

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

- Zelluläre Signaltransduktion -

des Zentrums für Experimentelle Medizin

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. Georg W. Mayr

Die Rolle der Inositol-5-Phosphatase SHIP1 für das Wachstum von Leukämiezelllinien mit konstitutiv aktivierten Tyrosinkinasen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Clarissa Viola Precht

aus Hamburg, Deutschland

Hamburg 2012

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 31.07.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Manfred Jücker

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Boris Fehse

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Martin Horstmann

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	7
2. Einleitung.....	8
2.1 Die Hämatopoese.....	8
2.2. Zytokine und Tyrosinkinaserzeptoren.....	10
2.2.1 Stammzellfaktor und KIT-Rezeptor	11
2.2.2 FLT3-Ligand (FL) und FLT3-Rezeptor (FLT3)	12
2.2.3 <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> (PDGFR)	13
2.3 <i>SH2-containing</i> Inositol-5-Phosphatase 1 (SHIP1).....	15
2.3.1 Struktur von SHIP	15
2.3.2 Isoformen	17
2.3.3 Enzymatische Aktivität	18
2.3.4 Interaktionen	18
2.3.5 Funktionen von SHIP	20
2.3.6 Leukämogenese	23
2.4 Leukämien.....	25
2.4.1 Einteilung und Definition der Leukämien.....	25
2.4.2 Akute myeloische Leukämie	28
2.4.2.1 Leukämogenese der akuten myeloischen Leukämie	31
2.4.2.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie.....	33
2.4.3 Chronische myeloische Leukämie.....	35
3. Material und Methoden.....	36
3.1 Materialien.....	36
3.1.1. Chemikalien	36
3.1.2. Puffer und Stammlösungen.....	36
3.1.3. Antikörper.....	38
3.1.4. Enzyme und Reaktionskits.....	39

3.1.5 Bakterienstämme	39
3.1.6 Nukleinsäuren	39
3.1.6.1 Vektor	39
3.1.6.2 DNA-Oligonukleotide	41
3.1.7 Zelllinien.....	41
3.1.7.1 Kasumi-1	41
3.1.7.2 MV 4-11	42
3.1.7.4 Cole	43
3.1.7.5 K562	44
3.1.7.6 M1.....	45
3.1.7.7 Eol-1	46
3.1.7.8 U937	49
3.1.7.9 293 gp.....	50
3.1.8 Geräte	51
3.1.9 Verbrauchsmaterialien	52
3.2 Methoden	53
3.2.1 Zellkultur	53
3.2.1.1 Stammhaltung und Vermehrung	53
3.2.1.3 Einfrieren von Zellen.....	53
3.2.1.2 Auftauen von Zellen.....	53
3.2.1.4 Färben mit Trypanblau.....	54
3.2.1.5 Wachstumskinetik mit LY 294002.....	54
3.2.1.6 Transiente Lipofectamine TM -Transfektion mit retroviralem Vektor	55
3.2.1.7 Transduktion der Leukämiezelllinien.....	56
3.2.1.8 Sortieren der EGFP-positiven Zellen	56
3.2.1.9 Untersuchung der Zellproliferation: Neubauer-Zählkammer	57
3.2.1.10 Untersuchung der Zellproliferation: BrdU-APC	57

3.2.2 Molekulargenetik	59
3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien.....	59
3.2.2.2 cDNA-Synthese	60
3.2.2.3 RT-PCR	60
3.2.2.4 Agarose-Gel.....	61
3.2.2.5 Sequenzierung.....	62
3.2.3 Bakterienkultur	63
3.2.3.1 Klonierung	63
3.2.3.2 Transformation.....	63
3.2.3.3 Plasmid-Mini-Präparation	64
3.2.3.4 Plasmid-Maxi-Präparation	65
3.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten	65
3.2.4.1 Lysat-Herstellung.....	65
3.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	66
3.2.4.3 Western Blot	66
4. Ergebnisse	69
4.1 Mutationsanalysen der Zelllinien	69
4.2 Analyse des PI3K/Akt-Signalweges in Zelllinien mit konstitutiv aktivierten Tyrosinkinaserzeptoren.....	70
4.2.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges	70
4.2.2 Abhängigkeit der Proliferation von der PI3-Kinase-Aktivität.....	71
4.3 Die Rolle von SHIP1 in Zelllinien mit konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinasen	75
4.3.1 Proliferation der Leukämiezelllinien nach Expression von SHIP1 mit dem Vektor SF91iGpre	75
4.3.1.1 Proliferationsuntersuchungen anhand von Wachstumskinetiken	76
4.3.1.2 Messung der Proliferation mit dem BrdU-APC-Assay.....	81

4.3.2 Akt-Phosphorylierung nach Expression von SHIP1 mit dem Vektor SF91iGpre	88
5. Diskussion	99
5.1 Endogene Expression von SHIP1	100
5.2 Phosphorylierung von Akt	101
5.3 Ektope SHIP1-Expression und deren Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von Akt	102
5.4 Hemmung des Zellwachstums	106
5.4.1 Hemmung des Zellwachstum durch PI3K-Hemmstoff LY294002 ...	107
5.4.2 Proliferationsuntersuchungen nach Transduktion mit SHIP1 und SHIP1-Mutante	108
6. Zusammenfassung	115
7. Literaturverzeichnis	117
8. Anhang	136
8.1 Abkürzungsverzeichnis	136
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	139
8.3 Danksagung	142
8.4 Lebenslauf.....	143
8.5 Eidesstattliche Versicherung	144

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Als Regulatoren des Zellwachstums gelten die von Protoonkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen codierten Proteine. Die Inositol-5-Phosphatase SHIP1 gehört zu den negativen Regulatoren der Wachstum vermittelnden Signalwege in hämatopoetischen und immunologischen Zellen, wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweg. In Versuchen mit dem spezifischen SHIP-Agonisten Pelorol konnte der PI3K/Akt-Signalweg mit all seinen Wirkungen, wie die Mastzell- und Osteoklastenaktivierung, nachweislich gehemmt werden. Mäuse mit einer SHIP1-Defizienz zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl von myeloischen Vorläuferzellen in Knochenmark und Milz aus.

Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit soll daher der Einfluss von SHIP1 auf das Wachstum von verschiedenen Leukämiezelllinien mit konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase untersucht werden. Dazu werden die Zelllinien U937, Cole, Eo1-1, K562, Kasumi-1, MV4-11 und M1 mit Hilfe von Western Blot Analysen auf eine konstitutive Aktivität der PI3-Kinase überprüft. Weiterhin soll untersucht werden, ob die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges durch pharmakologische Inhibitoren, wie LY 294002, oder auch die Expression der Inositol-5-Phosphatase SHIP1 das Wachstum dieser Leukämiezelllinien inhibiert.

SHIP1 soll mit Hilfe des retroviralen Vektors SF91iGpre mit EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) in die Zelllinien eingebracht werden. Als Kontrolle dienen Zellpopulationen, die entweder mit SF91 allein oder mit SF91 mit einer enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante transduziert werden. Bei der enzymatisch inaktiven Form von SHIP1 wurde Asparaginsäure durch Alanin an der Stelle 672 ausgetauscht. Die transduzierten Zellen sollen anhand der EGFP-Expression sortiert und in Hinblick auf ihr Proliferationsverhalten und die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden.

2. Einleitung

2.1 Die Hämatopoese

Als Hämatopoese bezeichnet man die Differenzierung einer pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle bis hin zum Erwerb der charakteristischen Merkmale der reifen, ausdifferenzierten Blutzellen. Durch zellspezifische Genexpression entwickeln die Blutzellen ihren spezifischen Phänotyp (Shivdasani und Orkin, 1996), der für die Erfüllung verschiedener Aufgaben, wie zum Beispiel Transport oder Abwehr verantwortlich ist. Je nach Zelltyp ist die Lebensdauer der Zellen auf Tage bis Monate begrenzt, so dass, um konstante Zellzahlen zu erhalten, eine stetige Neubildung stattfindet. In der Entwicklung der Vertebraten läuft die Hämatopoese in verschiedenen Phasen und unterschiedlichen anatomischen Regionen ab (Tavasoli et al., 1991; Zon et al., 1995). Unterschieden wird dabei zwischen einer ersten primitiven Hämatopoese, die durch kernhaltige Erythrozyten und embryonale Globinketten gekennzeichnet ist und der definitiven Hämatopoese mit kernlosen Erythrozyten und fetalen Globinketten. Bereits 15 - 18 Tage nach der Befruchtung einer menschlichen Eizelle beginnt die Blutbildung im extraembryonalen Mesenchym des Dottersacks. Später erfolgt die Bildung des Blutes in der sogenannten AGM-Region (Aorta-Gonaden-Mesonephros) des Embryos. Zwischen dem 25. und 42. Tag nach der Befruchtung übernimmt die foetale Leber die Hämatopoese. Später verlagert sich die definitive Hämatopoese jedoch in das Knochenmark und in die primären lymphatischen Organe, wo auch im erwachsenen Organismus das Blut gebildet wird.

Die zur Blutbildung benötigten hämatopoetischen Stammzellen, sind sehr seltene ($1 \text{ pro } 10^5$ Knochenmarkszellen) mononukleäre Zellen, die sich durch eine langsame Zellzykluspassage auszeichnen. Sie haben die Fähigkeit sich entweder selbst zu erneuern (*self-generation*), also neue hämatopoetische Stammzellen zu bilden oder sich in alle reifen Effektorzellen des Blutes zu differenzieren. Die Differenzierung kann von der hämatopoetischen Stammzelle aus zwei Wege einschlagen: entweder es entstehen die Vorläuferzellen der lymphoiden Reihe (CLP: *common lymphoid progenitor*) oder es bilden sich die Vorläuferzellen der

myeloiden Reihe (CMP: *common myeloid progenitor*) (Metcalf et al., 2007). Aus diesen multipotenten Vorläuferstufen entstehen wiederum verschiedene unipotente Vorläuferzellen, die in die jeweiligen Blutzelllinien differenzieren können. So entstehen aus den CLPs letztendlich B- oder T-Lymphozyten und aus den CMPs Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen oder Mastzellen. Wahrscheinlich werden bis zu einer vollständigen Differenzierung 10-15 Teilungen benötigt (Zhu und Emersen, 2002). Die verschiedenen Zelllinien lassen sich innerhalb der Differenzierungshierarchie durch phänotypische Eigenschaften, ihre Morphologie, Ausstattung an speziellen Enzymen, Oberflächen-Antigenen und der Expression bestimmter Gene unterscheiden.

Die Prozesse der Selbsterneuerung, Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind im hämatopoetischen System streng reguliert. Cashmann, Eaves und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Zellzykluszahl von in Langzeitkulturen, wie „human long-term marrow cultures (LTMC)“, gehaltenen Progenitorzellen bei Mediumwechsel anstieg. Bei Progenitorzellen, die nicht in LTMC kultiviert wurden, konnte kein schnelleres Durchlaufen des Zellzyklus festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass der als konstitutive Hämatopoese bezeichnete Prozess unter der Kontrolle der Knochenmark-Mikroumgebung, die auch als Knochenmarkstroma bezeichnet wird, steht (Cashmann and Eaves, 1985; Clark and Keating et al., 1995; Klein, 1995; Mayani, 1996). Dabei handelt es sich um eine komplexe Struktur aus verschiedenen Zelltypen, extrazellulären Matrixproteinen und hämatopoetischen Regulatorproteinen, den sogenannten Zytokinen. Das Überleben, die Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen kann dabei über Zell-Zell-Interaktionen mit den Stromazellen, über Adhäsion an die Extrazellulärmatrix und über Zytokine reguliert werden.

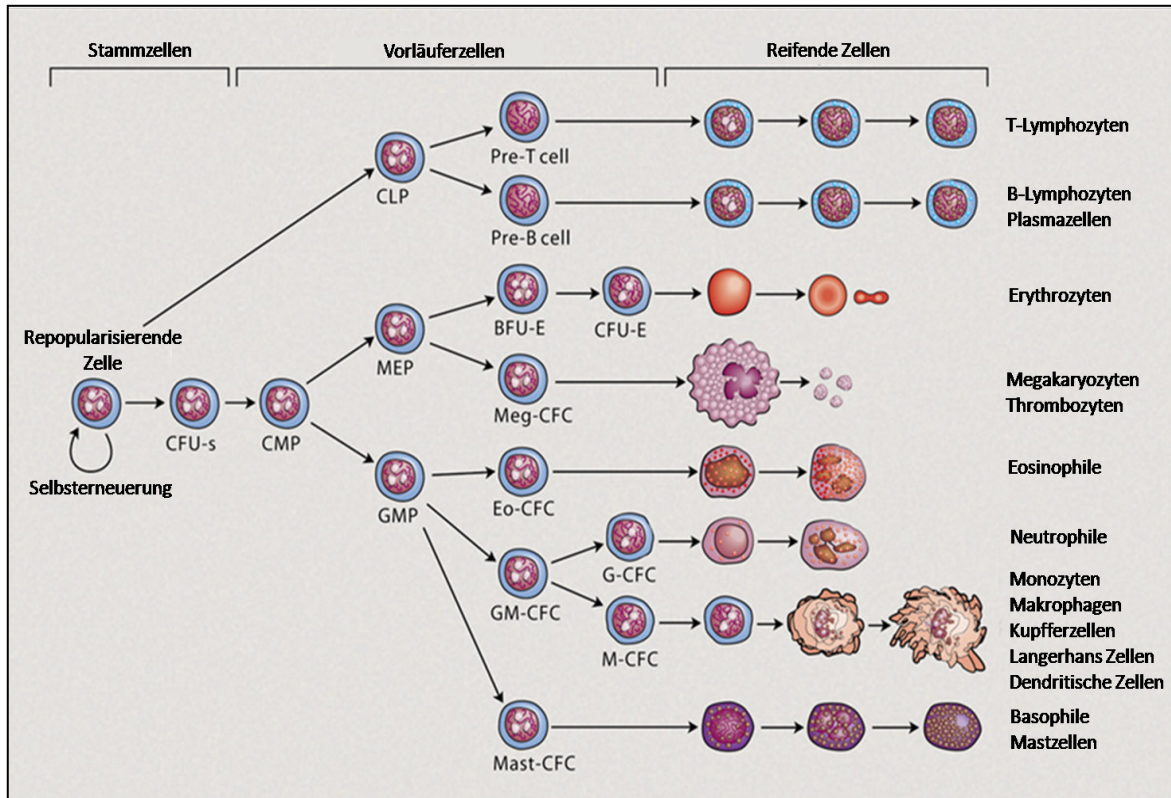


Abb. 1: Darstellung der Hämatopoese

Folgende Abkürzungen wurden verwendet: CFU bzw. CFC, Kolonienformende Einheiten (colony-forming units, bzw. cells). CFU-s, colony-forming unit-spleen (Milz); CMP, Myeloide Vorläuferzelle (common myeloid progenitor); CLP, Lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor); MEP, Megakaryozyten-Erythrozyten Vorläuferzelle (megakaryocyte-erythroid progenitor); GMP, Granulozyten-Makrophagen Vorläuferzelle (granulocyte-macrophage progenitor); BFU-E, burst-forming unit-erythroid; Meg, Megakaryozyten; Eo, Eosinophile; G, Granulozyten; M, Makrophagen. Metcalf et al, 2007, verändert.

2.2. Zytokine und Tyrosinkinaserzeptoren

Bei der Regulation der Hämatopoese spielen Zytokine, wie zum Beispiel Stammzellfaktor (SCF), auch c-kit-Ligand genannt oder FLT3-Ligand, und ihre jeweiligen Tyrosinkinaserzeptoren KIT bzw. FLK2/FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*), eine wichtige Rolle. Mutationen in Ligand oder Rezeptor führen zum Beispiel zu einer Abnahme der absoluten Zahl der hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) und können unter Umständen Leukämien auslösen (Oostendorp, 2003).

2.2.1 Stammzellfaktor und KIT-Rezeptor

Die Bindung von SCF an den KIT-Rezeptor ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors, was zu einer erhöhten katalytischen Aktivität der Tyrosinkinasedomäne und zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten führt. An diese Reste können dann Adaptermoleküle und intrazelluläre Kinasen, wie die PI3-Kinase oder die Lyn-Kinase, binden, die dann die weiteren Signalwege aktivieren (Koch et al., 1991; Furitsu et al., 1993; Longley et al., 1999). Beispielsweise phosphoryliert die PI3-Kinase im Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg (PI3K/Akt) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃). PtdIns(3,4,5)P₃ agiert als *second messenger* und rekrutiert *pleckstrin homology domain-containing* Adapter und Kinasen, wie PDK1, Akt, PLC-γ und DOK, an die Plasmamembran (Cully et al., 2006). Die *phosphatidyl dependent kinase-1* (PDK-1) phosphoryliert die Kinase Akt (Proteinkinase B), die verschiedene proliferationssteigernde Signalkaskaden aktiviert und proapoptische Signalwege hemmt. Weitere Signalwege verlaufen einerseits über die Januskinasen (JAK) und die sogenannten „*Signal Transducer and Activators of Transcription*“ (STAT-Proteine, STAT3 und STAT5), dem JAK/STAT- Signalweg, und andererseits über den Ras/Raf/MAP-Kinase („*mitogen-aktiviert protein kinase*“) -Signalweg.

Über die Signalmodulation kann SCF die Signale anderer Zytokine, wie zum Beispiel Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin-3 (IL-3) oder Erythropoetin (EPO), verstärken (Linnekin et al., 1999).

Mutationen im SCF-Rezeptor KIT werden in einigen Tumoren, wie zum Beispiel bei der Mastozytose, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) oder der akuten myeloischen Leukämie (AML) gefunden. Diese Mutationen führen häufig zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Asou et al., 1991; Furitsu et al., 1993; Nagata et al., 1995; Fletcher and Rubin, 2007). Ein Verlust beider Genloci, sowohl für SCF als auch für den Rezeptor ist letal (Ashman et al., 1999; Oostendorp, 2003).

2.2.2 FLT3-Ligand (FL) und FLT3-Rezeptor (FLT3)

Der FLT3-Ligand und sein Rezeptor weisen Ähnlichkeiten zu SCF und seinem Rezeptor auf. Der FLT3-Rezeptor gehört zu der Klasse III der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und wird vor allem in primitiven, CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen, Pro-B-Zellen und unreifen CD4⁺CD8⁻-Thymozyten exprimiert. Die mRNA des FLT3-Liganden kann in fast allen hämatopoetischen Zelllinien gefunden werden. Der FL wird jedoch primär in Prä-B-Zellen und monozytären und myeloiden Zelllinien exprimiert (Brasel et al., 1995; Meierhoff et al., 1995; Sheijen und Griffin, 2002). Der FLT3-Ligand steigert zusammen mit einer Reihe von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel GM-CSF, IL-3 oder TNF (Tumornekrosefaktor), die Produktion von hämatopoetischen Progenitorzellen und dendritischen Zellen (DC). Außerdem ist FL in der Lage das Überleben von späten myeloiden Vorläuferzellen zu unterstützen (Nicholls et al., 1999).

Im menschlichen Organismus folgen auf die Stimulierung des FLT3-Rezeptors durch den FLT3-Liganden eine direkte Assoziation mit Grb2 und Socs1, die Phosphorylierung von Cbl, CblB, Shc, SHIP, Shp2, Gab1, Gab2 und STAT5a und die Aktivierung des Ras/Raf/MAP-Kinase-Signalweges (Lavagna-Sevenier et al., 1998; Zhang und Broxmeyer, 2000; Zhang et al., 2000). Im Gegensatz zu FLT3 in der Maus hat FLT3 im Menschen keine Konsensussequenz am Carboxylende, die die p85-Untereinheit der PI3-Kinase (p85-PI3K) binden kann (Zhang und Broxmeyer, 1999). Stattdessen wurde beschrieben, dass die p85-PI3K an phosphoryliertes Shp2, SHIP, Gab1, Cbl und CblB bindet. Die STAT5-Signale werden im Gegensatz zur KIT-Signalkaskade nur über STAT5a und nicht über STAT5b vermittelt (Zhang et al., 2000; Oosterdorp, 2003).

Nakao und Mitarbeiter konnten 1996 in 5 von 30 AML-Patientenproben eine interne Tandemduplikation (ITD) im FLT3-Gen beobachten, die eine Verlängerung der Juxtamembrandomäne verursacht. Weitere Studien konnten zeigen, dass sich in 17-27% der de novo AML-Fälle bei Erwachsenen, in 14-17% der kindlichen AML-Fälle, in 3-5% der myelodysplastischen Syndrome (MDS), in 20% der akuten Promyelozytenleukämie und in 3% der pädiatrischen akuten lymphatischen

Leukämie (ALL) eine ITD in dem FLT3-Rezeptor findet (Kiyoi et al., 1997; Meshinchi et al., 2001; Rombouts et al., 2000; Xu et al., 1999; Parcels et al., 2006). Das Vorhandensein einer ITD in FLT3 korreliert mit schlechteren Überlebenschancen der Patienten (Sheijen und Griffin, 2002). Weiterhin wurde in 7% der AML- und in 3% MDS- und ALL-Fälle eine D835-Punktmutation (Missense-Mutation), bei der ein für die Struktur wichtiges Aspartat in der Aktivierungsschleife der zweiten Tyrosinkinasedomäne ausgetauscht wird, gefunden (Abu-Duhier et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Parcels et al., 2006).

2.2.3 Platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)

PDGFR α und PDGFR β sind zwei sehr ähnliche Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III. Die beiden Kinasedomänen sind zu 85 % identisch, die eingeschobene Kinasedomäne (KI) und der C-Terminus jedoch nur zu 27 % (Matsui et al., 1989). Der PDGF-Rezeptor bildet nicht nur zwischen der α - und β -Untereinheit Homo- und Heterodimere, sondern dimerisiert auch mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) (Saito et al., 2001). PDGF unterstützt die Zellteilung, vor allem in mesenchymalen Zellen, die Migration und die Differenzierung.

