3-Domänen.....	103
3.2.18...Durchflusszytometrie-basierter Proliferations-Assay.....	104
3.2.19...Oberflächenplasmonresonanz-Messung mit Biacore.....	106
3.2.20...Calcium-Messung.....	108
3.2.20.1...Methoden zur Untersuchung von Calciumsignalen:Das Fura-2-System.....	108
3.2.20.2...Durchführung.....	111
4.....Ergebnisse.....	113
4.1.....Herstellung SHIP1-exprimierender Jurkat-Klone	113
4.2..... Sequenzierung von Exon 26 – der SNP H1168Y.....	116
4.3.....Jurkat-Zellen exprimieren kein SHIP1, SHIP2 und kein PTEN.....	119
4.4.....SHIP1-5-Phosphatase-Aktivität.....	120
4.4.1.....Bestimmung des linearen Bereichs der SHIP1-katalysierten Reaktion.....	121
4.4.2.....Herstellung eines rekombinanten SHIP1-Standards.....	122
4.4.3.....Vermessung der SHIP1-Mutanten aus Jurkat-Lysaten.....	123
4.4.4.....Bestimmung von K_M , V_{max} und k_{cat} von humanem WT-SHIP1.....	127
4.5.....Reduktion der Akt-Phosphorylierung durch SHIP1.....	130
4.6.....Auswirkung der SHIP1-Expression auf die Proliferation.....	138
4.6.1.....Einfluss von Doxycyclin auf die Proliferation von Jurkat Tet-On-Zellen....	138
4.6.2..... Proliferation der SHIP1-Mutanten.....	139
4.7.....Die F28L-Mutation erzeugt eine defekte SH2-Domäne, die nicht an	

.....Phosphotyrosinmotive bindet.....	141
4.7.1.....Expression der SHIP1-SH2-Domäne.....	142
4.7.2..... <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domänen aus Lysaten stimulierter Zellen.....	142
4.8.....Oberflächenplasmonresonanz mit der SHIP1-SH2-Domäne.....	147
4.9..... Interaktion von SHIP1 mit Grb2.....	150
4.9.1..... Expression der Grb2-SH3-Domänen.....	150
4.9.2..... <i>Pull-Downs</i> mit Grb2-SH3-Domänen.....	151
4.10....Tyrosinphosphorylierung von SHIP1.....	161
4.11....Calcium-Signaltransduktion in Jurkat-SHIP1-Klonen.....	164
5.....Diskussion.....	168
5.1.....Etablierung induzierbar SHIP1-exprimierender Klone.....	169
5.2.....SNPs in SHIP1.....	170
5.3.....Enzymatische Aktivität von SHIP1.....	170
5.4.....Reduktion der pAkt-Level durch Expression von SHIP1.....	172
5.5.....Interaktion von SHIP1 mit Grb2.....	175
5.6.....Proliferation von Jurkat-SHIP1-Klonen.....	176
5.7.....Die SHIP1-SH2-Mutante F28L.....	176
5.8.....Konservierung der mutierten Aminosäuren in SHIP1.....	178
5.9.....Tyrosinphosphorylierung von SHIP1.....	182
5.10...Einfluss von SHIP1 auf die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Calcium-Signaltransduktion in Jurkat T-Lymphozyten.....	183
5.11...Oberflächenplasmonresonanz.....	184
5.12...Bedeutung von SHIP1-Mutationen für die Leukämogenese.....	185
6.....Literatur.....	178
7...Anhang.....	233
.....Abkürzungen.....	233
.....Abbildungsverzeichnis.....	238
.....Tabellenverzeichnis.....	240
.....Danksagung.....	241

1 Zusammenfassung

Akute myeloische Leukämien (AML) entstehen durch genetische Veränderungen in Zellen der Myelopoese, die eine klonale Proliferation und Akkumulation neoplastischer Zellen mit Verdrängung der physiologischen Blutbildung zur Folge haben. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 67 Jahren. Eine AML entwickelt sich in der Regel innerhalb weniger Wochen. Die häufigsten Todesursachen sind Blutungen und Infektionen.

Es wird davon ausgegangen, dass in mindestens zwei verschiedenen Signalwegen eine Mutation auftreten muss, damit aus einer myelopoetischen Zelle eine AML hervorgehen kann. Klassischerweise werden Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen oder deren Signalmodulatoren sowie Mutationen bestimmter Transkriptionsfaktoren gefunden, die zu einer gesteigerten Proliferation und zu einer Differenzierungsblockade führen.

In 50-70% der AML ist der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert. Ein Gegenspieler der PI3K und negativer Regulator der Proliferation in hämatopoetischen Zellen ist die SH2-Domäne-enthaltende Inositol-5-Phosphatase SHIP1.

In 3% der AML wurden nicht-synonyme (*missense*) Mutationen in SHIP1 gefunden. Diese liegen in der SH2-Domäne (F28L), der Inositol-5-Phosphatase-Domäne (N508D, Y643H, V684E), in einem P-x-x-P-Motiv (P1039S, P1042L), im C-Terminus (Q1153L) oder in einer bislang nicht näher charakterisierten Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne (V120M, R156Q, T162P, K210R, R225W) von SHIP1.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese 12 bei AML-Patienten gefundenen SHIP1-Mutationen sowie eine bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gefundene Mutation (Q1076X) und ein *missense single nucleotide polymorphism* (SNP) (H1168Y) auf ihre biologischen und biochemischen Effekte hin untersucht. Dazu wurden die SHIP1-Mutationen per ortsgerichteter Mutagenese in einen SHIP1-codierenden, γ -retroviralen Vektor mit einem *tet response element* (TRE) im 3'-LTR für die Doxycyclin-induzierbare Expression nach Integration ins Genom eingeführt. Jurkat Tet-On, eine Zelllinie akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie, die den reversen tet-Transaktivator exprimiert, jedoch kein endogenes SHIP1, wurde mit diesen Vektoren transduziert, selektioniert und SHIP1-exprimierende Klone etabliert.

Um die enzymatische Aktivität der SHIP1-Mutanten aus Jurkat Tet-On-Klonen zu bestimmen, wurde ein Inositol-5-Phosphatase-Assay mit $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3\text{-diC8}$ als Substrat

verwendet. Bei den Aktivitätsmessungen wurde eine SHIP1-Mutante der 5-Phosphatase-Domäne identifiziert, Y643H, die eine um 84% reduzierte 5-Phosphataseaktivität aufwies. Unter den Enzymen der Familie der Inositol-5-Phosphatasen ist der Tyrosinrest Y643 hochkonserviert. Die übrigen SHIP1-Mutanten der 5-Phosphatase-Domäne, N508D und V684E, zeigten normale Aktivität.

Weiterhin wurde die Fähigkeit der SHIP1-Mutanten, den PI3K-Akt-Signalweg in den Jurkat Tet-On-Klonen zu inhibieren, bestimmt. Dazu wurde die Fähigkeit von SHIP1, die Phosphorylierung von Akt an S473 und T308, die als Maß für die Akt-Aktivität gilt, zu reduzieren, durch Quantifizierung im *Western Blot* überprüft. Die SHIP1-Mutanten Y643H, V684E und P1039S waren nicht mehr in der Lage, die Akt-Phosphorylierung wie Wildtyp-SHIP1 zu inhibieren.

Die Mutante P1039S liegt in einem P-x-x-P-Motiv, einer Konsensusbindungssequenz für SH3-Domänen. Für das Adapterprotein Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) ist eine Interaktion seiner beiden SH3-Domänen mit SHIP1 bekannt. Die C-terminale Grb2-SH3-Domäne, die SHIP1 mit höherer Affinität bindet als die N-terminale, bindet nicht an das P-x-x-P-Motiv, in dem P1039 liegt. Für die N-terminale Grb2-SH3-Domäne wurde in dieser Arbeit eine Bindungsstelle in einer bislang uncharakterisierten Region von SHIP1, Aminosäuren 98-409, bestätigt, und das Bindungsmotiv wird aufgrund der Übereinstimmung mit der Grb2-SH3(N)-Konsensusbindungssequenz in den Aminosäuren 123-128 von SHIP1 vermutet. Die SHIP1-Mutationen in dieser Region, V120M, R156Q, T162P, K210R und R225W beeinträchtigten diese Interaktion nicht.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die SHIP1-Mutante Q1076X, der die C-terminalen 113 Aminosäuren fehlen, nicht mehr an die C-terminale Grb2-SH3-Domäne bindet. Deshalb wird ihre Bindungsstelle in den C-terminalen 113 Aminosäuren von SHIP1 vermutet.

Exon 26 des SHIP1-Gens *INPP5D*, das den SNP H/Y 1168 enthält, wurde im Rahmen dieser Arbeit von 97 AML-Patienten und 16 Gesunden sequenziert. Durch Überprüfung der Hardy-Weinberg-Proportionen konnte kein Zusammenhang des SNPs H/Y 1168 mit akuter myeloischer Leukämie gefunden werden.

Aus Calciummessungen an den SHIP1-exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen wurde bestätigt, dass SHIP1 kein Inhibitor des T-Zellsignals nach alleiniger CD3-Stimulation ist.

Die SHIP1-Mutante der SH2-Domäne, F28L, ist nicht mehr in der Lage, an tyrosinphosphorylierte Proteine zu binden, und ihre Fähigkeit, den GM-CSF-Rezeptor nach GM-CSF-Stimulation hämatopoetischer Zellen zu binden, ist stark reduziert.

Damit konnte für fünf der 14 in dieser Arbeit untersuchten Mutationen eine Beeinträchtigung der biologischen Funktion von SHIP1 festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Analysen von SHIP1-Mutationen bei Leukämiepatienten unterstützen ein Modell, in dem die beeinträchtigte Funktion des negativ regulatorischen SHIP1 zur gestörten Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen und somit womöglich zur Leukämogenese akuter Leukämien beiträgt.

2 Einleitung

2.1 Die Hämatopoese

Im Vorgang der Hämatopoese werden Blutzellen im Knochenmark aus gemeinsamen multipotenten Stammzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, gebildet. Blutzellen können in rote Blutzellen, die Erythrozyten, die in den Blutgefäßen O₂ und CO₂ transportieren, und weiße Blutzellen, die Leukozyten, die für die Immunabwehr verantwortlich sind, eingeteilt werden. Eine andere Einteilung erfolgt in lymphoide und myeloide Zellen. Zu den lymphoiden Zellen zählen die B-Zellen, T-Zellen und NK (*natural killer*)-Zellen. B-Zellen reifen im Knochenmark heran und sind für die Antikörperproduktion zuständig. T-Zellen reifen im Thymus heran und sind wie NK-Zellen für das Abtöten von Virus-infizierten Zellen zuständig, außerdem aktivieren sie B-Zellen und Makrophagen. Zu den myeloiden Zellen zählen die Erythrozyten, die Megakaryozyten, die die für die Blutgerinnung wichtigen Thrombozyten abschnüren, Granulozyten und Monozyten. Die Granulozyten lassen sich unterteilen in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Basophile vermitteln wie die Mastzellen durch Histaminausschüttung Entzündungsreaktionen. Eosinophile spielen bei der Immunabwehr von Parasiten und bei allergischen Reaktionen eine Rolle. Neutrophile phagozytieren eindringende Bakterien. Monozyten können zu Gewebsmakrophagen, dendritischen Zellen und Osteoklasten differenzieren. Makrophagen zählen wie die Neutrophilen zu den Phagozyten. Auch dendritische Zellen phagozytieren Pathogene. Sie sind neben B-Zellen und Makrophagen Antigen-präsentierende Zellen (APCs), die MHC II (*major histocompatibility complex*) auf ihrer Oberfläche exprimieren und so Helfer-T-Zellen Antigene der von ihnen aufgenommenen Pathogene präsentieren.

Die Entwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle bis hin zur ausdifferenzierten Blutzelle ist ein schrittweiser Prozess, der über Vorläuferzellen führt. Diese schrittweise Differenzierung der Vorläuferzellen wird durch Cytokine reguliert, Glykoproteine, die von verschiedenen Zelltypen einschließlich Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten produziert und ausgeschüttet werden. Ihre Wirkung ist oft pleiotrop und redundant, kann synergistisch, antagonistisch, lokal oder systemisch sein. Einige für die Hämatopoese wichtigen Cytokine sind in Abb. 2.1 aufgeführt.

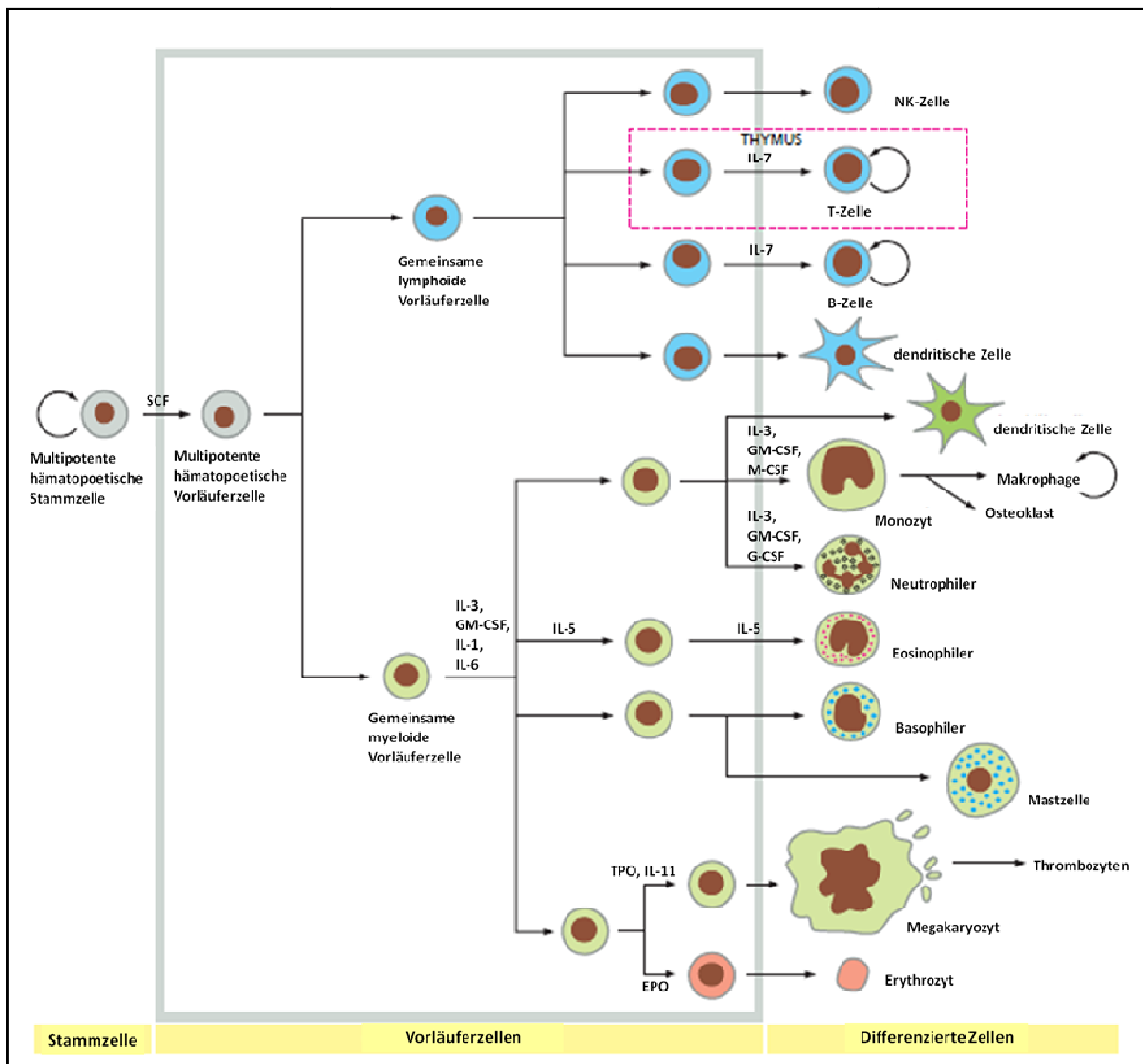


Abb. 2.1: Schema der Hämatopoese. Die multipotente hämatopoetische Stammzelle im Knochenmark erzeugt durch Teilung Vorläuferzellen für die lymphoide und die myeloide Linie, die sich unter Einfluss von Cytokinen weiter teilen und differenzieren. Die meisten hämatopoetischen Zellen entwickeln sich bei erwachsenen Säugern im Knochenmark, mit Ausnahme, der T-Zellen, die im Thymus ausdifferenzieren, und der Makrophagen und Osteoklasten, die in peripheren Geweben aus Monozyten differenzieren. Die Details auf den Stufen der Vorläuferzellen sind noch umstritten. Abb. aus Alberts et al. (ALBERTS et al., 2008), modifiziert nach Abbas und Lichtman (ABBAS and LICHTMAN, 2005). Die Vorläufer der Mastzellen sind noch unbekannt (MURPHY et al., 2009). SCF: *stem cell factor*, GM-CSF: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*, M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*, TPO: Thrombopoetin, EPO: Erythropoetin, IL: Interleukin, NK: *natural killer*.

Die Vorläuferzellen proliferieren im Gegensatz zur Stammzelle stark. Dies reduziert die Zahl der Zellteilungen der hämatopoetischen Stammzellen und senkt das Risiko, im Laufe eines Lebens Stammzell-Mutationen zu erwerben, die sonst in allen daraus hervorgehenden

Blutzellklonen enthalten wären. Außerdem wird die zellteilungsbedingte Seneszenz durch Verkürzung der Telomere so verringert.

Hämatopoetische Stammzellen sind im Knochenmark auf eine bestimmte Nische, die Stammzell-Nische begrenzt. Sie stehen in direktem Zell-Zell-Kontakt mit den Osteoblasten des Knochenmarkstromas sowie spezialisierten Endothelzellen. Diese liefern der Stammzelle Signale zu überleben und das Stammzellpotenzial zu bewahren. Dazu gehört die Expression des Kit-Liganden durch Stromazellen, der an die Rezeptortyrosinkinase c-Kit, die von den hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird, bindet. (ABBAS and LICHTMAN, 2005; ALBERTS et al., 2008).

Mutationen in hämatopoetischen Zellen können zu bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems, den Leukämien, führen, darunter die akute myeloische Leukämie (AML).

2.2 Akute myeloische Leukämie

2.2.1 Definition

Akute myeloische Leukämien (AML) entstehen durch genetische Veränderungen in Zellen der Myelopoese - d.h. dem Teil der Hämatopoese, der Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Megakaryozyten hervorbringt -, die eine klonale Proliferation und Akkumulation neoplastischer Zellen mit Verdrängung der physiologischen Blutbildung zur Folge haben.

AML können ohne erkennbar assoziierte Vorerkrankung entstehen (*De novo*-AML) oder sich aus einer präexistenten Hämatopoese Störung entwickeln (sekundäre AML) (EHNINGER et al., 2008).

2.2.2 Symptome und Pathophysiologie

Hauptsymptome sind Blässe, körperliche Schwäche, Fieber, lokalisierte oder systemische Infektionen, Blutungszeichen und Gerinnungsstörungen. Infolge einer Infiltration mit leukämischen Blasten kommt es darüber hinaus oft zu einer Hepato- und/oder Splenomegalie

bzw. zu Lymphknotenschwellungen. Aufgrund der hohen Proliferationsrate entwickeln sich akute Leukämien in der Regel kurzfristig, innerhalb weniger Wochen (EHNINGER et al., 2008).

Die Todesursache bei AML-Patienten sind zu 75% Infektionen, zu 24% Blutungen (CHANG et al., 1976).

2.2.3 Klassifikation

Die Einteilung der akuten Leukämien erfolgte seit Mitte der 1970er Jahre nach der sogenannten *French-American-British* (FAB)-Klassifizierung auf Grundlage morphologischer und zytochemischer Merkmale (M0-M7), siehe Tab. 2.1 (BENNETT et al., 1976, 1985, 1991). Seit den 2000er Jahren gibt es auch eine WHO (*World Health Organization*)-Klassifizierung, die die genetischen Ursachen berücksichtigt, siehe Tab. 2.2 (JAFPE, 2001).

Tab. 2.1 : Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach der *French-American-British* (FAB)-Klassifizierung. Nach Ehninger et al. (EHNINGER et al., 2008).

FAB-Subtyp	Bezeichnung
M0	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M3V	Akute Promyelozytenleukämie, mikrogranuläre Form
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit abnormer Eosinophilie
M5A	Akute Monoblastenleukämie
M5B	Akute Monozytenleukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Tab. 2.2 : Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach der WHO (World Health Organization)-Klassifizierung. Nach Ehninger et al. (EHNINGER et al., 2008) und Vardiman et al. (VARDIMAN et al., 2009). ETO: *eight twenty one*, CBFβ: *core binding factor β*, MYH: *smooth muscle myosin heavy chain*.

Kategorien	Leukämieformen
AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	AML mit t(8 ;21)(q22 ;q22) ; AML1-ETO
	AML mit abnormen Knochenmarkseosinophilen und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22); CBFβ-MYH11
	Akute Promyelozytenleukämie – AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12); PML-RARα und Varianten
	AML mit 11q23-(MLL-)Anomalien
AML mit multilineärer Dysplasie (mindestens zwei Linien betroffen)	AML mit vorausgegangener Myelodysplasie/myeloproliferativem Syndrom
	De-novo-AML ohne vorausgegangenes Syndrom
Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom (MDS)	AML/MDS nach Gabe von Alkylanzien
	AML/MDS nach Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren
	AML/MDS nach sonstiger Chemo-/Strahlentherapie
AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit	AML, minimal differenziert (FAB M0)
	AML ohne Ausreifung (FAB M1)
	AML mit Ausreifung (FAB M2)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4)
	Akute monozytäre Leukämie (FAB M5A, B)
	Akute Erythroleukämie (FAB M6)
	Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7)
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
	Myelosarkom/Chlorom

2.2.4 Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie macht etwa 80-90% der Fälle an akuten Leukämien bei Erwachsenen und etwa 15-20% der Fälle bei Kindern aus. Die höchsten Inzidenzen der AML des Erwachsenen finden sich in Nordamerika, Westeuropa und Ozeanien, die niedrigsten in Asien und Lateinamerika. Dagegen sind die Inzidenzen der kindlichen AML in Asien deutlich höher als in Nordamerika.

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 67, womit die AML als Erkrankung des älteren Menschen angesehen werden muss (EHNINGER et al., 2008).

Mit einem Anteil von 1% an den Krebs-Toten weltweit ist AML eine relativ seltene Krankheit (MARTENS and STUNNENBERG, 2010).

2.2.5 Risikofaktoren

Familiäre AML sind selten, deshalb dürfte nur ein geringer Prozentsatz durch Keimbahnmutationen verursacht werden. Ein Beispiel für eine familiäre AML wird durch eine Keimbahnmutation im *CCAAT enhancer binding protein alpha* (CEBP α) verursacht (SMITH et al., 2004), welches eine zentrale Rolle bei der Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen in reife Granulozyten spielt. Diese Mutationen treten aber auch sporadisch bei AML auf (PABST et al., 2001).

Bei Trisomie 21 tritt AML mit einer Häufigkeit von 1/300 auf. Besonders häufig ist die akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7). Diese AML ist sehr häufig mit einer Mutation im Transkriptionsfaktor GATA1, der für Megakaryopoese essentiell ist, verbunden (MAGALHAES et al., 2006).

Mutationen im G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*)-Rezeptor werden bei kongenitaler schwerer Aplasie beobachtet, und mit hoher Wahrscheinlichkeit tritt eine sekundäre AML auf. Mutationen im G-CSF-Rezeptor reichen allein jedoch nicht aus für eine Transformation. Mit einer Transformation korrelieren sekundäre zytogenetische Veränderungen wie Deletion von Chromosom 7 oder Mutationen im Ras-Onkogen (KALRA et al., 1995).

Eine als Polymorphismus vorkommende Mutation P187S in der im Benzolabbau wichtigen NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1 führt fast zum Funktionsverlust, v.a. im homozygoten Fall. Menschen, die diesen Polymorphismus tragen, zeigen eine erhöhte Neigung für die Entwicklung einer AML, auch für eine sekundäre (LARSON et al., 1999; SMITH et al., 2001).

Seltene Syndrome wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom, Blooms-Syndrom, Li-Fraumeni-Syndrom, die Fanconi-Anämie und die Neurofibromatose sind mit einem erhöhten Leukämierisiko verbunden.

Weitere Risikofaktoren, an AML zu erkranken, sind Benzol-Aussetzung am Arbeitsplatz (HAYES et al., 1997) sowie Zigarettenkonsum (THOMAS and CHELGHOU, 2004) - wobei ein Teil der durch Rauchen verursachten AML auf Benzol im Zigarettenrauch zurückgeht (KORTE et al., 2000) -, sowie ionisierende Strahlung und Chemotherapie (EHNINGER et al., 2008).

2.2.6 Pathogenese

Mutationen, die zu AML führen, werden fast immer im Laufe des Lebens erworben. Anhand der myeloischen Leukämien wurde das Konzept der Tumorstammzellen (CSC: *cancer stem cell*, LSC: *leukemic stem cell*) eingeführt (BONNET and DICK, 1997), nach dem Mutationen in Tumorstammzellen zu Tumorerkrankungen führen. Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die Möglichkeit des Verbleibens in einem Status außerhalb des Zellzyklus, die Fähigkeit zu unbegrenzter Proliferation, und sie können in verschiedene Linien differenzieren, wobei sich zwei Modelle gegenüberstehen: 1. Das Leukämie-auslösende Ereignis findet immer in einer sehr unreifen Vorläuferzelle mit Selbsterneuerungspotential statt, die dann mehr oder weniger in verschiedene Richtungen differenziert. 2. Das Leukämie-auslösende Ereignis findet in den jeweiligen Differenzierungsstufen der normalen Reifungsstadien statt und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wird erworben (EHNINGER et al., 2008).

2.2.7 Molekulare Ursachen von AML

Akute Leukämien sind immer durch zwei wesentliche Charakteristika gekennzeichnet: 1. gesteigerte, über den eigentlichen Bedarf hinausgehende Zellproliferation, 2. Blockade der Differenzierung.

Man geht i.A. davon aus, dass in mindestens zwei verschiedenen Signalwegen eine Mutation auftreten muss, um aus einer myeloischen Zelle eine Zelle zu formen, aus der eine AML hervorgehen kann. Klassischerweise werden Mutationen in RTKs (Rezeptortyrosinkinasen) oder deren Signalmodulatoren (z.B. *FLT3*, *RAS*) sowie Mutationen bestimmter Transkriptionsfaktoren, meist Fusionsgene, gefunden (EHNINGER et al., 2008). Spezifisch für AML sind z.B. *AML1-ETO* (*eight twenty one*), *PML-RARA* (*promyelocytic leukemia, retinoic acid receptor α*), *CBFB-MYH11* (*core binding factor β , smooth muscle myosin heavy chain 11*) (BEUG et al., 1995; KELLY et al., 2002). In Tab. 2.3 sind häufige molekulare Ursachen von AML aufgeführt. Die Liste wird ständig erweitert – allein für das Gen *MLL* (*mixed lineage leukemia*) sind über 50 Fusionspartner bekannt, mit AF9 als dem häufigsten in AML anzutreffenden (CLEARY, 2009).

Tab. 2.3: Molekulare Ursachen von AML. FG: Fusionsgen, Mut: Mutation. ETO: *eight twenty one*, CBFβ: *core binding factor β*, MYH: *smooth muscle myosin heavy chain*, PML: *promyelocytic leukemia*, RARA: *retinoic acid receptor α*, PLZF: *promyelocytic leukaemia zinc finger*, PTD: partielle Tandem-Duplikation, MLL: *mixed lineage leukemia*, EVI1: *ectrotropic virus integration site site 1*, CBP: *CREB binding protein*, MN1: *meningioma 1*, ERG: *Ets Related Gene*, NPM: Nukleophosmin, CEBPA: *CCAAT-enhancer-binding protein α*, ITD: interne Tandem-Duplikation; TKD: Tyrosinkinasedomäne (EHNINGER et al., 2008; MARTENS and STUNNENBERG, 2010; MCCUBREY et al., 2008).

Genetische Aberration	Typ	Gen-Rearrangement	Inzidenz in %
t(8;21)(q22;q22)	FG	AML1-ETO	5-12
inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;p22)	FG	CBFB-MYH11	6-12
t(15;17)(q22;q11-12)	FG	PML-RARA	4-10
t(11;17)(q23;q21)	FG	PLZF-RARA	
t(5;17)(q32;q12)	FG	NPM1-RARA	
t(8;16)(p11;p13)	FG	MOZ-CBP	<1
inv(8)(p11;q13)	FG	MOZ-TIF2	<1
t(8;22)(p11;q13)	FG	MOZ-p300	<1
t(8;20)	FG	MOZ-NcoA3	<1
t(9;11)(p22;q23)	FG	MLL-AF9	1-3
MLL auf 11q23	Mut	MLL-PTD	5-7
t(6;9)(p23;q34)	FG	DEK-CAN	<1
inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2)	FG	RPN1-EVI1	1-2
t(1;22)(p13;q13)	FG	RBM15-MKL1 = OTT-MAL	<1
t(7;11)	FG	NUP98-HOXA9	<1
t(12;22)	FG	MN1-TEL	<1
t(16;21)	FG	FUS-ERG	<1
+8 allein			5-10
+11 allein			1
NPM1 auf 5q31	Mut		25-35
CEBPA	Mut		4-15
FLT3-ITD	Mut	ITD	20-25
FLT3-TKD	Mut	TKD	6-8
c-KIT	Mut	D816	7-17
N- oder KRAS	Mut		10-30

Das *AML1*-Gen, auch *RUNX1* genannt, codiert die α -Untereinheit des Transkriptionsfaktors CBF (*core binding factor*). Die andere Untereinheit ist CBF β . Zusammen bilden sie ein Heterodimer CBF α/β , das in normalen hämatopoetischen Zellen die Transkription von für die Hämatopoese wichtigen Genen wie die für IL-1, IL-3, GM-CSF, Myeloperoxidase, BCL-2 oder das *mdr1* (*multidrug resistance*)-Gen reguliert.

AML1 ist in 5-12% der AML-Patienten durch die Translokation t(8;21)(q22;q22) oder seltener t(3;21) verändert. Bei Patienten mit AML M0 liegt die Häufigkeit bei ca. 20%. t(8;21)(q22;q22) führt zu einem Fusionsprotein aus dem N-terminalen Anteil von CBF α und dem C-terminalen Anteil von ETO. Dieses Fusionsprotein bindet zwar an dieselben Stellen wie CBF α/β auf der DNA, kann aber die Transkription der Zielgene nicht aktivieren und agiert somit als dominanter Repressor der CBF α/β -Funktion.

Bei inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;p22) kommt es zur Fusion des N-terminalen Teils von CBF β mit dem C-terminalen Teil von MYH11. Dieses CBF β -MYH11 bindet im Gegensatz zu AML-ETO nicht an die DNA, sondern bildet mit einem weiteren CBF β -MYH11 Komplexe im Zytoplasma, in die auch CBF α einbezogen ist. So kann weder CBF α noch CBF β in den Zellkern gelangen und dort transkriptionell aktiv werden (FUCHS, 2002).

AML M3 ist typischerweise durch t(15;17)(q22;q11-12) charakterisiert. Diese Translokation führt zu einem Fusionsprotein aus PML und Retinsäure-Rezeptor α (PML-RAR α). Normalerweise liegt bei Fehlen von Retinsäure der normale nukleäre RAR α in einem Komplex mit Repressorproteinen wie NCoR und Histondeacetylasen vor, sodass die abhängigen Gene der Zelldifferenzierung nicht abgelesen werden. In Anwesenheit von Retinsäure ändert RAR α seine Konformation, sodass die Repressoren vom Promotor abfallen und es zur Transkription kommen kann. PML-RAR α führt zur Dimerisierung auch des normalen RAR α , sodass dieser bei normalen Retinsäure-Konzentrationen seine repressorische Aktivität nicht verliert. Unphysiologisch hohe Konzentrationen an Retinsäure, wie sie durch Gabe von *all-trans*-Retinsäure (ATRA) erreicht werden, können jedoch den Differenzierungsblock aufheben.

Flt3 ist eine Rezeptortyrosinkinase. Mutationen in *FLT3* finden sich fast ausschließlich bei Patienten mit AML (KIYOI et al., 1999; KOTTARIDIS et al., 2002; NAKAO et al., 1996; SCHNITTGER et al., 2002; THIEDE et al., 2002) und MDS (AU et al., 2004; HORIIKE et al., 1997), selten auch bei Patienten mit ALL (5%) (ARMSTRONG et al., 2004; PAIETTA et al., 2004; VAN VLIERBERGHE et al., 2005) und chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (LIN et al., 2006). Es dominieren zwei Mutationstypen: Mutationen im für die

Tyrosinkinasedomäne codierenden Exon 20 und Insertionsmutationen von zumindest teilweise duplizierten DNA-Abschnitten von 3-400 bp Länge (ITD: interne Tandem-Duplikation) im Bereich der Exons 14 und 15, die für die Juxtamembrandomäne codieren (STIREWALT and RADICH, 2003). Die Häufigkeit der *FLT3*-Mutationen liegt bei erwachsenen AML-Patienten bei 25-33%. Von den AML mit normalem Karyotyp machen sie 33-45% aus (STIREWALT and RADICH, 2003), bei den seltenen t(6;9)-Translokationen sogar 70-90% (SLOVAK et al., 2006; THIEDE et al., 2002). Die *FLT3*-Mutationen führen zur konstitutiven Aktivierung von Flt3.

NPM1 (Nukleophosmin 1)-Mutationen haben eine hohe Spezifität für AML und konnten bisher nicht bei lymphatischen Neoplasien oder soliden Tumoren nachgewiesen werden (JEONG et al., 2007). Die Häufigkeit liegt bei 25-35% aller AML-Patienten. Von den AML mit normalem Karyotyp machen sie 45-55% aus. Mehr als 40 verschiedene *NPM1*-Mutationen sind beschrieben (FALINI et al., 2006; THIEDE et al., 2006). Sie führen zu einer zytoplasmatischen Dislokation des NPM1-*Shuttle*-Proteins (FALINI et al., 2005).

Dominant-negative Mutationen des Gens für den myeloischen Transkriptionsfaktor CEBP α (PABST et al., 2001) können in zwei Domänen des Proteins auftreten: in der transkriptionsaktivierenden Domäne (TAD) oder in der *Basic-leucine-zipper-(b-Zip-)*Region. Meist liegen biallelische Mutationen vor. Die Häufigkeit der CEBPA-Mutation bei AML-Patienten beträgt 4-15%.

Eine partielle Tandem-Duplikation des *MLL*-Gens von mehreren 100 kbp kommt bei 5-7% aller AML-Patienten vor, bei Patienten mit normalem Karyotyp etwa doppelt so häufig (DOHNER et al., 2002; STEUDEL et al., 2003).

Weitere Ursachen für AML, die aber nicht spezifisch sind für AML, sind Mutationen in *N-* und *KRAS* (10-30% aller AML (BACHER et al., 2006; REUTER et al., 2000)), *PTPN11* (codiert SHP-2), *TP53*, *JAK2* (z.B. V617F) und *c-KIT* (bei AML insbs. Mutation von D816). *c-KIT* Mutationen werden in 20-30% von AML mit t(8;21) oder inv(16)/t(16;16) gefunden (FROHLING et al., 2005).

Als prognostischer Marker werden die mRNA-Expressionslevel von WT1 (*Wilms tumour 1*) (ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, bei AML erhöhte Expression), BAALC (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*), MDR1 (*multi drug resistance 1*), LRP (*lung resistance protein*), ERG (*ETS related gene*) sowie MN1 (*meningioma 1*) herangezogen (EHNINGER et al., 2008).

Während 50% der AML-Fälle eine der oben genannten Ursachen zugeordnet werden kann, sind die Ursachen für die übrigen 50% unbekannt (MCCUBREY et al., 2008).

In 50-70% der AML-Patienten ist der PI3K-Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert (MARTELLI et al., 2006), insbesondere für die PI3K δ wurde eine konsistente Aktivierung in AML-Blasten gefunden (SUJOBERT et al., 2005). Es konnten aber weder Mutationen in PTEN (*phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10*), Akt oder PI3K gefunden werden (AGGERHOLM et al., 2000; KIM et al., 2008; MARTELLI et al., 2006; TIBES et al., 2008), siehe auch *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (SANGER, 2004).

2.2.8 Therapie von AML

Bei einer Hyperleukozytose, d.h. einer Leukozytenzahl von > 100 Gpt/L (Gigapartikel pro Liter) stellt die Leukapherese eine mögliche Notfallmaßnahme zur Verhinderung einer Leukostase (Festkleben der Leukozyten am Gefäßendothel, was zu mikrovaskulären Einschlüssen und Endothelschädigung führt), die zu Multiorganversagen führen kann (DUTCHER et al., 1987), dar.

Eine Therapiemöglichkeit ist die Chemotherapie. Eingesetzt werden Cytostatika, die in der DNA-Synthesephase der Zelle wirken, und somit vor allem in schnell proliferierenden Zellen. Cytosin-Arabinosid (ARA-C) wird intrazellulär zu ARA-CTP umgewandelt, welches als Analogon von dCTP in die DNA eingebaut wird und DNA-Polymerasen hemmt.

Anthryzalkine, das Anthrachinonderivat Mitoxantron, das Aminoacridinderivat Amsacrin (m-AMSA) wirken durch Hemmung der Topoisomerase II und Interkalation der DNA zytostatisch, ebenso Etoposid (VP-16) durch Topoisomerase II-Hemmung (O'DWYER et al., 1985).

6-Thioguanin ist ein Analogon der Purinbasen Guanin und Hypoxanthin. Es hemmt deren Biosynthese und wird an ihrer Stelle in DNA und RNA eingebaut, wodurch es zu Strangbrüchen kommt bzw. die RNA nicht mehr abgelesen werden kann (ELGEMEIE, 2003).

Fludarabin ist ein fluoriertes Derivat von 9- β -D-Arabinofuranosyladenin (Ara-A), das die Ribonukleotidreduktase, die DNA-Polymerase α und die DNA-Primase hemmt (PLUNKETT et al., 1993).

Daneben werden Inhibitoren eingesetzt, die spezifische Ziele in Signalwegen hemmen. Dazu zählen Flt3-, c-Kit-, VEGFR (*vascular endothelial Growth factor receptor*)-, Raf-, MEK

(MAPK/ERK-Kinase)-, Akt-, mTOR (*mammalian target of rapamycin*)-, Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*)-, XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*)-, HDAC (Histon-Deacetylase)-, DNMT (DNA-Methyltransferase)- und RXR (*retinoid X receptor*)-Inhibitoren.

Als Ras-Inhibitoren werden Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI) eingesetzt, die die Farnesylierung von Ras und somit die für die Ras-Aktivität kritische Membranlokalisation verhindern.

Bei AML mit *PML-RARA*, *PLZF-RARA*, *AML1-ETO* oder *CBFB-MYH11* konnte eine aberrante Histon-Acetylierung gezeigt werden (MINUCCI et al., 2001). HDAC-Inhibitoren induzieren eine terminale Differenzierung sowie Apoptose und Proliferationshemmung in diesen Zellen.

5-aza-desoxycytidin oder 5-aza-cytidin hemmen DNMTs.

Eine Verminderung der Blastenpopulation im Knochenmark auf 5% oder weniger gilt als vereinbar mit einer kompletten Remission (CHESON et al., 2003).

AML-Patienten in kompletter Remission können auch durch eine autologe oder, häufiger, allogene Blutstammzelltransplantation (BSZT) therapiert werden. Während die Knochenmarkentnahme als Stammzellquelle eine lange Tradition hat, werden heute zumeist periphere Blutstammzellen (CD34⁺) verwendet, die mittels Leukapherese gewonnen und nach Konditionierung des Empfängers intravenös appliziert werden. Bei der Blutstammzelltransplantation, insbs. der allogenen, wird auf sogenannte *Graft-versus-Leukemia* (GvL)-Effekte durch alloreaktive T- und NK-Zellen gesetzt. Die BSZT-assoziierte Mortalität ist mit 20-30% in den ersten 12-24 Monaten jedoch relativ hoch und auf das Auftreten einer akuten oder chronischen *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) zurückzuführen. Wegen der Bedeutung des GvL-Effekts ist eine T-Zell-Depletion als Prophylaxe einer GvHD jedoch nicht üblich (EHNINGER et al., 2008).

2.3 Der PI3K-Akt-Signalweg, seine Bedeutung bei AML und die Rolle von SHIP1

In der Signaltransduktion der Zelle werden Signale von der Cytoplasmamembran bis in den Zellkern weitergeleitet. Signale entstehen durch Bindung von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Hormonen und anderen Liganden an ihre Rezeptoren. Auf dieses Primärsignal hin ändert sich die Konzentration von Sekundärbotenstoffen. Über eine

Signalkette gelangt die Information zu Transkriptionsfaktoren im Zellkern, und es kommt zur Zellantwort.

In der Signaltransduktion ist die Regulation biochemischer Mechanismen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch Kinasen bzw. Phosphatasen ein immer wiederkehrendes Motiv. Phosphatreste verändern die Interaktionseigenschaften von Biomolekülen und regulieren somit beispielsweise Enzymaktivitäten. Folglich nehmen sie die Rolle von Schaltern in der Signaltransduktion der Zelle ein. Proteine können an Threonin-, Serin- und Tyrosinresten phosphoryliert werden. Aber nicht nur Proteine sind von Bedeutung, auch die Inositolphosphate und ihre Lipid-Verwandten, die Phosphatidylinositolphosphate, auch Phosphoinositide genannt, stellen durch Phosphorylierung regulierte Signalmoleküle in der Zelle dar.

Eine zentrale Rolle im Phosphoinositidstoffwechsel der Zelle haben die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K).

PI3K sind eine Familie kritischer intrazellulärer Enzyme, die die Addition eines Phosphats spezifisch an die 3-Position des Inositolrings katalysieren, wodurch D3-Phosphoinositide entstehen, einschließlich $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$, $\text{PtdIns}3\text{P}$ und, via PIKfyve, $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$ (VANHAESEBROECK et al., 2001). $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ scheint das prinzipielle und wichtigste Produkt der PI3K nach Rezeptorstimulation zu sein und seine Level steigen nach der Stimulation transient an. $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ rekrutiert und lokalisiert Signalproteine mit Lipid-bindenden PH (*pleckstrin homology*)-Domänen an die Innenseite der Plasmamembran, was zu ihrer Aktivierung führt (VANHAESEBROECK et al., 2001).

Es gibt drei Klassen PI3K, Klasse I, Klasse II und Klasse III, wobei Klasse I in IA und IB unterteilt ist. Davon generiert Klasse I PI3K $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. PI3K Klasse IA ist die am besten charakterisierte und die am häufigsten mit Krebs in Verbindung gebrachte (ENGELMAN, 2009). Klasse IA PI3K sind heterodimere Enzyme aus einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit. Bei Säugern gibt es drei Gene für Klasse IA katalytische Untereinheiten, die für $\text{p110}\alpha$, $\text{p110}\beta$ und $\text{p110}\delta$ codieren, sowie drei Gene für Klasse IA regulatorische Untereinheiten, die für $\text{p85}\alpha$ (und seine Spleißvarianten $\text{p55}\alpha$ und $\text{p50}\alpha$), $\text{p85}\beta$ und $\text{p55}\gamma$ codieren und kollektiv als p85 bezeichnet werden (LIU et al., 2009).

Klasse IB der PI3K stellt ein Heterodimer aus der katalytischen Untereinheit $\text{p110}\gamma$ und einer regulatorischen Untereinheit p101 , p87 oder p84 dar.

Während Klasse IA PI3K über die Rekrutierung von p85 an aktivierte Rezeptortyrosinkinasen oder daran assoziierte Adapterproteine aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der Klasse IB

über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs, *G protein-coupled receptors*) durch direkte Interaktion der regulatorischen Untereinheit mit G $\beta\gamma$ von trimeren G-Proteinen (KATSO et al., 2001). Die katalytische Untereinheit p110 der Klasse I kann auch direkt durch Bindung an Ras aktiviert werden (RODRIGUEZ-VICIANA et al., 1994)

Haupteffektor der PI3K ist die Serin-/Threoninkinase Akt (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*)/PKB. Akt wurde als Onkogen des Maus-Leukämie-Virus AKT8 (BELLACOSA et al., 1991; STAAL, 1987) und als Homolog der PKC (JONES et al., 1991) entdeckt. Es gibt drei Akt-Isoformen (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ). Wegen der Homologie zwischen den Kinasedomänen von Akt/PKB und den Proteinkinasen A, G und C zählt Akt als Mitglied der AGC-Kinase-Familie (MANNING and CANTLEY, 2007). Die Akt-Kinasedomäne erkennt das Minimalmotiv R-x-R-x-x-S/T-B, wobei X für eine beliebige und B für eine große hydrophobe Aminosäure steht (ALESSI et al., 1996).

Akt fördert das Zellüberleben, indem es proapoptische *Bcl-2 homology 3 (BH3)-only*-Proteine negativ reguliert, die normalerweise an antiapoptische Proteine der Bcl-2-Familie binden und diese inaktivieren. Beispielsweise inhibiert Akt das BH3-only-Protein BAD durch direkte Phosphorylierung an S99 (DATTA et al., 1997; DEL PESO et al., 1997), welches somit von 14-3-3 gebunden wird und sein Zielprotein freisetzt (DATTA et al., 2000). Durch direkte Phosphorylierung von FOXO (*forkhead box O*)-Transkriptionsfaktoren werden diese ebenfalls von 14-3-3 gebunden, aus dem Kern exportiert und die Expression ihrer Zielgene blockiert. Ein proapoptisches Ziel der FOXO-Transkriptionsfaktoren ist das BH3-only-Protein BIM, das den Zelltod hämatopoetischer Zellen bei Cytokinentzug stimuliert (DIJKERS et al., 2002). Akt phosphoryliert MDM2 (*murine double minute*) (HDM2 beim Menschen), eine E3 Ubiquitinligase, die daraufhin in den Kern transloziert und p53 negativ reguliert (MAYO and DONNER, 2001; ZHOU et al., 2001). Akt fördert die Proliferation, indem es die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β

(GSK3 β) phosphoryliert, wodurch die Kinase inaktiviert wird. GSK3 β phosphoryliert normalerweise Cyclin D1, was zu seinem Ubiquitin-vermittelten Abbau führt (ALT et al., 2000; DIEHL et al., 1998). Cyclin D1 aktiviert die Rb (Retinoblastom)-phosphorylierenden Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*) CDK2 und CDK4. Phosphoryliertes Rb kann nicht mehr an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie binden und es kommt zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (WAGENER and MÜLLER, 2010). Ein weiteres Zielgen der FOXO-TFs ist p27^{Kip1}, ein CKI (*cyclin-dependent kinase inhibitor*), dessen Expression bei FOXO-Phosphorylierung durch Akt herunterreguliert wird (MEDEMA et al., 2000). Akt fördert

das Zellwachstum durch Aktivierung von mTORC1 (*mammalian target of rapamycin, complex 1*). Diese erfolgt indirekt über Inhibierung durch Phosphorylierung von TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*, auch Tuberin) (INOKI et al., 2002; MANNING et al., 2002; POTTER et al., 2002), das mit TSC1 (auch Hamartin) assoziiert und normalerweise als GAP (GTPase-aktivierendes Protein) für das mTORC1-aktiverende kleine G-Protein Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) wirkt (GAO and PAN, 2001; GONCHAROVA et al., 2002; TAPON et al., 2001).

Akt fördert die Angiogenese, indem es in Endothelzellen die eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) durch direkte Phosphorylierung aktiviert (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999) und für eine erhöhte Produktion der Transkriptionsfaktoren HIF1 α und HIF2 α (*hypoxia-inducible factor α*) führt (GORDAN and SIMON, 2007).

In der Literatur gibt es über 100 Akt-Substrate (MANNING and CANTLEY, 2007).

Akt/PKB besitzt eine N-terminale PH-Domäne, die autoinhibitorisch wirkt. Bindung der PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P₃, bewirkt eine Lokalisation von Akt an die Membran, es kommt zur Konformationsänderung, wodurch der Aktivierungsloop von Akt durch PDK-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), die ebenfalls ein 3-phosphoryliertes Inositollipid für Aktivierung und Membrantranslokation erfordert, an Thr308, sowie das C-terminale hydrophobe Motiv von Akt durch mTORC2 an Ser473 phosphoryliert und Akt somit aktiviert werden kann.

Das PtdIns(3,4,5)P₃-Level wird über seine Synthese durch PI3K und über seinen Abbau durch Phosphoinositid-Phosphatasen bestimmt. Zwei Haupt-PtdIns(3,4,5)P₃-Abbauwege wurden definiert: die ubiquitär exprimierte 3-Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10*) und die in hämatopoetischen Zellen exprimierte 5-Phosphatase SHIP1 (*SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1*), welche PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(4,5)P₂ bzw. zu PtdIns(3,4)P₂ konvertieren (DAMEN et al., 1996; DI CRISTOFANO et al., 1998). In Abb. 2.2 ist die Regulation des PI3K durch PTEN und SHIP1 dargestellt.

Die Wichtigkeit des PI3K-Akt-Signalwegs und seiner Regulation durch Phosphatasen wird dadurch unterstrichen, dass *PTEN* eines der am häufigsten mutierten Gene in Tumoren ist (CANTLEY and NEEL, 1999).

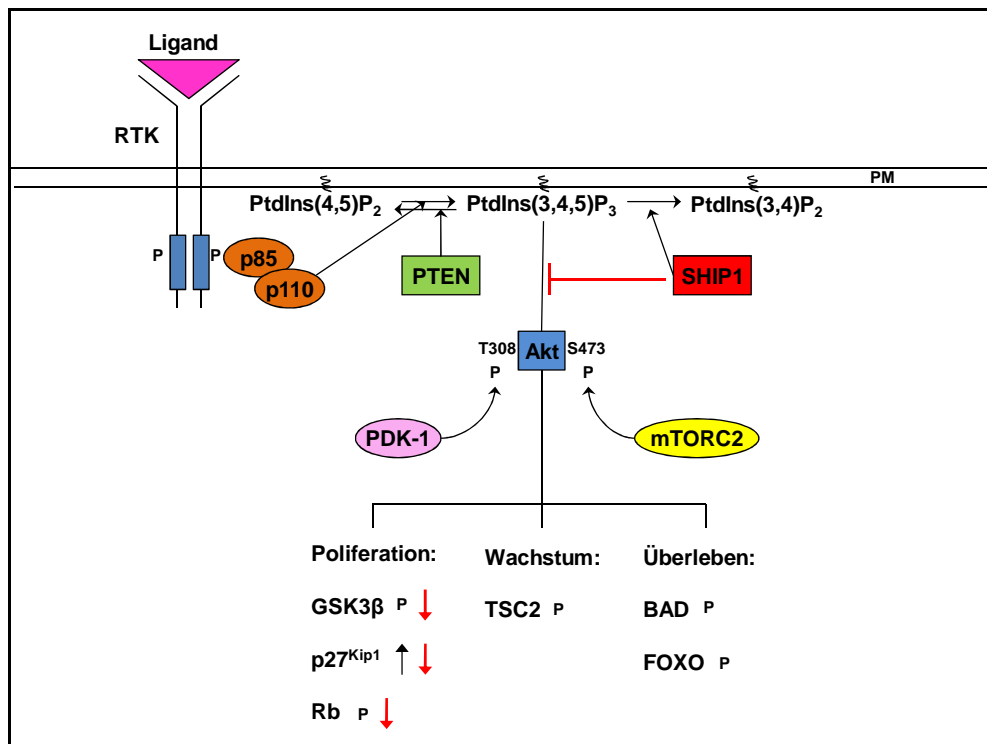


Abb. 2.2: Der PI3K-Akt-Signalweg und seine negative Regulation durch SHIP1. Über Rezeptortyrosinkinaseaktivierung nach Ligandenbindung kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung der PI3K (p85 regulatorische und p110 katalytische Untereinheit). PI3K phosphoryliert sein Substrat PtdIns(4,5)P₂ an Position 3 zu PtdIns(3,4,5)P₃. Die Serin-/Threoninkinase Akt wird PtdIns(3,4,5)P₃-abhängig mit seiner PH (*Pleckstrin homology*)-Domäne an die Plasmamembran (PM) rekrutiert und durch Phosphorylierung (P) an T308 durch PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) und an S473 durch mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) aktiviert. Akt hat >100 Substrate, die es phosphoryliert und damit u.a. zum Überleben, Wachstum und zur Proliferation der Zelle führt. Die SHIP1-vermittelten Effekte sind rot dargestellt. PTEN: *phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10*. Nach Liu et al., Manning und Cantley, Ooms et al., Horn et al., Yang et al. (HORN et al., 2004; LIU et al., 2009; MANNING and CANTLEY, 2007; OOMS et al., 2009; YANG et al., 2009b).

SHIP1 wurde zuerst als tyrosinphosphoryliertes Protein auf Stimulation von hämatopoetischen Zellen hin mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Cytokinen wie M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (LIOUBIN et al., 1994), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (ODAI et al., 1997), IL-3 (Interleukin-3) (LIU et al., 1994), SCF (*stem cell factor*) = SF (*steel factor*) = Kit-Ligand (LIU et al., 1994), Thrombopoetin (DRACHMAN et al., 1995), Erythropoetin (DAMEN et al., 1993; LIU et al., 1994), FL (Flt3-Ligand) (MARCHETTO et al., 1999) und Kreuzvernetzung von Antigenrezeptoren (CROWLEY et al., 1996; LAMKIN et al., 1997; SAXTON et al., 1994) beschrieben.

Humanes SHIP1 wurde 1996 erstmals kloniert (DRAYER et al., 1996; GEIER et al., 1997; ODAI et al., 1997; WARE et al., 1996). Es wird vom Gen *INPP5D* codiert, das beim Menschen auf 2q37.1 liegt (GEIER et al., 1997; WARE et al., 1996).

Obwohl Akt *in vitro* sowohl PtdIns(3,4,5)P₃ als auch PtdIns(3,4)P₂ bindet (FRANKE et al., 1997; FRECH et al., 1997), wird die PH-Domänen-vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von Akt durch den SHIP1-vermittelten PtdIns(3,4,5)P₃-Abbau inhibiert (ASTOUL et al., 1999; CARVER et al., 2000; FREEBURN et al., 2002). SHIP1 gilt deshalb als negativer Regulator von Proliferation und Überleben in hämatopoetischen Zellen. So wurde in verschiedenen hämatopoetischen Zellmodellen, darunter B-Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten, für SHIP1 eine Rolle in der Apoptose-Induktion sowohl im passiven Zelltod (*death by neglect*) als auch im aktivierten Zelltod (*activation-induced cell death*) (BRAUWEILER et al., 2000a; BRAUWEILER and CAMBIER, 2004; GARDAI et al., 2002; LIU et al., 1997a; LIU et al., 1999; LUO et al., 2003) gezeigt. SHIP1 spielt auch eine Rolle in der Proliferationshemmung (HORN et al., 2004; LIOUBIN et al., 1996; LUO et al., 2003; MALBEC et al., 2001; METZNER et al., 2007; METZNER et al., 2009), in Jurkat-T-Zellen über einen längeren Verbleib in der G1-Phase des Zellzyklus (HORN et al., 2004). Auch insbesondere die Überexpression von SHIP1 in primären AML- (METZNER et al., 2009) oder JMML (Juvenile myelomonozytäre Leukämie)-Zellen (METZNER et al., 2007) hemmt die Proliferation.

2.4 Struktur von SHIP1

Humanes SHIP1 wurde als Protein von 1188 Aminosäuren (DRAYER et al., 1996; WARE et al., 1996) und 1189 Aminosäuren (GEIER et al., 1997; ODAI et al., 1997), mit einem zusätzlichen Valin an Position 117, beschrieben. Es hat ein berechnetes Molekulargewicht von 133 kDa und einen berechneten pI (*isoelektrischer Punkt*) von 7,59.

Es besitzt N-terminal eine SH2 (*src homology 2*)-Domäne (AS 5-102), eine zentrale 5-Phosphatase-Domäne (ca. AS 397-862 (AMAN et al., 2000)) mit zwei hochkonservierten Inositol-5-Phosphatase-Motiven (ca. AS 582-593 und AS 663-679) (DRAYER et al., 1996; JEFFERSON and MAJERUS, 1995; MAJERUS et al., 1999; ODAI et al., 1997; WARE et al., 1996), und zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne etwa 300 Aminosäuren unbekannter Funktion. Die C-terminalen etwa 350 Aminosäuren umfassen 2 NPXY-Motive (NPNY AS 911-914, NPLY AS 1018-1021) (GEIER et al., 1997; ODAI et al., 1997; WARE et al., 1996),

die auf Tyrosin-Phosphorylierung hin mit den PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domänen verschiedener Proteine interagieren. Sie können aber auch, abhängig von den drei Resten C-terminal vom Tyrosin im NPXY-Motiv, Bindungsstellen für SH2-Domänen darstellen. Außerdem enthält der C-Terminus mehrere Polyprolin (P-x-x-P)-Motive, die als Bindungsstellen für SH3-Domänen dienen könnten (siehe Abb.2.3) (ODAI et al., 1997; WARE et al., 1996).

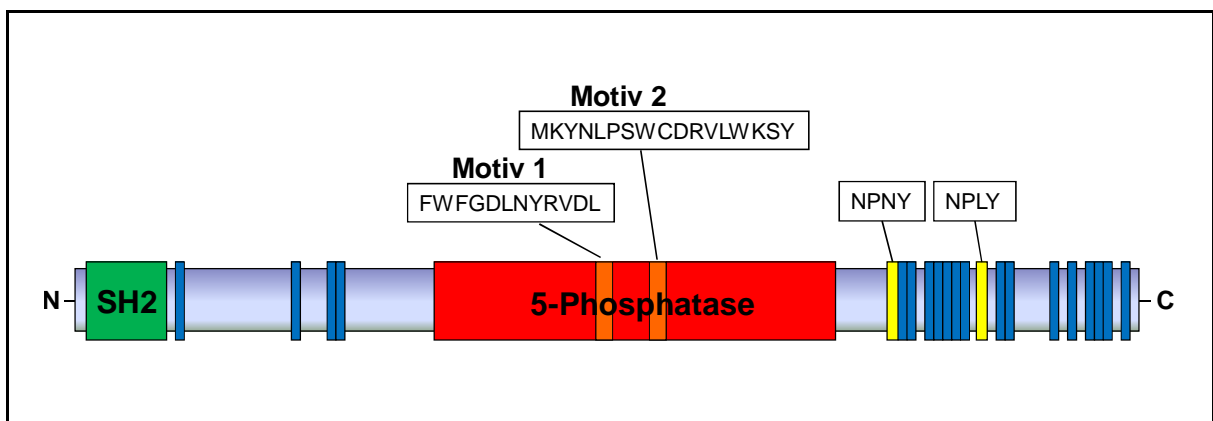


Abb. 2.3: Domänenstruktur von SHIP1. SHIP1 enthält N-terminal eine SH2-Domäne (grün), gefolgt von etwa 300 Aminosäuren unbekannter Funktion, eine zentrale 5-Phosphatase-Domäne (rot) mit zwei konservierten Inositol-5-Phosphatase-Motiven (orange), und im etwa 350 Aminosäuren umfassenden prolinreichen C-Terminus zwei NPXY-Motive (NPNY, AS 911-914, NPLY, AS 1018-1021; gelb) sowie mehrere P-x-x-P-Motive, die blau dargestellt sind. Nach Aman et al., Jefferson und Majerus, Majerus et al., Rohrschneider et al. und Ware et al. (AMAN et al., 2000; JEFFERSON and MAJERUS, 1996; MAJERUS et al., 1999; ROHRSCHEIDER et al., 2000; WARE et al., 1996) .

Es wurden mehrere SHIP1-Proteine mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten von 145 kD, 135 kD, 125 kD und 110 kD beschrieben (ROHRSCHEIDER et al., 2000). Diese könnten durch alternative Transkriptions-Initiation, alternative Translations-Initiation, alternatives Spleißen, Proteindegradation sowie posttranslationale Modifikationen entstehen. Bei einer murinen p135-Form, die durch alternatives Spleißen entsteht, sind direkt hinter dem ersten NPXY-Motiv 61 Aminosäuren deletiert. Die dafür codierende Sequenz von 183 Nucleotiden enthält Intron-Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Konsensus-Sequenzen. Das deletierte Stück umfasst mehrere P-x-x-P-Motive. Außerdem wird durch die Spleißstelle die dritte Aminosäure C-terminal des Tyrosinrests des ersten NPXY-Motivs verändert, was das Bindungsverhalten von SH2-Domänen an dieses Motiv verändern könnte. Diese $\Delta 183$ -cDNA kommt in allen p145-exprimierenden Zellen vor (LUCAS and ROHRSCHEIDER, 1999).

Bei einer humanen cDNA aus ML-1-Zellen (myeloische Leukämie-Zelllinie) sowie peripheren Blut-Leukozyten sind 282 Nukleotide deletiert, entsprechend dem kompletten Exon 25, das 94 AS codiert und das komplette erste NPXY-Motiv umfasst und die, falls translatiert, ebenfalls eine p135-Isoform liefern würde. Ob die in humanen hämatopoetischen Zellen beobachtete p135-Isoform mit der Δ 282-cDNA korrespondiert, ist nicht belegt (LUCAS and ROHRSCHEIDER, 1999).

Eine p102-Form entsteht durch proteolytische Spaltung von p145 am C-Terminus zwischen W941 und S942 durch eine mit PMSF inhibierbare Serinprotease (HORN et al., 2001).

Eine murine p110-Form entsteht durch C-terminale Proteolyse durch Calpain (DAMEN et al., 1998). Eine weitere p110-Form, humanes SIP-110, der die N-terminalen 221 Aminosäuren einschließlich der SH2-Domäne von SHIP1 fehlen, - stattdessen ergeben sich N-terminal 9 neue Aminosäuren -, soll durch alternatives Spleißen entstehen (KAVANAUGH et al., 1996).

In murinen embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen wurde eine p104-Form namens s-SHIP nachgewiesen, der die N-terminalen 262 Aminosäuren fehlen, was den N-terminalen 259 Aminosäuren in humanem SHIP1 delV117 entspricht. Sie entsteht durch Transkription von einem Promotor im Intron zwischen Exon 5 und 6 von *INPP5D* (ROHRSCHEIDER et al., 2005; TU et al., 2001).

2.5 Expression von SHIP1

SHIP1 wird in allen bisher untersuchten Zellen des Blutes und des Knochenmarks exprimiert. Es wurde in hämatopoetischen Stammzellen (CD34⁺), in B-Zellen (CD19⁺, CD20⁺), NK (*natural killer*)-Zellen, Monozyten/Makrophagen, T-Zellen (CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺), Granulozyten, Mastzellen und Thrombozyten nachgewiesen (COX et al., 2001; GEIER et al., 1997; GIURIATO et al., 1997; MARESCO et al., 1999; MAXWELL et al., 2004), außerdem in den Testes, Membran-lokalisiert in Spermatozoen (LIU et al., 1998c). Die SHIP1-Expression wird während der Erythropoese eingestellt. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression mit der T-Zellreifung (LIU et al., 1998c) und Aktivierung ruhender B-Zellen zu (BRAUWEILER et al., 2001).

2.6 Enzymatische Aktivität von SHIP1

SHIP1 spaltet spezifisch den 5-Phosphatrest von PtdIns(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) und Ins(1,3,4,5)P₄ (Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat) ab (DAMEN et al., 1996; DRAYER et al., 1996; KAVANAUGH et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996; ODAI et al., 1997).

Unter den 5-Phosphatasen ist SHIP1 das effizienteste Enzym, das PtdIns(3,4,5)P₃ abbaut (KISSELEVA et al., 2000).

2.7 SHIP1-Homologe: Die Familie der Inositol-5-Phosphatasen

SHIP1 gehört zur Enzymklasse der Inositol-5-Phosphatasen (EC 3.1.3.56). Diese sind Mg²⁺-abhängige Phosphoesterasen, die das Phosphat von Position 5 des Inositolrings von, je nach Spezifität, verschiedenen Inositolphosphaten und Phosphatidylinositolphosphaten hydrolysieren (WHISSTOCK et al., 2002). Sie zeichnen sich durch zwei konservierte Aminosäuresequenzen in der 5-Phosphatase-Domäne aus (JEFFERSON and MAJERUS, 1995). Die Familie der Inositol-5-Phosphatasen umfasst 10 Säuger- und vier Hefe-Enzyme, siehe Abb. 2.4. Das SHIP1 am nächsten verwandte Protein ist SHIP2, mit etwa 38% Gesamtsequenzhomologie, wobei die Homologie zur 5-Phosphatase 64%, zur SH2-Domäne 54% beträgt (PESESSE et al., 1997; ROHRSCHEIDER et al., 2000). Es weist wie SHIP1 mehrere Polyprolinmotive, aber nur ein NPXY-Motiv auf. SHIP2 zeigt ein apparentes Molekulargewicht von 155 kD. Im Gegensatz zu SHIP1 wird SHIP2 außer in hämatopoetischen Zellen unter anderem in menschlichem Herz, Hirn, Skelettmuskel, in Pankreas, Plazenta, Leber und Niere exprimiert (MURAILLE et al., 1999; PESESSE et al., 1997). SHIP2 kann *in vitro* Ins(1,2,3,4,5)P₅, Ins(1,3,4,5)P₄, Ins(1,4,5,6)P₄, Ins(2,4,5,6)P₄, PtdIns(3,4,5)P₃ und PtdIns(3,5)P₂ (CHI et al., 2004) sowie PtdIns(4,5)P₂ (TAYLOR et al., 2000) als Substrate verwenden.

Weitere entfernter verwandte 5-Phosphatasen, die ebenfalls sowohl PtdIns(3,4,5)P₃ als auch Ins(1,3,4,5)P₄ zum Substrat haben und u.a. in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, denen aber die SH2-Domäne fehlt, sind die ubiquitär exprimierten Synaptojanine 1 und 2, das X-Chromosom-codierte OCRL (*oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein*) (ATTREE et al., 1992) und die zuerst in Thrombozyten gefundene 5-Phosphatase II (OOMS et al., 2009). Die

72 kD Typ IV 5-Phosphatase hydrolysiert u.a. $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, aber kein $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, die 5-Phosphatase I hydrolysiert u.a. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$, aber kein $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$.

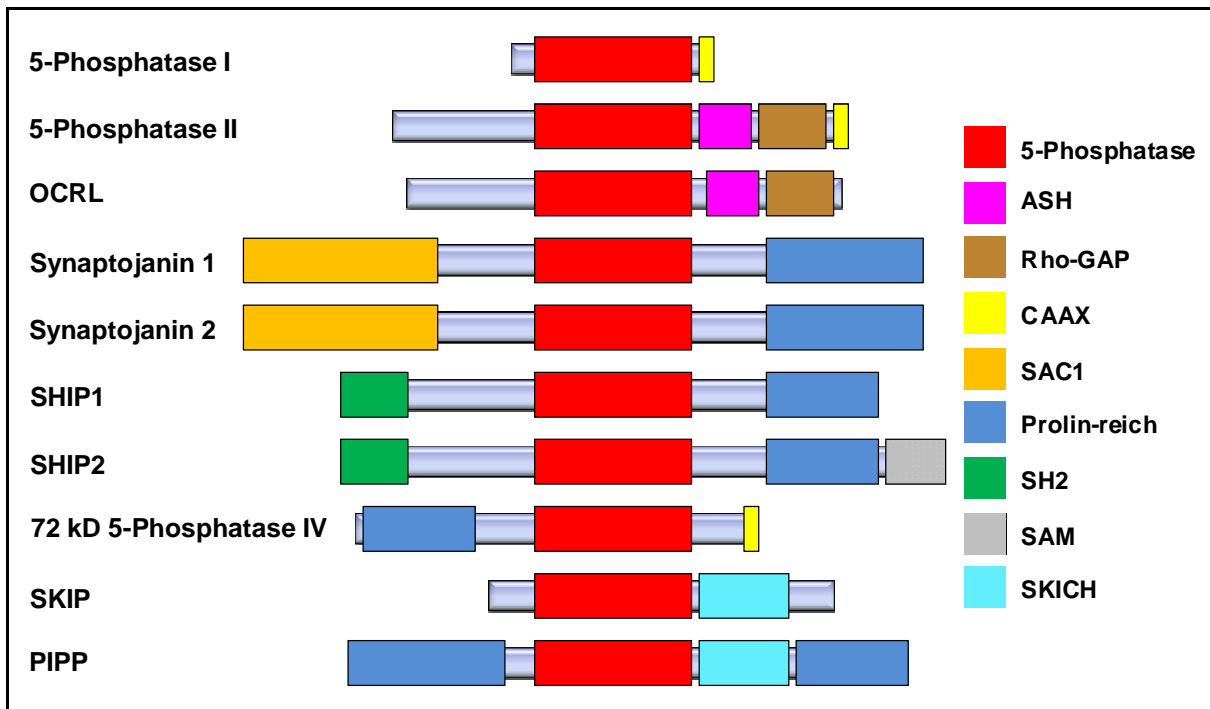


Abb. 2.4: Familie der Inositol-5-Phosphatasen. Dargestellt sind die 10 Säugerenzyme. Nach Ooms et al. (OOMS et al., 2009). OCRL: *oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein*, SKIP: *skeletal muscle- and kidney-enriched inositol phosphatase*, PIPP: *proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase*, ASH: *ASPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein)/SPD2 (spindle pole body 2)/hydin*, GAP: *GTPase-activating protein*, SH2: *Src-Homologie 2*, SAM: *sterile alpha motif*, SKICH: *SKIP carboxyl homology*.

2.8 Interaktionspartner von SHIP1

Die SHIP1-SH2-Domäne zeigt eine Präferenz für tyrosinphosphorylierte Motive bei Zielproteinen, siehe Tab. 2.4, wie sie in ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* $\text{YXX(L/I)X}_{6-8}\text{YXX(L/I)}$) und ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* $(\text{V/I})\text{XYXX(L/V)}$) gefunden werden, die im cytoplasmatischen Teil einiger Rezeptoren und transmembraner Adapterproteine vorkommen und für die Weitergabe von Signalen in der Zelle von Bedeutung sind.

Tab. 2.4: Literaturrecherche zur Konsensus-Erkennungssequenz der SHIP1-SH2-Domäne.

Motiv	Quelle
pY(Y/D)X(L/I/V)	(OSBORNE et al., 1996)
pYXN(I/V)	(LIU et al., 1997b)
pY(Y/S/T/V)(L/Y/X/F)(L/X/I/V)	(SWEENEY et al., 2005)
pY(S/Y)(L/Y/M)(L/M/I/V)	(ZHANG et al., 2009b)

Die SHIP1-SH2-Domäne bindet an tyrosinphosphorylierte ITIMs im Fc γ RIIB (CD32), der von B-Zellen und Mastzellen exprimiert wird (BRUHNS et al., 2000; COGGESHALL, 1998; KONCZ et al., 2001; ONO et al., 1996; ONO et al., 1997; TRIDANDAPANI et al., 1997c; TRIDANDAPANI et al., 1999; VELY et al., 1997), im gp49B1 und MAFA (*mast cell function-associated antigen*), die von Mastzellen exprimiert werden (KUROIWA et al., 1998; XU et al., 2001), und im PECAM-1 (*Platelet/endothelial cell adhesion molecule*) (CD31), das von Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen und Endothelzellen exprimiert wird (PUMPHREY et al., 1999), sowie zumindest *in vitro* direkt oder indirekt an das ITAM in der γ -Kette des Fc γ RIIIA (CD16), der von NK-Zellen exprimiert wird (GALANDRINI et al., 2002). *In vitro* bindet SHIP1 auch an Peptide, die die ITAM-Sequenzen der β - (KIMURA et al., 1997) oder γ -Kette (OSBORNE et al., 1996) des Fc ϵ RI, der von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen exprimiert wird, der γ -, δ - oder ϵ -Kette von CD3 oder der ζ -Kette des T-Zell-Rezeptors enthalten (OSBORNE et al., 1996). In SHIP1-Immunpräzipitationen können β - oder γ -Kette des Fc ϵ RI jedoch nicht nachgewiesen werden (OSBORNE et al., 1996).

SHIP1 interagiert über seine SH2-Domäne mit den tyrosinphosphorylierten Formen der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 (LIU et al., 1997b; SATTLER et al., 1997), der Gerüstproteine Gab1 (*Grb2-associated binder 1*) (KONCZ et al., 2001) und Gab2 (LIU et al., 2001), letztere zwei jedoch mit geringer Affinität (KONCZ et al., 2001); Dok1 (*downstream of kinase 1*) (DUNANT et al., 2000), Dok2 (TAMIR et al., 2000) und Dok3 (LEMAY et al., 2000), Shc (*src homologous and collagen*) (LIU et al., 1994; PRADHAN and COGGESHALL, 1997; VELAZQUEZ et al., 2000) sowie SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) (CD150) (MIKHALAP et al., 1999).

Mit den tyrosinphosphorylierten NPXY-Motiven bindet SHIP1 an die PTB-Domänen von Shc (HUBER et al., 1999; LAMKIN et al., 1997; LIOUBIN et al., 1996; PRADHAN and COGGESHALL, 1997), Dok1 (DUNANT et al., 2000), Dok2 (TAMIR et al., 2000) und Dok3 (LEMAY et al.,

2000). Die PTB-Domäne von Dab1 (*disabled 1*), das in neuronalen und hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, bindet *in vitro* an die NPXY-Motive von SHIP1, insbs. an das NPLY-Motiv, sofern es nicht tyrosinphosphoryliert ist (HOWELL et al., 1999). Die PI3K (*Phosphatidylinositol-3-Kinase*) besitzt zwei SH2-Domänen in ihrer regulatorischen p85-Untereinheit, die das Motiv pY-(M/V/I/E)-X-M binden, welches in der Sequenz C-terminal vom ersten NPXY-Motiv des murinen p145^{SHIP1} vorliegt (LUCAS and ROHRSCHEIDER, 1999), nicht aber im humanen.

Mit seinen prolinreichen Bereichen soll SHIP1 Proteine mit SH3-Domänen binden. Eine Interaktion von SHIP1 mit den SH3-Domänen von Grb2 (KAVANAUGH et al., 1996; ODAI et al., 1997; WISNIEWSKI et al., 1999), Abl, Lyn, Src, (ODAI et al., 1997), PLC- γ 1 (OSBORNE et al., 1996; SONG et al., 2005) und CIN85 (KOWANETZ et al., 2004) wurde gezeigt. Prolinreiche Bereiche in SHIP1 sind der C-Terminus und die Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne. SHIP1 interagiert mit seinem C-Terminus im unphosphorylierten Zustand mit PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT1*) (LIU et al., 1998a).

2.8.1 Interaktion von SHIP1 mit Grb2

Grb2 (*Growth factor receptor-bound 2*), auch bekannt als ASH (*abundant Src homology*), ist ein 25 kD-Adapter-Protein, das Rezeptortyrosinkinasen mit dem Ras-Signalweg verbindet (LOWENSTEIN et al., 1992; SCHLESSINGER, 1993, 1994). Es besitzt drei SH-Domänen in der Reihenfolge SH3(N)-SH2-SH3(C) (LOWENSTEIN et al., 1992; MATUOKA et al., 1992). 1995 wurde die Kristallstruktur von Grb2 veröffentlicht (MAIGNAN et al., 1995).

Grb2 ist das humane Homolog des Sem-5-Proteins aus *Caenorhabditis elegans* (CLARK et al., 1992) und des Drk-Proteins aus *Drosophila melanogaster* (OLIVIER et al., 1993; SIMON et al., 1993).

Im Cytoplasma unstimulierter Zellen liegt Grb2 als Komplex mit Sos (*son of sevenless*) vor, an das es mit seinen beiden SH3-Domänen bindet (KOHDA et al., 1994). Grb2 bindet mit seiner SH2-Domäne an Phosphotyrosinstellen von aktivierten Rezeptoren oder Adapterproteinen wie Shc, und zwar bevorzugt an pY-x-N-Motive, so dass der Grb2-Sos-Komplex an die Plasmamembran rekrutiert wird (BOWTELL et al., 1992; BUDAY and DOWNWARD, 1993; CHARDIN et al., 1993; EGAN et al., 1993; GALE et al., 1993; LI et al.,

1993; LOWENSTEIN et al., 1992; ROZAKIS-ADCOCK et al., 1993; ROZAKIS-ADCOCK et al., 1992; SIMON et al., 1993).

Sos, ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanine-nucleotide exchange factor*), konvertiert das über einen Farnesylrest in der Plasmamembran verankerte kleine G-Protein Ras von der inaktiven GDP-gebundenen in die aktive GTP-gebundene Form und aktiviert so den Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg.

SH3-Domänen sind ca. 60 Aminosäuren umfassende Proteinmotive, die in verschiedenen Proteinen, die an der Signaltransduktion oder am Cytoskelettaufbau beteiligt sind, gefunden werden (Koch et al. 1991 Science, Musacchio et al. 1992 FEBS lett). P-x-x-P-Motive gelten als Konsensusbindungssequenz für SH3-Domänen (PAWSON, 1995), aber auch für andere prolinreiche Sequenzen konnten SH3-Bindungen gezeigt werden (LI, 2005). Die erste aufgeklärte Struktur einer SH3-Domäne wurde 1992 beschrieben (Musacchio et al. 1992).

Zwar können beide Grb2-SH3-Domänen an Sos binden, jedoch ist für die Signaltransduktion durch Sos primär die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 verantwortlich (CHENG et al., 1998; McDONALD et al., 2009), während die C-terminale SH3-Domäne auch an die Adapterproteine Gab1 (FIXMAN et al., 1997; HOLGADO-MADRUGA et al., 1996; NGUYEN et al., 1997) und etwas schwächer Gab2 (HARKIOLAKI et al., 2009; SCHAEPER et al., 2000) bindet, was deren Rekrutierung an RTKs ermöglicht (LOCK et al., 2000). Die folgende Phosphorylierung von Gab1 und Gab2 schafft eine Bindungsstelle für SH2-Domänen, insbesondere die der p85-Untereinheit der PI3K (ONG et al., 2001), was in der Bildung von PtdIns(3,4,5)P₃ resultiert und somit Bindungsstellen für PH-Domänen schafft und Überlebenssignalwege über PH-Domänen-enthaltende Proteine wie Akt und PDK-1 aktiviert (BELHAM et al., 1999; RAMEH and CANTLEY, 1999).

Sos1 konkurriert mit einigen anderen Proteinen um die Bindung an Grb2, neben Gab1 und Gab2 mit SLP76 (LEWITZKY et al., 2001; SCHAEPER et al., 2000), der GTPase Dynamin1 (SEEDORF et al., 1994; VIDAL et al., 1998), der Ubiquitin-Ligase Cbl (LEWITZKY et al., 2001; ODAI et al., 1995; PARK et al., 1998) und dem Zellzyklus-Inhibitor p27^{KIP1} (MOELLER et al., 2003). Die Grb2-SH3(C)-Domäne bindet mit höherer Affinität an Gab1 und SLP76 als an Sos1 (McDONALD et al., 2009).

BCR (*B cell receptor*)-Crosslinking auf B-Zellen sowie M-CSF-Stimulation von Fms (M-CSF-Rezeptor) auf FDC-P1-Zellen führt zum Zusammenbau eines Komplexes, der Shc, Grb2, mSos1 und SHIP1 enthält (LIOUBIN et al., 1994; SAXTON et al., 1994).

Grb2 interagiert mit SHIP1 (JÜCKER et al., 1997; KAVANAUGH et al., 1996; ODAI et al., 1997), und zwar mit seinen beiden SH3-Domänen, dabei stärker mit SH3(C) als mit SH3(N), nicht aber mit seiner SH2-Domäne (JÜCKER et al., 1997; KAVANAUGH et al., 1996).

Obwohl eine Konkurrenz der SHIP1-SH2-Domäne mit der Grb2-SH2-Domäne um die Bindung an tyrosinphosphoryliertes Shc und anschließende Inhibition des Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalwegs in B-Zellen anfangs vorgeschlagen wurde (LIU et al., 1994; TRIDANDAPANI et al., 1997a; TRIDANDAPANI et al., 1997b; TRIDANDAPANI et al., 1998), konnte dies von anderen nicht bestätigt werden (AMAN et al., 2000; HARMER and DEFRANCO, 1999). Auch in T-Zellen scheint SHIP1 keinen spezifischen Einfluss auf den Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-Signalweg zu haben (HORN et al., 2004).

Da Grb2 über seine SH2-Domäne direkt oder mittelbar über Bindung an Adapterproteine wie Shc an zahlreiche aktivierte Rezeptortyrosinkinasen rekrutiert werden kann, darunter die hämatopoetischen Rezeptoren c-Kit, BCR, TCR, EpoR, c-Mpl (Thrombopoetin-Rezeptor), G-CSF-Rezeptor, GM-CSF-Rezeptor, Fms und CD28 (BUDAY, 1999), besteht so auch eine Möglichkeit für SHIP1, an die Membran rekrutiert zu werden.

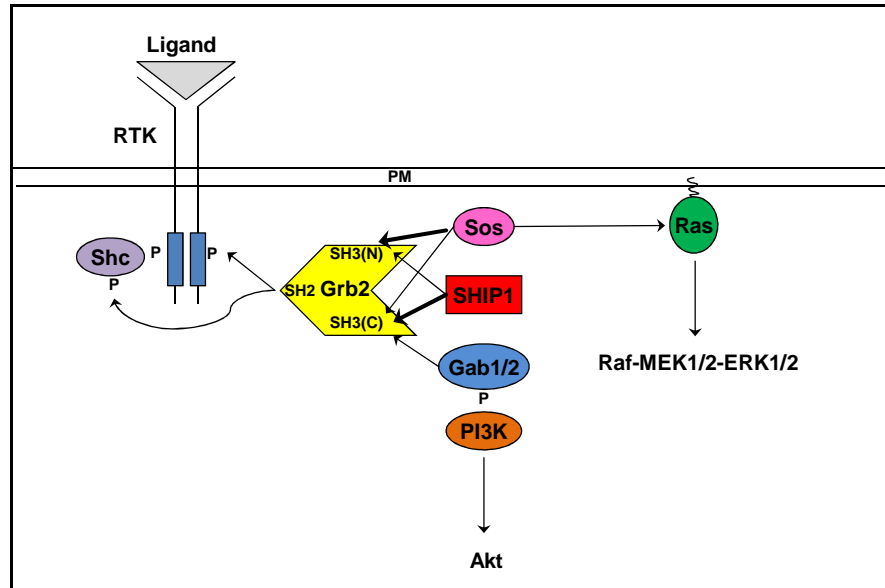


Abb. 2.5 Modell zur Signaltransduktion über Grb2 und Interaktion mit SHIP1. Grb2 (*Growth factor receptor-bound 2*) bindet mit seiner SH2-Domäne direkt an Phosphotyrosinreste aktivierter Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) oder indirekt über Shc. Dadurch werden die von Grb2 mit seinen SH3-Domänen gebundenen Proteine Sos (*son of sevenless*) und Gabs (*Grb2-associated binder*) und womöglich SHIP1 an die Membran rekrutiert und der Ras- (über Sos) bzw. PI3K- (über Gabs) Signalweg aktiviert. Es ist nicht gezeigt, dass SHIP1 mit Sos oder Gab1/2 um die Bindung an Grb2 konkurriert. Nach Pawson (PAWSON, 2004).

2.9 Modifikation von SHIP1

Src-Familienmitglieder, insbesondere Lyn, werden für die Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 verantwortlich gemacht (BARAN et al., 2003; GARDAI et al., 2002; HARDER et al., 2004; HERNANDEZ-HANSEN et al., 2004; HIBBS et al., 2002; MALBEC et al., 2002; XIAO et al., 2005). Murines SHIP1 delV120 (entspricht humanem SHIP1 delV117) wird an Y867 (Y864) (CAO et al., 2007; GOSS et al., 2006), S934 (S933) (CAO et al., 2007), Y944 (Y943) (CAO et al., 2007), Y917 (Y914) und Y1020 (Y1021) (RIKOVA et al., 2007; RUSH et al., 2005) phosphoryliert. SHIP1 kann *in vitro* an mehreren Serin- und Threoninresten von der PKA phosphoryliert werden (ZHANG et al., 2010).

2.10 Signalwege mit SHIP1

2.10.1 Mastzellen

Mastzellen gehören neben Basophilen und Eosinophilen zu den Effektorzellen in allergischen Reaktionen. Beim Menschen gibt es zwei Mastzell-Subtypen, die Mastzellen des Bindegewebes und die der Mukosa. Die Mastzellen des Bindegewebes enthalten in ihren Granula viel des biogenen Amins Histamin sowie Heparin und an Proteasen hauptsächlich Tryptase, Chymase, Carboxypeptidase A und Cathepsin G, die Mastzellen der Mucosa viel des Proteoglycans Chondroitinsulfat, weniger Histamin und an Proteasen hauptsächlich Tryptase.

Die Bindegewebe-Mastzellen- und Mukosa-Mastzellen-Phänotypen sind keine unterschiedlichen Abstammungslinien. Vielmehr können die beiden Mastzelltypen, abhängig von ihrer Mikroumgebung, bidirektional ineinander übergehen.

Mastzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den FcεRI, der mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-10}$ M) IgE bindet, so dass Mastzellen mit IgE bedeckt sind. FcεRI besteht aus einer Liganden-bindenden α -Kette, die zwei extrazelluläre Ig-Domänen besitzt; einer β -Kette, die die Membran viermal durchspannt und deren C- und N-Terminus intrazellulär liegen, wobei im C-Terminus ein ITAM vorkommt und mit dem N-Terminus von Lyn konstitutiv assoziiert ist; sowie einem γ -Ketten-Homodimer, wobei jede γ -Kette ein ITAM im cytoplasmatischen Teil enthält. β - und γ -Ketten sind für die Signaltransduktion verantwortlich.