Die PDGF-Rezeptoren werden von Fibroblasten, frühen Makrophagen-Vorläuferzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Osteoblasten gebildet. PDGFR β wird außerdem von multipotenten Stammzellen, Mastzellen, myeloiden Zelllinien und von T- und NK-Zellen exprimiert (de Parseval et al., 1993).

Es ist bekannt, dass PDGFR α und PDGFR β an Fusionsgenen beteiligt sind, die zu hämatologischen Erkrankungen führen. PDGFR α kann, wie auch weiter unten beschrieben, mit FIP1L1 fusionieren, was in einem idiopathischen hypereosinophilen Syndrom oder einer chronischen eosinophilen Leukämie resultiert (Cools et al. 2003; Stover et al., 2006). Ein großer Teil der chronischen myelomonozytären Leukämien (CMML) weist die Translokation t(5;12)(q33;p13) auf, die das Fusionsprotein TEL-PDGFR β generiert (Golub et al., 1994). Andere Translokationspartner von PDGFR β in CMML sind beispielsweise „*Huntingtin*

interacting protein 1“ (HIP1) und Rabaptin5 (Magnusson et al., 2001; Ross et al., 1998).

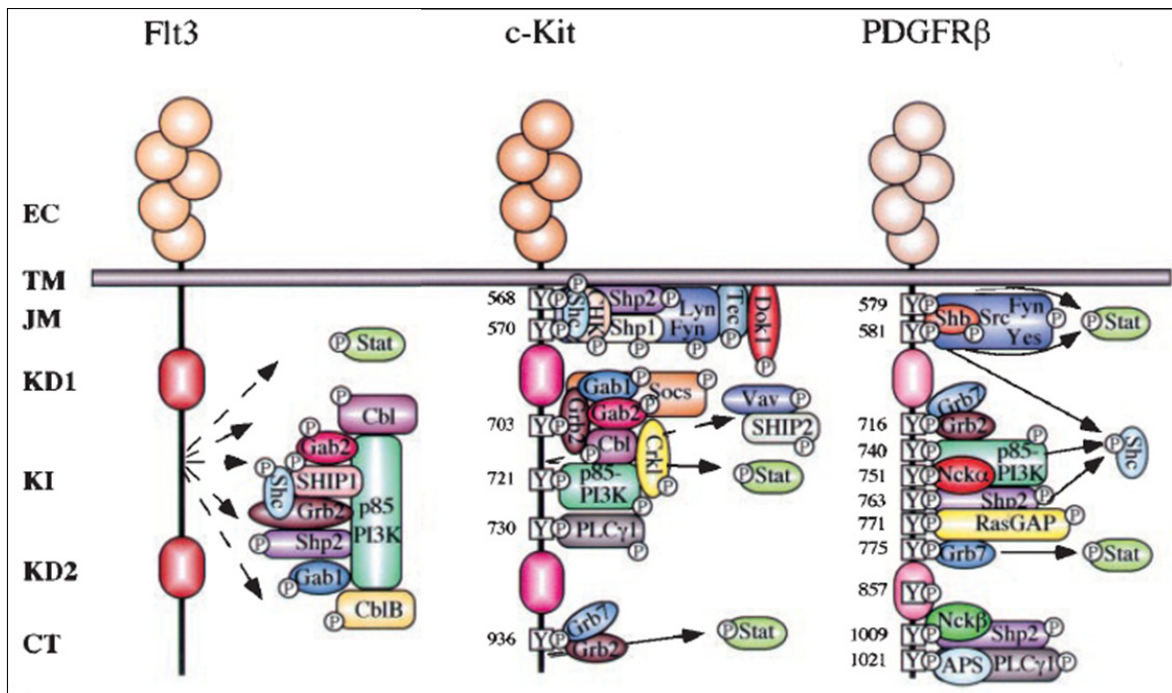


Abb. 2: Hypothetische Interaktionen von Signalmolekülen mit menschlichen Klasse III Rezeptortyrosinkinasen (RTK)

Klasse III RTK sind charakterisiert durch fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen in der Extrazellulärregion (EC) des Rezeptors, gefolgt von einer Transmembran- (TM) und einer Juxtamembran- (JM) Domäne, einer geteilten Kinasedomäne (KD), die eine eingeschobene Kinaseregion (KI) enthält, und ein c-terminales Ende (CT). Zur Autophosphorylierung befähigte Regionen sind zusammen mit ihren potentiellen Interaktionspartnern und Effektormolekülen dargestellt. Unterbrochene Pfeile weisen auf Substratphosphorylierung durch unidentifizierte Phosphotyrosinbindungsstellen hin. Durchgehende Pfeile zeigen indirekte Mechanismen der Phosphorylierung. (Scheijen and Griffin, 2002, modifiziert)

Nach der Aktivierung der beschriebenen Tyrosinkinase-Rezeptoren können Signalwege wie der JAK/STAT-, der Ras/Raf/MAP-Kinase- und der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg durch negative Regulatoren unterbrochen werden, von denen bislang vier verschiedene Gruppen bekannt sind. Sie greifen durch unterschiedliche Mechanismen in die negative Signalgebung ein. Die Existenz einer Src-Homologie-Domäne-2 (SH2-Domäne)

(Schaffhausen 1995) deutet bei allen Mitgliedern dieser vier Gruppen darauf hin, dass tyrosinphosphorylierte Proteine die Angriffspunkte für die Unterdrückung der Signalkaskade darstellen. Die negativen Regulatoren der Zytokin-vermittelten Signalgebung wurden als Tyrosinphosphatasen (z.B. Shp-1/HCP) (Yi et al., 1993), Kompetitoren der STAT-Bindung an den aktivierten Rezeptor (z.B. CIS) (Yoshimura et al., 1995; Matsumoto et al., 1997) und Inhibitoren der JAKs (z.B. JAB, Socs oder SSI) (Endo et al., 1997; Starr et al., 1997; Naka et al., 1997) identifiziert. Es wurde ein weiteres Protein beschrieben, das dieser Gruppe von negativen Regulatoren der cytokinvermittelten Signalgebung in hämatopoetischen Zellen zugerechnet wird. Dieses Protein wurde wegen seiner strukturellen und enzymatischen Eigenschaften „*SH2*-Domäne beinhaltende *Inositol-5-Phosphatase* (*SHIP/SHIP1*)“ genannt (Damen et al., 1996; Kavanaugh et al., 1996; Lioubin et al., 1996).

2.3 *SH2*-containing Inositol-5-Phosphatase 1 (SHIP1)

Die *SH2*-containing Inositol-5-Phosphatase 1 (SHIP1) ist ein negativer Regulator der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen. Ursprünglich wurde SHIP von verschiedenen Arbeitsgruppen in Blutzellen, nach Stimulation mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, als phosphoryliertes ~145 kDa Protein identifiziert (Damen et al, 1993; Kavanaugh and Williams, 1994; Lioubin et al., 1994; Liu et al,1994).

2.3.1 Struktur von SHIP

Das SHIP-Protein besteht aus 1189 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 133 kDa (Damen et al., 1996; Kavanaugh et al., 1996; Lioubin et al., 1996; Geier et al., 1997). Des Weiteren enthält SHIP mehrere Struktur motive, die für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung sind. Dazu gehört die aminoterminal gelegene *SH2*-Domäne, die mit Phosphotyrosinresten, interagieren kann (Schaffhausen et al., 1995). Die zentrale katalytische Domäne

der 5-Phosphatase umfasst ungefähr 450 Aminosäuren. Das carboxyterminale Ende ist ungefähr 350 Aminosäuren lang und enthält zwei NPXY-Motive, die nach Tyrosinphosphorylierung Bindungsstellen für *phosphotyrosine binding* – Domänen (PTB-Domänen) sind. Die Spezifität dieser Bindungsmotive wird durch die Sequenzumgebung des Tyrosinrestes bestimmt (Songyang et al., 1993). Außerdem befinden sich im carboxyterminalen Bereich von SHIP mehrere prolinreiche Sequenzen (PxxP-Motive), die potentielle Bindungsstellen für Moleküle mit SH3-Domänen, wie zum Beispiel Grb2, darstellen. Dem etwa 300 Aminosäuren großen Abschnitt zwischen der N-terminalen SH2-Domäne und der Phosphatase-Domäne konnte bislang noch keine Funktion zugeordnet werden (Rohrschneider et al., 2000). SHIP ist ein allosterisches Enzym, dessen enzymatische Aktivität durch spezifische Effektoren moduliert und durch Bindung des eigenen Produktes inhibiert werden kann (Ong et al., 2007). Es wurde eine C2-Domäne identifiziert, die sich in dem carboxyterminalen Ende der Phosphataseregion befindet (Abb. 3). Die C2-Domäne interagiert mit Phospholipiden und ist für die Bindung von SHIP1 an Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) verantwortlich. Eine SHIP1-Mutante, der die C2-Domäne fehlt, kann zwar Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) dephosphorylieren, jedoch nicht die eigene katalytische Aktivität durch die Bindung von PIP₂ steigern (Ong et al., 2007)

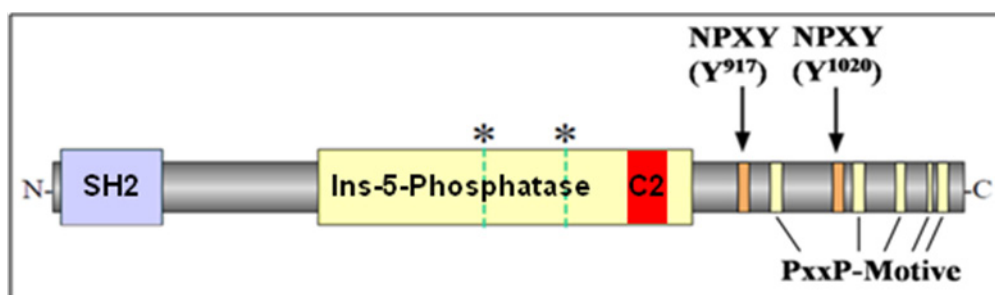


Abb. 3: SH2-containing Inositol-5-Phosphatase (SHIP)

SHIP enthält eine N-terminale SH2-Domäne, eine 5-Phosphatase-Domäne. Die Funktion der Region zwischen der SH2- und der Inositol-5-Phosphatase-Domäne ist ungeklärt. Die zwei Sterne über der Phosphatase-Domäne markieren die Stellen, die homolog zu den anderen Inositol-5-phosphatasen sind. Die C2-Domäne interagiert mit Phospholipiden und ist für die Bindung von SHIP 1 an Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PIP₂) verantwortlich. Weiterhin gehören zu SHIP zwei NPXY-Motive (orange dargestellt) und mehrere PxxP-Motive (gelb dargestellt). Die PxxP-Motive mit den schmalen gelben Banden sind weniger homolog zu SH3-Bindungsstellen. (Rohrschneider et al, 2000, Condé et al., 2011, modifiziert)

2.3.2 Isoformen

Von SHIP existieren verschiedene Isoformen, die mit Hilfe von Polyacrylamidgelen entdeckt wurden (Kavanaugh et al., 1996; Geier et al., 1997; Damen et al., 1998). Die größte Form hat ein Molekulargewicht von 145 kDa und wird hauptsächlich in reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die nächsten Proteinbanden wurden bei 135 kDa und zwischen 100 und 120 kDa detektiert. (Geier et al., 1997; Damen et al., 1998; Rohrschneider et al., 2000; Horn et al., 2001). Weiterhin wurde in Mäusen eine Isoform mit 104 kDa identifiziert, die in embryonalen Stammzellen und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und im Gegensatz zu der 145 kDa- SHIP-Isoform keine SH2-Domäne besitzt (s-SHIP) (Tu et al., 2001). Ohne SH2-Domäne kann s-SHIP keine Interaktion mit Shc eingehen, interagiert jedoch mit Grb2 (Tu et al., 2001). Nguyen et al., zeigten nun, dass s-SHIP nicht nur in Stammzellen vorkommt, sondern auch in reifen hämatopoetischen Zellen eine funktionelle Rolle spielt (Nguyen et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass je nach Reifegrad der hämatopoetischen Zellen, die verschiedenen Isoformen (145 kDa, 135 kDa, 110 kDa) unterschiedlich exprimiert werden (Geier et al., 1997, Lucas et al., 1999). Mögliche Mechanismen für die Entstehung dieser Isoformen sind alternatives Spleißen der mRNA, Proteolyse oder posttranslationale Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierungen (Rohrschneider et al., 2000).

Horn et al. konnten zeigen, dass die in menschlichen und murinen Knochenmark-Zellen beobachteten C-terminal trunkierten SHIP-Isoformen mit Molekulargewichten von 100 kDa - 120 kDa nur in vitro Artefakte sind, die bei der Zellyse entstehen. Durch Lyse der Zellen mit heißem SDS-Puffer konnte die Bildung dieser SHIP-Isoformen verhindert werden (Horn et al., 2001). Die Entstehung der C-terminal trunkierten SHIP-Isoformen ist wahrscheinlich auf die Freisetzung einer Serin-Protease aus Zellkompartimenten während der Zellyse mit Detergentien zurückzuführen, so dass diesen Formen keine physiologische Bedeutung beigemessen werden kann (Horn et al., 2001).

2.3.3 Enzymatische Aktivität

SHIP gehört zu einer Familie der Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasen, die Phosphatreste an der 5-Position des Inositolringes abspalten (Majerus et al., 1999). Das über Interaktionen seiner SH2-Domäne an die Plasmamembran rekrutierte SHIP spaltet das zuvor von der PI3-Kinase phosphorylierte Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns(3,4)P₂), sowie das Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (Ins(1,3,4,5)P₄) zu Inositol-1,3,4-trisphosphat (Ins(1,3,4)P₃). Dabei benötigt SHIP eine 3-Phosphatgruppe an dem Inositolring des PIP₃, um das 5-Phosphat abspalten zu können (Damen et al., 1996). In anderen Arbeiten hatte die Tyrosinphosphorylierung keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von SHIP1, die nur durch Translokation des Proteins an die Membran reguliert wurde (Phee et al. 2000). Akt ist ein Ziel der SHIP-abhängigen Modulation von PtdIns(3,4,5)P₃. Akt bindet über Pleckstrin Homologie Domänen an PtdIns(3,4,5)P₃, wodurch es an die Zytoplasmamembran relokalisiert wird. Die Aktivierung von Akt erfolgt dann über die duale Phosphorylierung von Threoninrest 308 und Serinrest 473.

Die Phosphatase PTEN (*3-inositol phosphatase und tensin homolog*) hydrolysiert ebenfalls das Produkt der PI3-Kinase PtdIns(3,4,5)P₃. Es entsteht jedoch PtdIns(4,5)P₂. PTEN wird im Gegensatz zu SHIP1 ubiquitär exprimiert und ist ein hoch aktives Enzym, das die basalen PtdIns(3,4,5)P₃-Level über dynamische Interaktionen mit der Plasmamembran reguliert (Vazquez und Devreotes, 2006).

2.3.4 Interaktionen

Die Interaktionen von SHIP mit anderen Molekülen sind vielfältig. Über die N-terminale SH2-Domäne bindet SHIP tyrosinphosphorylierte Proteine wie Shc (Damen et al., 1996), Gabs (*Grb2-associated binders*) (Koncz et al., 2001; Liu et al., 2001), Doks (*downstream of tyrosine kinases*) (Lemay et al., 2000; Dunant et al., 2000), SHP-2 (*SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*) (Liu et al., 1997; Sattler et al., 1997), c-Cbl (Yogo et al., 2006) und LAT (*linker for*

activation of T-cells) (Roget et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Onkogen bcr/abl die Bildung eines SHIP1-SHP2-Komplexes begünstigt, an den es auch selbst bindet (Sattler et al., 1997).

Weiterhin bindet SHIP über die SH2-Domäne an dem ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), das zum Beispiel in dem zytoplasmatischen Teil des Rezeptors FcγRIIb liegt. Dieser Schritt ist eine wichtige Komponente der hemmenden Signalkaskade in B-Zellen, die über den FcγRIIb-Rezeptor vermittelt wird (Ono et al., 1996; Aman et al., 2001). ITIM ist außerdem ein Teil des *killer cell inhibitor-Rezeptor* (KIR) auf Natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen (Saito et al., 1998) und dem KIR-like-Rezeptor gp49B1 auf Mastzellen (Kuroiwa et al., 1998).

Über die tyrosinphosphorylierten NPXY-Motive in SHIP1 kann Shc mit der PTB-Domäne an SHIP binden. Die prolinreichen Sequenzen von SHIP dienen zu Assoziation mit den SH3-Domänen von Grb2 (Damen et al., 1996; Jücker et al., 1997). Durch eine zusätzliche Interaktion von Shc mit der SH2-Domäne von Grb2 kann ein heterotrimerer Shc/Grb2/SHIP-Komplex entstehen, der unter Umständen mit dem Shc/Grb2/SOS-Komplex konkurriert (Harmer und DeFranco, 1999). Der Shc/Grb2/SOS-Komplex wird unter anderem für die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs benötigt. Durch eine konkurrierende Bindung von entweder SHIP oder SOS an den Shc/Grb2-Komplex, würde es zu einer Blockade der Ras-Aktivierung kommen (Saxton et al., 1994; Tridandapani et al., 1997). Eine andere mögliche Erklärung für die Bindung von SHIP an Shc/Grb2 wäre, dass SHIP mit Hilfe dieser Adapterproteine an verschiedene Stellen im Zellinneren, wie zum Beispiel an die Zellmembran, gelangen könnte (Rohrschneider et al., 2000).

Die PI3-Kinase (PI3K α , β , δ (class IA); PI3K γ (Class IB)) ist ein heterodimeres Enzym, das aus einer katalytischen Untereinheit von 110 Kilodalton (kDa) und einer regulatorischen Untereinheit von 85 kDa besteht. Die p85 α -Untereinheit besitzt zwei Src-Homologiedomänen 2 (SH2-Domänen), die mit Phosphotyrosinresten interagieren können (Songyang et al., 1993). Eine entsprechende Sequenz schließt sich direkt an den C-terminalen Tyrosinrest des ersten NPXY-Motivs von SHIP1 an (NPXpYIG). Experimente mit dem GST-p85 SH2-Fusionsprotein haben gezeigt, dass diese Domäne die komplette

tyrosinphosphorylierte SHIP1-Isoform p145 bindet, jedoch nicht die p135 SHIP-Isoform (Gupta et al., 1999; Lucas und Rohrschneider et al., 1999)

2.3.5 Funktionen von SHIP

SHIP1 wird in differenzierten hämatopoetischen Zellen, in hämatopoetischen Stammzellen, in embryonalen Stammzellen und in Endothelzellen exprimiert (Kerr et al., 1996; Damen et al., 1996; Tu et al., 2001; Zippo et al., 2004). Bislang wurde angenommen, dass SHIP1, im Gegensatz zu SHIP2 lediglich im Zytoplasma zu finden ist (Deleris et al., 2003; Nalaskowski et al., 2011). Nalaskowski und Mitarbeiter konnten jetzt nachweisen, dass auch SHIP1 ein nukleäres-zytoplasmatisches Shuttleprotein ist und zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) besitzt. Nukleäres SHIP1 ist teilweise in der Nähe von FLASH lokalisiert, welches an aktiven Transkriptionsstellen der RNA-Polymerase II zu finden ist. Die enzymatische Aktivität kann für nukleäres SHIP genauso wie für zytoplasmatisches nachgewiesen werden. Inaktivierung eines oder auch beider NLS führte zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums (Nalaskowski et al., 2011).

SHIP spielt in der negativen Regulation der B-Zellen eine wichtige Rolle. Nach Bindung eines Antigens an den B-Zell-Rezeptor (BCR) wird die Proliferation der B-Zellen aktiviert. Nach ausreichender Immunantwort wird das Proliferationssignal durch den Fc γ RIIB-Rezeptor unterbrochen (Muta et al., 1994; Daeron et al., 1995). Der Fc γ -Rezeptor bindet an das Fc-Fragment, der von den B-Zellen produzierten Antikörper, wodurch es zu einer Quervernetzung des BCR mit dem Fc γ -Rezeptor über einen Antigen/Antikörper-Komplex kommt. Dieses führt zu der Phosphorylierung eines ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) genannten Bereiches im cytoplasmatischen Teil des Fc γ -Rezeptors, an welchen die SH2-Domäne von SHIP bindet (Tridandapani et al., 1997; Unkeless und Jin 1997; Ono et al., 1996; Isnardi et al., 2006). Durch diese Bindung gelangt das eigentlich im Zytoplasma lokalisierte SHIP über sogenannte *lipid rafts* an die Plasmamembran (Aman et al., 2001). *Lipid rafts* sind Membranmikrodomänen, die

in der Plasmamembran lokalisiert sind. Sie bestehen aus einem Gemisch von Glycosphingolipiden, freiem Cholesterin und gesättigten Phospholipiden (Harder und Simons, 1997). Die Fc γ RIIB-abhängige Hemmung der BCR-Signaltransduktion benötigt den Komplex von Fc γ RIIB/SHIP1. SHIP wird durch diese Interaktion phosphoryliert und kann mit Grb2/SOS um die Bindung an das phosphorylierte Protein Shc konkurrieren. Dadurch wird der aktivierte Ras-Signalweg in den B-Zellen unterbrochen, sodass die Proliferation gestoppt wird (Tridandapani et al., 1997).

Durch die SHIP1-knockout-Maus (SHIP1^{-/-}) konnte gezeigt werden, dass SHIP eine wichtige Rolle für die normale Funktion der verschiedenen hämatopoetischen Zellen spielt (Kerr et al., 2008). Helgason und Mitarbeiter beobachteten, dass die SHIP-knockout-Maus durchaus lebensfähig und fertil ist, jedoch eine verkürzte Lebensspanne aufweist, die auf eine Infiltration der Lungen durch Makrophagen zurückzuführen ist. Nach 14 Wochen waren nur noch 40 % der Mäuse am Leben. Die Mäuse entwickelten einen Phänotyp, der den myeloproliferativen Syndromen (MPS) ähnlich ist. Durch die massive Proliferation der Vorläuferzellen von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen kommt es zu einer Verdrängung der geregelten Hämatopoese des Knochenmarks mit Reduktion der erythroiden und lymphoiden Vorläuferzellen und zu einer ausgeprägten Größenzunahme von Lymphknoten und Milz. Die myeloiden Vorläuferzellen wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Wachstumsfaktoren GM-CSF (*granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*) und Interleukin-3 (IL-3) auf, woraus Helgason schloss, dass SHIP1 eine bedeutende Rolle in der negativen Regulation der Zytokin-vermittelten Signalwege in hämatopoetischen Zellen spielt (Helgason et al., 1998).