Mastzellen werden durch Kreuzvernetzung von FcεRI durch multivalente Antigene aktiviert. Die folgende Signalkaskade ist ähnlich derer, die durch Antigenbindung an Lymphozyten initiiert wird. Die mit der β-Kette konstitutiv assoziierte Kinase Lyn phosphoryliert die β-Kette und γ-Ketten an Tyrosinen in den ITAMs. Syk wird daraufhin an die ITAMs der γ-Ketten rekrutiert, aktiviert und phosphoryliert und aktiviert seinerseits andere Enzyme und Adapterproteine in der Signalkaskade, die zu einer Aktivierung des PLCγ-IP₃-PKC- sowie des Ras-Signalwegs führen.

Die aktivierte PKC phosphoryliert die leichten Ketten des Myosin, was zu einem Auseinanderfallen der Actin-Myosin-Komplexe unterhalb der Plasmamembran führt, so dass es zur Exocytose der Granula kommt.

Die Phospholipase A₂ kontrolliert die Synthese von Lipid-Mediatoren. Sie wird durch erhöhtes cytoplasmatisches Calcium sowie durch Phosphorylierung durch eine MAPK aktiviert und hydrolysiert Membranphospholipide zu Lysophospholipiden und freien Fettsäuren, wobei Arachidonsäure die wichtigste Rolle einnimmt. Cyclooxygenase produziert daraus vornehmlich Prostaglandin D₂, Lipoxygenase vornehmlich Leukotrien LTC₄, aus dem durch Degradation LTD₄ und LTE₄ entstehen. Ein weiterer Lipid-Mediator ist PAF (*Platelet-activating Factor*), der durch Acylierung von Lysoglycerylether-Phosphorylcholin entsteht.

Durch die Aktivierung von Mastzellen wird außerdem die Synthese und Sekretion von Cytokinen stimuliert, z.B. von IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α und MIP-1α (ABBAS and LICHTMAN, 2005).

Die Mastzell-Aktivierung über den FcεRI oder FcγRIII (TAKAI et al., 1996) kann durch den inhibitorischen Rezeptor FcγRIIB (HUBER et al., 2002), oder MAFA (*mast cell-function associated antigen*) reguliert werden.

Durch Co-Aggregation von FcεRI und FcγRIIB phosphoryliert Lyn das ITIM von FcγRIIB, wodurch SHIP1, im Komplex mit Grb2 und Dok-1, mit seiner SH2-Domäne dorthin rekrutiert wird, wodurch die IgE-vermittelte Degranulation, Cytokinproduktion und Ca²⁺-Mobilisierung inhibiert werden (HUBER et al., 1998a; HUBER et al., 2002; KALESNIKOFF et al., 2002; KEPLEY et al., 2004).

SHIP1 inhibiert auch die durch SF und allein durch IgE induzierte Degranulation von Mastzellen (HUBER et al., 1998a; HUBER et al., 1998b; KALESNIKOFF et al., 2002; RAUH et al., 2003).

MAFA ist ein Typ II Membranglycoprotein (C-Terminus mit C-Typ Lectin-Domäne extrazellulär, N-Terminus mit ITIM intrazellulär). *Clustering* von MAFA führt zur Tyrosin-

Phosphorylierung des ITIMs durch Lyn, woraufhin SHIP1 mit seiner SH2-Domäne daran bindet und an die Cytoplasmamembran rekrutiert wird. Dadurch wird die sekretorische Antwort der Mastzellen auf den FcεRI-Stimulus supprimiert (ABRAMSON and PECHT, 2002; XU et al., 2001).

Die Co-Aggregation von FcγRIIB mit c-Kit führt zur Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 und zur SHIP1-abhängigen Hemmung der Akt-Phosphorylierung und der Proliferation (MALBEC et al., 2001).

IL-3 (*interleukin-3*), auch bekannt als multi-CSF (*multilineage colony-stimulating factor*) ist ein Produkt von T-Helferzellen, das auf unreife Vorläuferzellen des Knochenmarks einwirkt und die Expansion von Zellen fördert, die in alle bekannten reifen Zelltypen differenzieren. Es stimuliert die Jak2 (*Janus kinase 2*)-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung der β-Kette des IL-3-Rezeptors an Y577, wodurch Shc mit seiner PTB-Domäne daran bindet. Shc selbst wird daraufhin durch Lyn oder Jak2 Tyrosin-phosphoryliert, vornehmlich an Y239 und Y317. In Mastzellen wurde nachgewiesen, dass SHIP1 wiederum mit seiner SH2-Domäne an pY317 bindet (VELAZQUEZ et al., 2000) und somit eine negative Rolle in IL-3-vermittelten Signalwegen ausübt. In Abb. 2.6 ist die inhibitorische Rolle von SHIP1 in Mastzellen dargestellt.

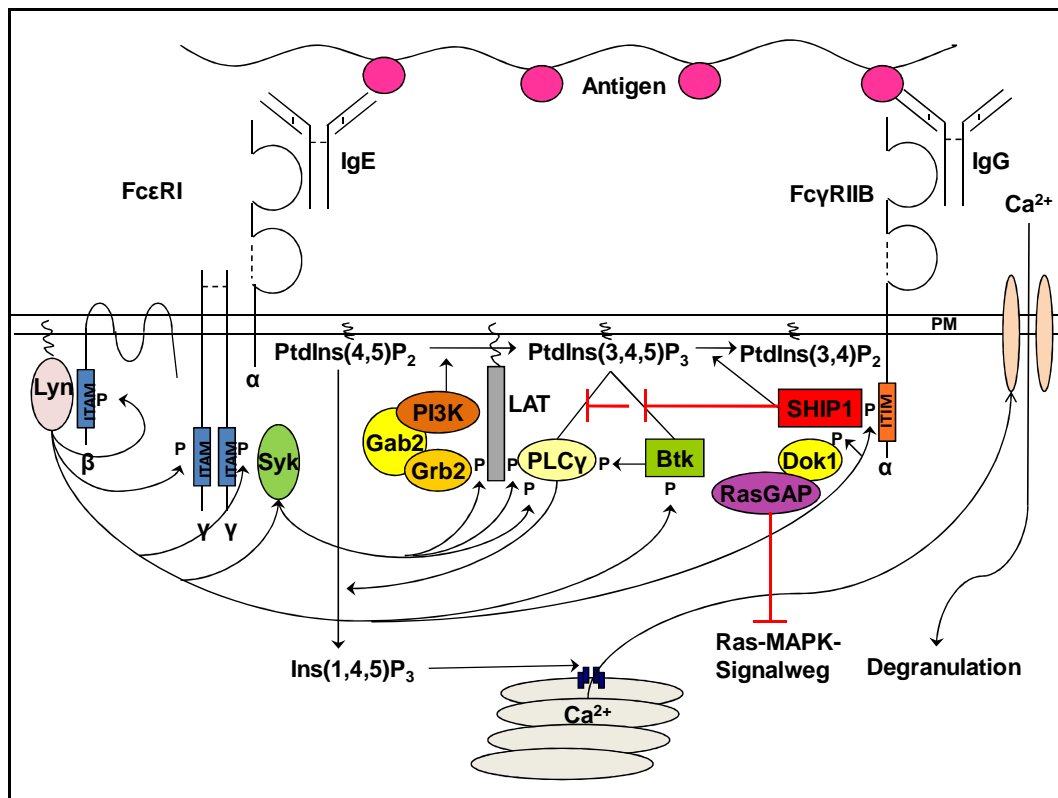


Abb. 2.6: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in Mastzellen. Auf Kreuzvernetzung des FcεRI mit FcγRIIB durch multivalente Antigene hin tyrosinphosphoryliert die Src-Kinase Lyn β- und γ-Ketten des FcεRI. Daraufhin bindet Syk an die γ-Kette und wird ebenfalls von Lyn tyrosinphosphoryliert. Syk tyrosinphosphoryliert LAT (*linker of activated T cells*) und schafft so eine Bindungsstelle für die PLCγ. Die PI3K wird ebenfalls aktiviert (durch Bindung an Gab2, das von Fyn phosphoryliert wurde und an die SH3-Domäne von Grb2 bindet, welches wiederum an phosphoryliertes LAT bindet) und stellt PtdIns(3,4,5)P₃ her. PLCγ bindet mit seiner SH2-Domäne an LAT und mit seiner PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P₃. Auch Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) bindet mit seiner PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P₃ und aktiviert die PLCγ. PLCγ spaltet PtdIns(4,5)P₂ zu Ins(1,4,5)P₃ und Diacylglycerin. Lyn phosphoryliert außerdem das ITIM des FcγRIIB, an das daraufhin SHIP1 bindet, welches PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ abbaut und so die Rekrutierung von Proteinen mit PH-Domänen an die Plasmamembran (PM) und das Calciumsignal inhibiert. Durch die Rekrutierung von Dok1 mit RasGAP (*Ras GTPase-activating protein*) durch SHIP1 wird auch der Ras-MAPK-Signalweg inhibiert. Nach Alvarez-Errico et al. (ALVAREZ-ERRICO et al., 2009).

2.10.2 B-Lymphozyten

Bei der positiven Signaltransduktion in B-Zellen, beispielsweise bei der Antigen-induzierten B-Zell-Aktivierung, werden B-Zell-Rezeptor-Komplexe durch Antigene kreuzvernetzt. Der B-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus Membran-Immunglobulin (IgM und IgD in reifen naiven B-Zellen, IgG, IgA oder IgE in aktivierten B-Zellen) sowie einem Heterodimer aus $I\alpha$ und $I\beta$. An den cytoplasmatischen Anteil des Membran-Ig/B-Zell-Rezeptor-Komplexes sind nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen der Src-Familie wie Fyn, Blk und Lyn assoziiert, die die ITAMs im cytoplasmatischen Anteil von $I\alpha$ und $I\beta$ phosphorylieren. Daran bindet die nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase Syk mit ihren zwei SH2-Domänen und phosphoryliert das Adapterprotein BLNK (*B cell linker protein*), auch SLP-65 genannt (*SH2-binding leukocyte phosphoprotein of 65 kD*). An phosphoryliertes BLNK binden Grb2, an das wiederum der GTP/GDP-Austauschfaktor Sos bindet, wodurch der Ras/MAPK-Signalweg aktiviert wird, sowie PLC γ 2 und die nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase der Tec-Familie Btk (*Bruton's tyrosine kinase*). Syk und Btk, die selbst beide von Lyn phosphoryliert und somit aktiviert werden (SCHARENBERG and KINET, 1998), aktivieren die PLC γ 2 durch Tyrosin-Phosphorylierung. Diese spaltet ihr Substrat PtdIns(4,5)P $_2$ zu Diacylglycerin (DAG) und Ins(1,4,5)P $_3$, die wiederum Aktivierung der Proteinkinase C- β bzw. Ca $^{2+}$ -Efflux aus intrazellulären Speichern bewirken.

Auch das Komplementsystem ist an der B-Zell-Aktivierung beteiligt. Antigen wird von dem Komplementfragment C3d gebunden, und dieses bindet wiederum an den Typ 2 Komplement-Rezeptor (CR2, CD21) auf B-Zellen, der, zusammen mit CD19 und CD81, Bestandteil des B-Zell-Corezeptor-Komplexes ist. B-Zell-Antwort auf das Antigen wird durch dieses costimulatorische Signal um das 1000fache verstärkt. In diesem Fall phosphoryliert die an die ITAMs von $I\alpha$ und $I\beta$ gebundene Syk ein ITAM im cytoplasmatischen Teil von CD19, an welches die PI3K bindet und zu ihrem Substrat PtdIns(4,5)P $_2$ rekrutiert wird, das sie zu PtdIns(3,4,5)P $_3$ phosphoryliert. PtdIns(3,4,5)P $_3$ ist ein Membran-assoziiertes Phospholipid, das als Antwort auf diverse extrazelluläre Stimuli hin aus PtdIns(4,5)P $_2$ durch die PI3K gebildet wird und PH (*pleckstrin homology*)-Domänen enthaltende Proteine bindet und sie an die Membran transloziert, damit sie dort ihre Effekte vermitteln können. Die PI3K stellt somit eine kritische Komponente der wichtigsten Signalwege dar. Die cytoplasmatische Tyrosinkinase Btk bindet mit ihrer PH-Domäne normalerweise hochaffin an PtdIns(3,4,5)P $_3$ und wird so an den Ort ihrer Wirkung rekrutiert (ABBAS and LICHTMAN, 2005).

Bei der negativen Signaltransduktion in B-Zellen, beispielsweise beim Antikörper-*Feedback*, einem Prozess zur Regulation der humoralen Immunantwort, wird die Antikörperproduktion einer aktivierten B-Zelle durch sezerniertes IgG gehemmt. Sezernierte IgG-Antikörper bilden Komplexe mit Antigen aus, die mit ihrem Fc-Anteil an den Fc γ RIIB (CD32) binden. Multivalente Antigene binden außerdem an den BCR, was zur Kreuzvernetzung der Rezeptoren führt und ihre cytoplasmatischen Anteile einander nahe bringt. Daraufhin wird das ITIM im cytoplasmatischen Teil des Fc γ RIIB durch eine mit dem BCR assoziierte Src-Protein-Tyrosin-Kinase wie Lyn phosphoryliert, woraufhin SHIP1 mit seiner SH2-Domäne daran bindet und ebenfalls von Lyn oder Syk phosphoryliert wird. Somit an den Ort seines Substrates PtdIns(3,4,5)P₃ lokalisiert, dephosphoryliert SHIP1 diesen Sekundärbotenstoff zu PtdIns(3,4)P₂. Damit wird die Membran an PtdIns(3,4,5)P₃, dem Produkt der PI3K, das für die PH-Domänen-vermittelte Mobilisierung vieler Proteine an die Membran von Bedeutung ist, abgereichert. Durch den Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ durch SHIP1 wird die PH-Bindungsstelle für Btk eliminiert, was ausreichend ist, um die B-Zellantwort abzuschalten (BOLLAND et al., 1998; KRAHN et al., 2004; SCHARENBERG et al., 1998). Die enzymatische Aktivität von SHIP1 ist für diese Funktion essentiell (BOLLAND et al., 1998).

Auch der Akt/PKB-Signalweg ist betroffen. Die BCR-induzierte Aktivierung von Akt wird bei BCR-Fc γ RIIB-Kreuzvernetzung in B-Zellen SHIP1-abhängig inhibiert (AMAN et al., 1998; ASTOUL et al., 1999; JACOB et al., 1999), indem SHIP1 die PtdIns(3,4,5)P₃-abhängige Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran (CARVER et al., 2000) und seine anschließende Aktivierung durch Phosphorylierung an S473 und T308 (AMAN et al., 1998) hemmt.

SHIP1 wird auch auf BCR-Clustering (mit F(ab')₂) hin tyrosinphosphoryliert (CHACKO et al., 1996; DAMEN et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996), was andeutet, dass SHIP1 auch eine Rolle nach BCR-Stimulation allein hat. Entsprechend zeigen SHIP1^{-/-}-B-Zellen nach BCR-Stimulation allein eine erhöhte Proliferation und verringerte BCR-vermittelte Apoptose (BRAUWEILER et al., 2000a).

Die inhibitorische Rolle von SHIP1 in B-Zellen ist in Abb. 2.7 dargestellt.

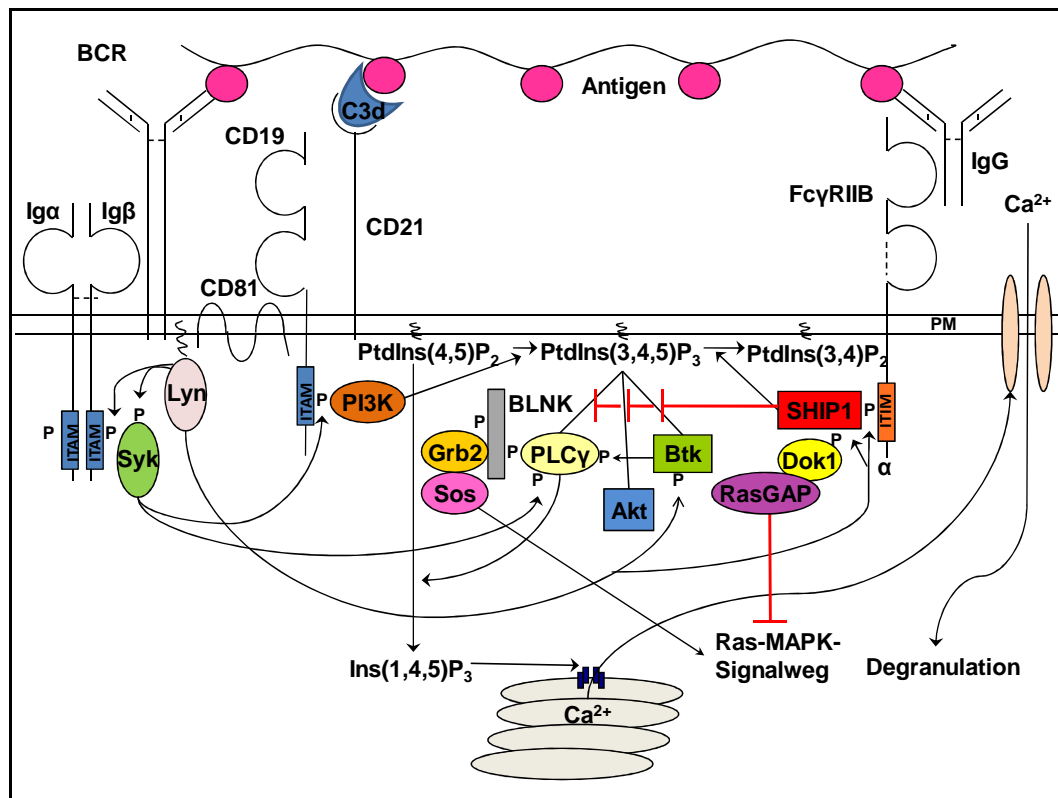


Abb. 2.7: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in B-Lymphozyten. Auf Kreuzvernetzung des BCR mit FcγRIIB durch multivalente Antigene hin tyrosinphosphoryliert die Src-Kinase Lyn β - und γ -Ketten des BCR (Ig α und Ig β). Daraufhin bindet die Tyrosinkinase Syk an den BCR und wird ebenfalls von Lyn tyrosinphosphoryliert. Syk tyrosinphosphoryliert BLNK (*B cell linker*) und schafft so Bindungsstellen für die PLC γ und Grb2. Die PI3K wird ebenfalls aktiviert durch Bindung an nach Komplementaktivierung tyrosinphosphoryliertes CD19 und stellt PtdIns(3,4,5)P₃ her. PLC γ bindet mit seiner SH2-Domäne an BLNK (*B cell linker*) und mit seiner PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P₃. Auch Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) bindet mit seiner PH-Domäne an PtdIns(3,4,5)P₃ und aktiviert die PLC γ . PLC γ spaltet PtdIns(4,5)P₂ zu Ins(1,4,5)P₃ und Diacylglycerin. Lyn phosphoryliert außerdem das ITIM des FcγRIIB, an das daraufhin SHIP1 bindet, welches PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂ abbaut und so die Bindung von Proteinen mit PH-Domänen an die Plasmamembran inhibiert, wodurch das Calciumsignal und die Akt-Aktivierung inhibiert werden. Durch die Rekrutierung von Dok1 mit RasGAP (*Ras GTPase-activating protein*) durch SHIP1 wird auch der Ras-MAPK-Signalweg inhibiert. Nach Abbas und Lichtman sowie Alvarez-Errico et al. (ABBAS and LICHTMAN, 2005; ALVAREZ-ERRICO et al., 2009).

2.10.3 T-Lymphozyten

T-Zellen exprimieren drei Klasse 1A PI3K-Isoformen (p110 α , p110 β und p110 δ), die über Protein-Tyrosin-Kinase-gekoppelte Rezeptoren reguliert werden, sowie Klasse 1B p110 γ , das über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird. Der TCR, die co-stimulatorischen

Rezeptoren der CD28-Familie und Cytokinrezeptoren aktivieren Klasse 1A PI3K-Isoformen (PARRY et al., 2007; WARD and CANTRELL, 2001). Chemokine aktivieren hauptsächlich Klasse 1B PI3K (WARD and MARELLI-BERG, 2009).

Die Ligation von CD3, Bestandteil des TCR-Komplexes, oder CD28, das an die co-stimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 bindet, auf T-Zellen resultiert in SHIP1-Phosphorylierung, und die Ligation von CD28 führt zu katalytischer Aktivierung und subzellulärer Redistribution von SHIP1 an die Plasmamembran (EDMUNDS et al., 1999). Es konnte jedoch keine direkte Bindung zwischen SHIP1 und CD28 oder der p85-Untereinheit der PI3K gefunden werden (EDMUNDS et al., 1999).

SHIP1 ist Bestandteil eines Komplexes mit LAT (*linker of activated T cells*), Dok-2 und Grb2, der sich auf T-Zell-Rezeptor-Stimulation hin bildet und an der Attenuierung des TCR-Signalwegs beteiligt ist, gemessen an der IL-2-Produktion (DONG et al., 2006). Dok2 bindet mit seiner PTB-Domäne an SHIP1 (TAMIR et al., 2000), Grb2 mit seinen SH3-Domänen. SHIP1 bindet nicht direkt an LAT, zumindest nicht mit seiner SH2-Domäne (DONG et al., 2006).

Während Makrophagen, Mastzellen, B-Zellen, dendritische Zellen und NK-Zellen von SHIP1^{-/-}-Mäusen funktionelle Defizienzen zeigten (BRAUWEILER et al., 2001; HUBER et al., 1998a; NAKAMURA et al., 2002; NEILL et al., 2007; WAHLE et al., 2007), wurde die Auswirkung der SHIP1-Deletion auf T-Lymphozyten anfangs für eher mild gehalten (HELGASON et al., 1998). Eine nähere Analyse der SHIP1-k.o.-Mäuse zeigte, dass sie auf Kosten von inflammatorischen T_H17-Zellen eine erhöhte Anzahl von CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen erzeugen, die ihre immunsuppressive Kapazität beibehalten (KASHIWADA et al., 2006; LOCKE et al., 2009).

T_H17-Zellen sind eine Untergruppe der CD4⁺-Effektor-T-Zellen. Sie regen lokale Epithel- und Stromazellen an, Chemokine zu produzieren, die in einer frühen Phase der adaptiven Immunantwort neutrophile Zellen an Infektionsherde locken (MURPHY et al., 2009).

Regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) vermitteln aktiv Selbst-Toleranz und kontrollieren somit Autoimmunität (SAKAGUCHI et al., 1985; SAOUDI et al., 1996). Sie limitieren außerdem anti-Tumor-T-Zellantworten und zerstörerische T-Zellantworten, die *Graft-versus-Host-Disease* (GVHD) (EDINGER et al., 2003; HOFFMANN et al., 2002) und Organabstoßung (*solid organ allograft rejection*) (KINGSLEY et al., 2002) auslösen. Allogene Immunantworten sind in SHIP1-defizienten Empfängern beeinträchtigt, sie zeigen signifikant reduzierte akute Abstoßung von MHC-*mismatched* Knochenmark und GVHD (PARAISO et al., 2007; WANG et

al., 2002). SHIP1 ist also erforderlich für robuste *Graft-versus-Host*- und *Host-versus-Graft*-Antworten durch CD4⁺-Zellen und limitiert ihre immunregulatorische Kapazität allein durch Erniedrigung der T_{Reg}-Zahl, denn WT-T_{Reg} CD3⁺CD4⁺CD25⁺ haben die gleiche Funktionsfähigkeit wie SHIP1^{-/-}-T_{Reg} CD3⁺CD4⁺CD25⁺ (COLLAZO et al., 2009).

SHIP1 ist ein direktes Ziel der microRNA miR-155 (O'CONNELL et al., 2009), siehe auch 2.11.3.2. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der spezifisch in T_{Reg}-Zellen exprimiert wird. Foxp3 bindet an ein Intron innerhalb der DNA-Sequenz, die die miR-155-Vorläufer-mRNA codiert, was ihre Expression verstärkt. So könnte Foxp3 die T_{Reg}-Population aufrechterhalten, indem es die SHIP1-Expression zumindest teilweise unterdrückt (MARSON et al., 2007; ZHENG et al., 2007).

Mäuse mit auf T-Zellen beschränkter, konditionaler SHIP1-Deletion zeigen eine Verschiebung der CD4⁺-Helfer-T-Zellen zum T_H1-Typ. So weisen T-Zellen aus diesem Modell geringere Expressionslevel der T_H2-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 auf und zeigen eine verminderte typische T_H2-vermittelte Immunreaktion (TARASENKO et al., 2007). Eine normale SHIP1-Expression scheint demnach einer Verschiebung zu T_H1 entgegenzuwirken und T_H2-Zell-Entwicklung zu erlauben.

Der Defekt der T_H2-Bildung ist vermutlich Konsequenz einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cytokinen, die die Induktion des T_H1-assoziierten Transkriptionsfaktors T-bet vermitteln (TARASENKO et al., 2007).

T_H1- und T_H2-Zellen sind CD4-positiv. Beide dienen der Anregung von B-Zellen, Antikörper zu produzieren. T_H1-Zellen haben noch eine zweite Funktion, nämlich bestimmte intrazelluläre bakterielle Infektionen, die durch Mykobakterien wie *M. tuberculosis* oder *M. leprae* verursacht werden, unter Kontrolle zu bringen. Diese Bakterien können in Phagosomen von ruhenden Makrophagen überleben und sich vermehren, indem sie die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen verhindern. T_H1-Zellen induzieren die Fusion der Bakterienenthaltenden Phagosomen mit den Lysosomen in den Makrophagen. IL-12, IFN- γ , Aktivierung von STAT1 und STAT4 und Expression des Transkriptionsfaktors T-bet sind für die Entwicklung von T_H1-Zellen essentiell, IL-4, Aktivierung von STAT6 und die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 für die von T_H2-Zellen. T_H1-Zellen produzieren spezifisch IFN- γ und IL-2, T_H2-Zellen IL-4 und IL-5 (MURPHY et al., 2009).

Die PI3K soll eine Rolle in der Zellmotilität und der gerichteten Migration zu Chemoattraktants besitzen. Das bringt eine polarisierte Akkumulation von PI3K an der Plasmamembran an der *leading edge* migrierender Zellen mit sich und eine lokale Produktion

von PtdIns(3,4,5)P₃ (WARD, 2004). Chemokine binden auf T-Zellen vornehmlich an GPCRs, die vornehmlich an die $\beta\gamma$ -abhängige PI3K γ -Isoform gekoppelt sind (SMITH et al., 2007). Obwohl PI3K durch die meisten von T-Zellen exprimierten Chemokine aktiviert wird, scheint die Aktivierung der PI3K durch Chemokine ein entbehrliches Signal für die gerichtete Migration der T-Zellen zu sein (WARD, 2004, 2006; WARD and MARELLI-BERG, 2009). Experimente mit SHIP1-shRNA an frisch isolierten humanen peripheren T-Lymphozyten zeigten, dass SHIP1-Silencing die basale Motilität und Geschwindigkeit (*velocity*) beeinträchtigt, nicht jedoch die Fähigkeit, die Richtung eines Chemoattraktants wahrzunehmen (PARRY et al., 2010).

Eine Reexpression von SHIP1 in Jurkat T-Zellen reguliert PtdIns(3,4,5)P₃-Level herunter und damit die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt (HORN et al., 2004), siehe Abb. 2.8. Sie führt außerdem zur Herunterregulation der Proliferation durch Verlängerung des Verbleibens in der G₁-Phase des Zellzyklus durch Regulation der G₁-Zellzyklusregulatoren Rb (reduzierte Phosphorylierung) und p27^{Kip1} (erhöhte Expression) (HORN et al., 2004) sowie Hochregulation von KLF2 (*krüppel-like factor 2*), einem Faktor, der eine Rolle in der T-Zell-*quiescence* spielt (GARCIA-PALMA et al., 2005).

SHIP1 hat eine protektive Rolle in T-Lymphozyten, die oxidativem Stress ausgesetzt werden (GLOIRE et al., 2006). Nach H₂O₂-Exposition aktivieren parentale, SHIP1-defiziente Jurkat T-Zellen NF- κ B (*nuclear factor of κ B*) durch Phosphorylierung des Inhibitors I κ B α (*inhibitor of nuclear factor of κ B α*) an Y42, was seine Calpain-vermittelte Degradation fördert und dem entlassenen NF- κ B erlaubt, in den Zellkern zu wandern (SCHOONBROODT et al., 2000; TAKADA et al., 2003). Im Gegensatz dazu aktivieren SHIP1-exprimierende Jurkat T-Zellen NF- κ B durch IKK-Aktivierung und Phosphorylierung des Inhibitors I κ B α an S32 und S36 auf H₂O₂-Exposition hin. Zelllinien, die SHIP1 natürlicherweise exprimieren, folgen demselben Signalweg (GLOIRE et al., 2006).

SHIP1-Expression in Jurkat T-Zellen führt außerdem zu erhöhter Resistenz gegenüber H₂O₂- und FasL-induzierter Apoptose (CHARLIER et al.; GLOIRE et al., 2006).

SHIP1 bindet, zumindest *in vitro*, an das ITAM in der ζ -Kette des TCR-Komplexes (OSBORNE et al., 1996).

Fc γ RIIB-Aggregation mit dem TCR im murinen T-Zell-Hybridom 2B4 führt zur Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 und zur Inhibition des Calciumsignals, womit ihm möglicherweise in T-Zellen eine ähnliche inhibitorische Rolle zukommt wie in B-Zellen (JENSEN et al., 2001). Die Rolle des Fc γ RIIB in T-Zellen ist jedoch unklar.

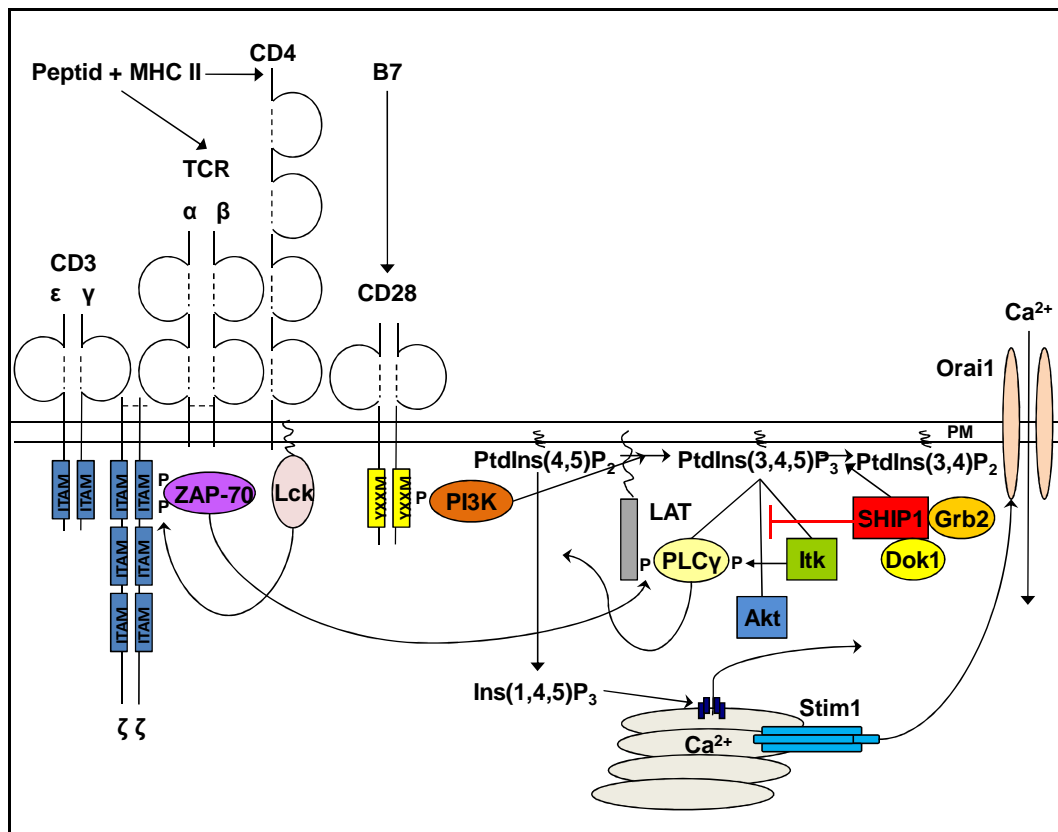


Abb. 2.8: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in T-Lymphozyten. CD4⁺-Zellen werden durch Bindung an ein Peptid-bindendes MHC II (*major histocompatibility complex II*) und gleichzeitige Costimulation, hier durch die Bindung von B7 an CD28, aktiviert. Die CD4-assoziierte Tyrosinkinase Lck phosphoryliert die ζ-Ketten, woraufhin ZAP-70 (*ζ chain-associated protein of 70 kD*), eine Tyrosinkinase, mit ihren beiden SH2-Domänen daran bindet und wiederum LAT (*linker of activated T cells*) phosphoryliert. Ligation von CD28 führt zur Aktivierung der PI3K und PtdIns(3,4,5)P₃-Produktion. Dadurch werden PLCγ1, Akt und die Tyrosinkinase Itk (*IL-2-inducible T cell kinase*) über ihre PH (*Pleckstrin homology*)-Domänen an die Plasmamembran rekrutiert. Itk phosphoryliert PLCγ1, die somit aktiviert wird, PtdIns(4,5)P₂ zu Ins(1,4,5)P₃ und Diacylglycerin zu spalten. Ins(1,4,5)P₃ bindet an den IP₃-Rezeptor in der ER-Membran, sodass es zum Ca²⁺-Ausstrom aus den Speichern ins Cytosol kommt. Die Erniedrigung der Ca²⁺-Konzentration in den internen Speichern führt zu Oligomerisierung von Stim1 (*Stromal interaction molecule 1*), welches daraufhin den CRAC (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel*) Orai1 aktiviert, sodass Ca²⁺ von extrazellulär einströmt (SOCE: *store-operated Ca²⁺-entry*). SHIP1-Expression führt zu einer Reduktion der pAkt-Level in Jurkat T-Zellen. Wie SHIP1 in T-Zellen an die Plasmamembran rekrutiert wird, ist unklar, ebenso, welche Rolle es in der Ca²⁺-Signaltransduktion spielt. Es sind nur zwei der vier im TCR-Komplex enthaltenen CD3-Ketten dargestellt (es gibt drei CD3-Ketten γ, δ, ε, die unterschiedlich kombiniert werden können).

2.10.3.1 Calcium-Signaltransduktion in T-Lymphozyten

In ruhenden Zellen wird die Konzentration freien intrazellulären Calciums ($[Ca^{2+}]_i$) bei 100-200 nM gehalten. Engagement von Lymphozytenantigenrezeptoren resultiert in einem schnellen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. In Lymphozyten und Mastzellen ist der Hauptmechanismus, $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen, *store-operated Ca²⁺-entry* (SOCE) durch *Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels* (CRAC) (LEWIS, 2001).

Engagement des TCR-Komplexes führt zur Tyrosinphosphorylierung der ITAMs der ζ -Kette des TCR durch Tyrosinkinassen der Src-Familie (z.B. Lyn, Fyn, Lck), Rekrutierung der Tyrosinkinase ZAP-70 (*ζ chain-associated protein of 70 kD*), die wiederum den Adapter LAT (*linker of activated T cells*) phosphoryliert, an den daraufhin die Phospholipase $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) (über SLP76, an das PLC mit ihrer SH3-Domäne bindet (YABLONSKI et al., 2001)) bindet. Außerdem führt Engagement des TCR-Komplexes zur Aktivierung der PI3K. Die PI3K phosphoryliert PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃, an das daraufhin, mit ihren PH-Domänen, PLC $\gamma 1$ und die Tyrosinkinassen der Tec-Familie Tec und Itk (*IL-2-inducible T cell kinase*) binden, woraufhin Itk die PLC $\gamma 1$ durch Phosphorylierung aktiviert. Die PLC $\gamma 1$ spaltet PtdIns(4,5)P₂ zu Ins(1,4,5)P₃ und DAG. Außerdem führt TCR-Stimulation zu einem dreifachen Anstieg der intrazellulären Konzentration von zyklischer ADP-Ribose (cADPR). Die einzigen bekannten cADPR-synthetisierenden Enzyme in Säugern sind CD38 und CD157 (SCHUBER and LUND, 2004). Ins(1,4,5)P₃ und cADPR binden an den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor bzw. Ryanodin-Rezeptor 3 in der ER-Membran und führen so zu einem Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER ins Cytosol. Stim1 (*Stromal interaction molecule 1*) ist ein ER-Membran-durchspannender ER-Ca²⁺-Sensor (LIOU et al., 2005; ROOS et al., 2005; ZHANG et al., 2005) und liegt im ruhenden Zustand der Zelle in monomerer Form, auf der ER-Lumenseite Ca²⁺-bindend, vor. Bei Ca²⁺-Entleerung des ER oligomerisiert Stim1 (STATHOPOULOS et al., 2008) und akkumuliert in Regionen des ER, die 10-25 nm unterhalb der Plasmamembran liegen und puncta genannt werden (LIOU et al., 2005). Säuger exprimieren drei Orai-Proteine, Orai1-3, die 4 Transmembrandomänen besitzen und deren N und C-Termini beide auf der Cytoplasmaseite liegen (FESKE et al., 2006; GWACK et al., 2007; VIG et al., 2006). Orai1 colokalisiert mit den puncta, die mit dem Ca²⁺-Einstrom koinzidieren (LUIK et al., 2006; XU et al., 2006). Humanes Orai1 stellt die Poren-bildende Untereinheit des CRAC dar. Der CRAC öffnet sich also und es kommt zum Stim1-Orai1-vermittelten SOCE, der Ca²⁺-Eintritt wird durch einen großen elektrochemischen Gradienten entlang der Plasmamembran

vorangetrieben. Die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration beträgt ca. 1 mM. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt von ca. 100 nM auf 1 μM im aktivierten Zustand der Zelle an.

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wird in hämatopoetischen Zellen durch die ITPKB, eine $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Kinase, zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ metabolisiert (IRVINE et al., 2006; NALASKOWSKI and MAYR, 2004; PATNI and BANTING, 2004; SCHELL, 2010; XIA and YANG, 2005). $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ kann an die Itk-PH-Domäne binden und erhöht so deren Affinität für $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ (HUANG et al., 2007), möglicherweise allosterisch in Itk-Oligomeren (HUANG et al., 2007; PRINCE et al., 2009; QI et al., 2006; READINGER et al., 2009; SAUER and COOKE, 2010).

$\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ kann zu höheren Inositolphosphaten umgesetzt werden oder zu IP_3 abgebaut. Es ist unbekannt, welche Phosphatasen in Leukozyten dies spezifisch tun (SAUER and COOKE, 2010) SHIP1 und SHIP2 können $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ an Position 5, PTEN an Position 3 dephosphorylieren zu $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ bzw. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (CAFFREY et al., 2001; ERNEUX et al., 1998; MAEHAMA and DIXON, 1998; PESESSE et al., 1998).

Die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -vermittelte Ca^{2+} -Signaltransduktion in T-Lymphozyten ist in Abb. 2.8 dargestellt.

2.10.4 Basophile Granulozyten

Auch basophile Granulozyten kommen im Bereich von Entzündungsreaktionen vor. Sie reagieren auf sehr ähnliche Wachstumsfaktoren wie die eosinophilen Granulozyten, darunter IL-3, IL-5 und GM-CSF. Es gibt Hinweise auf eine wechselseitige Kontrolle bei der Reifung der Stammzellpopulation zu Basophilen oder Eosinophilen. TGF- β in Anwesenheit von IL-3 beispielsweise unterdrückt die Differenzierung von Eosinophilen und fördert die Differenzierung von Basophilen. Im Blut sind normalerweise nur wenige ($4 \times 10^7/\text{L}$ (ALBERTS et al., 2008)) Basophile vorhanden. Sie besitzen bei der Immunabwehr ähnliche Funktionen wie die Eosinophilen. An ihrer Oberfläche exprimieren sie $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ und setzen nach ihrer Aktivierung durch Cytokine oder Antigene Histamin aus ihren basophilen Granula frei, nach denen sie benannt sind. Außerdem produzieren sie IL-4 und IL-13 (MURPHY et al., 2009).

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen Basophilen-Reaktivität, Sensitivität gegenüber polyklonalem IgE-Antikörper und Serum-IgE-Level bei Patienten mit

Bronchialasthma, nicht aber mit allergischer Rhinitis (CASOLARO et al., 1990; MARONE et al., 1989; MARONE et al., 1994).

Inhibition der PI3K mit Wortmannin oder LY294002 inhibiert die IgE-Aggregationsvermittelte Sekretion komplett (Histamin, LTC₄ und IL-4) (MIURA and MACGLASHAN, 2000a, b). Dies zeigt, dass die PI3K eine zentrale Rolle für die Funktion der Basophilen spielt. SHIP1 könnte hier auf dieselbe Weise wie in Mastzellen wirken.

Indem SHIP1 die IL-4-Produktion von Basophilen inhibiert, unterdrückt es die Bildung von M2-Makrophagen (KURODA et al., 2009), siehe auch 2.10.5.

2.10.5 Monozyten und Makrophagen

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten. Sie befinden sich im Bindegewebe, in der Submucosa des Verdauungstraktes, in der Lunge, in der Milz, als Kupffer-Zellen in der Leber und als Mikrogliazellen im Nervengewebe. Sobald sie ein Pathogen erkannt haben, z.B. Lipopolysaccharide in der Membran gramnegativer Bakterien, produzieren sie die Cytokine IL-1 β , TNF- α und IL-6 sowie das Chemokin CXCL8 = IL-8. CXCL8 bewirkt die Chemotaxe von zuerst Neutrophilen, dann Monozyten zum Infektionsherd. Die Cytokine bewirken eine Veränderung in der Selektinexpression der Gefäßendothelien, eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit des Blutes durch Erweiterung der Blutgefäße, sodass die angelockten Phagozyten und andere Leukozyten ins Gewebe einwandern können. Mithilfe von MMPs (Matrix-Metalloproteasen) durchstoßen sie die Basalmembran (Diapedese) (MURPHY et al., 2009).

SHIP1^{-/-}-Mäuse zeigen keine Endotoxin-Toleranz. Die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Endotoxin-Toleranz ist abhängig von SHIP1, dessen Expression vom autokrin wirkenden TGF- β in Makrophagen und Mastzellen auf das 10fache des Ausgangslevels hochreguliert wird (SLY et al., 2004). LPS ist ein Hauptglykolipid in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, das Entzündungsreaktionen auslöst, indem es das Immunsystem stimuliert, pro-inflammatorische Moleküle, wie Cytokine und NO, zu produzieren (BEUTLER and RIETSCHEL, 2003). Dies geschieht durch Bindung an TLR-4 (*toll-like receptor 4*), der wiederum mit MD-2 und CD14 in einem Komplex vorliegt. Überproduktion dieser pro-inflammatorischen Moleküle führt zu einem septischen Schock (WEST and HEAGY, 2002). Wenn jedoch Tiere oder isolierte Makrophagen einer ersten, niedrigen Dosis LPS ausgesetzt werden, induziert

dies einen zwei bis drei Wochen anhaltenden, refraktären/unempfindlichen Status gegenüber einer zweiten, hohen Dosis LPS, sodass viel weniger pro-inflammatorische Cytokine und NO produziert werden. Dieses Phänomen nennt man Endotoxin-Toleranz (WEST and HEAGY, 2002).

Makrophagen können unterteilt werden in klassisch aktivierte M1 „Killer“- und alternativ aktivierte M2 „Heiler“-Makrophagen (MILLS, 2001). M1-Makrophagen sind durch hohe iNOS (*inducible nitric oxide synthase*)-Level und die Produktion großer Mengen NO charakterisiert. M2-Makrophagen dagegen, die durch hohe Arginase-Level, welche mit iNOS um L-Arginin konkurriert, charakterisiert sind (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2002), spielen eine Rolle im „Aufräumen“, nachdem ein infektiöses Agens zerstört ist, indem sie zellulären Debris phagozytieren und die Wirtszellproliferation und Kollagensynthese stimulieren.

In SHIP1^{-/-}-Mäusen zeigen peritoneale und alveoläre Makrophagen eine 10fach niedrigere NO-Produktion als WT-Makrophagen, weil sie sehr hohe Arginase I-Level aufweisen und dieses Enzym mit iNOS um L-Arginin konkurriert. SHIP1 unterdrückt also normalerweise eine Entwicklung in Richtung M2 (Heiler)-Makrophagen, die hohe Arginase-Level aufweisen, zugunsten von M1 (*Killer*)-Makrophagen, die hohe Level an iNOS haben (RAUH et al., 2005; RAUH et al., 2004). SHIP1 unterdrückt diese Verschiebung in Richtung M2 jedoch nicht direkt in den Makrophagen selbst, sondern indem es die IL-3- und GM-CSF-induzierte IL-4-Produktion in Basophilen inhibiert (KURODA et al., 2009).

SHIP1-Defizienz scheint also durch Reduktion der NO-Produktion vor septischem Schock zu schützen, während SHIP1 für eine normale Antwort auf LPS sorgt.

SHIP1 scheint die Phagozytose in Monozyten/Makrophagen zu limitieren (COX et al., 2001).

Im Fall von Krebs werden infiltrierende Monozyten oft von Tumorzellen gekapert, um zu M2-ähnlichen Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) zu werden, die das Tumorwachstum und das Umgehen des Immunsystems verstärken. In dieser Hinsicht könnte die Manipulation von Makrophagen in Richtung eines M1-Phänotyps eine neue Form der Krebstherapie darstellen (ALLAVENA et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; SICA et al., 2008). In der Tat konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum in SHIP1^{-/-}-Mäusen signifikant schneller ist als in SHIP1^{+/+}-Mäusen, und dass die Tumor-infiltrierenden Makrophagen einen M2-Phänotyp zeigten (RAUH et al., 2005).

M-CSF (*monocyte colony-stimulating factor*) ist ein Cytokin, das die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Monozyten bewirkt. Auf Bindung an seinen Rezeptor Fms hin wird SHIP1

durch Lyn phosphoryliert. Die Phosphorylierung von SHIP1 bewirkt die Freisetzung des in unstimulierten Zellen konstitutiv an den nicht-phosphorylierten Carboxyl-Terminus von SHIP1 gebundenen PIAS1, das mit STAT1 interagiert, welches wiederum die Transkription reguliert (RAUH et al., 2004; ROHRSCHEIDER et al., 2000).

2.10.6. Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen (Durchmesser von 50 bis 100 μm), die sich aus der Monocyten/Makrophagen-Abstammungslinie auf Stimulation mit RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B-ligand*) hin differenzieren. Ihre Aufgabe ist die Resorption der Knochensubstanz durch proteolytischen Abbau der kollagenen Knochenmatrix und Phagozytose der freigesetzten Kollagenfragmente. Eine Überfunktion der Osteoklasten kann zu Osteoporose, eine Unterfunktion zu Osteopetrose führen. In SHIP1^{-/-}-Mäusen ist die Anzahl der Osteoklasten verdoppelt, die Zellen sind vergrößert und zeigen eine erhöhte Resorptionsaktivität (TAKESHITA et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass SHIP1 in Podosomen von Osteoklasten lokalisiert ist und die Knochenresorption abschwächt, wofür die SH2-Domäne erforderlich ist. SHIP1 zeigt eine Wechselwirkung mit den ebenfalls in Podosomen lokalisierten Proteinen c-Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*) und Cas (*Crk-associated substrate*) (YOGO et al., 2006).

2.11 Regulation von SHIP1

2.11.1 Enzymatische Aktivität

Es gibt unterschiedliche Publikationen darüber, wie die enzymatische Aktivität von SHIP1 reguliert wird. Es wird berichtet, dass die Phosphorylierung von SHIP1 durch die Protein-Tyrosin-Kinase Lck in einer zwei- bis dreifachen Reduktion der Enzymaktivität resultiert (OSBORNE et al., 1996), Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 als Antwort auf CD28-Stimulation zu gesteigerter SHIP1-Aktivität führt (EDMUNDS et al., 1999) oder weder die spezifische Aktivität von SHIP1 als Inositolphosphat-5-Phosphatase noch die subzelluläre Lokalisation von SHIP1 durch Tyrosinphosphorylierung verändert werden (DUNANT et al.,

2000; PHEE et al., 2000), SHIP1 also konstitutiv aktiv oder verfügbar ist (FREEBURN et al., 2002). SHIP1-Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige PKA (eine Serin-/Threoninkinase) erhöht die SHIP1-Aktivität 2-3fach (ZHANG et al., 2009a). Der für diese Aktivierung kritische phosphorylierte Rest ist S440 in murinem SHIP1 (entspricht S437 in humanem SHIP1 delV117) (ZHANG et al., 2010).

In anti-SHIP1-Immunpräzipitationen von M-CSF- oder IL-3-stimulierten FDC-P1/Fms (IL-3-abhängige M-CSF-Rezeptor-exprimierende murine myeloische Vorläuferzelllinie) bzw. B6SUtA1 (IL-3-abhängige multipotente murine hämatopoetische Vorläufer-Zelllinie) wurde kein signifikanter Aktivitätsunterschied im Vergleich zu anti-SHIP1-Immunpräzipitationen aus unstimulierten Zellen festgestellt (DAMEN et al., 1996; LIOUBIN et al., 1996). Die Bindung von SHIP1 an Shc hat keinen Einfluss auf die SHIP1-Aktivität (AMAN et al., 2000). Die Aktivität von SHIP1 wird zum großen Teil über seine Proteinlevel reguliert (SLY et al., 2009; SLY et al., 2004). Entscheidend für den PtdIns(3,4,5)P₃-Abbau ist die Membranlokalisation von SHIP1 (PHEE et al., 2000).

SHIP1 wird durch sein Produkt PtdIns(3,4)P₂ allosterisch aktiviert (ONG et al., 2007). In der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker wurde gezeigt, dass SHIP1 durch sein Produkt Ins(1,3,4)P₃ inhibiert wird.

2.11.2 Lokalisation

Es wird angenommen, dass SHIP1 seine inhibitorischen Effekte durch Translokation zu seinem Substrat PtdIns(3,4,5)P₃ (und evtl. zu Ins(1,3,4,5)P₄) ausübt. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass SHIP1 als Antwort auf Stimulation an die Plasmamembran transloziert (COX et al., 2001; EDMUNDS et al., 1999; PHEE et al., 2001). Je nach Zelltyp und Stimulus, könnte SHIP1 über verschiedene Mechanismen an die Plasmamembran gelangen (BONE and WELHAM, 2000; GALANDRINI et al., 2002; GALANDRINI et al., 2001; MARCHETTO et al., 1999; TRIDANDAPANI et al., 1999; TRIDANDAPANI et al., 2002; VELAZQUEZ et al., 2000). Es kann in B-Zellen mit seiner SH2-Domäne an tyrosinphosphorylierten FcγRIIB (CD32) binden (COGGESHALL, 1998; ONO et al., 1996), in Mastzellen außer an FcγRIIB auch an MAFA (KUROIWA et al., 1998; XU et al., 2001) oder FcεRI binden, oder an Shc und über dessen PTB-Domäne an den IL-3-Rezeptor (BONE and WELHAM, 2000; VELAZQUEZ et al., 2000). In NK-Zellen könnte es von der PTB-Domäne von Shc gebunden werden, welches

wiederum mit seiner SH2-Domäne an Fc γ RIIIA (CD16) bindet (BONE and WELHAM, 2000; GALANDRINI et al., 2002; GALANDRINI et al., 2001; MARCHETTO et al., 1999; TRIDANDAPANI et al., 1999; TRIDANDAPANI et al., 2002; VELAZQUEZ et al., 2000).

Für die Fc γ RIIB-vermittelte inhibitorische Signaltransduktion in B-Zellen sowie für die PtdIns(3,4,5)P₃-Hydrolyse und Hemmung der Degranulation in Mastzellen ist der prolinreiche C-Terminus von SHIP1 erforderlich (AMAN et al., 2000; DAMEN et al., 2001), und damit möglicherweise eine Interaktion mit Grb2.

SHIP1 soll außerdem ans Cytoskelett binden; Thrombin-Stimulation von menschlichen Thrombozyten führt zu Tyrosinphosphorylierung und Translokation von SHIP1 ans Actin-Cytoskelett (GIURIATO et al., 1997), ebenso Clustering von CR3 (*complement receptor 3*) auf murinen Makrophagen (COX et al., 2001).

2.11.3 Proteinmenge

Die SHIP1-vermittelten Effekte hängen mit seinem Expressionlevel zusammen (SLY et al., 2009; SLY et al., 2004). Dieses kann unterschiedlich reguliert werden. Eine hohe Expression eines Transkriptionsfaktors aus der Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren, Fli-1, unterdrückt die *INPP5D*-Transkription. Fli-1 wird durch Insertionsmutagenese in *Friend Murine Leukemia Virus* (F-MuLV)-induzierter Erythroleukämie aktiviert (BEN-DAVID et al., 1990). Entsprechend wird SHIP1 nicht exprimiert in F-MuLV-induzierten erythroleukämischen Zelllinien, die Fli-1 überexprimieren. Fli-1 bindet an eine Ets-Bindungsstelle im *INPP5D*-Promotor (LAKHANPAL et al., 2010).

Die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Endotoxin-Toleranz ist abhängig von SHIP1. Seine Expression wird vom autokrin wirkenden TGF- β in Makrophagen und Mastzellen auf das 10fache des Ausgangslevels hochreguliert (SLY et al., 2004).

Activin und TGF- β induzieren Smad-abhängig die SHIP1-Expression (VALDERRAMA-CARVAJAL et al., 2002).

Außerdem wird SHIP1 während der IL-4-induzierten Verschiebung von M1-Killer-Makrophagen zu M2-Heiler-Makrophagen herunterreguliert (RUSCHMANN et al., 2010).

Auch das die chronische myeloische Leukämie (CML) verursachende Fusionsprotein BCR-Abl, siehe 2.11.3.1 und 2.13.1, und die microRNA-155, siehe 2.11.3.2, regulieren die SHIP1-Menge herunter.

2.11.3.1 Proteasomaler Abbau

SHIP1 ist ein langlebiges Protein mit einer Halblebenszeit von >18 Std. (DAMEN et al., 1998; SATTLER et al., 1999). In BCR-Abl-exprimierenden Zellen beträgt seine Halblebenszeit jedoch <3 Std., was vermuten lässt, dass BCR-Abl die SHIP1-Degradation induziert, eher als nur die SHIP1-Transkription oder –Translation abzuschalten. Möglicherweise wird SHIP1 in BCR-Abl-exprimierenden Zellen durch Tyrosinphosphorylierung für den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau markiert: SHIP1 ist in BCR-Abl exprimierenden Ba/F3-Zellen viel stärker tyrosinphosphoryliert als ohne BCR-Abl und damit einhergehend auch stärker polyubiquitiniert (RUSCHMANN et al., 2010). Ein üblicher Weg, ein Degradationssignal in einem Protein zu erzeugen, ist die Phosphorylierung an einer spezifischen Position, wodurch ein normalerweise verborgenes Degradationssignal demaskiert wird (ALBERTS et al., 2008).

Ein Inhibitor von Src-Kinasen, die für die Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 verantwortlich gemacht werden (BARAN et al., 2003; GARDAI et al., 2002; HARDER et al., 2004; HERNANDEZ-HANSEN et al., 2004; HIBBS et al., 2002; MALBEC et al., 2002; XIAO et al., 2005), PP2A, inhibiert sowohl die Tyrosinphosphorylierung als auch die Polyubiquitinierung von SHIP1. SHIP1 ist physisch mit BCR assoziiert. Src, Lyn, Hck oder Fyn konnten in den SHIP1-Immunpräzipitationen jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ubiquitinligasen (E3) c-Cbl und Cbl-b konnten in SHIP1-Immunpräzipitationen nachgewiesen werden (RUSCHMANN et al., 2010).

2.11.3.2 microRNA

MicroRNAs (miRNA, miR) sind kurze (20-23 Nukleotide), endogene, einzelsträngige RNA-Moleküle, die die Genexpression regulieren (BARTEL, 2004). RNA-Polymerasen II oder III stellen das primäre miRNA-Transkript (pri-miRNA) her (BORCHERT et al., 2006; CAI et al., 2004; LEE et al., 2004). Eine durchschnittliche humane pri-miRNA besteht aus einem Haarnadel-Stamm von 33 bp, einem terminalen Loop und zwei einzelsträngigen flankierenden Regionen *upstream* und *downstream* des Stamms (HAN et al., 2006; ZENG and CULLEN, 2003,

2005). Die pri-miRNA wird durch den nukleären Mikroprozessorkomplex Drosha/DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) im Kern gespalten (LEE et al., 2003), und zwar 11 bp entfernt vom Übergang einzelsträngige RNA : doppelsträngiger Haarnadel-Stamm im Haarnadel-Stamm (ZENG et al., 2005). Das Drosha-vermittelte Schneiden erfolgt co-transkriptionell (KIM and KIM, 2007; MORLANDO et al., 2008). Die daraus resultierende Vorläufer-Haarnadelstruktur, die pre-miRNA, wird durch Exportin-5-Ran-GTP aus dem Kern exportiert (YI et al., 2003). Im Cytoplasma bilden die RNase Dicer, TRBP (*Tar RNA binding protein*), PACT (*protein activator of PKR*) und Ago2 (Argonaute-2) den RLC (*RISC loading complex*), der die exportierte pre-miRNA aufnimmt (GREGORY et al., 2005; HAASE et al., 2005; LEE et al., 2006; MACRAE et al., 2008). Dicer schneidet den Loop der pre-miRNA ab, so dass ein 22 Nukleotide langer miRNA-Duplex mit je 2 Nukleotiden Überhang an jedem 3'-Ende entsteht.

Der miRNA-Duplex wird durch eine Helicase entwunden und der *Guide*-Strang, der zum *Target* komplementär ist, vom *Passenger*-Strang, der abgebaut wird, abgetrennt. Die Auswahl hängt dabei von der thermodynamischen Stabilität der Basenpaare an den beiden Enden der Duplex ab: der miRNA-Strang mit dem weniger stabilen Basenpaar an seinem 5'-Ende in der Duplex wird in den RISC geladen (KHOVOROVA et al., 2003). Ago2 (hat Slicer-Aktivität) ist Effektor von RISC, es kommt zu Ziel-mRNA-Abbau, translationaler Repression oder mRNA-Deadenylierung (EULALIO et al., 2008; FILIPOWICZ et al., 2008; HUTVAGNER and ZAMORE, 2002; LIU et al., 2004; MEISTER et al., 2004; PILLAI et al., 2004).

miRNAs können die Proteinexpression reprimieren, indem sie direkt an die 3'-UTRs spezifischer Gene binden und deren Translation verhindern (SHEEDY and O'NEILL, 2008).

Die SHIP1-Expression wird von miRNA-155 herunterreguliert. miRNA-155 bindet direkt in der 3'-UTR der SHIP1-mRNA an eine 8 Nukleotide umfassende Zielsequenz (O'CONNELL et al., 2009).

miRNA-155 wird in einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert, einschließlich B-Zellen (EIS et al., 2005; FULCI et al., 2007; KLUIVER et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2007; TAM et al., 1997; THAI et al., 2007; VAN DEN BERG et al., 2003), T-Zellen (HAASCH et al., 2002), Makrophagen (O'CONNELL et al., 2007; TAGANOV et al., 2006), dendritischen Zellen (RODRIGUEZ et al., 2007) und Vorläufer-/Stammzellpopulationen (GEORGANTAS et al., 2007; O'CONNELL et al., 2008). In den meisten dieser Zelltypen werden niedrige Level an miR-155 gefunden. miR-155-Level werden schnell erhöht auf Stimuli wie Antigen, TLR-Liganden und inflammatorische Cytokine (HAASCH et al., 2002; O'CONNELL et al., 2007; RODRIGUEZ et al.,

2007; TAGANOV et al., 2006; THAI et al., 2007). In T-Zellen fördert miR-155 eine Verschiebung zur T_H1-Subpopulation (RODRIGUEZ et al., 2007; THAI et al., 2007). Die erhöhte Expression von miR-155 tritt konstitutiv in einer Subpopulation von Krebszellen lymphoiden (EIS et al., 2005; FULCI et al., 2007; KLUIVER et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2007; TAM et al., 1997; THAI et al., 2007; VAN DEN BERG et al., 2003) und myeloiden (GARZON et al., 2008; O'CONNELL et al., 2008) Ursprungs auf.

Expression von miR-155 im hämatopoetischen Kompartiment durch Knochenmarkstransfer von HSCs, die mit einem retroviralen, miR-155-codierenden Vektor transduziert wurden, verursachte eine myeloproliferative Erkrankung, die durch erhöhte Granulozyten-/Makrophagen-Populationen im Knochenmark, peripheren Blut und in der Milz, durch beeinträchtigte Erythropoese und schwere Splenomegalie wegen extramedullärer Hämatopoese charakterisiert war (O'CONNELL et al., 2008).

SHIP1^{-/-}-Mäuse ähneln in ihrem Phänotyp sehr miR-155-exprimierenden Mäusen (HARDER et al., 2004; HELGASON et al., 2003; HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999; O'CONNELL et al., 2008). siRNA-vermittelter SHIP1-*knockdown* durch retrovirale Transduktion von HSC-angereicherten Knochenmarkszellen und Transplantation in Mäuse führt zu einem myeloproliferativen Phänotyp wie er in SHIP1-k.o.- und miR-155-exprimierenden Mäusen beobachtet wurde (O'CONNELL et al., 2009).

Erhöhte miR-155-Level und entsprechend erniedrigte SHIP1-Level, werden auch mit B-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht (COSTINEAN et al., 2009).

Ursache für 20-25% der AML ist eine interne Tandem-Duplikation in der Tyrosinkinase Flt3 (*FLT3-ITD*). Interessanterweise wird in *FLT3-ITD*-AML miR-155 auf das ca. 8fache hochreguliert (CAMMARATA et al., 2010). Grb2 bindet an aktivierten Flt3 (ROSNET et al., 1996). SHIP1 könnte somit über Grb2 an Flt3 rekrutiert werden.

2.12 Die SHIP1-knockout-Maus

SHIP1^{-/-}-Mäuse wurden durch Deletion von Exon 1 des SHIP1-Gens *INPP5D* generiert (HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999). Die Mäuse sind lebensfähig und fertil, haben jedoch ein um 17% reduziertes Körpergewicht und sterben früher, weil sie eine chronische progressive Hyperplasie myeloider Zellen entwickeln, die die Lunge infiltrieren. Mehr als 50% der Mäuse sterben bis zum Alter von 10 Wochen. Die Mäuse zeigen eine Splenomegalie. Sie leiden an Osteoporose aufgrund einer erhöhten Anzahl an hyperaktiven Osteoklasten. Sie besitzen eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen in Knochenmark, Milz und Blutzirkulation, mit einhergehender Abnahme der Lymphozytenzahl. Die Zahl der Monozyten- und Granulozyten-Vorläuferzellen (Mac-1⁺ Gr-1⁺) ist erhöht, während sich die Zahl der erythroiden Zellen im Knochenmark (Ter119⁺) im Alter von 4 Wochen auf 70%, im Alter von 8-10 Wochen auf 30% in Bezug auf SHIP1^{+/+}-Mäuse beläuft. Vorläuferzellen des Knochenmarks zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cytokinen, d.h. die Zahl der Kolonie-bildenden Zellen in Methylcellulose-basiertem Medium in Anwesenheit von GM-CSF oder IL-3 ist erhöht. In Medium mit Serum, aber ohne Cytokinzusatz, zeigten die SHIP1^{-/-}-Zellen erhöhtes Überleben (HELGASON et al., 1998).

B-Zellen von SHIP1^{-/-}-Mäusen sind hypersensitiv gegenüber BCR-Stimulation, aber weniger sensitiv gegenüber Apoptose, verglichen mit SHIP1^{+/+}-Mäusen (BRAUWEILER et al., 2000a; BRAUWEILER and CAMBIER, 2004; BRAUWEILER et al., 2000b; HELGASON et al., 1998; HELGASON et al., 2000; LIU et al., 1998b).

SHIP1-k.o.-Mäuse erzeugen auf Kosten von inflammatorischen T_H17-Zellen eine erhöhte Anzahl von CD4⁺CD25⁺ T_{Reg}-Zellen, die ihre immunsuppressive Kapazität beibehalten (KASHIWADA et al., 2006; LOCKE et al., 2009).

Neutrophile und Mastzellen von SHIP1^{-/-}-Mäusen zeigen erhöhte Resistenz gegenüber durch verschiedene Stimuli induzierte Apoptose. Knochenmarks-Mastzellen von SHIP1^{-/-}-Mäusen weisen erhöhte PtdIns(3,4,5)P₃-Level sowie eine erhöhte und verlängerte Akt/PKB-Phosphorylierung an S473 und T308 und Akt-Aktivität, gemessen an GSK3-Phosphorylierung, nach IL-3-Stimulation auf. In Mastzellen, Neutrophilen, Knochenmark und Milz ist das pAkt-Level bereits basal erhöht. MAPK- und STAT5-Phosphorylierung ist vergleichbar zwischen SHIP1^{-/-}- und SHIP1^{+/+}-Kochenmarks-Mastzellen (LIU et al., 1999).

Da viele dieser phänotypischen Charakteristika mit PTEN^{+/-}-Mäusen (PTEN-Doppel-knockout ist embryonal letal (DI CRISTOFANO et al., 1998; PODSYPANINA et al., 1999;

STAMBOLIC et al., 1998)) übereinstimmen (FOX et al., 2002), ist es wahrscheinlich, dass die höheren Level an PtdIns(3,4,5)P₃ in SHIP1^{-/-}-Mäusen primär für diesen Phänotyp verantwortlich sind.

Der Phänotyp der SHIP1-k.o.-Maus ähnelt außerdem dem von normalen Mäusen, denen GM-CSF-überexprimierendes Knochenmark transplantiert wurde (JOHNSON et al., 1989).

Da der *knockout* durch Entfernung des ersten Exons von *INPP5D* generiert wurde, wird das p104 s-SHIP (siehe 2.4), dem zwar die SH2-Domäne fehlt, das aber die 5-Phosphatase-Aktivität besitzt, weiterhin exprimiert (SLY et al., 2003). SHIP2 wird ebenfalls noch in SHIP1^{-/-}-Mäusen exprimiert, was den Verlust von SHIP1 kompensieren könnte. Wahrscheinlich würde der SHIP1^{-/-}-Maus-Phänotyp noch schwerwiegender ausfallen, wenn auch s-SHIP deletiert wäre (RAUH et al., 2004).

Um pleiotrope Effekte bei einer ubiquitären Deletion von SHIP1 in der Maus auszuschließen und dennoch die regulatorischen Funktionen von SHIP1 in verschiedenen Immunzelltypen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen und voneinander zu unterscheiden, wurden konditional SHIP1-defiziente Mäuse geschaffen, in denen SHIP1 jeweils in spezifischen Zelltypen, unter Verwendung des Cre-Lox-Systems (LOY and GOODNOW, 2002), deletiert wurde.

Mäuse mit auf T-Zellen beschränkter SHIP1-Deletion wurden geschaffen, indem Mäuse, die ein loxP-flankiertes SHIP1-Gen besitzen (KARLSSON et al., 2003), mit Mäusen gekreuzt wurden, die transgen für Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promotors (CD4cre) sind (LEE et al., 2001). Die resultierenden Mäuse sind gesund und haben eine normale Lebensdauer im Vergleich zu SHIP1-exprimierenden Wurfgeschwistern (TARASENKO et al., 2007). Es wurden keine Defekte in der T-Zell-Entwicklung, weder im Thymus noch in der Peripherie, beobachtet. Dies steht im Widerspruch zu einer leichten Verminderung der Anzahl peripherer T-Lymphozyten in den Keimbahn-SHIP1-defizienten (k.o.) Mäusen (HELGASON et al., 1998). Weiterhin zeigen Mäuse mit Keimbahn-Defizienz von SHIP1 eine erhöhte Anzahl an regulatorischen Effektor-T-Zellen (T_{Reg}) (KASHIWADA et al., 2006). SHIP1^{-/-}-T_{Reg} besitzen jedoch die gleiche Funktionsfähigkeit wie WT-T_{Reg} (COLLAZO et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurden in der konditionalen SHIP1-Deletion keine Unterschiede in der Anzahl regulatorischer oder Effektor-T-Zellen gesehen. SHIP1 scheint demnach keine essentielle Rolle in der thymischen T-Zell-Selektion, in der T-Zell-Entwicklung oder der spontanen T-Zell-Aktivierung zu spielen. Außerdem legt dieses Ergebnis nahe, dass in der Tat das Umfeld von SHIP1^{-/-}-Mäusen die Expansion von regulatorischen Effektor-T-Zellen fördert (NEILL et al., 2007). *Ex vivo*-Analysen von T-Zellen aus Mäusen mit auf T-Zellen beschränkter SHIP1-

Deletion zeigten, dass SHIP1 die Stärke des TCR-Signals nicht bemerkenswert regulierte. Es wurden keine Unterschiede zwischen SHIP1-defizienten und WT T-Zellen weder in der Phosphorylierung von ERK, Akt, Zap-70 oder PLC γ gesehen, noch Unterschiede im Calcium-Influx auf TCR-Aktivierung hin mit anti-CD3 oder anti-CD3 und anti-CD4-Antikörpern. Auch in der *ex vivo*-Proliferation unterschieden sich die SHIP1-defizienten T-Zellen nicht von WT T-Zellen (TARASENKO et al., 2007). Obwohl gezeigt wurde, dass SHIP1 nach TCR-Stimulation tyrosinphosphoryliert wird (LAMKIN et al., 1997), konnte SHIP1 keine definitive Rolle in der TCR-Signaltransduktion *in vivo* zugeordnet werden (LEUNG et al., 2009).

Jedoch zeigte die T-Zell-beschränkte SHIP1-Deletion eine Verschiebung zu T_H1-Helfer- und cytotoxischen T-Zellen. So weisen T-Zellen aus diesem Modell geringere Expressionslevel der T_H2-Cytokine IL-4, IL-5 und IL-13 auf und zeigen eine verminderte typische T_H2-vermittelte Immunreaktion (TARASENKO et al., 2007). Der Defekt in der T_H2-Zell-Entwicklung ist wahrscheinlich Konsequenz einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cytokinen, die die Induktion des T_H1-assoziierten Transkriptionsfaktors T-bet vermitteln (TARASENKO et al., 2007). Eine normale SHIP1-Expression scheint demnach einer Verschiebung zu T_H1-Zellen entgegenzuwirken und T_H2-Zell-Entwicklung zu erlauben.

Mäuse mit auf B-Zellen beschränkter SHIP1-Deletion wurden geschaffen, indem Mäuse, die ein loxP-flankiertes SHIP1-Gen besitzen (KARLSSON et al., 2003), mit Mäusen gekreuzt wurden, die transgen für Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD19-Promotors sind (RICKERT et al., 1997). Diese konditional, auf B-Zellen beschränkt SHIP1-deletierten Mäuse entwickeln keine offensichtlichen Pathologien oder Veränderungen in der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark (LEUNG et al., 2009). Auch dieser Befund legt nahe, dass die in SHIP1-k.o.-Mäusen festgestellte Lymphopenie (HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999) wahrscheinlich auf ein pathologisches Umfeld bei ubiquitärem SHIP1-k.o. zurückzuführen ist (LEUNG et al., 2009). Diese Einschätzung könnte dadurch erklärt werden, dass bei SHIP1-k.o.-Mäusen höhere Level an IL-6 im Knochenmark die Myelopoese verstärken bei gleichzeitiger Reduktion der Lymphopoese (NAKAMURA et al., 2004).

Übereinstimmende Daten zwischen SHIP1-k.o.-Mäusen und konditional B-Zell-SHIP1-deletierten Mäusen sind die verringerte Anzahl an rezirkulierenden B-Zellen und die spontane Bildung von Keimzentren (*germinal center* in Lymphknoten), jeweils im Vergleich zu WT-Mäusen (HELGASON et al., 2000; LIU et al., 1998b). Die Reduktion in rezirkulierenden B-Zellen könnte über eine Veränderung der CD22-Funktion erklärt werden: CD22 spielt eine essentielle Rolle im *Homing* der B-Zellen ins Knochenmark (NITSCHKE et al., 1997),

außerdem soll SHIP1 mit dem ITIM in CD22 interagieren (POE et al., 2000; TRIDANDAPANI et al., 1997c). Mäuse mit auf B-Zellen beschränkter SHIP1-Deletion haben in der Peripherie verstärkt aktivierte B-Zellen mit erhöhtem Level spontanen Isotyp-*Switchings* und ein verschobenes Repertoire zu niedrigaffinen Rezeptoren hin. Die Zellen antworten nur sehr schwach auf T-Zell-abhängige und T-Zell-unabhängige Immunisierungen oder Viren (LEUNG et al., 2009), während SHIP1-k.o.-Mäuse verstärkte humorale Antworten zeigten (HELGASON et al., 2000). B-Zellen mit konditionaler SHIP1-Deletion aus Keimzentren zeigen eine normale somatische Hypermutationsrate, werden jedoch nicht für hochaffine Sequenzen selektioniert. SHIP1 scheint also eine essentielle Rolle in der Regulation der positiven Selektion für hochaffine Antigen-spezifische B-Zell-Klone in Keimzentren bei T-Zell-abhängiger Immunisierung zu spielen (LEUNG et al., 2009).

Mäuse mit auf die Granulozyten/Makrophagen-Linie beschränkter, konditionaler SHIP1-Deletion wurden geschaffen, indem Mäuse, die ein loxP-flankiertes SHIP1-Gen besitzen (KARLSSON et al., 2003), mit Mäusen gekreuzt wurden, die transgen für Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Lysozym M-Promotors sind (KARLSSON et al., 2003). Diese Mäuse mit auf die Granulozyten/Makrophagen-Linie beschränkter, konditionaler SHIP1-Deletion entwickeln eine myeloproliferative Pathologie, die ihre Lebenszeit reduziert, obwohl die Krankheit nicht so schwerwiegend ausfällt wie in SHIP1-k.o.-Mäusen (LEUNG et al., 2009). Ein Grund dafür mag sein, dass die SHIP1-Deletion in LysMCre erst in bereits differenzierten Makrophagen eintritt und nicht schon in frühen Vorläufern. Außerdem zeigen diese Mäuse Lymphozyten-Aktivierung als sekundären Effekt, sie entwickeln eine Splenomegalie mit einer großen Anzahl aktivierter Lymphozyten, was wiederum dem Phänotyp der SHIP1-k.o.-Mäuse entspricht (HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999). Die T-Zellen der Mäuse mit auf die Granulozyten/Makrophagen-Linie beschränkter, konditionaler SHIP1-Deletion zeigen eine vergrößerte Population an T_{Reg}-Zellen, neigen jedoch im Gegensatz zu SHIP1-k.o.-Mäusen zu einem T_H17-Phänotyp (LEUNG et al., 2009). Auch sind die konditional SHIP1-defizienten Makrophagen wie die der SHIP1-k.o.-Mäuse hypersensitiv gegenüber Wachstumsfaktorstimulation, wie z.B. CSFs, und setzen IL-6 frei, das unter den T-Zellen zu einer Verschiebung (*skewing*) zu T_H17-Zellen führt.

SHIP1^{-/-}-Mäuse und Mäuse, in denen in beiden SHIP1-Allelen die Exons 10 und 11, die die Inositol-5-Phosphatase-Domäne codieren, deletiert wurden, zeigen eine erhöhte Anzahl an Megakaryozytenvorläufern (*megakaryocyte progenitors*, MKP) (lin⁻c-Kit⁺CD41⁺) in Knochenmark, Milz und Blut mit verstärkter Phosphorylierung von STAT3, Akt und ERKs.

Trotz der erhöhten MKP-Zahl ist die Gesamtanzahl reifer Megakaryozyten (MK) ($\text{lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{CD41}^+$) im Körper nicht signifikant erhöht. Jedoch ist die Megakaryozyten-Zahl im Knochenmark reduziert, die in der Milz dagegen erhöht. Das könnte an der reduzierten Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 in SHIP1-defizienten MKs liegen (PEREZ et al., 2008).

SHIP1 ist negativer Regulator der Entstehung von dendritischen Zellen (DCs, *dendritic cells*) aus Knochenmarksvorläufern. Dies konnte durch verstärkte Proliferation von DCs aus SHIP1^{-/-}-GM-CSF-Kulturen sowie eine erhöhte Anzahl an DCs in der Milz von SHIP1^{-/-}-Mäusen gezeigt werden. Die SHIP1^{-/-}-DCs zeigen einen relativ unreifen Phänotyp und sezernieren substantiell weniger IL-12 nach TLR(*toll-like receptor*)-Ligand-Stimulation als WT-DCs. Dies wiederum führt zu einer reduzierten Stimulation von Antigen-spezifischer T-Zell-Proliferation und T_H1-Antworten. Dieser unreife DC-Phänotyp konnte durch die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 rückgängig gemacht werden. Dies spricht dafür, dass SHIP1 einerseits ein negativer Regulator der GM-CSF-vermittelten Entstehung von DCs ist, zugleich aber ein positiver Regulator ihrer Differenzierung (ANTIGNANO et al., 2010).

2.13 SHIP1 in Leukämien

2.13.1 Herunterregulation von SHIP1 in chronischer myeloischer Leukämie

Bei allen Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) ist in den Tumorzellen ein sogenanntes Philadelphia-Chromosom nachzuweisen (NOWELL and HUNGERFORD, 1960). Es kommt durch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 zustande, t(9;22)(q34;q11). Dabei ist das *ABL1*-Gen, das für eine Tyrosinkinase codiert, von Chromosom 9 auf das *BCR*-Gen (*Breakpoint Cluster Region*) übertragen (DE KLEIN et al., 1982; KURZROCK et al., 1988) und es wird das Fusionsprotein p210 BCR-Abl exprimiert (BEN-NERIAH et al., 1986). Im Gegensatz zum normalen Abl-Protein, das im Zellkern vorliegt, ist BCR-Abl im Cytoplasma lokalisiert. Durch Verlust des N-terminalen Bereichs von Abl, der normalerweise die katalytische Domäne blockiert, sowie durch Dimerisierung von BCR-Abl über ein *coiled coil*-Motiv in BCR, was zur Autophosphorylierung von Abl führt, besitzt die Tyrosinkinase in BCR-Abl eine erhöhte Aktivität (PLUK et al., 2002; SAWYERS, 2002).

Der myeloproliferative Phänotyp, der in SHIP1^{-/-}-Mäusen gesehen wird, siehe 2.12, ähnelt dem *BCR-ABL*-transgener Mäuse (DALEY et al., 1990; ELEFANTY et al., 1990; HEISTERKAMP et al., 1990; KELLIHER et al., 1990).

Die SHIP1-Expression ist reduziert in primären myeloiden Leukämiezellen von Patienten mit CML, die durch Expression von BCR-Abl charakterisiert sind, es besteht eine inverse Relation zwischen der Expression von SHIP1 und BCR-Abl. SHIP1 wird von BCR-Abl reversibel herunterreguliert, und dies erfordert die Tyrosinkinaseaktivität von Abl: Die Doxycyclin-abhängige Induktion der BCR-Abl-Expression in Ba/F3-Zellen korreliert direkt mit erhöhter zellulärer Tyrosinphosphorylierung und verringerter SHIP1-Protein-Expression (SATTLER et al., 1999).

Die Herunterregulation von SHIP1 ist spezifisch, da die Expression einer Reihe anderer Signalmoleküle – PTEN (RUSCHMANN et al.), SHIP2 (RUSCHMANN et al.; WISNIEWSKI et al., 1999) SHP-1, SHP-2, p85 der PI3K, c-Cbl, Vav, Shc oder Paxillin (SATTLER et al., 1999) – nicht von BCR-Abl betroffen ist.

Während die normale SHIP1-Protein-Halblebenszeit in Ba/F3-Zellen 18 Stunden beträgt, ist diese Zeit auf weniger als 3 Stunden in BCR-ABL-exprimierenden Ba/F3-Zellen reduziert (SATTLER et al., 1999). SHIP1 wird in BCR-ABL-exprimierenden Zellen womöglich durch Tyrosinphosphorylierung für den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau markiert, siehe 2.11.3.1 (RUSCHMANN et al., 2010).

Während auf der einen Seite berichtet wird, dass in Knochenmarksproben von primären CML SHIP1 nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird (SATTLER et al., 1999), wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass in primären CML-Zellen von CML-Patienten die SHIP1-Expression in primitiven CML-Zellen (CD34⁺lin⁻) sogar hochreguliert ist im Vergleich zu normalen Knochenmarkszellen und SHIP1 hier womöglich sogar eine positive Rolle in der BCR-Abl-vermittelten Transformation zukommt (JIANG et al., 2003). In den weiter differenzierten CML-Zellen (CD34⁻lin⁺) dagegen wurde jedoch im Vergleich zu normalen Knochenmarkszellen ebenfalls eine signifikant reduzierte SHIP1-Expression festgestellt (JIANG et al., 2003).

Möglicherweise ist die Herunterregulation von SHIP1 eine Voraussetzung für den Proliferationsvorteil einiger CML-Klone.

2.13.2 Mutationen von SHIP1 in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Mehrere Arbeitsgruppen haben Mutationen in SHIP1 bei AML-Patienten beschrieben (GILBY et al., 2007; HORSTMANN and JÜCKER, unveröffentlicht; LUO et al., 2004; LUO et al., 2003; ZHANG et al., 2006). Die Häufigkeit für das Auftreten von SHIP1-Mutationen rangierte dabei zwischen 0,5% (1/192) und 21,9% (7/32), im Durchschnitt ist SHIP1 in 3,2% von AML mutiert, siehe Abb. 2.9 und Tab. 2.5.

Die Mutation F28L liegt im hochkonservierten Motiv aller SH2-Domänen, dem acht Aminosäuren umfassenden Motiv G(S/T)FLVR(E/D)S, das die minimale notwendige Einheit darstellt, um tyrosinphosphorylierte Sequenzen zu erkennen (HIDAKA et al., 1991). Fünf Mutationen (V120M, R156Q, T162P, K210R, R225W) liegen in dem etwa 300 Aminosäuren umfassenden Bereich in SHIP1 zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne, der bislang noch nicht weiter charakterisiert wurde. Die Mutation T162P trat bei zwei AML-Patienten auf.

Drei der Mutationen, N508D, Y643H und V684E, liegen in der Inositol-5-Phosphatasedomäne.

Die Mutationen P1039S und P1042L liegen innerhalb eines P-x-x-P-Motivs. P-x-x-P-Motive stellen Konsensusbindungsmotive für SH3-Domänen dar (PAWSON, 1995).

Außerdem wurde im C-Terminus von SHIP1 die Mutation Q1153L gefunden.

In einer von neun ALL (akute lymphatische Leukämie) wurde zudem die *nonsense*-Mutation Q1076X gefunden, die zu einem frühzeitigen Translationsstopp und einem verkürzten SHIP1-Protein führt (LUO et al., 2004).

Alle Mutationen lagen heterozygot vor.

Bei gesunden Spendern als Kontrolle traten die Mutationen nicht auf: Die Mutationen F28L, V120M, K210R, N508D, Y643H, P1039S und P1042L wurden nicht in 50 Gesunden gefunden (LUO et al., 2004), die Mutation V684E ebenfalls nicht in 50 Gesunden (LUO et al., 2003). Die Mutation R156Q wurde nicht in 22 Gesunden gefunden (GILBY et al., 2007), die Mutation Q1153L nicht in 192 Gesunden (ZHANG et al., 2006). Die Mutation T162P wurde nicht in 36 Gesunden gefunden, die Mutation R225W nicht in 51 Gesunden (HORSTMANN and JÜCKER, unveröffentlicht).

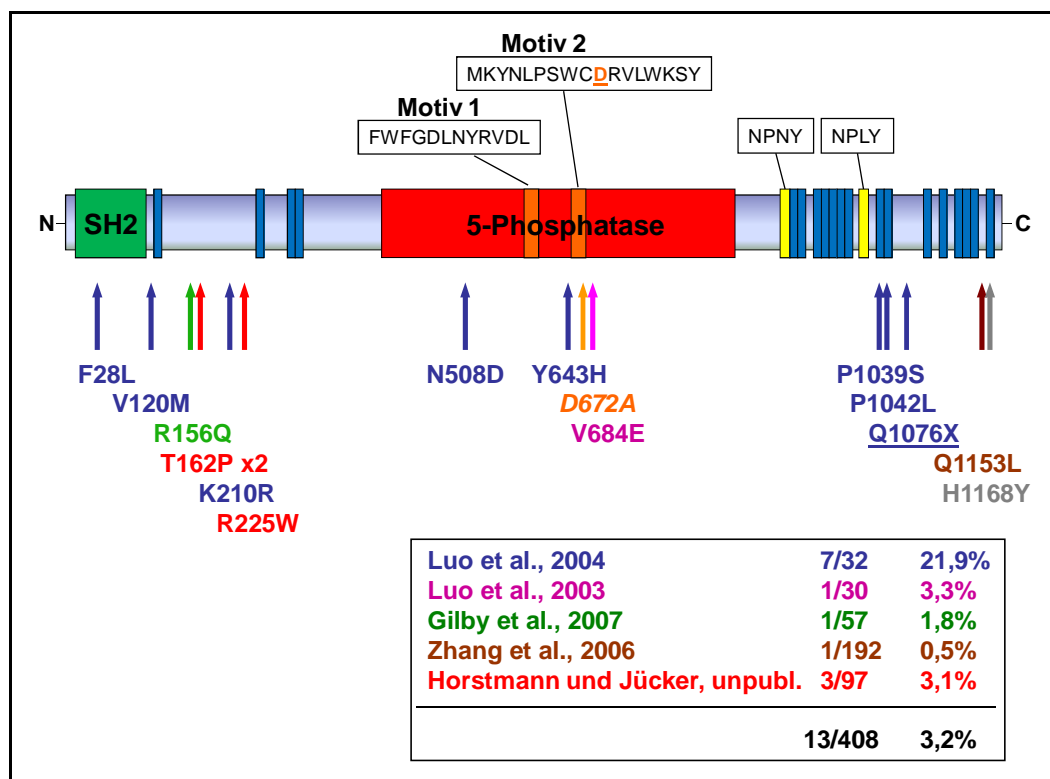


Abb. 2.9: SHIP1-Mutationen in AML. In 3,2% von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie wurden Mutationen im SHIP1-codierenden Gen *INPP5D* bzw. seinen Transkripten gefunden, und zwar in der SH2-Domäne, in der Domäne zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne, in der 5-Phosphatase-Domäne und im prolinreichen C-Terminus. In dieser Abb. sind auch drei Mutationen, die nicht bei AML gefunden wurden, aber in dieser Arbeit untersucht wurden, aufgeführt, dazu zählen Q1076X (unterstrichen) aus einer ALL, der SNP H1168Y (grau) und die als Kontrolle verwendete 5-Phosphatase-inaktive Mutante D672A (orange, kursiv).