Weiterhin konnten Huber et al. zeigen, dass SHIP1 die Mastzelldegranulation unterdrückt. Mastzellen werden unter anderem durch den Antikörper IgE aktiviert, der mit seinem Fc-Teil an den IgE-spezifischen Rezeptor Fc ϵ RI auf den Mastzellen bindet. Durch die Quervernetzung der IgE-Antikörper nach Bindung von multivalentem Antigen wird die Signalkaskade des Fc-Rezeptors aktiviert, was zu einem Calciumeinstrom in die Zelle und damit zu einer Ausschüttung der Histamin-haltigen Granula der Mastzellen führt. Die Mastzellen, denen beide

SHIP-Allele fehlten, zeigten eine deutlich stärkere Aktivierung mit Degranulation als die Mastzellen, bei denen das SHIP-Gen nicht deaktiviert war (Huber et al., 1998).

Wang und Mitarbeiter generierten eine SHIP-defiziente Maus, bei der sie feststellten, dass die Zahl der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aufgrund einer längeren Überlebensspanne deutlich erhöht war. Der NK1.1-Rezeptor wurde zehnfach stärker exprimiert als in SHIP-positiven Mäusen. Western Blot Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression von Akt, p-Akt und auch Bcl2 in SHIP^{-/-}-Mäusen, was auf eine Aktivierung der PI3-Kinase hinweist. Weiterhin beschrieben Wang et al, dass die Rekrutierung von SHIP in Mäusen durch den inhibitorischen Rezeptor Ly49 analog zu der Rekrutierung durch KIR in den Menschen verläuft und dass offenbar dieses, das *in vivo*-Überleben und die Effektorfunktion der NK-Zellen limitiert. In Transplantationsversuchen mit MHC-inkompatiblem Knochenmark konnten Wang et al. zeigen, dass die Wildtypmäuse das Knochenmark abstießen und die Transplantation nicht überlebten. Die SHIP-defizienten Mäuse hingegen stießen das Knochenmark nicht ab und entwickelten in den meisten Fällen auch keine Transplantat-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host disease*). Wang et al. schlugen daraufhin vor, die SHIP-Aktivität vor einer Knochenmarkstransplantation zu hemmen (Wang et al., 2002).

SHIP-defiziente Mäuse weisen außerdem eine erhöhte Anzahl von Osteoklasten und Osteoklasten-Vorläuferzellen auf, die auf eine verlängerte Lebensspanne der Zellen und auf eine Sensitivitätssteigerung in Bezug auf den *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und den NFκB-Liganden (RANKL) zurückzuführen ist (Takeshita et al., 2002). Bei den SHIP^{-/-}-Mäusen, die von Takeshita und Mitarbeitern untersucht wurden, kam es daher zu einer erhöhten Resorption des Knochens, so dass davon auszugehen ist, dass SHIP ein negativer Regulator der Osteoklasten ist und somit die Abwesenheit dieses Enzyms zu einer schweren Osteoporose führt (Takeshita et al., 2002).

Severin et al. konnten nachweisen, dass SHIP in Mäusen die Plättchenaggregation positiv beeinflusst. SHIP-defiziente Mäuse wiesen eine verlängerte Blutungszeit nach Verletzungen auf. Die Thrombozyten dieser Mäuse

zeigten große Membranausläufer, ein verändertes offenes canaliculäres System und eine verminderte Rate an Zellinteraktionen (Severin et al., 2007).

2.3.6 Leukämogenese

Der PI3-Kinase-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Regulation von Zellwachstum, Überleben und Differenzierung. Die konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs ist ein wichtiger Faktor für die Krebsentstehung. In etwa 30 % aller menschlichen Krebsarten, so auch häufig in den Zellen der akuten myeloischen Leukämie, konnte eine Mutation in einem der Mitglieder des PI3K-Signalwegs gefunden (wie zum Beispiel PTEN oder SHIP1) werden (Gilby et al., 2007). Lou und Mitarbeiter entdeckten bei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) eine dominant-negative Mutation von SHIP1. Dabei handelte es sich um eine somatische Mutation in dem Codon 684, bei der die Aminosäure Valin durch Glutamat ausgetauscht wurde. Das Codon liegt im 2. Signaturmotiv, welches die Phosphataseaktivität beinhaltet. Dadurch kommt es zu einer reduzierten katalytischen Aktivität von SHIP1 (Luo et al., 2003). Weitere Mutationsanalysen ergaben, dass 22 % (7/32) der AML- und 12 % (1/9) der ALL (akute lymphatische Leukämie)-Patienten eine SHIP1 Mutation aufweisen (Luo et al., 2004). Gilby und Mitarbeiter konnten die oben genannten Mutationen in kaukasischen AML-Patienten nicht bestätigen. Sie fanden zwei Sequenzalterationen: Eine Substitution in Exon 26 (H1168Y; c.3501 C>T) in 16/57 (28 %) AML und in 6/22 (27 %) gesunden Probanden und eine in Exon 4 (R156Q; c.466 G>A) in 1/57. Diese Veränderung wurde in den gesunden Probanden nicht gefunden. Weiterhin fanden sie sechs, die Aminosäuresequenz nicht verändernde, Einzelnukleotidmutationen, davon wurde nur eine nicht auch in den gesunden Individuen gefunden (Lys1106Lys; c.3317 G>A). 34 untranslatierte Sequenzveränderungen konnten in Introns, 5'UTR (*untranslated region*) und 3'UTR identifiziert werden. Der Großteil dieser Veränderungen wurde auch in den gesunden Individuen gefunden. Sechs der untranslatierten Alterationen wurden nur in AML-Patienten bestätigt (c.198-30 T>C, c.520+37 G>A, c.830+19 C>T, c.831-43 C>T, c.2593-99 G>A, c.*5 C>T) (Gilby et al., 2007).

In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass es bei einem Verlust von PTEN in T-Zellen zu letalen T-Zell-Lymphomen kommt. In B-Zellen konnte diese Beobachtung sowohl für PTEN als auch für SHIP1 nicht gemacht werden. Miletic und Mitarbeiter beschäftigten sich daher mit einer Mauslinie, der sowohl die Funktion von PTEN als auch der SHIP1 in den B-Zellen fehlt (bPTEN/SHIP -/-), und zeigten damit, dass so letale B-Zell-Lymphome hervorgerufen werden konnten. Diese Studie zeigt, dass PTEN und SHIP1 kooperieren, um B-Zell-Lymphome zu unterdrücken, so dass die Autoren darauf schlossen, dass SHIP1 ein Tumorsuppressor sein könnte (Miletic et al., 2010).

Die miRNA miR-155 entsteht durch die Transkription der BIC Gens, welches aufgrund der Überexpression im diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom entdeckt wurde (Eis et al., 2005). Transgene Mäuse, die miR-155 überexprimieren, entwickeln lymphoblastische Leukämien (Constinean et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass SHIP1 das primäre Ziel von miR-155 ist, welches eine spezifische Sequenz in der 3'UTR-Sequenz erkennt (Constinean et al., 2009; O'Connell et al., 2009; Pedersen et al., 2009). Der Phänotyp der Maus, die miR-155 überexprimiert, ist dem der SHIP-defizienten Maus sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen wird, dass eine Überexpression von miR-155 den gleichen Effekt hat, wie ein Verlust von SHIP1 (O'Connell et al., 2009). Die Unterdrückung von SHIP1 durch miR-155 konnte in den Zellen eines Patienten mit diffusem B-Zell Lymphom gezeigt werden. Die Überexpression von miR-155 wird durch die gesteigerte autokrine Produktion von TNF- α verursacht. Durch einen TNF- α -Antagonisten wird die Expression von miR-155 herunterreguliert und die Expression von SHIP1 gesteigert, wodurch das Zellwachstum reduziert wird (Pedersen et al., 2009). MiR-155 ist ebenfalls in den Zellen von Patienten mit AML überexprimiert (O'Connell et al., 2008). Die SHIP1-Expression ist bei dieser Leukämie häufig stark reduziert (Lou et al., 2003; Condé et al., 2011)

Bei 90% der Patienten mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML) hat eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 21 stattgefunden, das als Philadelphia-Chromosom bezeichnet wird. Hierdurch entsteht ein Bcr/Abl- Fusionsprotein, das die Abl Tyrosinkinase beinhaltet. Sattler et al. und auch Ruschmann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese

Tyrosinkinase für eine reduzierte Expression von SHIP1 in CML-Zellen verantwortlich ist (Sattler et al., 1999; Ruschmann et al., 2010). SHIP1 wird entweder direkt durch Bcr/Abl oder indirekt durch die, durch Bcr/Abl aktivierte, Src Kinase phosphoryliert. Wahrscheinlich wird SHIP1 dann durch die E3 Ligase c-Cbl polyubiquitiniert und schlussendlich im Proteasom degradiert (Ruschmann et al., 2010).

Ein weiteres Protoonkogen, das SHIP1 herunterreguliert, ist Tax, ein virales Protein, das in den Zellen der adulten T-Zell-Leukämie eine Rolle spielt (Fukuda et al., 2005). Diese Leukämie wird durch die HTLV-1 Infektion ausgelöst. Die Expression von SHIP1 wird in der Phase der Transkription durch die Tax induzierte NF- κ B-Aktivierung verringert (Fukuda et al., 2009).

Kennah und Mitarbeiter identifizierten eine Reihe von Molekülen, die an die C2-Domäne von SHIP1 binden und dessen katalytische Aktivität verstärken (*small molecule agonists*). Einer der SHIP1 Aktivatoren, AQX-MN100, konnte erfolgreich zur Behandlung einer multiplen Myelom-Zelllinie *in vitro* genutzt werden. Es zeigten sich eine reduzierte Akt-Phosphorylierung, erniedrigtes Zellwachstum und gesteigerte Apoptose. Die Aktivatoren agieren in Synergie mit anderen Medikamenten, die bereits zur Therapie des multiplen Myeloms zugelassen sind, wie zum Beispiel Dexamethason und Bortezomib (Kennah et al., 2009).

2.4 Leukämien

2.4.1 Einteilung und Definition der Leukämien

In der Hämatopoese geht von der hämatopoetischen Stammzelle die Produktion der reifen Blutzellen aus (Shivdasani und Orkin, 1996). Es folgen die multi- und unipotenten Vorläuferzellen, die in ihrer Differenzierungskapazität schon eingeschränkt sind, und am Ende stehen die voll ausdifferenzierten Blutzellen. Die hämatopoetische Stammzelle besitzt die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, so dass immer für einen ausreichend großen Stammzellpool mit einer potenten Hämatopoese gesorgt ist. Wenn die Balance zwischen der Differenzierung der

Stammzelle und der Selbsterneuerung aus dem Gleichgewicht gerät, kann daraus eine Leukämie resultieren.

Bei einer Leukämie handelt es sich dementsprechend um eine maligne Erkrankung der Zellen des hämatopoetischen Systems. Es liegt dabei eine systematisierte, diffuse und autonome Proliferation einer Leukozytenlinie vor. Die Expansion eines malignen Zellklons, ausgehend von einer leukämischen Stammzelle (*leukemic stem cell; LSC*) führt zu einer generalisierten Ausbreitung im blutbildenden Knochenmark, eventuellen Infiltration in extramedulläre Organe und Ausschwemmung der Zellen in das Blut (McCulloch et al., 1979; Fialkow et al., 1987b). Entstanden ist der Begriff Leukämie, was so viel bedeutet wie „weißes Blut“, aus der Beobachtung, dass sich nach dem Zentrifugieren des Blutes von Leukämiepatienten eine verbreiterte Leukozytenmanschette (buffy coat) auf der Erythrozytensäule bildet.

In Deutschland erkranken jährlich ca. 10.000 Menschen an Leukämien. Man teilt Leukämien in zwei Gruppen ein: in die chronischen und die akuten Leukämien. Die akuten Leukämien zeichnen sich durch einen Block in der Differenzierung aus und man findet hauptsächlich Blasten-Vorstufen. Aufgrund ihrer raschen Progression können sie unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tode führen. Im Gegensatz dazu differenzieren die leukämischen Zellen bei einer chronischen Leukämie noch aus, wodurch man eine erhöhte Zahl an reifen Blutzellen findet. Die chronischen Leukämien schreiten langsam voran, so dass die Patienten meist erst Jahre nach Beginn symptomatisch werden. Durch das Auftreten eines sogenannten Blastenschubes kann die Erkrankung jedoch plötzlich in eine akute Phase übergehen.

Weiterhin unterscheidet man zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien, die auf die jeweiligen Zelltypen zurückzuführen und aufgrund verschiedener Oberflächenmarker zu unterscheiden sind.

Die verschiedenen Leukämieformen weisen unterschiedliche Altersgipfel auf. So steigt die Inzidenz der chronischen Leukämien ab etwa dem fünfzigsten Lebensjahr stark an. Sie sind im Gegensatz zu der akuten myeloischen Leukämie (AML) in der Regel nicht im Kindes- und jungen Erwachsenenalter zu finden. Auch

bei der AML steigt die Inzidenz im Alter stark an, jedoch darf man diese Form der Leukämie bei jungen Erwachsenen nicht von vorneherein ausschließen. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine Erkrankung des Kindesalters. Der "Elimination of Leukemia Fund (ELF)" berichtet 2002, dass in den entwickelten Ländern mehr Kinder im Alter zwischen 2 und 15 Jahren an Leukämie verstorben sind als an irgendeiner anderen Krankheit.

Auffällig werden Leukämiepatienten im Allgemeinen durch Symptome, die auf die Komplikationen einer Panzytopenie zurückzuführen sind. Dazu gehören ein reduzierter Allgemeinzustand mit Schwäche, Müdigkeit, und Antriebsarmut, eine Anämie mit Blässe, Herzrasen, Schwindel und Atemnot, eine Blutungsneigung (Zahnfleischbluten, Nasenbluten, petechiale Einblutungen), eine Anfälligkeit für Infektionen, Fieber, Lymphknotenschwellung, eine Leber- und Milzvergrößerung (Hepato- und Splenomegalie), Gingivahypertrophie, Fundusveränderungen, Knochen- und Gelenkbeschwerden. Im fortgeschrittenen Stadium können die Leukämiezellen außerdem Organe wie Niere, Lunge und das Gehirn befallen. Die Symptomatik resultiert in der Regel aus der Verdrängung der normalen Knochenmarksfunktionen durch übermäßige Einlagerung der leukämischen Zellen. So ist die Blutarmut auf eine mangelnde Erythropoese (verringerte Sauerstofftransportkapazität), die Blutungsneigung auf eine insuffiziente Thrombozytenproduktion und die Infektionsneigung auf eine stark verminderte Granulopoese und gestörte Lymphozytopoese zurückzuführen. Schwellung der Lymphknoten und Hepatosplenomegalie resultieren aus einer übermäßigen Einwanderung der leukämischen Zelle in die jeweiligen Gewebe.

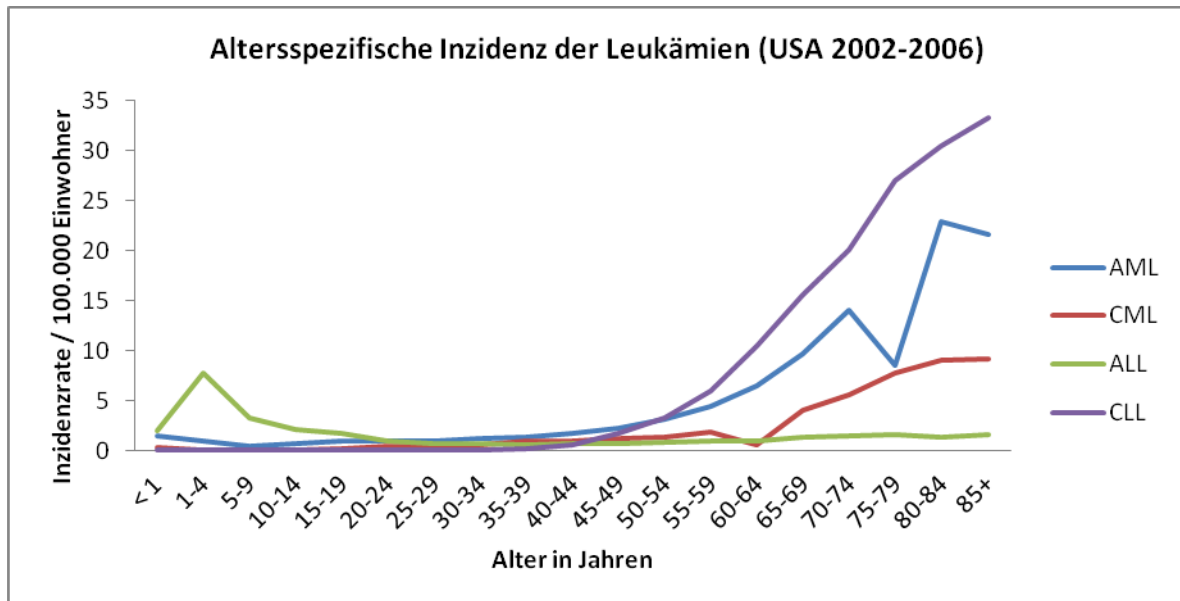


Abb. 4: Altersspezifische Inzidenz von Leukämien in den USA von 2002 - 2006

Auf der Ordinate ist die Inzidenz pro 100.000 Einwohner aufgetragen. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Altersgruppen dargestellt. Akute lymphatische Leukämie (grün, ALL); Akute myeloische Leukämie (blau, AML); Chronische myeloische Leukämie (rot, CML); Chronische lymphatische Leukämie (violett, CLL). Es lässt sich erkennen, dass die ALL als einzige Leukämie ihren Altersgipfel im Kindesalter hat, während die drei anderen dargestellten Leukämietypen ihren Altersgipfel im hohen Erwachsenenalter haben. Quelle: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute, USA.

2.4.2 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) wird definiert als eine maligne, klonale Neoplasie der hämatopoetischen Zellen, bei der es zu einer Akkumulation anormal differenzierter, nicht reifer myeloider Zellen kommt. Es kann jede myeloide Zelllinie betroffen sein und Variationen treten außerdem bei dem Reifungsgrad der leukämischen Blasten auf, was die Krankheit sehr heterogen werden lässt (Gililand et al., 2004; Hope et al, 2003). Da die Blastenzellen einer AML in ihrer Proliferationskapazität limitiert sind, nimmt man an, dass der leukämische Klon durch die Selbsterneuerungsfähigkeit einer kleinen Population von leukämischen Stammzellen (LSC) unterhalten wird.

Die akute myeloische Leukämie hat in Deutschland eine Inzidenz von 3 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr und ist mit einem Anteil von 80% die häufigste Leukämie im Erwachsenenalter. Das mediane Alter bei Diagnosestellung beträgt 65 Jahre und es erkranken mehr Männer als Frauen (5:3). Die AML zeichnet sich durch ein rasches Voranschreiten aus und kann unbehandelt innerhalb weniger Monate zum Tod durch unbeherrschbare Infektionen oder innere Blutungen führen.

Im Blutausschlag und Knochenmark eines AML-Patienten lassen sich wenig differenzierte oder undifferenzierte Blasten mit großen atypischen Nukleolen und schmalen, basophilen Plasmasaum finden. Ein Fehlen der mittleren Entwicklungsstufe ist typisch und wird als „Hiatus leucaemicus“ bezeichnet. In bis zu 25% der Fälle können Auerbachstäbchen im Zytoplasma entdeckt werden. Dabei handelt es sich um verdichtete basophile Granulationen, die nur bei einer AML und nicht bei einer ALL auftreten und damit Richtungsweisend für die weitere Diagnostik sein können.

Da die akute myeloische Leukämie eine sehr heterogene Erkrankung ist, wurden verschiedene Einteilungsverfahren entwickelt. Hier exemplarisch dargestellt ist die Einteilung nach morphologischen Kriterien der *French-American-British-Group* (FAB) in sieben AML Subtypen (Bennett et al., 1976; 1985).

Tabelle 1: Einteilung der AML-Subtypen nach der *French-American-British-Group* (FAB)

AML Subtypen	Prozent der AML	Zytogenetik (nur die häufigsten Abberationen)
M0 Undifferenzierte akute Leukämie	selten	
M1 AML ohne Ausreifung	20	t(9;22)
M2 AML mit Ausreifung	30	t(8;21)
M3 Promyelozyten Leukämie	5	t(15;17)
M4 Akute myelomonozytäre Leukämie a) ohne Eosinophilie b) mit Eosinophilie	30	Inv/del(16) bei M4eo
M5 Akute monozytäre Leukämie a) undifferenziert b) differenziert	10	a) t/del(11) b) t(8;16)
M6 Akute Erythroleukämie	selten	
M7 Akute megakaryozytäre Leukämie	selten	

Quelle: Bennett et al., 1976; 1985

2.4.2.1 Leukämogenese der akuten myeloischen Leukämie

Die Tumorgenese im Menschen ist ein mehrstufiger Prozess (Hanahan und Weinberg, 2000). Auch bei hämatopoetischen Zellen müssen nacheinander mehrere genetische Veränderungen auftreten, damit eine Leukämie resultieren kann. So führt zum Beispiel die Expression von PML-RAR α , das mit der Translokation t(15;17) in der akuten Promyelozyten-Leukämie assoziiert ist, in transgenen Mausmodellen erst mit einer langen Latenz von 6 Monaten und länger und nur einer unvollständigen Penetranz von 15 – 30% zu einer Leukämie (Brown et al., 1997; Grisolano et al., 1997; He et al., 1997).

Es wurden verschiedene Mutationen charakterisiert, die zu der Entstehung einer akuten Leukämie führen können. Allein 80% der AML-Fälle weisen mindestens eine chromosomale Neuordnung auf (Pandolfi et al., 2001).

Ein typisches Charakteristikum der AML ist der Block in der Differenzierung, der zu einer Akkumulation von mindestens 20% Blasten im Knochenmark führt (Gilliland und Tallman, 2002). Der Differenzierungsblock wird in der Regel durch Mutationen in Genen, die für Transkriptionsfaktoren codieren, ausgelöst (Pandolfi et al., 2001; Tenen et al., 2003). Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktorkomplex „core-binding factor“ (CBF), der aus den Proteinen AML1 und CBF β besteht und bei dem viele verschiedene mögliche Mutationen nachgewiesen werden konnten. AML1 ist in die frühe Hämatopoese involviert, ansonsten sind die spezifischen Funktionen eher unbekannt (Speck und Gilliland, 2002). Es gibt verschiedene chromosomale Neuordnungen, die CBF betreffen: Die chromosomale Translokation t (8; 21) ist in 12 – 15 % der AML-Fälle detektierbar und ist assoziiert mit dem FAB Subtyp M2. Die Inversion inv(16) ist pathognomonisch für AML-M4 mit Eosinophilie und macht 8 – 10 % der AML-Fälle aus. Weiterhin wurden bislang mehr als 12 verschiedene Translokationen gefunden, die den CBF-Komplex betreffen und insgesamt etwa in 25 % der AML-Fälle zu finden sind (Speck und Gilliland, 2002).

Damit ein maligner Zellklon dominant wird, muss er eine signifikante Wachstumssteigerung oder eine niedrigere Apoptoserate als die normale

Zellpopulation aufweisen. Zu einer Steigerung der Wachstumsrate kommt es in der Regel nach Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. Bei Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass in AML-Proben die Rezeptortyrosinkinasen Flt-3 und c-kit regelmäßig mutiert und damit konstitutiv aktiviert sind (Reilly et al., 2003). Aktivierende Mutationen des Flt-3-Rezeptors befinden sich in 17 – 26 % der AML-Fälle als Interne Tandemduplikation in der Juxtamembrandomäne und in etwa 7 % der Fälle als Punktmutation D835 in der Aktivierungsschleife (Parcells et al., 2006).

Die Wachstumsfaktorrezeptortyrosinkinase c-kit wird in 80 % der beschriebenen AML-Fälle exprimiert (Ikeda et al., 1991; Lyman und Jacobsen, 1998) und ist aber nur in einem kleinen Teil der Fälle mutiert (Gari et al., 1999). Die Proliferationssteigerung resultiert dabei aus der Reaktion des Rezeptors auf seinen Liganden, den Stammzellefaktor (*stem cell factor*, SCF) (Ikeda et al., 1991; Lyman und Jacobsen, 1998).

Eine der wichtigsten Fähigkeiten, die die leukämischen Stammzellen (LSC) mit den hämatopoetischen Stammzellen gemeinsam haben, ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Warner et al., 2004). Aus den Ergebnissen von *in vivo* Transplantationsstudien konnte gedeutet werden, dass das Selbsterneuerungspotential der LSC signifikant höher ist als das der HSC (Bonnet und Dick, 1997; Cashman et al., 1997).

Wie bereits erwähnt werden mehrere Mutationen im Genom einer Zelle benötigt, damit sich eine Leukämie manifestieren kann. Die Umgehung des natürlichen Zelltodes (Apoptose) gilt dabei als eines der Schlüsselereignisse, denn mit Verlängerung des Lebens einer Zelle erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, Mutationen zu entwickeln.

Ein Unterschied in der Höhe der Apoptoserate findet sich zum Beispiel zwischen myelodysplastischen Syndromen (MDS) und akuten myeloischen Leukämien. Der Übergang von einem MDS in eine AML ist assoziiert mit einem relativen Anstieg der Expression von antiapoptotischen gegenüber proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Davis und Greenberg, 1998), was darauf hindeutet, dass Gene, die

das Überleben einer Zelle regulieren, eine wichtige Rolle in der Leukämogenese spielen (Warner et al., 2004).

Die Replikationsfähigkeit einer normalen Zelle ist begrenzt durch die Länge der Telomere der DNA (Hayflick et al., 1997). Im Gegensatz zu den meisten menschlichen Körperzellen zeigen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen etwas Telomeraseaktivität (Broccoli et al., 1995; Engelhardt et al., 1997), was jedoch das Verkürzen der Telomere nur vermindert, nicht aber verhindern kann, so dass auch die Telomere von hämatopoetischen Zellen mit dem Alter kürzer werden (Rufer et al., 1999).

Da die Proliferationskapazität von leukämischen Stammzellen (LSC) stark gesteigert ist, ist ein essentieller Schritt zur Entstehung einer Leukämie, die Erhaltung der Telomerfunktion (Hanahan und Weinberg, 2000). In 70 % der AML-Fälle findet sich eine erhöhte Telomeraseaktivität (Ohyashiki et al., 2002).

2.4.2.2 Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Die derzeitige Standardtherapie der akuten myeloischen Leukämie unterteilt sich in 2 Phasen: die Induktionstherapie und die Postremissionstherapie. Nach der Einschätzung des Therapierisikos (Zytogenetik der Leukämie, Allgemeinzustand, Herz-Kreislauf- und andere Erkrankungen, vorherige Bluttransfusionen, Schwangerschaften, Medikamentenallergien, Infektionen, etc.) eines Patienten wird die Induktionstherapie eingeleitet, welche zum Ziel hat, die Zahl der Leukämiezellen im Körper auf ein nicht mehr zu detektierendes Maß (etwa 10^9 Zellen) zu reduzieren (Döhner et al., 2010). Im Allgemeinen wird eine Kombinationschemotherapie, bestehend aus einer Standarddosis Cytarabin (Cytosin-Arabinosid, AraC, Antimetabolit) über 7 Tage und einem Anthracyclin (DNA-Interkalator), vorzugsweise Daunorubicin, über 3 Tage angewandt. Abhängig von Alter und Patientenauswahl wird mit diesem Therapieregime bei 60-80 % der Erwachsenen unter 60 Jahre die komplette Remission erreicht (Kolitz, 2006). Da jedoch nicht alle malignen Zellen durch die Induktionstherapie zerstört werden können (*minimal residual disease*), muss, um ein Rezidiv zu

vermeiden, eine Postremissionstherapie angeschlossen werden (Cassileth et al., 1988). In der konventionellen Konsolidierungstherapie werden in der Regel höhere Cytarabin-Dosen als während der Induktionstherapie angewendet. Die Mortalität durch die Therapie ist mit 5 % recht gering.

Weiterhin besteht die Möglichkeit eine autologe oder eine allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation durchzuführen. Bei der autologen Stammzelltransplantation werden nach einer myeloablativen Konditionierungstherapie mit einer hochdosierten Zytostatikagabe und einer Ganzkörperbestrahlung, die vorher gewonnenen körpereigenen Stammstellen reinfundiert. Die therapiebezogene Mortalität und Morbidität ist mit etwa 6 % relativ gering, da keine Transplantat-Wirt-Reaktion (*Graft-versus-Host disease*) ausgelöst wird. Jedoch sind die Rezidivraten bei ebenfalls fehlendem Graft-versus-Leukemia-Effekt mit 30 – 50 % hoch. Für die allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation muss ein histokompatibler Spender gefunden werden. Im Idealfall gibt es einen Spender in der Familie. Die Mortalität der Therapie ist mit 20 % hoch.

Neuere Therapieansätze bestehen in der Verwendung von Medikamenten, die gezielt in die konstitutiv aktivierten Signaltransduktionswege der Leukämiezellen eingreifen. So lassen sich zum Beispiel bei AML mit Flt-3- oder c-kit-Mutationen Tyrosinkinase-Inhibitoren (wie PKC412, Imatinib etc.) und bei AML mit Ras-Mutationen Farnesyl-Transferase-Inhibitoren (z.B. Tipifarnib von Johnson & Johnson) einsetzen (Kolitz, 2006). Die bisherigen klinischen Erfolge mit reinen Flt3-Inhibitoren blieben bislang gering, doch die Kombination von Flt3-Inhibitoren mit der Standardchemotherapie scheint vielversprechend zu sein (Stone et al., 2005, Fathi et al., 2008, Kumar, 2011). Weiterhin existieren antiangiogenetische Stoffe, wie zum Beispiel Lenalidomid oder Bevacizumab, oder Inhibitoren des antiapoptischen Proteins bcl-2, wie Oblimersen (List et al., 2005; Karp et al., 2004; Marcucci et al., 2005). Die endgültige Einsetzbarkeit dieser Medikamente in der Standardtherapie der AML muss noch weiteren Studien geklärt werden (Kolitz, 2006, Stapnes et al., 2009, Kumar, 2011).

2.4.3 Chronische myeloische Leukämie

Die chronische myeloische Leukämie gehört zu den myeloproliferativen Syndromen und ist eine maligne Erkrankung des späten Erwachsenenalters, die durch eine abnorm gesteigerte Granulopoese mit einer resultierenden Hepatosplenomegalie gekennzeichnet ist. Sie tritt mit einer Inzidenz von etwa 1-2 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Deutschland pro Jahr auf und macht damit 20% aller Leukämien aus. Im Differenzialblutbild fällt das Vorkommen aller Reifungsstufen der Granulozyten auf, was als pathologische Linksverschiebung bezeichnet wird. Charakteristisch ist außerdem das vermehrte Auftreten von basophilen Granulozyten. Die Granulozyten einer CML sind jedoch im Gegensatz zu den unreifzelligen Blasten der AML funktionstüchtig. In zytogenetischen Untersuchungen findet sich bei 90% der Patienten das sogenannte Philadelphiachromosom, das durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 (t 9;22) entsteht und woraus das Onkogen Bcr/Abl resultiert.

Bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten erfolgt nach einer mehrjährigen chronischen Phase eine Transformation der Erkrankung in eine akute Phase, den meist terminalen Blastenschub (Jorgensen und Holyoake 2001; Eaves et al., 2003). Therapeutisch gibt es drei Optionen: a) kurativ durch allogene Stammzelltransplantation, b) Krankheitskontrolle durch Tyrosinkinaseinhibitoren, c) palliativ mit Zytostatika. Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib, Dasatinib, Nilotinib, hemmen die konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase Bcr/Abl (Lee et al., 2000; Kantarjian et al., 2007).

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1. Chemikalien

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

3.1.2. Puffer und Stammlösungen

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

	1 mM PMSF
10%TCA:	TCA Aceton 20 mM DTT
1x TAE:	40 mM Tris 13 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
1x Ladepuffer	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 3% SDS 10% Glycerol 0,01% Bromphenolblau
3x Ladepuffer	180 mM Tris-HCl pH 6,8 6% SDS 30% Glycerol 0,01% Bromphenolblau
TE pH 7,5:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA pH 8,0
10x Laufpuffer	144 g Glycin 30 g Tris <i>ad</i> 1 L ddH ₂ O
Transferpuffer	1x Laufpuffer 1/5 Volumen Methanol 1% SDS
20x MOPS- Puffer:	1 M MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure) 1 M Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 3 M SDS (Sodiumdodecylsulfat) 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

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

3.1.3. Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den Experimenten verwendet:

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

Primäre Antikörper

- GAPDH (1:3000, Santa Cruz Technologie, sc 32233), dabei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper, der gegen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) gerichtet ist.
- p-AKT (Cell Signaling, Bestell-Nr: 4058) hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Kaninchen-Antikörper, der gegen AKT gerichtet ist, das am Serinrest 473 phosphoryliert ist.
- SHIP P1C1 (1:500, Santa Cruz Technologie, sc8425), hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper der Subklasse IgG₁, der gegen ein rekombinantes Protein gerichtet ist, das mit den AS 866-1020 am C-terminalem Ende von SHIP1 der Maus übereinstimmt.
- Anti-GFP (1:1000), Roche Applied Science (Mannheim), #11 814 460 001, Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern IgG₁, die gegen GFP (*green fuorescenting protein*) gerichtet sind.
- MAPK (New England Biolabs), dabei handelt es sich um einen monoklonalen anti -p44/42 MAPKinase (Thr202/Tyr204) Mausantikörper.

Sekundäre Antikörper

- Ziege-anti-Kaninchen-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* HRP), gegen humanes und murines Serum präadsorbiert (Santa Cruz Technologie, sc2004) (1:5000)
- Ziege-anti-Maus-IgG gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* HRP), gegen humanes und murines Serum präadsorbiert (Santa Cruz Technologie, sc2060) (1:5000).

3.1.4. Enzyme und Reaktionskits

Die zum Verdau von Plasmid- und genomischer DNA benutzten Restriktionsenzyme wurden sowohl von Roche Diagnostics (Mannheim) als auch von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) bezogen.

3.1.5 Bakterienstämme

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

3.1.6 Nukleinsäuren

3.1.6.1 Vektor

SF91 iGpre (siehe Abbildung 5): Bei diesem Vektor handelt es sich um einen retroviralen Vektor. Dieser Vektor besitzt eine IRES (*internal ribosome entry site*), EGFP und ein PRE (*posttranskriptionelles Element*). Dieses PRE erhöht den Transport der RNA aus dem Kern ins Zytoplasma. Dadurch kommt es zu einer Translation und somit zu einer erhöhten Expression. Über eine NotI-Restriktionsschnittstelle wurde sowohl SHIP1 als auch die enzymatisch inaktive Form von SHIP (D672A) in den Vektor kloniert.

SHIP1 oder die enzymatisch inaktive Form von SHIP1 wurden somit jeweils vor der IRES eingebracht. Nach der IRES befinden sich das EGFP und dann das PRE. Die IRES hat die Funktion eine von der 5'-Cap-Struktur und dem Cap-Bindungskomplex unabhängige Translation der eukaryotischen mRNA zu ermöglichen. Bei dem PRE-Element handelt es sich um ein posttranskriptionelles regulatorisches Element, das zu einem erhöhten Transport der RNA aus dem Kern ins Cytoplasma führt, was in einer erhöhten Translation und damit verbundenen höheren Expression des Gens resultiert.

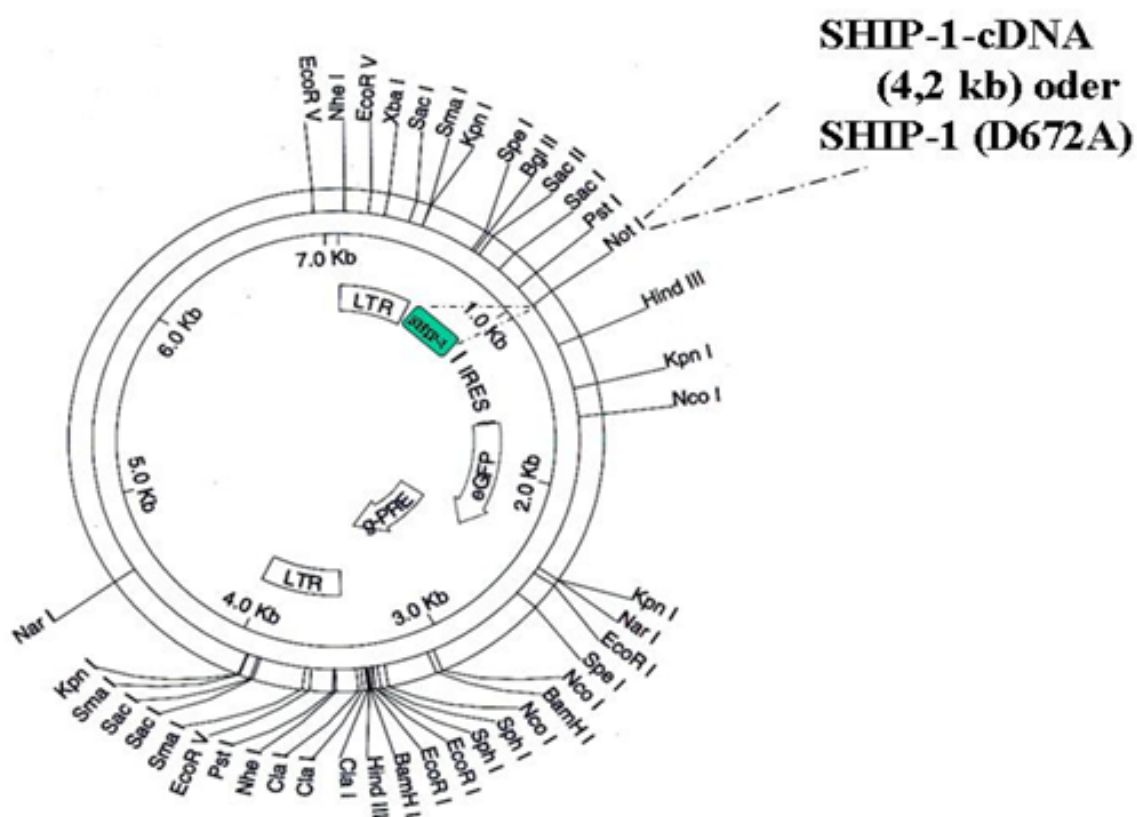


Abb. 5: Retroviraler Vektor SF91iGpre

Der retrovirale Vektor beinhaltet: LTR: long terminal repeat, eGFP: enhanced green fluorescence protein; IRES: Internal Ribosomen entry site

3.1.6.2 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 2: Oligonukleotide für PCR bzw. Sequenzierung

Zelllinie	Primersequenz	Fragmentgröße	GC-Gehalt
Kasumi	5'-TCC TGA CTT ACG ACA GGC TC-3'	486 bp	55%
	5'-CCA TAA GCA GTT GCC TCA AC-3'		50%
	5'-TTC ACA GAG ACT TGG CAG CC-3'		60%
MV 4-11	5'- GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC -3'	268 bp	43%
	5'- CTT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC -3'		48%
	5'- CGC CGC TCC AGG CGG CAT CG-3'		80%
Eol-1	5'- ACC TGG TGC TGA TCT TTC TGA T -3'	~ 700 bp	45%
	5'- TGA GAG CTT GTT TTT CAC TGG A -3'		41%
K 562	5'-GTT TCA GAA GCT TCT CCC TG-3'	468 bp	50%
	5'-CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC-3'		46%

Die Primer wurden bei MWG Biotech (Ebersberg) bestellt.

3.1.7 Zelllinien

3.1.7.1 Kasumi-1

Die Kasumi-1 ist eine Zelllinie, die von einem Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) mit einer t(8;21) etabliert wurde. Die chromosomalen Bruchpunkte betreffen das AML1-Gen (PEBP2a) auf Chromosom 21q und das ETO-Gen auf Chromosom 8q. Die t(8;21)(q22;q22) und inv(16)(p13q22) führt zu einer Unterbrechung der Gene, die für die Untereinheiten $\alpha 2$ und β des „core binding factor“ (CBF/PEBP2), codieren. CBF ist ein Regulator der Transkription der normalen Hämatopoese, wenn seine Untereinheiten wie beschrieben verändert werden, führt das zu Defekten in der Differenzierung und unkontrollierten Wachstum der Leukämiezellen.

Kasumi-1 beinhaltet außerdem eine aktivierende Mutation in dem c-kit-Protoonkogen, nämlich im Codon 822 (Austausch von Asparagin zu Lysin) in der A-Schleife der Tyrosinkinase KIT. Daraus resultiert eine ligandenunabhängige Aktivierung durch Autophosphorylierung der Tyrosinreste des Rezeptors mit einem Anstieg der Zellproliferation (Beghini et al., 2002).

Beghini et al. konnten außerdem zeigen, dass es ein quantitatives Ungleichgewicht von 5:1 zwischen dem mutierten und dem Wildtyp-Allel gibt.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. C. Stocking (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.2 MV 4-11

Die MV 4-11 ist eine akute myeloische Leukämiezelllinie (AML-Zelllinie), mit der Translokation t(4;11)(q21;q23), die typischerweise in biphenotypischen Leukämien beobachtet wird. MV4-11 wächst auch in Abwesenheit von GM-CSF und wurde aus dem peripheren Blut eines, an einer B-Zell myeloischen Leukämie erkrankten Patienten etabliert (Lange et al., 1987). In dieser Zelllinie weist das „*fms-like tyrosine kinase*“ – Gen, kurz FLT3-Gen, eine interne Tandemduplikation (ITD) in Exon 14 auf, wobei 30 Basenpaare wiederholt werden, was zu einem Austausch der ersten Aminosäure Tyrosin zu Histidin, nicht aber zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Diese Zelllinie besitzt ausschließlich das mutierte Allel („Loss of heterozygosity“) und exprimiert als einzige von 69 untersuchten AML-Zelllinien eindeutig das FLT3-Protein (Quentmeier et al., 2003).

Diese Mutation im FLT3-Gen ist bei 20-28% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie, sowie seltener bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie und myelodysplastischem Syndrom nachweisbar (Gilliland und Griffin, 2002; Whitman et al., 2001). Mutationen im FLT3-Gen sind mit schlechterer Prognose assoziiert und Kooperation mit weiteren leukämischen Onkogenen führt zu einem noch aggressiveren Phänotyp. Die in MV4-11 Zellen gefundene interne Tandemduplikation führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase-Aktivität des

Rezeptors (Gilliland und Griffin, 2002), Aktivierung der PI3K (Scheijen et al., 2004) und eine Ser473-Phosphorylierung von Akt (George et al., 2005). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. Justus Duyster (3. Medizinische Klinik, TUM) zur Verfügung gestellt.

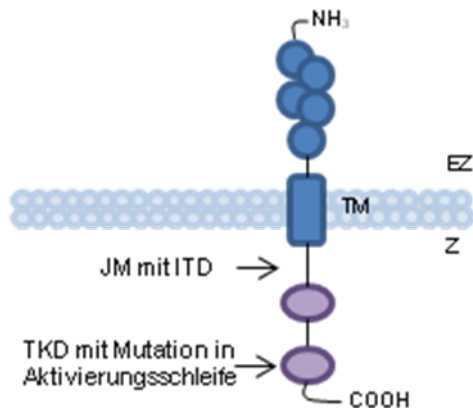


Abb. 6: FLT3-Rezeptor

FLT3-Rezeptor mit Juxtamembran-Ökonomie (JM), die in der Regel die internen Tandemduplikationen (ITD) aufweist, und der Tyrosinkinasedomäne (TKD), in der gehäuft Mutationen in der Aktivierungsschleife auftreten. Transmembran-Ökonomie (TM); Extrazellulärraum (EZ); Zytoplasma (Z). Modifiziert nach Parcells et al., 2006.