Tab. 2.5: SHIP1-Mutationen, die ausschließlich in AML-Patienten gefunden wurden.

Mutation	Aminosäureaustausch	Quelle
TTC > CTC	F28L	(LUO et al., 2004)
GTG > ATG	V120M	(LUO et al., 2004)
CGG > CAG	R156Q	(GILBY et al., 2007)
ACA > CCA	T162P	Jücker und Horstmann, unveröffentlicht
AAA > AGA	K210R	(LUO et al., 2004)
CGG > TGG	R225W	Jücker und Horstmann, unveröffentlicht
AAC > GAC	N508D	(LUO et al., 2004)
TAC > CAC	Y643H	(LUO et al., 2004)
GTG > GAG	V684E	(LUO et al., 2004)
CCC > TCC	P1039S	(LUO et al., 2004)
CCG > CTG	P1042L	(LUO et al., 2004)
CAG > CTG	Q1153L	(ZHANG et al., 2006)

Die Mutation V684E in SHIP1 wurde näher charakterisiert und eine auf ca. 18% im Vergleich zu WT-SHIP1 reduzierte Aktivität in der SHIP1-katalysierten PtdIns(3,4,5)P₃-Hydrolyse gemessen (LUO et al., 2003). Die in primären Leukämiezellen dieser Leukämie exprimierte SHIP1-Menge war nicht verändert im Vergleich zu einer AML, die WT-SHIP1 exprimierte. Das basale pAkt(S473)-Level sowie das pAkt(S473)-Level nach IL-3-Stimulation war ebenfalls in der AML mit SHIP1-V684E und AML mit WT-SHIP1 vergleichbar, jedoch hielt die Akt(S473)-Phosphorylierung in den Leukämiezellen mit V684-Mutation länger an (LUO et al., 2004; LUO et al., 2003). In der BCR-Abl-positiven CML-Zelllinie K562 inhibierte die Expression von WT-SHIP1 die Proliferation im Vergleich zur Vektorkontrolle, während SHIP1 V684E-exprimierende K562 sogar schneller proliferierten als die Vektorkontrolle. Es wurde die Apoptose bei Serumentzug bestimmt (DNA-Fragmentierung als Maß). Dabei gingen SHIP1-WT-Transfektanten am schnellsten in den Zelltod, vor der Vektorkontrolle, am längsten überlebten die mit SHIP1 V684E transfizierten Zellen. Ebenso verhielt es sich bei der Etoposid-induzierten Apoptose. Eine weitere Zelllinie, die monocytische U937, die SHIP1 endogen exprimiert, wurde ebenfalls transfiziert und zeigte die gleichen Proliferationstendenzen für WT-SHIP1, SHIP1 V684E und Vektorkontrolle wie K562 (LUO et al., 2003). Diese Zunahme in der Proliferation wurde über ein denkbare sogenanntes *substrate trapping* versucht zu erklären, wobei die katalytisch inaktive Phosphatase ihr Substrat schützt, indem sie daran bindet, es aber nicht umsetzen kann und es somit anreichert (LI and SUN, 1998; MYERS et al., 1998; SUN et al., 1993; ZHU et al., 2001). Nach erfolgreicher Behandlung war der AML-Patient mit der SHIP1 V684E-Mutation in Remission und die Mutation in SHIP1 wurde nicht mehr gefunden, was auf eine somatische Mutation schließen lässt (LUO et al., 2003). In keiner der untersuchten Leukämien und Zelllinien wurden PTEN-Mutationen gefunden (LUO et al., 2004).

Auch zur Mutation F28L wurden kürzlich Ergebnisse veröffentlicht (YANG et al., 2009a): Die Expression von SHIP1 F28L in K562-Zellen führte im Gegensatz zu WT-SHIP1 nicht zu einer Abnahme in pAkt(T308), pAkt(S473) und Cyclin D1 oder einer Zunahme der CKIs p27^{KIP1} und p21^{WAF1/CIP1}. Die Expression von SHIP1 WT führte zu einem Zellzyklusarrest in G₀/G₁, im Gegensatz dazu hatte SHIP1 F28L keinen Einfluss auf die Proliferation.

Diese Befunde deuten allesamt darauf hin, dass SHIP1 eine Rolle in der Leukämieentstehung spielen könnte und damit womöglich eine Rolle als Tumorsuppressor einnimmt.

2.14 Single Nucleotide Polymorphisms in SHIP1

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) sind Variationen einzelner Basenpaare der DNA. Sie stellen den häufigsten Typ genetischer Variationen beim Menschen dar und machen über 90% der Sequenzunterschiede aus (COLLINS et al., 1998), mit einer Gesamtfrequenz von einem SNP pro 1000 bp (TAILLON-MILLER et al., 1998). Während einige Definitionen eines SNPs eine Häufigkeit in der Bevölkerung von mehr als 1% fordern, z.B. Brookes (BROOKES, 1999), fallen andere Definitionen allgemeiner aus (dbSNP auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Es besteht die Hoffnung, insbs. auch seitens der Pharmakogenetik, dass das Kennen des SNP-Genotyps eines Individuums die Grundlage für die Feststellung einer Krankheitsprädisposition und die Wahl der optimalen Therapie bilden kann (MASOOD, 1999). Am wahrscheinlichsten beeinflussen SNPs in codierenden Sequenzen (cSNPs) und regulatorischen Bereichen der DNA die Genfunktion (CHAKRAVARTI, 1998; COLLINS et al., 1997; SYVANEN et al., 1999). Jedes Gen enthält durchschnittlich vier cSNPs. Etwa die Hälfte der cSNPs verursacht *missense*-Mutationen in den korrespondierenden Proteinen (*missense*-cSNPs), während die andere Hälfte stille Mutationen/cSNPs sind (CARGILL et al., 1999; HALUSHKA et al., 1999). *Missense*-cSNPs können neutral sein oder aber die Funktion beeinträchtigen (WANG and MOULT, 2001). *Missense*-Mutationen machen fast die Hälfte aller DNA-Mutationen aus, die Krankheiten verursachen (KRAWCZAK et al., 2000).

In Tab. 2.6 sind *missense*-cSNPs aufgeführt, die in SHIP1 gefunden wurden.

Tab. 2.6: *Missense*-cSNPs im SHIP1-Gen *INPP5D*. rs: Reference SNP cluster ID

Missense-cSNP	Quelle
D25G	(GEIER et al., 1997; LUO et al., 2004)
G26T	(GEIER et al., 1997; LUO et al., 2004)
M529V	(LUO et al., 2004)
P1028H	(GEIER et al., 1997; LUO et al., 2004)
H1168Y	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp : rs 9247

2.15 Haploinsuffizienz

Tumorsuppressorgene sind definiert als Gene, deren Funktionsverlust die Entstehung bzw. Progression von Tumoren fördert (STANBRIDGE, 1990). Nach der *Two-Hit*-Hypothese (KNUDSON, 1971) müssen beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert werden, damit sich ein Tumor entwickelt. Ein solcher LOH (*loss of heterozygosity*) kann durch Verlust eines Chromosoms oder Chromosomenabschnitts durch Deletion oder Translokation/Rekombination, aber auch durch Punktmutationen oder Inhibition der Expression durch Promotor-Hypermethylierung erfolgen. Das Modell der *Two Hits* ist jedoch schwierig in Einklang zu bringen mit der Theorie der klonalen Evolution von Krebs (NOWELL, 1976). Denn wenn der Verlust nur eines Tumorsuppressorallels tatsächlich keinen Phänotyp hat, müssten beide Allele innerhalb einer Zelle defekt sein, bevor ein selektiver Vorteil eintreten kann. Da die spontane Mutationsrate in Zellen jedoch sehr niedrig ist und in Diskrepanz zur Krebshäufigkeit steht, wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem Krebszellen einen Mutator-Phänotyp aufweisen, als Voraussetzung für die Anhäufung von Mutationen (LOEB, 1991).

In diploiden Organismen sind, bis auf Gene des X- und Y-Chromosoms und imprintete Gene, zwei funktionelle Allele vorhanden. Für viele Gene reicht jedoch ein Allel für die normale Funktion aus, andere hingegen sind sensitiv gegenüber der Gendosis. Haploinsuffizienz bedeutet, dass ein Allel nicht ausreicht um die normale Funktion des Genprodukts in der Zelle zu erfüllen.

Es gibt zahlreiche haploinsuffiziente Tumorsuppressorgene (PAYNE and KEMP, 2005), darunter *CBF α /AML1/RUNX1* (ERICKSON et al., 1992; MIYOSHI et al., 1993; SONG et al., 1999) mit einer Rolle in akuter myeloischer Leukämie, siehe auch 2.2.7.

Von der Haploinsuffizienz zu unterscheiden sind dominant-negative Mutationen in Tumorsuppressorgen. Hierbei ist ebenfalls nur ein Allel mutiert, jedoch so, dass das Genprodukt des mutierten Allels das Genprodukt des Wildtyp-Allels inaktiviert, häufig durch Bindung des Wildtyp-Proteins in nichtfunktionellen Komplexen. Beispiel hierfür ist p53, das als Tetramer an die DNA bindet. Hierbei wird durch die Tetramerisierung funktionaler und nicht-funktionaler Monomere die DNA-Bindungseigenschaft auch des funktionalen p53 beeinträchtigt (JOERGER and FERSHT, 2007).

Die Mutationen in SHIP1, die bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden wurden, lagen alle heterozygot vor. Dass die Gendosis auch für SHIP1 von entscheidender

Bedeutung sein kann, zeigt das Beispiel der CML, wo die SHIP1-Expression herunterreguliert wird, siehe 2.13.1.

Eine dominant-negative Funktion von SHIP1 im Sinne von p53 setzt eine Di- oder Multimerisierung voraus. Eine Multimerisierung von SHIP1 ist nicht bekannt. Allerdings zeigte die Michaelis-Menten-Auftragung des SHIP1-Umsatzes von Ins(1,3,4,5)P₄ einen sigmoidalen Verlauf (ONG et al., 2007), ein Indiz für Kooperativität und somit Multimerisierung. Eine ebensolche Beobachtung wurde bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker für die SHIP1-katalysierte Hydrolyse von Ins(1,3,4,5)P₄ gemacht.

2.16 Die Jurkat-Zelllinie als Modell

Die Jurkat-T-ALL-Zelllinie exprimiert kein SHIP1 (BRUYNS et al., 1999; FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; GLOIRE et al., 2006; HORN et al., 2004; LO et al., 2009), kein SHIP2 (BRUYNS et al., 1999; GLOIRE et al., 2006) und kein PTEN (FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; LO et al., 2009; SAKAI et al., 1998; SHAN et al., 2000). Aufgrund dessen zeigen Jurkat T-Zellen ein sehr hohes basales PtdIns(3,4,5)P₃-Level und eine sich daraus ergebende konstitutive Akt-Aktivierung (FREEBURN et al., 2002).

Der PTEN-Defekt in den Jurkat-Zellen geht auf zwei defekte PTEN-Allele zurück, die jeweils in Exon 7 mutiert sind. Ein Allel enthält eine 2 bp-Deletion gefolgt von einer 9 bp-Insertion, wodurch Codon 234 zerstört wird und *downstream* Stoppcodons entstehen. Das zweite Allel enthält eine 39 bp-Insertion hinter Codon 246, und das dadurch neu entstandene Codon 247 ist ein Stoppcodon (SAKAI et al., 1998). Die beiden SHIP1-Allele sind ebenfalls mutiert. Ein Allel enthält eine *nonsense*-Mutation in Codon 345, das zweite Allel eine Deletion der ersten 47 bp von Exon 12, welches mit AS 413 beginnt, sodass es zur Leserasterverschiebung (*frameshift*) und ebenfalls zum vorzeitigen Stopp kommt (LO et al., 2009).

2.17 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss Mutationen in der Inositol-5-Phosphatase SHIP1, die bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gefunden wurden, auf die Funktion dieses Proteins haben. Dazu sollte zuerst ein Projekt der genomischen Sequenzierung von SHIP1 in Proben von 97 AML-Patienten abgeschlossen werden. Anschließend sollten die Mutationen in die SHIP1-cDNA eingeführt und SHIP1 WT und SHIP1-Mutanten γ -retroviral in die hämatopoetische Jurkat-T-Zelllinie transduziert und Klone etabliert werden, die SHIP1 über das Tet-On-System Doxycyclin-induzierbar exprimieren. Die Jurkat-Zelllinie wurde von einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert und exprimiert kein endogenes SHIP1. Die so erzeugten SHIP1-exprimierenden Klone sollten auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die Phosphorylierung der Serin-/Threoninkinase Akt, die als Maß für ihre Aktivierung gilt, zu reduzieren. Akt ist der Haupteffektor der PI3K, und der PI3K-Akt-Signalweg ist in 50-70% aller AML aktiviert. Es sollte die enzymatische Aktivität der SHIP1-Mutanten, PtdIns(3,4,5)P₃ zu hydrolysieren, sowie die Proliferation und die Calcium-Signaltransduktion in den SHIP1-exprimierenden Klonen bestimmt werden. Für ausgewählte SHIP1-Mutanten sollten ihre Interaktionseigenschaften analysiert werden, so für die Mutante der SH2-Domäne ihre Bindung an tyrosinphosphorylierte Proteine und für Mutanten in prolinreichen Regionen ihre Bindung an die SH3-Domänen von Grb2. Für einige SHIP1-Mutanten sollte ihre Tyrosinphosphorylierung nach Zell-Stimulation analysiert werden. Neben den bei AML gefundenen Mutationen sollte auch eine bei einer ALL gefundene Mutation, ein *missense*-cSNP und eine enzymatisch inaktive SHIP1-Kontrolle in dieser Arbeit mit untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, von Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Biomol (Hamburg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Calbiochem (Bad Soden), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), und Bio-Rad (München) bezogen.

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primäre Antikörper

- SHIP1 (P1C1), sc-8425, von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), monoklonales IgG₁ aus Maus, 200 µg/ml, gerichtet gegen Aminosäuren 866-1020 im C-Terminus von Maus-SHIP1, empfohlen zur Detektion von p145 SHIP1 aus Maus, Ratte und Mensch. Einsatz WB 1:500.
- Phospho-Akt (Ser473), (193H12), von Cell Signaling (Danvers, MA, USA), monoklonales IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuresequenz um pS473 von Maus-Akt. Erkennt Akt nur, wenn an S473 phosphoryliert. Empfohlen zur Detektion von p60 pAkt (S473) aus Mensch, Maus und Ratte in *Western Blot*, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz, Durchflusszytometrie. Einsatz WB 1:1000.
- Phospho-Akt (Thr308) von Cell Signaling, polyklonales Ig aus Kaninchen, gerichtet gegen die Aminosäuresequenz um pT308 von Maus-Akt. Erkennt Akt nur, wenn an T308 phosphoryliert. Empfohlen zur Detektion von p60 pAkt (T308) aus Mensch, Maus und Ratte in *Western Blot*, Immunpräzipitation und Durchflusszytometrie. Einsatz WB 1:1000.

- Akt1/2/3 (H-136), sc-8312, von Santa Cruz Biotechnology, polyklonales Ig aus Kaninchen, 200 µg/mL, gerichtet gegen AS 345-480 von menschlichem Akt1/2. Empfohlen zur Detektion von Akt1, Akt2 und Akt3 aus Maus, Ratte Mensch und Krallenfrosch in *Western Blot*, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und ELISA. Einsatz WB 1:1000.
- PTEN (A2B1), sc-7974, von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG₁ aus Maus, 200 µg/mL, gerichtet gegen AS 388-400 von menschlichem PTEN. Empfohlen für die Detektion von PTEN aus Maus, Ratte und Mensch in *Western Blot*, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz. Einsatz WB 1:500.
- SHIP-2 (G-20), sc-14504, von Santa Cruz Biotechnology, polyklonales IgG aus Ziege, 200 µg/mL, gerichtet gegen den C-Terminus von SHIP2 aus Mensch. Empfohlen für die Detektion von SHIP2 aus Maus, Ratte und Mensch in *Western Blot*, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und ELISA. Einsatz WB 1:200.
- Anti-GST Antibody, GE Healthcare Lifesciences (Uppsala, Schweden), polyklonales Ig aus Ziege, gerichtet gegen GST aus Schistosoma. Kreuz-absorbiert an *E.coli*-Proteine. Erkennt mehrere Epitope von GST. Einsatz WB 1:3000.
- HSC 70 (B-6), sc-7298, von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG_{2a} aus Maus, 200 µg/mL, gerichtet gegen Aminosäuren 580-601 von menschlichem HSC 70. Empfohlen zur Detektion von HSC 70 aus Maus, Ratte und Mensch in *Western Blot*, Immunpräzipitation Immunfluoreszenz, Immunhistochemie, Durchflusszytometrie und ELISA. Einsatz WB 1:5000.
- GAPDH (6C5), sc-32233, von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG₁ aus Maus, 100 µg/mL, gerichtet gegen GAPDH aus Kaninchenmuskel. Empfohlen zur Detektion von GAPDH aus Maus, Ratte und Mensch in *Western Blot*, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz. Einsatz WB 1:3000-1:6000.
- OKT3, monoklonales IgG_{2a}, 1 mg/mL, gerichtet gegen CD3 des TCR-Komplexes (VAN WAUWE et al., 1980). Stimuliert T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität. OKT3 wurde freundlicherweise von Dr. Ralf Fliegert aus der AG von Prof. Dr. Andreas Guse zur Verfügung gestellt.
- p-Tyr (PY99), sc-7020, von Santa Cruz Biotechnology, monoklonales IgG_{2b} aus Maus, 200 µg/mL, gerichtet gegen Phosphotyrosinreste. Zeigt keine Kreuzreaktion mit Phosphoserin oder Phosphothreonin. Empfohlen zur Detektion von

tyrosinphosphorylierten Proteinen in *Western Blot*, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie. Einsatz WB 1:2000.

- IL-3/IL-5/GM-CSFR β (C-20), sc-675, von Santa Cruz Biotechnology, polyklonales IgG aus Kaninchen, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gerichtet gegen den C-Terminus des IL-3/IL-5/GM-CSFR β aus Mensch. Empfohlen zur Detektion von IL-3/IL-5/GM-CSFR β aus Mensch in *Western Blot*, Immunpräzipitation, Immunfluoreszenz und ELISA. Einsatz WB 1:500.
- Anti-SHC, von Upstate Biotechnology (Waltham, MA, USA), polyklonales IgG aus Kaninchen, 1 mg/mL , gerichtet gegen AS 366-47 der humanen SHC-SH2-Domäne. Empfohlen zur Detektion der 46 kD-, 52 kD- und 66 kD-SHC-Isoformen aus Mensch, Maus und Ratte in *Western Blot* und Immunpräzipitation. Einsatz WB 1:1000.
- *Strep*MAB-HRP-Konjugat, 2-1509-001, von IBA BioTAGnology (Göttingen), monoklonales IgG₁ aus Maus, gerichtet gegen *Strep*-tag II. Empfohlen zur Detektion von *Strep*-tag II-Fusionsproteinen im *Western Blot* ohne das Erfordernis eines Zweitantikörpers. Einsatz WB 1:5000.
- Phospho-SHIP1 (Tyr1020) Antibody von Cell Signaling, polyklonales Ig aus Kaninchen, gerichtet gegen ein synthetisches Phosphopeptid, das den Resten um Y1020 von murinem SHIP1 entspricht. Erkennt SHIP1 nur, wenn an Y1020 von murinem SHIP1 (oder Y1021 von humanem SHIP1) phosphoryliert. Empfohlen zur Detektion von p145 pSHIP1 aus Maus und Mensch im *Western Blot*. Einsatz WB 1:1000.

3.1.2.2 Sekundäre Antikörper

- Anti-Maus IgG, aus Ziege, HRP-konjugiert, sc-2055, von Santa Cruz Biotechnology, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, präadsorbiert mit humanem IgG. Empfohlen für *Western Blot* von Immunglobulin-reichen Geweben und Zellen. Einsatz WB 1:5000.
- Anti-Kaninchen IgG aus Ziege, HRP-konjugiert, sc-2054, von Santa Cruz Biotechnology, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, präadsorbiert mit humanem und murinem IgG. Empfohlen für *Western Blot* von Immunglobulin-reichen Geweben und Zellen. Einsatz WB 1:5000.
- Anti-Ziege IgG (H+L), aus Kaninchen, HRP-konjugiert, von Southern Biotech (Birmingham, AL, USA), absorbiert gegen humane Immunglobuline. Einsatz WB 1:5000.

3.1.3 Genomische DNA von AML-Proben und gesunden Spendern

Genomische DNA von 97 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) sowie von 16 gesunden Spendern wurde mir vom Kinderkrebs-Zentrum Hamburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Horstmann zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Zelllinien

3.1.4.1 Phoenix (Φ NX) Ampho-Zellen und Phoenix gp-Zellen

Phoenix Ampho ist eine Retroviren-Verpackungszelllinie der zweiten Generation für die Herstellung amphotroper Retroviren. Die Zelllinie basiert auf der HEK293T-Zelllinie (*human embryonic kidney*, die mit Adenovirus E1a transformiert wurde (GRAHAM et al., 1977) und ein temperatursensitives T-Antigen trägt, das mit Neomycin co-selektiert wurde).

Möglicherweise sind die Zellen nicht Nieren-, sondern neuronalen Ursprungs (SHAW et al., 2002).

Das Besondere dieser Zellen ist die hohe Transfektionsrate von bis zu 50% oder mehr. Die Linie trägt Konstrukte für die Produktion von gag-pol (*group-specific antigen; polymerase*) (Co-Selektionsmarker Hygromycin) sowie für env (*envelope*, Hüllprotein) für amphotrope Viren (Co-Selektionsmarker Diphtherieresistenz). Phoenix gag-pol exprimieren nur gag und pol. Da ein IRES-CD8 *downstream* des gag-pol-Leserahmen liegt, kann die gag-pol-Expression durch Durchflusszytometrie verfolgt werden. Für sowohl das gag-pol- wie auch das env-Konstrukt wurden nicht-Moloney-Promotor verwendet, um das Rekombinationspotential zu vermindern. Die Linie produziert keine Helferviren. Phoenix Ampho ist in der Lage, Episomen für die stabile Langzeit-Virenproduktion zu tragen (SWIFT et al., 2001).

Die Zellen zeigen eine epitheloide Morphologie und wachsen adhärent. Sie zeigen bei Erreichen der Konfluenz keine Kontaktinhibition, sondern wachsen in Inseln oder Klumpen weiter.

Die Zellen wurden verwendet für die Pseudotypisierung mit dem konstitutiv exprimierten Hüllprotein des amphotropen Virus Klon 4070A sowie dem G-Protein des Vesikuläre

Stomatitis Virus (VSV-G), das durch transiente Transfektion in die Helferzelllinie eingebracht wird (VSV-G ist toxisch).

3.1.4.2 Jurkat und Jurkat Tet-On

Jurkat ist eine humane T-Zelllinie und wurde in den 1970er Jahren aus peripherem Blut eines 14jährigen Jungen mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert und ursprünglich JM, nach dem Patienten, genannt (SCHNEIDER et al., 1977). Jurkat-Zellen exprimieren kein SHIP1 (BRUYNS et al., 1999; FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; GLOIRE et al., 2006; LO et al., 2009), kein SHIP2 (BRUYNS et al., 1999; GLOIRE et al., 2006) und kein PTEN (FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; LO et al., 2009; SAKAI et al., 1998; SHAN et al., 2000) aufgrund inaktivierender Mutationen (LO et al., 2009; SAKAI et al., 1998), siehe auch 2.16.

Jurkat Tet-On (Clontech, Mountain View, CA, USA) exprimieren den reversen tet-Transaktivator (siehe auch 3.2.11.8). Beide Zelllinien sind Suspensionszellen und wurden von der AG von Prof. Dr. Andreas Guse zur Verfügung gestellt.

3.1.4.3 TF-1 I33-5

Die TF-1-Zelllinie ist eine humane Erythroleukämie-Zelllinie und wurde aus dem Knochenmark eines 35jährigen Mannes mit Erythroleukämie etabliert (KITAMURA et al., 1989). Sie proliferiert abhängig von GM-CSF oder IL-3. TF-1 ist eine Suspensionszelllinie, die Neigung zur Adhäsion zeigt. Die Mutante TF-1 I33-5 proliferiert GM-CSF-unabhängig (HORN et al., 2003).

3.1.4.4 FDC-P1

FDC-P1 ist eine murine myeloische Vorläuferzelllinie, die aus Langzeitkulturen von Knochenmarkszellen des Maus-Stamms DBA/2 in mit Überstand von WEHI-3-Zellen konditioniertem Medium erhalten wurde (DEXTER et al., 1980). Sie ist eine Suspensionszelllinie und proliferiert IL-3-abhängig.

3.1.5 Bakterienstämme

3.1.5.1 DH10B

Der *E.coli*-Stamm DH10B (CASADABAN et al., 1980) hat folgenden Genotyp: *F' endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ* (GRANT et al., 1990). Er ist geeignet für die Klonierung von DNA, die methylierte Cytosine oder Adenine enthält, sowie für *Blue/White-Screening*.

3.1.5.2 XL10-Gold ultrakompetent

Der *E.coli*-Stamm XL10 Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) hat folgenden Genotyp: *Tet^RΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]*. Er ist abgeleitet von XL2-Blue MRF⁺ und besitzt eine 5mal höhere Transformationseffizienz als XL1 Blue-Zellen. Außerdem hat er den Hte-Phänotyp, der die Transformationseffizienz von ligierter DNA und großen Plasmiden erhöht. XL10-Gold-Zellen sind sowohl Endonuklease-defizient (*endA1*) als auch Rekombinase-defizient (*recA*). Die *endA1*-Mutation verbessert die Qualität von Plasmid-Minipräparation-DNA und die *recA*-Mutation gewährleistet Insert-Stabilität. Die McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr- und HsdR-Systeme wurden aus XL10-Gold entfernt. Die *mcrA*-, *mcrCB*- und *mrr*-Mutationen unterbinden das Schneiden klonierter DNA, die Cytosin- und/oder Adenin-Methylierung trägt, was häufig in eukaryontischer DNA vorkommt. Die McrA- und McrCB-Systeme erkennen und schneiden DNA-Sequenzen mit methyliertem Cytosin, das Mrr-System erkennt und schneidet DNA-Sequenzen mit methyliertem Adenin. Es schneidet auch DNA-Sequenzen mit methyliertem Cytosin, jedoch mit einer anderen Spezifität als die McrA- und McrCB-Systeme – diese Aktivität heißt McrF. Die McrF-Aktivität gegenüber methyliertem Cytosin ist ebenso hoch oder höher wie die von McrA und McrCB. Die *hsdR*-Mutation verhindert das Schneiden klonierter DNA durch das *EcoK* (*hsdR*)-Endonuklease-System.

XL10-Gold-Zellen wachsen schneller als XL1- oder XL2-Blue-Zellen, was in größeren Kolonien resultiert. Um *Blue/White-Screening* zu ermöglichen, enthalten die XL10-Gold-Zellen das *lacIqZΔM15*-Gen auf dem F'-Episom.

3.1.5.3 BL21 (DE3) pLysS pREP4

Der *E.coli*-Stamm BL21 (STUDIER and MOFFATT, 1986; WOOD, 1966) pLysS pREP4 hat folgenden Genotyp: $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3) pLysS(Cam^R) pREP4(Kan^R)$. Er enthält DE3, einen λ -Prophagen, der das Gen für die T7 RNA-Polymerase (DAVANLOO et al., 1984) unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt. Außerdem besitzen sie *lacI^q* (*Lac repressor I – high quantity*) für die Überproduktion des *lac*-Repressors. Zusätzlich wird *lacI* konstitutiv von pREP4 transkribiert. Transformierte Plasmide mit T7 Promotor-basierter Expression werden reprimiert, bis IPTG die Expression der T7 Polymerase vom *lacUV5*-Promotor induziert. Das pLysS-Plasmid codiert T7 Phage-Lysozym, einen Inhibitor der T7 RNA-Polymerase, der die Expression von transformierten T7 Promotor-enthaltenden Plasmiden reduziert bis eliminiert, sofern nicht induziert wurde. Das Vorhandensein von pLys-Plasmiden hat neben der Kontrolle der T7-RNA-Polymerase den Vorteil, dass durch die hohe Konzentration an Lysozym ein Zellaufschluss durch einfaches Einfrieren und Auftauen des Zellpellets erfolgen kann (LOTTSPREICH et al., 2006). Dem Stamm fehlen sowohl die *ompT*-Protease der äußeren Zellmembran als auch die *lon*-Protease, die Proteine während der Aufreinigung degradieren können (GRODBERG and DUNN, 1988).

3.1.6 Vektoren

- pASK-IBA5plus (IBA, Göttingen))
für die Expression von SHIP1 mit N-terminalem *Strep*-tag II in *E.Coli* BL21 (DE3) pLysS pREP4. Der pASK-IBA5plus-SHIP1-Vektor wurde von der AG von Dr. Manfred Jücker zur Verfügung gestellt.
- pLTR-tet-SV-HPH und pLTR-tet-SHIP1-SV-HPH (HORN et al., 2004)
 γ -retroviraler Vektor mit einem TRE (*tet response element*) im 3'-LTR für die Doxycyclin-induzierbare Expression nach Integration ins Genom und Hygromycin-Resistenzgen unter SV40-Promotor-Kontrolle. SHIP1 über BamHI-Schnittstelle eingefügt.
- M57 SV40 gagpol
Codiert γ -retrovirale gag- und pol-Proteine uner SV40-Promotor-Kontrolle.

- K25-2 pHCMV-A-MLVenv
Codiert amphotropes murines Leukämievirus Hüllprotein unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus.
- M75 pHCMV-VSV-G
Codiert Vesikuläre Stomatitis Virus G Hüllprotein.
- pGEX-5X-1 (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Schweden)
pGEX-5X-1-SHIP1-SH2 WT/F28L/R31Q wurden verwendet zur IPTG-induzierbaren Expression eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) N-terminal und der humanen SHIP1-SH2-Domäne (AS 5-103) C-terminal, und zwar des WT, der Mutanten F28L (LUO et al., 2004) und der Mutanten R31Q (LAMKIN et al., 1997; MASON et al., 2000; RAMEH et al., 1995) als Kontrolle. Nukleotide 11-309 der codierenden Sequenz von humanem SHIP1 sind in diesem Konstrukt 5' in die BamHI-Schnittstelle und 3' in die Sall-Schnittstelle der MCS des Vektors eingefügt. Die Expression steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Der *tac*-Promotor ist ein Hybridpromotor aus *lac*- und *trp*-Promotor. Er vereint die hohe Transkriptionseffizienz des *trp*-Promotors mit der einfachen Induzierbarkeit des *lac*-Promotors (LOTTSPEICH et al., 2006).
Ein internes *LacI^q* (*Lac repressor I high quantity*)-Gen zur Expression des Lac-Repressors ermöglicht die Fusionsproteinexpression in jedem *E. coli*-Wirtsstamm. Mit Faktor Xa kann der GST-Anteil des Fusionsproteins abgespalten werden.
pGEX-5X-1-SHIP1-SH2 WT und pGEX-5X-1-SHIP1-SH2 R31Q wurden mir von der AG von Dr. Manfred Jücker zur Verfügung gestellt, F28L per Mutagenese (siehe 3.2.5) generiert.
- pGEX-2T (GE Healthcare Lifesciences, Uppsala, Schweden)
pGEX-2T-Grb2-SH3(N) und pGEX-2T-Grb2-SH3(C) (PENDERGAST et al., 1993; SKOLNIK et al., 1993) wurden verwendet zur IPTG-induzierbaren Expression eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) (N-terminal) und der N-terminalen SH3-Domäne (AS 4-55) bzw. der C-terminalen SH3-Domäne (AS 154-217) von humanem Grb2. Die Expression steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Ein internes *LacI^q* (*Lac repressor I high quantity*)-Gen zur Expression des Lac-Repressors ermöglicht die Fusionsproteinexpression in jedem *E. coli*-Wirtsstamm. Mit Thrombin kann der GST-Anteil des Fusionsproteins abgespalten werden.
pGEX-2T-Grb2-SH3(N) und pGEX-2T-Grb2-SH3(C) wurden mir von Dr. Manfred Jücker zur Verfügung gestellt.

3.1.7 Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

3.1.7.1 Mutagenese-Primer

Mutagenese-Primer wurden nach folgenden Kriterien, entsprechend dem Handbuch des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA), entworfen:

- ✓ beide Primer (FP und RP) müssen die gewünschte Mutation enthalten und zu der gleichen Sequenz auf gegenüberliegenden Strängen des Plasmids annealen.
- ✓ $T_m \geq 75^\circ\text{C}$
- ✓ Primerlänge zwischen 25 und 45 Basen, wobei die Mutation in der Mitte der Primer liegen soll
- ✓ GC-Gehalt von mindestens 40%
- ✓ Am 3'-Ende ein oder mehrere G oder C

Die Schmelztemperatur T_m , bei der 50% der Primer-Template- bzw. FP-RP-Doppelhelix in denaturiertem Zustand, sprich einzelsträngig vorliegen, wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%Mismatch$$

wobei %GC und %Mismatch ganze Zahlen und N die Primerlänge in Basen sind.

Tab. 3.1: Mutagenese-Primer. Die *Mismatches* sind rot gekennzeichnet.

Sequenz 5'-3'	Position in SHIP1 codierender Sequenz	Orientierung	Länge	Name	Verwendung
CCTGAGGAGGACACAGAAAGTGC GTGTC	334-362	FP	29	SHIP1-FP 847-875	Deletion von V117
GACACGACACTTTCTGTGCCTCCTCAGG	334-362	RP	29	SHIP1-RP 875-847	Deletion von V117
CAAGGACGGGAGC C TCCTCGTGCGTG	69-94	FP	26	SHIP FP F28L	Mutation F28L

3 Material und Methoden

CACGCACGAGGAGGCTCCCGTCCTTG	69-94	RP	26	SHIP RP F28L	Mutation F28L
GGGAGCTTCCTCGTGCAGGCCAGCGAGTCCATC	71-108	FP	34	SHIP1-FP mut 587-620	Mutation R31Q
GATGGACTCGCTGGCCTGCACGAGGAAGCTCCC	71-108	RP	34	SHIP1-RP mut 620-587	Mutation R31Q
AGGACACAGAAAGTGTCATGTCTCCACCCGAGCTG	341-375	FP	35	SHIP FP V120M	Mutation V120M
CAGCTCGGGTGGAGACATGACACTTTCTGTGCCT	341-375	RP	35	SHIP RP V120M	Mutation V120M
CCGAGACCAGCCAGCCGAGCCTCTCC	455-480	FP	26	SHIP FP R156Q	Mutation R156Q
GGAGAGGCTCGGCTGGCTGGTCTCGG	455-480	RP	26	SHIP RP R156Q	Mutation R156Q
CCGAGCCTCTCCGAGCCATTGTTCCAGCGACTG	469-501	FP	33	SHIP1-FP 983-1014	Mutation T162P
CAGTCGCTGGAACAATGGCTCGGAGAGGCTCGG	469-501	RP	33	SHIP1-RP 983-1014	Mutation T162P
CTTCCTCACCTGAAGAGACTGACCACACTGCTC	613-645	FP	33	SHIP FP K210R	Mutation K210R
GAGCAGTGTGGTCAGTCTCTTCAGGTGAGGAAG	613-645	RP	33	SHIP RP K210R	Mutation K210R
TATGGAGAAGTCATCTGGACCCTCCCATCCC	658-688	FP	31	SHIP1 FP 1170-200	Mutation R225W
GGGATGGGAGGGTCCAGATGACTTCTCCATA	658-688	RP	31	SHIP1 RP1200-170	Mutation R225W
CCACATCTGTA CTGACGACGTGAAGACAGGC	1506-1536	FP	31	SHIP FP N508D	Mutation N508D
GCCTGTCTTCACGTGTCAGTACAGATGTGG	1506-1536	RP	31	SHIP RP N508D	Mutation N508D
CGTTTGCCCCAACCCACCGTTTTGAGAGAC	1913-1942	FP	30	SHIP FP Y643H	Mutation Y643H
GTCTCTCAAACGGTGGTTGGGGCAAACG	1913-1942	RP	30	SHIP FP Y643H	Mutation Y643H
TTGCCTTCCTGGTGTGCCGAGTCTCTGGAAG	1999-2031	FP		SHIP mut D672A FP	Mutation D672A
CTTCCAGAGGACTCGGGCACACCAGGAAGGCAA	1999-2031	RP	33	SHIP mut D672A RP	Mutation D672A
TCCCCTGGTGCACGAGGTGTGTCAGTCTTATG	2037-2068	FP	32	SHIP FP V684E	Mutation V684E
CATAAGACTGACACACCTCGTGCACCAGGGGA	2037-2068	RP	32	SHIP RP V684E	Mutation V684E
GAAGGACCAGGAATCCTCCAAAATGCCGCG	3099-3028	FP	30	SHIP FP P1039S	Mutation P1039S

CGCGGCATTTTGGAGGATTCTGGTCCTTC	3099-3028	RP	30	SHIP RP P1039S	Mutation P1039S
GAATCCCCAAAATGCTGCGGAAGGAACCCC	3109-3139	FP	31	SHIP FP P1042L	Mutation P1042L
GGGGTTCCTTCCGCAAGCATTGTTGGGGGATTC	3109-3139	RP	31	SHIP RP P1042L	Mutation P1042L
GGGCCCGGCAAGTAGGTGCCCGCGC	3214-3238	FP	25	SHIP FP Q1076X	Mutation Q1076X
GCGCGGGCACCTACTTGCCGGGCC	3214-3238	RP	25	SHIP RP Q1076X	Mutation Q1076X
GTGCTGCACCTCTGCACTCCAAGGGC	3445-3471	FP	27	SHIP FP Q1154L	Mutation Q1153L
GCCCTTGAGTGCAGGAGGTGCAGCAC	3445-3471	RP	27	SHIP RP Q1154L	Mutation Q1153L
CAACACCGAGCTCCCGTATCACGGCAAGCACCG	3486-3518	FP	33	SHIP FP H1168Y	Mutation H1168Y
CGGTGCTTGCCGTGATACGGGAGCTCGGTGTTG	3486-3518	RP	33	SHIP RP H1168Y	Mutation H1168Y

3.1.7.2 Sequenzierungs-Primer

Sequenzierungsprimer wurden nach folgenden Kriterien entworfen:

- ✓ Primerlänge zwischen 18 und 25 Basen
- ✓ GC-Gehalt von 40-60%
- ✓ Cluster von mehr als 3-4 Basen (v.a. G) sind zu vermeiden
- ✓ 3'-Ende soll stärker hybridisieren als 5'-Ende (Vermeidung von mehreren T an 3')
- ✓ Primer dürfen keine selbst-komplementierenden Sequenzen (Palindrome) aufweisen

Tab. 3.2: Sequenzierungs-Primer.

Sequenz 5'-3'	Position in SHIP1 codierender Sequenz	Orientierung	Länge	Name
TTCCTCGTGCGTGCCAGCGAGTCC	82-105	FP	24	SHIP FP 594-617
TCCAGCTTGGTGAAGAACCTCATGG	215-239	RP	25	SHIP RP 751-727
TTACAAGAAGGAAAACATGGGGC	255-277	FP	23	SHIP1 FP 767-789

ATCCCGCTGACTGCCAGCTCCTGTG	388-412	FP	25	SHIP FP 900-924
GAGGTTCCCTTTTCAAACGAGAATC	421-445	FP	25	SHIP-FP 933
GTCTCTGCAGAGGTTATTTGACCAG	693-717	FP	25	SHIP-FP 1205
TCTCTGCAGAGGTTATTTGACCAGC	694-718	FP	25	SHIP FP 1206-30
TGATCTTGGTGGAAACAGAGAAGG	1070-1093	FP	24	SHIP FP1582-1605
GGTGGAAACAGAGAAGGAGAAGATC	1077-1101	FP	25	SHIP-FP 1589
AACACTCCCTGCAAGAAATCACCAG	1394-1418	FP	25	SHIP FP 1906-30
CACCAGTGTGACTTTTAAAACAGTC	1413-1437	FP	25	SHIP-FP 1925
TTAACTACCGTGTGGATCTGCCTAC	1760-1784	FP	25	SHIP FP 2272
TACCTGGGAGGCAGAAACCATCATC	1782-1806	FP	25	SHIP FP2294-2318
AGATTGAGTTTCTCAGGTGCTATGC	2186-2210	FP	25	SHIP-FP 2698
TGCATTGCCCTTCGGTTAGAGGCC	2452-2475	FP	24	SHIP FP 2964-87
TCCAGCATCACTGAAATCATCAACC	2710-2734	FP	25	SHIP FP 3222-46
CTGAAATCATCAACCCCAACTACAT	2720-2744	FP	25	SHIP-FP 3232
AAGAACGCAGGGGACACGCTGC	2989-3010	FP	22	SHIP FP 3501-23
ACGCTGCCTCAGGAGGACCTGCCGC	3004-3028	FP	25	SHIP FP 3516-40
TCAGGAGGACCTGCCGCTGACG	3012-3033	FP	22	SHIP FP3524-45
AAGCCCGAGATGTTTGAGAACCCCC	3034-3058	FP	25	SHIP FP3546-70
GGCGGGGACAAGAGCCAAGGGAAGC	3289-3313	FP	25	SHIP-FP 3801
ACAAGAGCCAAGGGAAGCCCAAGAC	3291-3320	FP	25	SHIP FP 3808-32

3.1.7.3 Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung genomischer DNA

Die Sequenz der Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung von Exon 26 in genomischer DNA von 97 AML und 16 Gesunden wurde von AMGEN (Thousand Oaks, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Primer zur Amplifizierung und Sequenzierung von Exon 4 und

Exon 6 in genomischer DNA von zwei bzw. einer AML wurden von der AG von Prof. Dr. Martin Horstmann vom Kinderkrebs-Zentrum Hamburg zur Verfügung gestellt.

Für die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung in der SHIP1-Sequenz, die in Jurkat Tet-On-Klonen hineintransduziert worden war (siehe 3.2.11.6), wurden Intron-überspannende Primer entworfen, um selektiv die hineintransduzierte SHIP1-Sequenz, nicht aber die Sequenz des endogenen, nicht-exprimierten SHIP1-Gens zu erhalten. Hierbei wird ausgenutzt, dass eine cDNA-Sequenz transduziert wurde (enthält keine Introns). Der 5'-Anteil des Primers liegt im 3'-Bereich des einen Exons, der 3'-Bereich des Primers liegt im 5'-Bereich des benachbarten Exons. Die Sequenzen einiger verwendeter Primer liegen auch inmitten eines Exons; zwischen den Bindungsstellen eines Primerpaares liegt dann aber mindestens ein Intron.

Tab. 3.3: Primer zur Amplifizierung genomischer DNA.

Sequenz 5'-3'	Position in SHIP1 codierender Sequenz	Orientierung	Länge	Name	Verwendung
CATTAAGCAGCCATGCTCCCATGTCTTC	Exon 26 -70 bis -43	FP	28	SHIP FP Exon26	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 26
ATGGAGCAGTCCCAGGACCATCACTC	Exon 26 +151 bis +177	RP	27	SHIP RP Exon26	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 26
ACAAGAGCCAAGGGAAGCCCAAGAC	3291-3320	FP	25	SHIP FP 3808-32	Sequenzierung von SHIP1 Exon 26, Bestätigung Mutation en Q1153L und H1168Y
ACGCAGATGGAGATCAATAACGTG	Exon 4	FP	24	Ex 4 F	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 4
TCACCAGGCCATAACTAGGATC	Exon 4	RP	23	Ex 4 R	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 4
TCATCTCTGGCTAGAGCCCGTGC	Exon 6	FP	23	Ex 6 F	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 6
TCAGGACTGGCTAACTCAATCC	Exon 6	RP	22	Ex 6 R	Amplifizierung und Sequenzierung von SHIP1 Exon 6
GTCTTCCTACACTTCGAGGAGGAAG	1882-1906	FP	25	SHIP FP 2395-2419	Exon16-Exon17-überspannend Bestätigung Mutation D672A
TACCTGGGAGGCAGAAACCATCATC	1782-1806	FP	25	SHIP FP 2294-2318	Exon15-Exon16-überspannend Bestätigung Mutation Y643H
GTCGCTGGTACTGCCATAAGACTGA	2058-2082	RP	25	SHIP RP 2571-95	Exon18-Exon19-überspannend Bestätigung Mutation D672A

3 Material und Methoden

ACACTTCGAGGAGGAAGAAATCACG	1890-1914	FP	25	SHIP FP 2403-27	Exon16-Exon17-überspannend Bestätigung Mutationen D672A und V684E
CTCTTGACAAAACCTCTCCAAGCAGC	2261-2285	RP	25	SHIP RP 2774-98	Exon20-Exon21-überspannend Bestätigung Mutationen Y643H, D672A, V684E
GACACCAGTGGGCTTCCAGAAGAGC	511-535	FP	25	SHIP FP 1024-48	Exon4-Exon5-überspannend Bestätigung Mutation R225W
TTGGCCTCACCAGGAACCTGAGGAC	743-767	RP	25	SHIP RP 1256-80	Exon6-Exon7-überspannend Bestätigung Mutation R225W
AGCTCACTGAGGGCTTCACTGCATG	3558-Stopp +15	RP	25	SHIP RP 4071-95	Exon26-Exon27-überspannend Bestätigung Mutationen Q1153L und H1168Y
CGCTGACTGCCAGCTCCT	392-409	FP	18	SHIP FP 392-409	In Exon4 Bestätigung Mutation T162P
CTGGGCGAGCTGAGTGCT	562-598	RP	18	SHIP RP 562-598	In Exon5 Bestätigung Mutation T162P
ATGGACACCAGTGGGCTTCC	508-527	FP	20	SHIP FP 508-527	Exon4-Exon5-überspannend Bestätigung Mutation K210R
AGGAACCTGAGGACGTGGAC	737-756	RP	20	SHIP RP 737-756	Exon6-Exon7-überspannend Bestätigung Mutation K210R
AGGAGGACACAGAAAGTGTCGT	338-359	FP	22	SHIP FP 338-359	Exon3-Exon4-überspannend Bestätigung Mutationen R156Q, T162P
GATGACTTCTCCATAGAGCTCC	651-672	RP	22	SHIP RP 651-672	Exon5-Exon6-überspannend Bestätigung Mutationen V120M, R156Q, T162P
TAAACAGTCGCCATCCACA	1428-1447	FP	20	SHIP FP 1428-1447	Exon12-Exon13-überspannend Bestätigung Mutation N508D
TTTGGTTTCGCCTGAGTTTC	1641-1660	RP	20	SHIP RP- 1641-1660	Exon14-Exon15-überspannend Bestätigung Mutation N508D
CTGGAACCATGGCAACATCAC	12-32	FP	21	SHIP FP 12-32	In Exon1 Bestätigung Mutationen F28L und V120M
ACGACACTTCTGTGTCCTCCT	338-359	RP	22	SHIP RP 338-359	Exon3-Exon4-überspannend Bestätigung Mutation F28L
GAGTCAAGGCCAGTGACCT	2965-2984	FP	20	SHIP FP 2965-84	Exon25-Exon26-überspannend Bestätigung Mutationen P1039S, 1042L, Q1076X
CTGAGGGCTTCACTGCATGG	3557-Stopp +9	RP	20	SHIP RP 3557-76	Exon26-Exon27-überspannend Bestätigung Mutationen P1039S, P1042L, Q1076X

3.1.8 Geräte

Protein-Gelelektrophoresekammern	SE 600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 16 cm (Hoefer, MA, USA) SE 640 Wide-Mini Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 8 cm ² (Hoefer, MA, USA) PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, München) XCell <i>SureLock</i> Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
DNA-Gelelektrophoresekammern	(MWG Biotech, Ebersberg)
Blotkammer	Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München)
Geltrockner	GelAir Dryer (Bio-Rad, München)
Horizontalschüttler	Schüttelmaschine RO 10 (Gerhardt, Königswinter)
Schüttelinkubator	G25 Incubator shaker (New Brunswick scientific, Edison, NJ, USA) Aerotron (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)
Wipptisch	Rocky N (Fröbel Labortechnik, Lindau)
Heizblöcke	STK Schnipptherm (Schutron Labortechnik, Quedlinburg) Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Stromversorgungsgeräte	Electrophoresis Power Supply EPS 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) PowerPac 200 (Bio-Rad, München) PowerPac 1000 (Bio-Rad, München) PowerPac Universal (Bio-Rad, München)
Mikrowelle	R-3A55 (Sharp, Hamburg)
Zentrifugen	Galaxy Mini (VWR, Darmstadt) Biofuge pico (Heraeus, Hanau) Sorvall RC-5B refrigerated superspeed Centrifuge (DuPont Instruments, Cincinnati, OH,

		USA)
		5415 C (Eppendorf, Hamburg)
		5415 R (Eppendorf, Hamburg)
		Varifuge OR.3 (Heraeus, Hanau)
Rotoren		Sorvall GSA (DuPont Instruments, Cincinnati, OH, USA)
		Sorvall SS-34 (DuPont Instruments, Cincinnati, OH, USA)
Thermocycler		Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)
		T3 (Biometra, Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer		IKAMAG RH (IKA-Werke, Staufen)
		MR 1 (Heidolph Instruments, Schwabach)
pH-Meter		CG 820 (Schott-Geräte, Ludwigshafen)
pH-Elektrode		pH-Electrode Sentix 21 (WTW, Weilheim)
Brutschränke	Bakterien:	BE 400 (Mettler, Schwabach)
	Zellkultur:	(Heraeus, Hanau)
Werkbänke	Bakterien:	Typ 20229 (MDH, Saskatoon, Saskatchewan Canada)
	Zellkultur:	HERA safe Type HS 12 (Heraeus, Hanau)
Photometer		Ultrospec III (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
		Flow Titertek Multiskan PLUS Mk 11 (ICN Biomedicals, Frankfurt)
		BioPhotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg)
		mit Thermodrucker DPU 414 (Seiko Instruments, Neu-Isenburg)
Waagen		Type PM 200 (Mettler Instrumente, Gießen)
		Type PM 2000 (Mettler Instrumente, Gießen)
Spritze für Probenauftrag		Exmine Micro Syringe MS-100 (Carl Roth, Karlsruhe)
Vortexer		MS2 Minishaker (IKA-Werk, Staufen)
Zählkammer		(Neubauer)
Wasserbäder		Typ 1012 (GFL, Burgwedel)
		Typ 1002 (GFL, Burgwedel)

Sonifiziergerät	Sonopuls GM70 mit Stab UW70 (Bandelin electronic, Berlin)
Ultraschallbad mit Flüssigkühlung	G. Heinemann (Schwäbisch-Gmünd)
UV-Tisch	IL-350-M (Bachofer, Reutlingen) mit Video Monitor WV-BM900 (Panasonic), Video Graphic Printer UP-890CE, (Sony) FMC (Kappa)
Luminescent Image Analyzer mit CCD-Kamera	LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf)
Mikroskope	Labovert Typ 090-122.012 (Leitz, Wetzlar) Axiovert 25 (Zeiss, Jena) mit Stromversorgungsgerät mbq 52 ac

3.1.9 Gefäße und Verbrauchsmaterial

0,5 ml-Reaktionsgefäße	(Biozym)
1,5 ml-Reaktionsgefäße	(Eppendorf; Sarstedt)
2,0 ml-Reaktionsgefäße	(Eppendorf)
1000 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf; Sarstedt)
200 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf; Sarstedt)
10 µL-Pipettenspitzen	(Eppendorf; Sarstedt)
2,5 µL-Pipettenspitzen	(Biozym)
13 mL Röhrchen	(Greiner bio-one)
15 mL-Röhrchen	(Greiner bio-one, Sarstedt)
50 mL-Röhrchen	(Greiner bio-one, Sarstedt)
50 mL/25 cm ² Zellkulturflaschen	(Greiner bio-one; Sarstedt)
250 mL/75 cm ² Zellkulturflaschen	(Greiner bio-one; Sarstedt)
650 mL/175 cm ² Zellkulturflaschen	(Sarstedt)
6-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
12-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
24-Loch-Platten	(Greiner bio-one)
96-Loch-Platten	(Greiner bio-one)

Petrischalen für Gewebekulturen 94/16 mm	(Greiner bio-one)
Petrischalen für Bakterien	(Sarstedt)
5 mL-/10 mL-/25 mL-Plastikpipetten	(BD Falcon)
Plastikgefäße	(VWR; Vitlab)
Glasgeräte	(Schott; VWR)
Parafilm	(Pechiney Plastic Packaging)

Pechiney Plastic Packaging: Chicago, IL, USA

Vitlab: Großostheim

Schott: Mainz

Greiner bio-one: Frickenhausen

Sarstedt: Nümbrecht

Eppendorf: Hamburg

VWR: Darmstadt

Biozym: Hessisch Oldendorf

3.2 Methoden

3.2.1 Gelelektrophorese

3.2.1.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA wurde im Verhältnis 1:5 mit 6x Ladepuffer (30% Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol) versetzt und in horizontalen Gelen (0,6%-2,0% Agarose, 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, 200 ng/mL Ethidiumbromid) bei 80-120 V aufgetrennt und unter UV-Licht (312 nm) detektiert. Als Marker dienten 0,5 µg Lambda DNA/HindIII Marker, 2 (Fermentas, St. Leon-Rot) mit 4 µL TE-Puffer und 1 µL 6x Ladepuffer, 2 µg 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) mit 8 µL ddH₂O und 2 µL 6x Ladepuffer oder, insbesondere für Quantifizierungen, 5 µL HyperLadder I (Bioline, London, UK). Der Lambda DNA/HindIII Marker, 2 wurde vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min bei 65°C erhitzt, um die kohäsiven Enden der Phagen-DNA voneinander zu trennen.

3.2.1.2 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Proteine wurden in vertikalen Gelen nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Zonenelektrophorese aufgetrennt (ANDREWS, 1986; DAVIS, 1964; ORNSTEIN, 1964). Dazu wurden Trenngele (8-12% Acrylamid, 0,2-0,3% N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8; 0,07% (v/v) TEMED, 0,07% (w/v) APS zur Polymerisation) gegossen und mit ddH₂O oder Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Flüssigkeit abgegossen und anschließend das Sammelgel (375 mM Tris/HCl, 4% Acrylamid, 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,7; 0,07% (v/v) TEMED, 0,14% (w/v) APS zur Polymerisation) auf das Trenngel gegossen und Kämme eingesteckt. Laufpuffer (Kathoden- und Anodenpuffer) war 192mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS.

Die Taschen wurden vor dem Probenauftrag mit Kathodenpuffer gespült.

3x SDS-Probenpuffer (0,1875 M Tris, 6% (w/v) SDS, 30% Glycerin, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 0,3 M DTT, pH 6,8) oder 1x SDS-Probenpuffer (0,0625 M Tris, 2% (w/v) SDS, 10% Glycerin, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M DTT, pH 6,8 [für Marker, Immunpräzipitation oder *Pull-Downs*]) wurde zu den Proben gegeben, dabei das DTT frisch zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min bei 100°C erhitzt. Als Marker für Coomassie-Färbungen dienten 10 µL (kurze Gele 8 cm) bis 20 µL (lange Gele 16 cm) Spectra Multicolor (Fermentas, St. Leon-Rot), für *Western Blots* je 0,5 µL High Range und Low Range biotinylated SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, München) in 1x SDS-Probenpuffer und Spectra Multicolor. Die Gelelektrophorese erfolgte über 16-18 Std. bei 10-12 mA pro Gel (lange Gele) oder über 2 Std. bei 180 V (kurze Gele).

3.2.2 *Western Blot*

Für die immunchemische Analyse wurden Proteingele auf Membranen aus Nitrocellulose (Schleicher&Schuell, Dassel) geblottet. Dazu wurden die Membranen zugeschnitten (15,5x14 cm² für große Gele, 15,5x7 cm² für kleine Gele, 9x9 cm² für Minigele) und kurz in ddH₂O gelegt. Membranen und zugeschnittenes Whatman-Blotpapier (Schleicher&Schuell, Dassel) wurden in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) getränkt und in folgender Reihenfolge Sandwich-artig aufeinandergelegt: Blotpapier, Membran, Gel, Blotpapier. Nachdem Luftblasen mit einer Pipette durch Rollen entfernt wurden, wurde das Sandwich mit der Membran zur Anode zwischen Schwämmen in die Blotapparatur eingebaut und mit auf 4°C gekühltem Transferpuffer befüllt. Geblottet wurde bei 70-80 V und 4°C für mindestens 2 Stunden mit Rührfisch zur Pufferwärmeverteilung. Anschließend wurden die farbigen Markerbanden auf der Membran mit Bleistift markiert und die Membran für mindestens 1 Std. bei RT oder bei 4°C ü.N. in Blockierlösung (144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver) unter Schwenken inkubiert. Bei Verwendung biotinylierten Markers wurde die Markerlane abgeschnitten und unter Schwenken weiter in Blockierlösung inkubiert, während die Membran mit primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung in Waschlösung (144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH8, 0,5% (v/v) Tween 20, 2,5% (w/v) Magermilchpulver) für mindestens 1 Std. bei RT oder ü.N. bei 4°C unter Schwenken inkubiert wurde. Die Membran wurde bei RT dreimal 10 min mit Waschlösung gewaschen,

der Markerstreifen dreimal 10 min in TBST (144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH8, 0,5% (v/v) Tween 20). Der Markerstreifen wurde 1:3750 mit Streptavidin-HRP-Konjugat (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) in TBST, die Membran mit sekundärem Antikörper in entsprechender Verdünnung in Waschlösung für mindestens 1 Std. bei RT inkubiert. Membran und Markerstreifen wurden dreimal für mindestens 5 min mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 gewaschen. Markerstreifen und übrige Membran wurden aneinander auf Plastikfolie gelegt, je 3-6 mL der ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektionsreagenzien, d.h. eines 1:1 (v:v)-Gemischs aus Luminol/Enhancer und Peroxidpuffer (entweder nur SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) oder, für höhere Sensitivität, 1:10-gemischt mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific)) darauf gegeben und durch Auflegen der Deckfolie verteilt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt. HRP (*Horseradish peroxidase*) katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid) zu 3-Aminophthalat über mehrere Zwischenprodukte. Bei der Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 428 nm emittiert. In Anwesenheit von Enhancern, am effektivsten sind modifizierte Phenole, wird die Lichtemission um bis zu 1000fach verstärkt. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Luminescent Image Analyzer mit CCD-Kamera LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) entwickelt und mit der Software AIDA bearbeitet.

3.2.3 *Stripping von Western Blots*

Zur Entfernung primärer und sekundärer Antikörper von der *Western Blot*-Membran.

Der *Stripping*-Puffer (2% (w/v) SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8, 113 mM β -Mercaptoethanol) wurde im Wasserbad auf 70°C erwärmt, dabei das β -Mercaptoethanol erst nach Erreichen der Temperatur zugegeben. Die zu strippenden Membranen wurden unter Schütteln im Wasserbad für 30 min bei 70°C in *Stripping*-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 5x für je 10 min in TBS / 0,5% (v/v) Tween 20 gewaschen und danach ganz normal blockiert und weiter wie in 3.2.2.

3.2.4 Kolloidale Coomassie Brilliant Blue-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Proteine wurden nach Polyacrylamidgelelektrophorese mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. Dazu wurden die Gele 1 Std. in 200 mL Fixierlösung (0,85% ortho-Phosphorsäure, 20% (v/v) Methanol) geschwenkt und anschließend mindestens 2 Stunden in Roti-Blue Färbelösung (1x Roti-Blue (Carl Roth, Karlsruhe), 20% (v/v) Methanol). Die Gele wurden 5-10 min in Waschlösung (25% (v/v) Methanol) und für mehrere Stunden in ddH₂O, das mehrmals gewechselt wurde, geschüttelt. Die Gele wurden für 2-3 Std. zwischen GelAir Cellophane Support (Bio-Rad, München) im GelAir Dryer (Bio-Rad, München) getrocknet.

3.2.5 Mutagenese

Zur Deletion von Valin117 und zur Einführung der Punktmutationen F28L, V120M, R156Q, T162P, K210R, R225W, N508D, Y643H, D672A, V684E, P1039S, P1042L, Q1076X, Q1153L, sowie H1168Y in SHIP1 in dem Konstrukt pLTR-tet-SHIP1-SV-HPH, zur Einführung der Mutation F28L in die SH2-Domäne von SHIP1 in dem Konstrukt pGEX-5X-1-SHIP1-SH2 wurde das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Primer siehe 3.1.7.1.

Es wurden Ansätze aus 5 µL 10x Reaction Buffer, je 1,5 µL 10 µM Forward Primer und Reverse Primer, 1 µL dNTP-Mix, 3 µL QuikSolution und 50 ng Template-DNA in 500 µL-Reaktionsgefäßen hergestellt, mit ddH₂O auf 50 µL aufgefüllt, gemischt und 1 µL (2,5 U/µL) *PfuUltra* High-Fidelity Hotstart DNA-Polymerase zugegeben, erneut gemischt und folgendes Programm im Thermocycler durchgeführt:

1	T = 95°C	1 min	Denaturierung
2	T = 95°C	50 sec	Denaturierung
3	T = T _m -5°C	50 sec	Annealing
4	T = 68°C	(1 min/kb)	Extension
5	GOTO 2 repeat 17 times		
6	T = 68°C	7 min	
7	T = 4°C	hold	

Der Ansatz wurde anschließend mit 1 μ L 10 U/ μ L Dpn I (Fermentas, St. Leon-Rot) für mindestens 1 Std. bei 37°C verdaut. Dpn I schneidet den parentalen *dam*-methylierten DNA-Strang, jedoch nicht den per PCR generierten, die gewünschte Mutation tragenden DNA-Strang. Zur Kontrolle wurde je ein unverdautes und ein Dpn I-verdautes Aliquot sowie ein Aliquot aus einer PCR-Negativkontrolle (Mutagenese-PCR-Ansätze ohne Template-DNA) gelelektrophoretisch analysiert. Ein Aliquot aus dem Dpn I-Verdau wurde zur Transformation in *E. coli* DH10B oder XL10-Gold (siehe 3.1.5) eingesetzt. Von Kolonien wurde eine Plasmidminipräparation (siehe 3.2.7.1) angefertigt und die DNA sequenziert (siehe 3.2.8).

3.2.6 Transformation von Vektoren in Bakterien

100 μ L bei -80°C eingefrorener kompetenter Zellen (DH10B für DNA-Präparationen, BL21 (DE3) pLysS für Proteinexpression) wurden auf Eis aufgetaut. 100 pg bis 100 ng Plasmid-DNA wurde zugegeben und 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden einem 1-minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, anschließend in 1 mL LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) aufgenommen und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Sie wurden auf entsprechendes Antibiotikum enthaltenden LB-Agarplatten ausplattiert und für 16 Std. bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Plasmidpräparation

3.2.7.1 Plasmidminipräparation

3 mL LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum (50-100 μ g/mL Ampicillin bzw. 30 μ g/mL Kanamycin) versetzt, mit einem von einer LB-Agarplatte gepickten Klon inokuliert und bei 37°C und 300 rpm ü.N. inkubiert. Davon wurden 1,5 mL in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 16.000 x g kurz zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 μ L Puffer P1 (*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*, QIAGEN, Venlo, Niederlande) resuspendiert. Es wurden 200 μ L Puffer P2 (*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*) zugegeben, durch achtmaliges über Kopf-Kippen des Gefäßes gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 150 μ L Puffer P3

(*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*) zugegeben, durch achtmaliges über Kopf-Kippen des Gefäßes gemischt und 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, erneut 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. 1 mL -20°C kalten Ethanol absolut wurde zugegeben und kurz gevortext. Die DNA wurde bei -20°C für mindestens 30 min gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 100 µL -20°C kaltem Ethanol 70% gewaschen und 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch über Kopf-Stellen des Reaktionsgefäßes auf Zellstoff mehrere Stunden getrocknet. Es wurde in 50 µL TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

3.2.7.2 Plasmidmaxipräparation

Plasmidmaxipräparationen wurden mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (*QIAGEN*, Venlo, Niederlande), *NucleoBond PC 500* oder *NucleoBond Xtra Maxi EF* (*Macherey-Nagel*, Düren) nach dem zugehörigen Protokoll angefertigt.

3.2.8 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Plasmid-DNA wurde in 1/30- bis 1/100-Verdünnungen im Photometer bei 260 nm vermessen. Die Konzentration der DNA wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

- E Extinktion, oder Absorption: dekadischer Logarithmus von (Intensität des eintretenden Lichts/Intensität des aus der Probelösung austretenden Lichtstromes)
- ε molarer Extinktionskoeffizient in L/(mol*mm)
- c molare Konzentration in mol/L
- d Schichtdicke der Probelösung bzw. der Küvette in mm,

wobei eine Lösung, die 50 µg/mL doppelsträngige DNA enthält, bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge λ von 260 nm eine Extinktion (optische Dichte, OD) von 1 aufweist (LOTTSPEICH et al., 2006).

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

SHIP1 Exon 26 von 97 AML-Proben und 16 Gesunden, Exon 4 und Exon 6 von zwei bzw. einer AML-Probe sowie SHIP1-Fragmente der in Jurkat Tet-On-Zellen transduzierten SHIP1-cDNA wurden für die Sequenzierung amplifiziert.

Für die Amplifizierung von Exons 26, 4 und 6 wurden Reagenzien aus dem *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Es wurden Ansätze aus 5 µL 10x Reaction Buffer, je 1,5 µL 10 µM Forward Primer und Reverse Primer (siehe 3.1.7.3), 1 µL 10 mM (each) dNTP-Mix (Fermentas, St. Leon-Rot), 3 µL QuikSolution und 100 ng Template-DNA in 500 µL-Reaktionsgefäßen hergestellt, mit ddH₂O auf 50 µL aufgefüllt, gemischt und 1 µL (2,5 U/µL) *PfuUltra* High-Fidelity Hotstart DNA-Polymerase zugegeben und erneut gemischt.

Für die Amplifizierung der SHIP1-Fragmente wurden Reagenzien des *Taq DNA Polymerase Kit* (QIAGEN, Venlo, Niederlande) verwendet. Es wurden Ansätze aus 10 µL 10 PCR Buffer, je 2 µL 10 µM Primer und Reverse Primer (siehe 3.1.7.3), 2 µL 10 mM (each) dNTP-Mix (Fermentas, St. Leon-Rot), 20 µL 5x Q-Solution und 100 ng Template-DNA in 500 µL-Reaktionsgefäßen hergestellt, mit ddH₂O auf 100 µL aufgefüllt, gemischt und 0,5 µL (5 U/µL) Taq DNA-Polymerase zugegeben und erneut gemischt.

Programme wurden folgendermaßen im Thermocycler durchgeführt:

1	T = 94/95°C	3 min	Denaturierung
2	T = 94/95°C	30 sec	Denaturierung
3	T = T _m -5°C	30 sec	Annealing
4	T = 72°C	1 min	Extension
5	GOTO 2 repeat 34-44 times		
6	T = 72°C	10 min	
7	T = 4°C	hold	

3.2.10 Sequenzierung von DNA

Sequenzieransätze aus 500 ng Plasmid-DNA, 15 pmol Primer (siehe 3.1.7.2), 6 µL 2,5x ABI PRISM BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (200 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,0) und 2 µL 2,5x ABI PRISM BigDye Ready Reaction Mix (200 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,0, A-Dye Terminator gelabeled mit dichloro[R6G], C-Dye-Terminator gelabeled mit dichloro[ROX], G-Dye Terminator gelabeled mit dichloro[R110], T-Dye Terminator gelabeled mit dichloro[TAMRA], dATP, dCTP, dTTP, dUTP, AmpliTaq DNA Polymerase FS mit thermisch stabiler *rTh* Pyrophosphatase) ad 20 µL mit ddH₂O wurden in einem 500 µL-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert, gevortext, kurz abzentrifugiert und durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

1	T = 95°C	1 min	Denaturierung
2	T = 96°C	30 sec	Denaturierung
3	T = 50°C	15 sec	Annealing
4	T = 60°C	4 min	Extension
5	GOTO 2 repeat 34 times		
6	T = 4°C	hold	

Die Ansätze wurden mit 80 µL 0,3 M Natriumacetat und 250 µL Ethanol absolut versetzt, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 30 min bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Ethanol 70% gewaschen und 15 min bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei RT an der Luft mehrere Stunden getrocknet.

Die Proben wurden vom Sequenzierservice des UKE mithilfe des ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer sequenziert.

3.2.11 Zellkultur

3.2.11.1 Stammhaltung und Vermehrung

Die adhäsiv wachsenden Phoenix A wurden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) 41966 (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (*fetal calf serum*, fötales Kälberserum) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) in 5-10 mL (Flasche mit 25 cm² Bodenfläche) oder 20 mL (Flasche mit 75 cm² Bodenfläche) gehalten. Bei Erreichen der Konfluenz wurden sie zum Passagieren einmal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, 1 mL bzw. 3 mL 0,05% Trypsin/0,02% (w/v) EDTA in PBS (Biochrom, Berlin) in die 50 mL- bzw. 250 mL- Zellkulturflasche gegeben und einige Minuten im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden abgelöst hatten. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die Zellen wurden jeweils 1/10 verdünnt.

Für Transfektionen (siehe 3.2.11.6) wurden die Zellen in 94/16 mm-Petrischalen überführt.

Die Suspensionszelllinien Jurkat Tet-On und TF-1 I33-5 wurden in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-Medium 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 mM Natriumpyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) in 4-10 mL (Flasche mit 25 cm² Bodenfläche) oder 20-80 mL (Flasche mit 75 cm² Bodenfläche) gehalten. Erfolgreich mit SHIP1 transduzierte Jurkat Tet-On-Klone wurden zusätzlich mit je 100 ng/mL Hygromycin B (Carl Roth, Karlsruhe) und Geneticin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) gehalten.

Die Suspensionszelllinie FDC-P1 wurde in DMEM 41966 mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung und 10 ng/mL murinem IL-3 (PeproTech, Hamburg) gehalten.

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

3.2.11.2 Bestimmung der Zellzahl

Ein Aliquot von Zellen wurde 1:1 mit 0,4%iger (w/v) Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer 4 Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt. Blau gefärbte Zellen sind nicht vital und wurden nicht mitgezählt. Der Mittelwert aus den vier Quadraten wurde gebildet und durch den Trypanblauverdünnungsfaktor $\frac{1}{2}$ dividiert. Da ein Großquadrat ein Volumen von 0,1 μL hat, ergibt die anschließende Multiplikation mit 10^4 die Zellzahl pro mL.

3.2.11.3 Einfrieren von Zellen

5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 900 μL FCS (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 100 μL DMSO aufgenommen, in 1 mL-Kryoröhrchen (Nunc, Thermo Fisher Scientific) gefüllt und in auf 4°C vorgekühlten Isopropanolboxen (*Nalgene Cryo 1°C Freezing Container*) bei -80°C langsam eingefroren.

3.2.11.4 Auftauen von Zellen

5×10^6 bis 1×10^7 angetaute Zellen wurden in 10 mL auf 37°C vorgewärmtes Medium überführt, 7 min bei RT und 179-259 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium überführt.

3.2.11.5 Stimulation von Zellen

3.2.11.5.1 Stimulation von TF-1 I33-5-Zellen mit GM-CSF

Vor der Stimulation wurden die Zellen für 18-22 Std. in Hungermedium (RPMI mit 0,1% BSA und 1% Penicillin G/Streptomycin) in einer Konzentration von 1×10^6 /mL kultiviert. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen bei RT und 179-259 x g abzentrifugiert, im überstehenden Medium auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 /mL eingestellt, in eine

unbeschichtete Petrischale überführt und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Es wurde mit rekombinantem humanem GM-CSF (CellSystems) in einer finalen Konzentration von 1000 U/mL für 5 min bei 37°C stimuliert. Die Zellsuspension wurde anschließend zu 40 mL eiskaltem PBS mit 1 mM Na₃VO₄ pipettiert, bei 4°C und 179-259 x g 10 min abzentrifugiert und das Zellpellet in NP40-Puffer lysiert.

3.2.11.5.2 Stimulation von FDC-P1-Zellen mit Pervanadat und IL-3

Vor der Stimulation wurden die Zellen für 18-22 Std. in Hungermedium (DMEM mit 0,1% BSA und 1% Penicillin G/Streptomycin) in einer Konzentration von 4×10^5 /mL gehalten. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen bei RT und 179-259 x g abzentrifugiert, im überstehenden Medium auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 /mL eingestellt und in eine unbeschichtete Petrischale überführt. Es wurde eine Pervanadat-Lösung (200 mM H₂O₂ und 2 mM Na₃VO₄ in PBS) hergestellt und für 15 min bei 37°C erwärmt. Ein Zwanzigstel des Zellkulturvolumens wurde an Pervanadat-Lösung zu den Zellen gegeben und nach 2 min mit murinem IL-3 (PeproTech, Hamburg) in einer finalen Konzentration von 100 ng/mL stimuliert und für weitere 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu 40 mL eiskaltem PBS mit 1 mM Na₃VO₄ pipettiert, bei 4°C und 179-259 x g abzentrifugiert und die Zellen in NP40-Puffer lysiert.

Pervanadat ist ein starker Inhibitor von Proteintyrosinphosphatasen (PTP) und stimuliert Zellaktivierung (FANTUS et al., 1989; HEFFETZ et al., 1990; KADOTA et al., 1987; O'SHEA et al., 1992; SECRIST et al., 1993; ZICK and SAGI-EISENBERG, 1990).

3.2.11.5.3 Stimulation von Jurkat Tet-On-Klonen mit OKT3

Zwei Tage vor der Stimulation wurde in den Jurkat Tet-On-Klonen, ausgesät in einer Zellkonzentration von 4×10^5 /mL in RPMI-Medium 1640 GlutaMAX-I mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat, die SHIP1-Expression mit 1 µg/mL Doxycyclin (MP Biomedicals, Eschwege) induziert. 24 Std. wurde später jeder Klon in drei Ansätze aufgeteilt: zwei Ansätze Hungermedium (RPMI mit 0,1% BSA, 1% Penicillin G/Streptomycin und 1 µg/mL Doxycyclin), ein Ansatz im bisherigen Medium mit

10% FCS belassen. Dazu wurden die Zellen für die Ansätze in Hungermedium abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 /mL in Hungermedium resuspendiert. Nach weiteren weiteren 18-22 Std. wurden beide Hungeransätze 10 min bei RT und $179-259 \times g$ abzentrifugiert, im überstehenden Medium auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 /mL eingestellt, in 6-Loch-Schalen überführt und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Je einer der Hungeransätze wurde mit $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ OKT3 für 5 min stimuliert, zum zweiten Ansatz die gleiche Menge Überstand-Medium aus dem Zentrifugationsschritt gegeben. Alle drei Ansätze pro Klon wurden zu eiskaltem PBS mit $1 \text{ mM Na}_3\text{VO}_4$ pipettiert, bei 4°C und $179-259 \times g$ 10 min abzentrifugiert und die Zellen in NP40-Puffer lysiert.

3.2.11.6 Transfektion und γ -retrovirale Transduktion von Jurkat Tet-On-Zellen

Es wurden $1,5-2 \times 10^6$ Zellen der Verpackungszelllinie Phoenix Ampho (enthält die Gene *gag*, *pol* und amphotropes *env*, siehe 3.1.4.1) oder Phoenix gp (enthält die Gene *gag* und *pol*) 24 Std. vor Transfektion oder 1×10^6 Zellen 48 Std. vor Transfektion pro 94/16 mm-Zellkulturschale in 10 mL DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurde pro Ansatz folgende DNA in ein 1,5mL-Tube pipettiert:

- **5 μg retroviraler Vektor mit GOI** (*gene of interest*)
- **10 μg M57 SV40gagpol** (zusätzliches *gag* und *pol*)
- **5 μg K25-2 pHCMV-A-MLVenv** (zusätzliche amphotrope murines Leukämievirus Pseudotypisierung)
- **2 μg M75 pHCMV-VSV-G** (Vesiculäre Stomatitis Virus Glycoprotein Pseudotypisierung)

Die DNA in wurde in $750 \mu\text{L}$ DMEM ohne Serum und Antibiotika bzw. in Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) aufgenommen und vorsichtig gemischt. $20 \mu\text{L}$ PLUS Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) wurden zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA für die kationische Lipid-vermittelte Tranfektion zu prä-komplexieren. In dieser Zeit wurden $30 \mu\text{L}$ Lipofectamine Reagent (Invitrogen, Karlsruhe), eine 3:1 (w/w)-Zusammensetzung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleyloxy-N-

[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetat (DOSPA) und des neutralen Lipids Diolelylphosphatidylethanolamin (DOPE), in 750 μ L DMEM ohne Serum und Antibiotika bzw. in Opti-MEM I aufgenommen und vorsichtig gemischt. Dann wurde der DNA-Ansatz mit dem Lipofectamine-Ansatz gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert.

Das Medium der Verpackungszelllinie wurde abgenommen und durch frische 5mL DMEM mit 10% FCS ohne Antibiotika ersetzt. Die DNA-Lipofectamine-Mischung wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Schalen wurden 3 Std. im Brutschrank inkubiert, anschließend mit Medium auf 9 mL aufgefüllt und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die 9 mL Medium durch 7 mL frisches DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ersetzt.

24 Std. nach Mediumwechsel (ca. 48 Std. nach Transfektion) wurde der virenhaltige Überstand mit einer 10 mL-Spritze (Braun, Melsungen) abgenommen, durch einen 0,45 μ m-Acrodisc-Spritzenfilter mit HT Tuffryn-Polysulfonmembran (Pall, Port Washington, NY, USA) in 50 mL-Röhrchen filtriert. Frische 7 mL DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin wurden auf die Verpackungszelllinie gegeben.

Pro Transduktion wurden 4×10^5 Jurkat Tet-On-Zellen für 10 min bei RT und 179-259 x g abzentrifugiert, in 4mL Virusüberstand resuspendiert und in ein Loch einer 6-Lochplatte gegeben. Die 6-Lochplatte wurde 60 min bei 800 x g zentrifugiert und wieder in den Brutschrank gestellt.

Weitere Virenüberstände wurden 48 und 72 Std. nach Mediumwechsel (ca. 72 und 96 Std. nach Transfektion) abgenommen und damit wie mit dem ersten Virenüberstand verfahren, so dass die Jurkat Tet-On-Zellen insgesamt 3x mit frischem Virenüberstand transduziert wurden.

48 Std. nach der letzten Transduktion wurden die Zellen in RPMI Medium 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung, 1 mM Natriumpyruvat, 400 ng/mL Hygromycin B (Carl Roth, Karlsruhe) und 800 ng/mL Geneticin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) überführt und für mindestens zwei Wochen selektioniert. Als Kontrolle dienten nicht-transduzierte Jurkat Tet-On-Zellen.

3.2.11.7 Einzelzellklonierung durch Endpunktverdünnung

Zur Herstellung von Jurkat Tet-On-Klonen nach Transduktion mit pLTR-tet-SHIP1-SV-HPH wurden die Zellen in den Konzentrationen 1/mL, 10/mL und 100/mL in RPMI-Medium 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 1 mM Natriumpyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 400 ng/mL Hygromycin B (Carl Roth, Karlsruhe) und 800 ng/mL Geneticin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) in 96-Loch-Platten zu 100 µL/Loch, entsprechend 0,1 Zelle/Loch, 1 Zelle/Loch und 10 Zellen/Loch ausgesät. Drei bis fünf Tage nach dem Aussäen waren Trauben proliferierender Klone im Mikroskop sichtbar und wurden täglich kontrolliert, bis eindeutig die Zahl der Klone pro Loch festgestellt wurde. Nur Klone, die einzeln im Loch waren, wurden weiter kultiviert und über 24-Loch und 6-Loch-Platten expandiert.

3.2.11.8 Induzierbare Expression mit dem Tet-On-System

Das Tetracyclin-abhängige Regulationssystem basiert auf dem Tet-Operon und stammt ursprünglich von der Tetracyclin-Resistenz aus Bakterien (CHOPRA and ROBERTS, 2001). Tetracyclin diffundiert passiv durch die Cytoplasmamembran und bindet ein zweiwertiges Metallkation (SIGLER et al., 2000). Es wirkt als Antibiotikum, indem es die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die mRNA in der 30S-Untereinheit des Bakterien-Ribosoms verhindert und damit die Translation und letztlich die Proteinbiosynthese stoppt (CHOPRA et al., 1992; SCHNAPPINGER and HILLEN, 1996). Ein weit verbreiteter Resistenzmechanismus in gramnegativen Bakterien wie *E. coli* ist der aktive Export des Antibiotikums aus der resistenten Zelle durch einen membranständigen Proton-Tetracyclin-Antiporter, TetA. Dessen konstitutive Expression stellt einen Wachstumsnachteil für die Bakterienzelle dar, sodass resistente Bakterien nur dann kompetitiv wachsen können, wenn die Expression von TetA in Abwesenheit von Tetracyclin effektiv reprimiert wird. Eine solche Repression erfolgt auf Transkriptionsebene durch den Tet-Repressor, TetR. Die Tetracyclin-Resistenz wird demnach von zwei Genen codiert, *tetA* und *tetR*. Diese liegen im Tet-Operon in entgegengesetzten Richtungen angeordnet (siehe Abb. 3.1), dazwischen befinden sich die tet-Operator-Sequenzen, *tetO*. In Abwesenheit von Tetracyclin binden TetR-Dimere an die Tet-Operatoren

und verhindern somit die Transkription von *tetR* selbst und von *tetA*. In Anwesenheit von Tetracyclin bindet dieses an TetR, bewirkt eine Konformationsänderung, sodass sich TetR von der DNA ablöst und *tetA* und *tetR* transkribiert werden können (HILLEN and BERENS, 1994; SAENGER et al., 2000). Durch den evolutionären Druck, die Basisexpression von TetA niedrig zu halten, ist die Bindung von TetR an den Operator mit einer Affinitätskonstanten von 10^{11} M^{-1} sehr hoch, an unspezifische DNA dagegen mit $<10^5 \text{ M}^{-1}$ niedrig. Wegen dieser Eigenschaft und aufgrund der Zellgängigkeit des Induktors Tetracyclin wird TetR zur Transkriptionsregulation in Eukaryoten eingesetzt. Dazu werden Promotoren von zu regulierenden Genen *upstream* von tet-Operatoren flankiert, vom sogenannten TRE (*tet response element*), einem regulatorischen Element, das aus sieben Wiederholungen einer 42 bp-Sequenz, die *tetO* enthält, besteht. Außerdem wird TetR hier als Fusionsprotein mit viralen oder humanen Regulationsdomänen exprimiert (GOSSEN and BUJARD, 2002; URLINGER et al., 2000) und wird, je nachdem, ob diese Domäne Transkriptions-aktivierend oder –reprimierend wirkt, als Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (tTA) oder Transsuppressor (tTS) bezeichnet. Experimenteller Nachteil bei tTA ist, das Doxycyclin aus dem System entfernt werden muss, um Transkription des Zielgens zu erreichen (Tet-Off). Lösung war hier die Identifizierung einer tTA-Mutante, die *tetO* in Gegenwart statt in Abwesenheit von Tetracyclin bindet (GOSSEN et al., 1995), und die als reverser Tetracyclin-abhängiger Transaktivator (rtTA) bezeichnet wird, der nach Tetracyclin-Bindung die Transkription auslöst (Tet-On). Meist wird als Induktor das halbsynthetische Tetracyclin Doxycyclin verwendet, das mit einer Bindungskonstante von 10^{10} M^{-1} an TetR bindet (HILLEN and BERENS, 2002).

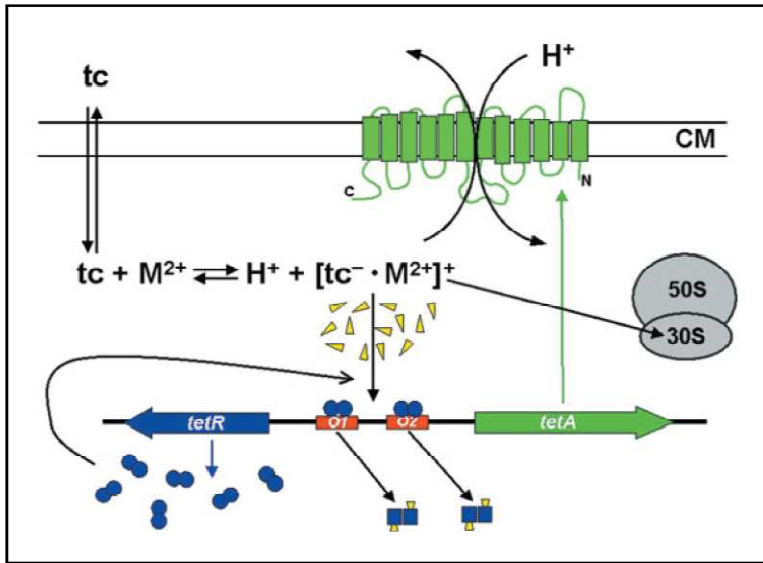


Abb. 3.1: Regulation der Genexpression bei bakterieller Tetracyclinresistenz.