3.1.7.4 Cole

Die Cole-Zelllinie wurde 1980 in Southampton von einer Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit Hodgkin Lymphom abgeleitet und entspricht dem Phänotyp einer T-Zelle (Jones et al., 1985).

In dieser Zelllinie ist die regulatorische p85 α -Untereinheit (85 kDa) der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) mutiert. In Exon 14 an der Position 1907 des p85 α -Gens wird in Folge einer Punktmutation die Base Adenin deletiert. Dadurch verschiebt sich der Leserahmen nach den ersten 635 Aminosäuren (AS) und 25 neue AS werden translatiert, bevor ein Stop-Codon vorzeitig zum Abbruch führt. Das so verkürzte Protein ist 660 AS lang und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 76 kDa, weshalb es den Namen p76 α trägt. Durch die Mutation wird die C-terminale SH2-Domäne von 97 AS auf 12 AS verkürzt.

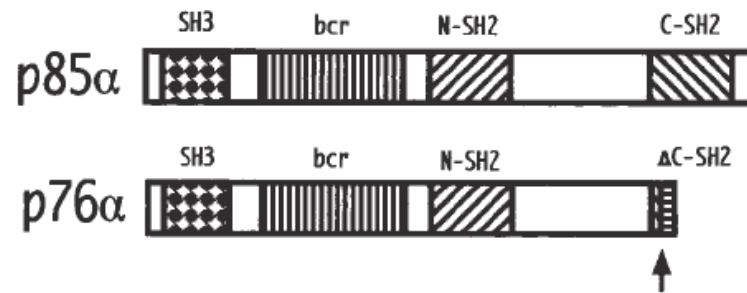


Abb. 7: Vergleich der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase p85α mit der in den Cole-Zellen vorkommenden mutierten Form p76α

Modifiziert nach Jücker et al. (2002). Bei p76 α/PI3K ist die C-terminale SH2-Domäne verkürzt. Der Pfeil markiert die Stelle, wo die 25 neuen AS beginnen. SH2: Src homology 2, SH3: Src homology 3, bcr: break point cluster region.

Die regulatorische p85α-Untereinheit bindet über die Inter-SH2-Domäne an die katalytische p110α-Untereinheit der PI3-Kinase und stabilisiert diese damit. Die N- und C-terminalen SH2-Domänen der p85α-Untereinheit können an phosphorylierte Konsensussequenzen, wie pYXXM oder pYVXV, in Zielproteinen binden, wodurch die PI3-Kinase aktiviert wird.

Wenn nun die C-terminale SH2-Domäne, wie in p76α fehlt, wird die PI3-Kinase konstitutiv aktiviert. Daraus folgt, dass Akt (PKB) dauerhaft phosphoryliert ist und dadurch Proliferations- und antiapoptische Signalwege angeschaltet werden.

Die Cole-Zellen tragen sowohl das mutierte p76α-Allel als auch das p85α-Wildtypallel, wobei nur das p76α-Protein exprimiert wird (Jücker et al., 2002).

Die Cole Zellen wurden freundlicherweise von Dr. H. Tesch (Universitätsklinikum Köln) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.5 K562

K562 ist eine erythroblastische Zelllinie, die das typische Merkmal der chronischen myeloischen Leukämie (CML) besitzt: Das Philadelphiachromosom (Luchetti et al., 1999).

Das Philadelphiachromosom entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22, t(9;22)(q34;q11) und ist in über 95% der CML zu finden (Eder et al., 1999). Auf Chromosom 9 befindet sich das Abl-Protoonkogen, das mit dem Bcr-Gen (*breakpoint cluster region*) auf Chromosom 22 fusioniert. Je nachdem welche Bruchpunktregion betroffen ist, ergeben sich folgende Varianten: b2a2 oder b3a2. Die K562-Zelllinie beinhaltet die b3a2-Variante des BCR-ABL-Fusionsgens. Das abl-Protoonkogen codiert für die ABL-Tyrosinkinase, die durch die Translokation konstitutiv aktiviert ist. Die 210 kiloDalton (kDa) BCR-ABL-Tyrosinkinase dereguliert intrazelluläre Signaltransduktionswege und verursacht so eine Hemmung der Apoptose und eine Steigerung der Zellproliferation (Luchetti et al., 1999; Delhommeau et al., 2006).

Interessant ist, dass BCR/ABL die Expression von SHIP inhibiert, so dass ein weiterer proapoptotischer Weg in der CML ausgeschaltet wird. Die Zelllinie K562 besitzt zwar das SHIP-Gen, aber keine detektierbare SHIP-mRNA (Sattler et al., 1999).

Die Therapie der Wahl ist momentan Imatinib (Glivec; STI571), ein spezifischer Hemmstoff der ABL-Kinase. Er führt, jedoch nur bei Philadelphia-positiven CML-Patienten zum Wachstumsarrest und zur Apoptose der CML-Zellen. Seit 2006 sind auch die Tyrosinkinase-Hemmstoffe Dasatinib und Nilotinib zugelassen. Sie sind bei 32 von 33 Imatinib-resistenten Mutationen des Philadelphia-Chromosoms einsetzbar.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Jutta Friel (Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.6 M1

M1 ist eine Mauszelllinie einer akuten myeloischen Leukämie (AML). Zur Etablierung der Zelllinie wurde Knochenmark von einer an akuter myeloischer Leukämie (AML) erkrankten Maus entnommen und in eine isogenische Maus

implantiert. Die M1-Zellen beinhalten nicht das Tumorsuppressorgen p53 und lassen sich durch Interleukin 6 (IL-6) in den Wachstumsarrest, die terminale Differenzierung zu Makrophagen und in die Apoptose treiben.

Dadurch, dass die M1-Zellen auf IL-6-Stimulation ansprechen, dient diese Zelllinie zur Erforschung therapeutischer Angriffspunkte in der Differenzierung von Leukämiezellen. Unter Anderem konnte von Vesely et al. (2006) gezeigt werden, dass der PI3-Kinase/Akt-Signalweg essentiell für die IL-6-Protektion gegen p53-induzierte Apoptose in M1-t-p53-Mutanten (Ala zu Val bei AS 135) ist (Xia et al., 2005; Vesley et al., 2006).

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. G. Schuch (Onkologie und Hämatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.7 Eol-1

Die Eol-1-Zelllinie wurde 1985 von einer chronischen eosinophilen Leukämie (CEL) abgeleitet. Ihr Charakteristikum ist das FIP1L1-PDGFR-A-Fusionsgen, dessen Produkt die konstitutiv aktivierte FIP1L1-PDGFR-A-Tyrosinkinase ist. Diese Mutation findet sich in etwa 56 % der CEL-Fälle (Gotlib et al., 2004).

Das Fusionsgen entsteht durch eine interstitielle 800 kb-Deletion des Exon 9 des *fip1-like 1* (FIP1L1)-Gens und des Exon 12 des *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) A-Gens auf Chromosom 4q12 (Cools et al., 2004). FIP1L1 ist ein 520 Aminosäuren langes Protein, das homolog zu einem früher entdeckten Hefe-Protein Fip1 mit unterbindender Funktion in der Polyadenylierung der mRNA ist. Das PDGFR-A-Protein ist eine Rezeptortyrosinkinase, die dimerisiert, sich selbst und *signal transducer and activator of transcription* (STAT5) phosphoryliert und den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg aktiviert. PDGFR-A ist membranständig.

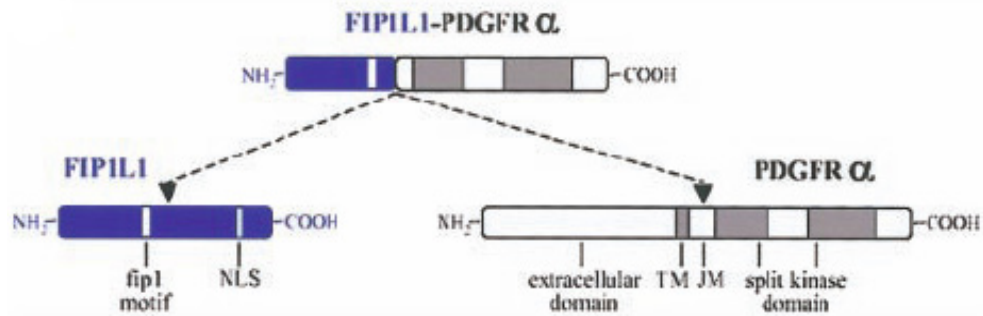


Abb. 8: Fusion von FIP1L1 mit PDGFRA

NLS: nuclear localization signal; TM: Transmembranregion; JM: Juxtamembranregion. Modifiziert nach Gotlib et al., 2004.

Durch die Deletion verliert PDGFRA die Transmembrandomäne und die Juxtamembranregion, so dass FIP1L1-PDGFRα im Cytosol lokalisiert ist. Da Ras der erste Schritt in dem MAPK-Signalweg ist, aber durch eine Farnesylierung an der Zellmembran verankert ist, kann der MAPK-Signalweg durch FIP1L1-PDGFRα nicht aktiviert werden. FIP1L1-PDGFRα kann jedoch aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation andere Signalmoleküle binden und so zum Beispiel STAT5 aktivieren (Cools et al., 2004).

Interessant dabei ist außerdem, dass das Partnerprotein FIP1L1 für die Aktivierung der Fusionskinase nicht notwendig ist. Der Grund dafür ist, dass durch die Fusion das PDGFRA-Protein zwischen zwei konservierten Tryptophan-Resten in der Juxtamembrandomäne unterbrochen wurde. Die konstitutive Aktivierung der Tyrosinkinase kommt demnach wahrscheinlich durch den Verlust der Juxtamembrandomäne zustande, von der bei anderen Tyrosinkinasen bekannt ist, dass sie eine autoinhibitorische Funktion besitzt (Stover et al., 2006).

Die Folge der Daueraktivierung kann ein Hypereosinophiles Syndrom (HES) (> 1500 Eosinophile/ μ l Blut) bzw. eine chronische eosinophile Leukämie (CES) sein, dessen Symptome Müdigkeit, Dyspnoe, Ödeme, Fieber, Rhinitis und andere sein können. Der Inhalt der eosinophilen Granula kann das Endokard des Herzens schädigen, woraus Thrombusbildung und Fibrosen resultieren, die wiederum zu einer Kardiomyopathie führen. Die Trikuspidal- und Mitralklappe des Herzens können ebenfalls durch Fibrosierungen insuffizient werden.

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 80%. 15 Jahre überleben etwa 42% der Patienten.

Eine konventionelle Therapie sieht folgendermaßen aus: 1 mg/kg/d Kortikosteroide. Bei fehlendem Ansprechen auf die Kortikosteroid-Therapie setzt man das Chemotherapeutikum Hydorxurea ein, das ein S-Phasen-spezifischer Inhibitor der Ribonukleotidreduktase und damit der DNA-Synthese ist.

Ist die Leukämie dann noch immer Therapierefraktär, bekommt der Patient IFN- α , das unter anderem die Freisetzung von Mediatoren, wie Neurotoxin und Interleukin 5 aus den eosinophilen Granula hemmt.

Ein schon bei der BCR-ABL-Mutation wirksames Medikament ist der Tyrosinkinasehemmer *Imatinib*. Imatinib wurde 2001 das erste Mal an Patienten mit eosinophiler Leukämie getestet und war erfolgreich. Es wurde sogar eine geringere Dosis als bei der BCR-ABL-verursachten Leukämie benötigt. 100 mg reichten oft schon aus, um bei einer therapierefrakteren eosinophilen Leukämie eine klinische Remission zu erzielen. Daraufhin konnte die FIP1L1-PDGFR α als eine pathologisch relevante Tyrosinkinase identifiziert werden (Stover et al., 2006).

Es gibt jedoch auch eosinophile Leukämiefälle, die gegen die Imatinib-Therapie resistent sind. Man hat herausgefunden, dass dies an einer T674I Punktmutation in der ATP-Bindungsdomäne der FIP1L1-PDGFR α -Tyrosinkinase liegt. Lierman et al. testeten daraufhin an Eo1-Zellen *Sorafenib* (BAY43-9006), einen B-RAF-Hemmstoff, der sich schon in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms bewährt hat und von dem bekannt war, dass er den PDGF-Rezeptor hemmt, und hatten Erfolg. Klinische Studien müssen nun die Wirksamkeit am Patienten bestätigen (Lierman et al., 2006).

Die Zelllinie wurde freundlicherweise von PD Dr. Justus Duyster (3. Medizinische Klinik, TUM) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.8 U937

Die Zelllinie U937 wurde aus den Zellen eines 37-jährigen Patienten mit einem diffusen histiozytären Lymphom abgeleitet (Sundstöm und Nilsson, 1976). Sie gilt als Modelzelllinie zur Untersuchung der Differenzierung von Monozyten und Makrophagen (Strefford et al., 2001). U937 weist verschiedene Chromosomenabberationen auf. Vor allem die balancierte Translokation $t(10;11)(p13,q14)$ wird als ursächlich für die Leukämogenese angesehen (Dreyling et al., 1996; Strefford et al., 2001). Die Translokation $t(10;11)(p13;q14-21)$ wurde in Patienten mit ALL (Berger et al., 1989; Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique, 2001), AML (Berger et al., 1989; Sait et al., 1987; Carter et al., 1991) und akuter eosinophiler Leukämie (Fischkoff et al., 1988) beobachtet. Die in der U937 beobachtete Translokation $t(10;11)(p13,q14)$ führt zu einer Fusion von AF10 (10p13) mit CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukemia gene) (11q14). AF10 ist vermutlich ein Transkriptionsfaktor und wurde von Thirman et al. als Fusionspartner des MLL-Gens nach Translokation $t(10;11)(p11-13;q23)$ in AML-Zellen gefunden (Thirman et al., 1993). Clathrin-coated Vesikel spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der rezeptorvermittelten Endozytose als auch bei dem Vesikeltransport durch das Golgi-Netzwerk. Dies könnte auch die Funktion der C-terminalen Hälfte von CALM sein. Es wird diskutiert, ob die endozytotische Aktivität durch die Phosphoinositol-Signalwege reguliert wird (Dreyling et al., 1996).

Kumon und Mitarbeiter konnten in einem Patienten eine $t(1;3)$ Translokation zeigen (Kumon et al., 1999). Der Bruchpunkt in Chromosom 3 lag in derselben Region wie auch der Bruchpunkt, der von Strefford et al. in den U937-Zellen beobachtet werden konnte (3q26) (Strefford et al., 2001). Weiterhin konnten Kumon und Mitarbeiter in der gleichen Studie in zwei Patienten einen Verlust von 12p feststellen, der durch die Translokation von Chromosom 12 an Chromosom 15 und 18 zustande kam (Kumon et al., 1999). Den Verlust von 12p konnten Strefford und Mitarbeiter auch in der Zelllinie U937 nachweisen $der(12)t(6;12)$ (Strefford et al., 2001). Sowohl ein vermehrtes Auftreten von Chromosom 20 in den Patienten (Kumon et al., 1999; Carlson et al., 2000) als auch eine

Überrepräsentation von Regionen des Chromosom 13 (Narita et al., 1999) konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Diese Veränderungen konnten ebenfalls von Strefford et al. in der M-FISH-Untersuchung der U937 nachgewiesen werden (Strefford et al., 2001).

Karyotyp der U937 nach Strefford et al., 2001:

51-57, XX, *der(1)t(1;5)(p22;q33)add(1)(q25)*, *add(2)(q33)*, *der(3)t(1;3)(q25;q25)*, *der(5)t(1;5)(p22;q33)*, +6, *add(6)(p23)*, +7, *t(10;11)(p13;q14)*, +12, *add(12)(p11.2)*, *add(13)(q32)*, +15, *add(16)(p10)*, *i(16)(q10)*, +19, *add(19)(q13.3)*, +20, +20, +21, +*mar1*, +*mar2*

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. G. Schuch (Onkologie und Hämatologie, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.7.9 293 gp

Die 293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen (*HEK; human embryonic kidney cells*), die durch den Adenovirus E1A transformiert wurden. Bei der Produktion von retroviralen Überständen wurde die 293-gp-Zelllinie verwendet, die zusätzlich ein gag-pol-Element besitzt und auch als Phönix-gp bezeichnet wird (Mulligan et al., 1993). Das gag-Protein hat eine zentrale Funktion bei der Virus-Herstellung, da es die Fähigkeit besitzt sowohl mit der Virus-RNA als auch mit den Virus-Hüllproteinen zu interagieren. Das pol-Gen produziert Protease, Reverse Transkriptase und die Integrase (Sharma et al., 1997).

Diese Helferzelllinie wurde freundlicherweise von Dr. G. Nolan (Stanford University) zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Geräte

Zellkultur-Brutschränke	Heraeus
Elektrophorese-Kammern (horizontal)	MWG-Biotech
Elektrophorese-Kammern (vertikal)	Protean® IixiCell, BioRad
Geldokumentationssystem CF8/1 FMC	Kappa Messtechnik
FACSAria	Becton & Dickinson
FACSCalibur	Becton & Dickinson
FACSCantor	Becton & Dickinson
Flow Titertek® Multiskan Plus	ICN
Horizontalschüttler Rocky®	Fröbel Labortechnik
Lyophyllisator: SpeedVac Concentrator	Savant
pH-Meter CG 820	Schott-Geräte GmbH
Power Supply EPS200	Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Eppendorf
Rührplatte	Heidolph
Schutron Schnipptherm	MS-Laborgeräte
Schüttelinkubator (Bakterien)	HAT Infors AG
Sonifiziergerät B-12	Branson Sonic Power Company
Thermomixer 5436	Eppendorf
Wasserbad 1086	GFL
Multi-Imager Fluor-Smax	Fuji
Zentrifugen:	
• Ultrazentrifuge L-60 Optima-L	Beckman
• Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
• Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus

- Zentrifuge 540 Eppendorf
- Zentrifuge Varifuge K Heraeus
- Zentrifuge Varifuge 3.0R Heraeus
- Sorvall-Zentrifuge RC-5B DuPont Instruments

Mikroskope und Zubehör:

- Axiovert 200 Zeiss

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

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

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Stammhaltung und Vermehrung

Die Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (GlutaMAXTm I, 25 mM HEPES; Invitrogen) und in DMEM-Medium (GIBCO, 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Pyruvat; Invitrogen) unter 5% CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C in Zellkulturflaschen oder auf Platten kultiviert. Dem Medium wurden außerdem 10% fötales Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (50 µg/ml Streptomycin; 50 Einheiten/ml Penicillin) zugesetzt. Dabei wurden die Zelllinien Kasumi-1, MV 4-11, EOL-1, Cole und K 562 in RPMI 1640 Medium gehalten. Die Zelllinie M1 und die Helferzelllinie Phoenix 293 gp wurden hingegen in DMEM-Medium kultiviert. Da die 293-Zellen adhärent wachsen, wurden sie statt in Zellkulturflaschen auf Zellkulturplatten kultiviert und alle zwei bis drei Tagen in einem Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium verdünnt. Dazu wurden sie mit 1 ml 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA-Lösung behandelt, nach ihrer Ablösung von der Oberfläche in Medium resuspendiert und geteilt.

3.2.1.3 Einfrieren von Zellen

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

3.2.1.2 Auftauen von Zellen

Die im Stickstofftank eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Die Zellen wurden dann in ein mit 9 ml Medium gefülltes Falcon-Röhrchen hinein pipettiert und sofort bei 290 g für 7 min zentrifugiert. Nach der

Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 10ml frischem Medium aufgenommen und dann im Inkubator verwahrt.

3.2.1.4 Färben mit Trypanblau

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

3.2.1.5 Wachstumskinetik mit LY 294002

Um herauszufinden, ob in den oben beschriebenen Zelllinien die Aktivität der PI3-Kinase für das Wachstum der Zellen notwendig ist, wurden sie mit dem PI3K-Hemmstoff LY 294002 behandelt, der in DMSO gelöst wurde.

Die acht Zelllinien wurden auf 6-Loch-Platten ausgesät. Dabei wurden zu den Zellen in drei wells LY 294002 in einer Endkonzentration von 25 µM hinzugegeben. Um zu garantieren, dass eine Wachstumshemmung nicht aufgrund der DMSO-Zugabe erfolgte, wurde in die anderen drei wells derselben Zelllinie die gleiche Menge DMSO gegeben. Daraufhin wurde über 8 Tage alle 2 Tage die Anzahl der lebenden und toten Zellen in allen wells mit Hilfe von Trypanblau und Neubauer -Zählkammern bestimmt und eine Wachstumskinetik erstellt.

3.2.1.6 Transiente LipofectamineTM-Transfektion mit retroviralem Vektor

Um den Vektor, Vektor mit SHIP und Vektor mit einer enzymatisch inaktiven SHIP-Mutante (V672A) in die Zielzellen einzubringen, wurden von der Helferzelllinie Phoenix 293 gp Viren produziert. Damit die Viren hergestellt werden konnten, wurden die Phoenix 293 gp mit der entsprechenden DNA transfiziert.

Die Helferzelllinie Phoenix 293 gp wurde in einer 10 cm Schale mit 10 ml DMEM-Medium so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu etwa 70 Prozent konfluent waren.

Es wurden drei Ansätze hergestellt mit jeweils 5 µg Vektor SF 91, SF 91 mit SHIP1-Insert und SF 91 mit inaktivem SHIP1-Mutante-Insert in jeweils 750 µl DMEM-Medium ohne fötales Kälberserum (FCS) und Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep). In jeden Ansatz wurden jeweils 5 µg Ampho, 2 µg VSV-G (M75) und 10 µg gag pol (M57) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 20 µl Plus Reagenz (Invitrogen) pro Ansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 30 µl LipofectamineTM-Reagenz (Invitrogen) in 750 µl DMEM-Medium ohne FCS und Penicillin-Streptomycin aufgenommen. Daraufhin wurden der Ansatz mit dem Plus-Reagenz und der mit dem LipofectamineTM-Reagenz vermischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

Das Medium der Phoenix 293 gp-Zellen wurde abgenommen und durch 5 ml frisches DMEM-Medium mit FCS und Penicillin-Streptomycin ersetzt. Daraufhin wurde die Lipofectamin-Lösung vorsichtig auf die Zellen gegeben und 3 Stunden in dem Inkubator stehen gelassen. Nach 3 Stunden wurde das Medium auf 9 ml aufgefüllt und am nächsten Morgen das gesamte Medium gewechselt. Nach 16 - 20 Stunden wurde das Medium gewechselt. 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion wurde der Virusüberstand abgenommen, filtriert (Acrodiscfilter; 0,45µm; Pallman) und entweder direkt auf die Zielzellen gegeben oder bei - 80°C gelagert.

Um möglichst hohe Virentiter zu erzielen, wurden die Phoenix 293 gp-Zellen anhand ihrer Fluoreszenz durch die Expression von EGFP im Zellsortierer FACS ARIA des Heinrich-Pette-Institutes zweimal sortiert, so dass nur die Zellen in Kultur genommen wurden, die die Konstrukte stabil integriert hatten. Diese Zellen wurden als Helferzelllinie für die Transduktionen der Leukämiezelllinien verwendet.

3.2.1.7 Transduktion der Leukämiezelllinien

Zur Transduktion der Suspensionszellen wurden 5×10^5 Zellen in 1,5 ml RPMI-Medium (U937, Cole, Eo1-1, K562, MV4-1 und Kasumi) oder DMEM (M1) aufgenommen und in einen 6-well ausgesät. Zu den Zellen wurden 2,5 ml des Virusüberstandes der 293 gp-Zellen und 4 μ l Sigmabrene hinzugegeben. Die Zielzellen wurden nach etwa 24 Stunden bei 1200 rpm abzentrifugiert und erneut in frischem Medium, Virusüberstand und Sigmabrene aufgenommen. Diese Prozedur wurde nach weiteren 24 Stunden wiederholt.

3.2.1.8 Sortieren der EGFP-positiven Zellen

Die Zellen wurden für 7 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden etwa 5×10^6 Zellen in 1 ml PBS mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 2 % FCS aufgenommen und filtriert (0,25 μ m, Macs).

Wenn die Zellen den Vektor aufgenommen haben, wurde das in dem Vektor befindliche EGF-Protein exprimiert, das grün fluoresziert. Die Fluoreszenz wurde von dem Zellsortierer FACS Aria (Becton & Dickinson) mittels Laser detektiert. Die positiven, also die grün leuchtenden, Zellen wurden in mit Medium vorbereitete FACS-Röhrchen (Falcon) sortiert und für proteinbiochemische Arbeiten und Wachstumsversuche in Kultur genommen. Die Fluoreszenz der EGFP-exprimierenden Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert (Abb. 9) Die negativen Zellen, die kein EGFP exprimierten, wurden verworfen.

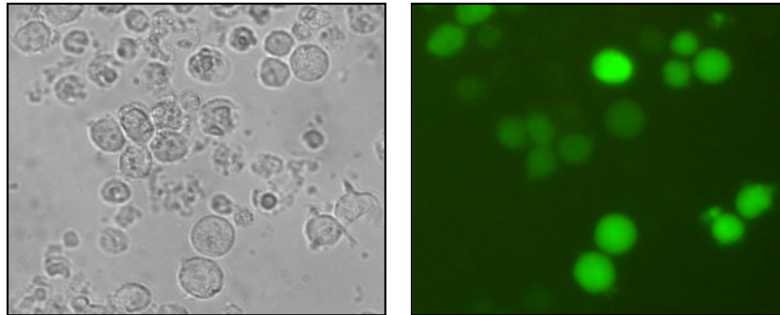


Abb. 9: EGFP-positive-Suspensionszellen

Die Abbildungen zeigen die sortierten Zielzellen unter dem Mikroskop ohne (links) und mit (rechts) Floureszenzlicht.

3.2.1.9 Untersuchung der Zellproliferation: Neubauer-Zählkammer

Die EGFP-positiven Zellen wurden durchschnittlich 6 Tage in Kultur gehalten, um genügend Zellen für Triplikate zur Erstellung der Wachstumskinetik und zur Lysatherstellung zu haben. Daraufhin wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^5 /ml in 24-well-Platten in Tripikaten ausplattiert und über sechs Tage jeden zweiten Tag mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt statistisch ausgewertet, dabei wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Students T-Test berechnet. Die Zellen der Versuchsreihe, die in 0,5 % FCS-haltigem Medium gehalten werden sollten, wurden 24 Stunden vor Beginn des Zählversuches in dieses Nährmedium umgesetzt.

3.2.1.10 Untersuchung der Zellproliferation: BrdU-APC

Für den Zellproliferationsversuch mit BrdU (Bromdesoxyuridin) wurden Reagenzien von BD Pharmingen™ (Cat. No. 552598) verwendet. Die BrdU-Lösung wurde auf den Zellen gegeben (10 µl BrdU 1 mM / ml Zellkultur). Die Zellen wurden für 16 Stunden entweder in 10 % oder 0,5 % FCS-haltigem Medium in Kultur gehalten. Danach wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Staining Puffer (1xPBS: 0,2

g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 8,0 g NaCl, 2,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, add 1 l H_2O ; 3% FCS; 0,09% NaAzid) aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 250 g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μl BD Cytofix/Cytoperm aufgenommen. Die Zellen wurden durch 30 min Inkubation bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 100 μl BD Cytoperm Plus aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden nach gleichem Schema abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μl BD Cytofix/Cytoperm aufgenommen. Die Zellen wurden durch Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur refixiert. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 μl DNase Lösung aufgenommen. Durch Inkubation für 1 Stunde bei 37°C wurde die DNA abgebaut und dadurch das eingebaute BrdU freigesetzt. Anschließend wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl Antikörper Lösung aufgenommen. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 1 ml BD Perm/Wash dazugeben und die Zellen wurden abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,5 ml Staining Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse mit Hilfe des FACS Cantor (Abb. 10).

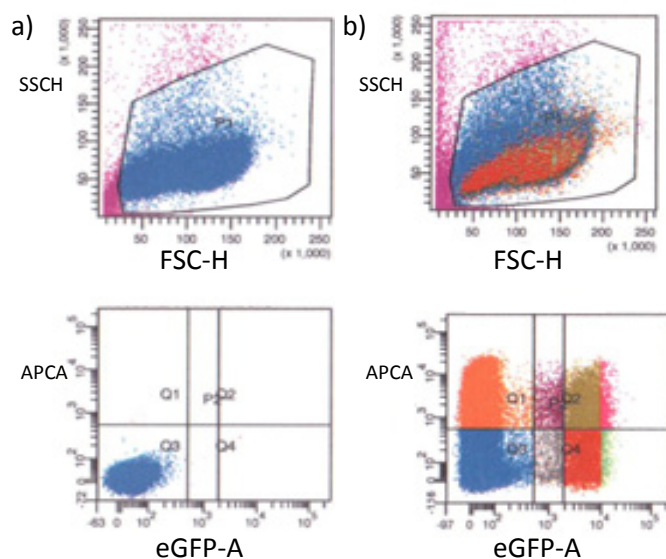


Abb. 10: FACS-Analyse der mit BrdU-APC gefärbten und eGFP exprimierenden Zellen

In a) ist die Kontrollzelllinie dargestellt, die weder eGFP exprimiert, noch die Base BrdU erhalten hat. In b) sind die Zellen zu sehen, die sowohl eGFP exprimieren als auch die Base BrdU erhalten haben. BrdU wird mit einem Antikörper beladen, dessen Fluoreszenz das FACS mit dem APC-Filter misst. SSC-H = side scatter; FSC-H = forward scatter

3.2.2 Molekulargenetik

3.2.2.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Aus folgenden Zelllinien wurde die RNA isoliert: Eol-1, K562, Kasumi und MV 4-11. Die benötigte Zellzahl pro Zelllinie betrug 1×10^7 Zellen. Um diese zu erreichen, wurden die Zellen gezählt und darüber jeweils die verwendeten Milliliterzahlen bestimmt.

Vor Beginn der Isolierung wurden 10 µl β-Mercaptoethanol zu dem RLT-Puffer und 4 Volumen Ethanol (96-100%) zu dem RPE-Puffer gegeben. Beide Puffer waren dem Kit beigelegt. Die Zellen wurden derweil 5 Minuten bei 1.200 rpm (Heraeus-Zentrifuge) in 50 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zell-Pellet wurde getrocknet, indem die Röhrchen umgekehrt auf ein Papiertuch gestellt wurden. Danach wurde das Pellet in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert. Um nun die Zellen zu zerstören und die RNA freizusetzen, wurde die Suspension in eine "Qia shredder spin column", platziert in einem 2 ml Tube, (dem Kit beigelegt) gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 1.300 rpm wurde ein Volumen 70 prozentiges Ethanol hinzugefügt, um das Zelllysat zu homogenisieren. Wovon wiederum 700 µl abgenommen wurden, um sie in eine "RNeasy spin column", ebenfalls platziert in einem 2 ml Tube, zu überführen und dann 15 Sekunden bei 10.000 rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurden 700 µl RW1-Puffer hinzupipettiert und die Säule wiederum 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die eingebaute Membran zu waschen. Der Überstand wurde wieder verworfen. Weiterhin wurden die Membran und die sich darin befindende RNA zweimal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach der ersten Pufferzugabe wurde 15 Sekunden und nach dem zweiten Mal 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in einem neuen 1,5 ml Tube platziert. Es wurde 50 µl RNase-freies Wasser (dem Kit beigelegt) hinzugegeben und 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, um die RNA zu lösen.

Die RNA-Konzentrationen und die 260/280-Reinheitsquotienten wurden mit dem Photometer gemessen.

3.2.2.2 cDNA-Synthese

Mit den gemessenen RNA-Konzentrationen konnten nun die Volumina berechnet werden, um die von dem Super Script II Kit zur cDNA-Synthese jeweils geforderten RNA-Mengen von 3µg einzusetzen.

Dieses Volumen, in dem sich die gewonnene RNA befand, wurde daraufhin mit 65°C warmen DEPC behandeltem H₂O auf 11 µl aufgefüllt und mit 1 µl Oligo-d(T)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Nach Kühlung auf Eis und kurzer Zentrifugation wurden 4 µl 5x First Strand Buffer (15 mM MgCl₂) 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, jeweils 10 mM, neutraler pH) zugegeben und 5 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl ReverserTranscriptase SuperScript II (Invitrogen) (200 U/µl) folgte die cDNA-Synthese bei 42°C für 50 Minuten. Gestoppt wurde die Reaktion durch 15 Minuten Erwärmen auf 70°C. Durch Zugabe von 2 U E. Coli RNase H (Invitrogen) wurde die verbleibende RNA degradiert.

3.2.2.3 RT-PCR

Um die gewonnene cDNA zu amplifizieren, wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Die dafür benötigten Primer wurden nach Literaturangaben ausgewählt (Furitsu et al., 1993; Quentmeier et al., 2003; Luchetti et al., 1999; Cools et al., 2004). Die Zelllinie HMC-1 besitzt zwei Punktmutationen an verschiedenen Stellen, weshalb zwei unterschiedliche Primer ausgewählt wurden.

Jeder 20 µl Ansatz enthielt 1xPCR-Puffer (Qiagen), 4 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix (Invitrogen), 1 Unit Taq Polymerase (Qiagen) sowie eine Konzentration von 0,5 µM pro Primer. Pro 20 µl Ansatz wurden 2 µl 1:5 verdünnte cDNA eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im MasterCycler gradient, Modell 5331 (Eppendorf) durchgeführt.

Das Programm war aus folgenden Teilschritten aufgebaut:

1 Minute initiale Denaturierung bei 95°C mit anschließend 29 Zyklen jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Primer-Annealing bei 60°C, 90 Sekunden Elongation bei 72°C. Nach 7 Minuten finaler Elongation bei 72°C wurden die Proben bis zur Entnahme auf 4°C gekühlt.

3.2.2.4 Agarose-Gel

Die amplifizierten RT-PCR-Produkte wurden einerseits zur Überprüfung und andererseits zum Aufreinigen auf 1,5-prozentige Agarose-Gele aufgetragen.

Ein 1,5%-Gel bestand aus 50 ml TBE-Puffer und 0,75 g Agarose. Diese Mischung wurde in der Mikrowelle aufgeköcht und mit 0,8 µl Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Aushärten wurden je 12 µl Proben (2 µl PCR-Produkt + 8 µl TE-Puffer + 2 µl 6x Loading buffer) und ein Marker (2 µl 1 kb Marker + 8 µl TE-Puffer + 2 µl 6x Loading buffer) aufgetragen und bei 150 Volt etwa eine halbe Stunde laufen gelassen.

Am Ende wurden die Banden in dem Gel durch UV-Licht detektiert und photographiert. Dabei wurde anhand des Markers überprüft, ob die PCR-Produkte die richtige Größe besaßen.

Aufreinigung der PCR-Produkte:

Zwei der vier untersuchten Zelllinien weisen Punktmutationen auf, die durch eine Sequenzierung bestätigt werden sollten (Kasumi-1 und MV 4-11). Um eine Sequenzierung durchführen zu können, mussten die PCR-Produkte erst aufgereinigt, kloniert und durch eine Mini-Präparation vervielfältigt werden.

Um nur die PCR-Produkte und keine unspezifischen Produkte für die weiteren Experimente zu verwenden, wurden die Produkte in doppelter Ausführung auf ein Agarose-Gel aufgetragen. In eine Tasche wurde nur eine geringe Menge der Probe und in eine andere Tasche der Rest gefüllt.

Bevor man das Gel nun dem UV-Licht aussetzte, wurde es mit einem Skalpell so zerschnitten, dass man die Gelspuren mit geringeren Mengen der Proben, von denen mit den größeren Mengen trennte. Erstere wurden dann mit UV-Licht bestrahlt. Die größere Menge der Probe wurde dann auf entsprechender Höhe ohne UV-Licht ausgeschnitten, um das Amplifikat nicht durch das UV-Licht zu schädigen.

Aus den so isolierten Gelstücken wurden die Amplifikationsprodukte mit dem Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden, Germany), entsprechend der Herstellerempfehlung, aufgereinigt. Hierzu wurden die Gelstücke in ihrem dreifachen Volumen des mitgelieferten QG-Puffers 10 Minuten bei 50°C unter ständigem Rütteln aufgelöst. Anschließend wurde eine dem Gelstückvolumen entsprechende Menge Isopropanol hinzu pipettiert. Die Proben wurden dann auf Austauschersäulen (QIAquick column) pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Die DNA bleibt dabei an die Austauschersäulen gebunden. Die Säulen wurden anschließend mit jeweils 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, um die DNA von Gelbestandteilen und Verunreinigungen zu befreien. Anschließend wurde die DNA mit 20 µl destilliertem Wasser eluiert und unter Zentrifugation in einem neuen Eppendorf-Gefäß aufgenommen.

3.2.2.5 Sequenzierung

Die aus den Bakterien präparierte Plasmid-DNA wurde sequenziert.

Es wurde zunächst ein Reaktionsansatz mit folgenden Zutaten hergestellt: Zu 6 µl HT-Puffer wurden 2 µl Big Dye und 8 µl autoklaviertes Wasser gegeben. Die Sequenzierungsprimer wurden so verdünnt, dass in 3 µl 15 pMol Primer enthalten waren. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde durch das Eppendorf-Photometer bestimmt. Danach wurde die DNA so verdünnt, dass in 1 µl etwa 500 ng Plasmid-DNA enthalten waren.

Der Reaktionsansatz wurde in den Thermocycler gestellt und folgendes Cycle-Sequencing-Programm gestartet: $T_1 = 95^\circ\text{C}$ 1 min; $T_2 = 96^\circ\text{C}$ 30 sec; $T_3 = 50^\circ\text{C}$ 15 sec; $T_4 = 60^\circ\text{C}$ 4 min

Nach dem 4. Schritt wurde erneut bei Schritt 2 begonnen, was 34 Mal wiederholt wurde. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben auf 4°C bis zur Entnahme gehalten.

Danach folgte die Aufarbeitung der Proben. Es wurden 80 μl 0,3 M Natriumacetat und 250 μl kaltes absolutes Ethanol zur DNA gegeben und dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Daraufhin wurden 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach entfernen des Überstandes wurde das nicht sichtbare Pellet mit 1 ml kaltem Ethanol (70%) gewaschen und 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Proben so lange bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sie vollständig getrocknet waren (Dauer ca. 3 Stunden). Nach der Trocknung wurden die Proben zur Analyse in das Sequenzierlabor ins Institut für Pathologie, UKE gegeben.

3.2.3 Bakterienkultur

3.2.3.1 Klonierung

Um Plasmid DNA herzustellen, wurden 4 μl des aufgereinigten PCR-Produkts, 1 μl Salzlösung (1.2 M NaCl; 0.06 M MgCl) und 1 μl pCRII-TOPO- Vektor (beides war dem Kit beigelegt) in ein Tube pipettiert und 30 Minuten (um möglichst viele Bakterienklone zu bekommen) bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3.2 Transformation

Um die Plasmid DNA zu vervielfältigen, wurden 400 μl chemisch-kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 6 μl des Klonierungsreaktionsgemisches versetzt und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Bakterien 42°C

ausgesetzt, um die Aufnahme von Plasmiden zu induzieren. Daraufhin wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurden einmal 100 µl und einmal der Rest der Suspension auf Antibiotikum-haltigen (Ampicillin) Agarplatten ausplattiert und bei 37°C 16 Stunden inkubiert. Sollten die Bakterien zu lang wachsen, bestünde die Gefahr, dass das Ampicillin verbraucht und sich Satellitenkolonien bilden würden, die das Separieren der erwünschten vektorhaltigen Klone erschweren würde. Am nächsten Tag konnten pro Zelllinie 10 Klone separiert und in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin aufgenommen und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert werden.

3.2.3.3 Plasmid-Mini-Präparation

Es wurden 4 ml der Übernachtskultur in zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 20 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 µl des dem Kit beigefügtem P1-Puffers (T₅₀E₁₀: 50mM Tris pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mg/ml RNase) resuspendiert. Daraufhin wurden 200 µl P2-Puffer hinzugegeben (0.2 M NaOH/1% SDS), durch achtmaliges invertieren gemischt und 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Prozedur wurde mit 150 µl P3-Puffer (3 M potassium Acetate pH 4.8) wiederholt. Dann wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C und 13.000 rpm 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml -20°C kalter absoluter Ethanol 30 Minuten bei -20°C präzipitiert. Nach der halben Stunde wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C und 13.000 rpm 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und 500 µl -20°C kaltem 70 prozentigem Ethanol hinzugefügt. Wieder wurde in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C und 13.000 rpm 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Lyophylle 20 Minuten getrocknet. Erst als das Pellet komplett trocken war, wurde die Plasmid-DNA mit 30 µl destilliertem Wasser resuspendiert und bei 4°C gelagert.

3.2.3.4 Plasmid-Maxi-Präparation

Es wurden Bakterienkulturen mit den zu amplifizierenden Plasmiden angelegt und bei 37°C 16 Stunden bei 300 rpm geschüttelt. Daraufhin wurden die Kulturen 15 Minuten bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 10 ml des dem Kit beigefügten Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde die Suspension 6 Mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um genomische DNA, Proteine und Zelltrümmer zu präzipitieren, wurden 10 ml Puffer P3 zu der Zellsuspension hinzugegeben und diese 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit wurde 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und daraufhin der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Um ausschließlich die Plasmid-DNA zu erhalten, wurde erneut bei 13.000 rpm und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden mehrere Qiagen-tip 500 mit jeweils 10 ml QBT-Puffer äquilibriert (dieser sowie folgende Puffer und Säulen waren dem Kit beigefügt). Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wurde auf ein Qiagen-tip gegeben und dadurch gefiltert. Die Säule wurde daraufhin 2 Mal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen, um Kontaminationen zu vermeiden. Dann wurde ein neues Röhrchen unter die Säulen gestellt und die am Filter haftende DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde dann in dem neuen Röhrchen mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und 30 Minuten bei 11.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 5 ml 70 prozentigem Ethanol gewaschen, in ein Greiner-Röhrchen überführt und 15 Minuten bei 11.000 rpm und 4°C erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde erst in der Lyophylle getrocknet und dann in 300 µl TE-Puffer, pH 8,0, gelöst. Durch Extinktionsmessung wurde die Konzentration der DANN bestimmt und diese nochmals mittels Agarosegel-Analyse kontrolliert.

3.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

3.2.4.1 Lysat-Herstellung

Die Zellen wurden für 7 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert und unter kräftigem Auf- und Abpipettieren in NP40- Lysepuffer lysiert. Dabei wurden 5×10^7 Zellen in

1 ml NP40-Puffer lysiert. Nach anschließender Inkubation für 5 Minuten auf Eis wurden die Lysate auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und 10 Minuten mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Nachdem die Protein-Lysate hergestellt wurden, wurden die Proteinkonzentrationen in Triplikaten mittels Photometer und Standardreihe bestimmt. Dazu wurde die Arbeitslösung A´ hergestellt, bestehend aus 20 µl Reagenz S und 1 ml Reagenz A. Parallel zu dem Ansatz wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in NP40-Lysispuffer pipettiert (0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 mg/ml). Danach wurden 5 µl des verdünnten Protein-Lysats (1:10) in das Well einer Mikrotiterplatte pipettiert und nacheinander 25 µl Arbeitslösung A´ und 200 µl Lösung B hinzugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei 595 nm gemessen und daraufhin die Proteinkonzentrationen durch die Standardreihe ermittelt.

3.2.4.3 Western Blot

Der Western Blot besteht aus zwei unterschiedlichen Teilen.

Als Erstes wird ein Proteingemisch in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im zweiten Teil werden dann die Proteine per Elektro-Blotting auf eine feste Nitrozellulosemembran übertragen und durch spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen. Ein Sekundärantikörper, der das Enzym Meerrettichperoxidase kovalent gebunden hat, bindet an den Erstantikörper und kann in Verbindung mit einer Entwicklungslösung eine detektierbare Chemilumineszenz auslösen.