Das Tetracyclin-Operon aus Enterobakterien besteht aus zwei divergent angeordneten Genen, tetR und tetA. In Abwesenheit von Tetracyclin (tc, gelbe Dreiecke) wird das Gen tetR für das Regulatorprotein exprimiert. TetR bindet als Dimer (blaue Kugeln) an die tet-Operatoren (tetO, rote Boxen) in der zentral gelegenen Kontrollregion. Dadurch

wird sowohl seine eigene als auch die Transkription des Resistenzgens tetA reprimiert. Gelangt Tetracyclin über passive Diffusion über die Cytoplasmamembran (CM) in die Zelle, bildet es einen Chelat-Komplex mit einem zweiwertigen Kation (M^{2+}). Dieser ist sowohl die antibiotisch aktive Form, die an die 30S-UE des Ribosoms bindet, als auch der Induktor für TetR und das Substrat für TetA. Bindung von Tetracyclin an TetR induziert eine Konformationsänderung (blaue Quadrate), die zum Verlust der Operatorfähigkeit und zur Expression des Resistenzproteins TetA führt. Dieses inseriert in die Membran und exportiert den Tetracyclin-Metall-Komplex im Austausch gegen ein Proton aus der Zelle. Aus Hillen und Berens (HILLEN and BERENS, 2002).

3.2.11.8.1 Induktion der SHIP1-Expression in Jurkat Tet-On-Klonen mit Doxycyclin

Um zu testen, ob die mit SHIP1 transduzierten Jurkat Tet-On-Klone durch Doxycyclin induzierbar SHIP1 exprimieren, wurden pro Klon zwei 10 mL-Ansätze mit je 3×10^5 Zellen/mL in RPMI-Medium 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (GIBCO, Invitrogen), 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 mM Natriumpyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) ausgesät, je ein Ansatz mit $1 \mu\text{g/mL}$ Doxycyclin, der zweite mit $1 \mu\text{L/mL}$ 70% Ethanol, dem Lösungsmittel für Doxycyclin. Dazu wurden pro Klon 6×10^5 Zellen bei $179\text{-}259 \times g$ für 10 min bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um sicherzustellen, dass alle in einem Experiment zu vergleichenden Klone exakt die gleiche Menge an Doxycyclin bzw. Ethanol im Medium hatten, wurden Medien mit $2 \mu\text{g/mL}$ Doxycyclin bzw. $2 \mu\text{L/mL}$ 70% Ethanol hergestellt, davon je 5 mL vorgelegt, das Zellpellet in 10 mL Medium ohne Doxycyclin oder Ethanol resuspendiert und auf die zwei vorgelegten Mediumansätze

aufgeteilt. Nach 48 Std. Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 179-259 x g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zum Waschen in kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mit 1 mM NaVO₄ resuspendiert, erneut für 10 min bei abzentrifugiert und in NP40-Puffer lysiert, siehe 3.2.12.

Um Proteinlysate für *Pull-Downs* oder den SHIP1-5-Phosphatase-Assay herzustellen, wurden Volumina von 80-250 mL mit 4x10⁵ Zellen/mL angesetzt.

3.2.12 Zellyse mit Nonidet P40-Puffer

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen gezählt, 10 min bei 4°C und 179-259 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mit 1 mM NaVO₄ resuspendiert und erneut für 10 min bei abzentrifugiert. Auf Eis wurde Nonidet P40(NP40)-Puffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF) frisch hergestellt. Die Zellpellets wurden in 1 mL NP40-Puffer/5x10⁷ Zellen resuspendiert, in 1,5 mL-Röhrchen überführt und für 5-10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 4°C und 16.000 x g für 5-10 min als Pellet abgetrennt und der Überstand in frische Röhrchen überführt.

3.2.13 Protein-Konzentrationsbestimmung

Proteinmengen in Zellysaten wurden mit dem DC (*detergent compatible*) Protein Assay (Bio-Rad) bestimmt. Dieser kolorimetrische Assay beruht auf dem Lowry-Assay (LOWRY et al., 1951) und ist mit Nonidet P40-Puffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF) kompatibel. Es wurden 5 µL der Probe (1/5- bis 1/20-Verdünnung) in Mikrotiterplatten mit 25 µL Reagenz A' (Mix aus 1:50 Reagenz S:Reagenz A, alkalische Kupfertartratlösung) versetzt und 200 µL Reagenz B (Folinreagenz) zugegeben. Nach mindestens 15 min Inkubation bei RT wurde im Photometer die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA in Nonidet P40-

Puffer (0 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,25 mg/mL, 1,5 mg/mL). Standard und Proben wurden in Triplikaten vermessen. Anhand der Messwerte des BSA-Standards wurde eine Eichgerade erstellt und daran die in den Proben enthaltene Proteinmenge berechnet.

Theoretischer Hintergrund des Lowry-Assays ist, dass Cu^{2+} -Ionen unter alkalischen Bedingungen Komplexe mit freien Elektronenpaaren (von Peptidbindungen) im Protein ausbilden und dabei zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. In einem zweiten Schritt wird Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zugegeben. Dieses enthält Molybdän und Wolfram der Nebengruppe VIb in der Oxidationsstufe +VI in Form von Heteropolyphosphorsauerstoffsäuren (PETERSON, 1979; WU, 1920). Die Metalle werden von Cu^+ , oder direkt von den aromatischen Aminosäureresten Tryptophan oder Tyrosin, zur Oxidationsstufe +V oder +IV reduziert, wobei Mischoxide entstehen (Tyrosin wird dabei oxidiert durch Zweihydroxylierung, bevorzugt in ortho-Stellung zur vorhandenen phenolischen Hydroxylgruppe). Es resultiert ein Farbumschlag von gelb nach blau, der photometrisch bestimmt werden kann. Das Absorptionsminimum liegt bei 405 nm, das Absorptionsmaximum bei 750 nm.

3.2.14 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit dem *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN, Venlo, Niederlande) isoliert. Es wurden bis zu 5×10^6 Zellen bei 179-259 x g abzenrifugiert, das Pellet in 200 μL PBS resuspendiert und 20 μL Proteinase K zugegeben. Es wurden 200 μL Puffer AL zugegeben, gründlich gemischt durch Vortexen und 10 min bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μL 96-100% Ethanol wurde erneut gründlich gevortext und das Gemisch auf in eine DNeasy Mini-Spin-Säule pipettiert, die wiederum in ein 2 mL-Auffangröhrchen gesetzt wurde. Es wurde 1 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurden 500 μL Puffer AW1 zugegeben, erneut 1 min bei 6000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es wurden 500 μL Puffer AW2 zugegeben, 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die DNeasy-Mini-Spin-Säule wurde in ein 1,5 mL-Röhrchen platziert und mit 1 x 200 μL oder 2 x 100 μL durch Zentrifugation für 1 min bei 6000 x g eluiert.

3.2.15 SHIP1-5-Phosphatase-Assay

Zur Bestimmung der 5-Phosphatase-Aktivität von SHIP1 wurden frische oder einmalig aufgetaute Proteinlysate verwendet. Für jede zu vermessende Mutante wurden sechs, mindestens jedoch drei Immunpräzipitationen zugleich angesetzt.

Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden) wurde dreimal mit NP40-Puffer gewaschen (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF), d.h. 1 mL NP40-Puffer zugegeben, gevortext, 30 s bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette, angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe, abgesaugt.

Es wurde eine 50:50-Suspension von Protein-G-Sepharose und NP40-Puffer angesetzt und davon pro Immunpräzipitation je 40-50 µL in zwei 1,5 mL-Röhrchen pipettiert. Zu einem der Röhrchen wurden 2 µg anti-SHIP1-Antikörper (siehe 3.1.2.1) sowie 240 µL NP40-Puffer gegeben und über Nacht oder mindestens eine Stunde bei 4°C rotiert. Zu dem zweiten Röhrchen wurden zur Präadsorption unspezifischer Bindungen an die Protein-G-Sepharose 400 µg bis 1 mg Proteinlysat gegeben, mit NP40-Puffer auf gleiche Volumina aufgefüllt und über Nacht oder mindestens eine Stunde bei 4°C rotiert.

Die Antikörper-gekoppelte Protein-G-Sepharose wurde dreimal mit NP40-Puffer gewaschen, anschließend mindestens dreimal mit Phosphatase-Assay-Puffer (20 mM Triethanolamin, 2,5 mM MgCl₂), abschließend wurde der Überstand komplett abgenommen.

Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat-diC8 (PtdIns(3,4,5)P₃-diC8, Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) wurde durch drei- bis sechsmaliges Sonifizieren à 30 s im Ultraschallbad bei 4°C in Phosphatase-Assay-Puffer gelöst und eine Konzentration von 200 µM hergestellt.

Es wurden je 60 µL 200 µM PtdIns(3,4,5)P₃-diC8 in Phosphatase-Assay-Puffer zu den Immunpräzipitationen gegeben und für 5 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 20 µL 0,1 M EDTA gestoppt. Die Konzentration von EDTA liegt damit beim 13,3fachen derer von Magnesiumionen und somit im Überschuss, sodass die Magnesiumionen chelatiert werden und dem Magnesiumion-abhängigen katalytischen Zentrum der SHIP1-Phosphatasedomäne nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Reaktionsansätze wurden für 20 s bei RT und 12.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Protein-G-Sepharose-Pellets wurden bis zum Auftragen

auf ein SDS-Polyacrylamidgel zur Bestimmung der SHIP1-Menge in den Immunpräzipitationen zur Berechnung der spezifischen SHIP1-5-Phosphataseaktivität bei -20°C eingefroren.

Zur Bestimmung der Menge abgespaltenen Phosphats in den Überständen wurde ein Phosphat-Standard in 15 mM Triethanolamin und 1,875 mM MgCl₂ in folgenden Konzentrationen aus einer 1 M-Phosphat-Stammlösung (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) angesetzt und als Dreifachbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert: 0 µM, 2 µM, 4 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM. Zur Detektion des Phosphates wurde Malachitgrün verwendet (MAEHAMA et al., 2000; VANDEPUT et al., 2006). Dieses bildet bei niedrigem pH-Wert Komplexe mit Phosphomolybdat, wobei sich das Absorptionsmaximum deutlich verschiebt (Farbumschlag von gelb nach grün), mit einem hohen molaren Absorptionskoeffizienten ($\epsilon = 112.000$) (HESS and DERR, 1975; ITAYA and UI, 1966). Malachitgrünreagenzien A und B (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) wurden auf RT erwärmt und im Verhältnis 100:1 gemischt. Davon wurden je 20 µL zu jedem Loch in der Mikrotiterplatte gegeben, 30 min inkubiert und der Farbumschlag bei 595 nm oder 630 nm detektiert.

3.2.16 Expression und Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine

3.2.16.1 *Strep*-tag II-Fusionsproteine

SHIP1 fl (*full-length*, volle Länge) und SHIP1 Q98-T409 R156Q wurden als Fusionsprotein mit einem N-terminalen *Strep*-tag, codiert von dem Vektor pASK-IBA5plus (IBA, Göttingen), in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS REP4 (siehe 3.1.5.3) exprimiert. Dazu wurden die Bakterien aus einem Glycerolstock auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Ampicillin ausgestrichen und 16 Std. bei 37°C im Brutschrank/Inkubator inkubiert. Es wurden Klone gepickt und Vorkulturen damit in LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) mit 100 µg/mL Ampicillin angesetzt und bei 26°C oder 37°C für 16 Std. bei 200 rpm geschüttelt. Die Vorkulturen wurden in je 250 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin überführt und bei 37°C und 200 rpm auf eine optische Dichte bei 550 nm von 0,5-0,6 anwachsen gelassen. Die Kulturen wurden 30 min bei RT abgekühlt. Mit Anhydrotetracyclin (Endkonzentration 200 ng/mL) wurde die Expression induziert und für

3 Std. bei 26°C und 200 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden bei 4°C oder RT für 5-15 min bei 4068 x g abzentrifugiert und das Pellet aus einer 250 mL-Kultur in 15 mL Puffer H (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,5) durch Schütteln bei 200 rpm resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Nach Auftauen auf Eis wurden 150 µL 0,1 M PMSF, 15 µL 1 M DTT, 750 µL 10% Triton X-100 sowie 75 µL 0,1 M Benzamidin zugegeben und die Bakteriensuspension dreimal 45 sec (Max Energy, Cycle 30) sonifiziert, dazwischen je 1 min auf Eis gestellt. Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 26890 x g und 4°C abzentrifugiert, und der Überstand auf Eis gelagert. Eine *Strep*-Tactin MacroPrep-(IBA, Göttingen)-Säule (1 mL Säulenbettvolumen in einer 1,0 x 10 cm [SHIP1 Q98-T409] bzw. 10 mL Säulenbettvolumen in einer 2,5 x 10 cm [fl SHIP1] Glass Economo-Column (Bio-Rad, München)) wurde zweimal mit 4 Säulenbettvolumina (CV) Waschpuffer W (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM oder 500 mM NaCl) äquilibriert.

Es wurden 5 mL bzw. 60 mL Bakterienlysat auf die 1 mL- bzw. 10 mL-Säule gegeben, anschließend mit 5 Säulenbettvolumina Puffer W gewaschen und mit sechsmal 1/2 Säulenbettvolumen Elutionspuffer E (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, 150 mM oder 500 mM NaCl) eluiert. Dabei wurde vor Entnahme von Eluat 2 die Säule unten verschlossen und für 1 Std. inkubiert. Die Säule wurde dreimal mit 5 Säulenvolumina Regenerationspuffer R (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, 150 mM NaCl) regeneriert und mit einigen mL Puffer R überschichtet gelagert.

Die Expression über den pASK-IBA5plus-Vektor erfolgt über den stringent regulierten tetA-Promotor/Operator. Der tet-Repressor (TetR) wird vom pASK-IBA5plus-Vektor codiert und konstitutiv vom β -Lactamase-Promotor exprimiert. Die Induktion erfolgt durch Anhydrotetracyclin. Dieses bindet 35mal affiner an den tet-Repressor als Tetracyclin (DEGENKOLB et al., 1991), der dadurch eine Konformationsänderung durchmacht und nicht mehr an den Operator binden kann. Folglich kann die Transkription des Zielgens stattfinden (HILLEN and BERENS, 2002; SKERRA, 1994).

Strep-tag II ist ein Peptid von acht Aminosäuren (WSHPKFEK), das mit einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 1 \mu\text{M}$ an *Strep*-Tactin bindet. *Strep*-Tactin ist eine Streptavidin-Mutante, und zwar ist es ein rekombinantes Minimal-Streptavidin (AS 13-139) mit Mutationen an Positionen 44, 45 und 47 (Q44V, S45T, V47R) (SKERRA, 2003).

3.2.16.2 GST-Fusionsproteine: SHIP1-SH2 WT/F28L/R31Q, Grb2-SH3(N)/(C)

Die beiden SH3-Domänen von Grb2 und die SH2-Domäne von SHIP1 wurden für *Pull-Down*-Experimente (siehe 3.2.17) als Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionproteine in Bakterien exprimiert.

Die beiden humanen SH3-Domänen von Grb2, eine C-terminal und eine N-terminal gelegene (kloniert von (PENDERGAST et al., 1993; SKOLNIK et al., 1993)), bereits in einen Expressionsbakterienstamm transformiert, wurden mir von Dr. Manfred Jücker zur Verfügung gestellt. Die C-terminale SH3-Domäne umfasst die AS 156-214 und ist in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pGEX-2T eingefügt. Die N-terminale SH3-Domäne umfasst die AS 4-55 und ist über die BamHI- und EcoRI-Schnittstellen in pGEX-2T eingefügt.

Die humane SHIP1-SH2-Domäne (AS 5-103), und zwar WT sowie die Mutante R31Q, jeweils kloniert in die BamHI-Stelle des Vektors pGEX-5X-1, außerdem der leere Vektor pGEX-5X-1 wurden mir von der AG von Dr. Manfred Jücker zur Verfügung gestellt. Auf die WT SH2-Domäne wurde per Mutagenese (siehe 3.2.5) die Mutation F28L eingefügt.

Alle drei SH2-Domänen wurden komplett sequenziert (siehe 3.2.10).

Die drei Domänen sowie der leere Vektor (zur Expression von GST allein) wurden in den Expressionsbakterienstamm BL21 (DE3) pLysS pREP4 (siehe 3.1.5.3) transformiert (siehe 3.2.6) und auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen, ebenso die Bakterien mit den Grb2-SH3-Domänen. Es wurde je ein Klon gepickt und in 3 mL LB-Medium (1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl) mit 100 µg/µL Ampicillin, 50 µg/µL Kanamycin und 34 µL/mL Chloramphenicol über Nacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Von diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag je 1,5 mL zu 150 mL LB-Medium mit 100 µg/µL Ampicillin, 50 µg/µL Kanamycin und 34 µL/mL Chloramphenicol gegeben, bei 37°C und 250 rpm geschüttelt und die optische Dichte der Bakteriensuspension bei 580 nm mindestens stündlich gemessen. Bei Erreichen von $OD_{580} = 0,4$ wurde die Expression der GST-Fusionsproteine mit 0,1 mM (f.c.) IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert, anschließend für 3,5 Std. bei 32°C weiterschüttelt. Die Bakterien wurden für 15 min bei 4°C und 6000 x g abzentrifugiert und die Pellets bei -20°C eingefroren.

Nach Wiederauftauen wurden die Pellets in je 10 mL NP40-Lysepuffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF)

resuspendiert, 3 x 30 sec sonifiziert (Max Energy, Cycle 30). Nach Abzentrifugieren für 10 min bei 4°C und 12.000 x g wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Die GST-SHIP1-SH2-Fusionsproteine sowie GST allein wurden nach SDS-PAGE durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue anhand eines BSA-Standards quantifiziert.

3.2.17 *Pull-Down mit GST-Fusionsproteinen*

3.2.17.1 *Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domänen*

Von den in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimierten (siehe 3.2.16.2) humanen SHIP1-SH2-Domänen (AS 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden pro *Pull-Down* je 10-25 µg an je 50 µL in NP40-Puffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF) äquilibrierte 50:50-Slurry Glutathion-Sepharose 4B (Ge Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden) für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C gebunden, anschließend 3x in NP40-Puffer gewaschen, d.h. 1 mL NP40-Puffer zugegeben, gevortext, 3 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette, angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe, abgesaugt.

Je 1-2 mg Lysat pro *Pull-Down* von mit 1000 U/mL behandelten I33-5-Zellen oder je 400 µg Lysat pro *Pull-Down* von mit 2 mM Pervanadat und 100 ng/mL Interleukin-3 behandelten FDC-P1-Zellen wurden an 50 µL 50:50-Slurry Glutathion-Sepharose für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C präadsorbiert (optional) und anschließend für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert, schließlich 3x mit NP-Puffer gewaschen.

3.2.17.2 *Pull-Down mit Grb2-SH3-Domänen*

Von den in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimierten (siehe 3.2.16.2) humanen Grb2-SH3-Domänen (N) und (C) wurden pro *Pull-Down* je 5-10 µg an je 50 µL in NP40-Puffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat,

1 mM PMSF) äquilibrierte 50:50-Slurry Glutathion-Sepharose 4B (Ge Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden) für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C gebunden, anschließend 3x in NP40-Puffer gewaschen, d.h. 1 mL NP40-Puffer zugegeben, gevortext, 3 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette, angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe, abgesaugt.

Es wurden je 2,5 µg *Strep*-tag II-Fusionsprotein, oder variierende Mengen Jurkat-Tet-On-Lysate, deren Volumina auf gleiche SHIP1-Mengen angepasst wurden, pro *Pull-Down* an 50 µL 50:50-Slurry Glutathion-Sepharose für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C präadsorbiert (optional) und anschließend für mindestens 1 Std. rotierend bei 4°C mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert, schließlich 3x mit NP-Puffer gewaschen.

3.2.18 Durchflusszytometrie-basierter Proliferations-Assay

Für diesen Proliferations-Assay wurde das APC BrdU Flow Kit von BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) verwendet. Pro zu vermessendem Klon wurden 6 Löcher einer 6-Loch-Platte zu je 2 ml mit 2×10^5 Zellen/mL in RPMI 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (*fetal calf serum*, fötales Kälberserum) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe), 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 mM Natriumpyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) ausgesät. Drei der Löcher enthielten 1 µg/mL Doxycyclin, die übrigen drei Löcher nur das Lösungsmittel, 1 µL/mL 70% Ethanol. Als Kontrolle dienten drei Löcher Jurkat Tet-On ohne Doxycyclin oder Ethanol und drei Löcher Jurkat Tet-On mit 25 µM des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 (Calbiochem). 48 Std. nach dem Aussäen wurden zu allen Löchern, mit Ausnahme der drei Jurkat Tet-On ohne Doxycyclin oder Ethanol, je 20 µL 1 mM BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)-Lösung gegeben um eine finale Konzentration von 10 µM zu erhalten. BrdU wird in Zellen in der Synthesephase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann später mit BrdU-spezifischen Antikörpern detektiert werden (GRATZNER and LEIF, 1981; MILTENBURGER et al., 1987; SASAKI et al., 1989; VANDERLAAN and THOMAS, 1985). 16 Std. nach BrdU-Zugabe wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 300 x g abzentrifugiert, in je 1 mL Staining Buffer (3% (v/v) FCS und 0,09% (w/v) NaN₃ in PBS) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in je 100 µL BD Cytotfix/Cytoperm Buffer resuspendiert und 15-30 min bei RT oder

auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mL 1 x BD Perm/Wash Buffer wurde abzentrifugiert, Pellets in je 100 µL BD Cytoperm Plus Buffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mL 1 x BD Perm/Wash Buffer wurde abzentrifugiert, Pellets in je 100 µL BD Cytotfix/Cytoperm Buffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mL 1 x BD Perm/Wash Buffer wurde abzentrifugiert, Pellets in je 100 µL 300 µg/mL DNase in PBS für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mL 1 x BD Perm/Wash Buffer wurde abzentrifugiert, Pellets in je 50 µL 1 x BD Perm/Wash Buffer mit APC-anti-BrdU-Antikörper resuspendiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 1 mL 1 x BD Perm/Wash Buffer wurde abzentrifugiert, die Pellets in je 250 µL Staining Buffer resuspendiert, durch einen Mikrosieb-Aufsatz in ein 5 mL Rundboden-Röhrchen für die Durchflusszytometrie (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) pipettiert und bis zur Messung dunkel bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, an einem BD FACS Canto (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) mit der Software DIVA vermessen.

3.2.19 Oberflächenplasmonresonanz-Messung mit Biacore

Surface Plasmon Resonance (SPR), oft unter dem Firmenlogo *Biacore* beschrieben, ist eine optische Methode, um Änderungen des Brechungsindex nahe (ca. 300 nm) an einer Sensoroberfläche zwischen Glas und Metall zu messen. Die Oberfläche bildet den Boden einer kleinen Durchflusszelle (20-60 nL) durch die gleichmäßig eine wässrige Lösung mit einem Analyten fließt. Auf der Sensoroberfläche (ein goldbeschichteter Chip) wird ein Bindungspartner (Ligand) immobilisiert. Wenn Analyt und Ligand binden, kommt es zur Erhöhung von Protein (Masse) an der Oberfläche, wodurch eine Änderung des Refraktionsindex ausgelöst wird. Für das Immobilisieren von Liganden stehen unterschiedliche chemische Verfahren und Chips zur Verfügung. Die Wahl der Kopplungsbedingungen hängt stark von der jeweiligen chemischen Beschaffenheit der Liganden und der erwarteten Größe und Struktur der Komplexe mit dem Analyten ab.

Das physikalische Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz ist relativ komplex und tritt ein, wenn ein monochromatischer, planar polarisierter Lichtstrahl an einer vollständig intern reflektierenden Oberfläche aus Glas ausgelöst wird, die an der Außenseite durch Metall beschichtet ist. Dadurch entstehen zwei unterschiedliche optische Wellen: eine exponentiell an Intensität abnehmende (evaneszente) Welle, die durch den internen totalen Reflexionsvorgang gebildet wird, und eine Welle, die im Metall fortschreitet. Bei einem bestimmten Einfallswinkel führt die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Wellen zu einem Abfall des von der Oberfläche reflektierten Lichts (Plasmon-Resonanz). Dieser Abfall lässt sich messen. Die Resonanzbedingungen werden von Material beeinflusst, das auf dem dünnen Metallfilm adsorbiert ist. Die Resonanzenergie zeigt einen annähernd linearen Zusammenhang mit der Massenkonzentration von Biomolekülen, wie Proteinen, DNA oder RNA, die auf der Sensoroberfläche fixiert sind. Das in Resonanzeinheiten (RU) gemessene SPR-Signal ist daher ein Maß der Konzentration der auf der Oberfläche des Sensorchips befindlichen Masse (es gilt, dass 1.000 RU der Anlagerung von 1 ng/mm² Protein oder Nukleinsäure entsprechen. Dabei resultiert eine Ablenkung des Reflexionswinkels um 0,1°). Durch die Messung können also Assoziation und Dissoziation von Analyt und Ligand erfasst werden und Gleichgewichtskonstanten der Interaktion bestimmt werden (LOTTSPREICH et al., 2006).

Eine typische Messanordnung und Messung sind in Abb. 3.2 dargestellt.

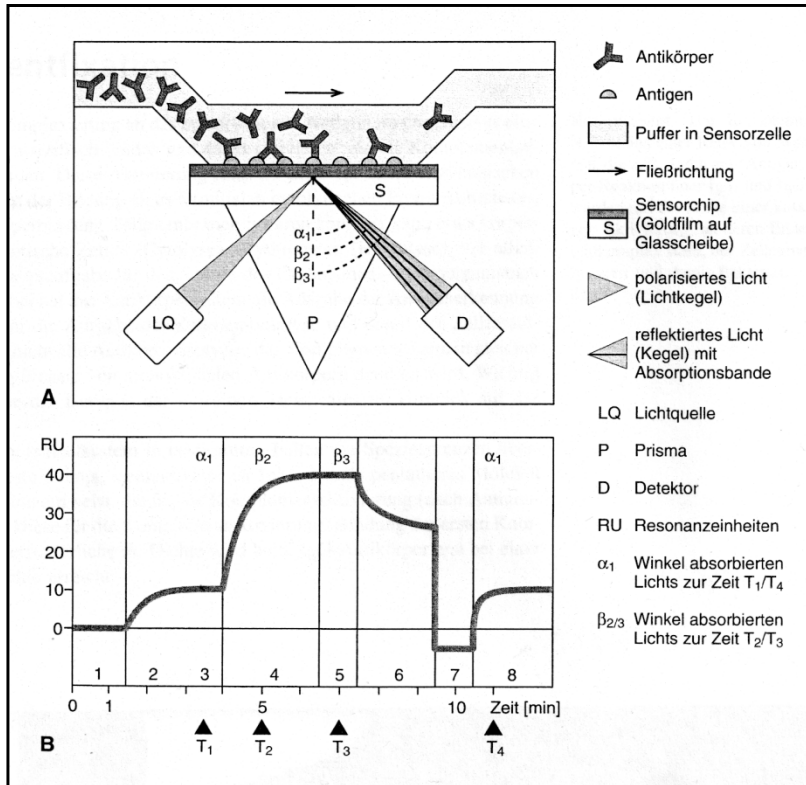


Abb. 3.2: Messung einer Antikörperbindung an ein Antigen mithilfe der SPR-Biacore-Technik in Echtzeit. A) Schematischer Aufbau der Anordnung mit Lichtquelle (LQ), Sensorchip (S), Detektor (D) und kontinuierlich durchströmbarer Minikammer mit insolubilisiertem Antigen auf der dem Puffer zugewandten Seite des Goldfilms. B) Das Messprofil der Antigen-Antikörper-Reaktion, die in A dargestellt ist. Das Profil zeigt die in den Phasen 1-8 am Sensorchip gebundenen Proteinmengen. 1 Basislinie (Sensorchip ohne Protein); 2 Antigenadsorption an

den Goldfilm bis zur Sättigung; 3 Auswaschung überschüssigen Antigens; 4 zunehmende Antikörperbindung; 5 Antikörperbindung gesättigt; 6 Puffer ohne Antikörper, Dissoziation der niedrig affinen Antikörper (frühes Antiserum kurz nach der Immunisierung); 7 Dissoziation der höher affinen Antikörper mit denaturierendem Puffer und Regeneration für einen weiteren Test.

α_1 Winkel zur Zeit T_1 , Ausgangslage (Phase 1 und 8); β_2 Winkel zur Zeit T_2 (Phase 4, das in A dargestellte Stadium); β_3 Winkel zur Zeit T_3 in Phase 5; RU Resonanzeinheiten, eine Einheit entspricht 1 pg/mm^2 . (Die Lichtkegel in ihrem Verlauf sind sehr vereinfacht dargestellt.) Aus Lottspeich et al. (LOTTSP EICH et al., 2006).

Vor Beginn der Messung wurde die Carboxymethyldextran-Glas-Oberfläche auf dem Gold-Sensorchip mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, um reaktive Succinimid-Ester zu erhalten. Anschließend wurde ein GST-Antikörper kovalent auf dem Chip immobilisiert, indem dessen primäre Aminogruppen (Lysinreste sowie der N-Terminus des Proteins) mit den Succinimid-Ester-Gruppen reagierten und eine stabile Amidgruppe zur Chip-Oberfläche ausbildeten. Überschüssige Succinimid-Ester-Gruppen wurden mit Ethanolamin weggebunden und mit NP40-Puffer (5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 200 KIU/mL Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF) äquilibriert. In vier verschiedenen Flusszellen wurden nun

verschiedene GST-Fusionsproteine an den Antikörper gebunden: 1) GST allein, 2) GST-SHIP1-SH2 WT, 3) GST-SHIP1-SH2 F28L und 4) GST-SHIP1-SH2 R31Q. Im ersten Experiment wurde ein Lysat GM-CSF-stimulierter TF-1 I33-5-Zellen (siehe 3.1.4.3) nacheinander in den Verdünnungen 1/100, 1/10 und unverdünnt für je 3 min (1/100 und 1/10) bzw. 10 min (unverdünnt) appliziert, dazwischen mit einer Glycinlösung pH 2,5 je zweimal gewaschen. Dadurch wurden die an den Antikörper gebundenen Proteine gewaschen und mussten anschließend erneut gekoppelt werden.

Im zweiten Experiment wurde statt eines Lysats ein 12-AS-Phosphopeptid appliziert mit der Sequenz LFDDPSpYVNVQN, die den AS 311-322 von humanem p52 SHC1 entspricht (Peptides&Elephants, Potsdam), und zwar in den Konzentrationen 0,3 μ M und 3 μ M Phosphopeptid.

Die Messungen wurden von Dr. Christian Schulze am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) durchgeführt.

3.2.20 Calcium-Messung

3.2.20.1 Methoden zur Untersuchung von Calciumsignalen: Das Fura-2-System

Um Calciumsignale in Zellen beobachten zu können, werden fluoreszierende Calciumindikatoren eingesetzt, mit möglichst hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung, so dass in Dimensionen von Millisekunden und Milli- bis Nanometern gemessen werden kann. Wichtig sind kinetische Eigenschaften, Calciumaffinität sowie der dynamische Bereich, um das Calciumsignal in der Zelle vollständig aufzunehmen.

Obwohl sich die fluoreszierenden Indikatoren in ihren Eigenschaften unterscheiden, sind sie alle Derivate von BAPTA (1,2-bis(*o*-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraethansäure), einem Calcium-Chelator mit einer ähnlichen Struktur wie EGTA. Es bindet Calcium mit einer Stöchiometrie von 1:1 und zeigt eine hohe Selektivität für Calcium über Magnesium. Auch andere Metallionen binden an BAPTA und seine Derivate, wovon einige einen ähnlichen Effekt wie Calcium auf die Fluoreszenz haben, andere, wie Mangan und Nickel, häufig die Fluoreszenz des Indikators quenchen (PUTNEY, 2000).

Das in diesem Versuch verwendete BAPTA-Derivat Fura-2-AM (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-Aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-

Tetraethansäure-pentakis-Acetoxy-methylester) ist ein traditioneller, hoch-affiner ratiometrischer Calciumindikator, der durch ultraviolettes Licht angeregt wird (PUTNEY, 2000).

Das Fura-2-Molekül bindet als Calcium-Chelator Ca^{2+} mit vier Carboxylgruppen. Die Stilbengruppe ist der Chromophor des Moleküls. Diese Substanz ist sehr selektiv für Ca^{2+} , und fast unempfindlich für pH-Schwankungen im physiologischen Bereich. Die Ca^{2+} -Affinität ist sehr günstig für physiologische Messungen: Die Dissoziationskonstante beträgt etwa 224 nM (GRYNKIEWICZ et al., 1985), liegt also genau in dem Bereich zellulärer Ca^{2+} -Signale (0,1-1 μM , = dynamischer Bereich).

Fura-2 wird als sein Acetoxy-methyl(AM)ester eingesetzt, damit es membranpermeabel ist und ins Cytoplasma der Zellen eingeschleust wird. Nach Abspaltung der AM-Gruppe durch unspezifische Esterasen im Cytosol verlässt Fura-2 die Zelle nicht mehr (PUTNEY, 2000).

Die Fluoreszenz von Fura-2 ändert sich sowohl mit der Wellenlänge des Anregungslichts als auch mit der Ca^{2+} -Konzentration. In Ca^{2+} -freier Lösung wird das blaue Spektrum mit einem Maximum bei 365 nm gemessen. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration verschiebt sich das Maximum auf 340 nm, und das rote Spektrum wird gemessen. Nur bei 360 nm, dem isosbestischen Punkt, ist die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration.

Bei Zugabe von Ca^{2+} zu einer Fura-2-Lösung ergeben sich also zwei gegenläufige Änderungen der Fluoreszenzintensität: Eine Zunahme bei 340 nm und eine Abnahme bei 380 nm. Auf diesem Effekt beruht die Verwendung von Fura-2 zur Messung der Ca^{2+} -Konzentration.

Die besondere Eignung von Fura-2 für Ca^{2+} -Messungen beruht auf dem Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Ca^{2+} -Konzentration. Wenn eine Fura-2-gefüllte Zelle mit Anregungslicht der Wellenlänge 340 nm beleuchtet wird, fluoresziert der Farbstoff bei ca. 510 nm mit der Intensität F_{340} . Die Intensität des Fluoreszenzlichtes wird bestimmt durch die Konzentration des Farbstoffs (c), die Dicke der Zelle (d), eine Konstante (K), die die optischen Eigenschaften der Messapparatur zusammenfasst, und sie ist auch eine Funktion der Ca^{2+} -Konzentration $f[\text{Ca}^{2+}]$) (<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/cellfur.htm>):

$$F_{340} = c \cdot d \cdot K \cdot f([\text{Ca}^{2+}])$$

Da aber weder c noch d noch K bekannt sind, ist es nicht möglich die Ca^{2+} -Konzentration aus der Intensität des Fluoreszenzlichtes F_{340} zu berechnen. Hier hilft nun die Eigenschaft von

Fura-2, auf Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration mit einem Anstieg von F_{340} und meinem Abfall von F_{380} zu reagieren:

Führt man zwei Fluoreszenzmessungen kurz hintereinander durch, und zwar zuerst mit einem Anregungslicht von 340 nm und dann bei 380 nm, kann man annehmen, dass sich weder c noch d oder K zwischen den beiden Messungen ändern. Wenn man dann die beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} durcheinander teilt, kann man die drei unbekanntenen Größen kürzen. Durch diesen Trick erhält man eine experimentell bestimmbare Messgröße (den Quotienten F_{340}/F_{380}), die nur von der Ca^{2+} -Konzentration abhängt.

$$\frac{F_{340}}{F_{380}} = \frac{c \cdot d \cdot K \cdot f([\text{Ca}^{2+}])}{c \cdot d \cdot K \cdot f'([\text{Ca}^{2+}])}$$

Der Quotient F_{340}/F_{380} wird oft mit R (*ratio*) bezeichnet. Er ermöglicht die Messung absoluter Ca^{2+} -Konzentrationen in lebenden Zellen, weil er unabhängig von Farbstoffkonzentration und Zellform ist.

$$R = \frac{F_{340}}{F_{380}} = f'([\text{Ca}^{2+}])$$

Um von einem gemessenen R -Wert auf die Ca^{2+} -Konzentrationen schließen zu können, muss die Ca^{2+} -Abhängigkeit von R experimentell ermittelt werden. Dazu wird R bei einer Reihe von bekannten Ca^{2+} -Konzentrationen gemessen, so dass eine Eichkurve erstellt werden kann. Mit Hilfe dieser Kurve kann für jeden in der Zelle gemessenen R -Wert die entsprechende Ca^{2+} -Konzentration abgeleitet werden.

In diesem Versuch wird die Ca^{2+} -Konzentration über folgende Formel berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_2 = 224 \text{ nM} \cdot \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{C2}{B2},$$

wobei R die Ratio des Zeitpunktes der zu bestimmenden Ca^{2+} -Konzentration ist, R_{\max} die Ratio der Ca^{2+} -Konzentration nach Triton X-100-Zugabe, R_{\min} die Ratio nach EGTA-Zugabe, $B2$ die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm nach Triton X-100-Zugabe ($F_{380\max}$), $C2$ die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm nach EGTA-Zugabe ($F_{380\min}$). Anders als bei R_{\max} und R_{\min} ist $F_{380\max}$ kleiner als $F_{380\min}$.

Nachteile von UV-Licht-Anregung sind Zellschaden, schwache Transmission durch Glas und die Anregung von endogenen Fluorophoren wie NADH und NADPH. Außerdem erscheinen große und schnelle Calcium-Transienten mit hoch-affinen Indikatoren gedämpft und verlängert, verglichen mit niedrig-affinen Indikatoren (PUTNEY, 2000).

Durch die AM-Gruppe kann Fura-2 allerdings auch in Organellen eintreten, was möglicherweise zu Artefakten führt. Denn wenn dort die geeigneten Esterasen vorliegen, um AM abzuspalten, kommt es zu einer Anreicherung / Kompartimentierung des Farbstoffes.

Das Beladen von Zellen mit fluoreszenten Indikatoren kann sowohl die Ca^{2+} -Pufferungs-Kapazität als auch die Sensitivität der IP_3Rs stören (PUTNEY, 2000).

3.2.20.2 Durchführung

Etwa 48 Std. vor der Messung wurde in Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Expression induziert. Dazu wurden 4×10^6 Zellen bei $259 \times g$ abzentrifugiert und in 10 mL RPMI-Medium 1640 GlutaMAX-I (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit 10% (v/v) FCS (GIBCO, Invitrogen), 1% (v/v) Penicillin G/Streptomycin-Lösung (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 mM Natriumpyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe) mit $1 \mu\text{g/mL}$ Doxycyclin resuspendiert und bis zur Messung im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 gehalten. Aufgrund der Anzahl der Klone wurde die Messung auf drei Tage pro Woche aufgeteilt. Ein Teil der Klone wurde montags induziert und mittwochs vermessen, ein anderer Teil dienstags induziert und donnerstags vermessen, und ein weiterer Teil mittwochs induziert und freitags vermessen. Da jeder Klon dreimal und an drei verschiedenen Tagen vermessen werden sollte, wurde über drei Wochen gemessen und in jeder Woche der Tag der Induktion und damit der Messung für alle Klone gewechselt, so dass jeder Klon einmal mittwochs, donnerstags und freitags vermessen wurde, um Unterschiede auszuschließen, die allein durch die Kultivierung zustande kommen.

Am Tag der Messung wurden pro Klon 5×10^6 Zellen bei $520 \times g$ 6 min abzentrifugiert, in 0,5 mL 37°C warmem Medium resuspendiert und für 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert (f.c. = 1×10^7 Zellen/mL). Die Röhrchen wurden mit Alufolie umwickelt. Um die Zellen mit Fura-2-AM zu beladen, wurden je $2 \mu\text{L}$ einer 1 mg/mL -Stammlsg., i.e. $\sim 1 \text{ mM}$, zu den Zellen gegeben (f.c. = $4 \mu\text{M}$), sofort vorsichtig geschüttelt und für 15 min im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wurde 1/5 mit 37°C warmem Medium verdünnt,

d.h. 2 mL zugegeben. Die Zellen wurden bei 520 x g 6 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in 10 mL Raumtemperatur-warmem Messpuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES, 1 mM NaH₂PO₄, 5,5 mM Glucose, pH 7,4) resuspendiert (f.c. = 5x10⁵ Zellen/mL). Der Messpuffer soll nicht wärmer als Raumtemperatur sein, da die Zellen sonst Fura-2 über MDR(*multiple drug resistance*)-Transporter wieder aus der Zelle ausschleusen.

Für jeden Klon wurden die ersten sieben Löcher einer schwarzen 96-Lochplatte (BRANDplates, 96, pureGrade, PS, schwarz, F-Boden, unsteril, BRAND, Wertheim) ausgesät, und zwar 100 µL/Loch, entsprechend 50.000 Zellen/Loch. Die Messungen wurden in einem Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, 5082 Grödig, Österreich) durchgeführt. Zur Bestimmung der maximalen Ratio F₃₄₀/F₃₈₀ und B2 (F_{380max}) wurden zu zwei Spalten mit einer Multipette 50 µL/Loch einer 0,4% (v/v) Triton X-100-Stammlösung gegeben (f.c. = 0,13%) und jeweils vermessen. Zur Bestimmung der minimalen Ratio F₃₄₀/F₃₈₀ und C2 (F_{380min}) wurden zu zwei Spalten mit einer Multipette 50 µL/Loch einer 0,4% (v/v) Triton X-100 / 30 mM EGTA pH 7,4-Stammlösung gegeben (f.c. = 0,13% Triton X-100, 10 mM EGTA) und jeweils vermessen. Zur Bestimmung des Calciumsignals nach TCR-Stimulation wurden zu drei Spalten mit einer Multipette 50 µL/Loch einer 30 µg/mL OKT3-Stammlösung gegeben (f.c. = 10 µg/mL) und jeweils für 15 min vermessen. OKT3 ist ein muriner monoklonaler Antikörper, der gegen CD3 des TCR gerichtet ist. Im Anschluss wurden in die übrigen 5 Löcher jeder Reihe Zellen ausgesät, weitere drei Spalten mit OKT3 stimuliert, zu einer Spalte 50 µL nur Messpuffer gegeben, und eine Spalte diente als Reserve.

4 Ergebnisse

In 3% von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie wurden Mutationen in der Inositol-5-Phosphatase SHIP1 gefunden (GILBY et al., 2007; HORSTMANN and JÜCKER, unveröffentlicht; LUO et al., 2004; LUO et al., 2003; ZHANG et al., 2006), siehe auch 2.13.2. Diese Mutationen wurden hinsichtlich ihrer biologischen Funktion in der T-ALL (akute lymphatische Leukämie)-Zelllinie Jurkat untersucht. Diese Zelllinie exprimiert aufgrund inaktivierender Mutationen in beiden Allelen des endogenen SHIP1-Gens, *INPP5D*, siehe auch 2.16, kein SHIP1-Protein (LO et al., 2009).

4.1 Herstellung SHIP1-exprimierender Jurkat-Klone

SHIP1 sollte induzierbar in Klonen der Jurkat-T-Zelllinie exprimiert werden. Dazu wurde in der SHIP1-codierenden Sequenz zuerst das Codon für die Aminosäure Valin 117 deletiert. Diese zusätzliche Aminosäure in SHIP1 stellt einen genetischen Polymorphismus dar. In allen 97 AML-Proben und den zusätzlichen Proben von Gesunden, die im Rahmen der dieser Arbeit vorangegangenen genomischen Sequenzierung analysiert wurden, war V117 deletiert. Anschließend wurden die Mutationen per ortsgerichteter Mutagenese in SHIP1 eingeführt. Jurkat Tet-On-Zellen, die einen reversen tet-Transaktivator (rtTA, siehe auch 3.2.11.8) exprimieren, wurden γ -retroviral mit einem SHIP1-codierenden Vektor transduziert, dessen Transkription nach Integration in das Zellgenom unter der Kontrolle eines TREs (*tet response element*) steht.

Nach der Transduktion wurden die Zellen für mindestens zwei Wochen für den SHIP1- und den rtTA-Vektor selektioniert. Aus den so erhaltenen Massenkulturen wurden durch Verdünnung und Aussäen in 96-Loch-Platten nach Beobachtung über mehrere Wochen 0-25 Einzelklone pro Platte erhalten.

Es wurden für den WT, die 15 Mutationen und die Vektorkontrolle insgesamt 254 Klone erhalten, von einem bis 30 pro Mutation.

Von den 254 Klonen exprimierten 100 Klone SHIP1 nach Induktion mit 1 μ g/mL im Medium. Einige dieser 100 Klone zeigten eine sehr strikte (*tight*) Regulation, d.h. sie exprimierten SHIP1 erst nach Zugabe von Doxycyclin ins Medium. Andere Klone waren *leaky*, d.h. sie exprimierten SHIP1 bereits ohne Doxycyclin, die SHIP1-Expression ließ sich

aber durch Doxycyclin-Zugabe ins Medium steigern. Viele der 100 Klone exprimierten SHIP1 konstitutiv, d.h. bereits ohne Doxycyclin, und durch Doxycyclin ließ sich keine Steigerung mehr erreichen.

Die SHIP1-Expressionslevel variierten zwischen den Mutanten, weniger zwischen den Klonen einer Mutation. Um alle Mutationen untersuchen zu können, wurde fortan immer mit 1 µg/mL Doxycyclin (+Dox) im Medium gearbeitet, d.h. alle Mutanten-Klone exprimierten SHIP1 unter diesen Bedingungen. Als Kontrolle diente der Vektorklon.

SHIP1-exprimierende Klone, mit denen weitergearbeitet wurde, sind in Abb. 4.1 dargestellt.

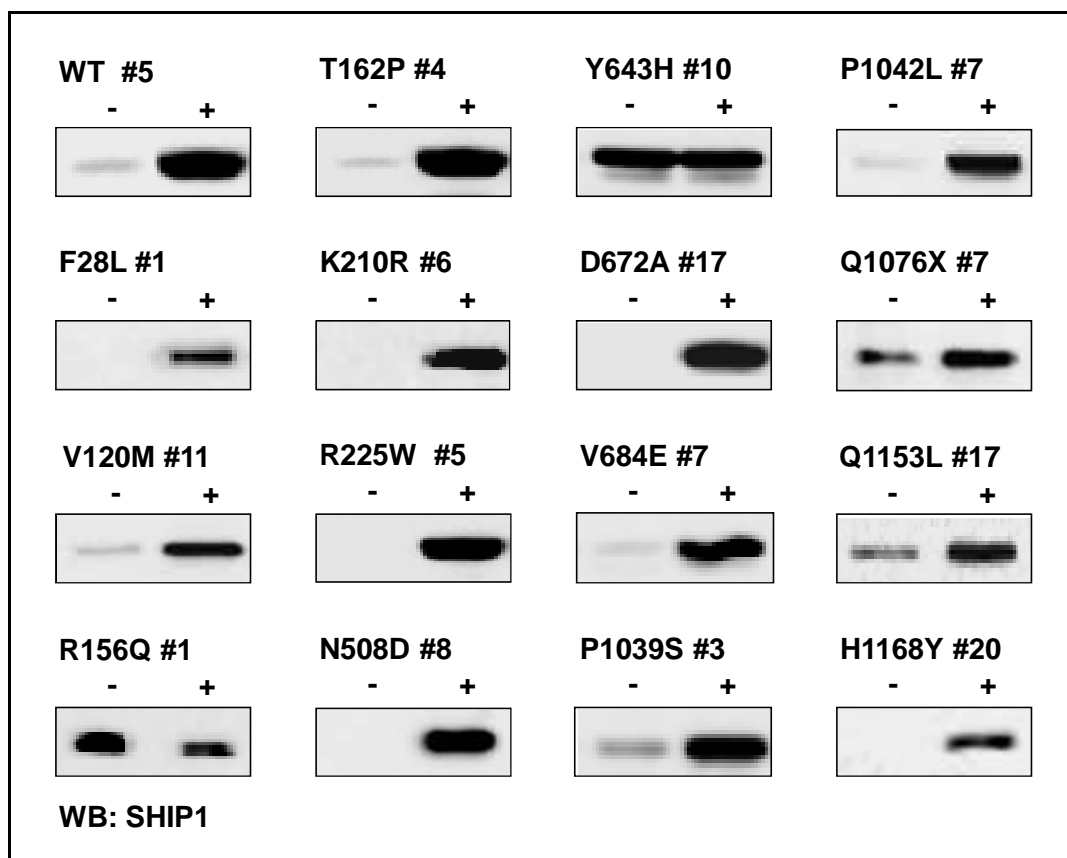


Abb. 4.1: SHIP1-Expression in transduzierten Jurkat Tet-On-Klonen. Jurkat Tet-On-Zellen wurden mit SHIP1 WT oder Mutanten retroviral transduziert, die Zellen nach Inhalt der Konstrukte für rtTA und SHIP1 selektioniert und durch Endpunktverdünnung Klone etabliert. Diese wurden für 48 Std. in Medium mit 1 µg/mL Doxycyclin (+) bzw. 1 µL/mL 70% Ethanol (-) kultiviert, lysiert und im *Western Blot* auf Doxycyclin-induzierbare SHIP1-Exprssion hin getestet.

Vor der Transduktion wurde die gesamte SHIP1-codierende Sequenz in allen Vektoren, für den WT und die SHIP1-Mutanten, sequenziert. Nach der Transduktion wurde in allen Klonen,

mit denen fortan gearbeitet wurde, die jeweilige Mutation auf genomischer Ebene bestätigt, siehe Abb. 4.2. Dies geschah durch Sequenzierung mit Intron-überspannenden Primern, um keine Amplifikate des endogenen SHIP1-Gens zu erhalten.

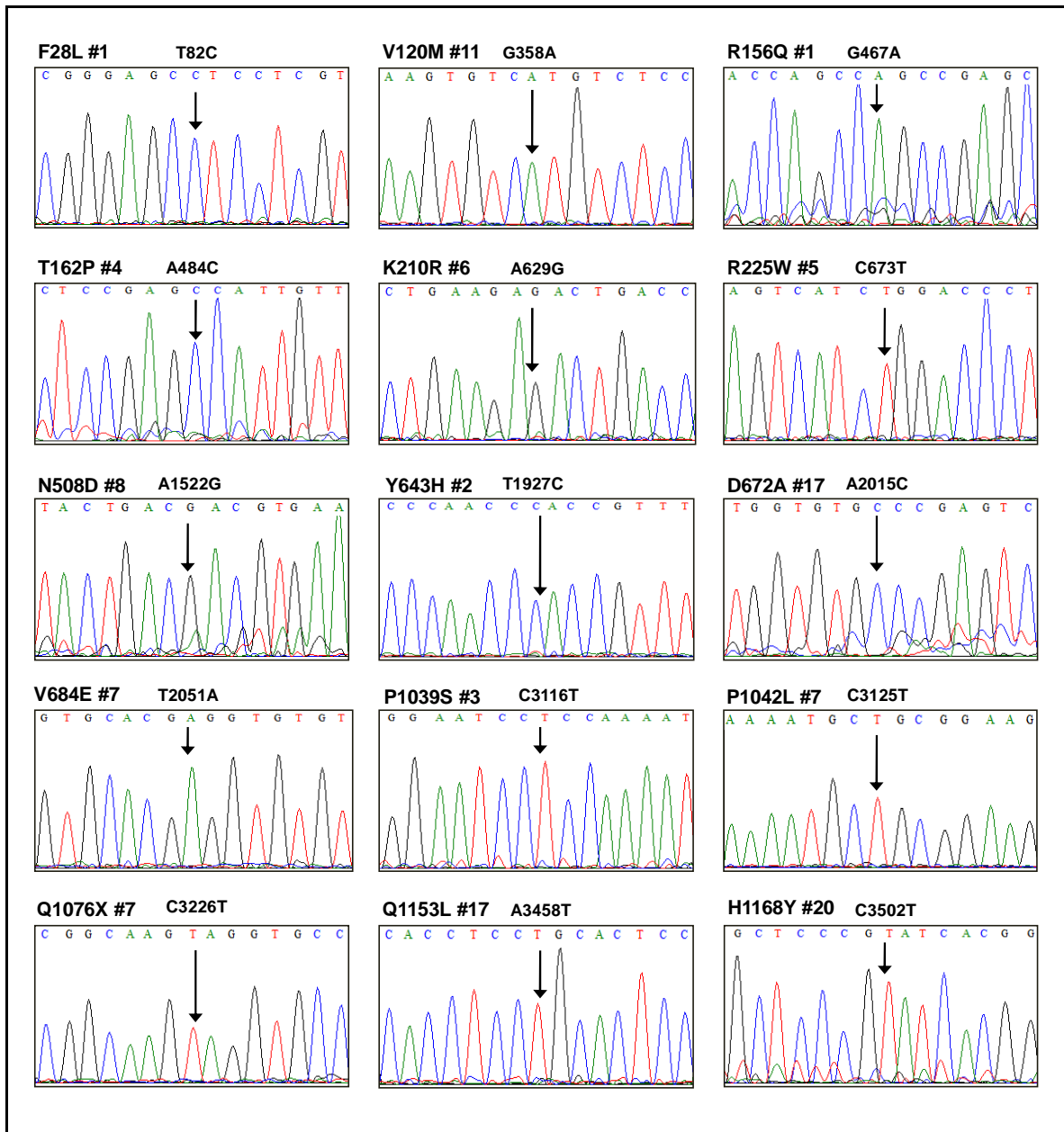


Abb. 4.2: Genomische Sequenzierung der SHIP1-transduzierten Jurkat Tet-On-Klone zur Bestätigung der Mutationen. Jurkat Tet-On-Zellen wurden mit SHIP1-WT oder SHIP1-Mutanten transduziert, es wurden Klone selektiert und auf induzierbare SHIP1-Expression hin getestet. Aus den für die Folgeexperimente ausgewählten Klonen wurde genomische DNA isoliert und mit Exon-überspannenden Primern die jeweilige Mutation bestätigt.

4.2 Sequenzierung von Exon 26 – der SNP H1168Y

Im Rahmen der Sequenzierung der SHIP1-codierenden Sequenz auf genomischer Ebene wurden am Kinderkrebszentrum Hamburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Horstmann 26 der insgesamt 27 Exons des humanen SHIP1 von 97 AML auf Mutationen hin analysiert. Das übrige Exon, Exon 26, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit sequenziert.

Exon 26 enthält mit 592 Nukleotiden den größten Anteil der codierenden Sequenz von SHIP1 unter den 27 *INPP5D*-Exons, siehe Tab. 4.1 (Übersicht SHIP1-Exons).

Tab. 4.1: Exon-Übersicht des humanen SHIP1-Gens *INPP5D*.

Erhalten mit BLAST (*basic local alignment tool*) (ZHANG et al., 2000) der SHIP1-cDNA-Sequenz, GenBank *accession number* U57650.

Exon	Nukleotide der codierenden Sequenz	Größe des Exons in bp	Codiert AS
1	5'UTR und 1-134	646	1-45
2	135-198	64	45-66
3	199-349	151	67-116
4	350-521	172	117-174
5	522-662	141	174-221
6	663-750	88	221-250
7	751-831	81	251-277
8	832-903	72	278-301
9	904-1027	124	302-343
10	1028-1134	107	343-378
11	1135-1237	103	379-413
12	1238-1434	197	413-478
13	1435-1552	118	479-518
14	1553-1649	97	518-550
15	1650-1788	139	550-596
16	1789-1897	109	597-633
17	1898-1986	89	633-662
18	1987-2068	82	663-690
19	2069-2158	90	690-720
20	2159-2272	114	720-758
21	2273-2355	83	758-785
22	2356-2443	88	786-815
23	2444-2593	150	815-865
24	2594-2690	97	865-897
25	2691-2972	282	897-991
26	2973-3564	592	991-1188
27	3565-3567 und 3'UTR	1191	Stopp

Exon 26 enthält in den Sequenzierungsdaten von 97 AML und 16 gesunden Spendern zwei cSNPs (*single nucleotide polymorphism in coding sequence*), siehe auch 2.14, davon ist einer still und einer ist ein *missense*-cSNP. Beide sind in der SNP-Datenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) bereits verzeichnet.

Tab. 4.2: cSNPs in SHIP1 Exon 26. *Reference SNP cluster ID (rs)* von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

SNP	G3258A		C3502T	
Aminosäure	T1086T		H1168Y	
<i>Reference SNP cluster ID (rs)</i>	7346		9247	
	AML	gesund	AML	Gesund
homozygot für Referenzallel	55	7	56	7
heterozygot	33	8	32	9
homozygot für das andere Allel	9	1	9	0

Für die stille, oder synonyme, Mutation G3258A (T1086) waren von 97 AML 55 homozygot G/G, 33 heterozygot G/A und 9 homozygot A/A. Von 16 Gesunden waren 7 homozygot G/G, 8 heterozygot G/A und 1 homozygot A/A.

Für die *missense*-Mutation, oder nicht-synonyme Mutation, C3502T (H1168Y) waren von 97 AML 56 homozygot C/C (His/His), 32 heterozygot C/T (His/Tyr), 9 homozygot T/T (Tyr/Tyr) für Aminosäure 1168. Von 16 Gesunden waren 7 homozygot His/His, 9 heterozygot His/Tyr, keiner homozygot Tyr/Tyr.

G3258 und C3502 lagen offensichtlich wie A3258 und T3502 jeweils zusammen auf einem Allel bei 111 von 113 Proben. Bei einem Gesunden und einer AML lagen A3258 und C3502 zusammen auf einem Allel, zwischen beiden Positionen muss es also zum *Crossing Over* gekommen sein. Die Rekombinationshäufigkeit beträgt $2/226 = 0,9\% = 0,9$ cM (centiMorgan).

In Tab. 4.3 sind die Sequenzierungsdaten für den SNP H1168Y für verschiedene Populationen von der Datenbank Hapmap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) aufgeführt und um die eigenen, unterteilt nach AML und gesund, ergänzt. Die Häufigkeiten sowohl für AML als auch für Gesunde liegen zwischen denen der verschiedenen Populationen und es wird kein Zusammenhang zwischen ihnen und AML gesehen. Auffällig ist zwar, dass keiner der 16 Gesunden homozygot für Y1168 war, vermutet wird aber, dass dies an der geringen Probenzahl lag.

Tab. 4.3: Genotyp- und Allel-Häufigkeiten des SNP H1168Y in verschiedenen Populationen. Die Daten stammen von <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/> (Stand: August 2010) und wurden um die eigenen Daten ergänzt (abgesetzt). Das Tabellenlayout samt englischer Sprache wurde übernommen. Populationen: ASW (A): *African ancestry in Southwest USA*, CEU (C): *Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection*, CHB (H): *Han Chinese in Beijing, China*, CHD (D): *Chinese in Metropolitan Denver, Colorado*, GIH (G): *Gujarati Indians in Houston, Texas*, JPT (J): *Japanese in Tokyo, Japan*, LWK (L): *Luhya in Webuye, Kenya*, MEX (M): *Mexican ancestry in Los Angeles, California*, MKK (K): *Maasai in Kinyawa, Kenya*, TSI (T): *Tuscan in Italy*, YRI (Y): *Yoruban in Ibadan, Nigeria*. CEPH: *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*.

Population	Genotype frequencies										Allele frequencies						
	C/C			C/T			T/T			Total	Ref-allele			Other-allele			Total
	genotype	freq	count	genotype	freq	count	genotype	freq	count		allele	freq	count	allele	freq	count	
ASW (A)	C/C	0,589	33	C/T	0,357	20	T/T	0,054	3	56	C	0,768	86	T	0,232	26	112
CEU (C)	C/C	0,881	77	C/T	0,301	34	T/T	0,018	2	113	C	0,832	188	T	0,168	38	226
CHB (H)	C/C	0,423	58	C/T	0,445	61	T/T	0,131	18	137	C	0,646	177	T	0,354	97	274
CHD (D)	C/C	0,385	42	C/T	0,486	53	T/T	0,128	14	109	C	0,628	137	T	0,372	81	218
GIH (G)	C/C	0,545	55	C/T	0,386	39	T/T	0,069	7	101	C	0,738	149	T	0,262	53	202
JPT (J)	C/C	0,469	53	C/T	0,416	47	T/T	0,115	13	113	C	0,677	153	T	0,323	73	226
MEX (M)	C/C	0,614	35	C/T	0,281	16	T/T	0,105	6	57	C	0,754	86	T	0,246	28	114
MKK (K)	C/C	0,721	111	C/T	0,273	42	T/T	0,006	1	154	C	0,857	264	T	0,143	44	308
TSI (T)	C/C	0,539	55	C/T	0,412	42	T/T	0,049	5	102	C	0,745	152	T	0,255	52	204
YRI (Y)	C/C	0,767	112	C/T	0,233	34	T/T	0	0	146	C	0,884	258	T	0,116	34	292
AML	C/C	0,577	56	C/T	0,330	32	T/T	0,093	9	97	C	0,742	144	T	0,258	50	194
Healthy	C/C	0,438	7	C/T	0,563	9	T/T	0	0	16	C	0,719	23	T	0,281	9	32

Um zu ermitteln, ob sich die sequenzierte Proben-Population in Hardy-Weinberg-Proportionen befindet, kann aufgrund der Bekanntheit der Allelhäufigkeiten für C3502 und T3502 zunächst die Hardy-Weinberg-Erwartung (E) der Genotypen aufgestellt werden und anschließend mit der tatsächlich beobachteten verglichen und im χ^2 -Quadrat-Test eine mögliche Abweichung von den Hardy-Weinberg-Proportionen überprüft werden (http://en.wikipedia.org/wiki/Hardy-Weinberg_principle), zunächst für die AML-Proben:

$$E(CC) = p^2 n = 0,742^2 \cdot 97 = 53$$

$$E(CT) = 2pq n = 2 \cdot 0,742 \cdot 0,258 \cdot 97 = 37$$

$$E(TT) = q^2 n = 0,258^2 \cdot 97 = 6$$

mit n: Gesamtzahl der AML-Proben.

χ^2 ergibt sich aus der Summe der beobachteten Anzahl je Genotyp (B) abzüglich der erwarteten Anzahl je Genotyp (E) zum Quadrat relativ zur erwarteten Anzahl je Genotyp:

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{(56-53)^2}{53} + \frac{(32-37)^2}{37} + \frac{(9-6)^2}{6} = 1,84$$

Für die gesunden Spender ergeben sich folgenden Rechnungen:

$$E(CC) = p^2n = 0,719^2 \cdot 16 = 8$$

$$E(CT) = 2pqn = 2 \cdot 0,719 \cdot 0,281 \cdot 16 = 6$$

$$E(TT) = q^2n = 0,281^2 \cdot 16 = 1$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = \frac{(7-8)^2}{8} + \frac{(9-6)^2}{6} + \frac{(0-1)^2}{1} = 2,45$$

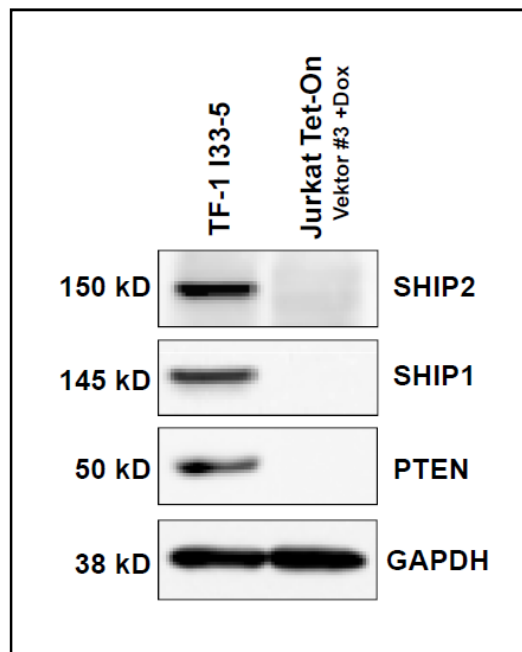
Bei drei Genotypen und zwei Allelen ergibt sich ein Freiheitsgrad, sodass eine 95%ige Wahrscheinlichkeit der Hardy-Weinberg-Proportionen bei einem χ^2 -Wert von $<3,84$ zutrifft, und das ist für AML-Proben und gesunde Spender der Fall.

4.3 Jurkat-Zellen exprimieren kein SHIP1, SHIP2 und kein PTEN

Jurkat-Zellen exprimieren weder PTEN (FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; LO et al., 2009; SAKAI et al., 1998; SHAN et al., 2000), noch SHIP1 (BRUYNS et al., 1999; FREEBURN et al., 2002; FUKUDA et al., 2005; GLOIRE et al., 2006; HORN et al., 2004; LO et al., 2009) oder SHIP2 (BRUYNS et al., 1999; GLOIRE et al., 2006). Dies konnte hier bestätigt werden, siehe Abb. 4.3.

Aufgrund dessen zeigen Jurkat T-Zellen ein sehr hohes basales PtdIns(3,4,5)P₃-Level und eine sich daraus ergebende konstitutive Akt-Aktivierung, weshalb sie ein geeignetes Modell darstellen, da die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs ein gemeinsames Merkmal von AML ist (BRANDTS et al., 2005; GRANDAGE et al., 2005; KORNBLAU et al., 2005; KUBOTA et al., 2004; MIN et al., 2003; TAZZARI et al., 2004; XU et al., 2003; ZHAO et al., 2004) und in 50-70% der AML-Fälle zu finden ist (MARTELLI et al., 2006).

Abb. 4.3: Jurkat-Zellen exprimieren kein SHIP1, SHIP2 oder PTEN. *Western Blot.* Gesamtzelllysate eines mit dem Leervektor transduzierten Jurkat Tet-On-Klons und des GM-CSF-unabhängig proliferierenden TF-1-Klons I33-5 als Positivkontrolle wurden nebeneinander aufgetragen. GAPDH diente als Ladekontrolle.



4.4 SHIP1-5-Phosphatase-Aktivität

SHIP1 spaltet den Phosphatrest an Position 5 des D-myo-Inositolrings in $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, hydrolytisch ab. Um die Inositol-5-Phosphatase-Aktivität unter den SHIP1-Mutanten zu vergleichen, sollte eine Methode angewandt werden, die ein wasserlösliches Substrat verwendet und bei der die Reaktion einfach detektierbar ist. $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ist aufgrund der langen Alkanoylreste (C16 oder C18, meist Stearoyl- an Position 1; C16 bis C20, meist Arachidonoyl-, an Position 2 des Glycerins) wasserunlöslich. Für die Analyse einer großen Probenanzahl war eine Detektion per Deacylierung der Produkte mit anschließender HPLC (MAYR, 1988) zu aufwendig. Es wurde daher eine Methode gewählt, bei der das laut Hersteller zu 1 mg/mL wasserlösliche $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -diC8 als Substrat und Malachitgrün als Detektionsreagenz für gebildetes anorganisches Phosphat als Maß für den Umsatz von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -diC8 verwendet wird (MAEHAMA et al., 2000; VANDEPUT et al., 2006). In Abb. 4.4 ist die Reaktion abgebildet.

Malachitgrün bildet bei niedrigem pH-Wert Komplexe mit Phosphomolybdat, wobei sich das Absorptionsmaximum deutlich verschiebt (Farbumschlag von gelb nach grün), mit einem hohen molaren Absorptionskoeffizienten ($\epsilon = 112.000$) (HESS and DERR, 1975; ITAYA and UI, 1966). Ein typischer Phosphatstandard zur Bestimmung des gebildeten anorganischen Phosphats während der Enzymreaktion ist in Abb. 4.5 dargestellt.

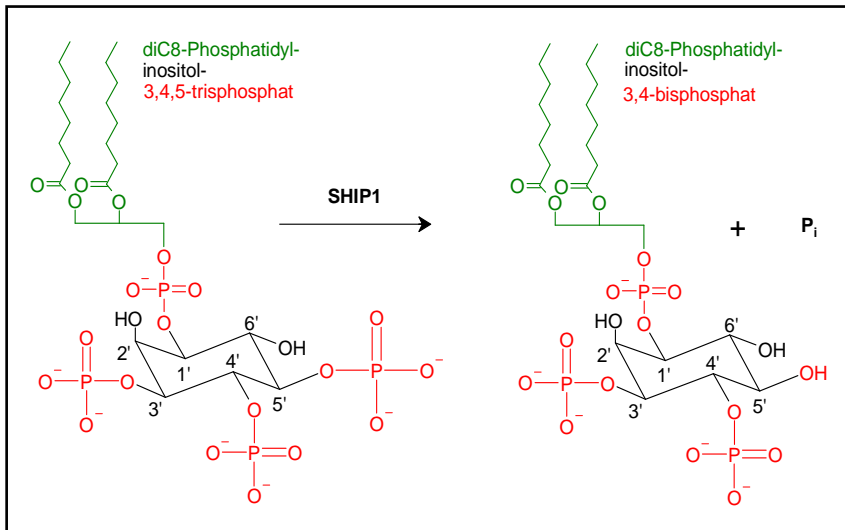


Abb. 4.4: Von SHIP1 katalysierte Reaktion im 5-Phosphatase-Assay. SHIP1 hydrolysiert das Phosphat an Position 5 von PtdIns(3,4,5)P₃-diC8, einer wasserlöslichen Form von PtdIns(3,4,5)P₃. Das entstehende Phosphat (P_i) ist als Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex messbar.

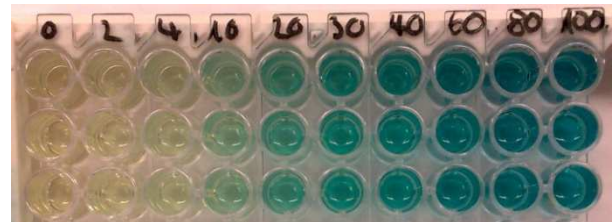
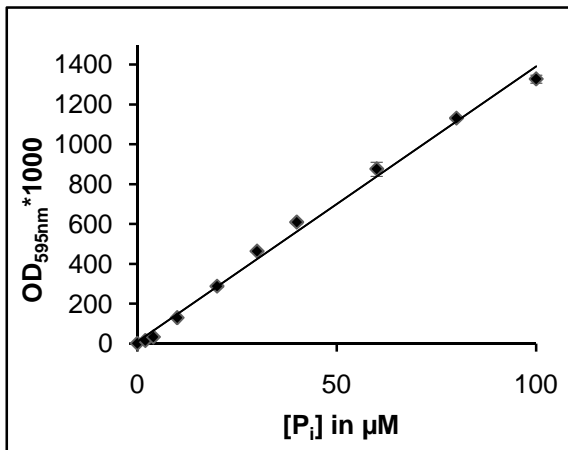


Abb. 4.5: Phosphat-Standard als Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex. Phosphat in den Konzentrationen 0 µM, 2 µM, 4 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM und 100 µM. Dreifachbestimmung ±SD.

Als PtdIns(3,4,5)P₃-diC8-Konzentration wurde 200 µM gewählt, wie sie in Membranen von Jurkat Tet-On-Zellen vor Re-Expression von SHIP1 zu erwarten ist (HORN et al., 2004).

Es wurde zunächst der lineare Bereich der Inositol-5-Phosphatase-Reaktion bestimmt, die SHIP1-Mutanten enzymatisch charakterisiert und schließlich die kinetischen Daten für humanes WT-SHIP1 erhoben.

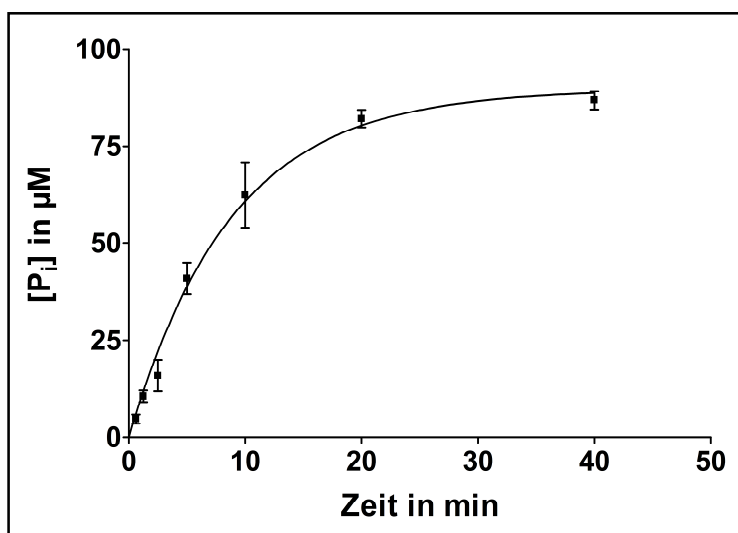
4.4.1 Bestimmung des linearen Bereichs der SHIP1-katalysierten Reaktion

Vor der enzymatischen Vermessung der SHIP1-Mutanten und für die spätere Bestimmung der enzymatischen Parameter von WT-SHIP1 sollte der lineare Bereich der 5-

Phosphatasereaktion ermittelt werden, also der Zeitraum der Reaktion, in dem Substratumsetzung bzw. Produktbildung noch linear erfolgen.

WT-SHIP1 aus Doxycyclin-induziertem Jurkat-Klon wurde immunpräzipitiert und die Bildung von anorganischem Phosphat (P_i) als Maß für den Umsatz von je 200 μM PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8 mit Malachitgrünreagenz zu acht Zeitpunkten (0 min, 0,625 min, 1,25 min, 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min, 40 min) bestimmt. In jede Immunpräzipitation wurde 1 mg Lysat eingesetzt und für jeden Zeitpunkt eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus Abb. 4.6 wurde der lineare Bereich auf 0 min bis 10 min bestimmt. Für alle folgenden Messungen wurde ein Zeitraum von 5 min für die Reaktion gewählt.

Abb.: 4.6: Zeitkinetik der SHIP1-katalysierten Hydrolyse des Phosphats an Position 5 von PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8. Aufgetragen ist die Konzentration des entstandenen Phosphats (P_i) als Maß für den Abbau von PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8, detektiert mit Malachitgrünreagenz, gegen die Zeit. Eingesetzt wurden je 200 μM PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8. Dreifachbestimmungen \pm SD.



4.4.2 Herstellung eines rekombinanten SHIP1-Standards

Um die in SHIP1-Immunpräzipitationen gemessene Phosphataseaktivität unter den Mutanten vergleichen zu können, wurde die Aktivität auf gleiche SHIP1-Proteinmengen normalisiert. Dazu wurde ein rekombinanter in Bakterien exprimierter SHIP1-Standard hergestellt und neben den SHIP1-Immunpräzipitationen nach dem Phosphatase-Assay im *Western Blot* aufgetragen. SHIP1-wurde dazu mit einem N-terminalen *Strep*-tag II in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pREP4 exprimiert, über eine *Strep*-Tactin-Säule aufgereinigt und die SHIP1-Proteinmenge anhand eines BSA-Standards im Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgel auf 18 ng/ μL quantifiziert, siehe Abb. 4.7.

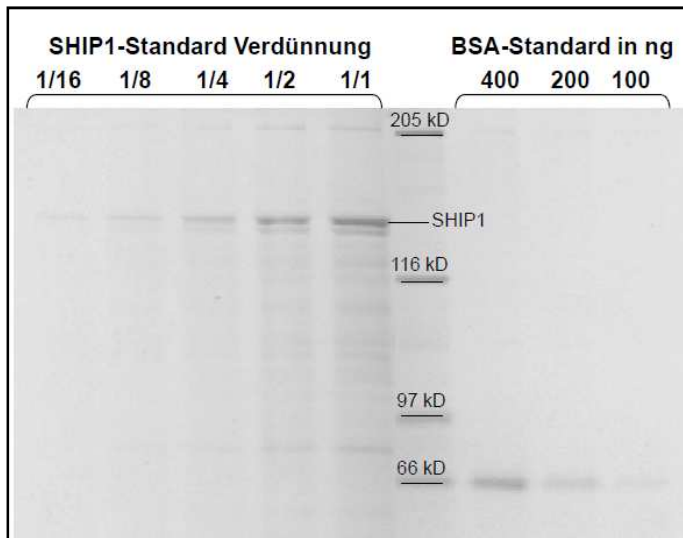
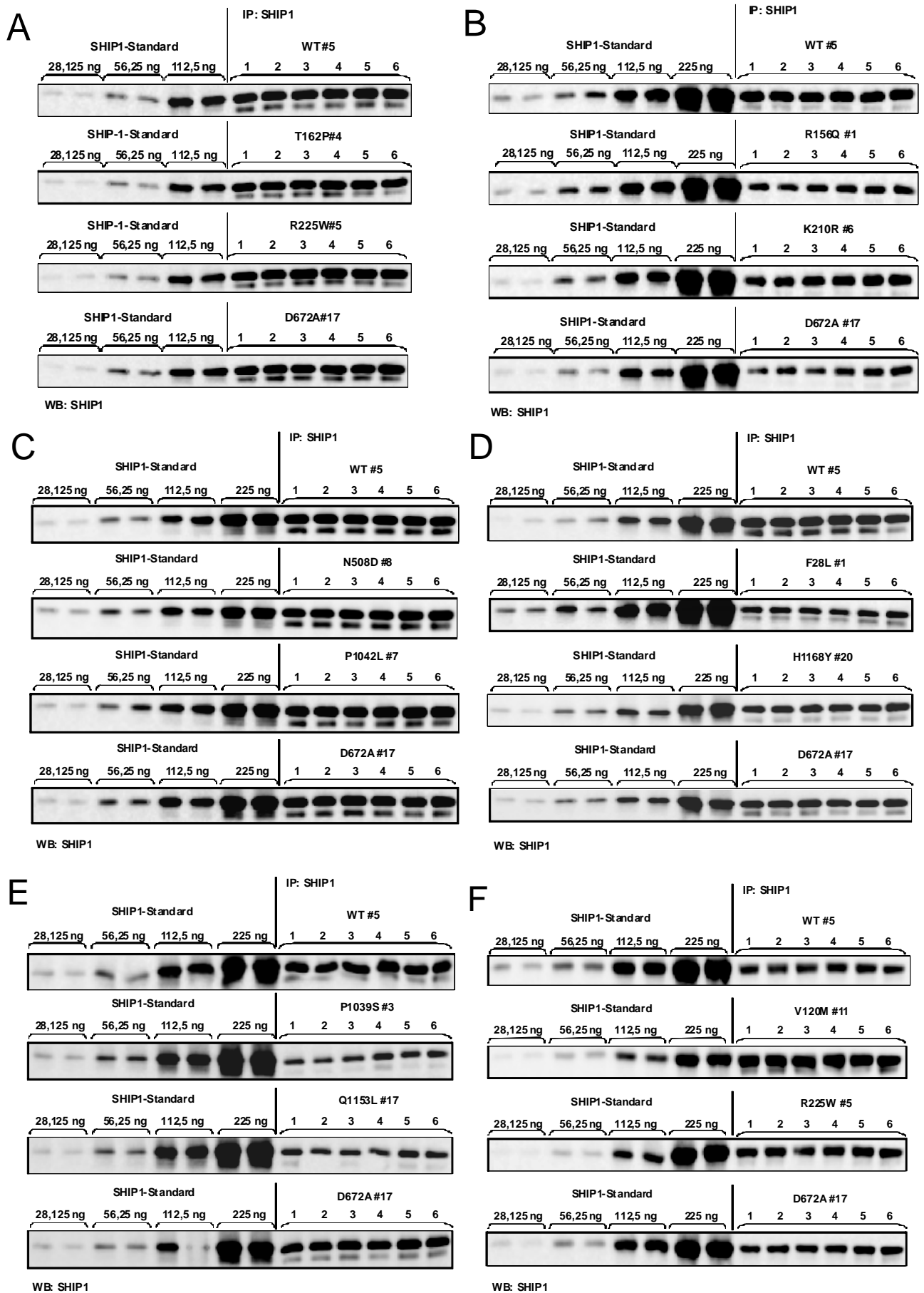


Abb. 4.7: Quantifizierung des rekombinanten SHIP1-Standards. *Strep-tag II-SHIP1* wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pREP4 exprimiert, über eine *Strep-Tactin*-Säule aufgereinigt und die SHIP1-Proteinmenge anhand eines BSA-Standards in einem Coomassie-Blau gefärbten Polyacrylamidgel bestimmt.

4.4.3 Vermessung der SHIP1-Mutanten aus Jurkat-Lysaten

Für den SHIP1-5-Phosphatase-Assay wurde SHIP1 aus nach Doxycyclin-Induktion SHIP1 WT oder –Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen mit anti-SHIP1-Antikörpern an Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe von 200 μ M PtdIns(3,4,5)P₃-diC8 für 5 min bei 30°C und anschließende Detektion des entstandenen anorganischen Phosphats im Überstand als Maß für den Substratabbau mit Malachitgrünreagenz bestimmt. Protein-G-Sepharose allein mit 200 μ M PtdIns(3,4,5)P₃-diC8 diente dabei als durch das Substrat erzeugten von allen Messwerten abzuziehenden Hintergrund. Um sicherzustellen, dass das gemessene Phosphat aus der durch SHIP1 katalysierten Reaktion stammt, wurden anti-SHIP1-Immunpräzipitationen aus Lysaten von dem mit dem Leervektor transduzierten, also kein SHIP1-exprimierenden, Klon, mit und ohne Doxycyclin vermessen. Die Werte entsprachen denen von Protein-G-Sepharose allein mit 200 μ M PtdIns(3,4,5)P₃-diC8.

In jedem Assay wurden SHIP1 WT und die SHIP1-Mutante D672A, als 5-Phosphatase-inaktive Kontrolle (DAMEN et al., 2001; DEUTER-REINHARD et al., 1997; JEFFERSON and MAJERUS, 1996), mitvermessen. Von jedem Klon wurden mindestens sechs Immunpräzipitationen vermessen. Die Protein-G-Sepharose-Pellets wurden neben einem rekombinanten, in Bakterien exprimierten SHIP1-Standard auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit anti-SHIP1-Antikörpern detektiert, siehe Abb. 4.8. Anhand dessen konnte die SHIP1-Menge bestimmt und zusammen mit den enzymatischen Daten die spezifische Aktivität berechnet werden.



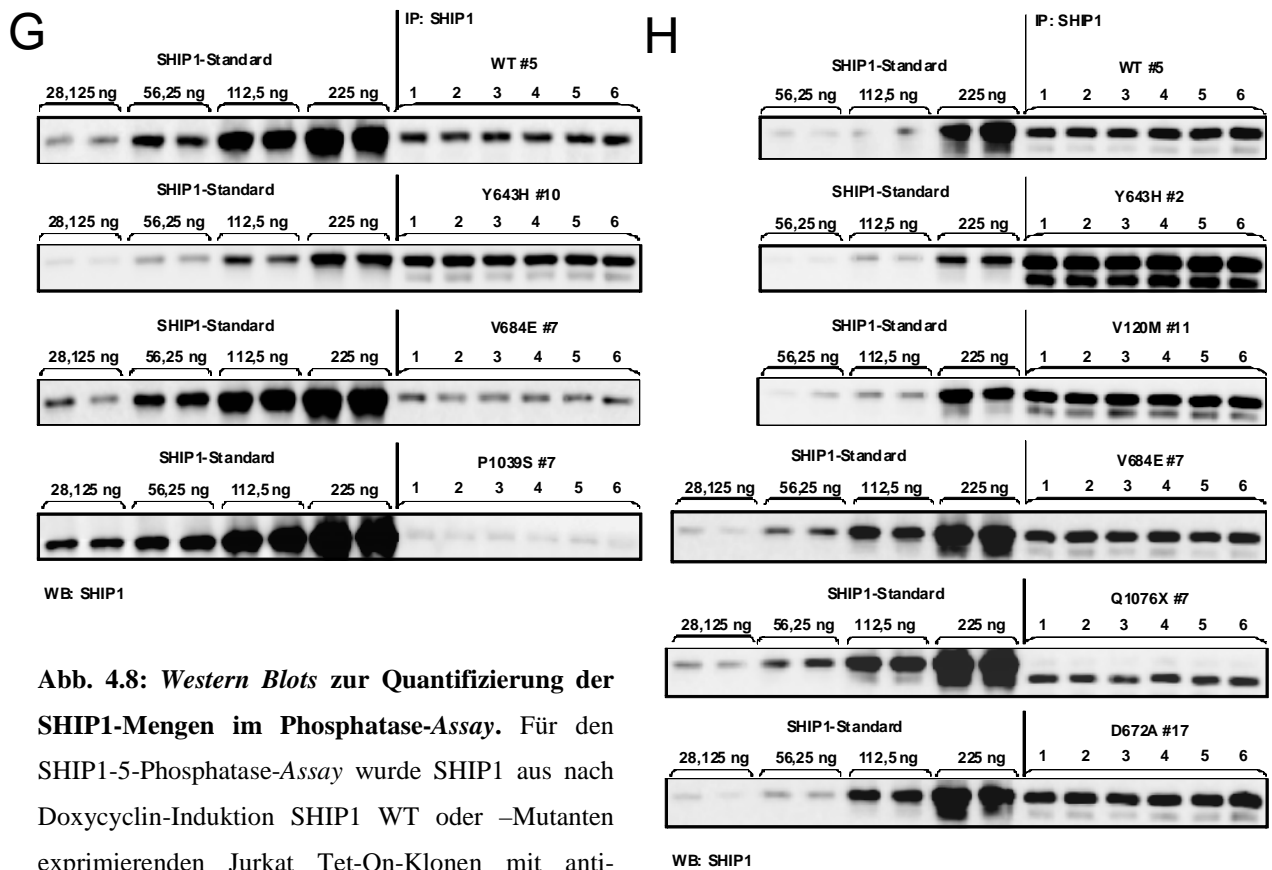


Abb. 4.8: Western Blots zur Quantifizierung der SHIP1-Mengen im Phosphatase-Assay. Für den SHIP1-5-Phosphatase-Assay wurde SHIP1 aus nach Doxycyclin-Induktion SHIP1 WT oder -Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen mit anti-SHIP1-Antikörpern an Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe von 200 μ M PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8 für 5 min bei 30°C und anschließende Detektion des entstandenen anorganischen Phosphats im Überstand als Maß für den Substratabbau mit Malachitgrün bestimmt. In jedem Assay wurden SHIP1 WT und die D672A-Mutante, als 5-Phosphatase-inaktive Kontrolle, mitvermessen. Von jedem Klon wurden sechs Immunpräzipitationen parallel vermessen. Die Protein-G-Sepharose Pellets wurden neben einem rekombinanten, in Bakterien exprimierten SHIP1-Standard mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-SHIP1-Antikörpern detektiert. Anhand dessen konnte die SHIP1-Menge bestimmt und zusammen mit den enzymatischen Daten die spezifische Aktivität berechnet werden. Dargestellt sind A) T162P #4 und R225W #5, B) R156Q #1 und K210R #6, C) N508D #8 und P1042L #7, D) F28L #1 und H1168Y #20, E) P1039S #3 und Q1153L #17, F) V120M #11 und R225W #5, G) Y643H #10, V684E #7 und P1039S #7, H) Y643H #2, V120M #11, V684E #7 und Q1076X #7. Einige Mutanten wurden in mehr als sechs Immunpräzipitationen vermessen (nicht alle dargestellt).