Die „X Cell Sure Lock“- Western Blot – Apparatur von Invitrogen besteht aus einer inneren und einer äußeren Kammer. Für die innere Kammer, in die die Fertiggele

(NuPage 10%, Bis-Tris Gel, 1,0 mm x 10 well (oder 12 well) von Invitrogen eingespannt wurden, wurden 200 ml des 1x MOPS-Puffers mit 250 µl DTT gemischt. Daraufhin wurden 20 µg Protein-Lysat mit NP40-Lysispuffer auf 13,3 µl gebracht und mit 6,7 µl 3x Ladepuffer vermischt. Die Proben wurden in dem Schutron 5 Minuten geschüttelt und auf 100°C erhitzt. Für den Marker wurden zu 49 µl 1x Ladepuffer 0,5 µl low-range und 0,5 µl high-range pipettiert und dann 1 Minute auf ebenfalls 100°C erwärmt. Nach der Vorbereitung der Apparatur (Gele einspannen, Puffer hinzufügen, Geltaschen spülen, an die Stromquelle anschließen (Pharmacia Biotech)) wurden die Proben und der Marker in die Geltaschen pipettiert. Danach wurden die Proben etwa 1 ½ Stunden bei 150 V laufen gelassen. Währenddessen wurden die Nitrozellulose-Membran (0,45 µm) und das Watman 3MM-Chromatografiepapier auf Gelgröße zugeschnitten. Dann wurde die Western Blot-Apparatur (Trans-Blot™ Cell, Bio Rad) vorbereitet. Die Western Blot-Halterung wurde mit der dunklen Fläche nach unten in eine Schale mit Transfer-Puffer gelegt. Darauf wurden in der Reihenfolge ein Scotch-Schwamm, ein mit Transfer-Puffer benetztes Watmann-Papier, das Gel und dann eine in Transfer-Puffer getränkte Nitrocellulose-Membran gelegt. Daraufhin wurde das Tray geschlossen und so in die Western Blot-Apparatur gehängt, dass sich zwischen dem Gel und dem Pluspol die Nitrozellulose-Membran befand, da die Proteine von dem Minus- zum Pluspol wandern und damit in der Nitrozellulose-Membran hängen bleiben. Die Apparatur wurde mit Transfer-Puffer gefüllt und die Proteine wurden im Nasszell-Verfahren in 2 Stunden bei 50 V auf die Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend kurz in 1 x TBS gewaschen und mit 1 x TBS / 0,5% Tween 20 / 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur für 1 Stunde blockiert. Der am Rand aufgetragene, biotinylierte Marker wurde als Streifen von der Membran abgeschnitten und über Nacht in der Block-Lösung bei 4°C belassen. Der primäre Antikörper wurde in 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver / 0,01% Natriumazid verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C damit inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver gewaschen und 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-Antikörper–HRP-gekoppelt; nach den Angaben des Herstellers in 1x TBS / 0,5% Tween 20 / 2,5% Magermilchpulver verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Der abgetrennte Markerstreifen wurde

dreimal für 10 Minuten in 1x TBS / 0,5% Tween 20 gewaschen und mit Streptavidin (1:2000 verdünnt in 1x TBS / 0,5% Tween 20, Amersham Pharmacia Biotech) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Membran und Marker wurden weiterhin wie folgt gewaschen: Zweimal für 10 Minuten mit 1x TBS / 0,5% Tween 20, einmal für 10 Minuten mit 1x TBS / 3% Tween 20, zweimal für 15 Minuten mit 1x TBS / 0,5% Tween 20, zweimal für 30 Minuten mit 1x TBS / 0,5% Tween 20, zweimal für 30 Minuten mit 1x TBS. Je 750 µl des „SuperSignal® West Dura Stable Peroxid Buffer“ und der „SuperSignal® West Dura Luminol/Enhancer Solution“ von Pierce wurden zuerst in einem Eppendorf-Tube gemischt und dann auf eine gesäuberte Glasplatte gegeben. Die Membran wurde mit der Proteinseite zur Glasplatte 5 Minuten durch die Lösung geschwenkt und danach in dem LAS 3000 – Chemilumineszenz - Imager von FUJI entwickelt.

4. Ergebnisse

4.1 Mutationsanalysen der Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die in Kultur genommenen Zelllinien die Mutationen aufweisen, die in der Literatur beschrieben wurden, wurden vor den eigentlichen Experimenten Mutationsanalysen durchgeführt.

a) Das Charakteristikum der Zelllinien EOL-1 und K562 sind Fusionsgene, die mittels RT-PCR und Agarose-Gel nachgewiesen werden sollten. Dabei wurden die Primer so gelegt, dass sich nur bei einem Vorhandensein des Fusionsgens, ein Fragment in bestimmter Länge ergibt. Bei der Zelllinie EOL-1 ergibt sich mit dem FIP1L1/PDGFRA-Fusionsgen eine Fragmentlänge von 468 Basenpaaren (bp) (Abb. 12). Das Bcr/Abl-Fusion der Zelllinie K562 hat eine Fragmentlänge von ungefähr 700 Basenpaaren (Abb. 11). Die Mutationen der Zelllinien K562 und Eol-1 konnten damit bestätigt werden.

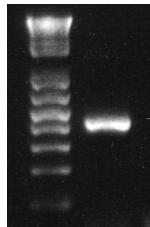


Abb. 12: EOL-1 mit FIP1L1/PDGFRA-Fusionen

Nach RT-PCR und Auftragen auf ein Agarosegel ergibt sich für das Fusionsgen eine Fragmentlänge von 468 bp.

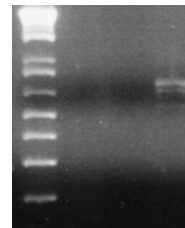


Abb. 11: K562 mit BCR/ABL- Fusionsgen

Nach RT-PCR und Auftragen auf ein Agarosegel ergibt sich für das Fusionsgen eine Fragmentlänge von ~ 700 bp.

b) Um die in der Literatur beschriebenen Mutationen der Zelllinien MV 4-11, die eine Tandemduplikation in Flt3 hat (Abb. 13), und Kasumi-1, die eine Punktmutation in c-kit hat (Abb. 14), zu bestätigen, wurde nach einer RT-PCR der RNA das Produkt aufgereinigt und nach einer Klonierung die Plasmid-DNA

präpariert und sequenziert. Die Mutationen der Zelllinien MV4-11 und Kasumi-1 konnten bestätigt werden.



Abb. 13: MV 4-11 mit Flt3-Tandemduplikation

Es werden die Sequenzen des Wildtyp Flt3 und des Flt3 in der Zelllinie MV 4-11 gegenübergestellt. 30 bp sind dupliziert.

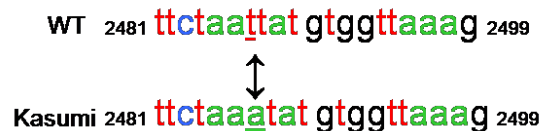


Abb. 14: Kasumi-1 mit c-kit-Punktmutation

Es werden die Sequenzen des Wildtyp c-kit und des c-kit in der Zelllinie Kasumi-1 gegenübergestellt. Es kommt zu einer Punktmutation bei nt 2486 (T→A)

4.2 Analyse des PI3K/Akt-Signalweges in Zelllinien mit konstitutiv aktivierten Tyrosinkinaserzeptoren

4.2.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg hat eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation, der Zellgröße, des Wachstums und des Überlebens der Zellen. Um zu überprüfen, ob die PI3-Kinase in den untersuchten Zelllinien aktiv ist, wurde mit Hilfe von Western Blots die Phosphorylierung von Akt an dem Serinrest 473 bestimmt.

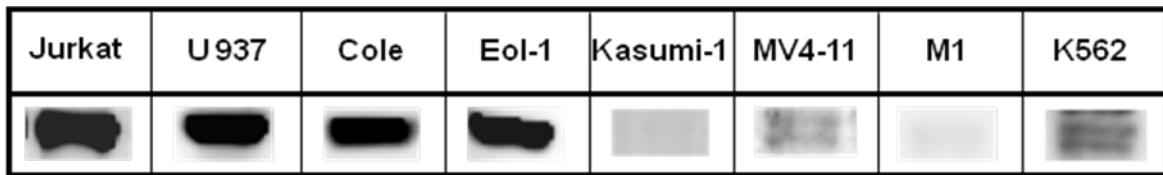


Abb. 15: Detektierung von p-Akt (Ser473) in Zelllinien Jurkat, U937, Cole, Eol-1, MV4-11, M1 und K562 im Western Blot

Die Lysate der verschiedenen Zelllinien wurden mittels Western Blot auf die Aktivierung der PI3-Kinase hin untersucht. Es wurde p-Akt (Ser473) nachgewiesen.

Die Zelllinien U937, Cole und Eol-1 wiesen einen hohen p-Akt (Ser473)-Spiegel auf, was auf eine starke Aktivierung der PI3-Kinase schließen lässt. Bei den Zelllinien MV4-11, M1 und K562 wurden hingegen nur geringe p-Akt-Mengen gefunden, wodurch hier von einer geringen Aktivität der PI3-Kinase auszugehen ist. Für die Zelllinie Kasumi-1 konnte keine Aktivierung der PI3-Kinase nachgewiesen werden. Als Referenz wurde der p-Akt-Spiegel der Zelllinie Jurkat genommen, bei der eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bekannt ist (Abb. 15).

4.2.2 Abhängigkeit der Proliferation von der PI3-Kinase-Aktivität

Um herauszufinden, ob in den oben beschriebenen Zelllinien die Aktivität der PI3-Kinase für das Wachstum der Zellen notwendig ist, wurden sie mit dem PI3K-Hemmstoff LY 294002 behandelt.

Begonnen wurde der Proliferationsversuch mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml in 6-well-Platten. Es wurden Triplikate ausgesät. Der Hemmstoff LY294002 wurde in einer Endkonzentration von 25 μ M eingesetzt. Um zu garantieren, dass eine Wachstumshemmung nicht aufgrund der DMSO-Zugabe erfolgte, wurde zu den Zellen, die nicht mit LY294002 behandelt wurden, die gleiche Menge DMSO gegeben. Die Zellzahlen wurden jeden zweiten Tag über 8 Tage mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Exemplarisch werden die logarithmierten Mittelwerte der Zellzahlen von zwei der acht untersuchten Zelllinien als Wachstumskurven dargestellt.

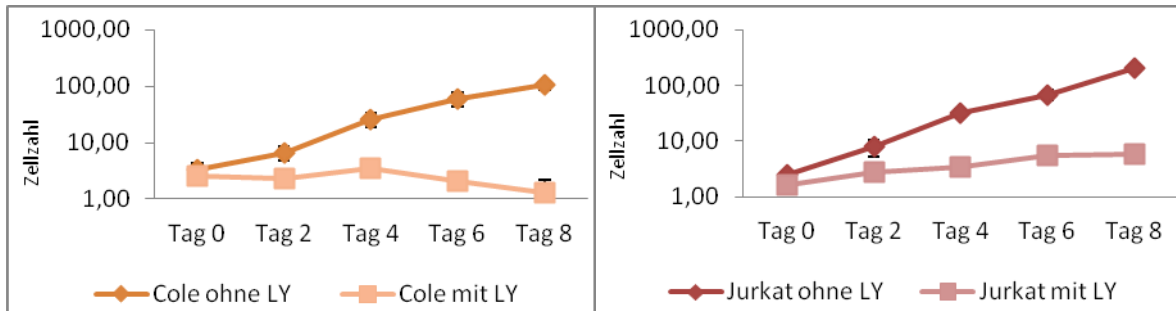


Abb. 16: Wachstumskinetiken der Zelllinien Cole und Jurkat mit und ohne Hemmstoff LY294002

Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten mit und ohne den PI3K-Hemmstoff LY294002 (LY) inkubiert und über 8 Tage jeden zweiten Tag gezählt. Der Hemmstoff LY294002 wurde in einer Endkonzentration von 25µM eingesetzt. Die Zellen, die keinen Hemmstoff erhielten, wurden mit DMSO inkubiert, um eine Wachstumshemmung durch das DMSO auszuschließen.

Bereits nach zwei Tagen ist bei beiden Zelllinien ein Wachstumsunterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Am 8. Tag beträgt die Hemmung des Wachstums durch LY294002 im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen bei der Zelllinie Cole etwa 98,8 % und bei der Zelllinie Jurkat etwa 97,3 %. Bei den übrigen Zelllinien verhält es sich ähnlich.

Nur die Zelllinie K562 reagiert mit 90,7 % Hemmung etwas schwächer auf den Hemmstoff. Die Zellen wachsen zwar langsamer, aber sie wachsen kontinuierlich (siehe Abb. 18). Die anderen untersuchten Zelllinien weisen unter Einfluss des Hemmstoffes LY294002 fast kein Wachstum auf. Auch der Prozentsatz der toten

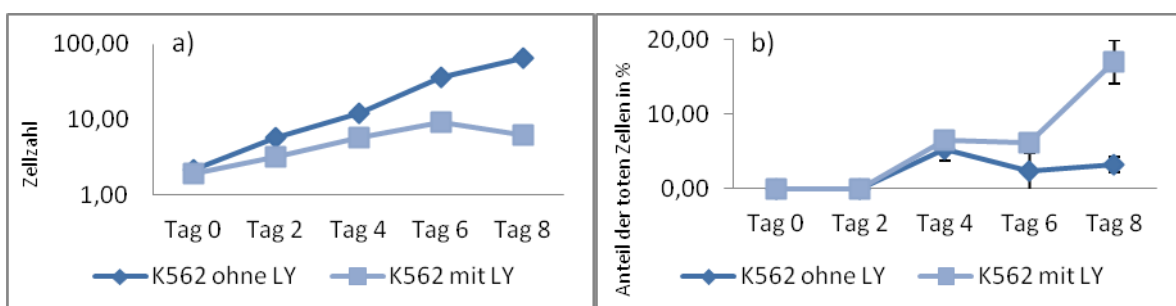


Abb. 17: a) Wachstumskinetik der Zelllinie K562 mit und ohne Hemmstoff LY294002; b) Prozentsatz der gestorbenen K562 Zellen als Anteil der Gesamtzellzahl mit und ohne Hemmstoff LY294002

a) Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten mit und ohne den PI3K-Hemmstoff LY294002 (LY) inkubiert und über 8 Tage jeden zweiten Tag gezählt. b) In der Abbildung ist auf der Ordinate der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl und auf der Abszisse sind die Tage dargestellt.

Zellen liegt bei den behandelten K562-Zellen mit knapp über 20 % unter dem der anderen Zelllinien, die sich zwischen 50 und 95 % gestorbener Zellen bewegen.

Im Folgenden werden die Proliferationsergebnisse aller Zelllinien am 8. Tag der durchgeführten Wachstumskinetik abgebildet. Die Zellzahlen der Zellen, die nicht mit dem Hemmstoff LY294002 behandelt wurden, wurden als Referenz verwendet und gleich 100 % gesetzt. Die Zellzahlen der mit LY294002 inkubierten Zellen wurden dazu in Bezug gesetzt und so das relative Wachstum berechnet. Das Wachstum jeder der acht untersuchten Zelllinien lässt sich durch LY294002 hoch signifikant hemmen. Im Vergleich zu den Zellen ohne Hemmstoff lässt sich das Wachstum der Jurkat zu $97,3 \% \pm 0,4\%$, der U937 zu $92,8\% \pm 2,8\%$, der Cole zu $98,8 \% \pm 0,9 \%$, der Eol-1 zu $97,3 \% \pm 1,3 \%$, der Kasumi-1 zu $97,7 \% \pm 0,9 \%$, der MV4-11 zu $99,6 \% \pm 0,2 \%$, der M1 zu $97,8 \% \pm 0,1 \%$ und der K562 zu $90,7 \% \pm 2,2 \%$ durch LY294002 hemmen. (Abb. 18)

Weiterhin werden die Ergebnisse der Zählungen der toten Zellen aller Zelllinien nach Zugabe des Hemmstoffes LY294002 am 8. Tag dargestellt. Dabei wurde der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet. Es zeigt sich, dass nach Zugabe des PI3-Kinase-Hemmstoffes LY294002 signifikant mehr Zellen im Verlauf des Experimentes absterben als bei den Kontrollzellen, die dem Hemmstoff nicht ausgesetzt wurden. Im Vergleich finden bei den Jurkat $50,7 \% \pm 1 \%$, den U937 $40,6\% \pm 2,2\%$, den Cole $68,6 \% \pm 0,9 \%$, den Eol-1 $45,6 \% \pm 0,5 \%$, den Kasumi-1 $50,2 \% \pm 8 \%$, der MV4-11 zu $83,2 \% \pm 9 \%$, der M1 zu $53,6 \% \pm 0,7 \%$ und der K562 zu $13,8 \% \pm 3 \%$ durch LY294002 (Abb. 19)

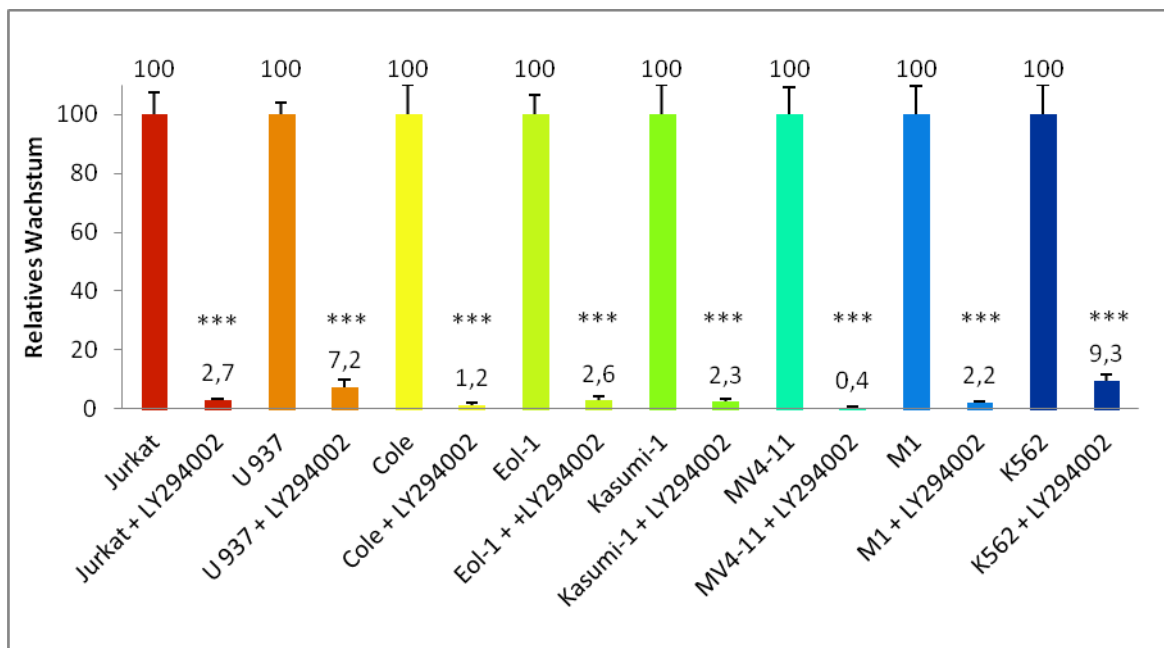


Abb. 18: Proliferationsergebnisse der Zelllinien Jurkat, U 937, Cole, Eol-1, Kasumi-1, M1 und K562 mit und ohne Zugabe des Hemmstoffes LY294002

Es ist auf der Ordinate das Wachstum der Zelllinien in Prozent dargestellt. Die Zellzahlen der Zellen ohne Hemmstoff wurden gleich 100 % gesetzt. Die Zellzahlen der mit LY294002 behandelten Zellen wurden dazu in Bezug gesetzt und so das prozentuale Wachstum berechnet. (***) $p \leq 0,001$.

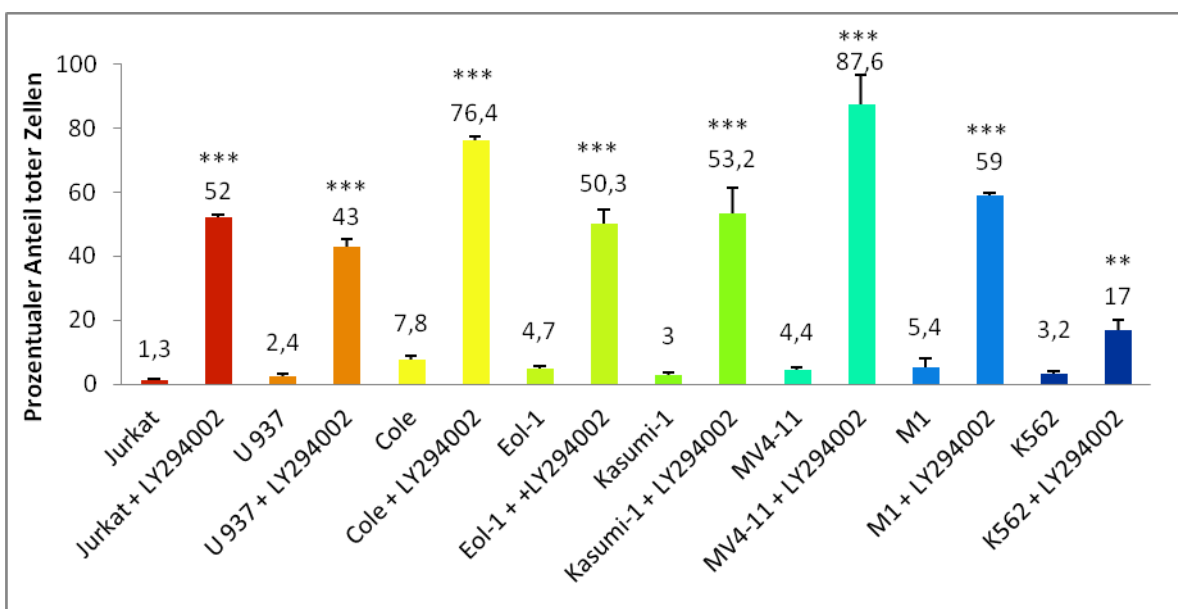


Abb. 19: Prozentualer Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl der Zelllinien Jurkat, U 937, Cole, Eol-1, Kasumi-1, M1 und K562 mit und ohne Zugabe des Hemmstoffes LY294002

Die toten Zellen wurden über 8 Tage gezählt. Dann wurde der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellzahl, der entweder mit oder ohne Hemmstoff LY294002 gewachsen sind, berechnet. (**) $p \leq 0,01$. (***) $p \leq 0,001$.