Da die spezifische Aktivität für den WT allein von Assay zu Assay von 2 units/mg bis 5 units/mg, mit einem Mittelwert von 3 units/mg, schwankte, wurde die relative spezifische Aktivität in Bezug auf den WT verwendet, um alle Mutanten miteinander vergleichen zu können. Dargestellt sind die Ergebnisse aus allen Phosphatase-Assays zusammengefasst in Abb. 4.9.

Im Folgenden sind die Balken in Diagrammen bei Vergleich mehrerer Mutanten nach den Regionen in SHIP1, in denen sie auftraten, in Anlehnung an Abb. 2.3 farblich unterschieden.

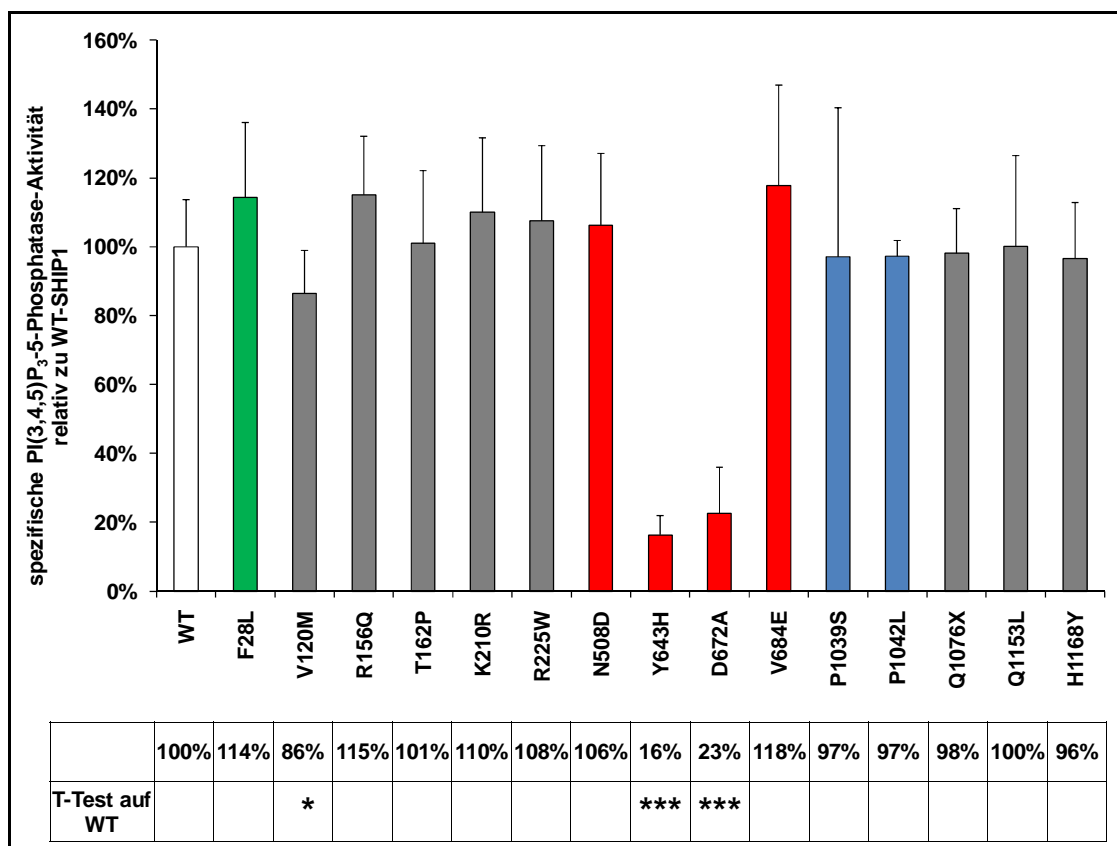


Abb. 4.9: Relative SHIP1-5-Phosphatase-Aktivität. SHIP1 wurde aus nach Doxycyclin-Induktion SHIP1 WT oder –Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen mit anti-SHIP1-Antikörpern an Protein-G-Sepharose immunpräzipitiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch Zugabe von 200 μM PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8 für 5 min bei 30°C und anschließende Detektion des entstandenen anorganischen Phosphats im Überstand als Maß für den Substratabbau mit Malachitgrün bestimmt. In jedem Assay wurden SHIP1 WT und D672A-Mutante, als 5-Phosphatase-inaktive Kontrolle, mitvermessen. Von jedem Klon wurden sechs Immunpräzipitationen parallel vermessen. Die Protein-G-Sepharose Pellets wurden neben einem rekombinanten, in Bakterien exprimierten SHIP1-Standard mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-SHIP1-Antikörpern detektiert. Anhand dessen konnte die SHIP1-Menge bestimmt und zusammen mit den enzymatischen Daten die spezifische Aktivität berechnet werden. Einige Mutanten wurden in mehr als sechs Immunpräzipitationen vermessen. Dargestellt ist die zum WT relative spezifische Aktivität \pm SD. Grün: SH2-Domäne, rot: 5-Phosphatase-Domäne, blau: P-x-x-P-Motiv. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Die Mutante der SH2-Domäne, F28L, zeigt eine relative spezifische Aktivität von 114%, die damit leicht, aber nicht signifikant, erhöht ist. Dies stimmt mit Literaturdaten überein, die ergaben, dass die spezifischen Aktivitäten für die murinen SHIP1-Konstrukte WT, R34G

(phospho-Tyrosin-Bindungs-defekte SH2-Mutante) und Δ SH2 (fehlende SH2-Domäne) gleich waren (LIU et al., 1997a) Die Mutanten der Domäne zwischen SH2- und 5-Phosphatasedomäne zeigten relative spezifische Aktivitäten von 86% für V120M, 115% für R156Q, 101% für T162P, 110% für K210R und 108% für R225W. Auch diese Ergebnisse können mit Literaturdaten abgeglichen werden, in denen die Deletion der SH2-Domäne und darüber hinaus in murinem SHIP1 (Deletion von AS 1-165, entspricht humanen AS 1-162) keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hatte (AMAN et al., 2000).

Die Mutanten der 5-Phosphatasedomäne zeigten relative spezifische Aktivitäten von 106% für N508D, 16% für Y643H, 23% für D672A (Kontrolle) und 118% für V684E. Für die D672A- und die ihr entsprechende murine D675G-Mutante wird keine (DEUTER-REINHARD et al., 1997) bzw. eine Restaktivität von 10% (DAMEN et al., 2001) berichtet.

Die zwei Mutanten im P-x-x-P-Motiv zeigten relative spezifische Aktivitäten von 97% für P1039S und ebenfalls 97% für P1042L. Die übrigen Mutanten im C-Terminus zeigten relative spezifische Aktivitäten von 98% für Q1076X, 100% für Q1153L und 96% für H1168Y. In der Literatur wird beschrieben, dass die Deletion des C-Terminus in murinem SHIP1 (Deletion von AS 934-1190, entspricht humanen 933-1188) keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat (AMAN et al., 2000).

Bis auf Y643H und D672A (Kontrolle) schwanken die Mutanten um maximal 18% um den WT. Da die Mutante V684E in der Literatur bereits als 5-Phosphatase-inaktiv (Restaktivität ca. 18%) beschrieben wurde (LUO et al., 2003), hier aber keine signifikant vom WT verschiedene Aktivität aufwies, wurde derselbe Klon in einem weiteren *Assay* mit weiteren sechs Immunpräzipitationen vermessen, um das Ergebnis zu bestätigen. Für die Mutanten Y643H, mit stark reduzierter Aktivität, und P1039S, die für die Reduktion der pAkt-Level auffällig war, siehe 4.5, wurde je ein weiterer Klon in einem weiteren 5-Phosphatase-*Assay* mit weiteren sechs Immunpräzipitationen vermessen, um auch diese Ergebnisse zu bestätigen. Alle Ergebnisse sind in Abb. 4.9 eingeflossen.

4.4.4 Bestimmung von K_M , V_{max} und k_{cat} von humanem WT-SHIP1

Für die Bestimmung der enzymkinetischen Daten von humanem WT-SHIP1 wurden 5-Phosphatase-*Assays* mit Immunpräzipitationen aus Jurkat Tet-On-Klon-Proteinlysaten, die WT-SHIP1 nach Doxycyclin-Induktion exprimierten, für sieben unterschiedliche

Substratkonzentrationen (10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM und 200 μM PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8) durchgeführt und in einer Auftragung nach Michaelis-Menten die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration aufgetragen, siehe Abb. 4.10 A.

Zur Bestimmung der enzymkinetischen Daten werden Linearisierungsverfahren, seitdem es Programme zur nicht-linearen Regression gibt, eigentlich nicht mehr zur Datenauswertung verwendet, sondern direkt aus der Michaelis-Menten-Auftragung errechnet. Da eine Sättigung in diesem Experiment aber offensichtlich nicht erreicht wurde, wurde dennoch darauf zurückgegriffen und die Auftragung nach Lineweaver-Burk vorgenommen, siehe Abb. 4.10 B. Die Gleichungen für die entsprechenden Funktionen sind darunter aufgeführt. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) wurden K_M und V_{\max} berechnet, siehe Tab. 4.4.

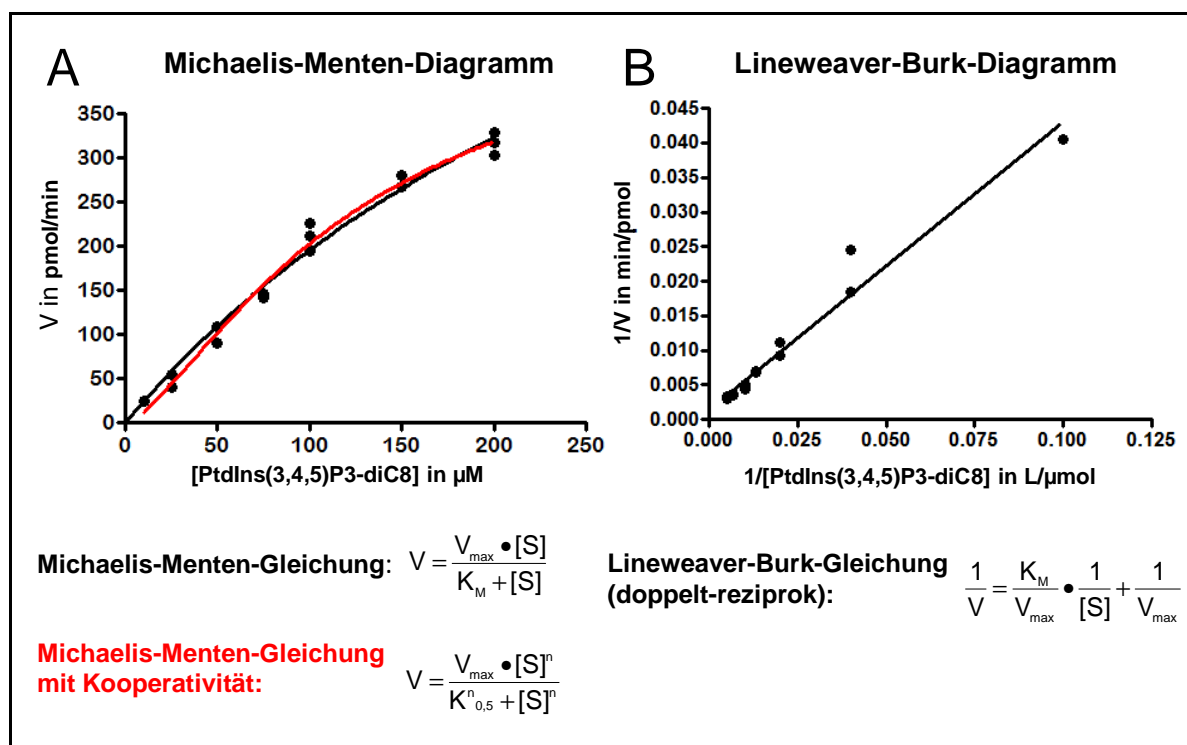


Abb. 4.10: Bestimmung der enzymkinetischen Daten von SHIP1. SHIP1 wurde aus Jurkat Tet-On-Klon-Proteinlysaten, die WT-SHIP1 nach Doxycyclin-Induktion exprimierten, immunpräzipitiert und für sieben unterschiedliche PtdIns(3,4,5) P_3 -diC8-Konzentrationen (10 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM , 150 μM und 200 μM) im Phosphatase-Assay vermessen. Aus der Auftragung nach Michaelis-Menten (A) wurden die enzymkinetischen Daten per nicht-linearer Regression mit Graphpad Prism erhalten. Außerdem wurde auf mögliche Kooperativität getestet (rote Kurve). Da die Messwerte nicht in den Sättigungsbereich reichten, wurden die Daten daneben nach Lineweaver-Burk (B) linearisiert.

Es wurde auch getestet, ob SHIP1 Kooperativität zeigt, siehe Abb. 4.10 A rote Kurve. Tatsächlich fällt die Anpassungsgüte der Kurve (*goodness of fit*) für die Gleichung mit angenommener Kooperativität etwas besser aus, so dass die Daten durch diese Funktion besser interpretiert werden. Der Wert n beträgt 1,4, was auf eine Dimerisierung von SHIP1 hindeutet. Der K_M -Wert bei Kooperativität ist für die Bindung des ersten aktivierenden Moleküls ein anderer als für die Bindung des zweiten. Es lässt sich aber aus $V_{max}/2$ ein mittlerer K_M -Wert bestimmen.

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität und der Wechselzahl k_{cat} wurde die im Phosphatase-Assay eingesetzte Menge SHIP1 pro Immunpräzipitation mit Hilfe eines SHIP1-Standards bestimmt (Abb. 4.11). Es ergab sich ein Wert von durchschnittlich 170 ng pro Immunpräzipitation. Anhand des Molekulargewichts von SHIP1 mit 145.000 g/mol und V_{max} ließen sich k_{cat} und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M für humanes SHIP1 berechnen (siehe Tab. 4.4).

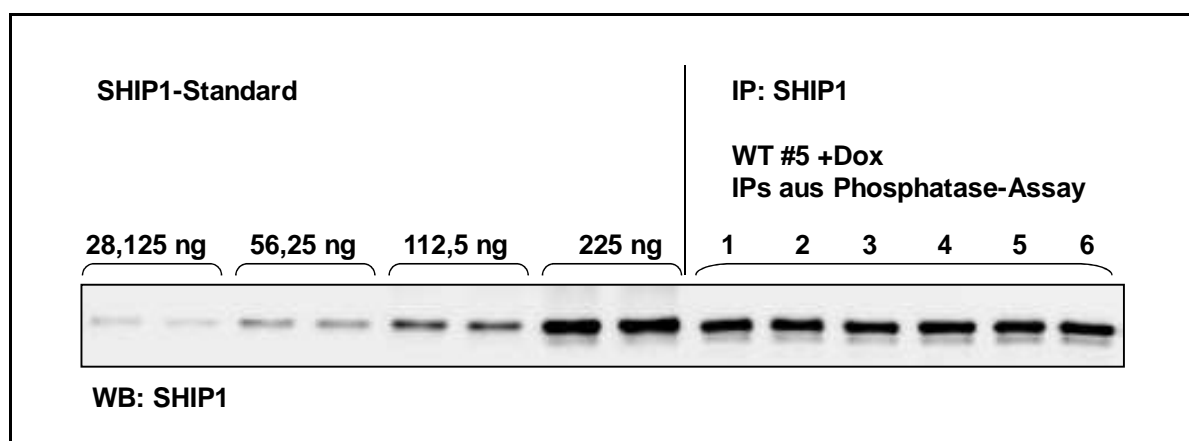


Abb. 4.11: Bestimmung der im Phosphatase-Assay eingesetzten SHIP1-Menge pro Immunpräzipitation anhand eines SHIP1-Standards. Anti-SHIP1-Western Blot. Die SHIP1-Mengen in 12 der 24 im Phosphatase-Assay eingesetzten Immunpräzipitationen (IPs) wurden anhand eines rekombinanten, in Bakterien exprimierten SHIP1-Standards quantifiziert, 6 davon sind hier dargestellt.

Tab. 4.4: Enzymkinetische Daten für SHIP1 nach Michaelis-Menten, Michaelis-Menten mit Kooperativität und Lineweaver-Burk.

	K_M in μM	V_{max} in pmol/min	V_{max} in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{ng})$	k_{cat} in $1/\text{s}$	k_{cat}/K_M in $1/(\mu\text{M} \cdot \text{s})$
Michaelis-Menten	375	930	5,5	13	0,035
Michaelis-Menten mit Kooperativität	124	478	2,8	7	0,055
Lineweaver-Burk	280	385	2,3	5	0,020

In der Literatur gefundene Werte sind in Tab. 4.5 aufgeführt.

Tab. 4.5: In der Literatur gefundene enzymkinetische Daten für SHIP1.

K_M in μM	V_{max} in $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{ng})$	Substrat	Quelle	Anmerkung
46	1,8	PtdIns(3,4,5)P ₃ -diC8	(ZHANG et al., 2009a)	Murines SHIP1
351,4	3,8	Ins(1,3,4,5)P ₄	(ZHANG et al., 2009a)	Murines SHIP1
5,95	0,458	PtdIns(3,4,5)P ₃	(KISSELEVA et al., 2000)	
15,7	0,1	Ins(1,3,4,5)P ₄	(KAVANAUGH et al., 1996)	SIP-110

Der in dieser Arbeit nach Michaelis-Menten bestimmte Wert für K_M liegt mit $375 \mu\text{M}$ bzw. $124 \mu\text{M}$ deutlich über den in der Literatur gefundenen Werten von $46 \mu\text{M}$ (ZHANG et al., 2009a) bzw. $5,95 \mu\text{M}$ (KISSELEVA et al., 2000).

Zum Vergleich: Für PTEN beträgt K_M für PtdIns(3,4,5)P₃ $50 \mu\text{M}$ (MAEHAMA et al., 2001). Für SHIP2 beträgt k_{cat}/K_M für Ins(1,3,4,5)P₄ $0,096 1/(\mu\text{M} \cdot \text{s})$ und für PtdIns(3,4,5)P₃ $0,0101 1/(\mu\text{M} \cdot \text{s})$ (CHI et al., 2004), womit SHIP1 eine höhere katalytische Effizienz als SHIP2 besäße.

4.5 Reduktion der Akt-Phosphorylierung durch SHIP1

WT-SHIP1 reduziert die Aktivität des PI3K-Effektors Akt, gemessen an verminderter Akt-Phosphorylierung an S473 und T308. Die 5-Phosphatase-Aktivität von SHIP1 ist essentiell für die Vermittlung dieses Effekts (FREEBURN et al., 2002).

Um die Effekte der SHIP1-Mutationen, die bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie gefunden wurden, auf die Akt-Aktivierung zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von Akt an S473 und T308 in den SHIP1-exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen per *Western Blot*

analysiert, und zwar jeweils im Vergleich zur Vektorkontrolle. Jeweils mitaufgetragen wurde die 5-Phosphatase-inaktive Mutante D672A.

Zuvor wurde der Einfluss von Doxycyclin auf die Phosphorylierung von Akt unabhängig von SHIP1 im Vektorklon getestet. Doxycyclin hat allein keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt, siehe Abb. 4.12.

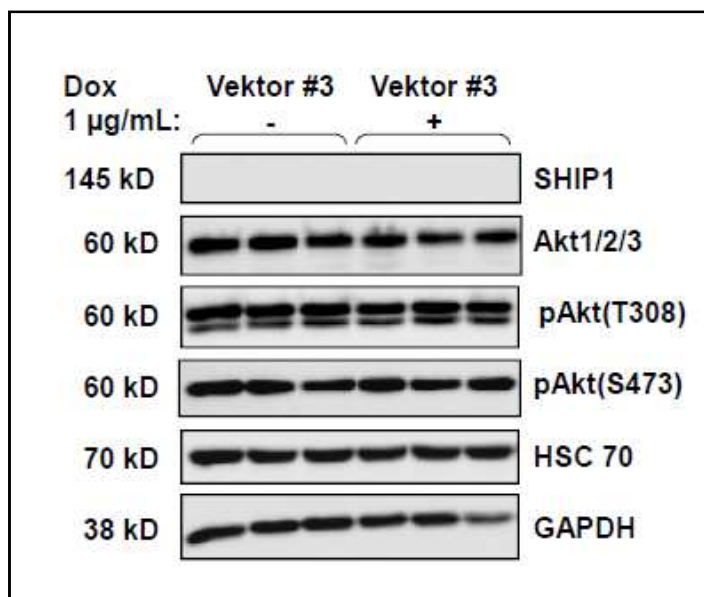


Abb. 4.12: Doxycyclin hat keinen Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung. Der Jurkat Tet-On-Klon, der den leeren Vektor pLTR-tet-SV-HPH trägt, wurde in einer Zellkonzentration von 4×10^5 /mL ausgesät und für 48 Std. in Medium mit 1 µg/mL Doxycyclin (+) bzw. mit 1 µL/mL 70% Ethanol (-), dem Lösungsmittel für Doxycyclin, kultiviert, anschließend in NP40-Puffer lysiert. Die Lysate wurden im *Western Blot* analysiert. GAPDH und HSC 70 dienen als Ladekontrolle. Akt1/2/3: Gesamt-Akt.

Der Einfluss der Expression von SHIP1 WT und Mutanten auf die Phosphorylierung von Akt in Jurkat Tet-On-Klonen ist aus Abb. 4.13-4.16 ersichtlich, in Abb. 4.13 und 4.14 sind die *Western Blots* dargestellt, in Abb. 4.15 und 4.16 die zusammengefassten Quantifizierungen der *Western Blots* jeweils als pAkt-Mengen relativ zur Vektorkontrolle.

WT-SHIP1 reduziert das pAkt(S473)-Level um 74% und das pAkt(T308)-Level um 62%. In der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker wurden bereits Werte für die SHIP1-vermittelte Reduktion von Gesamt-pAkt in Jurkat-Zellen von 65% festgestellt (HORN et al., 2004).

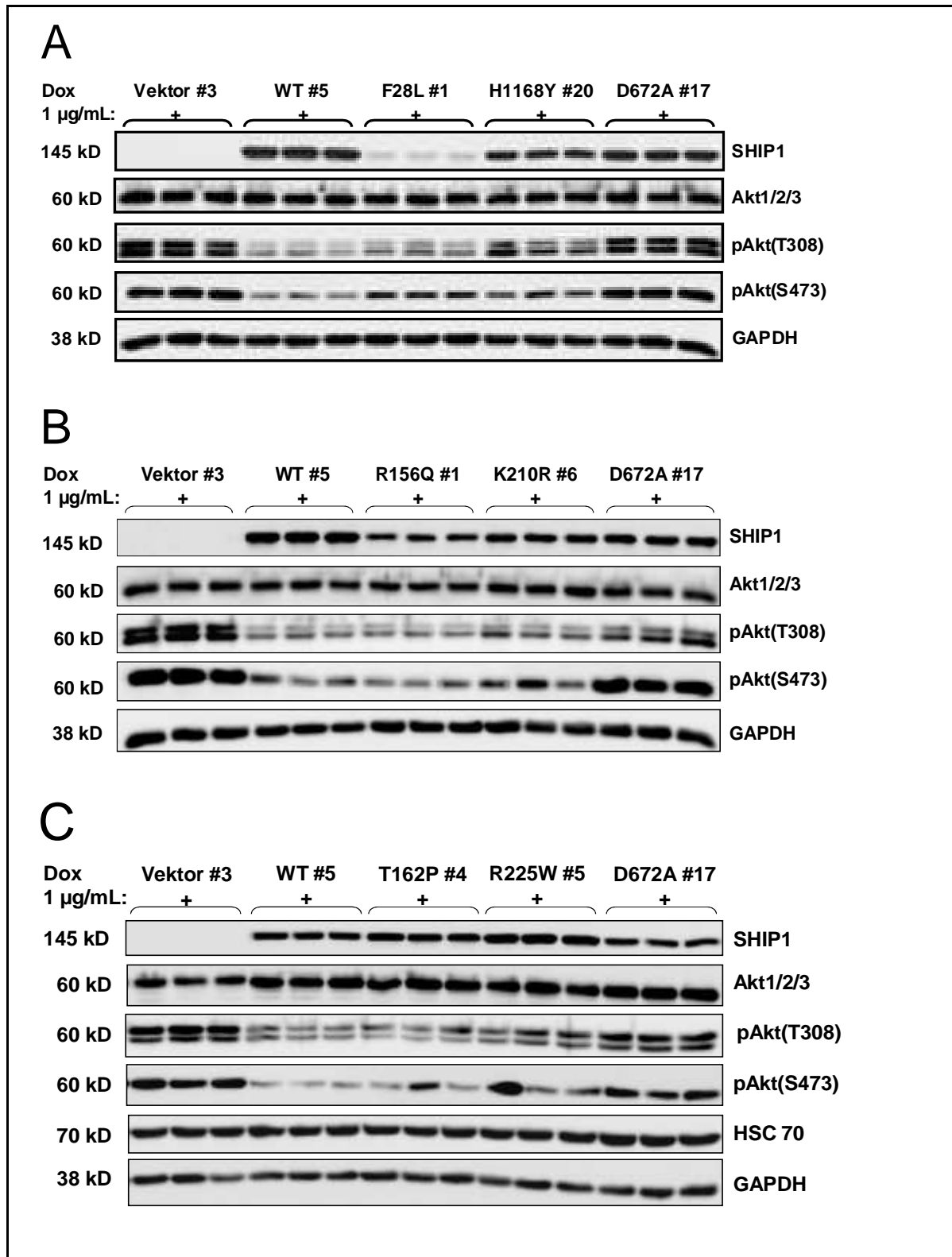
Die Mutante in der SH2-Domäne, F28L, siehe Abb. 4.13 A, ist in der Lage, die pAkt-Level zu senken, pAkt(S473) um 59%, pAkt(T308) um 61%. In der Literatur gibt es dazu unterschiedliche Daten: Eine Jurkat-Zelllinie, die SHIP1 mit einer defekten SH2-Domäne, SHIP1 R41G, exprimiert, ist, wie in dieser Arbeit gesehen, weiterhin in der Lage, pAkt zu reduzieren (CHARLIER et al., 2010). In K562-Zellen ist SHIP1 F28L nicht mehr in der Lage, weder das pAkt(S473)- noch pAkt(T308)-Level zu reduzieren (YANG et al., 2009b).

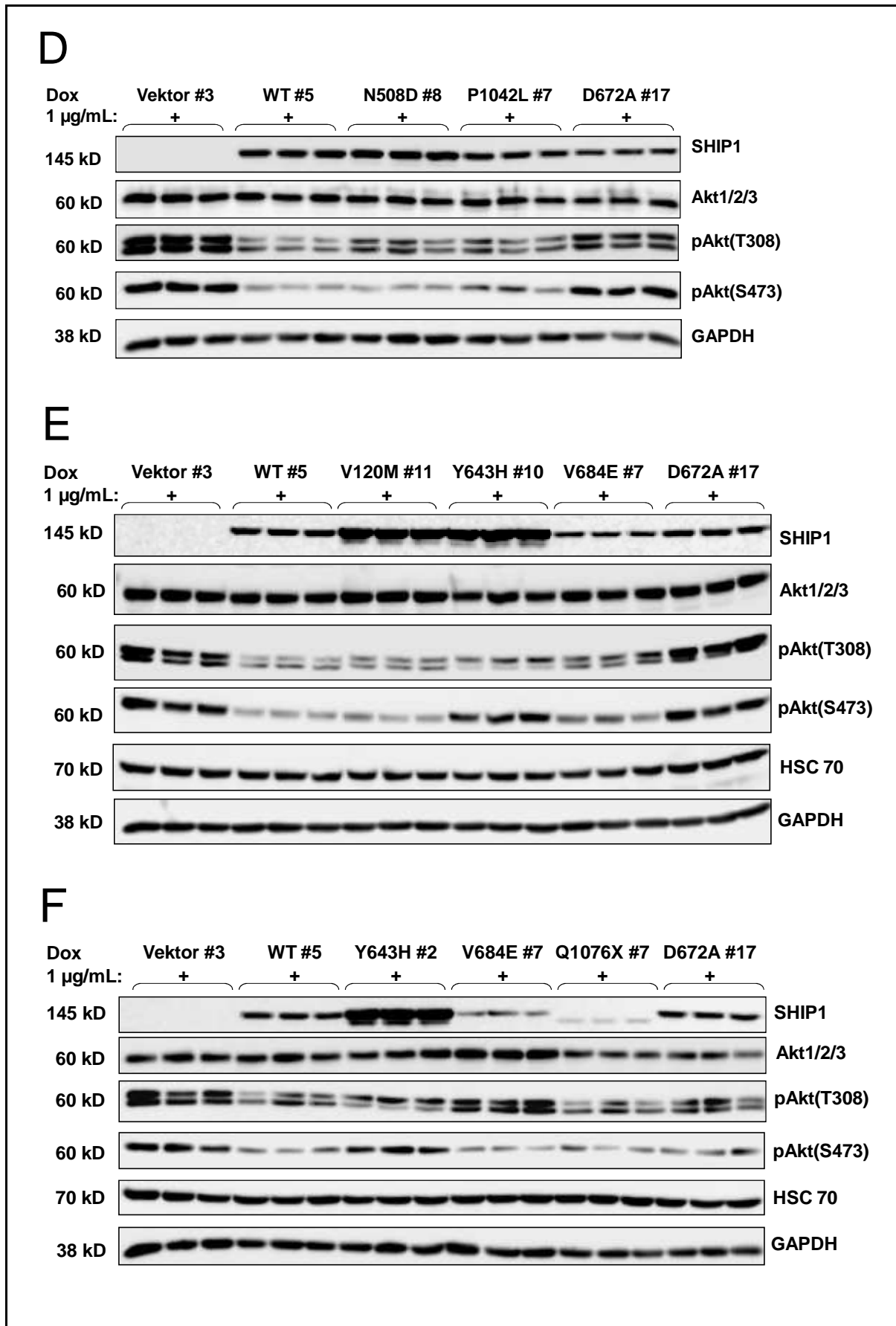
Der SNP H1168Y, siehe Abb. 4.13 A, reduziert pAkt(S473) um 61% und pAkt(T308) um 49%.

Alle fünf Mutanten in der Domäne zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne reduzieren die pAkt-Level, und zwar in folgendem Ausmaß:

SHIP1 V120M, siehe Abb. 4.13 E reduziert pAkt(S473) um 71% und pAkt(T308) um 40%, SHIP1 R156Q, siehe Abb. 4.13 B reduziert pAkt(S473) um 87% und pAkt(T308) um 79%, SHIP1 T162P, siehe Abb. 4.13 C reduziert pAkt(S473) um 68% und pAkt(T308) um 61%, SHIP1 K210R, siehe Abb. 4.13 B, reduziert pAkt(S473) um 74% und pAkt(T308) um 62%, SHIP1 R225W, siehe Abb. 4.13 C reduziert pAkt(S473) um 64% und pAkt(T308) um 43%.

Für die drei SHIP1-Mutationen, die in der 5-Phosphatase-Domäne gefunden wurden, sowie die 5-Phosphatase-inaktive Kontroll-Mutante D672A, fielen die Ergebnisse unterschiedlicher aus. SHIP1 N508D, siehe Abb. 4.13 D, reduzierte pAkt(S473) um 82% und pAkt(T308) um 70%. Für SHIP1 Y643H wurde im ersten untersuchten Klon #10, siehe Abb. 4.13 E, ein reduziertes pAkt(T308)-Level gesehen, das pAkt(S473)-Level blieb jedoch hoch. Dies konnte in einem zweiten Klon #2, siehe Abb. 4.13 F, bestätigt werden. Insgesamt reduzierte SHIP1 Y643H pAkt(T308) um 36%, die Phosphorylierung von Akt an S473 nahm jedoch im Vergleich zum Vektorklon noch um 5% zu. Diese Mutante zeigte eine um 84% reduzierte PtdIns(3,4,5)P₃-5-Phosphatase-Aktivität im Vergleich zum WT, siehe 4.4.3. Die Unfähigkeit, insbesondere pAkt(S473) zu reduzieren, hängt also mit der 5-Phosphatase-Aktivität zusammen. Die bereits in der Literatur beschriebene Kontrolle SHIP1 D672A reduzierte pAkt(S473) um 20% und pAkt(T308) um 25% und damit deutlich geringer als WT-SHIP1. Dass noch eine geringe pAkt-Reduktion für die 5-Phosphatase-beeinträchtigten Mutanten Y643H und D672A festgestellt wird, ist wahrscheinlich auf ihre Restaktivität zurückzuführen. Die Mutante SHIP1 V684E, siehe Abb. 4.13 E und F, reduzierte pAkt(S473) um 51%, pAkt(T308) jedoch nur um 2%. Warum diese Mutante pAkt(T308) nicht reduziert, ist nicht klar, da keine verringerte 5-Phosphatase-Aktivität im Vergleich zum WT gefunden wurde, siehe 4.4.3. Diese Mutante wurde in der Literatur bereits beschrieben (LUO et al., 2003), mit im Gegensatz zu diesen Ergebnissen auf ca. 18% verringerter 5-Phosphatase-Aktivität. Während die primären, für die V684E-Mutationen heterozygoten AML-Zellen dieses AML-Patienten ein basales pAkt(S473)-Level wie AML-Zellen ohne SHIP1-Mutation gezeigt hatten, hatte die Akt-Phosphorylierung auf IL-3-Stimulation und auf IL-3-Entzug hin in den Zellen mit V684E-Mutation länger angehalten. Transfektion dieser Mutante in K562-Zellen hatte ein erhöhtes basales pAkt(S473) im Vergleich zu mit SHIP1 WT transfizierten K562 gezeigt (LUO et al., 2003).





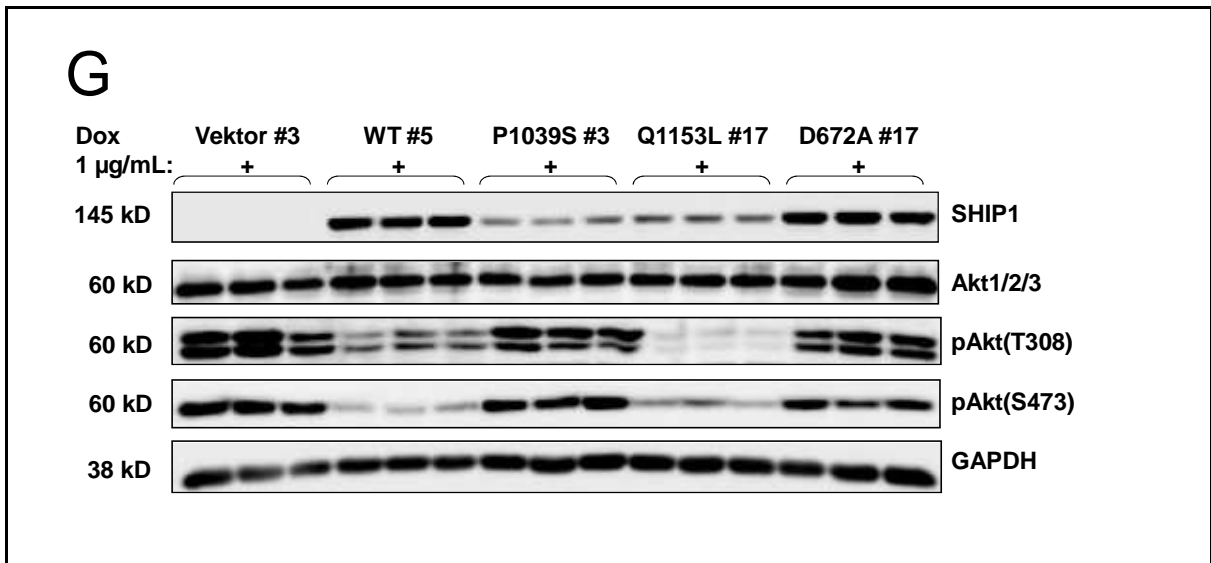


Abb. 4.13: Auswirkungen der Expression von SHIP1-Mutanten auf die Phosphorylierung von Akt. Mit SHIP1 WT oder Mutanten transduzierte Jurkat Tet-On-Klone wurden in einer Zellkonzentration von 4×10^5 /mL ausgesät und für 48 Std. in Medium mit 1 µg/mL Doxycyclin (+) kultiviert, anschließend in NP40-Puffer lysiert. Die Lysate wurden im *Western Blot* analysiert. GAPDH und HSC 70 dienten als Ladekontrolle. Akt1/2/3: Gesamt-Akt.

Die beiden Mutationen P1039S und P1042L liegen in einem und demselben P-x-x-P-Motiv. P-x-x-P-Motive gelten als Konsensusbindungssequenz für SH3-Domänen (PAWSON, 1995). SHIP1 P1042L, siehe Abb. 4.13 D, reduzierte pAkt(S473) um 60% und pAkt(T308) um 67% im Vergleich zum Vektorklon und verhält sich damit ähnlich dem WT.

SHIP1 P1039S, siehe Abb. 4.13 G, zeigte im ersten untersuchten Klon #3 nur eine Reduktion von pAkt(S473) um 4% für pAkt(T308) sogar eine Zunahme um 9%. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden zwei weitere Klone, #2 und #6, siehe Abb. 4.14, analysiert. Während pAkt(T308) in der Mutante SHIP1 P1039S #2 um 47%, in #6 um 21% reduziert wurde, nahm pAkt(S473) in beiden Klonen zu, um 25% bzw. 28%. Um womöglich einen Effekt vor und nach Induktion der SHIP1-Expression mit Doxycyclin zu sehen, wurden auch die Lysate der uninduzierten Klone (-Dox) untersucht. Es zeigte sich jedoch auch hier im Vergleich zum jeweils uninduzierten Klone keine Abnahme in pAkt durch die Expression von SHIP1, sondern sogar noch eine leichte Zunahme (für #3 hier nicht gezeigt).

Insgesamt beeinträchtigt diese P1039S-Mutation SHIP1, die pAkt-Level zu reduzieren. Da diese Mutante normale 5-Phosphatase-Aktivität zeigte, siehe 4.4.3, geht dieser Phänotyp womöglich auf die Vereitelung einer Wechselwirkung mit einem für die SHIP1-Membranrekrutierung erforderlichen, an das P-x-x-P-Motiv bindenden, Interaktionspartner

zurück, beispielsweise der Bindung an das Adaptermolekül Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*). Diese Interaktion wurde in 4.9 näher untersucht.

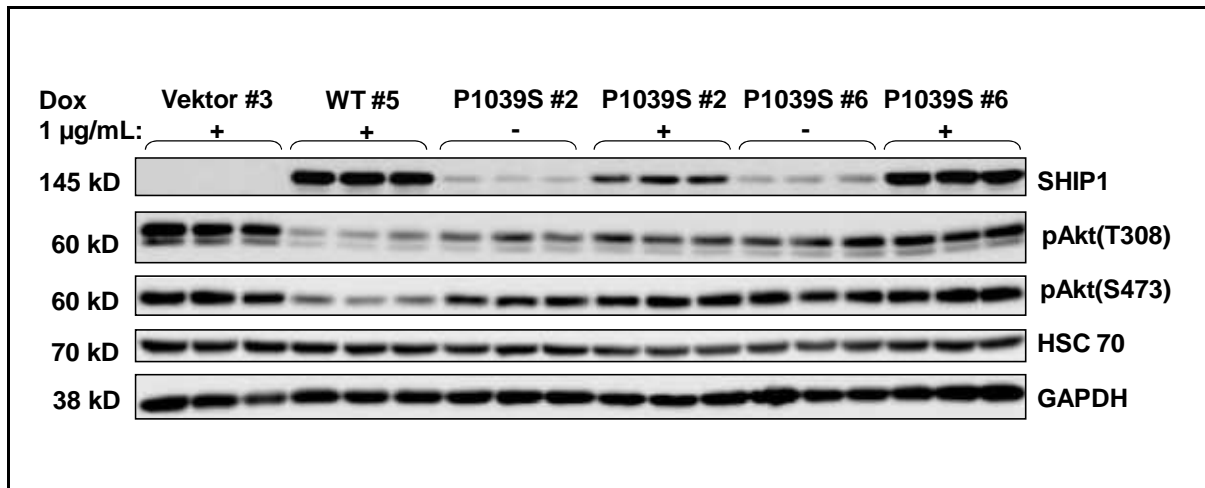


Abb. 4.14: Auswirkungen der Expression von SHIP1 P1039S-Mutanten auf die Phosphorylierung von Akt. Mit SHIP1 P1039S transduzierte Jurkat Tet-On-Klone wurden in einer Zellkonzentration von 4×10^5 /mL ausgesät und für 48 Std. in Medium mit $1 \mu\text{g/mL}$ Doxycyclin (+) bzw. mit $1 \mu\text{L/mL}$ 70% Ethanol (-) kultiviert, anschließend in NP40-Puffer lysiert. Die Lysate wurden im *Western Blot* analysiert. GAPDH und HSC 70 dienten als Ladekontrolle. Akt1/2/3: Gesamt-Akt.

Die Mutation Q1076X, durch die ein um 113 Aminosäuren verkürztes SHIP1-Protein entsteht, wurde bei einem Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) gefunden. SHIP1 Q1076X in Jurkat T-Zellen, siehe Abb. 4.13 F, reduziert pAkt(S473) um 48%, pAkt(T308) jedoch nur um 26%. Dieser Mutante fehlen sechs P-x-x-P-Motive und damit mögliche Bindungsstellen für SH3-Domänen.

SHIP1 Q1153L, siehe Abb. 4.13 G, reduziert pAkt(S473) um 74% und pAkt(T308) um 87%, womit durch diese Mutation die Fähigkeit von SHIP1, die Akt-Phosphorylierung zu inhibieren, nicht eingeschränkt wird.

Der Effekt von SHIP1 auf die Phosphorylierung von Akt an S473 und T308 ist für alle Mutationen quantifiziert und zusammengefasst in Abb. 4.15 und 4.16 dargestellt, und zwar als pAkt-Level relativ zum Vektorklon.

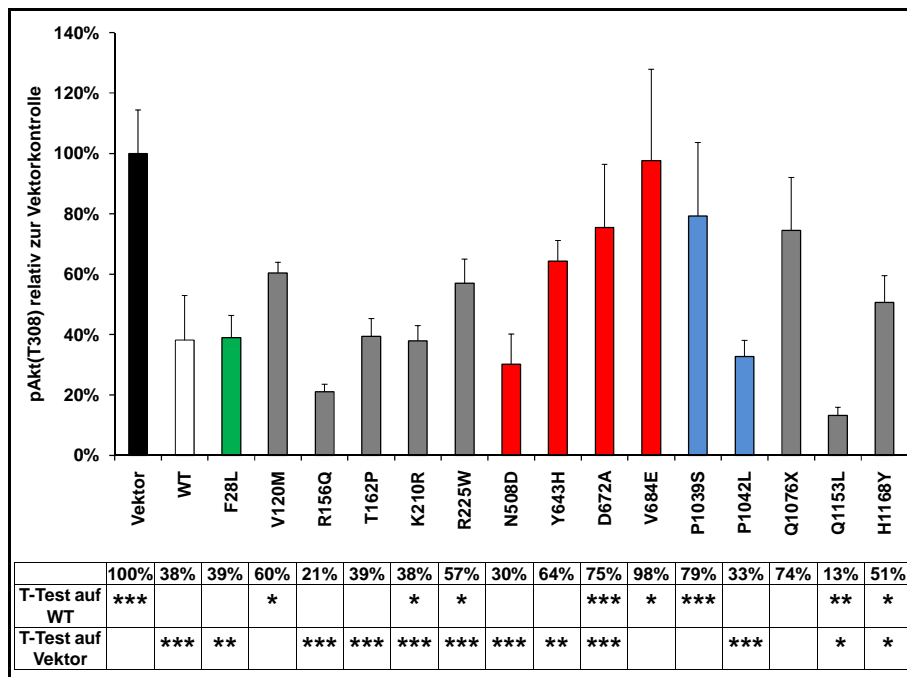


Abb. 4.15: pAkt(T308)-Level bei Expression von SHIP1-Mutanten in Jurkat-Zellen. Alle Klone wurden für 48 Std. bis 72 Std. in Medium mit 1 µg/mL Doxycyclin kultiviert, um die SHIP1-Expression zu induzieren, anschließend lysiert und im *Western Blot* analysiert. Die Werte wurden auf GAPDH oder HSC70 normalisiert. Werte ± SD. Grün: SH2-Domäne, rot: 5-Phosphatase-Domäne, blau: P-x-x-P-Motiv. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.

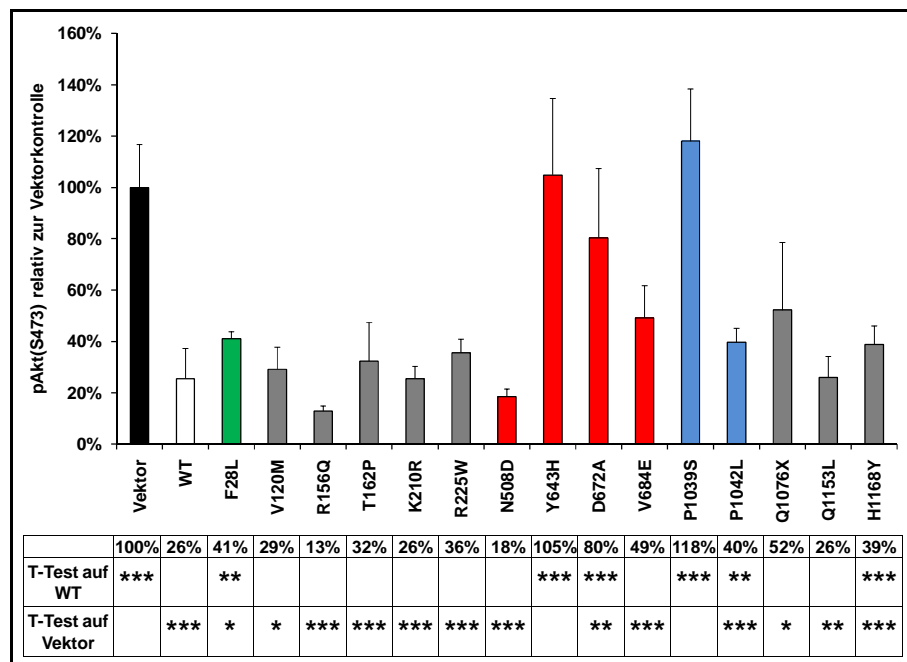


Abb. 4.16: pAkt(S473)-Level bei Expression von SHIP1-Mutanten in Jurkat-Zellen. Alle Klone wurden für 48 Std. bis 72 Std. in Medium mit 1 µg/mL Doxycyclin kultiviert, um die SHIP1-Expression zu induzieren, anschließend lysiert und im *Western Blot* analysiert. Die Werte wurden auf GAPDH oder HSC70 normalisiert. Werte ± SD. Grün: SH2-Domäne, rot: 5-Phosphatase-Domäne, blau: P-x-x-P-Motiv. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.

4.6 Auswirkung der SHIP1-Expression auf die Proliferation

4.6.1 Einfluss von Doxycyclin auf die Proliferation von Jurkat Tet-On-Zellen

Da Doxycyclin die Proliferation von humanen Lymphozyten hemmen kann (THONG and FERRANTE, 1979), wurde hier untersucht, in welchem Maße das für Jurkat Tet-On-Zellen zutrifft. Die Proliferation von Jurkat Tet-On Zellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Doxycyclin, und zwar 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ im Medium über sieben Tage verfolgt, siehe Abb. 4.17. Es wurde festgestellt, dass bereits eine Doxycyclin-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine Proliferationshemmung von 24% über sieben Tage bewirkt, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine Proliferationshemmung von 32%, und mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ findet keine Proliferation mehr statt. Es war deshalb in den folgenden Proliferationsmessungen wichtig, den Vektor-Klon als Kontrolle mit der gleichen Doxycyclin-Konzentration im Medium wie die SHIP1-Mutanten-Klone einzusetzen.

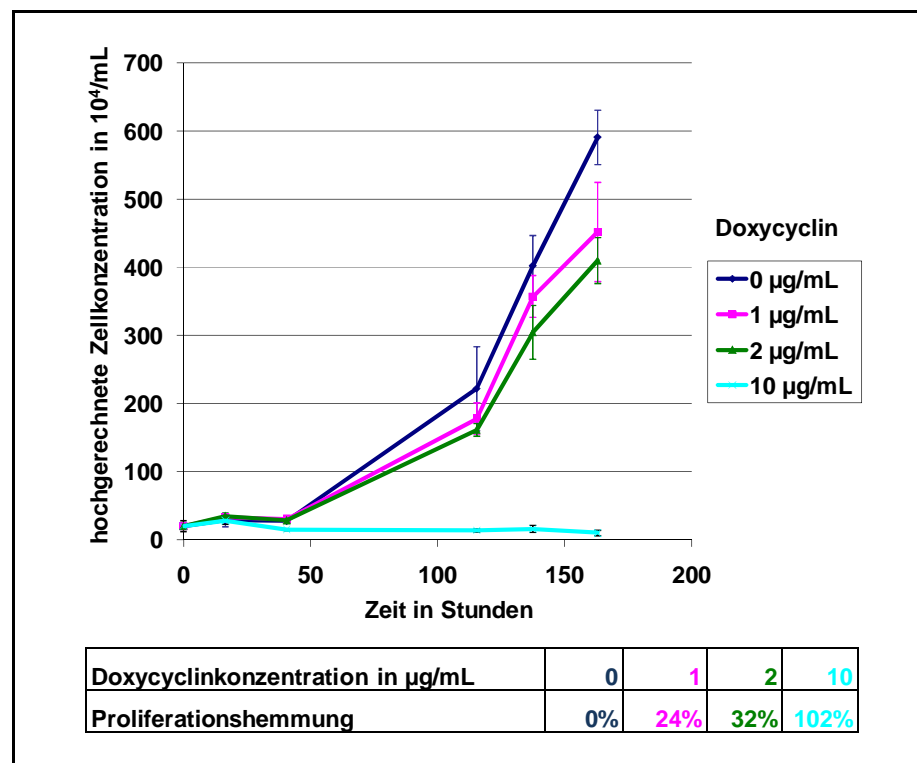


Abb. 4.17: Proliferation von Jurkat Tet-On-Zellen bei verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen. Jurkat Tet-On-Zellen wurden mit 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oder 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin im Medium kultiviert und die Proliferation über sieben Tage durch Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer verfolgt. Für jede Doxycyclin-Konzentration wurden drei Ansätze ausgesät und jeder Ansatz dreifach gezählt.

4.6.2 Proliferation der SHIP1-Mutanten

Für die ersten nach SHIP1-Transduktion erhaltenen Klone WT #5, R225W #5 und D672A #5 wurden die Proliferation in einem *Assay* auf Basis des BrdU-Einbaus in die DNA bestimmt. Dabei wurden pro Klon drei Ansätze mit 1 µg/mL Doxycyclin, drei Ansätze mit 1 µL/mL 70% Ethanol ausgesät, als Kontrolle je drei Ansätze Jurkat Tet-On-Zellen mit 1 µg/mL Doxycyclin, 1 µL/mL 70% Ethanol und mit 25 µM LY294002, einem PI3K-Inhibitor. Nach 48 Std. wurde BrdU für 16 Std. ins Medium gegeben und mit Fluoreszenz-markierten anti-BrdU-Antikörpern im FACS-Gerät (*fluorescence-activated cell sorting*) die Proliferation analysiert, dabei jeweils die Proliferation von +Dox bezogen auf –Dox für jeden Klon berechnet. Das Experiment wurde zweimal, zeitlich getrennt, durchgeführt.

Wie in Abb. 4.18 dargestellt, hemmt Doxycyclin in der Konzentration von 1 µg/mL die Proliferation in Jurkat Tet-On-Zellen, die kein SHIP1 exprimieren, über 16 Std. bereits um 3%. SHIP1 WT hemmt die Proliferation um 13%, SHIP1 R225W um 11%, D672A um 5%. Abzüglich des 3% Doxycyclin-Effekt ergeben sich Werte von 10%, 8% und 2% Proliferationshemmung. Dabei ist festzuhalten, dass die Hemmung durch WT und R225W-Mutante sich nicht signifikant unterscheiden. Sie unterschieden sich aber beide signifikant von der D672A (5-Phosphatase-inaktiven)-Mutante, welche sich mit nur 2% Hemmung nicht signifikant von Jurkat Tet-On-Zellen unterscheidet. Die Resthemmung könnte auf die Rest-5-Phosphataseaktivität der Mutante zurückgehen.

Die maximal durch Inhibition des PI3K-Signalwegs, hier durch den PI3K-Inhibitor LY294002, erreichbare Proliferationshemmung über 16 Std. beträgt 61% bzw. 58%.

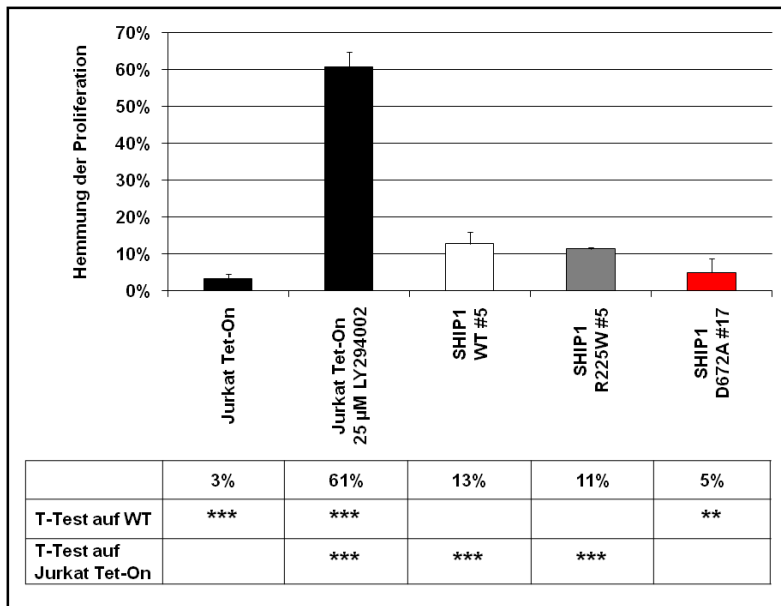


Abb. 4.18: BrdU-Einbau-basierter Proliferations-Assay über 16 Std.

Jurkat Tet-On-Zellen sowie die induzierbar SHIP1-exprimierenden Klone WT #5, R225W #5 und D672A #17 wurden in je drei Ansätzen mit 1 µg/mL Doxycyclin und drei Ansätzen mit 1 µL/mL 70% Ethanol behandelt. Für Jurkat Tet-On wurden drei weitere Ansätze mit 25 µM LY294002, einem PI3K-Inhibitor, ausgesät. Nach 48 Std. wurde BrdU für 16 Std. ins Medium gegeben, die Zellen gewaschen und

fixiert, mit APC-anti-BrdU-Antikörpern markiert und im FACS die Proliferation analysiert, dabei jeweils die Proliferation von +Dox bezogen auf –Dox für jeden Klon berechnet. Das Experiment wurde zweimal, zeitlich getrennt, durchgeführt. Werte ± SD. Rot: 5-Phosphatase-Domäne. *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.

Nicht in allen Klonen war die SHIP1-Expression induzierbar, d.h. sie waren *leaky* und exprimierten SHIP1 bereits ohne Doxycyclin im Medium. Deshalb wurde versucht, die SHIP1-vermittelten Effekte durch SHIP1 WT und -Mutanten jeweils durch Vergleich der Klone mit Doxycyclin im Medium zum Vektorklon mit Doxycyclin darzustellen, statt für jeden Klon den SHIP1-vermittelten Effekt durch Vergleich von +Dox und –Dox zu berechnen und erst dann die Klone miteinander zu vergleichen. Dieses Experiment wurde durch Bestimmen der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt und ist in Abb. 4.19 zu sehen.

1 µg/mL Doxycyclin zeigt auch hier auf den Vektorklon eine proliferationshemmende Wirkung. Die Expression von WT-SHIP1 führt zu einer weiteren Steigerung der Proliferationshemmung. Anders als im BrdU-Einbau-basierten Assay proliferiert die Mutante R225W #5 hier jedoch schneller als der WT #5, die Mutante D672A #17 langsamer. Dies stimmt mit den vorherigen Ergebnissen nicht überein. Es scheint also nicht möglich zu sein, nur die mit Doxycyclin behandelten Klone untereinander zu vergleichen, sondern es müsste pro Klon jeweils die nicht-induzierte Kontrolle, ohne Doxycyclin, herangezogen werden. Da wie gehabt viele Klone bereits ohne Doxycyclin SHIP1 exprimierten, ist der allein durch SHIP1 vermittelte Effekt so nicht für alle Mutanten zu vergleichen.

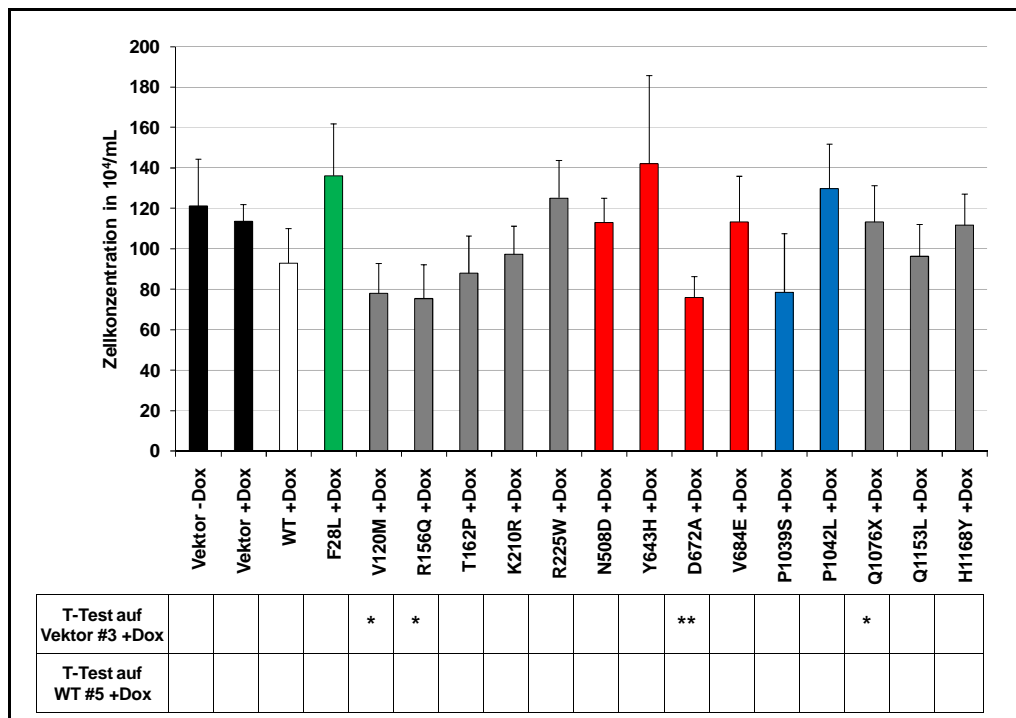


Abb. 4.19: Neubauer-Zählkammer-basierter Proliferations-Assay über 3 Tage. Jurkat Tet-On SHIP1 WT, Mutanten und Vektorkontrolle wurden an Tag 0 in Medium mit 0,5% FCS und 1 $\mu\text{g/mL}$ Doxycyclin (+Dox) bzw. 1 $\mu\text{L/mL}$ 70% Ethanol (-Dox) (nur für Vektor #3) in je drei Ansätzen ausgesät und an Tag 0, 1, und 2 in der Neubauer-Zählkammer jeder Ansatz viermal gezählt. Dargestellt ist die Zellkonzentration an Tag 2, normalisiert auf gleiche Zellkonzentrationen von 40×10^4 an Tag 0. Werte \pm SD. Grün: SH2-Domäne, rot: 5-Phosphatase-Domäne, blau: P-x-x-P-Motiv. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

4.7 Die F28L-Mutation erzeugt eine defekte SH2-Domäne, die nicht an Phosphotyrosinmotive bindet

Die Strukturen von SH2-Domänen wurden Anfang der 1990er Jahre aufgeklärt (BOOKER et al., 1992; OVERDUIN et al., 1992; WAKSMAN et al., 1992). SH2-Domänen umfassen etwa 100 Aminosäuren, binden an Phosphotyrosinreste (pY) in Proteinen und ihre Spezifität hängt von den dem pY C-terminal folgenden Aminosäuren ab (SONGYANG et al., 1994). Das acht Aminosäuren umfassende Motiv G(S/T)FLVR(E/D)S in der SH2-Domäne ist hochkonserviert und die minimale notwendige Einheit, um tyrosinphosphorylierte Sequenzen zu erkennen (HIDAKA et al., 1991).

Die in SHIP1 bei einer AML gefundene Mutation F28L liegt im FLVR-Motiv der SHIP1-SH2-Domäne (LUO et al., 2004). Mutation des Arginin im FLVR-Motiv unterbindet die Bindung von SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste (MAYER et al., 1992; RAMEH et al.,

1995). Es wurde untersucht, ob die SHIP1-SH2-Domänen-Mutante F28L ebenfalls die Bindungseigenschaften der SH2-Domäne beeinträchtigt. Als Kontrolle wurde die Arginin-Mutante des FLVR-Motivs, R31Q, verwendet, für die Defekte in der SHIP1-Funktion im Gesamtlänge-Protein bereits gezeigt wurden (LIU et al., 1997a; MASON et al., 2000).

4.7.1 Expression der SHIP1-SH2-Domäne

Die humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimiert, über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, nach Auftrennung im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau angefärbt und anhand eines BSA-Standards quantifiziert, siehe Abb. 4.20.

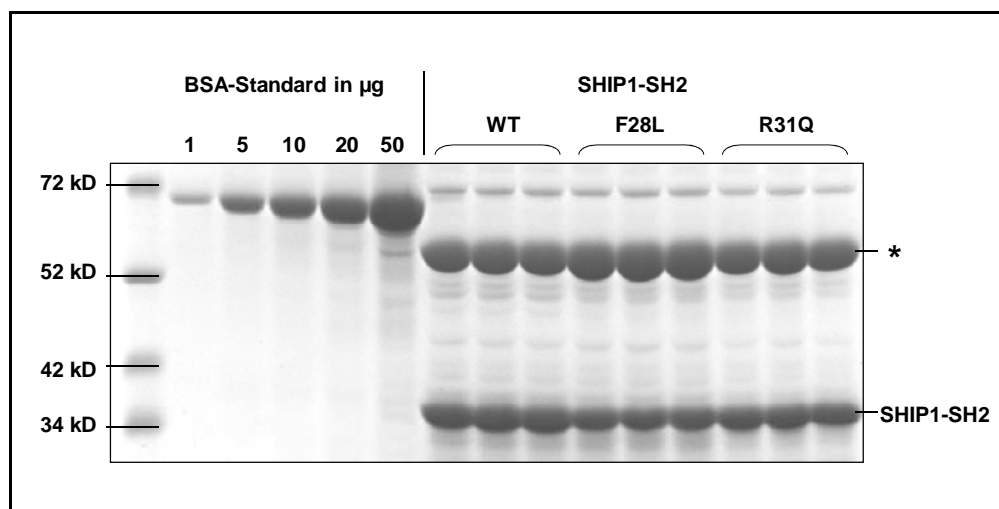


Abb. 4.20: Quantifizierung der SHIP1-SH2-Domänen. humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in *E.Coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert, über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt und anhand eines BSA-Standards quantifiziert. *: unbekanntes Protein von 60 kD.

4.7.2 Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domänen aus Lysaten stimulierter Zellen

Die humanen SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und *Pull-Downs* aus der mit IL-3 und Pervanadat stimulierten murinen myeloischen Vorläuferzelllinie FDC-P1, siehe Abb. 4.21, und aus der mit GM-CSF-

stimulierten humanen faktorunabhängig wachsenden AML-Zelllinie (Erythroleukämie) TF-1 I33-5, siehe Abb. 4.22, durchgeführt. Viele der Wirkungen, die IL-3 in der Hämatopoese der Maus ausübt, werden in der Hämatopoese des Menschen von GM-CSF übernommen (ABBAS and LICHTMAN, 2005).

Es wurden jeweils drei *Pull-Downs* pro SHIP1-SH2-Domäne ausgeführt und die von ihnen präzipitierte Menge an tyrosinphosphorylierten Proteinen im *Western Blot* quantifiziert und auf die eingesetzte Menge an GST-Fusionsprotein normiert sowie die Molekulargewichte dieser Proteine bestimmt.

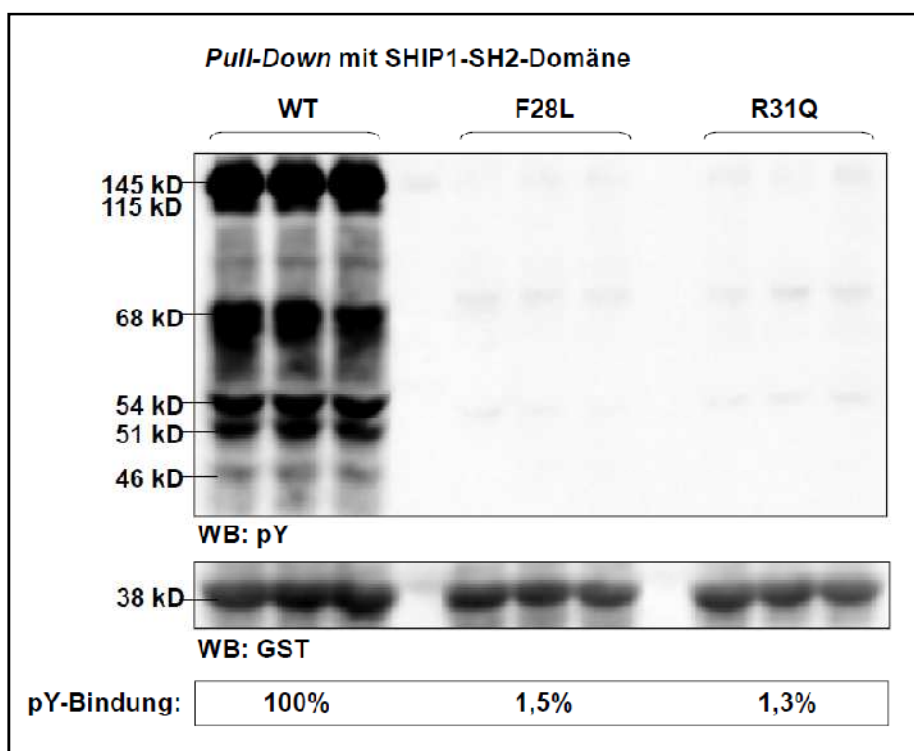


Abb. 4.21: Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domäne aus IL-3-stimulierten FDC-P1-Zellen. Die humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in *E. coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Je 400 µg Lysat pro *Pull-Down*

von mit 2 mM Pervanadat und 100 ng/mL Interleukin-3 behandelten FDC-P1-Zellen wurden mit Glutathion-Sepharose präadsorbiert und anschließend mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert. Pro WT und Mutanten wurden drei *Pull-Downs* durchgeführt, auf einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und ein *Western Blot* davon angefertigt. Oben: WB: phospho-Tyrosin (pY). Die Molekulargewichte der Banden wurden aus einer graphischen Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte des Markers gegen ihren jeweiligen Retardationsfaktor berechnet. Mitte: WB: GST (nach *Stripping* des phospho-Tyrosin-*Western Blots*) zur relativen Quantifizierung des SHIP1-SH2-GST-Fusionsproteins (38 kD). Unten: relative Bindung Tyrosinphosphorylierter Proteine, normalisiert auf die jeweilige Menge an SHIP1-SH2-Fusionsprotein.

Aus Abb. 4.21 und 4.22 geht eindeutig hervor, dass die SHIP1-SH2-Mutante F28L ihre Fähigkeit, an tyrosinphosphorylierte Proteine zu binden, verloren hat. Im Vergleich zum WT

zeigt sie eine Restbindung an tyrosinphosphorylierte Proteine aus FDC-P1-Zellen von 1,5%, an solche aus TF-1 I33-5-Zellen von 3,1%. Die Kontrolle SHIP1-SH2 R31Q zeigt eine Restbindung von 1,3% bzw. 4,6%.

Für die von der WT-SHIP1-SH2-Domäne präzipitierten tyrosinphosphorylierten Proteine aus FDC-P1-Zellen wurden Molekulargewichte von 145 kD, 115 kD, 68 kD, 54 kD, 51 kD und 46 kD bestimmt, wobei das stärkste Signal von der 145 kD-Bande herrührte. Entweder wurde davon am meisten präzipitiert oder es war am stärksten (mehrfach) tyrosinphosphoryliert.

Für die von der WT-SHIP1-SH2-Domäne präzipitierten tyrosinphosphorylierten Proteine aus TF-1 I33-5-Zellen wurden Molekulargewichte von 141 kD, 120 kD, 68 kD, 60 kD und 54 kD bestimmt.

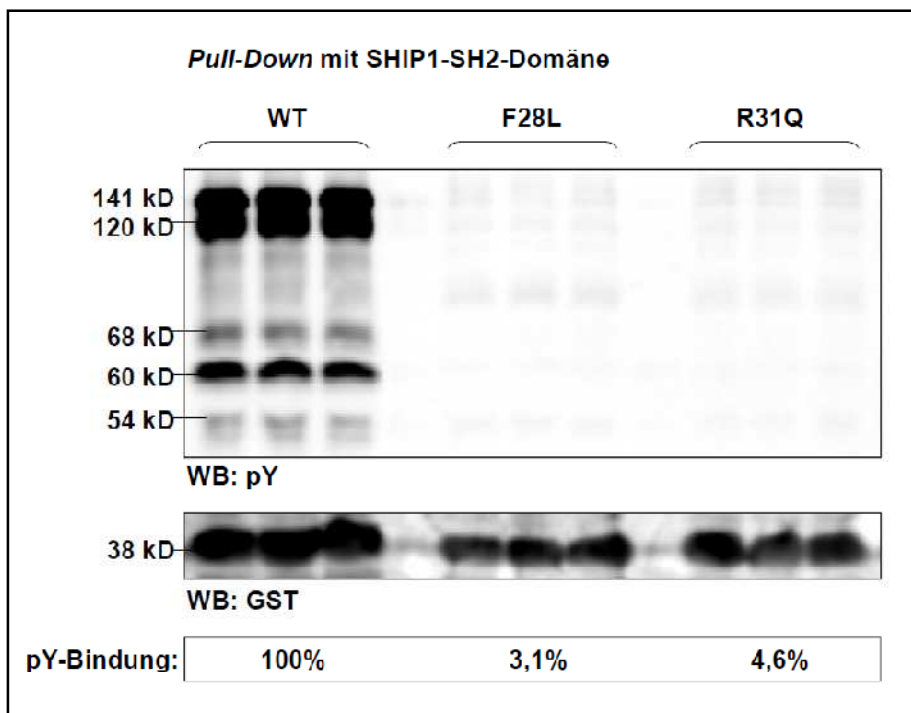


Abb. 4.22: Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domäne aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen. Die humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in *E. coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Je 1 mg

Lysat pro *Pull-Down* von mit 1000 U/mL GM-CSF behandelten TF-1 I33-5-Zellen (faktorunabhängig wachsende humane Erythroleukämie-Zelllinie) wurde mit Glutathion-Sepharose präadsorbiert und anschließend mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert. Pro WT und Mutation wurden drei *Pull-Downs* durchgeführt, auf einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und ein *Western Blot* davon angefertigt. Oben: WB: phospho-Tyrosin (pY). Die Molekulargewichte der Banden wurden aus einer graphischen Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte des Markers gegen ihren jeweiligen Retardationsfaktor berechnet. Mitte: WB: GST (nach *Stripping* des phospho-Tyrosin *Western Blots*) zur relativen Quantifizierung des SHIP1-SH2-GST-Fusionsproteins (38 kD). Unten: relative Bindung Tyrosin-phosphorylierter Proteine, normalisiert auf die jeweilige Menge an SHIP1-SH2-Fusionsprotein.

Die Rezeptoren für IL-3, GM-CSF und IL-5 verwenden eine gemeinsame β_c -Kette (β_c), die auf Ligandenstimulation hin Tyrosin-phosphoryliert wird (Miyajimi et al. 1993) und für die Signaltransduktion über diese Rezeptoren verantwortlich ist.

SHIP1 zeigt nach IL-3-Stimulation keine direkte Interaktion an die β_c -Kette (LIU et al., 1999). IL-3 induziert jedoch die Tyrosinphosphorylierung und Assoziation von SHIP1 und Shc (DAMEN et al., 1996; DAMEN et al., 1998; LIU et al., 1994; LIU et al., 1999; VELAZQUEZ et al., 2000), womöglich über die SH2-Domäne von SHIP1 (LIU et al., 1994). Shc wird in hämatopoetischen Zellen in Isoformen der Molekulargewichte von etwa 46 kD und 52 kD exprimiert und könnte somit eines der von der SHIP1-SH2-Domäne WT präzipitierten tyrosinphosphorylierten Proteine sein.

SHIP1 soll mit seiner SH2-Domäne auch an die tyrosinphosphorylierten Proteine Dok-1 (*downstream of kinase 1*) (MW ca. 62 kD) (DUNANT et al., 2000), Dok-2 (MW ca. 56 kD) (TAMIR et al., 2000) und Dok-3 (MW ca. 58-62 kD) (LEMAY et al., 2000) binden.

Obwohl bekannt ist, dass SHIP1 die GM-CSF-vermittelte Signaltransduktion negativ reguliert (HARDER et al., 2004; HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999), ist der genaue Mechanismus, wie dies geschieht, jedoch unbekannt (RAMSHAW et al., 2007).

An pY577 der GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette kann SHIP1 mit seiner SH2-Domäne womöglich direkt binden (DURSTIN et al., 1996; OKUDA et al., 1999) oder Shc direkt mit der PTB-Domäne von Shc (BONE and WELHAM, 2000; LANFRANCONE et al., 1995; PRATT et al., 1996). Wenn SHIP1 direkt mit seiner SH2-Domäne an pY577 der GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette bindet, könnte Shc mit seiner PTB-Domäne an SHIP1 binden und so rekrutiert werden. Wenn Shc direkt mit seiner PTB-Domäne an die GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette bindet, könnte SHIP1 mit seiner SH2-Domäne an Shc binden und so rekrutiert werden oder aber Grb2 mit seiner SH2-Domäne an Shc binden und, da Grb2 mit seinen SH3-Domänen SHIP1 binden kann, zusammen mit SHIP1 rekrutiert werden (LANFRANCONE et al., 1995). Auf jeden Fall führt der Verlust der Bindung an pY577 zu erhöhtem Überleben, erhöhter Proliferation und Koloniebildung von primären hämatopoetischen Zellen, erhöhter Gab2-Phosphorylierung, länger anhaltender PI3K-Aktivierung und Verlust der SHIP1-PtdIns(3,4,5)P₃-5-Phosphatase-Aktivität in GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette-Immunpräzipitationen (RAMSHAW et al., 2007).

Wenn SHIP1 nicht über Grb2 an die GM-CSF-R- β_c -Kette rekrutiert wird, spielt die SH2-Domäne für diesen Prozess die entscheidende Rolle. In diesem Fall sollte die SHIP1-SH2-Mutante F28L, die, wie gezeigt, nicht mehr an tyrosinphosphorylierte Proteine bindet, nicht an die GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette binden können. Um dies zu testen, wurden TF-1 I33-5-

Zellen mit GM-CSF stimuliert und *Pull-Downs* mit den SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q durchgeführt und die präzipitierte Menge GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette quantifiziert. Wie in Abb. 4.23 zu sehen, ist die von SHIP1-SH2 F28L präzipitierte Menge IL-3/IL-5/GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette auf 11% der von SHIP1-SH2 WT präzipitierten Menge reduziert, die mit SHIP1-SH2 R31Q auf 18%.

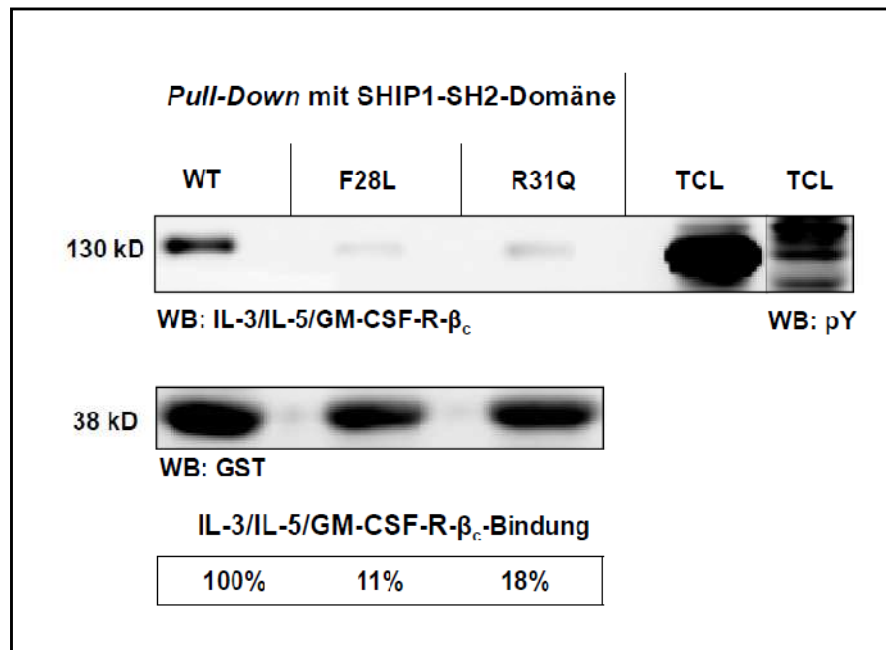


Abb. 4.23: Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domäne aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen. Die humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 5-103), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in *E. coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. Je 1 mg Lysat pro *Pull-Down* von mit 1000 U/mL GM-CSF behandelten TF-1 I33-5-Zellen (faktorunabhängig wachsende humane Erythroleukämie-Zelllinie) wurden mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und ein *Western Blot* davon angefertigt. Oben links: WB: IL-3/IL-5/GM-CSF-Rezeptor- β_c . Oben rechts: WB: phospho-Tyrosin (pY). Mitte: WB: GST (nach *Stripping* des IL-3/IL-5/GM-CSF-Rezeptor- β_c -*Western Blots*) zur relativen Quantifizierung des SHIP1-SH2-GST-Fusionsproteins (38 kD). Unten: relative Bindung von IL-3/IL-5/GM-CSF-R- β_c , normalisiert auf die jeweilige Menge an GST-SHIP1-SH2-Fusionsprotein. TCL: Gesamtzelllysate (*total cell lysate*).

Es wurde auch die Bindung von SHIP1-SH2 an Shc untersucht, jedoch konnte bereits im *Pull-Down* mit der WT-SHIP1-SH2-Domäne aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen kein Shc detektiert werden, siehe Abb. 4.24 links.

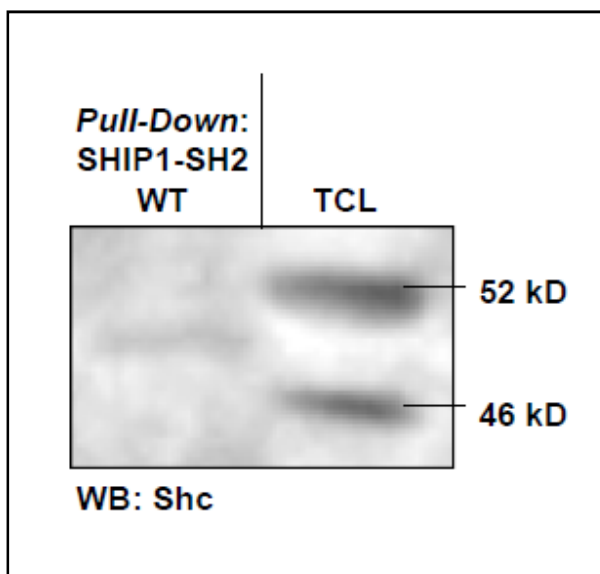


Abb. 4.24: Pull-Down mit SHIP1-SH2-Domänen aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen. Die humane SHIP1-SH2-Domäne (Aminosäuren 2-105), WT sowie die Mutanten F28L und R31Q, wurden in *E. coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert und an Glutathion-Sepharose gebunden. 2 mg Lysat von mit 1000 U/mL behandelten TF-1 I33-5-Zellen (faktorunabhängig proliferierende humane Erythroleukämie-Zelllinie) wurden mit Glutathion-Sepharose präadsorbiert und anschließend mit SHIP1-SH2-Domäne-gekoppelter Glutathion-Sepharose inkubiert. TCL: Gesamtzelllysate (*total cell lysate*).

4.8 Oberflächenplasmonresonanz mit der SHIP1-SH2-Domäne

Um die Bindung der WT-SHIP1-SH2-Domäne und der F28L-Mutante an tyrosinphosphorylierte Proteine zu quantifizieren, wurde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz gewählt (siehe auch 3.2.19). Dabei wird ein Bindungspartner auf einem beschichteten Gold-Sensorchip immobilisiert, hier die SH2-Domäne über ihren GST-Anteil an anti-GST-Antikörper, die kovalent an die Oberfläche gebunden wurden. Der zweite Bindungspartner (Analyt) fließt darüber hinweg und bewirkt bei Bindung an die Oberfläche eine Änderung des Reflexionswinkels eines monochromatischen, polar linearisierten Lichtstrahls, der von unten auf den Chip trifft.

Es wurde zuerst die Bindung der SHIP1-SH2-Domäne an tyrosinphosphorylierte Proteine eines Gesamtzelllysats GM-CSF-stimulierter TF-1 I33-5-Zellen untersucht, außerdem an ein tyrosinphosphoryliertes Peptid des humanen p52^{Shc1}, an das SHIP1 binden soll (LIU et al., 1997a), wenngleich eine Bindung der SHIP1-SH2-Domäne an Shc im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, siehe 4.7.2. Für die murine SHIP1-SH2-Domäne wurde eine Bindung an das Peptid RRASVSpYVNVQN, deren C-terminale sieben Aminosäuren humanem Shc1 (Aminosäuren 316-322) entsprechen, mit $K_D = 290 \pm 130$ nM gezeigt (LIU et al., 1997a), für die SHIP1-SH2-Domäne (Spezies unklar) wurde eine Bindung an das Peptid ELFDDPSpYVNVQNL, das in seiner gesamten Sequenz humanem Shc1 entspricht (Aminosäuren 310-323 von p52^{Shc1}) mit $K_D = 145$ nM bestimmt (KONCZ et al., 2001).

In einem ersten Schritt wurden die in Bakterien als GST-Fusionsproteine exprimierte humanen SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q sowie GST allein, siehe auch 4.7.1 und 4.9.1, an auf dem Sensorchip kovalent gebundene anti-GST-Antikörper gekoppelt (*Capturing*), jede in einer eigenen, einzeln ansteuerbaren Mikrozone, und zwar 600 bis 800 RU (*response units*), wobei 1.000 RU der Anlagerung von 1 ng/mm² Protein entsprechen, siehe Abb. 4.25.

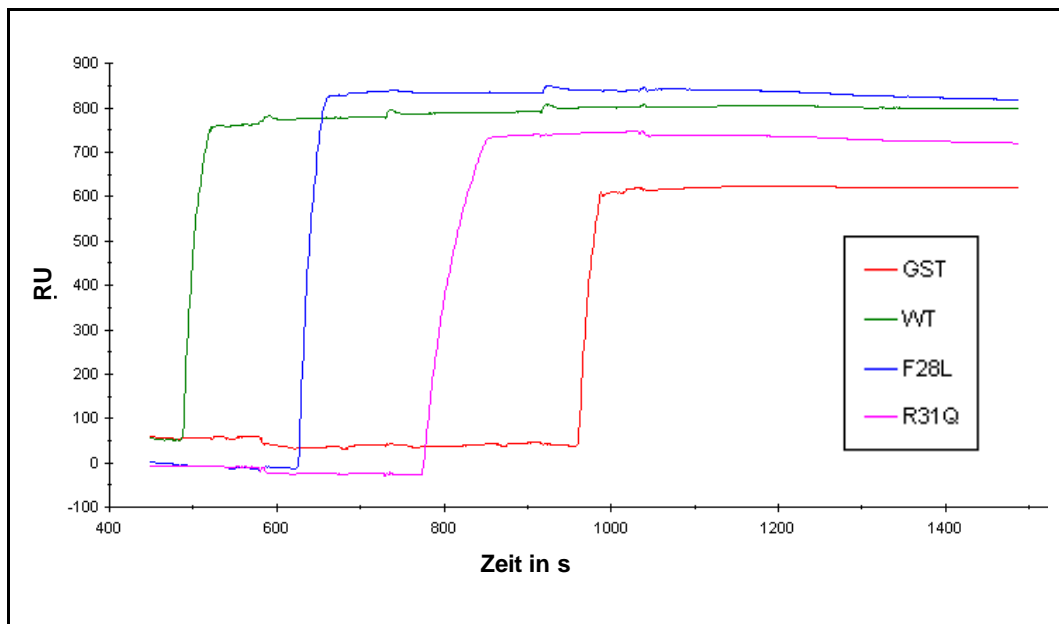


Abb. 4.25: Capturing von Proteinen an den Sensorchip. GST sowie die SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q als GST-Fusionsproteine wurden über Anti-GST-Antikörper an den Sensorchip gekoppelt. RU: *response units*.

Im ersten Versuch wurde ein Lysat GM-CSF-stimulierter TF-1 I33-5-Zellen, das tyrosinphosphorylierte Proteine enthält, für 10 min injiziert, siehe Abb. 4.26. In der Darstellung ist der Hintergrund des GST für alle vier Messkurven bereits abgezogen. Es konnte keine für den WT spezifische Bindung an die Oberfläche gemessen werden. Die Kurven gehen in den Bereich negativer RU, was auf kleine Unterschiede in den Zusammensetzungen des frisch für das Experiment zubereiteten Puffers und dem des eingefrorenen Lysats zurückzuführen ist, da das Gerät dafür sehr empfindlich ist. Dass keine Bindung tyrosinphosphorylierter Proteine detektiert wurde, kann auf ihren geringen Gehalt in Gesamtzelllysaten zurückgehen.

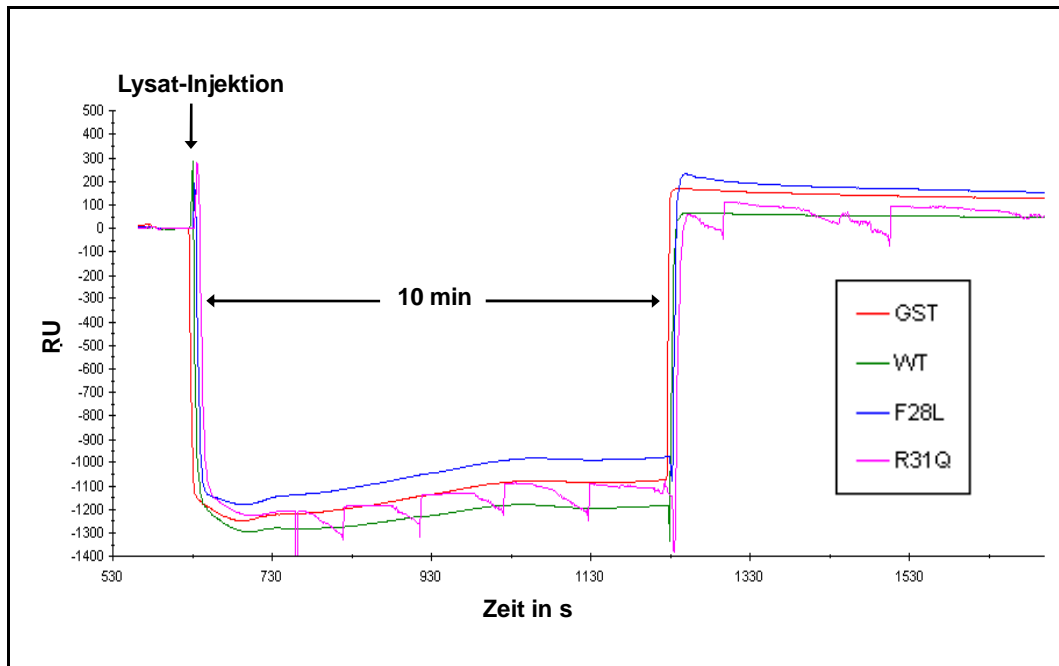


Abb. 4.26: Oberflächenplasmonresonanzmessung mit Gesamtzelllysate an SHIP1-SH2-Domänen. GST sowie die SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q als GST-Fusionsproteine wurden über einen Anti-GST-Antikörper an den Sensorchip gekoppelt und ein Phosphotyrosin-Protein-haltiges Lysat GM-CSF-stimulierter TF-1 I33-5-Zellen für 10 min injiziert. RU: *response units*.

Im zweiten Versuch wurde die Bindung der SHIP1-SH2-Domänen an das 12 Aminosäuren-Phosphopeptid der Sequenz LFDDPSpYVNVQN, die den Aminosäuren 311-322 von humanem p52^{Shc1} entspricht, untersucht. Dazu wurden die Fusionsproteine erneut an die zuvor regenerierte Sensorchipoberfläche mit immobilisiertem anti-GST-Antikörper gekoppelt und das Peptid in den Konzentrationen 0,03 μM , 0,3 μM und 3 μM , wie es bei einem K_D von $290 \pm 130 \text{ nM}$ dem $K_D \times 10^{-1}$, $K_D \times 10^0$ und $K_D \times 10^1$ entspricht. In der Darstellung in Abb. 4.27 ist der Hintergrund des GST für alle vier Messkurven bereits abgezogen. Dargestellt sind die Messungen mit 0,3 μM und 3 μM Phosphopeptid. Auch hier konnte keine für die WT-SHIP1-SH2-Domäne spezifische Bindung an die Oberfläche gemessen werden. Die Kurven steigen zwar in den Bereich positiver RU an, aber für alle Fusionsproteine gleichermaßen. Der Anstieg ist auch hier auf kleine Unterschiede in den Zusammensetzungen der Puffer zurückzuführen. Das Peptid war in DMSO gelöst und wurde vor der Injektion für die Einstellung der unterschiedlichen Peptidkonzentrationen unterschiedlich stark verdünnt.

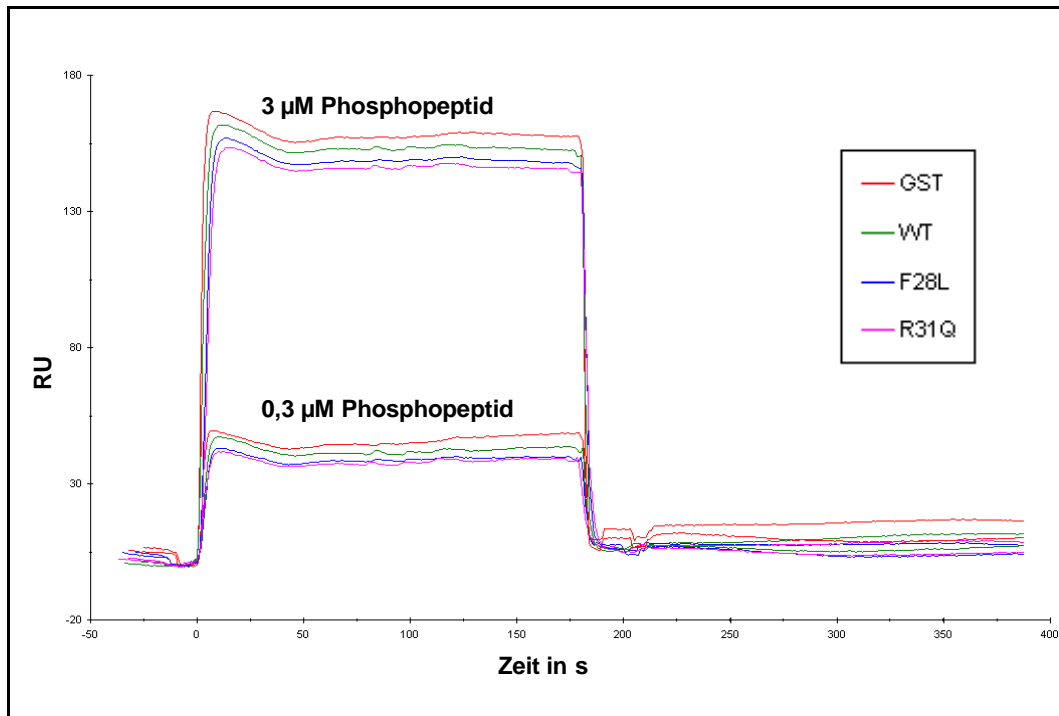


Abb. 4.27: Oberflächenplasmonresonanzmessung mit Phosphopeptid an SHIP1-SH2-Domänen. GST sowie die SHIP1-SH2-Domänen WT, F28L und R31Q als GST-Fusionsproteine wurden über eine Anti-GST-Antikörper an den Sensorchip gekoppelt und ein 12 Aminosäuren-Phosphopeptid der Sequenz LFDDPSpYVNVQN, die den Aminosäuren 311-322 von humanem p52^{SHC1} entspricht, für je 3 min injiziert, und zwar in den Konzentrationen 0,3 µM und 3 µM Phosphopeptid. RU: *response units*.

4.9 Interaktion von SHIP1 mit Grb2

4.9.1 Expression der Grb2-SH3-Domänen

Die humanen Grb2-SH3-Domänen, die N-terminale (Grb2-SH3(N)) und die C-terminale (Grb2-SH3(C)) als GST-Fusionsproteine sowie GST allein wurden in Bakterien exprimiert, über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, nach Auftrennung im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau angefärbt und anhand eines BSA-Standards quantifiziert, siehe Abb. 4.28.

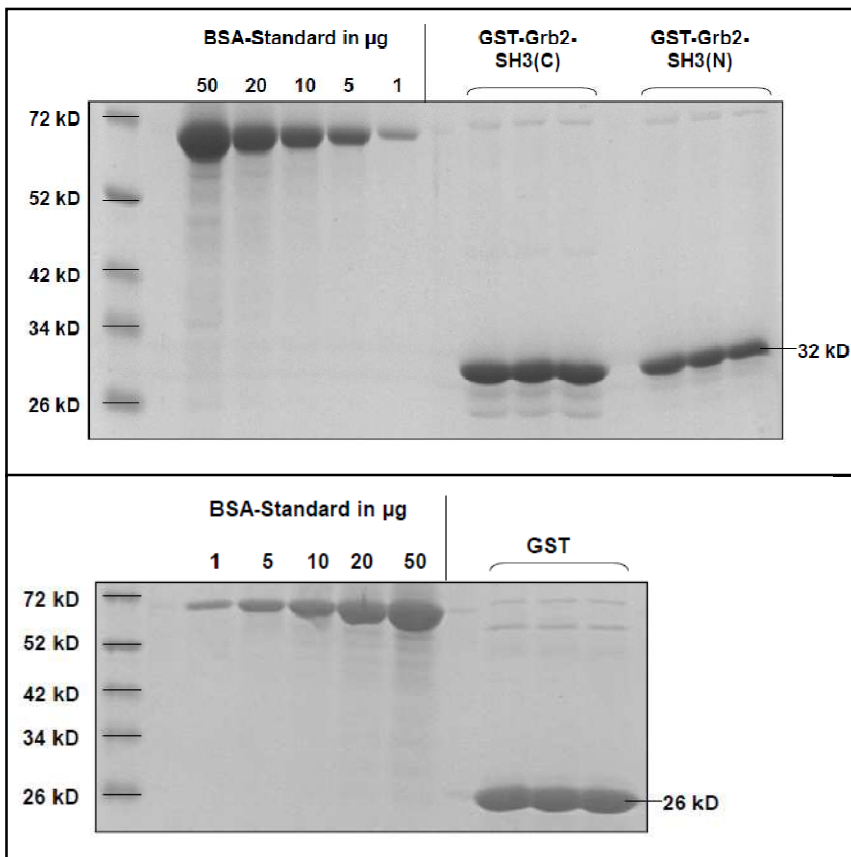


Abb. 4.28: Quantifizierung der Grb2-SH3-Domänen. Humane N-terminale und C-terminale Grb2-SH3-Domänen wurden in *E. coli* BL21 pLysS pREP4 als GST-Fusionsproteine exprimiert, über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, per SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Blau angefärbt und anhand eines BSA-Standards quantifiziert.

4.9.2 Pull-Downs mit Grb2-SH3-Domänen

Grb2 (*Growth factor receptor-bound 2*), auch bekannt als Ash (*abundant Src homology*), ist ein 25 kD-Adapter-Protein, das Rezeptortyrosinkinasen mit dem Ras-Signalweg verbindet (LOWENSTEIN et al., 1992; SCHLESSINGER, 1993, 1994). Es besitzt drei SH-Domänen in der Reihenfolge SH3(N)-SH2-SH3(C) (LOWENSTEIN et al., 1992; MATUOKA et al., 1992). SHIP1 interagiert mit Grb2, und zwar bindet es an die C-terminale und schwächer an die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 (JÜCKER et al., 1997; WISNIEWSKI et al., 1999).

Im *Pull-Down* mit Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) aus SHIP1-WT nach Doxycyclin-Induktion exprimierenden Jurkat Tet-On-Klon-Lysaten konnte dies bestätigt werden, siehe Abb. 4.29. Die Quantifizierung ergab, dass Grb2-SH3(C) SHIP1 1,9fach so gut bindet wie Grb2-SH3(N).

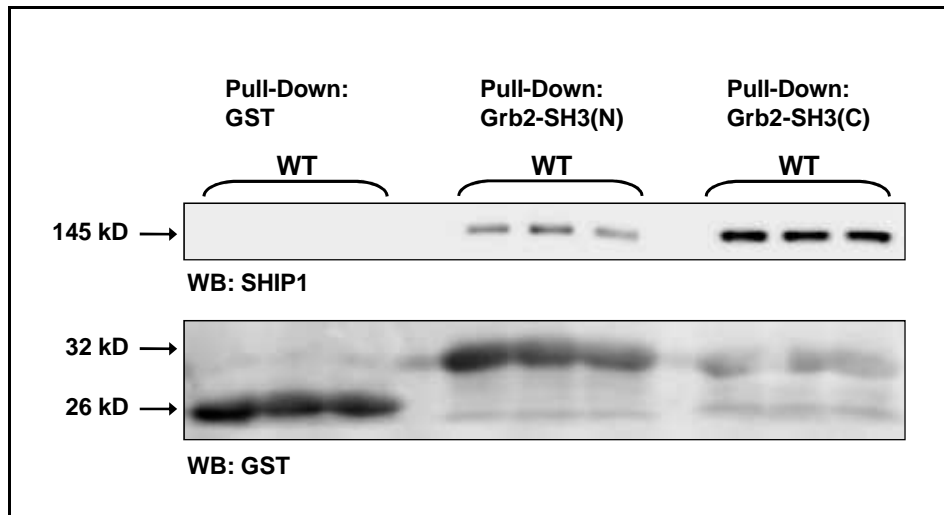


Abb. 4.29: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1. *Pull-Downs* mit GST-Grb2-SH3-Fusionsproteinen und GST allein aus Jurkat Tet-On SHIP1-Lysaten. Je 10 µg Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) sowie äquimolare Mengen GST wurden pro *Pull-Down* an Glutathion-Spearose gebunden, mit je 300 µg WT-SHIP1 exprimierenden Jurkat Tet-On-Lysaten inkubiert und anschließend präzipitiert.

Die Mehrheit der SH3-Domänen erkennt und bindet Proteinsequenzen mit einem P-x-x-P-Kernmotiv (FELLER et al., 1994; LI, 2005; SPARKS et al., 1998). Selektivität wird durch die das Kernmotiv flankierenden Reste gegeben (SPARKS et al., 1996). Jedoch binden einige SH3-Domänen auch an Motive, die kein P-x-x-P-Kernmotiv enthalten (KAMI et al., 2002; LI, 2005), was zeigt, dass die Bindungen von SH3-Domänen vielfältig sind.

Für die Bindung der N-terminalen Grb2-SH3-Domäne (Grb2-SH3(N)) werden in der Literatur die Konsensussequenzen P-x-ψ-P-x-R mit ψ: I/L/V (MCDONALD et al., 2009) und D-x-P-L-P-x-L-P (SPARKS et al., 1996) gefunden, Sequenzen also, die das P-x-x-P-Kernmotiv enthalten. Dagegen existiert für die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 (Grb2-SH3(C)) kein eindeutig definiertes Konsensusbindungsmotiv. In der Literatur werden P-x-ψ-P-x-R-R-R mit ψ: I/L/V, P-x-x-x-R-x-x-K-P-x₇-P-L-D (LOCK et al., 2000), P-x-x-x-R-x-x-K-P (LEWITZKY et al., 2001) oder auch nur R-x-x-K (HARKIOLAKI et al., 2009) angegeben, also Sequenzen mit P-x-x-P-Kernmotiv als auch ohne. Eine Übersicht ist in Abb. 4.30 dargestellt.

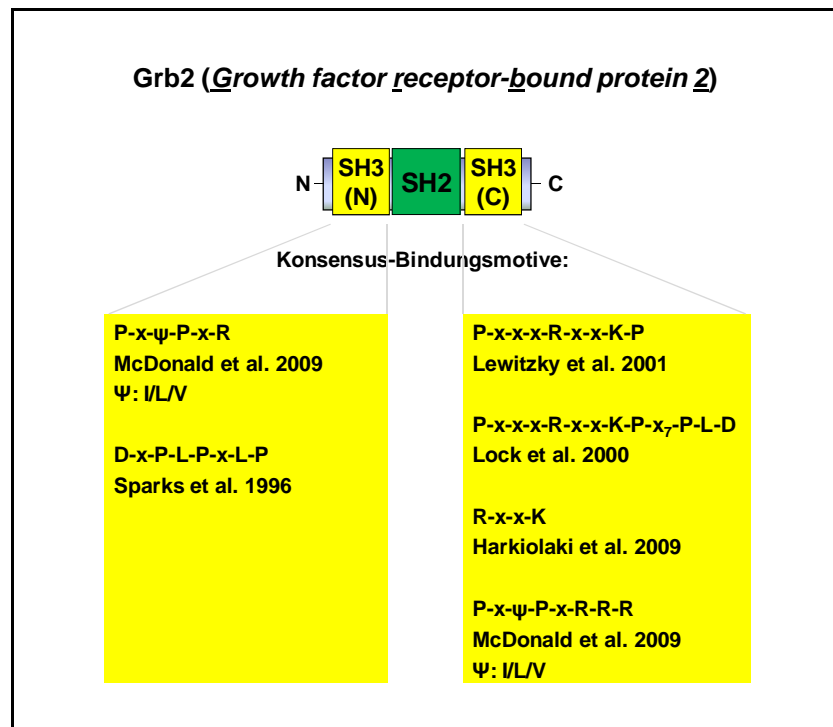


Abb. 4.30: Konsensusbindungsmotive der Grb2-SH3-Domänen. Ψ: I/L/V.

SHIP1 enthält zwei prolinreiche Regionen (schwarze Kästen Abb. 4.32), und zwar die Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne, außerdem den C-Terminus C-terminal der 5-Phosphatase-Domäne.

SHIP1 enthält 19 P-x-x-P-Motive (siehe Abb. 4.31 und blaue schmale Rechtecke in Abb. 4.32). Davon enthält ein P-x-x-P-Motiv in der Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne das Konsensus-Bindungsmotiv P-x-ψ-P-x-R für Grb2-SH3(N). Ein D-x-P-L-P-x-L-P-Motiv, ein weiteres Konsensus-Bindungsmotiv für Grb2-SH3(N), kommt in SHIP1 nicht vor. An Konsensus-Bindungsmotiven für Grb2-SH3(C) existieren in SHIP1 drei R-x-x-K-Motive, je eines in der SH2- und in der 5-Phosphatase-Domäne sowie im C-Terminus, jedoch kein P-x-x-x-R-x-x-K-P-, und entsprechend kein P-x-x-x-R-x-x-K-P-x₇-P-L-D-, oder P-x-ψ-P-x-R-R-R-Motiv.

Motive in SHIP1 als mögliche Bindungsstellen von Grb2-SH3-Domänen

<u>P-x-x-P-Motive</u>		<u>P-x-ψ-P-x-R-Motive</u>	
<u>AS</u>	<u>Sequenz</u>	<u>AS</u>	<u>Sequenz</u>
123-128	<u>PELPPR</u>	123-128	<u>PELPPR</u>
249-252	<u>PQVP</u>		
286-291	<u>PESP_HR</u>		<u>D-x-P-L-P-x-L-P-Motive</u>
289-292	<u>PHRP</u>		keines
919-922	<u>PFGP</u>		
922-925	<u>PPMP</u>		<u>P-x-ψ-P-x-R-R-R-Motive</u>
951-954	<u>PLG_HPC_R</u>		keines
960-963	<u>PPTP</u>		
961-964	<u>P_HTPP</u>		
964-967	<u>PGQP</u>		<u>R-x-x-K-Motive</u>
968-971	<u>PISP</u>	<u>AS</u>	<u>Sequenz</u>
1039-1042	<u>PKMP</u>	21-24	<u>RTGK</u>
1047-1050	<u>PPCP</u>	624-627	<u>REQK</u>
1105-1108	<u>PKTP</u>	1119-1122	<u>RPIK</u>
1120-1125	<u>PIK_HPS_R</u>		
1133-1136	<u>PPTP</u>		<u>P-x-x-x-R-x-x-K-P-Motive</u>
1138-1141	<u>PRPP</u>		keines
1140-1143	<u>PPLP</u>		
1178-1181	<u>PPGP</u>		

Abb. 4.31: Motive in SHIP1 als mögliche Bindungsstellen für die SH3-Domänen von Grb2. Die Aminosäuren(AS)-Zählung bezieht sich auf humanes SHIP1 delV117 mit 1188 AS. ψ: I/L/V.

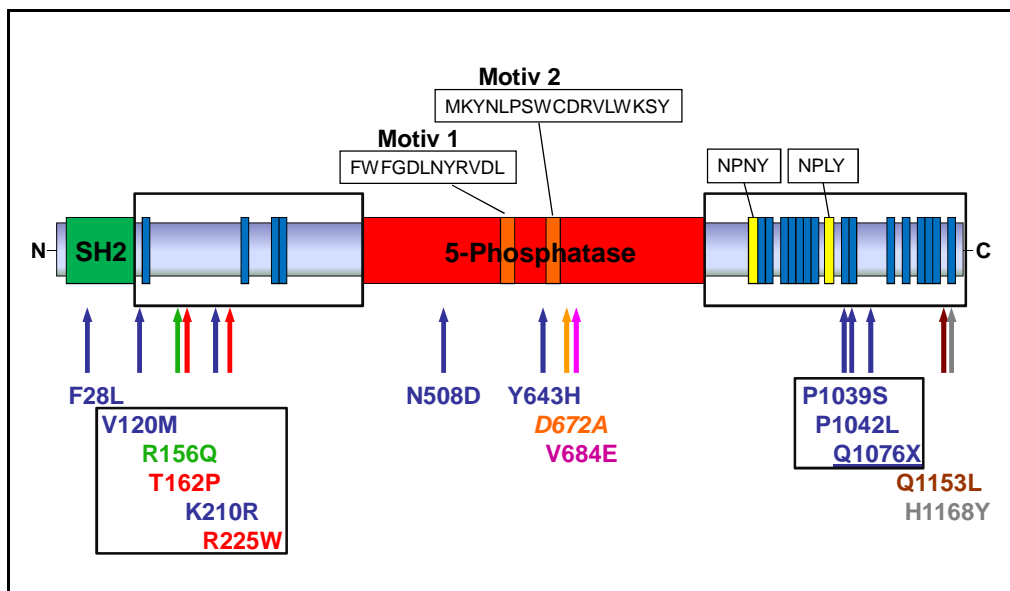


Abb. 4.32: SHIP1-Mutationen in prolinreichen Regionen. P-x-x-P-Motive als mögliche Bindungsstellen von SH3-Domänen sind als schmale blaue Rechtecke dargestellt. Die auf eine Interaktion mit den Grb2-SH3-Domänen hin untersuchten SHIP1-Mutanten sind schwarz umrahmt.

In der Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne wurden fünf Mutationen bei AML-Patienten gefunden (siehe Abb. 4.32), im prolinreichen C-Terminus ebenfalls fünf. Von den Mutationen im C-Terminus erschienen drei besonders interessant, darunter P1039S und P1042L, weil beide in einem, darüber hinaus demselben, P-x-x-P-Motiv liegen. Durch die Q1076X-Mutationen kommt es zu einem trunkierten SHIP1-Protein, dem die sechs C-terminalen P-x-x-P-Motive fehlen.

Um zu testen, ob eine dieser Mutationen, schwarz umrahmt in Abb. 4.32, einen Einfluss auf die Bindung von SHIP1 an eine der beiden Grb2-SH3-Domänen hat, wurden WT-SHIP1 sowie die SHIP1-Mutanten V120M, R156Q, T162P, K210R, R225W, P1039S und P1042L in Jurkat Tet-On-Klonen exprimiert, Proteinlysatsvolumina auf gleiche SHIP1-Mengen hin angepasst und *Pull-Downs* aus diesen Lysaten mit Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) durchgeführt, siehe Abb. 4.33, und die präzipitierten Mengen an WT-SHIP1 mit denen der Mutanten verglichen, siehe Abb. 4.34.

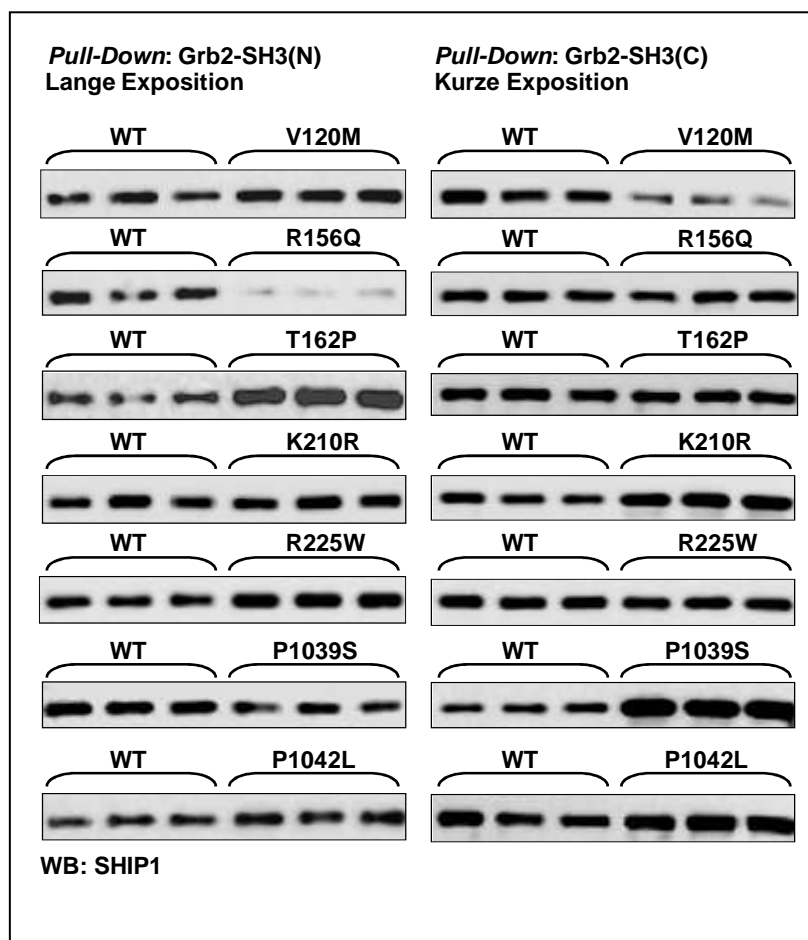


Abb. 4.33: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1 WT und Mutanten. Je 10 µg Grb2-SH3-Domänen (Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C)) pro *Pull-Down* wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt, *Pull-Downs* aus nach Doxycyclinzusatz SHIP1-exprimierenden Jurkat Tet-On-Lysaten, deren Volumina auf gleiche SHIP1-Mengen angepasst wurden, ausgeführt, und die präzipitierte Menge an SHIP1 im *Western Blot* analysiert. Die *Western Blots* der *Pull-Downs* mit Grb2-SH3(N) sind nach längerer Aufnahmezeit dargestellt, Grb2-SH3(N) bindet insgesamt schwächer an SHIP1 als Grb2-SH3(C).

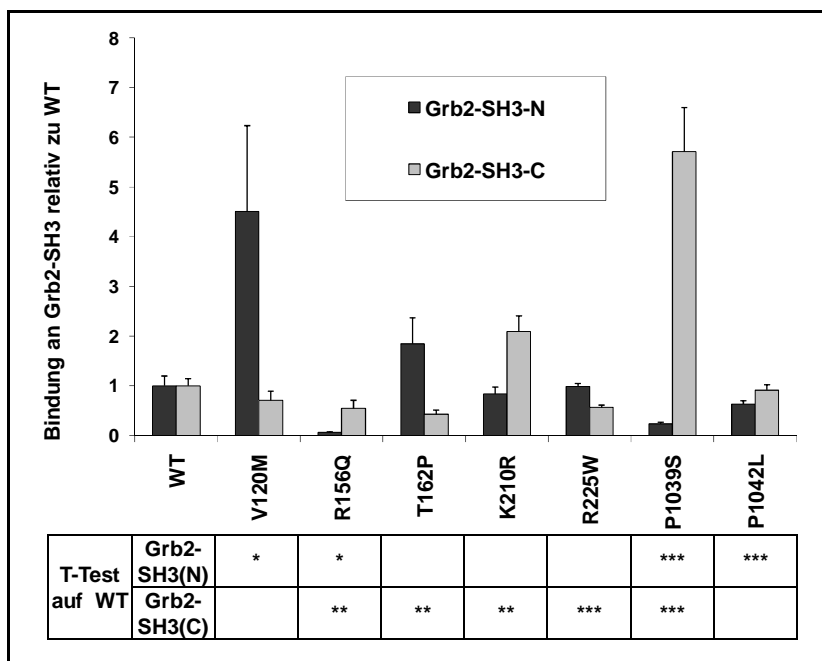


Abb. 4.34: Quantifizierung der Pull-Downs mit Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) aus WT-SHIP1- oder SHIP1-Mutanten-exprimierenden Jurkat Tet-On-Lysaten. Die Bindung der jeweiligen Grb2-SH3-Domäne an WT-SHIP1 wurde gleich 1 gesetzt und die Bindung der Mutanten relativ dazu dargestellt. Die Bindungen sind in dieser Abb. nur für die jeweilige SH3-Domäne miteinander vergleichbar, nicht jedoch die Bindung an Grb2-SH3(N), die SHIP1 insgesamt schwächer bindet, mit der Bindung an Grb2-SH3(C).

Die Bindung der SHIP1-Mutanten an die Grb2-SH3-Domänen relativ zu WT-SHIP1, siehe Abb. 4.34, variiert stark. Jede der Mutanten zeigt eine signifikant zu WT-SHIP1 veränderte präzipitierte SHIP1-Menge für mindestens eine der Grb2-SH3-Domänen.

Andererseits variiert auch das Verhältnis der Bindung Grb2-SH3(C) / Grb2-SH3(N) an WT-SHIP1 zwischen den *Western Blots* allein von 1,1fach bis 13,4fach.

Es ist deshalb fraglich, ob die Bindungsunterschiede zwischen WT und Mutanten real sind oder nur Schwankungen innerhalb des Experiments. Es wurden deshalb weitere Experimente durchgeführt.

Es existiert ein interessantes Motiv in SHIP1: Wenn man die Sequenz, die das P-x-x-P-Motiv mit P1039 und P1042L enthält, von C- nach N-terminal liest, ergibt sich ein P-x-x-x-R-x-x-K-P-Motiv und damit ein Konsensusbindungsmotiv für Grb2-SH3-(C), siehe Abb. 4.35. In diesem Motiv wäre P1039 für die Interaktion essentiell, P1042 dagegen nicht. Darüber könnte womöglich der Effekt der Mutante P1039S erklärt werden, pAkt nicht mehr zu reduzieren, für den Fall, dass die Rekrutierung von SHIP1 hierfür über Grb2 vermittelt würde.

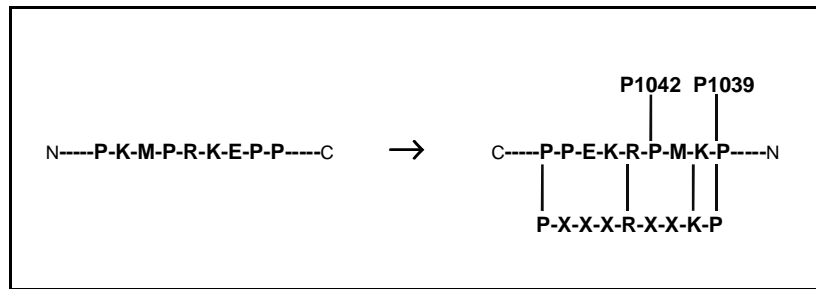


Abb. 4.35. Interessantes Motiv in SHIP1. Wird die Sequenz P1039-P1047 in SHIP1 vom C-Terminus zum N-Terminus gelesen, ergibt sich ein Grb2-SH3(C)-Konsensusbindungsmotiv.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Stephan Feller am *Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK*, wurde daraufhin die Bindung der Grb2-SH3(C)-Domäne an ein Peptid, das den Aminosäuren 1031-1048 des humanen SHIP1 in natürlicher N- zu C-Orientierung entspricht, per isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Es wurde jedoch keine Interaktion dieses Peptids mit Grb2-SH3(C) festgestellt.

Es wäre erwartet worden, dass, sofern die C-terminale Grb2-SH3-Domäne an C-P-x-x-x-R-x-x-K-P-N bindet, diese Bindung durch P1039S zerstört wird, während P1042L keinen Einfluss auf die Bindung haben sollte. Dass beide Mutanten also weiterhin an Grb2-SH3(C) binden, siehe Abb. 4.33 und 4.34, passt dazu, dass Grb2-SH3(C) nicht an dieses Motiv bindet.

Statt abzunehmen, nimmt die Bindung von Grb2-SH3(C) an P1039S-SHIP1 sogar noch zu, (Abb. 4.33 und 4.34). Da diese Zunahme nicht von einer direkten Bindung von Grb2-SH3(C) herrühren kann, gibt es vielleicht ein Vermittlerprotein, das sowohl an SHIP1 als auch an Grb2-SH3(C) bindet und in diesem *Pull-Down* in erhöhter Menge vorlag. Dafür spricht, dass vom P1039S-SHIP1-Lysat das größte Volumen eingesetzt werden musste, um auf gleiche SHIP1-Mengen zu kommen. Um die Rolle eines Vermittlerproteins zu testen, wurde *full length* (fl)-SHIP1 mit einem N-terminalen *Strep*-tag II in Bakterien exprimiert, über eine *Strep*-Tactin-Säule aufgereinigt, *Pull-Downs* mit Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) durchgeführt und die präzipitierte Menge an fl-SHIP1 quantifiziert. Da Bakterien normalerweise kein SHIP1 exprimieren, sollten sie auch ein Vermittlerprotein nicht exprimieren. Das Ergebnis ist in Abb.4.36 dargestellt.



Abb. 4.36: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an fl-SHIP1. Pro *Pull-Down* wurden 5 µg Grb2-SH3(N) oder Grb2-SH3(C) und 2,5 µg fl-SHIP1 eingesetzt und im *Western Blot* die präzipitierte fl-SHIP1-Menge zwischen beiden Grb2-SH3-Domänen quantifiziert und verglichen.

Dabei kam heraus, dass Grb2-SH3(C) 1,4fach so stark an SHIP1 bindet wie Grb2-SH3(N). Zur Erinnerung: Grb2-SH3(C) bindet WT-SHIP1 aus Jurkat Tet-On-Lysaten 1,9fach so gut wie Grb2-SH3(N). Der Unterschied zwischen den Faktoren 1,4 und 1,9 ist nicht signifikant. Grb2-SH3(C) bindet damit wahrscheinlich direkt an SHIP1 und nicht über ein Vermittlerprotein.

Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse aus Abb. 4.33 und 4.34 für die Mutanten in der Domäne zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne reproduzierbar sind, wurde nur diese Region (Aminosäuren 98-409) mit einem N-terminalen *Strep*-tag II in Bakterien exprimiert, über eine *Strep*-Tactin-Säule aufgereinigt und *Pull-Downs* mit Grb2-SH3(N) und Grb2-SH3(C) durchgeführt. In der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker war bereits gezeigt worden, dass beide Grb2-SH3-Domänen an diese Domäne binden, dabei die N-terminale stärker als die C-terminale.

In Abb. 4.37 ist zu sehen, dass erstens Grb2-SH3(N) an die Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne bindet, Grb2-SH3(C) dagegen kaum über GST-Hintergrund, und dass zweitens alle Mutanten ähnlich stark wie der WT an Grb2-SH3(N) binden. In Abb. 4.38 wurden die durch Grb2-SH3(N) präzipitierten Mengen SHIP1-Q98-T409 quantifiziert.

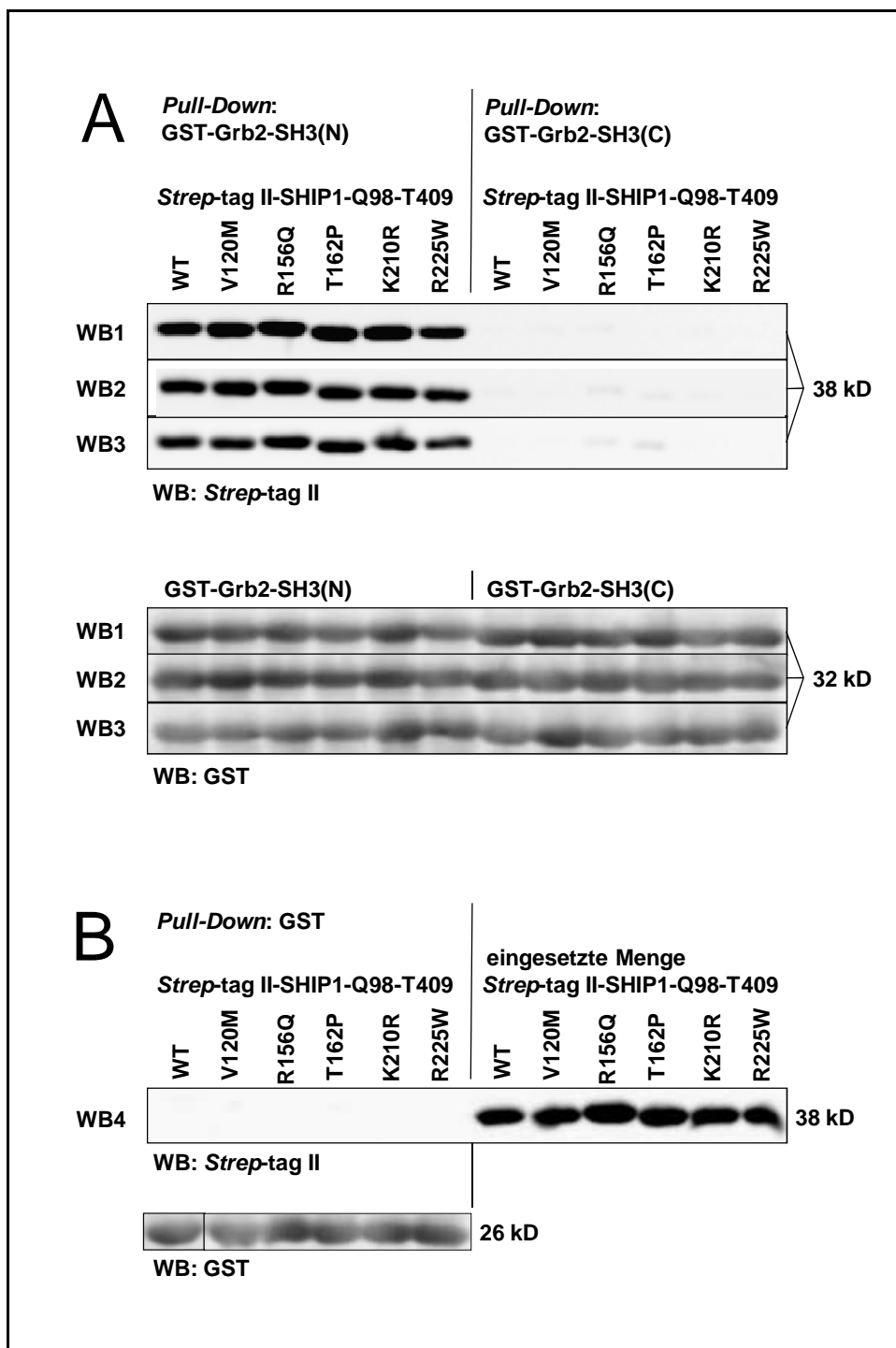


Abb. 4.37: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1-Q98-T409 WT und Mutanten. Je 5 µg Grb2-SH3(N) oder Grb2-SH3(C) pro Pull-Down wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und 2,5 µg Strep-tag II-SHIP1-Q98-T409 pro Pull-Down eingesetzt. A) Western Blots der Pull-Downs von Strep-tag II-SHIP1-Q98-T409 WT, V120M, R156Q, T162P, K210R und R225W mit Grb2-SH3(N) (oben links) und Grb2-SH3(C) (oben rechts) als Dreifachbestimmung. Zur Kontrolle unten die eingesetzte Menge an Grb2-SH3-GST-Fusionsproteinen. B) Kontrollen: Pull-Downs von Strep-tag II-SHIP1-Q98-T409 WT, V120M, R156Q, T162P, K210R und R225W mit GST (links), pro Pull-Down eingesetzte Menge Strep-tag II-SHIP1 Q98-T409 (rechts).

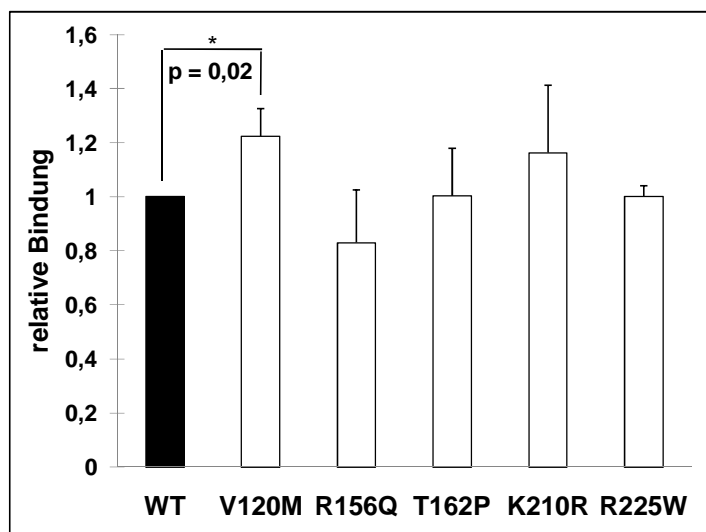


Abb. 4.38: Relative Bindung von Grb2-SH3(N) an SHIP1-Q98-T409 WT und Mutanten. Die dreifach bestimmten Mengen an durch Grb2-SH3(N) präzipitiertem *Strep*-tag II-SHIP1-Q98-T409 WT, V120M, R156Q, T162P, K210R und R225W aus Abb. 4.37 wurden quantifiziert, auf die eingesetzten Mengen *Strep*-tag II-SHIP1-Q98-T409 normalisiert und in Relation zum WT dargestellt, \pm SD.

Die Mutante V120M bindet minimal, aber signifikant, stärker an Grb2-SH3(N) als WT-SHIP1-Q98-T409. R156Q bindet minimal, aber nicht-signifikant, schwächer an Grb2-SH3(N) als WT. Vermutlich beeinträchtigen Mutationen in der SHIP1-Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne die Grb2-Bindungsfunktion von SHIP1 also nicht und die Ergebnisse aus Abb. 4.33 und 4.34 sind vermutlich Resultat von Schwankungen im Experiment.

Außerdem ergibt sich aus Abb. 4.37, dass eine physiologisch relevante Bindung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne an SHIP1-Q98-T409 somit unwahrscheinlich ist.

Da die Gesamt-SHIP1-Bindung von Grb2-SH3(C) höher ist als die von Grb2-SH3(N), muss Grb2-SH3(C) also an die übrigen möglichen SH3-Bindungsmotive im Rest von SHIP1 binden. Auch eine Bindung von Grb2-SH3(N) an andere Bereiche ist ebenfalls nicht ausgeschlossen.

Es wurde gezeigt, dass ein Fragment von SHIP1, das den Aminosäuren 1103-1188 des humanen SHIP1 delV117 entspricht, an Grb2 bindet (KAVANAUGH et al., 1996). Aus dieser Veröffentlichung geht nicht hervor, ob das Fragment mit Gesamt-Grb2 oder einer der beiden SH3-Domänen gebunden wurde. Eine Bindungsstelle sollte hier aber liegen. In dem Fragment, das den humanen SHIP1 delV117-AS 1103-1188 entspricht, liegen sechs P-x-x-P-Motive und ein R-x-x-K-Motiv. Dies sind genau die Motive, die in der Q1076X-Mutante fehlen. Es wurden *Pull-Downs* mit beiden Grb2-SH3-Domänen aus Lysaten von Jurkat Tet-On, die SHIP1 Q1076X exprimieren, ausgeführt, siehe Abb. 4.39.

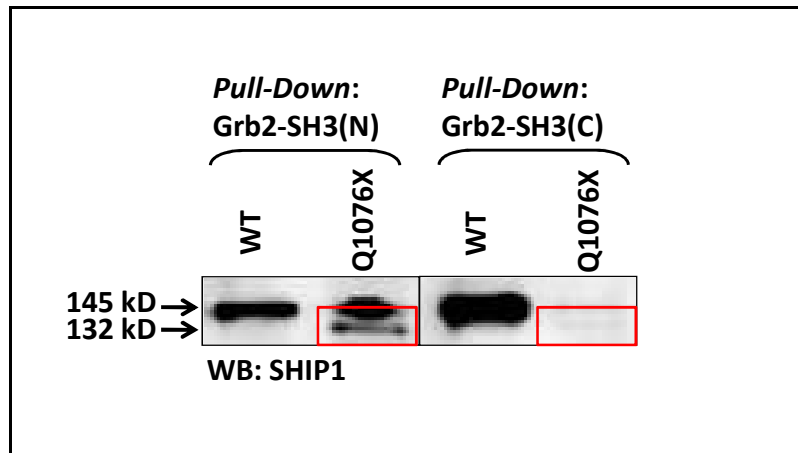


Abb. 4.39: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an Q1076X-Mutante. Je 10 µg Grb2-SH3(N) oder Grb2-SH3(C) pro *Pull-Down* wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und *Pull-Downs* von auf gleiche SHIP1-Mengen angepassten Volumina von Jurkat Tet-On-Lysaten, die nach Doxycyclinzusatz SHIP1 WT oder Q1076X exprimierten, durchgeführt und im *Western Blot* analysiert.

Es geht aus Abb. 4.39 hervor, dass Grb2-SH3(C) (rechts), wie aus den vorherigen Ergebnissen erwartet, stärker an WT-SHIP1 bindet als Grb2-SH3(N) (links).

Für SHIP1 Q1076X ist eine Bindung an Grb2-SH3(N) feststellbar (links), aber keine Bindung an Grb2-SH3(C) (rechts).

Q1076X fehlen die C-terminalen 113 Aminosäuren des WT. Dies bedeutet, dass die Bindungsstelle für Grb2-SH3(C) in den C-terminalen 113 Aminosäuren von SHIP1 liegt.

4.10 Tyrosinphosphorylierung von SHIP1

SHIP1 wird auf Stimulation von hämatopoetischen Zellen hin mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Cytokinen wie M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) (LIOUBIN et al., 1994), GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) (ODAI et al., 1997), IL-3 (Interleukin-3) (LIU et al., 1994), SCF (*stem cell factor*) = SF (*steel factor*) = Kit-Ligand (LIU et al., 1994), Thrombopoetin (DRACHMAN et al., 1995), Erythropoetin (DAMEN et al., 1993; LIU et al., 1994), FL (Flt3-Ligand) (MARCHETTO et al., 1999) und Kreuzvernetzung von Antigenrezeptoren (CROWLEY et al., 1996; LAMKIN et al., 1997; SAXTON et al., 1994) tyrosinphosphoryliert.

Der C-Terminus von SHIP1 ist essentiell für die Translokation von SHIP1 an die Plasmamembran nach FcγRIIB-BCR-Kreuzvernetzung auf B-Zellen und nach Stimulation

von Mastzellen aus Knochenmark mit SF (AMAN et al., 2000; DAMEN et al., 2001), und damit für PtdIns(3,4,5)P₃-Abbau und Inhibition des FcγRIIB-BCR-Kreuzvernetzung- bzw. SF-induzierten intrazellulären Calciumfluxes. Eine C-terminal nach Aminosäure 983 in murinem SHIP1 (entspricht Aminosäure 984 in humanem SHIP1 delV117) trunkierte SHIP1-Mutante wird kaum noch tyrosinphosphoryliert (DAMEN et al., 2001). Andererseits könnte auch die SH2-Domäne für die SHIP1-Tyrosinphosphorylierung verantwortlich sein (LIU et al., 1997a; MASON et al., 2000), oder aber auch nicht (LAMKIN et al., 1997).

Aus diesem Grund wurde die Tyrosinphosphorylierung ausgewählter Mutanten untersucht, und zwar der Mutanten im C-Terminus P1039S, P1042L, Q1076X und Q1153L, sowie in der Phosphotyrosin-Bindungs-defekten SH2-Domäne-Mutante F28L und der 5-Phosphatase-inaktiven Phosphatasedomänen-Mutante Y643H. Dazu wurde in den Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Tyrosinphosphorylierung vor und nach OKT3-Stimulation sowie bei einfacher Kultivierung in 10% FCS untersucht, siehe Abb. 4.40.

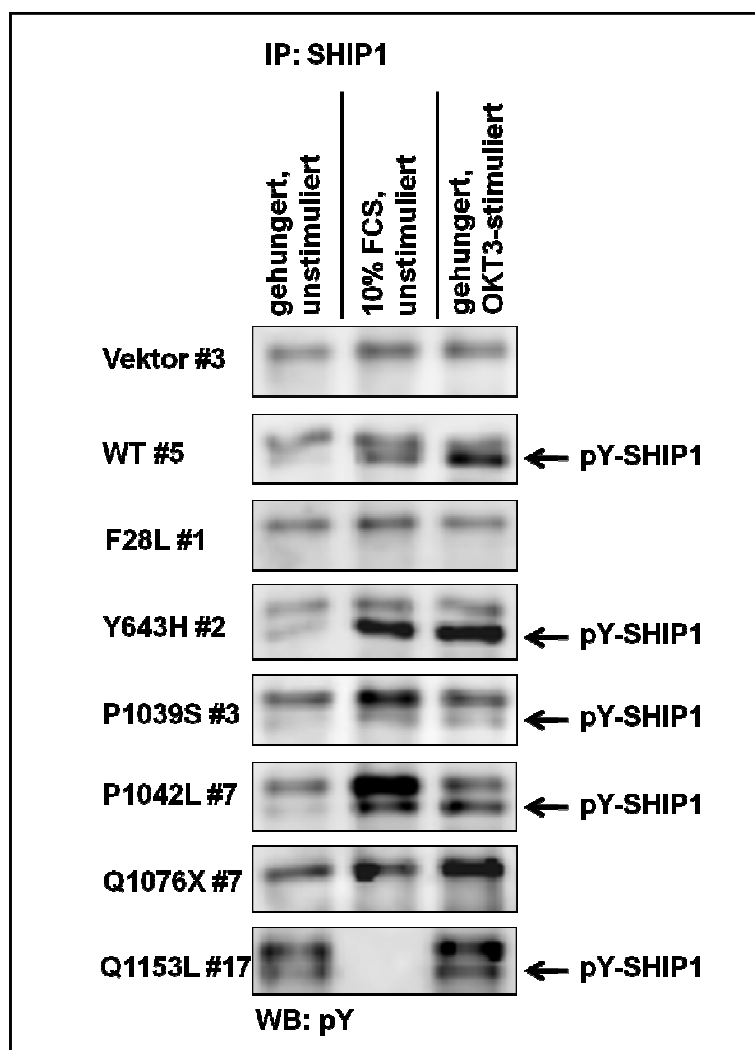


Abb. 4.40: Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 WT und ausgewählten Mutanten. Es wurde in den Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Expression induziert, 24 Std. später jeder Klon in drei Ansätze aufgeteilt (zwei Ansätze Hungermedium, ein Ansatz weiterhin 10% FCS) und nach weiteren 24 Std. einer der Hungeransätze mit OKT3 stimuliert, die anderen zwei nicht, alle drei lysiert und aus jedem Lysat zwei SHIP1-Immunpräzipitationen durchgeführt. Je eine Immunpräzipitation wurde mit Phosphotyrosin (pY) geblottet, die andere mit SHIP1 (siehe Abb.4.41).

Im ersten Experiment wurde SHIP1 aus Jurkat Tet-On-Klonen immunpräzipitiert und im *Western Blot* mit Phosphotyrosin-Antikörpern detektiert, siehe Abb. 4.40.

Eine Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 wurde für WT, Y643H, P1039S, P1042L und Q1153L festgestellt, nicht jedoch für F28L und Q1076X. Die Tyrosinphosphorylierung in gehungerten, unstimulierten Zellen ist gering, in 10% FCS gehalten aber nicht unterscheidbar von der Tyrosinphosphorylierung nach OKT3-Stimulation von gehungerten Zellen. Um auszuschließen, dass eine Tyrosinphosphorylierung aufgrund zu geringer SHIP1-Mengen in F28L und Q1076X nicht detektierbar war, wurden alle Immunpräzipitationen doppelt ausgeführt und eine jeweils mit SHIP1-Antikörpern im *Western Blot* detektiert und die SHIP1-Menge quantifiziert, siehe Abb. 4.41. Die eingesetzten SHIP1-Mengen für F28L und Q1076X lagen demnach über den SHIP1-Mengen von P1039S und z.T. auch von Q1153L, für die beide eine Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen wurde.

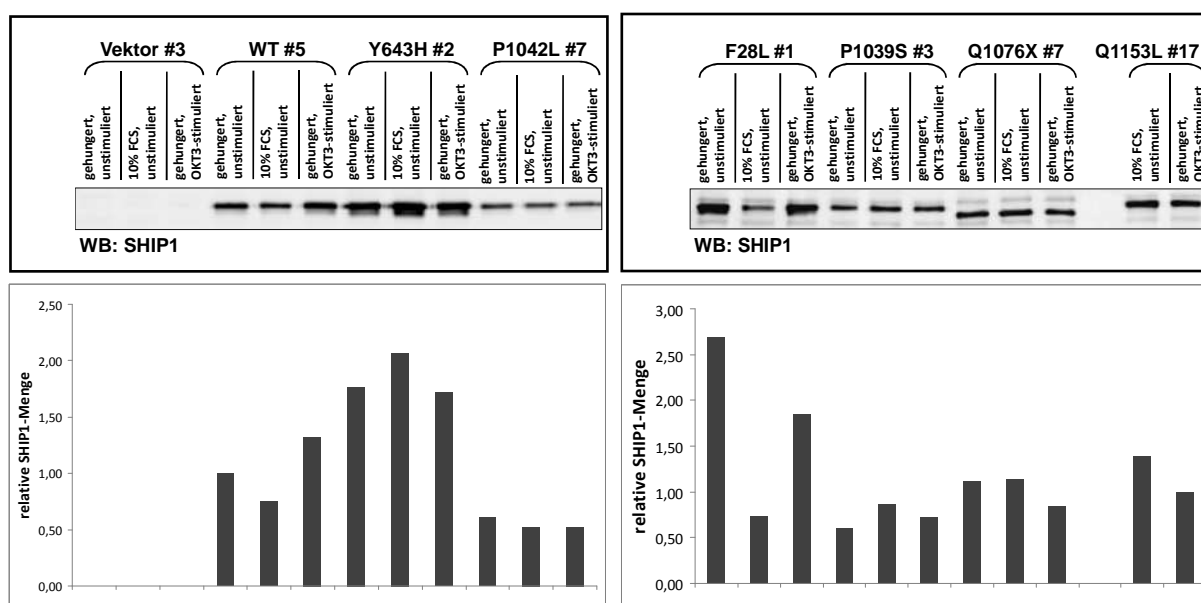


Abb. 4.41: Quantifizierung der auf Tyrosinphosphorylierung untersuchten eingesetzten SHIP1-Menge. Es wurde in den Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Expression induziert, 24 Std. später jeder Klon in drei Ansätze aufgeteilt (zwei Ansätze Hungermedium, ein Ansatz weiterhin 10% FCS) und nach weiteren 24 Std. einer der Hungeransätze mit OKT3 stimuliert, die anderen zwei nicht, alle drei lysiert und aus jedem Lysat zwei SHIP1-Immunpräzipitationen durchgeführt. Eine der Immunpräzipitation wurde mit SHIP1 geblottet. Links wurde die aus gehungertem, unstimuliertem WT-SHIP1 exprimierenden Jurkat Tet-On-Klon präzipitierte SHIP1-Menge 1 gleichgesetzt, rechts die aus gehungertem, OKT3-stimuliertem SHIP1 Q1153L exprimierenden Jurkat Tet-On-Klon präzipitierte SHIP1-Menge, da für beide jeweils eine Tyrosinphosphorylierung festgestellt worden war.

In einem weiteren *Western Blot* wurden Gesamtzelllysate der in 10% FCS gehaltenen Klone aufgetragen und mit SHIP1 und pY1020-SHIP1 (entspricht pY1021 in humanem SHIP1) detektiert, siehe Abb. 4.42. Hier wurde eine, wenngleich schwache, Tyrosinphosphorylierung von F28L und Q1076X gesehen, die den geringen SHIP1-Expressionsleveln in beiden Klonen entspricht.

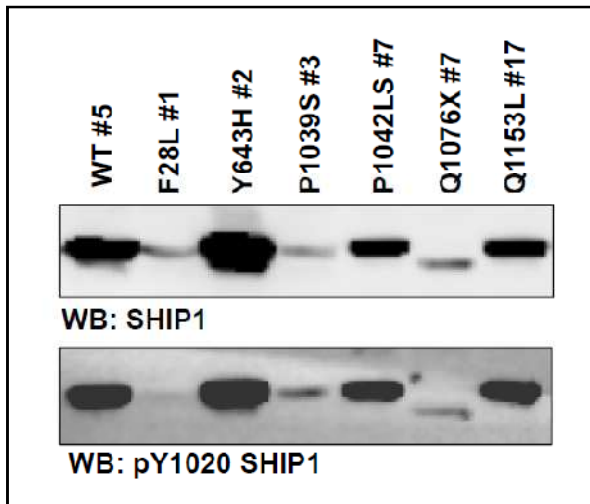


Abb. 4.42: Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 an Y1021. Es wurde in in 10% FCS gehaltenen Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Expression induziert, nach 48 Std. Proteinlysate angefertigt und die Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 an Y1021 im Gesamtzelllysat im *Western Blot* analysiert. Humanes Y1021 entspricht murinem Y1020, nach dem der Antikörper bezeichnet ist.

4.11 Calcium-Signaltransduktion in Jurkat-SHIP1-Klonen

Aus der Literatur ist bekannt (LAMKIN et al., 1997) und auch hier konnte gezeigt werden, dass SHIP1 nach TCR-Stimulation tyrosinphosphoryliert wird. Außerdem bindet SHIP1 zumindest *in vitro* an die ζ -Kette des TCR und die γ -, δ - oder ϵ -Ketten von CD3 (OSBORNE et al., 1996). Die Rekrutierung von enzymatisch aktivem SHIP1 an die Rezeptorkomplexe nach Fc γ RIIB-BCR-Quervernetzung in B-Zellen bzw. nach SF-Stimulation von Knochenmarksentstammenden Mastzellen führt zur Inhibition des intrazellulären Calciumfluxes (AMAN et al., 2000; DAMEN et al., 2001; DIEGEL et al., 1994; KIENER et al., 1997; ONO et al., 1997). Deshalb wurde untersucht, ob SHIP1 einen Einfluss auf das TCR-induzierte Calcium-Signal in SHIP1 WT und –Mutanten-exprimierenden Jurkat-Klonen hat.

In Abb. 4.43 ist das durch den anti-CD3-Antikörper OKT3 in den Klonen induzierte Calciumsignal dargestellt. Da die Kalibrierung, siehe 3.2.20.2, für einige Klone nicht optimal war, wurden hier nicht die Ca²⁺-Konzentrationen, sondern die Ratios F₃₄₀/F₃₈₀ angegeben.

Um die Klone besser miteinander vergleichen zu können, wurde die maximale Ratio F₃₄₀/F₃₈₀ (*Peak* zwischen 150 und 440 sec) bestimmt, siehe Abb. 4.44.

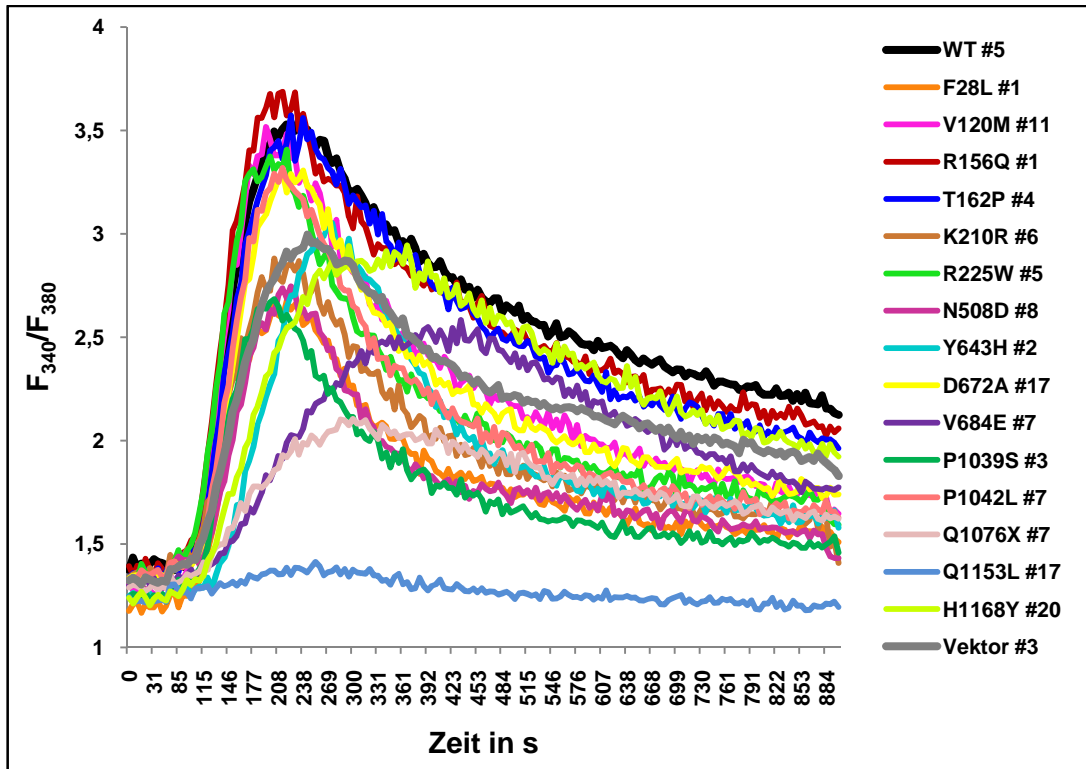


Abb. 4.43: Calciumsignale in SHIP1 WT oder -Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen nach OKT3-Stimulation. Die SHIP1-Expression wurde mit 1 $\mu\text{g/mL}$ Doxycyclin im Medium für 48 Std. in den Jurkat Tet-On-Klonen induziert, die Zellen mit Fura-2-AM beladen, in 96-Loch-Platten ausgesät und je drei Löcher pro Klon mit 10 $\mu\text{g/mL}$ OKT3 (anti-CD3) stimuliert, über 15 min die Fluoreszenzintensität durch Anregung bei 340 nm und 380 nm vermessen und die Ratio F_{340}/F_{380} als Maß für die Ca^{2+} -Konzentration dargestellt. Die Messung wurde aufgrund der Anzahl an Klonen in drei Gruppen durchgeführt, mit WT +Dox und Vektorkontrolle +Dox in jeder Gruppe und einer Gruppe pro Tag und drei Messtagen pro Gruppe.

Auswertbar waren solche Klone, deren maximale Ratio F_{340}/F_{380} sich vom Vektor #3 +Dox oder WT #5 +Dox signifikant unterschied, vom anderen nicht, oder von beiden nicht. Unterschied sie sich von beiden signifikant, waren sie nicht auswertbar, da sie niedriger als beide war und somit nicht im Messfenster, d.h. zwischen der maximalen Ratio F_{340}/F_{380} von Vektor #3 +Dox und von WT #5 +Dox. Damit fallen die Klone N508D #8, Q1153L #17 und Q1076X #7 heraus.

Die Q1076X-Mutante wäre sonst sehr interessant gewesen, da murine SHIP1-Mutanten, die nach Aminosäure 912 (entspricht humaner Aminosäure 909) bzw. Aminosäure 1027 (1028, beinhaltet noch beide NPXY-Motive) trunkiert sind, nicht wie WT-SHIP1 den Calciumflux bei SF-Stimulation von Mastzellen inhibieren können (DAMEN et al., 2001), genauso wenig wie nach Aminosäure 900 (entspricht humaner Aminosäure 897) trunkiertes SHIP1 bei $\text{Fc}\gamma\text{RIIB-BCR-Quervernetzung}$ (AMAN et al., 2000).

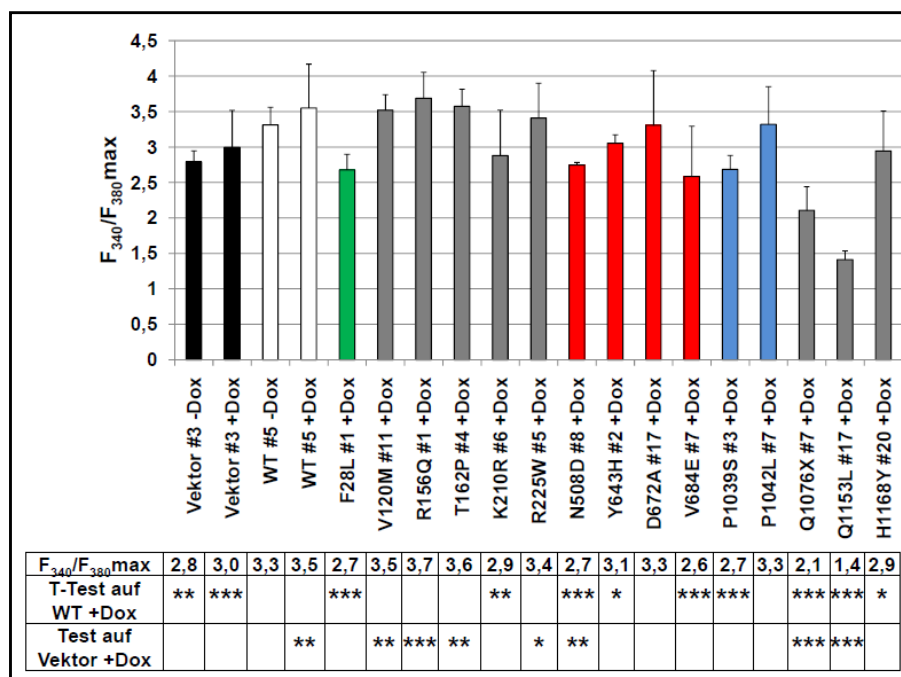


Abb. 4.44: Maximale Ratio F_{340}/F_{380} in SHIP1 WT oder -Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen nach OKT3-Stimulation. Die SHIP1-Expression wurde mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Doxycyclin im Medium für 48 Std. in den Jurkat Tet-On-Klonen induziert, die Zellen mit Fura-2-AM beladen, in 96-Loch-Platten ausgesät und je drei Löcher pro Klon mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ OKT3 (anti-CD3) stimuliert, über 15 min die Fluoreszenzintensität durch Anregung bei 340 nm und 380 nm vermessen und die maximale Ratio F_{340}/F_{380} als Maß für die maximale Ca^{2+} -Konzentration nach OKT3-Stimulation dargestellt. Die Messung wurde aufgrund der Anzahl an Klonen in drei Gruppen durchgeführt, mit WT +Dox und Vektorkontrolle +Dox in jeder Gruppe und einer Gruppe pro Tag und drei Messtagen pro Gruppe. Grün: SH2-Domäne, rot: 5-Phosphatase-Domäne, blau: P-x-x-P-Motiv. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Anders als möglicherweise erwartet, lag die maximale Ratio F_{340}/F_{380} nach OKT3-Stimulation für WT #5 +Dox über der des Vektorklons +Dox, d.h. die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle scheint nach SHIP1-Expression noch erhöht. Dieses Phänomen wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker bereits beobachtet. Die Mutanten V120M, R156Q, T162P und R225W erhöhen das Ca^{2+} -Signal in der Zelle, wie der WT, signifikant bezogen auf die Vektorkontrolle. Die Mutanten F28L, K210R, Y643H, V684E und P1039S erhöhen das Ca^{2+} -Signal, anders als der WT, nicht, sie bleiben signifikant unter dem Signal des WT. Bis auf die Mutante K210R war für alle diese Mutanten auch in den vorigen Experimenten ein zum WT veränderter Phänotyp festgestellt worden. Für die Mutanten D672A und P1042L ließ sich aufgrund zu großer Standardabweichung kein signifikanter Unterschied vom WT oder von der Vektorkontrolle feststellen.

Obwohl diese Ergebnisse für einige der Mutanten zu zuvor beobachteten zum WT veränderten Phänotypen passen, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den Messwerten um einfache klonale Unterschiede und nicht um einen SHIP1-spezifischen Effekt handelt.

Die Proteintyrosinphosphorylierung in Gesamtzelllysaten ausgewählter Klone, die in Hungermedium (FCS-frei) gehalten und mit OKT3-stimuliert wurden oder auch nicht, oder die einfach in Medium mit 10% FCS gehalten wurden, wurde im *Western Blot* analysiert, siehe Abb. 4.45. Es fällt auf, dass die Gesamt-Tyrosinphosphorylierung nach OKT3-Stimulation in allen SHIP1-exprimierenden Klone geringer ist als in der Vektorkontrolle. Außerdem fällt die Bande eines tyrosinphosphorylierten Proteins von ca. 48 kD auf, das erst nach OKT3-Stimulation in Erscheinung tritt. Im Jurkat Tet-On-Klon SHIP1 Q1153L #17 nimmt die Intensität dieser Bande nach OKT3-Stimulation nicht zu, was dafür spricht, dass die Zellantwort in diesem Klon generell nicht-funktionell war, möglicherweise durch retrovirale Integration von SHIP1 in einen für die TCR-Signaltransduktion wichtigen Locus.

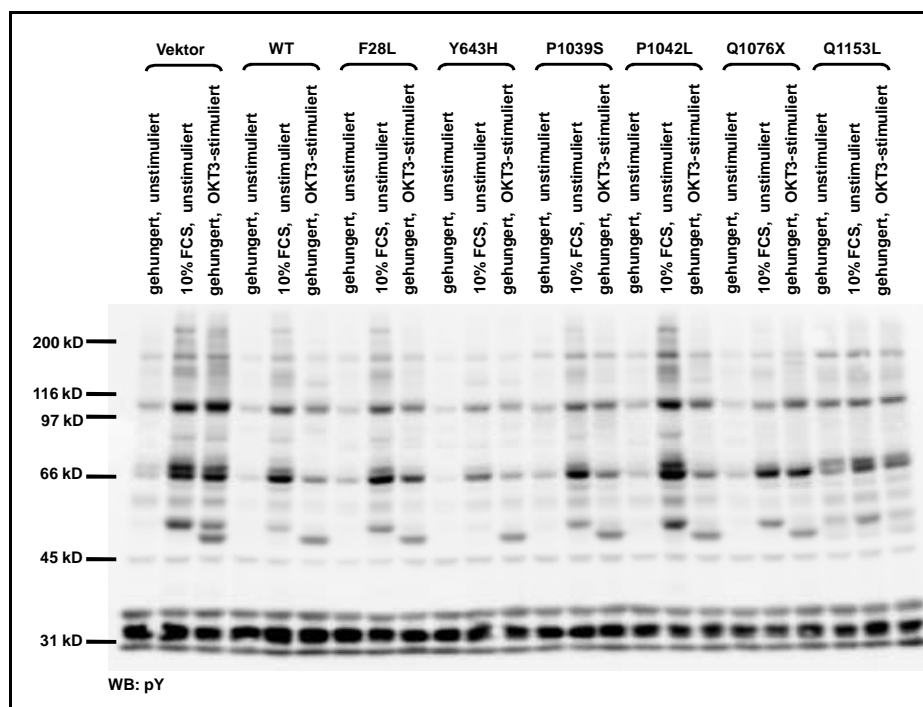


Abb. 4.45: Tyrosinphosphorylierung in Gesamtzelllysaten von WT-SHIP1 und ausgewählte SHIP1-Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen. Es wurde in den Jurkat Tet-On-Klonen die SHIP1-Expression induziert, 24 Std. später jeder Klon in drei Ansätze aufgeteilt (zwei Ansätze Hungermedium, ein Ansatz weiterhin 10% FCS) und nach weiteren 24 Std. einer der Hungeransätze mit OKT3 stimuliert, die anderen zwei nicht, alle drei lysiert und die Proteintyrosinphosphorylierung im *Western Blot* analysiert.

5 Diskussion

Akute Leukämien sind durch gesteigerte, über den eigentlichen Bedarf hinausgehende Zellproliferation und eine Blockade in der Differenzierung gekennzeichnet.

Es wird davon ausgegangen, dass in mindestens zwei verschiedenen Signalwegen Mutationen auftreten müssen, um aus einer myeloischen Zelle eine Zelle zu formen, aus der eine akute myeloische Leukämie hervorgehen kann. Dies sind üblicherweise Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen oder deren Signalmodulatoren sowie Mutationen bestimmter Transkriptionsfaktoren, meist Fusionsgene (EHNINGER et al., 2008).

In 50-70% der akuten myeloischen Leukämien ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert (MARTELLI et al., 2006), und das von Klasse IA PI3K generierte $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ist erforderlich für die Transformation (DENLEY et al., 2009).

3% der akuten myeloischen Leukämien weisen Mutationen in der SH2-Domäne-enthaltenden Inositol-5-Phosphatase SHIP1 auf. Als negativer Gegenspieler der PI3K, durch Abbau von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, kommt SHIP1 nach diesem Modell die Rolle eines mutierten Signalmodulators zu. SHIP1 inhibiert die Aktivierung des PI3K-Effektors Akt und damit Proliferation und Überleben (AMAN et al., 1998; ASTOUL et al., 1999; CARVER et al., 2000; FREEBURN et al., 2002).

SHIP1-*knockout*-Mäuse sowie Mäuse mit konditionaler Deletion von SHIP1 in der Granulozyten-/Makrophagen-Linie zeigen ein myeloproliferatives Syndrom (HELGASON et al., 1998; LEUNG et al., 2009). BCR-Abl, das für Chronische myeloische Leukämien charakteristische Fusionsprotein, reguliert spezifisch die SHIP1-Expression herunter (SATTLER et al., 1999). Die Überexpression der miRNA-155, die die Expression von SHIP1 herunterreguliert, in hämatopoetischen Zellen führt ebenfalls zu einer myeloproliferativen Erkrankung (O'CONNELL et al., 2008) und wird auch in AML gefunden (CAMMARATA et al., 2010).

All dies sind Indizien, die auf eine mögliche Rolle von SHIP1 als Tumorsuppressor hindeuten.

Es wurden 12 *missense*-Mutationen in SHIP1 bei Patienten mit AML gefunden, die nicht als SNP verzeichnet sind, siehe Abb. 2.9. Eine der Mutationen, F28L, liegt im hochkonservierten, für die Phosphotyrosinbindung der SH2-Domäne verantwortlichen FLVR-Motiv. Fünf der Mutationen liegen in der bislang nicht weiter charakterisierten Domäne zwischen SH2-Domäne und 5-Phosphatase-Domäne. In der 5-Phosphatase-Domäne traten 3 Mutationen auf,

im prolinreichen C-Terminus weitere drei, zwei davon, P1039S und P1042L, innerhalb eines P-x-x-P-Motivs, eines Konsensusbindungsmotivs für SH3-Domänen (PAWSON, 1995). Neben diesen 12 Mutationen wurden im Rahmen dieser Arbeit außerdem der SNP H1168Y, die bei T-ALL gefundene *nonsense*-Mutation Q1076X und die als 5-Phosphatase-inaktiv beschriebene Mutante D672A untersucht.

Dazu wurden die Mutationen in einen γ -retroviralen, SHIP1-codierenden Vektor eingeführt und Jurkat Tet-On-Zellen, die kein endogenes SHIP1 exprimieren, damit transduziert, sodass die SHIP1-Transkription nach Integration in das Zellgenom unter der Kontrolle eines TREs (*tet response element*) stand und die SHIP1-Expression durch das Tetracyclin Doxycyclin induzierbar sein sollte. Aus den transduzierten Kulturen wurden über Endpunktverdünnung Klone etabliert.

Die Jurkat Tet-On SHIP1-Mutanten sollten hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität, ihrer Fähigkeit, den PI3K-Akt-Signalweg und die Proliferation zu inhibieren sowie möglicher weiterer Phänotypen untersucht werden.

5.1 Etablierung induzierbar SHIP1-exprimierender Klone

Von 254 erhaltenen Klonen exprimierten 100 Klone SHIP1, davon einige erst nach Zugabe von Doxycyclin ins Medium. Andere Klone waren *leaky*, d.h. sie exprimierten SHIP1 bereits ohne Doxycyclin, die SHIP1-Expression ließ sich aber durch Doxycyclin-Zugabe ins Medium steigern. Viele der 100 Klone exprimierten SHIP1 konstitutiv, d.h. bereits ohne Doxycyclin, und durch Doxycyclin ließ sich keine Steigerung mehr erreichen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren und hier in transkriptionell besonders aktive Loci integrieren (SCHERDIN et al., 1990), die dann bei konstitutiver transkriptioneller Aktivierung womöglich nicht mehr durch das Tet-On-System regulierbar sind, da dabei die transkriptionelle Reprimierung durch ein Nicht-Binden des reversen tet-Transaktivators an die DNA in Abwesenheit von Doxycyclin erfolgt. Dieses Problem wird üblicherweise durch Expression eines tet-Transsuppressors (tTS) umgangen, der in Abwesenheit von Doxycyclin durch Bindung an tet-Operator-Sequenzen im Promotor des inserierten Gens die Transkription aktiv reprimiert (HILLEN and BERENS, 2002). Die verwendeten Jurkat Tet-On-Zellen exprimierten diesen tTS nicht.

5.2 SNPs in SHIP1

Alle der in einer dieser Arbeit vorausgegangenen genomischen Sequenzierung der SHIP1-codierenden Sequenz untersuchten 97 AML-Proben zeigten eine Deletion des Valins an Position 117. Diese zusätzliche Aminosäure in SHIP1 stellt einen genetischen Polymorphismus dar und wird offensichtlich vornehmlich in asiatischen Bevölkerungsgruppen gefunden (LUO et al., 2004; ZHANG et al., 2006), während sie in kaukasischen Bevölkerungsgruppen zu fehlen scheint (GILBY et al., 2007; HORSTMANN and JÜCKER, unveröffentlicht). Interessant dabei ist, dass V117 an der Exon3-Exon4-Spleißstelle codiert wird.

In Exon 26 von humanem SHIP1, das im Rahmen dieser Arbeit in Proben von 97 AML-Patienten und 16 Gesunden sequenziert wurde, wurde auch der SNP H1168Y gefunden. Er trat heterozygot und homozygot bei AML auf, bei Gesunden wurde er nur heterozygot angetroffen. Da insgesamt das für H1168 codierende Allel weiter verbreitet ist als das für Y1168, siehe auch Tab. 4.3, wird angenommen, dass dieser Befund auf eine zu geringe Anzahl an Proben von gesunden Spendern zurückzuführen ist, da sich die Genotyp-Verteilung im Rahmen der Hardy-Weinberg-Proportionen bewegt.

70% der *missense*-cSNPs haben keinen Effekt auf das codierte Protein, die übrigen 30% wirken sich fast alle auf die Proteininstabilität aus (WANG and MOULT, 2001). In der Mehrheit sind *missense*-cSNPs also ohne Auswirkung auf die biologische Funktion. Da die SHIP1-Mutante H1168Y in der 5-Phosphatase-Aktivität und in den pAkt-Leveln im Vergleich zu WT-SHIP1 keinen wesentlich abweichendem Phänotyp zeigte, scheint dies auch für den SNP H1168Y zuzutreffen.

5.3 Enzymatische Aktivität von SHIP1

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von WT-SHIP1 und SHIP1-Mutanten wurde SHIP1 aus nach Doxycyclin-Induktion SHIP1-exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen immunpräzipitiert und der Abbau von PtdIns(3,4,5)P₃-diC8 durch Detektion des entstandenen anorganischen Phosphats im Überstand als Maß für den Substratabbau mit Malachitgrünreagenz detektiert.

Die SHIP1-Mengen in den Immunpräzipitationen wurden durch Auftragung der Immunpräzipitate neben einem rekombinanten, in Bakterien exprimierten SHIP1-Standard im *Western Blot* bestimmt. Aus Substratumsatz und SHIP1-Menge konnte die spezifische Aktivität berechnet werden. Während die relative spezifische Aktivität von SHIP1 WT und SHIP1 D672A, die beide in jedem *Assay* mit vermessen wurden, weitgehend konstant blieb, schwankte die absolute spezifische Aktivität von *Assay* zu *Assay*. Dafür könnte es mehrere Ursachen geben: Das als Substrat verwendete PtdIns(3,4,5)P₃-diC₈ soll durch die beiden verkürzten Fettsäurereste laut Hersteller zu 1 mg/mL wasserlöslich sein und unterhalb seiner kritischen Micellen-Konzentration von ca. 3 mM monodispers vorliegen. Dennoch musste es im Ultraschallbad in Lösung gebracht werden und entsprach optisch eher einer Suspension als einer Lösung. Möglicherweise wurde das Substrat nicht immer vollständig in Lösung/Suspension gebracht. Für viele Enzyme gilt außerdem die Faustregel, dass im Temperaturbereich zwischen 25°C und 37°C bei einer Temperaturänderung um 1 K Aktivitätsänderungen um bis zu 10% auftreten. Bei der Aktivitätsmessung muss die gewählte Messtemperatur daher exakt eingehalten werden (LOTTSPREICH et al., 2006). Wenngleich die Temperatur der verwendeten Heizblöcke zusätzlich per Thermometer kontrolliert wurde, können geringe Schwankungen nicht ausgeschlossen werden.

Für alle SHIP1-Mutanten, bis auf die Mutanten der 5-Phosphatase-Domäne Y643H und die 5-Phosphatase-inaktive Kontrolle D672A, wurde eine dem WT entsprechende enzymatische Aktivität gemessen. Die 5-Phosphatase-Aktivität der Y643H-Mutante ist auf 16% der Aktivität von WT-SHIP1 reduziert. Diese Mutante war bisher in der Literatur nicht charakterisiert. Eine andere Mutante der 5-Phosphatase-Domäne, V684E, war mit ca. 18% Restaktivität beschrieben worden (LUO et al., 2003), wogegen sich hier keine vom WT signifikant verschiedene enzymatische Aktivität feststellen ließ. Für die Mutation Y643H wurde ein zweiter Klon vermessen, für die Mutation V684E der einzige Klon in zwei *Assays* à je sechs Immunpräzipitationen. In allen verwendeten Klonen wurde die eingeführte SHIP1-Mutation auf genomischer Ebene bestätigt.

In dieser Arbeit wurde der K_M -Wert von SHIP1 für PtdIns(3,4,5)P₃ nach Michaelis-Menten mit 375 μ M, bzw. mit ca. 124 μ M bei Kooperativität, bestimmt. Damit liegt er deutlich über den in der Literatur gefundenen Werten von 46 μ M (ZHANG et al., 2009a) bzw. 5,95 μ M (KISSELEVA et al., 2000). Dies würde außerdem für eine höhere Affinität von PTEN ($K_M = 50 \mu$ M (MAEHAMA et al., 2001)) für PtdIns(3,4,5)P₃ sprechen und zu einem Modell passen, in dem PTEN als eine Art *sentinel* für die basale Regulation der PtdIns(3,4,5)P₃-Level

verantwortlich ist, SHIP1 dagegen als *gatekeeper* für hohe PtdIns(3,4,5)P₃-Level nach Rezeptorstimulation (HARRIS et al., 2008).

In dieses Modell passt auch der Befund, dass sich die pAkt(S473)-Level in primären AML erst nach IL-3-Stimulation zwischen WT-SHIP1 und SHIP1 V684E unterscheiden, nicht aber basal (LUO et al., 2003). Auch in Knochenmarkszellen von SHIP1^{-/-}-Mäusen ist ein proliferativer Vorteil gegenüber solchen von SHIP1^{+/+}-Mäusen erst nach Stimulation mit GM-CSF, IL-3, SF (kit-Ligand) oder M-CSF, nicht aber in 15% Serum enthaltendem Medium allein zu verzeichnen (HELGASON et al., 1998). Jurkat-Zellen exprimieren kein PTEN und zeigen bereits in FCS-haltigem Medium eine konstitutive PI3K-Akt-Signalweg-Aktivierung, und so ist hier ein Effekt von SHIP1 zu sehen.

5.4 Reduktion der pAkt-Level durch Expression von SHIP1

SHIP1 reduziert die Aktivität des PI3K-Effektors Akt, gemessen an verminderter Akt-Phosphorylierung an S473 und T308 (HORN et al., 2004; LIU et al., 1998b). Die 5-Phosphatase-Aktivität von SHIP1 ist essentiell für die Vermittlung dieses Effekts (FREEBURN et al., 2002).

In der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker wurden nach Expression von SHIP1 in Jurkat-Zellen um 69% reduzierte Ruhelevel von PtdIns(3,4,5)P₃ festgestellt, die mit einer Reduktion der Akt-Kinaseaktivität in Jurkat-Zellen von 65% korrelierten (HORN et al., 2004). Jacob et al. (JACOB et al., 1999) zeigten in COS-7-Zellen eine durch SHIP1-Expression um 70% reduzierte basale Akt-Kinaseaktivität bzw. eine um 64% reduzierte Akt-Kinaseaktivität nach Serumstimulation, während die katalytisch inaktive SHIP1-Mutante D672A die Akt-Kinaseaktivität nach Serumstimulation nur um 23% reduzierte.

In dieser Arbeit reduzierte WT-SHIP1 das pAkt(S473)-Level um 74% und das pAkt(T308)-Level um 62%. Das pAkt(S473)-Level spiegelt die SHIP1-Aktivität wieder: Alle SHIP1-Mutanten (mit Ausnahme von P1039S, siehe weiter unten), die eine WT-SHIP1 entsprechende 5-Phosphatase-Aktivität zeigten, besaßen auch die Fähigkeit, das pAkt(S473)-Level entsprechend dem WT zu reduzieren, die Mutante Y643H und die Kontrolle D672A dagegen nicht.