4.3 Die Rolle von SHIP1 in Zelllinien mit konstitutiv aktivierten Rezeptortyrosinkinasen

Die Inositol-5-Phosphatase SHIP1 ist ein negativer Regulator der Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen und durch die SHIP-knockout-Maus konnte bestätigt werden, dass SHIP1 wichtig für die normale Entwicklung und Funktion von hämatopoetischen Zellen ist.

Um herauszufinden, ob eine Überexpression von SHIP1 das Wachstum in den oben beschriebenen Leukämiezelllinien beeinflussen kann, wurden die Zellen mit dem retroviralen Vektor SF91iGpre transduziert, in den entweder SHIP1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP1 (D672A) kloniert wurde. Als Koexpressionsvektor exprimiert SF91iGpre außerdem das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).

Mit Hilfe von 293gp-Zellen wurden Virusüberstände mit den drei Konstrukten SF91, SF91+SHIP1 und SF91+SHIP1-Mutante und den Pseudotypisierungen VSV-G und amphotrop hergestellt und die Zielzelllinien damit infiziert. Der Vektor SF91 wurde als Kontrolle eingesetzt, damit ausgeschlossen werden konnte, dass eine eventuelle Wachstumshemmung der mit SF91+SHIP1 transduzierten Zellen auf die Manipulation der Zellen zurückzuführen war. Mit der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante sollte untersucht werden, ob Effekte, die mit SHIP1 beobachtet werden, von der enzymatischen Aktivität von SHIP1 abhängen.

4.3.1 Proliferation der Leukämiezelllinien nach Expression von SHIP1 mit dem Vektor SF91iGpre

Nach Transduktion der Zelllinien wurde die Proliferation gemessen. Dazu wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Als Erstes wurden die Zellen in dem Zellsortierer FACS Aria nach EGFP-positiven Zellen sortiert, in Kultur genommen, über 6 Tage mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt und eine Wachstumskinetik erstellt. Zusätzlich wurde eine Proliferationsmessung direkt

nach der Transduktion mittels BrdU-APC-Markierung durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse beider Verfahren dargestellt.

Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten der transduzierten Zelllinien in Nährmedien mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und in Nährmedien mit 0,5 % FCS, also unter reduzierten Serumbedingungen, untersucht.

4.3.1.1 Proliferationsuntersuchungen anhand von Wachstumskinetiken

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit den Viren, die die drei Konstrukte SF91, SF91+SHIP1 und SF91+SHIP1-Mutante (D672A) enthielten, transduziert und nach EGFP-positiven Zellen mit Hilfe des FACS Aria sortiert. Die positiven Zellen wurden durchschnittlich 6 Tage in Kultur gehalten, um genügend Zellen für Triplikate zur Erstellung der Wachstumskinetik und zur Lysatherstellung zu haben. Daraufhin wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5/\text{ml}$ in 24-well-Platten in Tripikaten ausplattiert und über sechs Tage jeden zweiten Tag mit Hilfe der Neubauerzählkammer gezählt. Die Zellen der Versuchsreihe, die in 0,5 % FCS-haltigem Medium gehalten werden sollten, wurden 24 Stunden vor Beginn des Zählversuches in dieses Nährmedium umgesetzt.

Im Folgenden wird die Zellzahl der jeweiligen Zelllinie am 6. Tag des Proliferationsexperimentes dargestellt. Es wird zwischen den Zellen, die in 10 % FCS-haltigem Medium und denen, die in 0,5 % FCS-haltigem Medium gehalten wurden unterschieden.

U937

Bei der Zelllinie U937, die in 10% FCS-haltigem Medium kultiviert wurde, kann man nach sechs Tagen keinen signifikanten Wachstumsunterschied nach Transduktion mit SHIP1 und SHIP1-Mutante und der Vektorkontrolle feststellen (siehe Abb. 20).

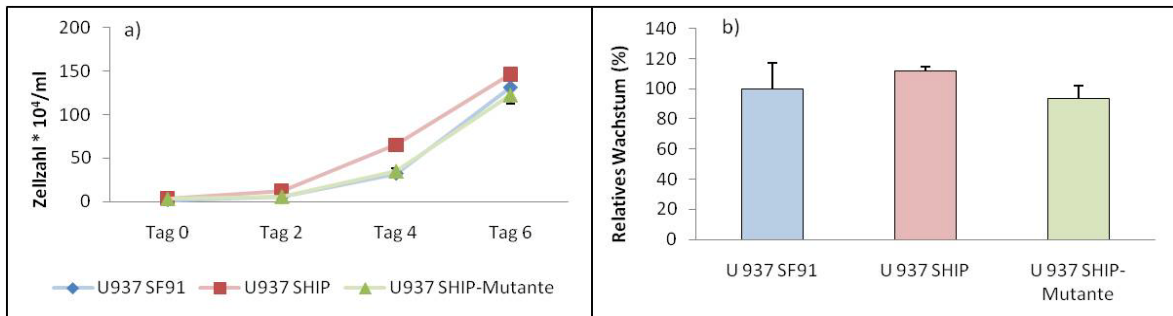


Abb. 18: Wachstumskinetik der Zelllinie U937 am 6.Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium

a) U937-Zellen wurden mit SF91, SF91 mit SHIP und SF91 mit SHIP-Mutante transduziert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP-positiven Zellen in Kultur genommen und in Triplikaten über 6 Tage jeden zweiten Tag gezählt. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied.

Bei den U937-Zellen, die in 0,5% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, kann man jedoch bei den mit SHIP1 transduzierten Zellen eine hoch signifikante Wachstumsreduktion von 70,7 % \pm 15 % im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem Vektor SF91 transduziert wurden, erkennen ($p = 0,0002$). Zwischen SF91 und SHIP1-Mutante besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied (siehe Abb. 21).

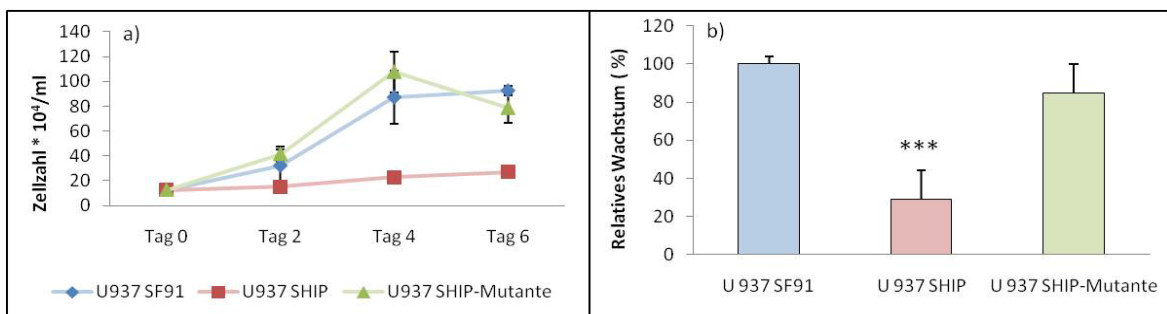


Abb. 19: Wachstumskinetik der Zelllinie U937 am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium

a) Mit den Zellen wurde ähnlich verfahren wie in Abb. 19, nur dass sie 24 Stunden vor Beginn der Zählungen in 0,5% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht eine hoch signifikante Wachstumsreduktion der U 937 -Zellen, die mit SF91 + SHIP transduziert wurden, (***) $p \leq 0,001$.

Cole

In dem Nährmedium, das 10 % FCS enthielt, ist nach sechs Tagen kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den Cole-Zellen, die mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transduziert wurden, zu erkennen (siehe Abb. 22).

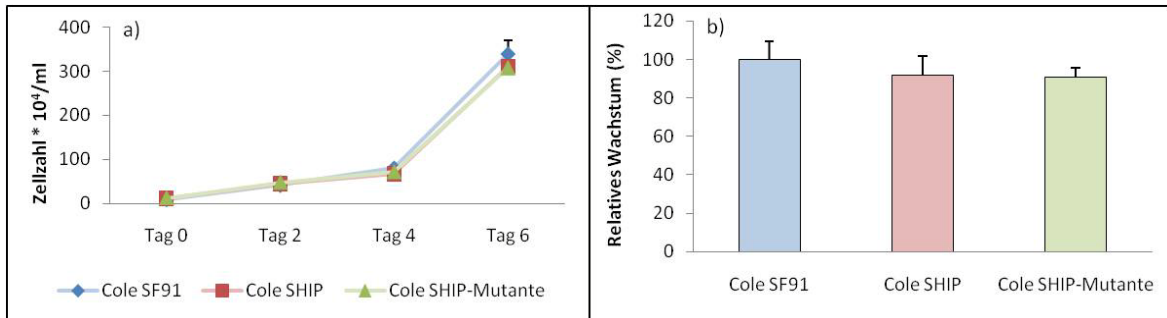


Abb. 20: Wachstumskinetik der Zelllinie Cole am 6. Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium

a) Cole-Zellen wurden mit SF91, SF91 mit SHIP und SF91 mit SHIP-Mutante transduziert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP-positiven Zellen in Kultur genommen und in Triplikaten über 6 Tage jeden zweiten Tag gezählt. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied.

Nach Kultivierung der Cole-Zellen in Nährmedium mit 0,5 % FCS konnte hingegen durch SHIP1 eine Wachstumsreduktion von $62,6 \% \pm 0,7 \%$ im Vergleich zu SF91 gezeigt werden ($p = 0,0008$). Die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante weist im Vergleich zum Vektor eine Wachstumshemmung von $21,8 \% \pm 14,5 \%$ auf ($p = 0,042$) (siehe Abb. 23)

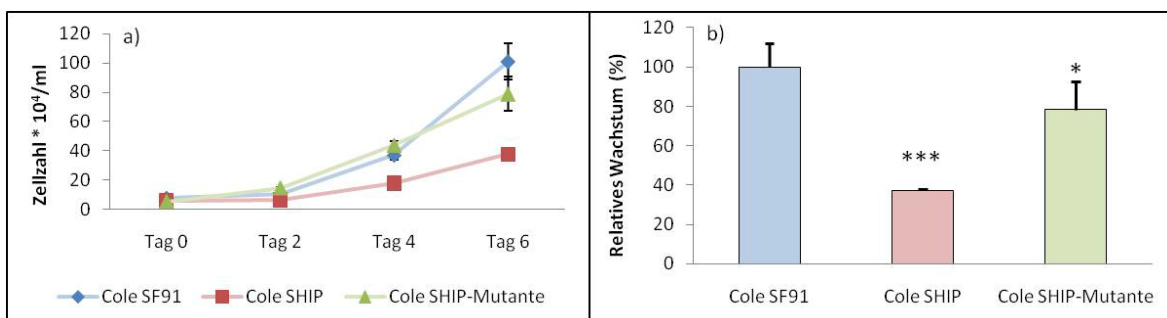


Abb. 21: Wachstumskinetik der Zelllinie Cole am 6. Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium

a) Mit den Zellen wurde ähnlich verfahren wie in Abb. 21, nur dass sie 24 Stunden vor Beginn der Zählungen in 0,5% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht eine hoch signifikante Wachstumsreduktion der Cole-Zellen, die mit SF91 + SHIP transduziert wurden, (*) $p \leq 0,05$.

Eol-1

Die Eol-1-Zellen mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante, die 10 % FCS-haltigem Nährmedium kultiviert wurden, weisen keinerlei signifikanten Wachstumsunterschied nach sechs Tagen auf (siehe Abb. 24).

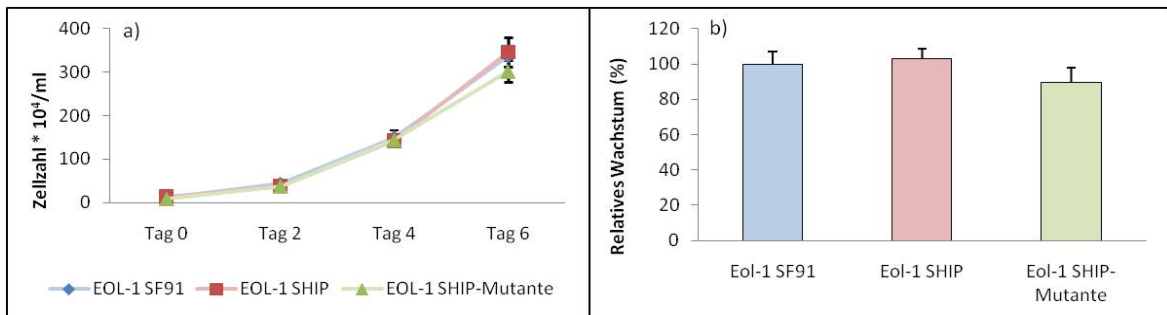


Abb. 22: Wachstumskinetik der Zelllinie Eol-1 am 6. Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium

a) EOL-1-Zellen wurden mit SF91, SF91 mit SHIP und SF91 mit SHIP-Mutante transduziert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP-positiven Zellen in Kultur genommen und in Triplikaten über 6 Tage jeden zweiten Tag gezählt. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied.

In dem 0,5 % FCS-haltigen Medium weisen die mit SHIP1 transduzierten EOL-1-Zellen eine hoch signifikante Wachstumsreduktion von $22,1 \% \pm 6 \%$ im Vergleich zu den mit SF91 transduzierten Zellen auf ($p = 0,0073$). Zwischen der SHIP1-Mutante und dem Vektor SF91 besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied (siehe Abb. 25).

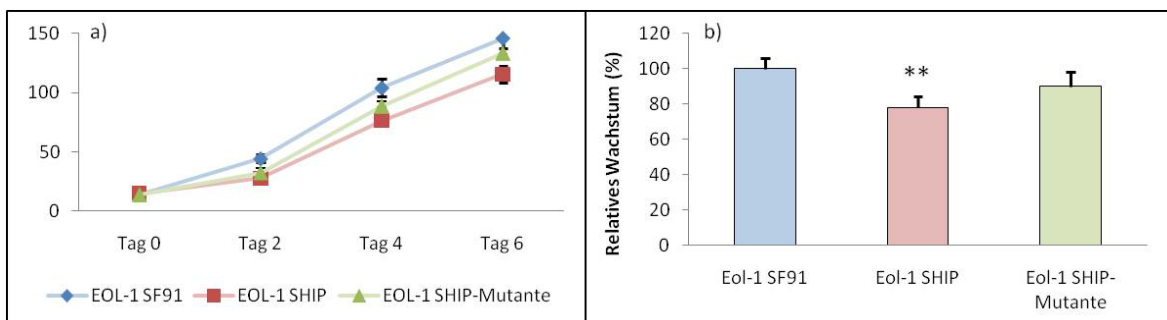


Abb. 23: Wachstumskinetik der Zelllinie Eol-1 am 6. Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium

a) Mit den Zellen wurde ähnlich verfahren wie in Abb. 21, nur dass sie 24 Stunden vor Beginn der Zählungen in 0,5% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht eine signifikante Wachstumsreduktion der EOL-1-Zellen, die mit SF91 + SHIP transduziert wurden, (** $p \leq 0,01$).

K562

In dem 10 % FCS-haltigem Medium zeigen die mit SHIP1 transduzierten K562-Zellen eine signifikante Wachstumshemmung um $26,1 \% \pm 8,5 \%$ im Vergleich zum Vektor ($p = 0,001$). Zwischen den Zellen mit der SHIP1-Mutante und denen mit SF91 besteht kein signifikanter Wachstumsunterschied (siehe Abb. 26).

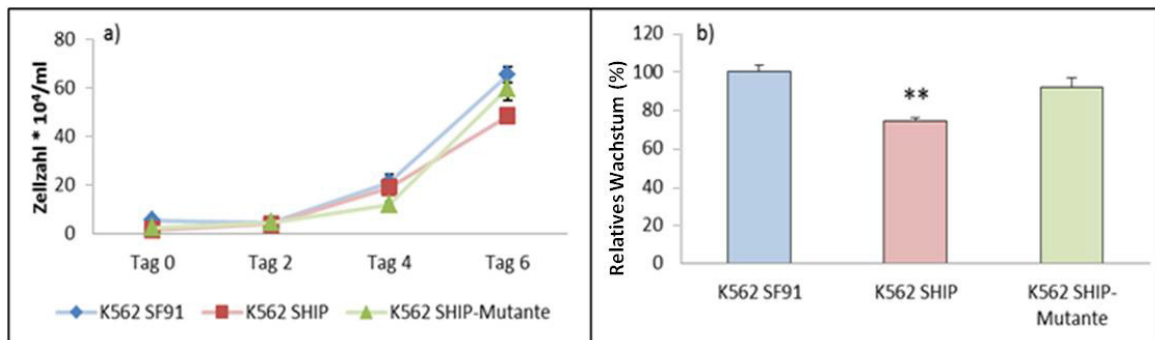


Abbildung 24: Wachstumskinetik der Zelllinie K562 am 6. Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium

a) K562-Zellen wurden mit SF91, SF91 mit SHIP und SF91 mit SHIP-Mutante transduziert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP-positiven Zellen in Kultur genommen und in Triplikaten über 6 Tage jeden zweiten Tag gezählt. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht eine signifikante Wachstumsreduktion der K562-Zellen, die mit SF91 + SHIP transduziert wurden. (**) $p \leq 0,01$

In dem 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium besteht interessanterweise sowohl bei den mit SHIP1 als auch mit der SHIP1-Mutante transduzierten K562-Zellen eine signifikante Wachstumssteigerung im Vergleich zu den mit dem Vektor transduzierten Zellen. Durch die Transduktion mit SHIP1 wird eine Wachstumssteigerung von $42,4 \% \pm 3 \%$ erreicht ($p = 0,0005$). Durch die SHIP1-Mutante steigert sich das Wachstum um $54,3 \% \pm 11 \%$ ($p = 0,007$) (siehe Abb. 27).

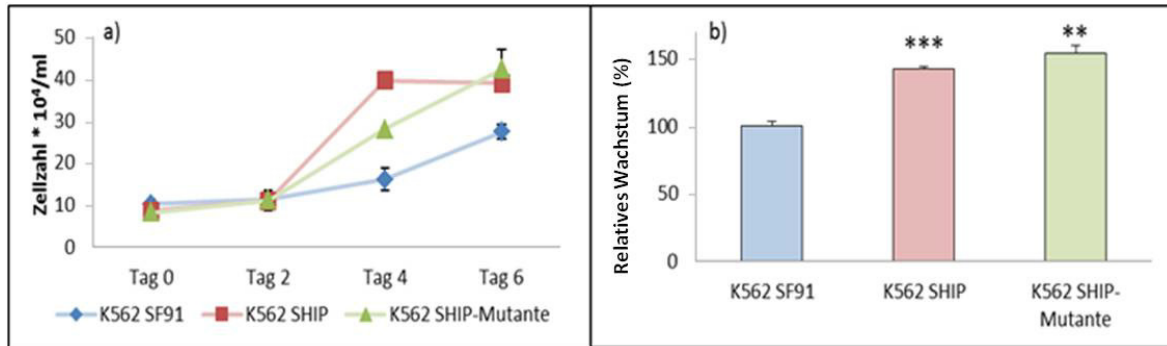


Abb: 25: Wachstumskinetik der Zelllinie K562 am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium

a) Mit den Zellen wurde ähnlich verfahren wie in Abb. 21, nur dass sie 24 Stunden vor Beginn der Zählungen in 0,5% FCS-haltigem Medium kultiviert wurden. b) Die in Abbildung a) gezeigten Zellzahlen 6 Tage nach Transduktion mit SHIP 1 und SHIP 1-Mutante sind in Relation zur Vektorkontrolle dargestellt. Es besteht eine hoch signifikante Wachstumsreduktion der Cole-Zellen, die mit SF91 + SHIP transduziert wurden, (***) $p < 0,001$.

4.3.1.2 Messung der Proliferation mit dem BrdU-APC-Assay

Die Zelllinien wurden in Triplikaten über drei Tage mit den Virusüberständen, die entweder nur den Vektor SF91, den Vektor mit SHIP1 oder den Vektor mit der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante enthielten, transduziert. Am darauffolgenden Abend wurden die Zelllinien über 16 Stunden mit der Base Bromdesoxyuridin (BrdU) inkubiert, die bei der Zellteilung in die DNA eingebaut wird. Im Anschluss wurde der fluoreszenzgekoppelte Antikörper (APC) gegen BrdU und das grün fluoreszierende Protein EGFP, das in den Vektor SF91 kloniert wurde, mittels FACS-Analyse detektiert.

Für die Messung der Proliferation in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium wurden die Zellen am Morgen nach der dritten Transduktion in 0,5 % FCS-haltiges Medium umgesetzt und 12 Stunden später mit BrdU versetzt.

Zur Überprüfung des BrdU-APC-Assays wurden Jurkat-TetOn-SHIP1 # 51-Zellen mit einem Tet-on-System in Triplikaten mit Doxycyclin (10 $\mu\text{g/ml}$), das in 70-prozentigem Ethanol gelöst wurde, oder dem PI3-Kinase Hemmstoff LY 294002 (25 μM) behandelt. Zur Kontrolle wurde ein Triplikat der Jurkat-Zellen nur mit 70-

prozentigem Ethanol versetzt. Eine Doxycyclingabe induziert bei dieser Zelllinie die SHIP1-Expression. Die Zellen wurden über vier Tage kultiviert. Am 3. Tag wurde BrdU dazugegeben, so dass die Proliferation der Zellen am nächsten Tag mittels FACS-Analyse gemessen wurde. (Abb. 28)