Für die pAkt(T308)-Level ergibt sich ein etwas anderes Bild. Hier scheinen neben der Kontrolle D672A die Mutanten V684E, P1039S und Q1076X ihre Fähigkeit verloren zu

haben, pAkt(T308) zu reduzieren, was aber für letzte drei nicht in Zusammenhang mit der 5-Phosphatase-Aktivität steht, möglicherweise aber mit der Translokation dieser SHIP1-Mutanten an den Ort ihrer Wirkung.

5.5 Interaktion von SHIP1 mit Grb2

SHIP1 übt seine inhibitorischen Effekte nach Translokation zu seinem Substrat PtdIns(3,4,5)P₃ in der Plasmamembran (und evtl. zu Ins(1,3,4,5)P₄) aus, siehe auch 2.11.2. Diese Translokation könnte über das Adapterprotein Grb2 geschehen, siehe auch 2.8.1. Für die Mutanten P1039S und P1042L, die beide innerhalb eines P-x-x-P-Motivs, einer möglichen Bindungsstelle für SH3-Domänen, liegen, sowie für die Mutante Q1076X, der die 6 C-terminalen P-x-x-P-Motive fehlen, wurde ihre Fähigkeit der Interaktion mit den SH3-Domänen des Adapterproteins Grb2 untersucht, für die eine Bindung an SHIP1 bekannt ist (JÜCKER et al., 1997). Mit einbezogen in die Untersuchung wurden außerdem die Mutanten der Domäne zwischen der SH2- und der 5-Phosphatase-Domäne, da für diese Region, Q98-T409, in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker ebenfalls eine Interaktion mit den Grb2-SH3-Domänen gezeigt worden war.

In dieser Arbeit wurde eine Interaktion der N-terminalen Grb2-SH3-Domäne mit der SHIP1-Region Q98-T409 nachgewiesen, während eine Bindung der C-terminalen Grb2-SH3-Domäne an diese Region vernachlässigbar schwach war und vermutlich nicht physiologisch ist. Durch Abgleich mit der Konsensusbindungssequenz für Grb2-SH3(N), P-x-ψ-P-x-R (MCDONALD et al., 2009), mit ψ: I/V/L, wird angenommen, dass das Bindungsmotiv für Grb2-SH3(N) in den Aminosäuren 123-128 in SHIP1, P-E-L-P-P-R, dem einzigen Motiv in SHIP1, das diesem Konsensus entspricht, liegt.

Für die Mutanten V120M, R156Q, T162P, K210R und R225W wurde keine besondere Beeinträchtigung der Bindung an Grb2-SH3(N) festgestellt.

Insgesamt bindet Grb2-SH3(C) aber stärker an das volle-Länge-SHIP1-Protein, und zwar um einen Faktor zwischen 1,4 und 1,9 relativ zu Grb2-SH3(N). Die Bindungsstelle für Grb2-SH3(C) muss außerhalb von Q98-T409 liegen.

Ein Fragment von SHIP1, das den Aminosäuren 1103-1188 des humanen SHIP1 delV117 entspricht, bindet an Grb2 (KAVANAUGH et al., 1996). Aus dieser Veröffentlichung geht nicht hervor, ob das Fragment mit Gesamt-Grb2 oder einer der beiden SH3-Domänen gebunden

wurde. Eine Bindungsstelle sollte hier aber liegen. In dem Fragment, das den humanen SHIP1 delV117-Aminosäuren 1103-1188 entspricht, liegen sechs P-x-x-P-Motive und ein R-x-x-K-Motiv. Dies sind genau die Motive, die in der Q1076X-Mutante fehlen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Grb2-SH3(C) diese SHIP1-Mutante nicht mehr präzipitieren kann. Q1076X wurde in einer T-ALL gefunden. Dieser Befund deutet auf eine mögliche Rolle von SHIP1 auch in der Entstehung von akuten lymphatischen Leukämien hin.

Das P-x-x-P-Motiv, das P1039 und P1042 enthält, liegt vor dem Stopp-Codon der Q1076X-Mutante. Für Grb2-SH3(C) gibt es kein eindeutiges Konsensusbindungsmotiv, es wurden mehrere vorgeschlagen, siehe 4.9. Vom C- zum N-Terminus gelesen ergibt sich für die Sequenz P1039-P1047 in SHIP1 ein P-x-x-x-R-x-x-K-P-Motiv, das einem Konsensus für Grb2-SH3(C) entspricht (LEWITZKY et al., 2001). Einige prolinreichen Sequenzen bilden eine pseudo-symmetrische Helix aus und besitzen damit die strukturelle Grundlage, an SH3-Domänen sowohl in N- zu C- als auch in C- zu N-Orientierung zu binden (LIM et al., 1994). In einem P-x-x-x-R-x-x-K-P-Motiv würde P1039 einen essentiellen Rest darstellen, P1042 nicht, was dazu passen würde, dass für die SHIP1-Mutante P1039S ein Phänotyp, nämlich der Verlust der Fähigkeit, pAkt-Level zu reduzieren, trotz funktionaler 5-Phosphatase-Aktivität, festgestellt wurde, für die Mutante P1042L dagegen kein vom WT wesentlich abweichender. In der Arbeitsgruppe von Dr. Stephan Feller am *Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK*, wurde die Bindung der Grb2-SH3(C)-Domäne an ein Peptid, das den Aminosäuren 1031-1048 des humanen SHIP1 in natürlicher N- zu C-Orientierung entspricht, untersucht, jedoch keine Interaktion festgestellt. Dieses Ergebnis passt dazu, dass die Bindungsstelle von Grb2-SH3(C) C-terminal von Q1076 liegt. Jedoch kann so der Phänotyp der P1039S-Mutante nicht über einen Verlust der Bindung von SHIP1 an Grb2 und somit über den Verlust der Rekrutierung an die Plasmamembran bzw. den Ort seiner Wirkung erklärt werden.

Möglicherweise interagiert die Sequenz, die P1039 enthält, mit einem anderen Protein. Das Programm SH3-Hunter (<http://cbm.bio.uniroma2.it/SH3-Hunter/>) findet als mögliche Bindungspartner für die Sequenz PKMPRK, die den Aminosäuren 1039-1044 des humanen SHIP1 delV117 entspricht, Nck1-SH3-3, Nck2-SH3-3, Grb2-SH3(C), Vav-SH3(N), Ruk-SH3-1, Endophilin A1, Abl und Src. Endophilin ist ein neuronales Protein. Für Grb2-SH3(C) wurde für die Sequenz PKMPRK eine Bindung bereits ausgeschlossen, ebenso für Vav- und Nck-SH3-Domänen an SHIP1 (OSBORNE et al., 1996). Es bleiben Ruk, Abl und Src. Wie eine

Bindung eines dieser Proteine an SHIP1 bzw. der Verlust dieser Bindung in SHIP1 P1039S sich auf die Akt-Phosphorylierung auswirken soll, ist unklar. Darüber hinaus wären in der Sequenz P-K-M-P-R-K, sofern eines der Proteine daran bindet, beide Prolinreste, P1039 und P1042, zumindest für eine Interaktion mit Abl oder Src erforderlich (KAY et al., 2000), was nicht den speziell durch Mutation von P1039 erzeugten Effekt erklären könnte.

Eine weitere Möglichkeit für den für die P1039S-Mutante beobachteten Phänotyp könnte ein Funktionszugewinn (*gain of function*) sein und es wird in SHIP1 eine neue Bindung geschaffen, die es womöglich vom Ort seiner Funktion wegsequestriert.

Die Bindungsstellen für Grb2-SH3-Somänen in SHIP1 lassen sich womöglich über Literatursuche weiter eingrenzen: Das SHIP1-homologe SHIP2 bindet wie SHIP1 schwach an Grb2-SH3(N), jedoch nicht an Grb2-SH3(C) (WISNIEWSKI et al., 1999). Sofern die Bindung an Grb2-SH3(N) zwischen SHIP1 und SHIP2 konserviert ist, müsste sich in SHIP2 eine SHIP1-homologe Grb2-SH3(N)-Konsensusbindungssequenz finden. SHIP2 besitzt ein einziges P-x-ψ-P-x-R-Motiv, mit der Sequenz P-P-L-P-P-R, und dieses liegt wie die entsprechende P-E-L-P-P-R-Sequenz in SHIP1 in der Region zwischen SH2- und 5-Phosphatase-Domäne direkt C-terminal der SH2-Domäne. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Sequenz P-E-L-P-P-R (Aminosäuren 123-128 in SHIP1) die Bindungsstelle für Grb2-SH3(N) in SHIP1 sein könnte.

Umgekehrt dürfte unter den für die Bindung von SHIP1 an Grb2-SH3(C) in Frage kommenden 113 C-terminalen Aminosäuren das Grb2-SH3(C)-bindende Motiv nicht homolog sein zwischen SHIP1 und SHIP2. Ein *Alignment* zeigt, dass keines der sechs P-x-x-P-Motive noch das R-x-x-K-Motiv homolog sind, womit nicht näher eingegrenzt werden kann, wo Grb2-SH3(C) in SHIP1 bindet.

Andererseits beinhaltet das Motiv AS 1119-1125 sowohl ein P-x-x-P- als auch ein R-x-x-K-Motiv und ähnelt stark einem Motiv in Gab2, an das Grb2-SH3(C) bindet (HARKIOLAKI et al., 2009), siehe Abb. 5.1.

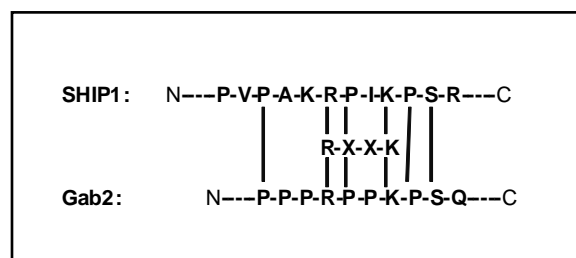


Abb. 5.1: *Alignment* der AS 1114-1125 von SHIP1 mit einer Sequenz aus Gab2, die an Grb2-SH3(C) bindet.

5.6 Proliferation von Jurkat-SHIP1-Klonen

SHIP1 hemmt die Proliferation in Jurkat-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (HORN et al., 2004; LIOUBIN et al., 1996; LUO et al., 2003; MALBEC et al., 2001; METZNER et al., 2007; METZNER et al., 2009), insbesondere auch bei Überexpression in primären AML-Zellen (METZNER et al., 2009).

Für WT-SHIP1 und die SHIP1-Mutante R225W wurde in dieser Arbeit mit der Methode des Vergleichs des BrdU-Einbaus (ein Thymidin-Analogon) in die DNA zwischen durch Doxycyclin-induziert SHIP1-exprimierenden Jurkat-Zellen und uninduzierten ein proliferationshemmender Effekt nachgewiesen, der mit der 5-Phosphatase-inaktiven Mutante D672A nicht zu beobachten war. Diese Klone waren gut induzierbar und kaum *leaky* in ihrer SHIP1-Expression.

Da viele Klone *leaky* in ihrer SHIP1-Expression waren oder SHIP1 sogar konstitutiv exprimierten, war eine solche Durchführung, in der für jeden Klon einzeln der Proliferationsunterschied zwischen –Dox und +Dox, entsprechend –SHIP1 und +SHIP1, bestimmt wird und die erhaltenen Werte anschließend miteinander verglichen werden, nicht möglich.

Stattdessen wurde versucht, die SHIP1-vermittelten Effekte durch SHIP1-WT und -Mutanten jeweils durch Vergleich der per Neubauer-Zählkammer ermittelten Proliferation der Klone mit Doxycyclin im Medium zum Vektorklon mit Doxycyclin darzustellen. Vielleicht ist die Proliferationsmessung durch Vergleich aller SHIP1-Mutanten-Klone mit dem Vektorklon so nicht durchführbar, da alle Klone sind und womöglich klonal unterschiedlich proliferieren. Tatsächlich wurde dies im BrdU-Proliferations-Assay beobachtet.

In weiteren Versuchen wäre es sinnvoll, die beobachteten Effekte der SHIP1-Mutanten in Jurkat-Klonen im myeloischen Modell, präferentiell an primären AML-Zellen zu bestätigen und insbesondere auch den Effekt auf deren Proliferation zu untersuchen.

5.7 Die SHIP1-SH2-Mutante F28L

SH2-Domänen umfassen etwa 100 AS und binden an Phosphotyrosin(pY)-haltige Motive, wobei die Spezifität der SH2-Domäne von den Resten C-terminal des pY abhängt (SONGYANG et al., 1993). Das acht Aminosäurereste umfassende Motiv G(S/T)FLVR(E/D)S

stellt die minimale notwendige Einheit dar, um tyrosinphosphorylierte Sequenzen zu erkennen (HIDAKA et al., 1991). Die Mutation des Arginin im FLVR-Motiv der SH2-Domäne unterbindet die Bindung von SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste (MAYER et al., 1992).

Die Rezeptoren für IL-3, GM-CSF und IL-5 verwenden eine gemeinsame β_c -Kette (β_c), die auf Ligandenstimulation hin Tyrosin-phosphoryliert wird (Miyajimi et al. 1993) und für die Signaltransduktion über diese Rezeptoren verantwortlich ist.

Für die SHIP1-SH2-Domänen-Mutante F28L wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ihre Fähigkeit, nach IL-3- bzw. GM-CSF-Stimulation an Phosphotyrosinmotive zu binden, auf 1,5%-3,1% der von WT-SHIP1 reduziert ist, und die Fähigkeit der (Co-)Präzipitation der GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette auf 11%.

SHIP1 zeigt nach IL-3-Stimulation keine direkte Interaktion mit der β_c -Kette (LIU et al., 1999). IL-3 induziert jedoch die Tyrosinphosphorylierung und Assoziation von SHIP1 und Shc (DAMEN et al., 1996; DAMEN et al., 1998; LIU et al., 1994; LIU et al., 1999; VELAZQUEZ et al., 2000).

SHIP1 reguliert das GM-CSF-vermittelte Signaltransduktion negativ (HARDER et al., 2004; HELGASON et al., 1998; LIU et al., 1999). Der genaue Mechanismus, wie dies geschieht, ist jedoch unbekannt (RAMSHAW et al., 2007).

SHIP1 könnte mit seiner SH2-Domäne direkt an pY577 der GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette binden (DURSTIN et al., 1996; OKUDA et al., 1999) oder indirekt über Shc, das mit seiner PTB-Domäne an GM-CSF-Rezeptor- β_c bindet (BONE and WELHAM, 2000; LANFRANCONE et al., 1995; PRATT et al., 1996).

In dieser Arbeit sowie in vorangegangenen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker konnte Shc mit der WT-SHIP1-SH2-Domäne nicht präzipitiert werden. Ein Co-Immünpräzipitationsexperiment mit *full length*-SHIP1 zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der SHIP1-SH2-Mutante an Shc wäre wahrscheinlich nicht aussagekräftig gewesen, da Shc mit seiner PTB-Domäne ebenfalls an die NPXpY-Motive in SHIP1 binden soll (HUBER et al., 1999; LAMKIN et al., 1997; LIOUBIN et al., 1996; PRADHAN and COGGESHALL, 1997).

Die Ergebnisse sprechen für ein Modell, in dem SHIP1 direkt oder indirekt über ein weiteres Protein, von seiner SH2-Domäne abhängig an die GM-CSF-Rezeptor- β_c -Kette rekrutiert wird. In Frage hierfür käme SHP-2, für das eine Bindung an SHIP1-SH2 vorgeschlagen wurde (LIU et al., 1997b; SATTLER et al., 1997).

In jedem Fall führt der Verlust der direkten oder indirekten Bindung von SHIP1 an pY577 durch Mutagenese des Tyrosinrestes zu erhöhtem Überleben, erhöhter Proliferation und Koloniebildung von primären hämatopoetischen Zellen, länger anhaltender PI3K-Aktivierung und Verlust der SHIP1-PtdIns(3,4,5)P₃-5-Phosphatase-Aktivität in GM-CSF-Rezeptor-β_c-Kette-Immünpräzipitationen (RAMSHAW et al., 2007).

In myeloischen Zellen ist eine defekte SHIP1-SH2-Domäne womöglich nicht mehr in der Lage, im GM-CSF-induzierten Signalweg einen negativen regulatorischen Effekt auf die Proliferation auszuüben.

In dieser Arbeit wurde eine Reduktion der pAkt-Level durch SHIP1 F28L in Jurkat-Zellen beobachtet, die der von WT-SHIP1 entspricht.

Dagegen führte die Expression von SHIP1 F28L in K562-Zellen im Gegensatz zu WT-SHIP1 nicht zur Reduktion von weder pAkt(S473) noch pAkt(T308) (YANG et al., 2009b).

Murines SHIP1 R41G, in dem ein Arginin der SH2-Domäne mutiert wurde, das zwar nicht im FLVR-Motiv liegt, dennoch eine defekte SH2-Domäne erzeugen soll, ist, wie in dieser Arbeit gesehen, in Jurkat-Zellen weiterhin wie WT-SHIP1 in der Lage, die pAkt-Level zu reduzieren (CHARLIER et al., 2010).

Es ist nicht ausgeschlossen, dass SHIP1 in T-Zellen eine andere Funktion ausübt als in B-Zellen oder myeloischen Zellen (GLOIRE et al., 2007). Nach einem solchen Modell wird SHIP1 in T-Zellen unabhängig von seiner SH2-Domäne an die Plasmamembran rekrutiert, in myeloischen Zellen dagegen wäre diese Rekrutierung SH2-Domänen-abhängig.

5.8 Konservierung der mutierten Aminosäuren in SHIP1

Für die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen in SHIP1 wurde untersucht, wie konserviert die mutierten Aminosäuren von SHIP1 zum einen in der Familie der humanen 5-Phosphatasen, zum anderen in SHIP1-Orthologen sind, siehe Abb. 5.2 und 5.3. Es wurden nur bestätigte (*reviewed*) Sequenzen aus der *Universal Protein Resource*-Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) verwendet.

Für das FLVR-Motiv der SH2-Domäne, in dem der mutierte Rest F28 liegt, ist seine hohe Konservierung in SH2-Domänen bekannt, außerdem besitzen nur zwei der Inositol-5-Phosphatasen eine SH2-Domäne, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

Es zeigt sich in Abb. 5.2, dass in allen humanen 5-Phosphatasen weder V120, R156, T162, K210, R225 oder N508 noch Q1153, H1168Y noch der C-Terminus (interessant für die Mutation Q1076X) konserviert sind. An der K210 entsprechenden Position wird in dem SHIP1 nächsten Verwandten, SHIP2, sogar ein Argininrest gefunden, zu dem K210 in SHIP1 in einer AML mutiert war. Diese Reste liegen bis auf N508 außerhalb der 5-Phosphatase-Domäne und zeigen, da in deren Mutanten keine wesentlich von WT-SHIP1 abweichende 5-Phosphataseaktivität festgestellt wurde, dass sie offensichtlich keine Funktion in der enzymatischen Katalyse einnehmen. P1039 und P1042 sind zumindest in SHIP2 konserviert. Deren Mutanten zeigten ebenfalls keine von WT-SHIP1 abweichende 5-Phosphataseaktivität, jedoch könnten diese Reste eine Rolle in einer bei den Paralogen SHIP1 und SHIP2 erhaltenen Interaktion spielen. Die Konservierung könnte aber auch zufällig sein.

Der Aspartatrest D672 dagegen ist bei allen zehn humanen 5-Phosphatasen konserviert. Seine Bedeutung für das aktive Zentrum der 5-Phosphatasen ist strukturell belegt (WHISSTOCK et al., 2002). Auch Tyrosin Y643 ist hochkonserviert, es ist in neun der zehn humanen 5-Phosphatasen an der entsprechenden Position vorhanden. In PIPP befindet sich an dieser Position ein Phenylalaninrest, ein strukturell konservativer Austausch, der darauf hindeutet, dass er keinen Einfluss auf die Proteinstabilität hat und die Hydroxylgruppe des Tyrosins keine essentielle Wasserstoffbrücke ausbildet, sondern die Hydrophobizität des aromatischen Ringes hier von Bedeutung ist. Laut Whisstock et al. (WHISSTOCK et al., 2002) ist Y643 und damit die Hydroxylgruppe des Tyrosins auch nicht direkt an der Katalyse der Phosphoesterhydrolyse beteiligt. Sofern das Phenylalanin in PIPP das Tyrosin ersetzt, ist auch eine Phosphorylierung dieses Restes unwahrscheinlich und wurde bislang auch nicht gezeigt. V684, deren Mutante V684E laut Luo et al. (LUO et al., 2003) nur noch eine Restaktivität von ca. 18% besitzt, in dieser Arbeit dagegen eine von WT-SHIP1 nicht signifikant unterschiedliche 5-Phosphataseaktivität zeigte, ist in drei der zehn humanen Inositol-5-Phosphatasen konserviert, neben SHIP1 in OCRL und PIPP. In SHIP2, 5-Phosphatase II und 72 kD 5-Phosphatase IV liegt an dieser Position ein Isoleucin, in SKIP ein Leucin vor und ist somit konservativ substituiert (FRENCH and ROBSON, 1983). In drei von zehn 5-Phosphatasen ist V684 nicht-konservativ substituiert. V684 ist Bestandteil des zweiten der beiden konservierten Inositol-5-Phosphatase-Motive (ODAI et al., 1997) oder auch nicht (JEFFERSON and MAJERUS, 1995; MAJERUS et al., 1999; WARE et al., 1996).

	120	156	162	210	225	508
SHIP1	DTESVVSPEL	ATETSRPSELSETLFQRL		LPHLKKLTTLLCKELYGEVIRTLPSL		HICTDNVKTGI
SHIP2	ASDGEDEKPP	APETPTAPAAESAPNGL		LPHLTRTLATSCRRHSEVDKVL SGL		HVSTSSVKTGI
OCRL	SNS-----G	-----ERRFEIP		QS-----QLLVEPEQKSSSWYQKL		DIATETVGTGI
Synaptojanin 1	AAHKQAKACLI	FVETEQVVYLLDSSVSSF		DRHFRTLKKNLYGKQIIIVNLLGSKEGE		DVAVDTVKTGM
Synaptojanin 2	ASHKQAKACLV	FVETEQMIYMDGVSFF		DRHMVLLKEQYQQVNVNLLGSRGGE		DVAIDTVKTGM
5-Phosphatase I	-----	-----		RARVYLDENYKQEHFTALGSFYFLH		NLVAWETSPSV
5-Phosphatase II	ELSLVFQLPFG	FLWLSRYRCAELELEMP		PSRKKRWGLEEARPQGAGSVLFWGGA		EVEAETVGTGI
72kd 5-Phosphatase IV	QSEGGAPAH	SPSSGGNPLSGVASSP		LPSLLPPRPPALSLDIASDLRTAN		EVECESTVTRI
PIPP	SAGPKPPATT	LGPNLAPTSRDQKQEP		PPPELSTPSPVSPVLSPTQEQALAP		DVQTDCTRITGL
SKIP	-----	-----		-----		ILSTKSTPTGL
	643		672			684
SHIP1	TFAPTYRFERLTRDKYAYTKQKATGMKYNLPSWCDRVLWKS		Y-----			PLVHVVCQSY
SHIP2	SFPPTYRYERGSRDYAWHKQKPTGVRTNVPWCDRILWKS		Y-----			PETHIICNSY
OCRL	KFIPTYKYDSKT-----	DRWDSGKCRVPAWCDRILWRGT-----				NVNQLNY
Synaptojanin 1	TFAPTYKYDLFS-----	DDYDTSEKCRTPAWTDRVLWRRRKPWDRSAEDLDLLNASFQDESKILYTWTPGTL				LLH
Synaptojanin 2	NFGPTYKYDVGS-----	AAYDTSKCRTPAWTDRVLWRRRKHFPDKTAGELNLLDSDLVDVTKVRHTWSPGALQY				
5-Phosphatase I	SFPPSYPYSEDAR-----	QGEQYMNTRCPAWCDRILMSPS-----				AKELVL
5-Phosphatase II	TFQPTYKYDTGS-----	DDWDTSEKCRAPAWCDRILWKGK-----				NITQLSY
72kd 5-Phosphatase IV	HFLPSYKFDIGK-----	DTYDTSKQRTFSTYDRVLYRSR-----				HKGDICPVSY
PIPP	NFAPTFKFDVGT-----	NKYDTSAKRRKPAWTDRIWLVKVA-----				PGGGPSPSGRKSRLQVQTQHSY
SKIP	LFPPTYKFDKRN-----	NDYDTSKRRKPAWTDRIWLVKVA-----				PCAGPDTPIPPASHFSLSLRQY
	1039	1042	1076	1153	1168	
SHIP1	KDQESPKMPRKEPP		EGPGKQVPAPR	AVLHLQHSGRDRDNTLPHHG---		
SHIP2	AEARGPPPKAHP		CSVLQMAKTL	AIGLERVEEGLVHNGWDDLEFLSDIT		
OCRL	-----FSEYNSV		TPSDRQRAIQF	-----		
Synaptojanin 1	TPPQPPRPRSSHS		LKIDPFEDLS-	PFSDRTAAPGNPFRAKSESEATSWF		
Synaptojanin 2	AIKKPTLR-RTGKP		VEAPPVVTAPR	SQLLOGLTYNSSDPSGHPPAAGTVF		
5-Phosphatase I	-----		-----	-----		
5-Phosphatase II	-----NSAKNHL		DMTEKKKAQEF	-----		
72kd 5-Phosphatase IV	-----		-----	-----		
PIPP	-----PGGGGSW		GGLGP-----	-----		
SKIP	-----		-----	-----		

Abb. 5.2: Konservierung der in dieser Arbeit untersuchten mutierten SHIP1-Aminosäuren in der Familie der humanen Inositol-5-Phosphatasen. Dargestellt ist ein mit dem Programm ClustalW durchgeführtes multiples *Alignment* der Sequenzen mit den *Universal Protein Resource Knowledgebase (UniprotKB) identifiers* Q92835-2 (SHIP1 delV117), O15357-1 (SHIP2), Q01968-1 (OCRL), O43426-1 (Synaptojanin 1), O15056-1 (Synaptojanin 2), Q14642-1 (5-Phosphatase I), P32019-1 (5-Phosphatase II), Q9NRR6-1 (72kd 5-Phosphatase IV), Q15735-1 (PIPP), Q9BT40-1 (SKIP). Die Positionen der den in humanem SHIP1 mutierten entsprechenden Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Unter den SHIP1-Proteinen in vier verschiedenen Spezies, siehe Abb. 5.3, sind in der Domäne zwischen SH2- und Inositol-5-Phosphatase-Domäne die Aminosäuren T162, K210 und R225 konserviert, V120M nicht und R156 in Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*mus musculus*) und Ratte (*Rattus norvegicus*), nicht jedoch im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*).

In der 5-Phosphatase-Domäne sind Y643 und D672 in allen vier Spezies erhalten, N508 kommt in drei von vier Spezies vor, ebenso V684, an letzterer Position liegt im Krallenfrosch jedoch ein konservativer Austausch mit Isoleucin vor. Im C-Terminus sind P1039, Q1076, Q1153 und H1168 unter Mensch, Maus und Ratte konserviert (dem SHIP1 des Krallenfroschs fehlt der C-Terminus), P1042 dagegen nicht. Dies spricht neben dem von WT-SHIP1 sich

nicht unterscheidenden Phänotyp der Mutante P1042L dafür, dass in einem möglichen Bindungsmotiv in dieser Region P1042 nicht erforderlich ist.

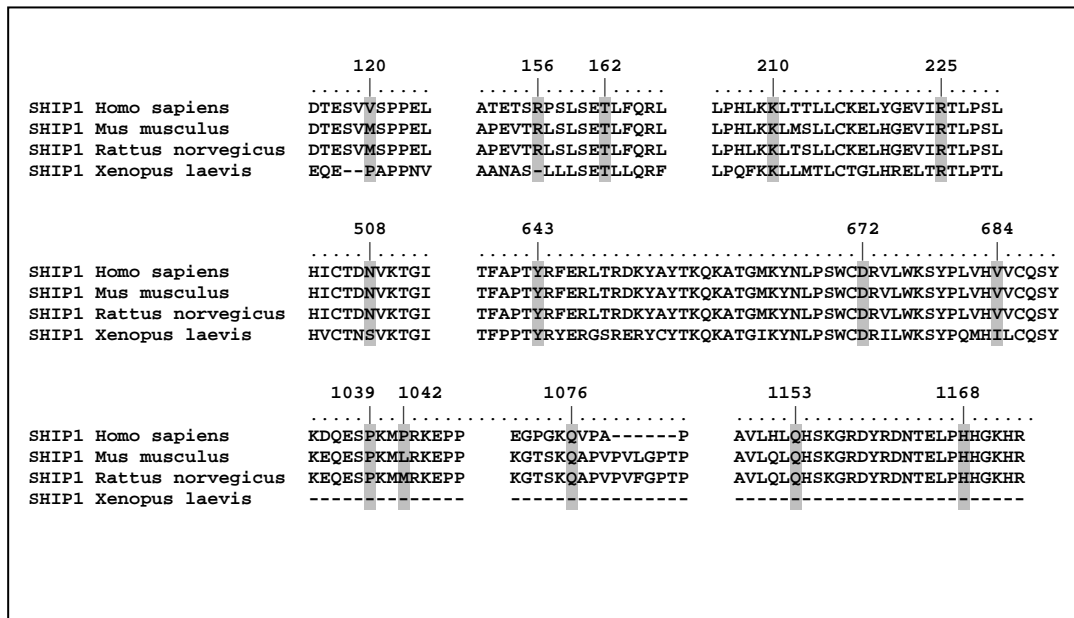


Abb. 5.3: Konservierung der in dieser Arbeit untersuchten mutierten SHIP1-Aminosäuren in SHIP1 verschiedener Spezies. Dargestellt ist ein mit dem Programm ClustalW durchgeführtes multiples *Alignment* der Sequenzen mit den *Protein Knowledgebase (UniprotKB) identifiers* Q92835-2 (SHIP1 delV117 *Homo sapiens*), Q9ES52-2 (SHIP1 delV120 *Mus musculus*), P97573-1 (SHIP1 *Rattus norvegicus*), Q6P4S2-1 (SHIP1 *Xenopus laevis*). Es wurden nur bestätigte Sequenzen verwendet. Die Positionen der den in humanem SHIP1 mutierten entsprechenden Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Insgesamt zeigt sich anhand der Konservierung, dass für keinen der mutierten Reste zwangsläufig ein Einfluss auf die 5-Phosphataseaktivität von SHIP1 erwartet worden wäre, mit Ausnahme von Y643H und D672A, die hochkonserviert sind. Für D672A war eine Beeinträchtigung der 5-Phosphataseaktivität bereits bekannt. Die Mutante konnte deshalb als Kontrolle verwendet werden. Für Y643H wurde in dieser Arbeit eine reduzierte 5-Phosphataseaktivität nachgewiesen.

Was die übrigen mutierten Reste betrifft, ist aufgrund der Konservierung eine bedeutende Funktion für die Strukturstabilität oder für intermolekulare Wechselwirkungen für V120, R156 und P1042 unwahrscheinlich und es wurde auch kein von WT-SHIP1 veränderter Phänotyp beobachtet.

5.9 Tyrosinphosphorylierung von SHIP1

SHIP1 wird auf TCR-Stimulation hin tyrosinphosphoryliert (LAMKIN et al., 1997). In Mastzellen wurde gezeigt, dass der C-Terminus von SHIP1 für die Tyrosinphosphorylierung erforderlich ist (DAMEN et al., 2001). Deshalb wurden WT-SHIP1, SHIP1 P1039S, P1042L, Q1076X, Q1153L, aber auch die SH2-Domänen-Mutante F28L auf ihre Tyrosinphosphorylierung in Jurkat Tet-On-Klonen vor und nach TCR(CD3)-Stimulation sowie bei Kultur in 10% FCS-haltigem Medium untersucht.

Obwohl in der Untersuchung der Gesamt-SHIP1-Tyrosinphosphorylierung in SHIP1-Immunpräzipitaten bei den Mutanten F28L und Q1076X keine Tyrosinphosphorylierung weder in 10% FCS noch nach TCR-Stimulation erkannt wurde, wurde mit einem Antikörper, der spezifisch die Sequenz um phosphoryliertes Y1021 in humanem SHIP1 bindet, in Gesamtzelllysaten aller untersuchter SHIP1-Mutanten eine Tyrosinphosphorylierung bei Kultivierung in 10% FCS detektiert, die dem Expressionslevel von SHIP1 jeweils entsprach.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Bedeutung der SH2-Domäne für die Tyrosinphosphorylierung. Stimulation von mit Erythropoetin-Rezeptor und SHIP1 co-transfizierten HEK293T-Zellen mit Epo ergab, dass murines WT-SHIP1 tyrosinphosphoryliert wird, nicht aber SHIP1 mit der Mutation R34Q, die eine defekte SH2-Domäne hervorbringt (MASON et al., 2000). In mit murinem SHIP1 und Lck co-transfizierten COS-7-Zellen werden SHIP1 R34Q und SHIP1, in dem die SH2-Domäne deletiert ist, noch tyrosinphosphoryliert (LAMKIN et al., 1997).

In Erythropoetin-Rezeptor-exprimierenden DA-ER-Zellen werden murines SHIP1 R34G oder SHIP1, in dem die SH2-Domäne deletiert ist, anders als WT-SHIP1 nicht tyrosinphosphoryliert (LIU et al., 1997a).

Die Tyrosinphosphorylierung von SHIP1, insbesondere der Tyrosine in den beiden NPXY-Motiven ist von daher von Bedeutung, als sie Voraussetzung für eine Interaktion mit den PTB-Domänen von Shc oder den Dok-Proteinen ist.

5.10 Einfluss von SHIP1 auf die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Calcium-Signaltransduktion in Jurkat T-Lymphozyten

Anders als vielleicht erwartet, hemmt WT-SHIP1 das Calciumsignal nach TCR-Stimulation mit dem anti-CD3-Antikörper OKT3 nicht, es ist sogar ein Anstieg im Calcium-*Peak* zu verzeichnen verglichen mit der Vektorkontrolle. Ein solcher Effekt war in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker zuvor bereits beobachtet worden.

Vom Modell würde erwartet, dass SHIP1 zum einen über den Abbau von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, zum anderen über den Abbau von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ die Rekrutierung und Aktivierung von $\text{PLC}\gamma 1$ und Itk inhibiert, ähnlich wie die der $\text{PLC}\gamma 2$ und von Btk in B-Lymphozyten.

Ausgehend von der Beobachtung, dass SHIP1 in B-Zellen das Calcium-Signal nur inhibieren kann, wenn der BCR mit dem $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ kreuzvernetzt wird, nicht aber, wenn nur der BCR coligiert wird (AMAN et al., 2000; ONO et al., 1997), könnte erwartet werden, dass es sich mit dem TCR in T-Zellen genauso verhält und die beobachteten Effekte rein klonalen und nicht SHIP1-spezifischen Ursprungs sind. In der murinen T-Zelllinie 2B4, die endogenen $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ exprimiert (DAERON et al., 1995), kommt es ebenfalls bei reiner TCR-Kreuzvernetzung zu einem Calciumsignal, das erst inhibiert wird, wenn TCR und $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ kreuzvernetzt werden (JENSEN et al., 2001). Welche Rolle der $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ in T-Zellen spielt, ist jedoch unklar.

In SHIP1-deletierten primären T-Zellen werden keine Unterschiede in den Phosphorylierungsleveln von ERK, Akt, ZAP-70 oder $\text{PLC}\gamma 1$ sowie im Calciumflux auf polyklonale Aktivierung mit anti-CD3 hin im Vergleich zu SHIP1-exprimierenden T-Zellen und keine Unterschiede in Akt- und GSK-Phosphorylierung bei CD28-Stimulation allein gesehen (TARASENKO et al., 2007). Auch diese Befunde sprechen dafür, dass auch in T-Zellen möglicherweise erst ein inhibitorischer Rezeptor engagiert werden muss, damit SHIP1 seine hemmende Rolle entfalten kann. Ein Beispiel für einen inhibitorischen Rezeptor in T-Zellen, für den aber bislang keine Interaktion mit SHIP1 beschrieben ist, wäre CTLA-4. CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor für das costimulatorische Molekül B7 und inhibiert die T-Zell-Aktivierung. Engagemet von CTLA-4 blockiert die normale Phosphorylierung von den TCR-assoziierten ζ -Ketten, möglicherweise über die Rekrutierung einer Phosphatase an den TCR-Komplex. Ob eine T-Zelle CD28 oder CTLA-4 benutzt, um B7 auf APCs zu binden, ist eine Schlüsseldeterminante für das Ergebnis der Antigenerkennung, aber wie die Wahl getroffen wird, ist unbekannt. CTLA-4 bindet B7.1 und B7.2 mit ~50fach höherer Affinität als CD28, und eine Möglichkeit ist, dass APCs mit geringer B7-Expression präferentiell CTLA-4

binden. Normale ruhende APCs, die womöglich Selbst-Antigene präsentieren, aber wenige B7-Moleküle exprimieren, engagieren CTLA-4 und induzieren Toleranz in selbstreaktiven T-Zellen. Infektionen führen zur Hochregulation der B7-Expression, was dann zum CD28-Engagement und T-Zellaktivierung führt. Auch ist bekannt, dass naive T-Zellen CD28 exprimieren, die CTLA-4-Expression jedoch erfordert T-Zellaktivierung. Deshalb könnten naive T-Zellen CD28 benutzen, um Antworten zu initiieren, aber zu späterer Zeit, wenn mehr CTLA-4 exprimiert wird, könnte dessen Bindung an B7 die Funktion haben, die T-Zellantwort zu terminieren (ABBAS and LICHTMAN, 2005).

5.11 Oberflächenplasmonresonanz

Es konnte keine Interaktion der SHIP1-SH2-Domäne weder mit tyrosinphosphorylierten Proteinen aus dem Lysat von mit GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen noch mit dem Phosphoprotein LFDDPSpYVNVQN festgestellt werden, das den Aminosäuren 311-322 des humanen p52^{Shc1} entspricht, welches mit SHIP1 interagiert.

Es war für die murine SHIP1-SH2-Domäne eine Bindung an das Peptid RRASVSpYVNVQN, deren C-terminale sieben Aminosäuren humanem Shc1 (AS 316-322) entsprechen, mit $K_D = 290 \pm 130$ nM gezeigt worden (LIU et al., 1997a). Dabei ist nicht klar, woher die N-terminalen fünf Aminosäuren stammen, da diese 12-Aminosäuren-Sequenz in keiner der murinen oder humanen Shc-Isoformen noch mit dem Programm BLAST in irgendeinem Protein zu 100% identisch gefunden wurden. Für die SHIP1-SH2-Domäne (Spezies unklar) war eine Bindung an das Peptid ELFDDPSpYVNVQNL, das in seiner gesamten Sequenz humanem Shc1 entspricht (AS 310-323 von p52^{Shc1}) mit $K_D = 145$ nM bestimmt worden (KONCZ et al., 2001).

Die Konzentration an tyrosinphosphorylierten Proteinen und davon an denen, die spezifisch an die SHIP1-SH2-Domäne binden, könnte im Proteinlysate der Zellen zu gering gewesen sein. Bei der Messung der Interaktion mit dem Phosphopeptid könnte ein methodisches Problem vorgelegen haben: Das zu erwartende Messsignal in *response units* (RU_{exp}) ist proportional zum Quotienten aus dem Molekulargewicht des Analyten (hier: Phosphopeptid) und dem des immobilisierten Liganden (hier: GST-SHIP1-SH2 an anti-GST-Antikörper, laut:

$$RU_{\text{exp}} = \frac{\text{MW (Analyt)} \cdot \text{RU des immobilisierten Liganden} \cdot \text{Aktivität} \cdot \text{Anzahl der Ligandenbindungsstellen}}{\text{MW (immobilisierter Ligand)}}$$

(KARLSSON et al., 1997). Mit einem Molekulargewicht des Phosphopeptids von etwa 1,5 kD und dem des Liganden von 38 kD, einer Bindungsstelle und einer Aktivität von beispielsweise 0,4 (wie im Beispiel von Karlsson et al. (KARLSSON et al., 1997) angenommen) sowie den beobachteten 700 RU des immobilisierten Liganden ergeben sich ohne den Molekulargewichtsquotienten zu erwartende RU von 280, die durch den Molekulargewichtsquotienten auf 11 RU reduziert werden. Wird außerdem berücksichtigt, dass die GST-SHIP1-SH2-Domäne an einen Antikörper von zusätzlichen 150 kD gebunden ist, der zudem zwei GST-SH2-Domänen bindet, sich dafür die Anzahl der Ligandenbindungsstellen zwar auf zwei erhöht, werden die zu erwartenden RU jedoch nochmals auf 4 RU reduziert, was letztendlich womöglich nicht mehr sichtbar war.

Bei Liu et al. (LIU et al., 1997a) und Koncz et al. (KONCZ et al., 2001) waren jeweils die Peptide an die Oberfläche gekoppelt und die SH2-Domänen fungierten als Analyten. In diesem umgekehrten Ansatz sind die RU des immobilisierten Liganden zwar klein, der Kehrwert des Quotienten der Molekulargewichte verstärkt in diesem Fall aber das Signal.

5.12 Bedeutung von SHIP1-Mutationen für die Leukämogenese

SHIP1^{-/-}-Mäuse (HELGASON et al., 1998) oder Mäuse mit auf die Granulozyten/Makrophagen-Linie beschränkter, konditionaler SHIP1-Deletion entwickeln eine myeloproliferative Pathologie, die ihre Lebenszeit reduziert (LEUNG et al., 2009) und in denen der PI3K-Akt-Signalweg aktiviert ist (LIU et al., 1999), so wie in 50-70% der akuten myeloischen Leukämien des Menschen (MARTELLI et al., 2006).

Die SHIP1-Expression ist in Zellen chronischer myeloischer Leukämie herunterreguliert (MARTINO et al., 2001; SATTLER et al., 1999). Außerdem wird die SHIP1-Expression durch miR-155 herunterreguliert, deren Expression in einigen akuten myeloischen Leukämien erhöht ist (CAMMARATA et al., 2010; GARZON et al., 2008; O'CONNELL et al., 2008).

Reexpression von SHIP1 in Jurkat-Zellen (HORN et al., 2004) oder in der CML-Linie K562 (LUO et al., 2003) sowie die SHIP1-Überexpression in primären AML-Zellen (METZNER et al., 2009) führt zu verringerter PI3K-Akt-Signaltransduktion und verringerter Proliferation.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass eine quantitative SHIP1-mRNA-Analyse in 285 AML-Proben zu dem Ergebnis kam, dass SHIP1 in primären AML-Zellen im Vergleich zu normalem Knochenmark nicht spezifisch herunterreguliert wird (GILBY et al., 2007). Auf Proteinebene wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker festgestellt, dass die SHIP1-Menge in primären AML-Zellen zwar variierte, aber nicht mit der Akt-Phosphorylierung korrelierte (METZNER et al., 2009)

Bei allen AML-Patienten, in denen eine SHIP1-Mutation gefunden wurde, lag diese heterozygot vor. Dabei muss bemerkt werden, dass SHIP1-hemizygoten Mäuse (SHIP1^{+/-}) insgesamt mehr SHIP1^{+/+}-Mäusen als SHIP1^{-/-}-Mäusen ähneln und keine Tumorsuszeptibilität zeigen (HELGASON et al., 1998). In diesem Zusammenhang wurde auf Haploinsuffizienz und *substrate trapping* bereits in 2.15 bzw. 2.13.2 eingegangen.

Abwesenheit von Haploinsuffizienz für SHIP1 würde für einen SHIP1-Funktionsverlust bei Heterozygotie eine dominant-negative Funktion des mutierten SHIP1-Proteins voraussetzen.

Im Falle des *substrate trapping* schützt die katalytisch inaktive Phosphatase ihr Substrat, indem sie daran bindet, es aber nicht umsetzen kann und es somit anreichert. Bei einem AML-Patienten mit der Mutation V684E in der Inositol-5-Phosphatase-Domäne wurden trotz Heterozygotie, d.h. ein gesundes Allel war vorhanden, nach IL-3-Stimulation primärer AML-Zellen erhöhte pAkt-Level im Vergleich zu AML-Zellen ohne SHIP1-Mutation festgestellt. Auch zeigte die Expression von WT-SHIP1, SHIP1 V684E und Vektorkontrolle in der CML-Zelllinie K562, die geringe Mengen an endogenem SHIP1 exprimiert, und in der monocytischen Zelllinie U937, die SHIP1 endogen exprimiert, nicht nur eine Proliferationsinhibition durch WT-SHIP1 im Vergleich zur Vektorkontrolle und einen Verlust der Proliferationsinhibitionsfähigkeit von SHIP1 V684E, sondern sogar noch einen proliferationssteigernden Effekt durch SHIP1 V684E im Vergleich zur Vektorkontrolle. Diese Beobachtungen wurden auf *substrate trapping* als möglichen Mechanismus zurückgeführt (LUO et al., 2003). Ein solcher Mechanismus könnte für die 5-Phosphatase-inaktive Mutante Y643H ebenfalls vorliegen. Für die Mutationen F28L, P1039S und der bei ALL gefundenen Q1076X ließe sich ein möglicher Effekt so nicht erklären. Hier würde eine dominant-negative Funktion von SHIP1 (im Sinne von p53) eine Di- oder Multimerisierung voraussetzen.

In der Tat zeigte die Michaelis-Menten-Auftragung des SHIP1-Umsatzes von Ins(1,3,4,5)P₄ einen sigmoidalen Verlauf (ONG et al., 2007), ein Indiz für Kooperativität und somit Multimerisierung. Eine ebensolche Beobachtung wurde bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Jücker für die SHIP1-katalysierte Hydrolyse von Ins(1,3,4,5)P₄ gemacht. Die in

dieser Arbeit erstellte Michaelis-Menten-Kinetik für das Substrat PtdIns(3,4,5)P₃-diC8 deutet ebenfalls Kooperativität an und lässt womöglich darauf schließen, dass SHIP1 als Dimer in der Zelle vorliegt.

In einer kürzlich veröffentlichten Dissertation (KAKADIYA, 2009) wurde SHIP1 als Fusionsprotein mit Abl 1 in einer Patientin mit B-ALL entdeckt. Das Fusionsprotein umfasst N-terminal die Aminosäuren 1-343 von SHIP1 und C-terminal die Aminosäuren 28-1446 von Abl 1a oder 47-1446 von Abl 1b. Da eine konstitutive Aktivierung in Abl 1-Fusionsproteinen eine Dimerisierung über den jeweiligen nicht-Abl 1-Anteil zur Ursache hat, wurde eine Di- oder Oligomerisierung dieser Region von SHIP1 untersucht und der Bereich C-terminal der SH2-Domäne willkürlich in zwei Domänen (D1: Aminosäuren 100-260, D2: Aminosäuren 260-340 von SHIP1) aufgeteilt. Dabei wurde eine Interaktion von D1 mit D2 festgestellt, jedoch keine Interaktion der gesamten Region 1-343 mit sich selbst. Eine Dimerisierungsdomäne in dieser Region von SHIP1 könnte einen dominant-negativen Effekt der übrigen Mutanten eventuell erklären. Womöglich bilden D1 und D2 jedoch eine intramolekulare Wechselwirkung aus, sodass D1 und D2 im volle-Länge-SHIP1 und in der Region 1-343 verborgen, im SHIP1-Abl 1-Fusionprotein jedoch zugänglich sind.

Eine weitere Möglichkeit, wie es trotz Heterozygotie für das mutierte SHIP1-Allel zu einem Funktionsverlust des nicht-mutierten Allels kommen kann, ist die monoallele oder Allelspezifische Genexpression (PALACIOS et al., 2009; ZAKHAROVA et al., 2009). Während die Mehrheit der autosomalen Säugergene in äquivalenten Mengen vom paternalen und maternalen Allel transkribiert wird, wird eine Anzahl von Genen vornehmlich von einem der Allele transkribiert. Grund hierfür können SNPs in regulatorischen Elementen sein. Für die Mengen an Transkripten von mutiertem im Vergleich zu nicht-mutiertem SHIP1 in den AML-Zellen liegen keine Daten vor.

In Mäusen, die hemizygot für die PtdIns(3,4,5)P₃-3-Phosphatase PTEN sind, verstärkt die zusätzliche Hemizygotie von SHIP1 (PTEN^{+/-}SHIP1^{+/-}) einen lymphoproliferativen und autoimmunen Phänotyp, der mit erhöhten pAkt-Leveln einhergeht (MOODY et al., 2003).

Die funktionelle Inaktivierung von SHIP1 ist somit womöglich kein primäres transformierendes Ereignis, mag aber die Tumorprogression fördern, indem es Zellen im Sinne eines Mutatorphänotyps (LOEB, 1991) vor Apoptose bewahrt und ihnen erlaubt, genetische Veränderungen anzuhäufen. (LUO et al., 2003).

Von den 12 bei AML-Patienten und einer bei ALL gefundenen SHIP1-Mutationen sowie dem SNP H1168Y wurden in dieser Arbeit fünf identifiziert, die SHIP1 in seiner Inositol-5-

Phosphataseaktivität (Y643H), in seiner Bindung an tyrosinphosphorylierte Proteine (F28L), seiner Fähigkeit zur Reduktion der pAkt-Level (P1039S, Y643H, V684E) und seiner Interaktion mit der Grb2-SH3(C)-Domäne (Q1076X) beeinträchtigen und somit funktionell zumindest partiell inaktivieren. In Abb. 5.4 sind die möglichen Auswirkungen dieser Mutationen auf das SHIP1-Signalling in myeloischen Zellen dargestellt.

Für die übrigen Mutationen wurde in dieser Arbeit keine funktionelle Beeinträchtigung von SHIP1 festgestellt. Die Mutation T162P, die bei zwei AML-Patienten auftrat, und die Mutation R225W, die bei einem AML-Patienten auftrat, waren entsprechend bei zwei der Patienten auch noch vorhanden, als sie sich in Remission befanden. Von dem zweiten Patienten mit der SHIP1-Mutation T162P stand kein Remissions-Probenmaterial zur Verfügung.

Die Inhibition des PI3K-Akt-Signalwegs wäre das Ziel für die 50-70% der AML, in denen er konstitutiv aktiviert ist. Ein Behandlungsansatz ist die Anwendung von spezifischen Inhibitoren dieser Kinasen. Ein eleganter, alternativer Ansatz ist die allosterische Aktivierung von SHIP1, das nur in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, durch das Pelorol-Analogon AQX-MN100, für das gezeigt wurde, dass es spezifisch SHIP1 und nicht sein ubiquitär exprimiertes Homolog SHIP2 aktiviert (ONG et al., 2007). AQX-MN100 soll an eine C2-Domäne, die die Aminosäuren 725-863 in SHIP1 umfassen soll, binden. AQX-MN100 hemmt den PI3K-Akt-Signalweg in Zelllinien des multiplen Myeloms, nicht aber von Brust- oder Prostatakarzinom, und inhibiert damit Proliferation und fördert Apoptose (KENNAH et al., 2009).

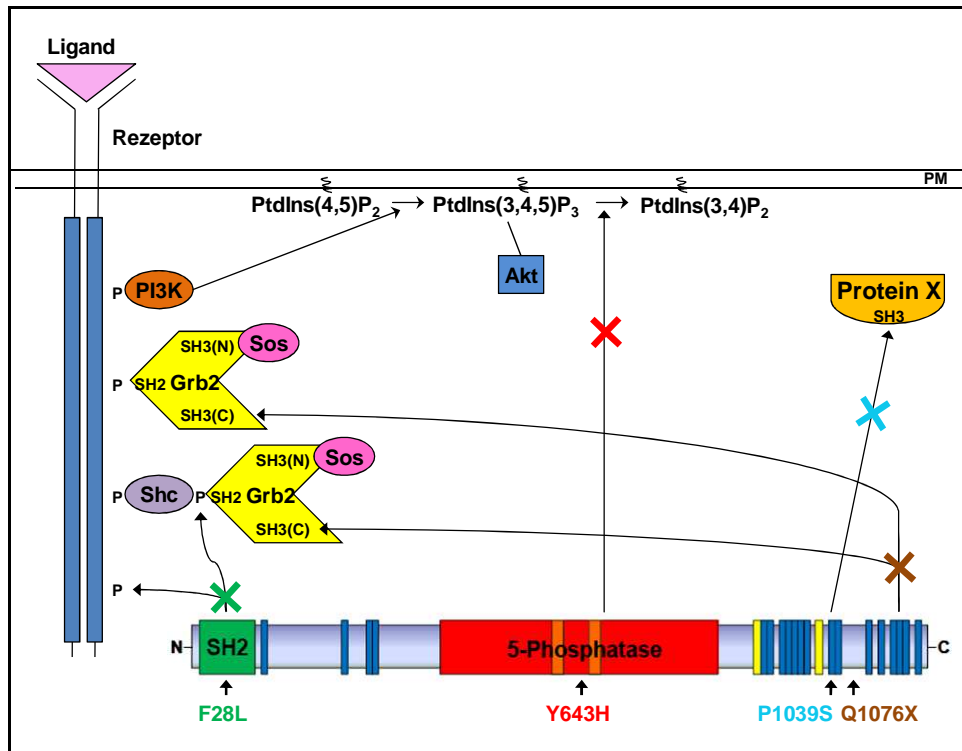


Abb. 5.4: Modell zur möglichen Funktion von SHIP1-Mutationen von Leukämiepatienten auf die Signaltransduktion in myeloischen Zellen. Die Mutation F28L in der SHIP1-SH2-Domäne verhindert die Bindung an tyrosinphosphorylierte Proteinmotive, z.B: pY577 im GM-CSF-Rezeptor oder pY317 in Shc, das wiederum mit seiner SH2-Domäne oder seiner PTB-Domäne an aktivierte Rezeptoren binden kann, und somit die Translokation von SHIP1 zu seinem Substrat PtdIns(3,4,5)P₃ an der Cytoplasmamembran. Die Mutation Y643H in der 5-Phosphatasedomäne führt zu einem SHIP1-Protein mit drastisch reduzierter 5-Phosphataseaktivität. Wenngleich es weiterhin zu seinem Substrat transloziert wird, kann es PtdIns(3,4,5)P₃ nicht hydrolysieren. Die Mutation P1039S könnte die Interaktion von SHIP1 mit der SH3-Domäne eines bislang unbekanntes Proteins (Protein X) zerstören und damit die Rekrutierung zur Plasmamembran (PM) verhindern. Dies würde erklären, warum die SHIP1-Mutante P1039S die Phosphorylierung von Akt nicht mehr reduzieren kann. Die Mutation Q1076X führt zu einem C-terminal um 113 Aminosäuren verkürzten SHIP1-Protein, dem das Bindungsmotiv für Grb2-SH3(C) fehlt und das deshalb nicht mehr rekrutiert werden und an der Plasmamembran enzymatisch aktiv sein kann.

6 Literatur

ABBAS, A.K., and LICHTMAN, A.H. (2005). Cellular and Molecular Immunology, Fifth, Updated edn (Philadelphia, Elsevier Saunders).

ABRAMSON, J., and PECHT, I. (2002). Clustering the mast cell function-associated antigen (MAFA) leads to tyrosine phosphorylation of p62Dok and SHIP and affects RBL-2H3 cell cycle. *Immunol Lett* 82, 23-28.

AGGERHOLM, A., GRONBAEK, K., GULDBERG, P., and HOKLAND, P. (2000). Mutational analysis of the tumour suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders. *Eur J Haematol* 65, 109-113.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., and WALTER, P. (2008). Molecular Biology of the Cell (New York, Garland Science).

ALESSI, D.R., CAUDWELL, F.B., ANDJELKOVIC, M., HEMMINGS, B.A., and COHEN, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 399, 333-338.

ALLAVENA, P., SICA, A., GARLANDA, C., and MANTOVANI, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155-161.

ALT, J.R., CLEVELAND, J.L., HANNINK, M., and DIEHL, J.A. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14, 3102-3114.

ALVAREZ-ERRICO, D., LESSMANN, E., and RIVERA, J. (2009). Adapters in the organization of mast cell signaling. *Immunol Rev* 232, 195-217.

AMAN, M.J., LAMKIN, T.D., OKADA, H., KUROSAKI, T., and RAVICHANDRAN, K.S. (1998). The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J Biol Chem* 273, 33922-33928.

AMAN, M.J., WALK, S.F., MARCH, M.E., SU, H.P., CARVER, D.J., and RAVICHANDRAN, K.S. (2000). Essential role for the C-terminal noncatalytic region of SHIP in FcγRIIB1-mediated inhibitory signaling. *Mol Cell Biol* 20, 3576-3589.

ANDREWS, A.T. (1986). Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications (New York, Oxford University Press).

ANTIGNANO, F., IBARAKI, M., KIM, C., RUSCHMANN, J., ZHANG, A., HELGASON, C.D., and KRYSZAL, G. (2010). SHIP is required for dendritic cell maturation. *J Immunol* 184, 2805-2813.

- ARMSTRONG, S.A., MABON, M.E., SILVERMAN, L.B., LI, A., GRIBBEN, J.G., FOX, E.A., SALLAN, S.E., and KORSMEYER, S.J. (2004). FLT3 mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 3544-3546.
- ASTOUL, E., WATTON, S., and CANTRELL, D. (1999). The dynamics of protein kinase B regulation during B cell antigen receptor engagement. *J Cell Biol* 145, 1511-1520.
- ATTREE, O., OLIVOS, I.M., OKABE, I., BAILEY, L.C., NELSON, D.L., LEWIS, R.A., MCINNES, R.R., and NUSSBAUM, R.L. (1992). The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature* 358, 239-242.
- AU, W.Y., FUNG, A.T., MA, E.S., LIANG, R.H., and KWONG, Y.L. (2004). Low frequency of FLT3 gene internal tandem duplication and activating loop mutation in therapy-related acute myelocyticleukemia and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 149, 169-172.
- BACHER, U., HAFERLACH, T., SCHOCH, C., KERN, W., and SCHNITTGER, S. (2006). Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 107, 3847-3853.
- BARAN, C.P., TRIDANDAPANI, S., HELGASON, C.D., HUMPHRIES, R.K., KRYSTAL, G., and MARSH, C.B. (2003). The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J Biol Chem* 278, 38628-38636.
- BARTEL, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- BELHAM, C., WU, S., and AVRUCH, J. (1999). Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr Biol* 9, R93-96.
- BELLACOSA, A., TESTA, J.R., STAAL, S.P., and TSICHLIS, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274-277.
- BEN-DAVID, Y., GIDDENS, E.B., and BERNSTEIN, A. (1990). Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1332-1336.
- BEN-NERIAH, Y., DALEY, G.Q., MES-MASSON, A.M., WITTE, O.N., and BALTIMORE, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233, 212-214.
- BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A., GRALNICK, H.R., and SULTAN, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
- BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A., GRALNICK, H.R., and SULTAN, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103, 620-625.

- BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A., GRALNICK, H.R., and SULTAN, C. (1991). Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78, 325-329.
- BEUG, H., DAHL, R., STEINLEIN, P., MEYER, S., DEINER, E.M., and HAYMAN, M.J. (1995). In vitro growth of factor-dependent multipotential hematopoietic cells is induced by the nuclear oncoprotein v-Ski. *Oncogene* 11, 59-72.
- BEUTLER, B., and RIETSCHEL, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3, 169-176.
- BOLLAND, S., PEARSE, R.N., KUROSAKI, T., and RAVETCH, J.V. (1998). SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* 8, 509-516.
- BONE, H., and WELHAM, M.J. (2000). Shc associates with the IL-3 receptor beta subunit, SHIP and Gab2 following IL-3 stimulation. Contribution of Shc PTB and SH2 domains. *Cell Signal* 12, 183-194.
- BONNET, D., and DICK, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- BOOKER, G.W., BREEZE, A.L., DOWNING, A.K., PANAYOTOU, G., GOUT, I., WATERFIELD, M.D., and CAMPBELL, I.D. (1992). Structure of an SH2 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 358, 684-687.
- BORCHERT, G.M., LANIER, W., and DAVIDSON, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1097-1101.
- BOWTELL, D., FU, P., SIMON, M., and SENIOR, P. (1992). Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6511-6515.
- BRANDTS, C.H., SARGIN, B., RODE, M., BIERMANN, C., LINDTNER, B., SCHWABLE, J., BUERGER, H., MULLER-TIDOW, C., CHOUDHARY, C., MCMAHON, M., *et al.* (2005). Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res* 65, 9643-9650.
- BRAUWEILER, A., TAMIR, I., DAL PORTO, J., BENSCHOP, R.J., HELGASON, C.D., HUMPHRIES, R.K., FREED, J.H., and CAMBIER, J.C. (2000a). Differential regulation of B cell development, activation, and death by the src homology 2 domain-containing 5' inositol phosphatase (SHIP). *J Exp Med* 191, 1545-1554.
- BRAUWEILER, A., TAMIR, I., MARSCHNER, S., HELGASON, C.D., and CAMBIER, J.C. (2001). Partially distinct molecular mechanisms mediate inhibitory FcγRIIB signaling in resting and activated B cells. *J Immunol* 167, 204-211.
- BRAUWEILER, A.M., and CAMBIER, J.C. (2004). Autonomous SHIP-dependent FcγRIIB signaling in pre-B cells leads to inhibition of cell migration and induction of cell death. *Immunol Lett* 92, 75-81.

- BRAUWEILER, A.M., TAMIR, I., and CAMBIER, J.C. (2000b). Bilevel control of B-cell activation by the inositol 5-phosphatase SHIP. *Immunol Rev* 176, 69-74.
- BROOKES, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- BRUHNS, P., VELY, F., MALBEC, O., FRIDMAN, W.H., VIVIER, E., and DAERON, M. (2000). Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by fcgamma RIIB. *J Biol Chem* 275, 37357-37364.
- BRUYNS, C., PESESSE, X., MOREAU, C., BLERO, D., and ERNEUX, C. (1999). The two SH2-domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 are coexpressed in human T lymphocytes. *Biol Chem* 380, 969-974.
- BUDAY, L. (1999). Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422, 187-204.
- BUDAY, L., and DOWNWARD, J. (1993). Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73, 611-620.
- CAFFREY, J.J., DARDEN, T., WENK, M.R., and SHEARS, S.B. (2001). Expanding coincident signaling by PTEN through its inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 3-phosphatase activity. *FEBS Lett* 499, 6-10.
- CAI, X., HAGEDORN, C.H., and CULLEN, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
- CAMMARATA, G., AUGUGLIARO, L., SALEMI, D., AGUELI, C., LA ROSA, M., DAGNINO, L., CIVILETTO, G., MESSANA, F., MARFIA, A., BICA, M.G., *et al.* (2010). Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 85, 331-339.
- CANTLEY, L.C., and NEEL, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
- CAO, L., YU, K., BANH, C., NGUYEN, V., RITZ, A., RAPHAEL, B.J., KAWAKAMI, Y., KAWAKAMI, T., and SALOMON, A.R. (2007). Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling. *J Immunol* 179, 5864-5876.
- CARGILL, M., ALTSHULER, D., IRELAND, J., SKLAR, P., ARDLIE, K., PATIL, N., SHAW, N., LANE, C.R., LIM, E.P., KALYANARAMAN, N., *et al.* (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22, 231-238.
- CARVER, D.J., AMAN, M.J., and RAVICHANDRAN, K.S. (2000). SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood* 96, 1449-1456.
- CASADABAN, M.J., CHOU, J., and COHEN, S.N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J Bacteriol* 143, 971-980.

- CASOLARO, V., SPADARO, G., and MARONE, G. (1990). Human basophil releasability. VI. Changes in basophil releasability in patients with allergic rhinitis or bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 142, 1108-1111.
- CHACKO, G.W., TRIDANDAPANI, S., DAMEN, J.E., LIU, L., KRYSTAL, G., and COGGESHALL, K.M. (1996). Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosine phosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP. *J Immunol* 157, 2234-2238.
- CHAKRAVARTI, A. (1998). It's raining SNPs, hallelujah? *Nat Genet* 19, 216-217.
- CHANG, H.Y., RODRIGUEZ, V., NARBONI, G., BODEY, G.P., LUNA, M.A., and FREIREICH, E.J. (1976). Causes of death in adults with acute leukemia. *Medicine (Baltimore)* 55, 259-268.
- CHARDIN, P., CAMONIS, J.H., GALE, N.W., VAN AELST, L., SCHLESSINGER, J., WIGLER, M.H., and BAR-SAGI, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.
- CHARLIER, E., CONDE, C., ZHANG, J., DENEUBOURG, L., DI VALENTIN, E., RAHMOUNI, S., CHARIOT, A., AGOSTINIS, P., PANG, P.C., HASLAM, S.M., *et al.* SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. *Leukemia* 24, 821-832.
- CHARLIER, E., CONDE, C., ZHANG, J., DENEUBOURG, L., DI VALENTIN, E., RAHMOUNI, S., CHARIOT, A., AGOSTINIS, P., PANG, P.C., HASLAM, S.M., *et al.* (2010). SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. *Leukemia* 24, 821-832.
- CHENG, A.M., SAXTON, T.M., SAKAI, R., KULKARNI, S., MBAMALU, G., VOGEL, W., TORTORICE, C.G., CARDIFF, R.D., CROSS, J.C., MULLER, W.J., *et al.* (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* 95, 793-803.
- CHESON, B.D., BENNETT, J.M., KOPECKY, K.J., BUCHNER, T., WILLMAN, C.L., ESTEY, E.H., SCHIFFER, C.A., DOEHNER, H., TALLMAN, M.S., LISTER, T.A., *et al.* (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21, 4642-4649.
- CHI, Y., ZHOU, B., WANG, W.Q., CHUNG, S.K., KWON, Y.U., AHN, Y.H., CHANG, Y.T., TSUJISHITA, Y., HURLEY, J.H., and ZHANG, Z.Y. (2004). Comparative mechanistic and substrate specificity study of inositol polyphosphate 5-phosphatase *Schizosaccharomyces pombe* Synaptojanin and SHIP2. *J Biol Chem* 279, 44987-44995.
- CHOPRA, I., HAWKEY, P.M., and HINTON, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* 29, 245-277.
- CHOPRA, I., and ROBERTS, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.

- CLARK, S.G., STERN, M.J., and HORVITZ, H.R. (1992). *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344.
- CLEARY, M.L. (2009). Regulating the leukaemia stem cell. *Best Pract Res Clin Haematol* 22, 483-487.
- COGGESHALL, K.M. (1998). Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Curr Opin Immunol* 10, 306-312.
- COLLAZO, M.M., WOOD, D., PARAISO, K.H., LUND, E., ENGELMAN, R.W., LE, C.T., STAUCH, D., KOTSCH, K., and KERR, W.G. (2009). SHIP limits immunoregulatory capacity in the T-cell compartment. *Blood* 113, 2934-2944.
- COLLINS, F.S., BROOKS, L.D., and CHAKRAVARTI, A. (1998). A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8, 1229-1231.
- COLLINS, F.S., GUYER, M.S., and CHAKRAVARTI, A. (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278, 1580-1581.
- COSTINEAN, S., SANDHU, S.K., PEDERSEN, I.M., TILI, E., TROTTA, R., PERROTTI, D., CIARLARIELLO, D., NEVIANI, P., HARB, J., KAUFFMAN, L.R., *et al.* (2009). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood* 114, 1374-1382.
- COX, D., DALE, B.M., KASHIWADA, M., HELGASON, C.D., and GREENBERG, S. (2001). A regulatory role for Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) in phagocytosis mediated by Fc gamma receptors and complement receptor 3 (alpha(M)beta(2); CD11b/CD18). *J Exp Med* 193, 61-71.
- CROWLEY, M.T., HARMER, S.L., and DEFRANCO, A.L. (1996). Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages. *J Biol Chem* 271, 1145-1152.
- DAERON, M., LATOUR, S., MALBEC, O., ESPINOSA, E., PINA, P., PASMANS, S., and FRIDMAN, W.H. (1995). The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* 3, 635-646.
- DALEY, G.Q., VAN ETTEN, R.A., and BALTIMORE, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824-830.
- DAMEN, J.E., LIU, L., CUTLER, R.L., and KRYSTAL, G. (1993). Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-Kd tyrosine phosphorylated protein. *Blood* 82, 2296-2303.
- DAMEN, J.E., LIU, L., ROSTEN, P., HUMPHRIES, R.K., JEFFERSON, A.B., MAJERUS, P.W., and KRYSTAL, G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1689-1693.

- DAMEN, J.E., LIU, L., WARE, M.D., ERMOLAEVA, M., MAJERUS, P.W., and KRYSTAL, G. (1998). Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood* 92, 1199-1205.
- DAMEN, J.E., WARE, M.D., KALESNIKOFF, J., HUGHES, M.R., and KRYSTAL, G. (2001). SHIP's C-terminus is essential for its hydrolysis of PIP3 and inhibition of mast cell degranulation. *Blood* 97, 1343-1351.
- DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y., and GREENBERG, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- DATTA, S.R., KATSOV, A., HU, L., PETROS, A., FESIK, S.W., YAFFE, M.B., and GREENBERG, M.E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6, 41-51.
- DAVANLOO, P., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., and STUDIER, F.W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2035-2039.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci* 121, 404-427.
- DE KLEIN, A., VAN KESSEL, A.G., GROSVELD, G., BARTRAM, C.R., HAGEMEIJER, A., BOOTSMA, D., SPURR, N.K., HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J., and STEPHENSON, J.R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 300, 765-767.
- DEGENKOLB, J., TAKAHASHI, M., ELLESTAD, G.A., and HILLEN, W. (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 1591-1595.
- DEL PESO, L., GONZALEZ-GARCIA, M., PAGE, C., HERRERA, R., and NUNEZ, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- DENLEY, A., GYMNOPOULOS, M., KANG, S., MITCHELL, C., and VOGT, P.K. (2009). Requirement of phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate in phosphatidylinositol 3-kinase-induced oncogenic transformation. *Mol Cancer Res* 7, 1132-1138.
- DEUTER-REINHARD, M., APELL, G., POT, D., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L.T., and KAVANAUGH, W.M. (1997). SIP/SHIP inhibits *Xenopus* oocyte maturation induced by insulin and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 17, 2559-2565.
- DEXTER, T.M., GARLAND, J., SCOTT, D., SCOLNICK, E., and METCALF, D. (1980). Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J Exp Med* 152, 1036-1047.
- DI CRISTOFANO, A., PESCE, B., CORDON-CARDO, C., and PANDOLFI, P.P. (1998). Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19, 348-355.

- DIEGEL, M.L., RANKIN, B.M., BOLEN, J.B., DUBOIS, P.M., and KIENER, P.A. (1994). Cross-linking of Fc gamma receptor to surface immunoglobulin on B cells provides an inhibitory signal that closes the plasma membrane calcium channel. *J Biol Chem* 269, 11409-11416.
- DIEHL, J.A., CHENG, M., ROUSSEL, M.F., and SHERR, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.
- DIJKERS, P.F., BIRKENKAMP, K.U., LAM, E.W., THOMAS, N.S., LAMMERS, J.W., KOENDERMAN, L., and COFFER, P.J. (2002). FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 156, 531-542.
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R., and ZEIHNER, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- DOHNER, K., TOBIS, K., ULRICH, R., FROHLING, S., BENNER, A., SCHLENK, R.F., and DOHNER, H. (2002). Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20, 3254-3261.
- DONG, S., CORRE, B., FOULON, E., DUFOUR, E., VEILLETTE, A., ACUTO, O., and MICHEL, F. (2006). T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J Exp Med* 203, 2509-2518.
- DRACHMAN, J.G., GRIFFIN, J.D., and KAUSHANSKY, K. (1995). The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem* 270, 4979-4982.
- DRAYER, A.L., PESESSE, X., DE SMEDT, F., WOSCHOLSKI, R., PARKER, P., and ERNEUX, C. (1996). Cloning and expression of a human placenta inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 243-249.
- DUNANT, N.M., WISNIEWSKI, D., STRIFE, A., CLARKSON, B., and RESH, M.D. (2000). The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP1 associates with the dok1 phosphoprotein in bcr-Abl transformed cells. *Cell Signal* 12, 317-326.
- DURSTIN, M., INHORN, R.C., and GRIFFIN, J.D. (1996). Tyrosine phosphorylation of Shc is not required for proliferation or viability signaling by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in hematopoietic cell lines. *J Immunol* 157, 534-540.
- DUTCHER, J.P., SCHIFFER, C.A., and WIERNIK, P.H. (1987). Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol* 5, 1364-1372.
- EDINGER, M., HOFFMANN, P., ERMANN, J., DRAGO, K., FATHMAN, C.G., STROBER, S., and NEGRIN, R.S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 9, 1144-1150.

- EDMUNDS, C., PARRY, R.V., BURGESS, S.J., REAVES, B., and WARD, S.G. (1999). CD28 stimulates tyrosine phosphorylation, cellular redistribution and catalytic activity of the inositol lipid 5-phosphatase SHIP. *Eur J Immunol* 29, 3507-3515.
- EGAN, S.E., GIDDINGS, B.W., BROOKS, M.W., BUDAY, L., SIZELAND, A.M., and WEINBERG, R.A. (1993). Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51.
- EHNINGER, G., LINK, H., and BERDEL, W.E., eds. (2008). *Akute Myeloische Leukämie. Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose* (Köln, Deutscher Ärzteverlag).
- EIS, P.S., TAM, W., SUN, L., CHADBURN, A., LI, Z., GOMEZ, M.F., LUND, E., and DAHLBERG, J.E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3627-3632.
- ELEFANTY, A.G., HARIHARAN, I.K., and CORY, S. (1990). bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *EMBO J* 9, 1069-1078.
- ELGEMEIE, G.H. (2003). Thioguanine, mercaptopurine: their analogs and nucleosides as antimetabolites. *Curr Pharm Des* 9, 2627-2642.
- ENGELMAN, J.A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9, 550-562.
- ERICKSON, P., GAO, J., CHANG, K.S., LOOK, T., WHISENANT, E., RAIMONDI, S., LASHER, R., TRUJILLO, J., ROWLEY, J., and DRABKIN, H. (1992). Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, runt. *Blood* 80, 1825-1831.
- ERNEUX, C., GOVAERTS, C., COMMUNI, D., and PESESSE, X. (1998). The diversity and possible functions of the inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1436, 185-199.
- EULALIO, A., HUNTZINGER, E., and IZAURRALDE, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.
- FALINI, B., BOLLI, N., SHAN, J., MARTELLI, M.P., LISO, A., PUCCIARINI, A., BIGERNA, B., PASQUALUCCI, L., MANNUCCI, R., ROSATI, R., *et al.* (2006). Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 107, 4514-4523.
- FALINI, B., MECUCCI, C., TIACCI, E., ALCALAY, M., ROSATI, R., PASQUALUCCI, L., LA STARZA, R., DIVERIO, D., COLOMBO, E., SANTUCCI, A., *et al.* (2005). Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352, 254-266.
- FANTUS, I.G., KADOTA, S., DERAGON, G., FOSTER, B., and POSNER, B.I. (1989). Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* 28, 8864-8871.

- FELLER, S.M., REN, R., HANAFUSA, H., and BALTIMORE, D. (1994). SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem Sci* 19, 453-458.
- FESKE, S., GWACK, Y., PRAKRIYA, M., SRIKANTH, S., PUPPEL, S.H., TANASA, B., HOGAN, P.G., LEWIS, R.S., DALY, M., and RAO, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S.N., and SONENBERG, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114.
- FIXMAN, E.D., HOLGADO-MADRUGA, M., NGUYEN, L., KAMIKURA, D.M., FOURNIER, T.M., WONG, A.J., and PARK, M. (1997). Efficient cellular transformation by the Met oncoprotein requires a functional Grb2 binding site and correlates with phosphorylation of the Grb2-associated proteins, Cbl and Gab1. *J Biol Chem* 272, 20167-20172.
- FOX, J.A., UNG, K., TANLIMCO, S.G., and JIRIK, F.R. (2002). Disruption of a single Pten allele augments the chemotactic response of B lymphocytes to stromal cell-derived factor-1. *J Immunol* 169, 49-54.
- FRANKE, T.F., KAPLAN, D.R., CANTLEY, L.C., and TOKER, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.
- FRECH, M., ANDJELKOVIC, M., INGLEBY, E., REDDY, K.K., FALCK, J.R., and HEMMINGS, B.A. (1997). High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 272, 8474-8481.
- FREEBURN, R.W., WRIGHT, K.L., BURGESS, S.J., ASTOUL, E., CANTRELL, D.A., and WARD, S.G. (2002). Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol* 169, 5441-5450.
- FRENCH, S., and ROBSON, B. (1983). What is a Conservative Substitution? *Journal of Molecular Evolution* 19, 171-175.
- FROHLING, S., SCHOLL, C., GILLILAND, D.G., and LEVINE, R.L. (2005). Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 23, 6285-6295.
- FUCHS, R., ed. (2002). *Akute myeloische Leukämie* (Bremen, UNI-MED Verlag).
- FUKUDA, R., HAYASHI, A., UTSUNOMIYA, A., NUKADA, Y., FUKUI, R., ITOH, K., TEZUKA, K., OHASHI, K., MIZUNO, K., SAKAMOTO, M., *et al.* (2005). Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15213-15218.
- FULCI, V., CHIARETTI, S., GOLDONI, M., AZZALIN, G., CARUCCI, N., TAVOLARO, S., CASTELLANO, L., MAGRELLI, A., CITARELLA, F., MESSINA, M., *et al.* (2007). Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109, 4944-4951.

- FULTON, D., GRATTON, J.P., MCCABE, T.J., FONTANA, J., FUJIO, Y., WALSH, K., FRANKE, T.F., PAPAPETROPOULOS, A., and SESSA, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.
- GALANDRINI, R., TASSI, I., MATTIA, G., LENTI, L., PICCOLI, M., FRATI, L., and SANTONI, A. (2002). SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells. *Blood* 100, 4581-4589.
- GALANDRINI, R., TASSI, I., MORRONE, S., LANFRANCONE, L., PELICCI, P., PICCOLI, M., FRATI, L., and SANTONI, A. (2001). The adaptor protein shc is involved in the negative regulation of NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 31, 2016-2025.
- GALE, N.W., KAPLAN, S., LOWENSTEIN, E.J., SCHLESSINGER, J., and BAR-SAGI, D. (1993). Grb2 mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on Ras. *Nature* 363, 88-92.
- GAO, X., and PAN, D. (2001). TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* 15, 1383-1392.
- GARCIA-PALMA, L., HORN, S., HAAG, F., DIESENBACHER, P., STREICHERT, T., MAYR, G.W., and JUCKER, M. (2005). Up-regulation of the T cell quiescence factor KLF2 in a leukaemic T-cell line after expression of the inositol 5'-phosphatase SHIP-1. *Br J Haematol* 131, 628-631.
- GARDAI, S., WHITLOCK, B.B., HELGASON, C., AMBRUSO, D., FADOK, V., BRATTON, D., and HENSON, P.M. (2002). Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils. *J Biol Chem* 277, 5236-5246.
- GARZON, R., GAROFALO, M., MARTELLI, M.P., BRIESEWITZ, R., WANG, L., FERNANDEZ-CYMERING, C., VOLINIA, S., LIU, C.G., SCHNITTGER, S., HAFERLACH, T., *et al.* (2008). Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3945-3950.
- GEIER, S.J., ALGATE, P.A., CARLBERG, K., FLOWERS, D., FRIEDMAN, C., TRASK, B., and ROHRSCHEIDER, L.R. (1997). The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood* 89, 1876-1885.
- GEORGANTAS, R.W., 3RD, HILDRETH, R., MORISOT, S., ALDER, J., LIU, C.G., HEIMFELD, S., CALIN, G.A., CROCE, C.M., and CIVIN, C.I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2750-2755.
- GILBY, D.C., GOODEVE, A.C., WINSHIP, P.R., VALK, P.J., DELWEL, R., and REILLY, J.T. (2007). Gene structure, expression profiling and mutation analysis of the tumour suppressor SHIP1 in Caucasian acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 21, 2390-2393.
- GIURIATO, S., PAYRASTRE, B., DRAYER, A.L., PLANTAVID, M., WOSCHOLSKI, R., PARKER, P., ERNEUX, C., and CHAP, H. (1997). Tyrosine phosphorylation and relocation of SHIP are integrin-mediated in thrombin-stimulated human blood platelets. *J Biol Chem* 272, 26857-26863.

- GLOIRE, G., CHARLIER, E., RAHMOUNI, S., VOLANTI, C., CHARIOT, A., ERNEUX, C., and PIETTE, J. (2006). Restoration of SHIP-1 activity in human leukemic cells modifies NF-kappaB activation pathway and cellular survival upon oxidative stress. *Oncogene* 25, 5485-5494.
- GLOIRE, G., ERNEUX, C., and PIETTE, J. (2007). The role of SHIP1 in T-lymphocyte life and death. *Biochem Soc Trans* 35, 277-280.
- GONCHAROVA, E.A., GONCHAROV, D.A., ESZTERHAS, A., HUNTER, D.S., GLASSBERG, M.K., YEUNG, R.S., WALKER, C.L., NOONAN, D., KWIATKOWSKI, D.J., CHOU, M.M., *et al.* (2002). Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the TSC2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM). *J Biol Chem* 277, 30958-30967.
- GORDAN, J.D., and SIMON, M.C. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77.
- GORDON, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
- GOSS, V.L., LEE, K.A., MORITZ, A., NARDONE, J., SPEK, E.J., MACNEILL, J., RUSH, J., COMB, M.J., and POLAKIEWICZ, R.D. (2006). A common phosphotyrosine signature for the Bcr-Abl kinase. *Blood* 107, 4888-4897.
- GOSSSEN, M., and BUJARD, H. (2002). Tetracyclines in the control of gene expression in eukaryotes. In *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*, M. Nelson, W. Hillen, and R.A. Greenwald, eds. (Basel, Birkhäuser), pp. 139-157.
- GOSSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W., and BUJARD, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769.
- GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., and NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- GRANDAGE, V.L., GALE, R.E., LINCH, D.C., and KHWAJA, A. (2005). PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 19, 586-594.
- GRANT, S.G., JESSEE, J., BLOOM, F.R., and HANAHAN, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4645-4649.
- GRATZNER, H.G., and LEIF, R.C. (1981). An immunofluorescence method for monitoring DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry* 1, 385-393.
- GREGORY, R.I., CHENDRIMADA, T.P., COOCH, N., and SHIEKHATTAR, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640.
- GRODBERG, J., and DUNN, J.J. (1988). ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170, 1245-1253.

- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., and TSIEN, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450.
- GWACK, Y., SRIKANTH, S., FESKE, S., CRUZ-GUILLOT, F., OH-HORA, M., NEEMS, D.S., HOGAN, P.G., and RAO, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282, 16232-16243.
- HAASCH, D., CHEN, Y.W., REILLY, R.M., CHIOU, X.G., KOTERSKI, S., SMITH, M.L., KROEGER, P., MCWEENY, K., HALBERT, D.N., MOLLISON, K.W., *et al.* (2002). T cell activation induces a noncoding RNA transcript sensitive to inhibition by immunosuppressant drugs and encoded by the proto-oncogene, BIC. *Cell Immunol* 217, 78-86.
- HAASE, A.D., JASKIEWICZ, L., ZHANG, H., LAINE, S., SACK, R., GATIGNOL, A., and FILIPOWICZ, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 6, 961-967.
- HALUSHKA, M.K., FAN, J.B., BENTLEY, K., HSIE, L., SHEN, N., WEDER, A., COOPER, R., LIPSHUTZ, R., and CHAKRAVARTI, A. (1999). Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22, 239-247.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K.H., NAM, J.W., HEO, I., RHEE, J.K., SOHN, S.Y., CHO, Y., ZHANG, B.T., and KIM, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887-901.
- HARDER, K.W., QUILICI, C., NAIK, E., INGLESE, M., KOUNTOURI, N., TURNER, A., ZLATIC, K., TARLINTON, D.M., and HIBBS, M.L. (2004). Perturbed myelo/erythropoiesis in Lyn-deficient mice is similar to that in mice lacking the inhibitory phosphatases SHP-1 and SHIP-1. *Blood* 104, 3901-3910.
- HARKIOLAKI, M., TSIRKA, T., LEWITZKY, M., SIMISTER, P.C., JOSHI, D., BIRD, L.E., JONES, E.Y., O'REILLY, N., and FELLER, S.M. (2009). Distinct binding modes of two epitopes in Gab2 that interact with the SH3C domain of Grb2. *Structure* 17, 809-822.
- HARMER, S.L., and DEFRANCO, A.L. (1999). The src homology domain 2-containing inositol phosphatase SHIP forms a ternary complex with Shc and Grb2 in antigen receptor-stimulated B lymphocytes. *J Biol Chem* 274, 12183-12191.
- HARRIS, S.J., PARRY, R.V., WESTWICK, J., and WARD, S.G. (2008). Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem* 283, 2465-2469.
- HAYES, R.B., YIN, S.N., DOSEMECI, M., LI, G.L., WACHOLDER, S., TRAVIS, L.B., LI, C.Y., ROTHMAN, N., HOOVER, R.N., and LINET, M.S. (1997). Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst* 89, 1065-1071.
- HEFFETZ, D., BUSHKIN, I., DROR, R., and ZICK, Y. (1990). The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 265, 2896-2902.

- HEISTERKAMP, N., JENSTER, G., TEN HOEVE, J., ZOVICH, D., PATTENGAL, P.K., and GROFFEN, J. (1990). Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344, 251-253.
- HELGASON, C.D., ANTONCHUK, J., BODNER, C., and HUMPHRIES, R.K. (2003). Homeostasis and regeneration of the hematopoietic stem cell pool are altered in SHIP-deficient mice. *Blood* 102, 3541-3547.
- HELGASON, C.D., DAMEN, J.E., ROSTEN, P., GREWAL, R., SORENSEN, P., CHAPPEL, S.M., BOROWSKI, A., JIRIK, F., KRYSTAL, G., and HUMPHRIES, R.K. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev* 12, 1610-1620.
- HELGASON, C.D., KALBERER, C.P., DAMEN, J.E., CHAPPEL, S.M., PINEAULT, N., KRYSTAL, G., and HUMPHRIES, R.K. (2000). A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of B lymphocytes in ship^{-/-} mice. *J Exp Med* 191, 781-794.
- HERNANDEZ-HANSEN, V., SMITH, A.J., SURVILADZE, Z., CHIGAEV, A., MAZEL, T., KALESNIKOFF, J., LOWELL, C.A., KRYSTAL, G., SKLAR, L.A., WILSON, B.S., *et al.* (2004). Dysregulated FcεRI signaling and altered Fyn and SHIP activities in Lyn-deficient mast cells. *J Immunol* 173, 100-112.
- HESS, H.H., and DERR, J.E. (1975). Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1-5 nanomole range. *Anal Biochem* 63, 607-613.
- HIBBS, M.L., HARDER, K.W., ARMES, J., KOUNTOURI, N., QUILICI, C., CASAGRANDA, F., DUNN, A.R., and TARLINTON, D.M. (2002). Sustained activation of Lyn tyrosine kinase in vivo leads to autoimmunity. *J Exp Med* 196, 1593-1604.
- HIDAKA, M., HOMMA, Y., and TAKENAWA, T. (1991). Highly conserved eight amino acid sequence in SH2 is important for recognition of phosphotyrosine site. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 1490-1497.
- HILLEN, W., and BERENS, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48, 345-369.
- HILLEN, W., and BERENS, C. (2002). Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *BIOSpektrum* 4, 355-358.
- HOFFMANN, P., ERMANN, J., EDINGER, M., FATHMAN, C.G., and STROBER, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196, 389-399.
- HOLGADO-MADRUGA, M., EMLET, D.R., MOSCATELLO, D.K., GODWIN, A.K., and WONG, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.
- HORIIKE, S., YOKOTA, S., NAKAO, M., IWAI, T., SASAI, Y., KANEKO, H., TANIWAKI, M., KASHIMA, K., FUJII, H., ABE, T., *et al.* (1997). Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia* 11, 1442-1446.

- HORN, S., ENDL, E., FEHSE, B., WECK, M.M., MAYR, G.W., and JUCKER, M. (2004). Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3beta signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle. *Leukemia* 18, 1839-1849.
- HORN, S., MEYER, J., HEUKESHOVEN, J., FEHSE, B., SCHULZE, C., LI, S., FREY, J., POLL, S., STOCKING, C., and JUCKER, M. (2001). The inositol 5-phosphatase SHIP is expressed as 145 and 135 kDa proteins in blood and bone marrow cells in vivo, whereas carboxyl-truncated forms of SHIP are generated by proteolytic cleavage in vitro. *Leukemia* 15, 112-120.
- HORN, S., MEYER, J., STOCKING, C., OSTERTAG, W., and JUCKER, M. (2003). An increase in the expression and total activity of endogenous p60(c-Src) in several factor-independent mutants of a human GM-CSF-dependent leukemia cell line (TF-1). *Oncogene* 22, 7170-7180.
- HORSTMANN, M., and JÜCKER, M. (unveröffentlicht).
- HOWELL, B.W., LANIER, L.M., FRANK, R., GERTLER, F.B., and COOPER, J.A. (1999). The disabled 1 phosphotyrosine-binding domain binds to the internalization signals of transmembrane glycoproteins and to phospholipids. *Mol Cell Biol* 19, 5179-5188.
- HUANG, Y.H., GRASIS, J.A., MILLER, A.T., XU, R., SOONTHORNVACHARIN, S., ANDREOTTI, A.H., TSOUKAS, C.D., COOKE, M.P., and SAUER, K. (2007). Positive regulation of Itk PH domain function by soluble IP4. *Science* 316, 886-889.
- HUBER, M., HELGASON, C.D., DAMEN, J.E., LIU, L., HUMPHRIES, R.K., and KRYSTAL, G. (1998a). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11330-11335.
- HUBER, M., HELGASON, C.D., DAMEN, J.E., SCHEID, M., DURONIO, V., LIU, L., WARE, M.D., HUMPHRIES, R.K., and KRYSTAL, G. (1999). The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 423-434.
- HUBER, M., HELGASON, C.D., SCHEID, M.P., DURONIO, V., HUMPHRIES, R.K., and KRYSTAL, G. (1998b). Targeted disruption of SHIP leads to Steel factor-induced degranulation of mast cells. *EMBO J* 17, 7311-7319.
- HUBER, M., KALESNIKOFF, J., RETH, M., and KRYSTAL, G. (2002). The role of SHIP in mast cell degranulation and IgE-induced mast cell survival. *Immunol Lett* 82, 17-21.
- HUTVAGNER, G., and ZAMORE, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J., and GUAN, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-657.
- IRVINE, R.F., LLOYD-BURTON, S.M., YU, J.C., LETCHER, A.J., and SCHELL, M.J. (2006). The regulation and function of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases. *Adv Enzyme Regul* 46, 314-323.
- ITAYA, K., and UI, M. (1966). A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin Chim Acta* 14, 361-366.

- JACOB, A., COONEY, D., TRIDANDAPANI, S., KELLEY, T., and COGGESHALL, K.M. (1999). FcγRIIb modulation of surface immunoglobulin-induced Akt activation in murine B cells. *J Biol Chem* 274, 13704-13710.
- JAFFE, E.S., ed. (2001). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. (Lyon, IARC Press).
- JEFFERSON, A.B., and MAJERUS, P.W. (1995). Properties of type II inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* 270, 9370-9377.
- JEFFERSON, A.B., and MAJERUS, P.W. (1996). Mutation of the conserved domains of two inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochemistry* 35, 7890-7894.
- JENSEN, W.A., MARSCHNER, S., OTT, V.L., and CAMBIER, J.C. (2001). FcγRIIb-mediated inhibition of T-cell receptor signal transduction involves the phosphorylation of SH2-containing inositol 5-phosphatase (SHIP), dephosphorylation of the linker of activated T-cells (LAT) and inhibition of calcium mobilization. *Biochem Soc Trans* 29, 840-846.
- JEONG, E.G., LEE, S.H., and YOO, N.J. (2007). Absence of nucleophosmin 1 (NPM1) gene mutations in common solid cancers. *APMIS* 115, 341-346.
- JIANG, X., STUIBLE, M., CHALANDON, Y., LI, A., CHAN, W.Y., EISTERER, W., KRYSTAL, G., EAVES, A., and EAVES, C. (2003). Evidence for a positive role of SHIP in the BCR-ABL-mediated transformation of primitive murine hematopoietic cells and in human chronic myeloid leukemia. *Blood* 102, 2976-2984.
- JOERGER, A.C., and FERSHT, A.R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene* 26, 2226-2242.
- JOHNSON, G.R., GONDA, T.J., METCALF, D., HARIHARAN, I.K., and CORY, S. (1989). A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J* 8, 441-448.
- JONES, P.F., JAKUBOWICZ, T., PITOSI, F.J., MAURER, F., and HEMMINGS, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4171-4175.
- JÜCKER, M., SCHIFFER, C.A., and FELDMAN, R.A. (1997). A tyrosine-phosphorylated protein of 140 kD is constitutively associated with the phosphotyrosine binding domain of Shc and the SH3 domains of Grb2 in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 89, 2024-2035.
- KADOTA, S., FANTUS, I.G., DERAGON, G., GUYDA, H.J., HERSH, B., and POSNER, B.I. (1987). Peroxide(s) of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 147, 259-266.
- KAKADIYA, P.M. (2009). First Description and Analysis of the Novel SHIP1/ABL1 Fusion Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia (München, Ludwig-Maximilians-Universität).
- KALESNIKOFF, J., LAM, V., and KRYSTAL, G. (2002). SHIP represses mast cell activation and reveals that IgE alone triggers signaling pathways which enhance normal mast cell survival. *Mol Immunol* 38, 1201-1206.

- KALRA, R., DALE, D., FREEDMAN, M., BONILLA, M.A., WEINBLATT, M., GANSER, A., BOWMAN, P., ABISH, S., PRIEST, J., OSEAS, R.S., *et al.* (1995). Monosomy 7 and activating RAS mutations accompany malignant transformation in patients with congenital neutropenia. *Blood* 86, 4579-4586.
- KAMI, K., TAKEYA, R., SUMIMOTO, H., and KOHDA, D. (2002). Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J* 21, 4268-4276.
- KARLSSON, M.C., GUINAMARD, R., BOLLAND, S., SANKALA, M., STEINMAN, R.M., and RAVETCH, J.V. (2003). Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J Exp Med* 198, 333-340.
- KARLSSON, R., ROOS, H., BRUNO, J., and STOLZ, L. (1997). Practical aspects concerning direct detection of low molecular weight analytes using BIACORE 2000. *BIAjournal*, 18-21.
- KASHIWADA, M., CATTORETTI, G., MCKEAG, L., ROUSE, T., SHOWALTER, B.M., AL-ALEM, U., NIKI, M., PANDOLFI, P.P., FIELD, E.H., and ROTHMAN, P.B. (2006). Downstream of tyrosine kinases-1 and Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase are required for regulation of CD4+CD25+ T cell development. *J Immunol* 176, 3958-3965.
- KATSO, R., OKKENHAUG, K., AHMADI, K., WHITE, S., TIMMS, J., and WATERFIELD, M.D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 615-675.
- KAVANAUGH, W.M., POT, D.A., CHIN, S.M., DEUTER-REINHARD, M., JEFFERSON, A.B., NORRIS, F.A., MASIARZ, F.R., COUSENS, L.S., MAJERUS, P.W., and WILLIAMS, L.T. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol* 6, 438-445.
- KAY, B.K., WILLIAMSON, M.P., and SUDOL, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 14, 231-241.
- KELLIHER, M.A., MCLAUGHLIN, J., WITTE, O.N., and ROSENBERG, N. (1990). Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6649-6653.
- KELLY, L.M., KUTOK, J.L., WILLIAMS, I.R., BOULTON, C.L., AMARAL, S.M., CURLEY, D.P., LEY, T.J., and GILLILAND, D.G. (2002). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8283-8288.
- KENNAH, M., YAU, T.Y., NODWELL, M., KRYSAL, G., ANDERSEN, R.J., ONG, C.J., and MUI, A.L. (2009). Activation of SHIP via a small molecule agonist kills multiple myeloma cells. *Exp Hematol* 37, 1274-1283.
- KEPLEY, C.L., TAGHAVI, S., MACKAY, G., ZHU, D., MOREL, P.A., ZHANG, K., RYAN, J.J., SATIN, L.S., ZHANG, M., PANDOLFI, P.P., *et al.* (2004). Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem* 279, 35139-35149.

KHVOROVA, A., REYNOLDS, A., and JAYASENA, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 209-216.

KIENER, P.A., LIOUBIN, M.N., ROHRSCHEIDER, L.R., LEDBETTER, J.A., NADLER, S.G., and DIEGEL, M.L. (1997). Co-ligation of the antigen and Fc receptors gives rise to the selective modulation of intracellular signaling in B cells. Regulation of the association of phosphatidylinositol 3-kinase and inositol 5'-phosphatase with the antigen receptor complex. *J Biol Chem* 272, 3838-3844.

KIM, M.S., JEONG, E.G., YOO, N.J., and LEE, S.H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer* 98, 1533-1535.

KIM, Y.K., and KIM, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26, 775-783.

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

KINGSLEY, C.I., KARIM, M., BUSHELL, A.R., and WOOD, K.J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168, 1080-1086.

KISSELEVA, M.V., WILSON, M.P., and MAJERUS, P.W. (2000). The isolation and characterization of a cDNA encoding phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem* 275, 20110-20116.

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

KIYOI, H., NAOE, T., NAKANO, Y., YOKOTA, S., MINAMI, S., MIYAWAKI, S., ASOU, N., KURIYAMA, K., JINNAI, I., SHIMAZAKI, C., *et al.* (1999). Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 93, 3074-3080.

KLUIVER, J., POPPEMA, S., DE JONG, D., BLOKZIJL, T., HARMS, G., JACOBS, S., KROESEN, B.J., and VAN DEN BERG, A. (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207, 243-249.

KNUDSON, A.G., JR. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

KOHDA, D., TERASAWA, H., ICHIKAWA, S., OGURA, K., HATANAKA, H., MANDIYAN, V., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J., and INAGAKI, F. (1994). Solution structure and ligand-binding site of the carboxy-terminal SH3 domain of GRB2. *Structure* 2, 1029-1040.

KONCZ, G., TOTH, G.K., BOKONYI, G., KERI, G., PECHT, I., MEDGYESI, D., GERGELY, J., and SARMAJ, G. (2001). Co-clustering of Fc γ and B cell receptors induces

dephosphorylation of the Grb2-associated binder 1 docking protein. *Eur J Biochem* 268, 3898-3906.

KORNBLAU, S.M., WOMBLE, M., CADE, J.S., LEMKER, E., and QIU, Y.H. (2005). Comparative analysis of the effects of sample source and test methodology on the assessment of protein expression in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 19, 1550-1557.

KORTE, J.E., HERTZ-PICCIOTTO, I., SCHULZ, M.R., BALL, L.M., and DUELL, E.J. (2000). The contribution of benzene to smoking-induced leukemia. *Environ Health Perspect* 108, 333-339.

KOTTARIDIS, P.D., GALE, R.E., LANGABEER, S.E., FREW, M.E., BOWEN, D.T., and LINCH, D.C. (2002). Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 100, 2393-2398.

KOWANETZ, K., HUSNJAK, K., HOLLER, D., KOWANETZ, M., SOUBEYRAN, P., HIRSCH, D., SCHMIDT, M.H., PAVELIC, K., DE CAMILLI, P., RANDAZZO, P.A., *et al.* (2004). CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell* 15, 3155-3166.

KRAHN, A.K., MA, K., HOU, S., DURONIO, V., and MARSHALL, A.J. (2004). Two distinct waves of membrane-proximal B cell antigen receptor signaling differentially regulated by Src homology 2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Immunol* 172, 331-339.

KRAWCZAK, M., BALL, E.V., FENTON, I., STENSON, P.D., ABEYSINGHE, S., THOMAS, N., and COOPER, D.N. (2000). Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat* 15, 45-51.

KUBOTA, Y., OHNISHI, H., KITANAKA, A., ISHIDA, T., and TANAKA, T. (2004). Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation. *Leukemia* 18, 1438-1440.

KURODA, E., HO, V., RUSCHMANN, J., ANTIGNANO, F., HAMILTON, M., RAUH, M.J., ANTOV, A., FLAVELL, R.A., SLY, L.M., and KRYSAL, G. (2009). SHIP represses the generation of IL-3-induced M2 macrophages by inhibiting IL-4 production from basophils. *J Immunol* 183, 3652-3660.

KUROIWA, A., YAMASHITA, Y., INUI, M., YUASA, T., ONO, M., NAGABUKURO, A., MATSUDA, Y., and TAKAI, T. (1998). Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene. *J Biol Chem* 273, 1070-1074.

KURZROCK, R., GUTTERMAN, J.U., and TALPAZ, M. (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 319, 990-998.

LAKHANPAL, G.K., VECCHIARELLI-FEDERICO, L.M., LI, Y.J., CUI, J.W., BAILEY, M.L., SPANER, D.E., DUMONT, D.J., BARBER, D.L., and BEN-DAVID, Y. (2010). The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood* 116, 428-436.

- LAMKIN, T.D., WALK, S.F., LIU, L., DAMEN, J.E., KRYSAL, G., and RAVICHANDRAN, K.S. (1997). Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP. *J Biol Chem* 272, 10396-10401.
- LANFRANCONE, L., PELICCI, G., BRIZZI, M.F., ARONICA, M.G., CASCIARI, C., GIULI, S., PEGORARO, L., PAWSON, T., PELICCI, P.G., and AROUCA, M.G. (1995). Overexpression of Shc proteins potentiates the proliferative response to the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and recruitment of Grb2/SoS and Grb2/p140 complexes to the beta receptor subunit. *Oncogene* 10, 907-917.
- LARSON, R.A., WANG, Y., BANERJEE, M., WIEMELS, J., HARTFORD, C., LE BEAU, M.M., and SMITH, M.T. (1999). Prevalence of the inactivating 609C-->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood* 94, 803-807.
- LEE, P.P., FITZPATRICK, D.R., BEARD, C., JESSUP, H.K., LEHAR, S., MAKAR, K.W., PEREZ-MELGOSA, M., SWEETSER, M.T., SCHLISSEL, M.S., NGUYEN, S., *et al.* (2001). A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763-774.
- LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RADMARK, O., KIM, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- LEE, Y., HUR, I., PARK, S.Y., KIM, Y.K., SUH, M.R., and KIM, V.N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25, 522-532.
- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K.H., LEE, S., BAEK, S.H., and KIM, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
- LEMAY, S., DAVIDSON, D., LATOUR, S., and VEILLETTE, A. (2000). Dok-3, a novel adapter molecule involved in the negative regulation of immunoreceptor signaling. *Mol Cell Biol* 20, 2743-2754.
- LEUNG, W.H., TARASENKO, T., and BOLLAND, S. (2009). Differential roles for the inositol phosphatase SHIP in the regulation of macrophages and lymphocytes. *Immunol Res* 43, 243-251.
- LEWIS, R.S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.
- LEWITZKY, M., KARDINAL, C., GEHRING, N.H., SCHMIDT, E.K., KONKOL, B., EULITZ, M., BIRCHMEIER, W., SCHAEFER, U., and FELLER, S.M. (2001). The C-terminal SH3 domain of the adapter protein Grb2 binds with high affinity to sequences in Gab1 and SLP-76 which lack the SH3-typical P-x-x-P core motif. *Oncogene* 20, 1052-1062.
- LI, D.M., and SUN, H. (1998). PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15406-15411.

- LI, N., BATZER, A., DALY, R., YAJNIK, V., SKOLNIK, E., CHARDIN, P., BAR-SAGI, D., MARGOLIS, B., and SCHLESSINGER, J. (1993). Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363, 85-88.
- LI, S.S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* 390, 641-653.
- LIM, W.A., RICHARDS, F.M., and FOX, R.O. (1994). Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature* 372, 375-379.
- LIN, P., JONES, D., MEDEIROS, L.J., CHEN, W., VEGA-VAZQUEZ, F., and LUTHRA, R. (2006). Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 126, 530-533.
- LIU, J., KIM, M.L., HEO, W.D., JONES, J.T., MYERS, J.W., FERRELL, J.E., JR., and MEYER, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.
- LIUBIN, M.N., ALGATE, P.A., TSAI, S., CARLBERG, K., AEBERSOLD, A., and ROHRSCHEIDER, L.R. (1996). p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev* 10, 1084-1095.
- LIUBIN, M.N., MYLES, G.M., CARLBERG, K., BOWTELL, D., and ROHRSCHEIDER, L.R. (1994). Shc, Grb2, Sos1, and a 150-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein form complexes with Fms in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 14, 5682-5691.
- LIU, B., LIAO, J., RAO, X., KUSHNER, S.A., CHUNG, C.D., CHANG, D.D., and SHUAI, K. (1998a). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.
- LIU, J., CARMELL, M.A., RIVAS, F.V., MARSDEN, C.G., THOMSON, J.M., SONG, J.J., HAMMOND, S.M., JOSHUA-TOR, L., and HANNON, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
- LIU, L., DAMEN, J.E., CUTLER, R.L., and KRYSTAL, G. (1994). Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc. *Mol Cell Biol* 14, 6926-6935.
- LIU, L., DAMEN, J.E., HUGHES, M.R., BABIC, I., JIRIK, F.R., and KRYSTAL, G. (1997a). The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 8983-8988.
- LIU, L., DAMEN, J.E., WARE, M.D., and KRYSTAL, G. (1997b). Interleukin-3 induces the association of the inositol 5-phosphatase SHIP with SHP2. *J Biol Chem* 272, 10998-11001.
- LIU, P., CHENG, H., ROBERTS, T.M., and ZHAO, J.J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8, 627-644.

- LIU, Q., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A.J., MARIATHASAN, S., BOUCHARD, D., JONES, J., SARAO, R., KOZIERADZKI, I., OHASHI, P.S., PENNINGER, J.M., and DUMONT, D.J. (1998b). The inositol polyphosphate 5-phosphatase ship is a crucial negative regulator of B cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 188, 1333-1342.
- LIU, Q., SASAKI, T., KOZIERADZKI, I., WAKEHAM, A., ITIE, A., DUMONT, D.J., and PENNINGER, J.M. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev* 13, 786-791.
- LIU, Q., SHALABY, F., JONES, J., BOUCHARD, D., and DUMONT, D.J. (1998c). The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, ship, is expressed during hematopoiesis and spermatogenesis. *Blood* 91, 2753-2759.
- LIU, Y., JENKINS, B., SHIN, J.L., and ROHRSCHEIDER, L.R. (2001). Scaffolding protein Gab2 mediates differentiation signaling downstream of Fms receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 21, 3047-3056.
- LO, T.C., BARNHILL, L.M., KIM, Y., NAKAE, E.A., YU, A.L., and DICCIANNI, M.B. (2009). Inactivation of SHIP1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia due to mutation and extensive alternative splicing. *Leuk Res* 33, 1562-1566.
- LOCK, L.S., ROYAL, I., NAUJOKAS, M.A., and PARK, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 275, 31536-31545.
- LOCKE, N.R., PATTERSON, S.J., HAMILTON, M.J., SLY, L.M., KRYSTAL, G., and LEVINGS, M.K. (2009). SHIP regulates the reciprocal development of T regulatory and Th17 cells. *J Immunol* 183, 975-983.
- LOEB, L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 3075-3079.
- LOTTSPEICH, F., ENGELS, J.W., and SIMEON, A., eds. (2006). *Bioanalytik*, 2. Auflage edn (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
- LOWENSTEIN, E.J., DALY, R.J., BATZER, A.G., LI, W., MARGOLIS, B., LAMMERS, R., ULLRICH, A., SKOLNIK, E.Y., BAR-SAGI, D., and SCHLESSINGER, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- LOY, A.L., and GOODNOW, C.C. (2002). Novel approaches for identifying genes regulating lymphocyte development and function. *Curr Opin Immunol* 14, 260-265.
- LUCAS, D.M., and ROHRSCHEIDER, L.R. (1999). A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase is expressed during myeloid development. *Blood* 93, 1922-1933.

- LUIK, R.M., WU, M.M., BUCHANAN, J., and LEWIS, R.S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 174, 815-825.
- LUO, J.M., LIU, Z.L., HAO, H.L., WANG, F.X., DONG, Z.R., and OHNO, R. (2004). Mutation analysis of SHIP gene in acute leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12, 420-426.
- LUO, J.M., YOSHIDA, H., KOMURA, S., OHISHI, N., PAN, L., SHIGENO, K., HANAMURA, I., MIURA, K., IIDA, S., UEDA, R., *et al.* (2003). Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 17, 1-8.
- MACRAE, I.J., MA, E., ZHOU, M., ROBINSON, C.V., and DOUDNA, J.A. (2008). In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 512-517.
- MAEHAMA, T., and DIXON, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- MAEHAMA, T., TAYLOR, G.S., and DIXON, J.E. (2001). PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 70, 247-279.
- MAEHAMA, T., TAYLOR, G.S., SLAMA, J.T., and DIXON, J.E. (2000). A sensitive assay for phosphoinositide phosphatases. *Anal Biochem* 279, 248-250.
- MAGALHAES, I.Q., SPLENDORE, A., EMERENCIANO, M., FIGUEIREDO, A., FERRARI, I., and POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. (2006). GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 166, 112-116.
- MAIGNAN, S., GUILLOTEAU, J.P., FROMAGE, N., ARNOUX, B., BECQUART, J., and DUCRUIX, A. (1995). Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* 268, 291-293.
- MAJERUS, P.W., KISSELEVA, M.V., and NORRIS, F.A. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol Chem* 274, 10669-10672.
- MALBEC, O., ATTAL, J.P., FRIDMAN, W.H., and DAERON, M. (2002). Negative regulation of mast cell proliferation by FcγRIIB. *Mol Immunol* 38, 1295-1299.
- MALBEC, O., SCHMITT, C., BRUHNS, P., KRYSZAL, G., FRIDMAN, W.H., and DAERON, M. (2001). Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 mediates cell cycle arrest by FcγRIIB. *J Biol Chem* 276, 30381-30391.
- MANNING, B.D., and CANTLEY, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- MANNING, B.D., TEE, A.R., LOGSDON, M.N., BLENIS, J., and 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. *Mol Cell* 10, 151-162.

- MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P., and SICA, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555.
- MARCHETTO, S., FOURNIER, E., BESLU, N., AURRAN-SCHLEINITZ, T., DUBREUIL, P., BORG, J.P., BIRNBAUM, D., and ROSNET, O. (1999). SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor. *Leukemia* 13, 1374-1382.
- MARESCO, D.L., OSBORNE, J.M., COONEY, D., COGGESHALL, K.M., and ANDERSON, C.L. (1999). The SH2-containing 5'-inositol phosphatase (SHIP) is tyrosine phosphorylated after Fc gamma receptor clustering in monocytes. *J Immunol* 162, 6458-6465.
- MARONE, G., CASOLARO, V., CIRILLO, R., STELLATO, C., and GENOVESE, A. (1989). Pathophysiology of human basophils and mast cells in allergic disorders. *Clin Immunol Immunopathol* 50, S24-40.
- MARONE, G., SPADARO, G., PATELLA, V., and GENOVESE, A. (1994). The clinical relevance of basophil releasability. *J Allergy Clin Immunol* 94, 1293-1303.
- MARSON, A., KRETSCHMER, K., FRAMPTON, G.M., JACOBSEN, E.S., POLANSKY, J.K., MACISAAC, K.D., LEVINE, S.S., FRAENKEL, E., VON BOEHMER, H., and YOUNG, R.A. (2007). Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445, 931-935.
- MARTELLI, A.M., NYAKERN, M., TABELLINI, G., BORTUL, R., TAZZARI, P.L., EVANGELISTI, C., and COCCO, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 20, 911-928.
- MARTENS, J.H., and STUNNENBERG, H.G. (2010). The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett* 584, 2662-2669.
- MARTINEZ, F.O., SICA, A., MANTOVANI, A., and LOCATI, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13, 453-461.
- MASON, J.M., BEATTIE, B.K., LIU, Q., DUMONT, D.J., and BARBER, D.L. (2000). The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 275, 4398-4406.
- MASOOD, E. (1999). As consortium plans free SNP map of human genome. *Nature* 398, 545-546.
- MATUOKA, K., SHIBATA, M., YAMAKAWA, A., and TAKENAWA, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9015-9019.
- MAXWELL, M.J., YUAN, Y., ANDERSON, K.E., HIBBS, M.L., SALEM, H.H., and JACKSON, S.P. (2004). SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIb beta 3 signaling in platelets. *J Biol Chem* 279, 32196-32204.

- MAYER, B.J., JACKSON, P.K., VAN ETTEN, R.A., and BALTIMORE, D. (1992). Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol* 12, 609-618.
- MAYO, L.D., and DONNER, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.
- MAYR, G.W. (1988). A novel metal-dye detection system permits picomolar-range h.p.l.c. analysis of inositol polyphosphates from non-radioactively labelled cell or tissue specimens. *Biochem J* 254, 585-591.
- MCCUBREY, J.A., STEELMAN, L.S., ABRAMS, S.L., BERTRAND, F.E., LUDWIG, D.E., BASECKE, J., LIBRA, M., STIVALA, F., MILELLA, M., TAFURI, A., *et al.* (2008). Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* 22, 708-722.
- MCDONALD, C.B., SELDEEN, K.L., DEEGAN, B.J., and FAROOQ, A. (2009). SH3 domains of Grb2 adaptor bind to PXpsiPXR motifs within the Sos1 nucleotide exchange factor in a discriminate manner. *Biochemistry* 48, 4074-4085.
- MEDEMA, R.H., KOPS, G.J., BOS, J.L., and BURGERING, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- MEISTER, G., LANDTHALER, M., PATKANIOWSKA, A., DORSETT, Y., TENG, G., and TUSCHL, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197.
- METZNER, A., HORSTMANN, M.A., FEHSE, B., ORTMEYER, G., NIEMEYER, C.M., STOCKING, C., MAYR, G.W., and JUCKER, M. (2007). Gene transfer of SHIP-1 inhibits proliferation of juvenile myelomonocytic leukemia cells carrying KRAS2 or PTPN11 mutations. *Gene Ther* 14, 699-703.
- METZNER, A., PRECHT, C., FEHSE, B., FIEDLER, W., STOCKING, C., GUNTHER, A., MAYR, G.W., and JUCKER, M. (2009). Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D. *Gene Ther* 16, 570-573.
- MIKHALAP, S.V., SHLAPATSKA, L.M., BERDOVA, A.G., LAW, C.L., CLARK, E.A., and SIDORENKO, S.P. (1999). CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis. *J Immunol* 162, 5719-5727.
- MILLS, C.D. (2001). Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. *Crit Rev Immunol* 21, 399-425.
- MILTENBURGER, H.G., SACHSE, G., and SCHLIERMANN, M. (1987). S-phase cell detection with a monoclonal antibody. *Dev Biol Stand* 66, 91-99.
- 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., and KO, Y.W. (2003). Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 17, 995-997.

- MINUCCI, S., NERVI, C., LO COCO, F., and PELICCI, P.G. (2001). Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 20, 3110-3115.
- MIURA, K., and MACGLASHAN, D.W. (2000a). Phosphatidylinositol-3 kinase regulates p21ras activation during IgE-mediated stimulation of human basophils. *Blood* 96, 2199-2205.
- MIURA, K., and MACGLASHAN, D.W., JR. (2000b). Dual phase priming by IL-3 for leukotriene C4 generation in human basophils: difference in characteristics between acute and late priming effects. *J Immunol* 164, 3026-3034.
- MIYOSHI, H., KOZU, T., SHIMIZU, K., ENOMOTO, K., MASEKI, N., KANEKO, Y., KAMADA, N., and OHKI, M. (1993). The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* 12, 2715-2721.
- MOELLER, S.J., HEAD, E.D., and SHEAFF, R.J. (2003). p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Mol Cell Biol* 23, 3735-3752.
- MOODY, J.L., PEREIRA, C.G., MAGIL, A., FRITZLER, M.J., and JIRIK, F.R. (2003). Loss of a single allele of SHIP exacerbates the immunopathology of Pten heterozygous mice. *Genes Immun* 4, 60-66.
- MORLANDO, M., BALLARINO, M., GROMAK, N., PAGANO, F., BOZZONI, I., and PROUDFOOT, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol* 15, 902-909.
- MURAILLE, E., PESESSE, X., KUNTZ, C., and ERNEUX, C. (1999). Distribution of the src-homology-2-domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP-2 in both non-haemopoietic and haemopoietic cells and possible involvement of SHIP-2 in negative signalling of B-cells. *Biochem J* 342 Pt 3, 697-705.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., and WALPORT, M. (2009). *Janeway Immunologie* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- MYERS, M.P., PASS, I., BATTY, I.H., VAN DER KAAY, J., STOLAROV, J.P., HEMMINGS, B.A., WIGLER, M.H., DOWNES, C.P., and TONKS, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13513-13518.
- NAKAMURA, K., KOURO, T., KINCADE, P.W., MALYKHIN, A., MAEDA, K., and COGGESHALL, K.M. (2004). Src homology 2-containing 5-inositol phosphatase (SHIP) suppresses an early stage of lymphoid cell development through elevated interleukin-6 production by myeloid cells in bone marrow. *J Exp Med* 199, 243-254.
- NAKAMURA, K., MALYKHIN, A., and COGGESHALL, K.M. (2002). The Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase negatively regulates Fcγ receptor-mediated phagocytosis through immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing phagocytic receptors. *Blood* 100, 3374-3382.
- NAKAO, M., YOKOTA, S., IWAI, T., KANEKO, H., HORIIKE, S., KASHIMA, K., SONODA, Y., FUJIMOTO, T., and MISAWA, S. (1996). Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-1918.

- NALASKOWSKI, M.M., and MAYR, G.W. (2004). The families of kinases removing the Ca²⁺-releasing second messenger Ins(1,4,5)P₃. *Curr Mol Med* 4, 277-290.
- NEILL, L., TIEN, A.H., REY-LADINO, J., and HELGASON, C.D. (2007). SHIP-deficient mice provide insights into the regulation of dendritic cell development and function. *Exp Hematol* 35, 627-639.
- NGUYEN, L., HOLGADO-MADRUGA, M., MAROUN, C., FIXMAN, E.D., KAMIKURA, D., FOURNIER, T., CHAREST, A., TREMBLAY, M.L., WONG, A.J., and PARK, M. (1997). Association of the multisubstrate docking protein Gab1 with the hepatocyte growth factor receptor requires a functional Grb2 binding site involving tyrosine 1356. *J Biol Chem* 272, 20811-20819.
- NITSCHKE, L., CARSETTI, R., OCKER, B., KOHLER, G., and LAMERS, M.C. (1997). CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* 7, 133-143.
- NOWELL, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- NOWELL, P.C., and HUNGERFORD, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85-109.
- O'CONNELL, R.M., CHAUDHURI, A.A., RAO, D.S., and BALTIMORE, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7113-7118.
- O'CONNELL, R.M., RAO, D.S., CHAUDHURI, A.A., BOLDIN, M.P., TAGANOV, K.D., NICOLL, J., PAQUETTE, R.L., and BALTIMORE, D. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 205, 585-594.
- O'CONNELL, R.M., TAGANOV, K.D., BOLDIN, M.P., CHENG, G., and BALTIMORE, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1604-1609.
- O'DWYER, P.J., LEYLAND-JONES, B., ALONSO, M.T., MARSONI, S., and WITTES, R.E. (1985). Etoposide (VP-16-213). Current status of an active anticancer drug. *N Engl J Med* 312, 692-700.
- O'SHEA, J.J., MCVICAR, D.W., BAILEY, T.L., BURNS, C., and SMYTH, M.J. (1992). Activation of human peripheral blood T lymphocytes by pharmacological induction of protein-tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10306-10310.
- ODAI, H., SASAKI, K., IWAMATSU, A., HANAZONO, Y., TANAKA, T., MITANI, K., YAZAKI, Y., and HIRAI, H. (1995). The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J Biol Chem* 270, 10800-10805.
- ODAI, H., SASAKI, K., IWAMATSU, A., NAKAMOTO, T., UENO, H., YAMAGATA, T., MITANI, K., YAZAKI, Y., and HIRAI, H. (1997). Purification and molecular cloning of SH2- and SH3-containing inositol polyphosphate-5-phosphatase, which is involved in the signaling pathway of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, erythropoietin, and Bcr-Abl. *Blood* 89, 2745-2756.

- OKUDA, K., FOSTER, R., and GRIFFIN, J.D. (1999). Signaling domains of the beta c chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 872, 305-312; discussion 312-303.
- OLIVIER, J.P., RAABE, T., HENKEMEYER, M., DICKSON, B., MBAMALU, G., MARGOLIS, B., SCHLESSINGER, J., HAFEN, E., and PAWSON, T. (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell* 73, 179-191.
- ONG, C.J., MING-LUM, A., NODWELL, M., GHANIPOUR, A., YANG, L., WILLIAMS, D.E., KIM, J., DEMIRJIAN, L., QASIMI, P., RUSCHMANN, J., *et al.* (2007). Small-molecule agonists of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood* 110, 1942-1949.
- ONG, S.H., HADARI, Y.R., GOTOH, N., GUY, G.R., SCHLESSINGER, J., and LAX, I. (2001). Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6074-6079.
- ONO, M., BOLLAND, S., TEMPST, P., and RAVETCH, J.V. (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383, 263-266.
- ONO, M., OKADA, H., BOLLAND, S., YANAGI, S., KUROSAKI, T., and RAVETCH, J.V. (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* 90, 293-301.
- OOMS, L.M., HORAN, K.A., RAHMAN, P., SEATON, G., GURUNG, R., KETHESPARAN, D.S., and MITCHELL, C.A. (2009). The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J* 419, 29-49.
- ORNSTEIN, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121, 321-349.
- OSBORNE, M.A., ZENNER, G., LUBINUS, M., ZHANG, X., SONGYANG, Z., CANTLEY, L.C., MAJERUS, P., BURN, P., and KOCHAN, J.P. (1996). The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J Biol Chem* 271, 29271-29278.
- OVERDUIN, M., RIOS, C.B., MAYER, B.J., BALTIMORE, D., and COWBURN, D. (1992). Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl. *Cell* 70, 697-704.
- PABST, T., MUELLER, B.U., ZHANG, P., RADOMSKA, H.S., NARRAVULA, S., SCHNITTGER, S., BEHRE, G., HIDDEMANN, W., and TENEN, D.G. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 27, 263-270.
- PAIETTA, E., FERRANDO, A.A., NEUBERG, D., BENNETT, J.M., RACEVSKIS, J., LAZARUS, H., DEWALD, G., ROWE, J.M., WIERNIK, P.H., TALLMAN, M.S., *et al.* (2004). Activating FLT3 mutations in CD117/KIT(+) T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 104, 558-560.

- PALACIOS, R., GAZAVE, E., GONI, J., PIEDRAFITA, G., FERNANDO, O., NAVARRO, A., and VILLOSLADA, P. (2009). Allele-specific gene expression is widespread across the genome and biological processes. *PLoS One* 4, e4150.
- PARAISO, K.H., GHANSAH, T., COSTELLO, A., ENGELMAN, R.W., and KERR, W.G. (2007). Induced SHIP deficiency expands myeloid regulatory cells and abrogates graft-versus-host disease. *J Immunol* 178, 2893-2900.
- PARK, R.K., KYONO, W.T., LIU, Y., and DURDEN, D.L. (1998). CBL-GRB2 interaction in myeloid immunoreceptor tyrosine activation motif signaling. *J Immunol* 160, 5018-5027.
- PARRY, R.V., HARRIS, S.J., and WARD, S.G. (2010). Fine tuning T lymphocytes: a role for the lipid phosphatase SHIP-1. *Biochim Biophys Acta* 1804, 592-597.
- PARRY, R.V., RILEY, J.L., and WARD, S.G. (2007). Signalling to suit function: tailoring phosphoinositide 3-kinase during T-cell activation. *Trends Immunol* 28, 161-168.
- PATTNI, K., and BANTING, G. (2004). Ins(1,4,5)P3 metabolism and the family of IP3-3Kinases. *Cell Signal* 16, 643-654.
- PAWSON, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-580.
- PAWSON, T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191-203.
- PAYNE, S.R., and KEMP, C.J. (2005). Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis* 26, 2031-2045.
- PENDERGAST, A.M., QUILLIAM, L.A., CRIPE, L.D., BASSING, C.H., DAI, Z., LI, N., BATZER, A., RABUN, K.M., DER, C.J., SCHLESSINGER, J., *et al.* (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.
- PEREZ, L.E., DESPONTS, C., PARQUET, N., and KERR, W.G. (2008). SH2-inositol phosphatase 1 negatively influences early megakaryocyte progenitors. *PLoS One* 3, e3565.
- PESESSE, X., DELEU, S., DE SMEDT, F., DRAYER, L., and ERNEUX, C. (1997). Identification of a second SH2-domain-containing protein closely related to the phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 697-700.
- PESESSE, X., MOREAU, C., DRAYER, A.L., WOSCHOLSKI, R., PARKER, P., and ERNEUX, C. (1998). The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 displays phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate 5-phosphatase activity. *FEBS Lett* 437, 301-303.
- PETERSON, G.L. (1979). Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 100, 201-220.
- PHEE, H., JACOB, A., and COGGESHALL, K.M. (2000). Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem* 275, 19090-19097.

- PHEE, H., RODGERS, W., and COGGESHALL, K.M. (2001). Visualization of negative signaling in B cells by quantitative confocal microscopy. *Mol Cell Biol* 21, 8615-8625.
- PILLAI, R.S., ARTUS, C.G., and FILIPOWICZ, W. (2004). Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10, 1518-1525.
- PLUK, H., DOREY, K., and SUPERTI-FURGA, G. (2002). Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108, 247-259.
- PLUNKETT, W., GANDHI, V., HUANG, P., ROBERTSON, L.E., YANG, L.Y., GREGOIRE, V., ESTEY, E., and KEATING, M.J. (1993). Fludarabine: pharmacokinetics, mechanisms of action, and rationales for combination therapies. *Semin Oncol* 20, 2-12.
- PODSYPANINA, K., ELLENSON, L.H., NEMES, A., GU, J., TAMURA, M., YAMADA, K.M., CORDON-CARDO, C., CATORETTI, G., FISHER, P.E., and PARSONS, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1563-1568.
- POE, J.C., FUJIMOTO, M., JANSEN, P.J., MILLER, A.S., and TEDDER, T.F. (2000). CD22 forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux. *J Biol Chem* 275, 17420-17427.
- POTTER, C.J., PEDRAZA, L.G., and XU, T. (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol* 4, 658-665.
- PRADHAN, M., and COGGESHALL, K.M. (1997). Activation-induced bi-dentate interaction of SHIP and Shc in B lymphocytes. *J Cell Biochem* 67, 32-42.
- PRATT, J.C., WEISS, M., SIEFF, C.A., SHOELSON, S.E., BURAKOFF, S.J., and RAVICHANDRAN, K.S. (1996). Evidence for a physical association between the Shc-PTB domain and the beta c chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 271, 12137-12140.
- PRINCE, A.L., YIN, C.C., ENOS, M.E., FELICES, M., and BERG, L.J. (2009). The Tec kinases Itk and Rlk regulate conventional versus innate T-cell development. *Immunol Rev* 228, 115-131.
- PUMPHREY, N.J., TAYLOR, V., FREEMAN, S., DOUGLAS, M.R., BRADFIELD, P.F., YOUNG, S.P., LORD, J.M., WAKELAM, M.J., BIRD, I.N., SALMON, M., *et al.* (1999). Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C-gamma1 with PECAM-1/CD31. *FEBS Lett* 450, 77-83.
- PUTNEY, J.W., ed. (2000). *Calcium Signaling* (Florida, CRC Press LLC).
- QI, Q., SAHU, N., and AUGUST, A. (2006). Tec kinase Itk forms membrane clusters specifically in the vicinity of recruiting receptors. *J Biol Chem* 281, 38529-38534.
- RAMEH, L.E., and CANTLEY, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274, 8347-8350.

- RAMEH, L.E., CHEN, C.S., and 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.
- RAMSHAW, H.S., GUTHRIDGE, M.A., STOMSKI, F.C., BARRY, E.F., OOMS, L., MITCHELL, C.A., BEGLEY, C.G., and LOPEZ, A.F. (2007). The Shc-binding site of the beta2 subunit of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors is a negative regulator of hematopoiesis. *Blood* 110, 3582-3590.
- RAUH, M.J., HO, V., PEREIRA, C., SHAM, A., SLY, L.M., LAM, V., HUXHAM, L., MINCHINTON, A.I., MUI, A., and KRYSTAL, G. (2005). SHIP represses the generation of alternatively activated macrophages. *Immunity* 23, 361-374.
- RAUH, M.J., KALESNIKOFF, J., HUGHES, M., SLY, L., LAM, V., and KRYSTAL, G. (2003). Role of Src homology 2-containing-inositol 5'-phosphatase (SHIP) in mast cells and macrophages. *Biochem Soc Trans* 31, 286-291.
- RAUH, M.J., SLY, L.M., KALESNIKOFF, J., HUGHES, M.R., CAO, L.P., LAM, V., and KRYSTAL, G. (2004). The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. *Biochem Soc Trans* 32, 785-788.
- READINGER, J.A., MUELLER, K.L., VENEGAS, A.M., HORAI, R., and SCHWARTZBERG, P.L. (2009). Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunol Rev* 228, 93-114.
- REUTER, C.W., MORGAN, M.A., and BERGMANN, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood* 96, 1655-1669.
- RICKERT, R.C., ROES, J., and RAJEWSKY, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-1318.
- RIKOVA, K., GUO, A., ZENG, Q., POSSEMATO, A., YU, J., HAACK, H., NARDONE, J., LEE, K., REEVES, C., LI, Y., *et al.* (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-1203.
- RODRIGUEZ-VICIANA, P., WARNE, P.H., DHAND, R., VANHAESEBROECK, B., GOUT, I., FRY, M.J., WATERFIELD, M.D., and DOWNWARD, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370, 527-532.
- RODRIGUEZ, A., VIGORITO, E., CLARE, S., WARREN, M.V., COUTTET, P., SOOND, D.R., VAN DONGEN, S., GROCOCK, R.J., DAS, P.P., MISKA, E.A., *et al.* (2007). Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science* 316, 608-611.
- ROHRSCHEIDER, L.R., CUSTODIO, J.M., ANDERSON, T.A., MILLER, C.P., and GU, H. (2005). The intron 5/6 promoter region of the ship1 gene regulates expression in stem/progenitor cells of the mouse embryo. *Dev Biol* 283, 503-521.
- ROHRSCHEIDER, L.R., FULLER, J.F., WOLF, I., LIU, Y., and LUCAS, D.M. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev* 14, 505-520.

- ROOS, J., DIGREGORIO, P.J., YEROMIN, A.V., OHLSEN, K., LIUDYNO, M., ZHANG, S., SAFRINA, O., KOZAK, J.A., WAGNER, S.L., CAHALAN, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- ROSNET, O., BUHRING, H.J., DELAPEYRIERE, O., BESLU, N., LAVAGNA, C., MARCHETTO, S., RAPPOLD, I., DREXLER, H.G., BIRG, F., ROTTAPPEL, R., *et al.* (1996). Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol* 95, 218-223.
- ROZAKIS-ADCOCK, M., FERNLEY, R., WADE, J., PAWSON, T., and BOWTELL, D. (1993). The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85.
- ROZAKIS-ADCOCK, M., MCGLADE, J., MBAMALU, G., PELICCI, G., DALY, R., LI, W., BATZER, A., THOMAS, S., BRUGGE, J., PELICCI, P.G., *et al.* (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689-692.
- RUSCHMANN, J., HO, V., ANTIGNANO, F., KURODA, E., LAM, V., IBARAKI, M., SNYDER, K., KIM, C., FLAVELL, R.A., KAWAKAMI, T., *et al.* Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Exp Hematol* 38, 392-402, 402 e391.
- RUSCHMANN, J., HO, V., ANTIGNANO, F., KURODA, E., LAM, V., IBARAKI, M., SNYDER, K., KIM, C., FLAVELL, R.A., KAWAKAMI, T., *et al.* (2010). Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Exp Hematol* 38, 392-402, 402 e391.
- RUSH, J., MORITZ, A., LEE, K.A., GUO, A., GOSS, V.L., SPEK, E.J., ZHANG, H., ZHA, X.M., POLAKIEWICZ, R.D., and COMB, M.J. (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23, 94-101.
- SAENGER, W., ORTH, P., KISKER, C., HILLEN, W., and HINRICHS, W. (2000). The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch. *Angew Chem Int Ed Engl* 39, 2042-2052.
- SAKAGUCHI, S., FUKUMA, K., KURIBAYASHI, K., and MASUDA, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161, 72-87.
- SAKAI, A., THIEBLEMONT, C., WELLMANN, A., JAFFE, E.S., and RAFFELD, M. (1998). PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 92, 3410-3415.
- SANGER (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website.
- SAOUDI, A., SEDDON, B., HEATH, V., FOWELL, D., and MASON, D. (1996). The physiological role of regulatory T cells in the prevention of autoimmunity: the function of the thymus in the generation of the regulatory T cell subset. *Immunol Rev* 149, 195-216.
- SASAKI, K., MURAKAMI, T., and TAKAHASHI, M. (1989). [Flow cytometric analysis of cell proliferation kinetics using the anti-BrdUrd antibody]. *Gan To Kagaku Ryoho* 16, 2338-2344.

- SATTLER, M., SALGIA, R., SHRIKHANDE, G., VERMA, S., CHOI, J.L., ROHRSCHEIDER, L.R., and GRIFFIN, J.D. (1997). The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. *Oncogene* *15*, 2379-2384.
- SATTLER, M., VERMA, S., BYRNE, C.H., SHRIKHANDE, G., WINKLER, T., ALGATE, P.A., ROHRSCHEIDER, L.R., and GRIFFIN, J.D. (1999). BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* *19*, 7473-7480.
- SAUER, K., and COOKE, M.P. (2010). Regulation of immune cell development through soluble inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate. *Nat Rev Immunol* *10*, 257-271.
- SAWYERS, C.L. (2002). Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell* *1*, 13-15.
- SAXTON, T.M., VAN OOSTVEEN, I., BOWTELL, D., AEBERSOLD, R., and GOLD, M.R. (1994). B cell antigen receptor cross-linking induces phosphorylation of the p21ras oncoprotein activators SHC and mSOS1 as well as assembly of complexes containing SHC, GRB-2, mSOS1, and a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein. *J Immunol* *153*, 623-636.
- SCHAEFER, U., GEHRING, N.H., FUCHS, K.P., SACHS, M., KEMPKES, B., and BIRCHMEIER, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* *149*, 1419-1432.
- SCHARENBERG, A.M., EL-HILLAL, O., FRUMAN, D.A., BEITZ, L.O., LI, Z., LIN, S., GOUT, I., CANTLEY, L.C., RAWLINGS, D.J., and KINET, J.P. (1998). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J* *17*, 1961-1972.
- SCHARENBERG, A.M., and KINET, J.P. (1998). PtdIns-3,4,5-P₃: a regulatory nexus between tyrosine kinases and sustained calcium signals. *Cell* *94*, 5-8.
- SHELL, M.J. (2010). Inositol trisphosphate 3-kinases: focus on immune and neuronal signaling. *Cell Mol Life Sci* *67*, 1755-1778.
- SCHERDIN, U., RHODES, K., and BREINDL, M. (1990). Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration. *J Virol* *64*, 907-912.
- SCHLESSINGER, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* *18*, 273-275.
- SCHLESSINGER, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* *4*, 25-30.
- SCHNAPPINGER, D., and HILLEN, W. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* *165*, 359-369.
- SCHNEIDER, U., SCHWENK, H.U., and 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. *Int J Cancer* *19*, 621-626.

- SCHNITTGER, S., SCHOCH, C., DUGAS, M., KERN, W., STAIB, P., WUCHTER, C., LOFFLER, H., SAUERLAND, C.M., SERVE, H., BUCHNER, T., *et al.* (2002). Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100, 59-66.
- SCHOONBROODT, S., FERREIRA, V., BEST-BELPOMME, M., BOELAERT, J.R., LEGRAND-POELS, S., KORNER, M., and PIETTE, J. (2000). Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol* 164, 4292-4300.
- SCHUBER, F., and LUND, F.E. (2004). Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4, 249-261.
- SECRIST, J.P., BURNS, L.A., KARNITZ, L., KORETZKY, G.A., and ABRAHAM, R.T. (1993). Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* 268, 5886-5893.
- SEEDORF, K., KOSTKA, G., LAMMERS, R., BASHKIN, P., DALY, R., BURGESS, W.H., VAN DER BLIEK, A.M., SCHLESSINGER, J., and ULLRICH, A. (1994). Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C gamma and GRB-2. *J Biol Chem* 269, 16009-16014.
- SHAN, X., CZAR, M.J., BUNNELL, S.C., LIU, P., LIU, Y., SCHWARTZBERG, P.L., and WANGE, R.L. (2000). Deficiency of PTEN in Jurkat T cells causes constitutive localization of Itk to the plasma membrane and hyperresponsiveness to CD3 stimulation. *Mol Cell Biol* 20, 6945-6957.
- SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., and GRAHAM, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16, 869-871.
- SHEEDY, F.J., and O'NEILL, L.A. (2008). Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3, iii50-55.
- SICA, A., LARGHI, P., MANCINO, A., RUBINO, L., PORTA, C., TOTARO, M.G., RIMOLDI, M., BISWAS, S.K., ALLAVENA, P., and MANTOVANI, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18, 349-355.
- SIGLER, A., SCHUBERT, P., HILLEN, W., and NIEDERWEIS, M. (2000). Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and Escherichia coli. *Eur J Biochem* 267, 527-534.
- SIMON, M.A., DODSON, G.S., and RUBIN, G.M. (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* 73, 169-177.
- SKERRA, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli. *Gene* 151, 131-135.
- SKERRA, A. (2003). Das Strep-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung. *Biospektrum* 2, 189-192.

- SKOLNIK, E.Y., LEE, C.H., BATZER, A., VICENTINI, L.M., ZHOU, M., DALY, R., MYERS, M.J., JR., BACKER, J.M., ULLRICH, A., WHITE, M.F., *et al.* (1993). The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J* 12, 1929-1936.
- SLOVAK, M.L., GUNDACKER, H., BLOOMFIELD, C.D., DEWALD, G., APPELBAUM, F.R., LARSON, R.A., TALLMAN, M.S., BENNETT, J.M., STIREWALT, D.L., MESHINCHI, S., *et al.* (2006). A retrospective study of 69 patients with t(6;9)(p23;q34) AML emphasizes the need for a prospective, multicenter initiative for rare 'poor prognosis' myeloid malignancies. *Leukemia* 20, 1295-1297.
- SLY, L.M., HAMILTON, M.J., KURODA, E., HO, V.W., ANTIGNANO, F.L., OMEIS, S.L., VAN NETTEN-THOMAS, C.J., WONG, D., BRUGGER, H.K., WILLIAMS, O., *et al.* (2009). SHIP prevents lipopolysaccharide from triggering an antiviral response in mice. *Blood* 113, 2945-2954.
- SLY, L.M., RAUH, M.J., KALESNIKOFF, J., BUCHSE, T., and KRYSTAL, G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol* 31, 1170-1181.
- SLY, L.M., RAUH, M.J., KALESNIKOFF, J., SONG, C.H., and KRYSTAL, G. (2004). LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* 21, 227-239.
- SMITH, L.D., HICKMAN, E.S., PARRY, R.V., WESTWICK, J., and WARD, S.G. (2007). PI3Kgamma is the dominant isoform involved in migratory responses of human T lymphocytes: effects of ex vivo maintenance and limitations of non-viral delivery of siRNA. *Cell Signal* 19, 2528-2539.
- SMITH, M.L., CAVENAGH, J.D., LISTER, T.A., and FITZGIBBON, J. (2004). Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 351, 2403-2407.
- SMITH, M.T., WANG, Y., KANE, E., ROLLINSON, S., WIEMELS, J.L., ROMAN, E., RODDAM, P., CARTWRIGHT, R., and MORGAN, G. (2001). Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 97, 1422-1426.
- SONG, M., KIM, M.J., HA, S., PARK, J.B., RYU, S.H., and SUH, P.G. (2005). Inositol 5'-phosphatase, SHIP1 interacts with phospholipase C-gamma1 and modulates EGF-induced PLC activity. *Exp Mol Med* 37, 161-168.
- SONG, W.J., SULLIVAN, M.G., LEGARE, R.D., HUTCHINGS, S., TAN, X., KUFRIN, D., RATAJCZAK, J., RESENDE, I.C., HAWORTH, C., HOCK, R., *et al.* (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* 23, 166-175.
- SONGYANG, Z., BLECHNER, S., HOAGLAND, N., HOEKSTRA, M.F., PIWNICA-WORMS, H., and CANTLEY, L.C. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* 4, 973-982.

- SONGYANG, Z., SHOELSON, S.E., CHAUDHURI, M., GISH, G., PAWSON, T., HASER, W.G., KING, F., ROBERTS, T., RATNOFSKY, S., LECHLEIDER, R.J., *et al.* (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- SPARKS, A.B., RIDER, J.E., HOFFMAN, N.G., FOWLKES, D.M., QUILLAM, L.A., and KAY, B.K. (1996). Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1540-1544.
- SPARKS, A.B., RIDER, J.E., and KAY, B.K. (1998). Mapping the specificity of SH3 domains with phage-displayed random-peptide libraries. *Methods Mol Biol* 84, 87-103.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5034-5037.
- STAMBOLIC, V., SUZUKI, A., DE LA POMPA, J.L., BROTHERS, G.M., MIRTOSOS, C., SASAKI, T., RULAND, J., PENNINGER, J.M., SIDEROVSKI, D.P., and MAK, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95, 29-39.
- STANBRIDGE, E.J. (1990). Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24, 615-657.
- STATHOPOULOS, P.B., ZHENG, L., LI, G.Y., PLEVIN, M.J., and IKURA, M. (2008). Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* 135, 110-122.
- STEUDEL, C., WERMKE, M., SCHAICH, M., SCHAKEL, U., ILLMER, T., EHNINGER, G., and THIEDE, C. (2003). Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 237-251.
- STIREWALT, D.L., and RADICH, J.P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3, 650-665.
- STUDIER, F.W., and MOFFATT, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- SUJOBERT, P., BARDET, V., CORNILLET-LEFEBVRE, P., HAYFLICK, J.S., PRIE, N., VERDIER, F., VANHAESEBROECK, B., MULLER, O., PESCE, F., IFRAH, N., *et al.* (2005). Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 106, 1063-1066.
- SUN, H., CHARLES, C.H., LAU, L.F., and TONKS, N.K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75, 487-493.
- SWEENEY, M.C., WAVREILLE, A.S., PARK, J., BUTCHAR, J.P., TRIDANDAPANI, S., and PEI, D. (2005). Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains. *Biochemistry* 44, 14932-14947.

- SWIFT, S., LORENS, J., ACHACOSO, P., and NOLAN, G.P. (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol Chapter 10*, Unit 10 17C.
- SYVANEN, A.C., LANDEGREN, U., ISAKSSON, A., GYLLENSTEN, U., and BROOKES, A. (1999). First International SNP Meeting at Skokloster, Sweden, August 1998. Enthusiasm mixed with scepticism about single-nucleotide polymorphism markers for dissecting complex disorders. *Eur J Hum Genet* 7, 98-101.
- TAGANOV, K.D., BOLDIN, M.P., CHANG, K.J., and BALTIMORE, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12481-12486.
- TAILLON-MILLER, P., GU, Z., LI, Q., HILLIER, L., and KWOK, P.Y. (1998). Overlapping genomic sequences: a treasure trove of single-nucleotide polymorphisms. *Genome Res* 8, 748-754.
- TAKADA, Y., MUKHOPADHYAY, A., KUNDU, G.C., MAHABELESWAR, G.H., SINGH, S., and AGGARWAL, B.B. (2003). Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278, 24233-24241.
- TAKAI, T., ONO, M., HIKIDA, M., OHMORI, H., and RAVETCH, J.V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379, 346-349.
- TAKESHITA, S., NAMBA, N., ZHAO, J.J., JIANG, Y., GENANT, H.K., SILVA, M.J., BRODT, M.D., HELGASON, C.D., KALESNIKOFF, J., RAUH, M.J., *et al.* (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat Med* 8, 943-949.
- TAM, W., BEN-YEHUDA, D., and HAYWARD, W.S. (1997). *bic*, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukemia virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol* 17, 1490-1502.
- TAMIR, I., STOLPA, J.C., HELGASON, C.D., NAKAMURA, K., BRUHNS, P., DAERON, M., and CAMBIER, J.C. (2000). The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory Fc gamma RIIB signals in B cells. *Immunity* 12, 347-358.
- TAPON, N., ITO, N., DICKSON, B.J., TREISMAN, J.E., and HARIHARAN, I.K. (2001). The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 105, 345-355.
- TARASENKO, T., KOLE, H.K., CHI, A.W., MENTINK-KANE, M.M., WYNN, T.A., and BOLLAND, S. (2007). T cell-specific deletion of the inositol phosphatase SHIP reveals its role in regulating Th1/Th2 and cytotoxic responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11382-11387.
- TAYLOR, V., WONG, M., BRANDTS, C., REILLY, L., DEAN, N.M., COWSERT, L.M., MOODIE, S., and STOKOE, D. (2000). 5' phospholipid phosphatase SHIP-2 causes protein kinase B inactivation and cell cycle arrest in glioblastoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 6860-6871.

- TAZZARI, P.L., CAPPELLINI, A., GRAFONE, T., MANTOVANI, I., RICCI, F., BILLI, A.M., OTTAVIANI, E., CONTE, R., MARTINELLI, G., and MARTELLI, A.M. (2004). Detection of serine 473 phosphorylated Akt in acute myeloid leukaemia blasts by flow cytometry. *Br J Haematol* 126, 675-681.
- THAI, T.H., CALADO, D.P., CASOLA, S., ANSEL, K.M., XIAO, C., XUE, Y., MURPHY, A., FRENDEWEY, D., VALENZUELA, D., KUTOK, J.L., *et al.* (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604-608.
- THIEDE, C., KOCH, S., CREUTZIG, E., STEUDEL, C., ILLMER, T., SCHAICH, M., and EHNINGER, G. (2006). Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 107, 4011-4020.
- THIEDE, C., STEUDEL, C., MOHR, B., SCHAICH, M., SCHAKEL, U., PLATZBECKER, U., WERMKE, M., BORNHAUSER, M., RITTER, M., NEUBAUER, A., *et al.* (2002). Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-4335.
- THOMAS, X., and CHELGHOU, Y. (2004). Cigarette smoking and acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 45, 1103-1109.
- THONG, Y.H., and FERRANTE, A. (1979). Inhibition of mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses by tetracycline analogues. *Clin Exp Immunol* 35, 443-446.
- TIBES, R., KORNBLAU, S.M., QIU, Y., MOUSSES, S.M., ROBBINS, C., MOSES, T., and CARPTEN, J.D. (2008). PI3K/AKT pathway activation in acute myeloid leukaemias is not associated with AKT1 pleckstrin homology domain mutation. *Br J Haematol* 140, 344-347.
- TRIDANDAPANI, S., CHACKO, G.W., VAN BROCKLYN, J.R., and COGGESHALL, K.M. (1997a). Negative signaling in B cells causes reduced Ras activity by reducing Shc-Grb2 interactions. *J Immunol* 158, 1125-1132.
- TRIDANDAPANI, S., KELLEY, T., COONEY, D., PRADHAN, M., and COGGESHALL, K.M. (1997b). Negative signaling in B cells: SHIP Grbs Shc. *Immunol Today* 18, 424-427.
- TRIDANDAPANI, S., KELLEY, T., PRADHAN, M., COONEY, D., JUSTEMENT, L.B., and COGGESHALL, K.M. (1997c). Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol Cell Biol* 17, 4305-4311.
- TRIDANDAPANI, S., PHEE, H., SHIVAKUMAR, L., KELLEY, T.W., and COGGESHALL, K.M. (1998). Role of SHIP in Fc gammaRIIb-mediated inhibition of Ras activation in B cells. *Mol Immunol* 35, 1135-1146.
- TRIDANDAPANI, S., PRADHAN, M., LADINE, J.R., GARBER, S., ANDERSON, C.L., and COGGESHALL, K.M. (1999). Protein interactions of Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol phosphatase (SHIP): association with Shc displaces SHIP from Fc gammaRIIb in B cells. *J Immunol* 162, 1408-1414.
- TRIDANDAPANI, S., WANG, Y., MARSH, C.B., and ANDERSON, C.L. (2002). Src homology 2 domain-containing inositol polyphosphate phosphatase regulates NF-kappa B-mediated gene

transcription by phagocytic Fc gamma Rs in human myeloid cells. *J Immunol* 169, 4370-4378.

TU, Z., NINOS, J.M., MA, Z., WANG, J.W., LEMOS, M.P., DESPONTS, C., GHANSAH, T., HOWSON, J.M., and KERR, W.G. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood* 98, 2028-2038.

URLINGER, S., HELBL, V., GUTHMANN, J., POOK, E., GRIMM, S., and HILLEN, W. (2000). The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene* 247, 103-110.

VALDERRAMA-CARVAJAL, H., COCOLAKIS, E., LACERTE, A., LEE, E.H., KRYSAL, G., ALI, S., and LEBRUN, J.J. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* 4, 963-969.

VAN DEN BERG, A., KROESEN, B.J., KOOISTRA, K., DE JONG, D., BRIGGS, J., BLOKZIJL, T., JACOBS, S., KLUIVER, J., DIEPSTRA, A., MAGGIO, E., *et al.* (2003). High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 20-28.

VAN VLIERBERGHE, P., MEIJERINK, J.P., STAM, R.W., VAN DER SMISSEN, W., VAN WERING, E.R., BEVERLOO, H.B., and PIETERS, R. (2005). Activating FLT3 mutations in CD4+/CD8- pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 106, 4414-4415.

VAN WAUWE, J.P., DE MEY, J.R., and GOOSSENS, J.G. (1980). OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol* 124, 2708-2713.

VANDEPUT, F., BACKERS, K., VILLERET, V., PESESSE, X., and ERNEUX, C. (2006). The influence of anionic lipids on SHIP2 phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase activity. *Cell Signal* 18, 2193-2199.

VANDERLAAN, M., and THOMAS, C.B. (1985). Characterization of monoclonal antibodies to bromodeoxyuridine. *Cytometry* 6, 501-505.

VANHAESEBROECK, B., LEEVERS, S.J., AHMADI, K., TIMMS, J., KATSO, R., DRISCOLL, P.C., WOSCHOLSKI, R., PARKER, P.J., and WATERFIELD, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.

VARDIMAN, J.W., THIELE, J., ARBER, D.A., BRUNNING, R.D., BOROWITZ, M.J., PORWIT, A., HARRIS, N.L., LE BEAU, M.M., HELLSTROM-LINDBERG, E., TEFFERI, A., *et al.* (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.

VELAZQUEZ, L., GISH, G.D., VAN DER GEER, P., TAYLOR, L., SHULMAN, J., and PAWSON, T. (2000). The shc adaptor protein forms interdependent phosphotyrosine-mediated protein complexes in mast cells stimulated with interleukin 3. *Blood* 96, 132-138.

VELY, F., OLIVERO, S., OLCESE, L., MORETTA, A., DAMEN, J.E., LIU, L., KRYSAL, G., CAMBIER, J.C., DAERON, M., and VIVIER, E. (1997). Differential association of phosphatases

with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Eur J Immunol* 27, 1994-2000.

VIDAL, M., MONTIEL, J.L., CUSSAC, D., CORNILLE, F., DUCHESNE, M., PARKER, F., TOCQUE, B., ROQUES, B.P., and GARBAY, C. (1998). Differential interactions of the growth factor receptor-bound protein 2 N-SH3 domain with son of sevenless and dynamin. Potential role in the Ras-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 273, 5343-5348.

VIG, M., BECK, A., BILLINGSLEY, J.M., LIS, A., PARVEZ, S., PEINELT, C., KOOMOA, D.L., SOBOLOFF, J., GILL, D.L., FLEIG, A., *et al.* (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* 16, 2073-2079.

WAGENER, C., and MÜLLER, O. (2010). *Molekulare Onkologie* (Stuttgart, Georg Thieme Verlag).

WAHLE, J.A., PARAISSO, K.H., KENDIG, R.D., LAWRENCE, H.R., CHEN, L., WU, J., and KERR, W.G. (2007). Inappropriate recruitment and activity by the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP1) is responsible for receptor dominance in the SHIP-deficient NK cell. *J Immunol* 179, 8009-8015.

WAKSMAN, G., KOMINOS, D., ROBERTSON, S.C., PANT, N., BALTIMORE, D., BIRGE, R.B., COWBURN, D., HANAFUSA, H., MAYER, B.J., OVERDUIN, M., *et al.* (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646-653.

WANG, J.W., HOWSON, J.M., GHANSAH, T., DESPONT, C., NINOS, J.M., MAY, S.L., NGUYEN, K.H., TOYAMA-SORIMACHI, N., and KERR, W.G. (2002). Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science* 295, 2094-2097.

WANG, Z., and MOULT, J. (2001). SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat* 17, 263-270.

WARD, S.G. (2004). Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* 25, 67-74.

WARD, S.G. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* 27, 80-87.

WARD, S.G., and CANTRELL, D.A. (2001). Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 13, 332-338.

WARD, S.G., and MARELLI-BERG, F.M. (2009). Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* 418, 13-27.

WARE, M.D., ROSTEN, P., DAMEN, J.E., LIU, L., HUMPHRIES, R.K., and KRYSTAL, G. (1996). Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood* 88, 2833-2840.

WEST, M.A., and HEAGY, W. (2002). Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 30, S64-S73.

- WHISSTOCK, J.C., WIRADJAJA, F., WATERS, J.E., and GURUNG, R. (2002). The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life* 53, 15-23.
- WISNIEWSKI, D., STRIFE, A., SWENDEMAN, S., ERDJUMENT-BROMAGE, H., GEROMANOS, S., KAVANAUGH, W.M., TEMPST, P., and CLARKSON, B. (1999). A novel SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase (SHIP2) is constitutively tyrosine phosphorylated and associated with src homologous and collagen gene (SHC) in chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *Blood* 93, 2707-2720.
- WOOD, W.B. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* 16, 118-133.
- WU, H. (1920). Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances. *J Biol Chem* 43.
- XIA, H.J., and YANG, G. (2005). Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinases: functions and regulations. *Cell Res* 15, 83-91.
- XIAO, W., NISHIMOTO, H., HONG, H., KITAJURA, J., NUNOMURA, S., MAEDA-YAMAMOTO, M., KAWAKAMI, Y., LOWELL, C.A., RA, C., and KAWAKAMI, T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεpsilonRI. *J Immunol* 175, 6885-6892.
- XU, P., LU, J., LI, Z., YU, X., CHEN, L., and XU, T. (2006). Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 969-976.
- XU, Q., SIMPSON, S.E., SCIALLA, T.J., BAGG, A., and CARROLL, M. (2003). Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood* 102, 972-980.
- XU, R., ABRAMSON, J., FRIDKIN, M., and PECHT, I. (2001). SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5'-phosphatase is the main mediator of the inhibitory action of the mast cell function-associated antigen. *J Immunol* 167, 6394-6402.
- YABLONSKI, D., KADLECEK, T., and WEISS, A. (2001). Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol Cell Biol* 21, 4208-4218.
- YANG, L., LUO, J.M., LIU, X.J., WEN, S.P., DU, X.Y., and YAO, L. (2009a). [Inhibitory effect of lentiviral vector-mediated SHIP gene transfection on proliferation of leukemia K562 cells and PI3K/Akt pathway regulation]. *Ai Zheng* 28, 366-372.
- YANG, L., LUO, J.M., LIU, X.J., WEN, S.P., YANG, J.C., and ZHANG, J.Y. (2009b). [Effects of SHIP gene mutation on cell cycle related proteins and phosphorylated Akt in K562 cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 30, 548-552.
- YI, R., QIN, Y., MACARA, I.G., and CULLEN, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- YOGO, K., MIZUTAMARI, M., MISHIMA, K., TAKENOUCHI, H., ISHIDA-KITAGAWA, N., SASAKI, T., and TAKEYA, T. (2006). Src homology 2 (SH2)-containing 5'-inositol phosphatase

localizes to podosomes, and the SH2 domain is implicated in the attenuation of bone resorption in osteoclasts. *Endocrinology* 147, 3307-3317.

ZAKHAROVA, I.S., SHEVCHENKO, A.I., and ZAKIAN, S.M. (2009). Monoallelic gene expression in mammals. *Chromosoma* 118, 279-290.

ZENG, Y., and CULLEN, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 9, 112-123.

ZENG, Y., and CULLEN, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* 280, 27595-27603.

ZENG, Y., YI, R., and CULLEN, B.R. (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 24, 138-148.

ZHANG, J., RAVICHANDRAN, K.S., and GARRISON, J.C. (2010). A key role for the phosphorylation of Ser440 by the Cyclic AMP-dependent protein kinase in regulating the activity of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase (SHIP1). *J Biol Chem*.

ZHANG, J., WALK, S.F., RAVICHANDRAN, K.S., and GARRISON, J.C. (2009a). Regulation of the Src homology 2 domain-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP1) by the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 284, 20070-20078.

ZHANG, S.J., SHI, J.Y., ZHU, Y.M., SHI, Z.Z., YAN, S., GU, B.W., BAI, X.T., SHEN, Z.X., and LI, J.Y. (2006). The investigation of mutation and single nucleotide polymorphism of receptor tyrosine kinases and downstream scaffold molecules in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 47, 2610-2616.

ZHANG, S.L., YU, Y., ROOS, J., KOZAK, J.A., DEERINCK, T.J., ELLISMAN, M.H., STAUDERMAN, K.A., and CAHALAN, M.D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902-905.

ZHANG, Y., WAVREILLE, A.S., KUNYS, A.R., and PEI, D. (2009b). The SH2 domains of inositol polyphosphate 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 have similar ligand specificity but different binding kinetics. *Biochemistry* 48, 11075-11083.

ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L., and MILLER, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7, 203-214.

ZHAO, S., KONOPLEVA, M., CABREIRA-HANSEN, M., XIE, Z., HU, W., MILELLA, M., ESTROV, Z., MILLS, G.B., and ANDREEFF, M. (2004). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia* 18, 267-275.

ZHENG, Y., JOSEFOWICZ, S.Z., KAS, A., CHU, T.T., GAVIN, M.A., and RUDENSKY, A.Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445, 936-940.

ZHOU, B.P., LIAO, Y., XIA, W., ZOU, Y., SPOHN, B., and HUNG, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.

ZHU, X., KWON, C.H., SCHLOSSHAUER, P.W., ELLENSON, L.H., and BAKER, S.J. (2001). PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* 61, 4569-4575.

ZICK, Y., and SAGI-EISENBERG, R. (1990). A combination of H₂O₂ and vanadate concomitantly stimulates protein tyrosine phosphorylation and polyphosphoinositide breakdown in different cell lines. *Biochemistry* 29, 10240-10245.

7 Anhang

Abkürzungen

Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ash	<i>abundant Src homology</i>
ASH	<i>ASPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated protein)/SPD2 (spindle pole body 2)/hydin</i>
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATRA	all-trans-Retinsäure
BCR	<i>B cell receptor</i>
BCR	<i>breakpoint cluster region</i>
BLNK	<i>B cell linker</i>
BSZT	Blutstammzelltransplantation
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
Cas	<i>Crk-associated substrate</i>
Caspase	<i>cysteine-aspartic acid protease</i>
CBF	<i>core binding factor</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cbl	<i>casitas B-lineage lymphoma</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CEBP α	<i>CCAAT-enhancer-binding protein α,</i>
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cSNP	<i>coding single nucleotide polymorphism</i>
CR3	<i>complement receptor 3</i>
CRAC	<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels</i>
CSC	<i>cancer stem cell</i>
Dab	<i>disabled</i>

DC	Dentritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dd	didestilliert
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
Dok	<i>downstream of kinase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal Growth factor receptor</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
<i>Env</i>	<i>envelope</i>
EPO	Erythropoetin
ERG	<i>Ets Related Gene</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETO	<i>eight twenty one</i>
EVI1	<i>ectrotropic virus integration site site 1</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
f.c.	<i>final concentration</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Flt3	<i>Fms-like tyrosine kinase</i>
FOXO	<i>forkhead box O</i>
FP	Vorwärtsprimer (<i>forward Primer</i>)
Gab	<i>Grb2-associated binder</i>
Gag	<i>group-specific antigen</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3

GST	Glutathion-S-Transferase
HABA	Hydroxyazophenylbenzoesäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSC 70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
Ig	Immunglobulin
I κ B α	inhibitor of <i>NF-κB alpha</i>
IKK	<i>inhibitor of NF-κB kinase</i>
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
I κ k	<i>IL-2-inducible T cell kinase</i>
Jak	Janus-Kinase
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
kb	kiloBasen
kD	kiloDalton
KLF2	<i>krüppel-like factor 2</i>
LacI ^q	<i>Lac repressor I high quantity</i>
LB	<i>lysogeny broth, Luria Bertani</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSC	<i>leukemic stem cell</i>
MAFA	<i>mast cell function-associated antigen</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA, miR	<i>microRNA</i>
MKP	Megakaryozytenvorläufer (<i>megakaryocyte progenitor</i>)
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>

MN1	<i>meningioma 1</i>
MS	Massenspektrometrie
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
MYH11	<i>smooth muscle myosin heavy chain 11</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>natural killer</i>
NPM1	Nukleophosmin 1
OCRL	<i>oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein</i>
OD	optische Dichte
PACT	<i>protein activator of PKR</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDK	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PECAM	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
pI	isoelektrischer Punkt
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT1</i>
PIPP	<i>proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase</i>
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLZF	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne
PTEN	<i>phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10</i>
PI	Phosphatidylinositol
PTP	Proteintyrosinphosphatase
RANKL	<i>receptor activator of nuclaer factor-κB-ligand</i>
RXR	<i>retionoid X receptor</i>

Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RLC	<i>RISC loading complex</i>
RP	Rückwärtsprimer (<i>reverse primer</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SH	Sarcoma(Src)-Homologie
Shc	<i>src homologous and collagen</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol 5-phosphatase</i>
SKICH	<i>SKIP carboxyl homology</i>
SKIP	<i>skeletal muscle- and kidney-enriched inositol phosphatase</i>
SLAM	<i>signaling lymphocyte activation molecule</i>
SLP-65	<i>SH2-binding leukocyte phosphoprotein of 65 kD</i>
SOCE	<i>store-operated Ca²⁺-entry</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Stim1	<i>Stromal interaction molecule 1</i>
TCL	Gesamtzelllysat (<i>total cell lysate</i>)
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPO	Thrombopoetin
TRBP	<i>Tar RNA binding protein</i>
TRE	<i>tet response element</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
v	Volumen (<i>volume</i>)
w	Gewicht (<i>weight</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
ZAP-70	<i>ζ chain-associated protein of 70 kD</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Schema der Hämatopoese.....	5
Abb. 2.2: Der PI3K-Akt-Signalweg und seine negative Regulation durch SHIP1.....	19
Abb. 2.3: Domänenstruktur von SHIP1.....	21
Abb. 2.4: Familie der Inositol-5-Phosphatasen.....	24
Abb. 2.5 Modell zur Signaltransduktion über Grb2 und Interaktion mit SHIP1.....	28
Abb. 2.6: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in Mastzellen...	32
Abb. 2.7: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in B-Lymphozyten.....	35
Abb. 2.8: Inhibitorische Wirkung von SHIP1 auf die Signaltransduktion in T-Lymphozyten.....	39
Abb. 2.9: SHIP1-Mutationen in AML.....	57
Abb. 3.1: Regulation der Genexpression bei bakterieller Tetracyclinresistenz.....	69
Abb. 3.2: Messung einer Antikörperbindung an ein Antigen mithilfe der SPR-Biacore- Technik in Echtzeit.....	107
Abb. 4.1: SHIP1-Expression in transduzierten Jurkat Tet-On-Klonen.....	114
Abb. 4.2: Genomische Sequenzierung der SHIP1-transduzierten Jurkat Tet-On-Klone zur Bestätigung der Mutationen.....	115
Abb. 4.3: Jurkat-Zellen exprimieren kein SHIP1, SHIP2 oder PTEN.....	120
Abb. 4.4: Von SHIP1 katalysierte Reaktion im 5-Phosphatase-Assay.....	121
Abb.: 4.5: Phosphat-Standard als Malachitgrün-Phosphomolybdat-Komplex.....	121
Abb. 4.6: Zeitkinetik der SHIP1-katalysierten Hydrolyse des Phosphats an Position 5 von PtdIns(3,4,5)P ₃ -diC8.....	122
Abb. 4.7: Quantifizierung des rekombinanten SHIP1-Standards.....	123
Abb. 4.8: <i>Western Blots</i> zur Quantifizierung der SHIP1-Mengen im Phosphatase-Assay..	124
Abb. 4.9: Relative SHIP1-5-Phosphatase-Aktivität.....	126
Abb. 4.10: Bestimmung der enzymkinetischen Daten von SHIP1.....	128
Abb. 4.11: Bestimmung der im Phosphatase-Assay eingesetzten SHIP1-Menge pro Immunpräzipitation anhand eines SHIP1-Standards.....	129
Abb. 4.12: Doxycyclin hat keinen Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung.....	131
Abb. 4.13: Auswirkungen der Expression von SHIP1-Mutanten auf die Phosphorylierung von Akt.....	133
Abb. 4.14: Auswirkungen der Expression von SHIP1 P1039S-Mutanten auf die Phosphorylierung von Akt.....	136

Abb. 4.15: pAkt(T308)-Level bei Expression von SHIP1-Mutanten in Jurkat-Zellen.....	137
Abb. 4.16: pAkt(S473)-Level bei Expression von SHIP1-Mutanten in Jurkat-Zellen.....	137
Abb. 4.17: Proliferation von Jurkat Tet-On-Zellen bei verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen.....	138
Abb. 4.18: BrdU-Einbau-basierter Proliferations-Assay über 16 Std.	140
Abb. 4.19: Neubauer-Zählkammer-basierter Proliferations-Assay über 3 Tage.....	141
Abb. 4.20: Quantifizierung der SHIP1-SH2-Domänen.....	142
Abb. 4.21: <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domäne aus IL-3-stimulierten FDC-P1-Zellen...	143
Abb. 4.22: <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domäne aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen.....	144
Abb. 4.23: <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domäne aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen.....	146
Abb. 4.24: <i>Pull-Down</i> mit SHIP1-SH2-Domänen aus GM-CSF-stimulierten TF-1 I33-5-Zellen.....	147
Abb. 4.25: <i>Capturing</i> von Proteinen an den Sensorchip.....	148
Abb. 4.26: Oberflächenplasmonresonanzmessung mit Gesamtzelllysate an SHIP1-SH2- Domänen.....	149
Abb. 4.27: Oberflächenplasmonresonanzmessung mit Phosphopeptid an SHIP1-SH2- Domänen.....	150
Abb. 4.28: Quantifizierung der Grb2-SH3-Domänen.....	151
Abb. 4.29: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1.....	152
Abb. 4.30: Konsensusbindungsmotive der Grb2-SH3-Domänen.....	153
Abb. 4.31: Motive in SHIP1 als mögliche Bindungsstellen für die SH3-Domänen von Grb2.....	154
Abb. 4.32: SHIP1-Mutationen in prolinreichen Regionen.....	154
Abb. 4.33: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1 WT und Mutanten.....	155
Abb. 4.34: Quantifizierung der <i>Pull-Downs</i> mit Grb2-SH3-(N) und Grb2-SH3(C) aus WT-SHIP1- oder SHIP1-Mutanten-exprimierenden Jurkat Tet-On-Lysaten...	156
Abb. 4.35. Interessantes Motiv in SHIP1.....	157
Abb. 4.36: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an fl-SHIP1.....	158
Abb. 4.37: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an SHIP1-Q98-T409 WT und Mutanten...	159
Abb. 4.38: Relative Bindung von Grb2-SH3(N) an SHIP1-Q98-T409 WT und Mutanten	160
Abb. 4.39: Bindung der Grb2-SH3-Domänen an Q1076X-Mutante.....	161
Abb. 4.40: Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 WT und ausgewählten Mutanten.....	162
Abb. 4.41: Quantifizierung der auf Tyrosinphosphorylierung untersuchten eingesetzten SHIP1-Menge.....	163

Abb. 4.42: Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 an Y1021.....	164
Abb. 4.43: Calciumsignale in SHIP1 WT oder -Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen nach OKT3-Stimulation.....	165
Abb. 4.44: Maximale Ratio F_{340}/F_{380} in SHIP1 WT oder -Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen nach OKT3-Stimulation.....	166
Abb. 4.45: Tyrosinphosphorylierung in Gesamtzelllysaten von WT-SHIP1 und ausgewählte SHIP1-Mutanten exprimierenden Jurkat Tet-On-Klonen.....	167
Abb. 5.1: <i>Alignment</i> der AS 1114-1127 von SHIP1 mit einer Sequenz aus Gab2, die an Grb2-SH3(C) bindet.....	175
Abb. 5.2: Konservierung der in dieser Arbeit untersuchten mutierten SHIP1-Aminosäuren in der Familie der humanen Inositol-5-Phosphatasen.....	180
Abb. 5.3: Konservierung der in dieser Arbeit untersuchten mutierten SHIP1-Aminosäuren in SHIP1 verschiedener Spezies.....	181
Abb. 5.4: Modell zur möglichen Funktion von SHIP1-Mutationen von Leukämiepatienten auf die Signaltransduktion in myeloischen Zellen.....	189

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach der <i>French-American-British</i> (FAB)-Klassifizierung.....	7
Tab. 2.2: Einteilung der akuten myeloischen Leukämien nach der WHO (<i>World Health Organization</i>)-Klassifizierung.....	8
Tab. 2.3: Molekulare Ursachen von AML.....	11
Tab. 2.4: Literaturrecherche zur Konsensus-Erkennungssequenz der SHIP1-SH2-Domäne.....	25
Tab. 2.5: SHIP1-Mutationen, die ausschließlich in AML-Patienten gefunden wurden.....	57
Tab. 2.6: <i>Missense</i> -cSNPs im SHIP1-Gen <i>INPP5D</i>	59
Tab. 3.1: Mutagenese-Primer.....	71
Tab. 3.2: Sequenzierungs-Primer.....	73
Tab. 3.3: Primer zur Amplifizierung genomischer DNA.....	75
Tab. 4.1: Exon-Übersicht des humanen SHIP1 Gens <i>INPP5D</i>	116
Tab. 4.2: cSNPs in SHIP1 Exon26.....	117
Tab. 4.3: Genotyp- und Allel-Häufigkeiten des SNP H1168Y in verschiedenen Populationen.....	118
Tab. 4.4: Enzymkinetische Daten für SHIP1 nach Michaelis-Menten, Michaelis-Menten mit Kooperativität und Lineweaver-Burk.....	130
Tab. 4.5: In der Literatur gefundene enzymkinetische Daten für SHIP1.....	130

Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. M. Jücker für die Anleitung und Betreuung der Arbeit sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Prof. Dr. G. W. Mayr möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I durchführen zu können, sowie für die Betreuung meiner Arbeit als Erstgutachter.

Prof. Dr. T. Burmester möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Für das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion bedanken.

Prof. Dr. M. Horstmann und Julia Strauß vom Kinderkrebs-Zentrum Hamburg danke ich für die Bereitstellung der genomischen DNA von AML-Patienten und gesunden Spendern.

Dr. R. Fliegert aus der AG Calciumsignale danke ich für die Möglichkeit der Calciummessungen.

Dr. C. Schulze vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg möchte ich für die Durchführung des Oberflächenplasmonresonanz-Experiments danken.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern, die mein Studium durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben.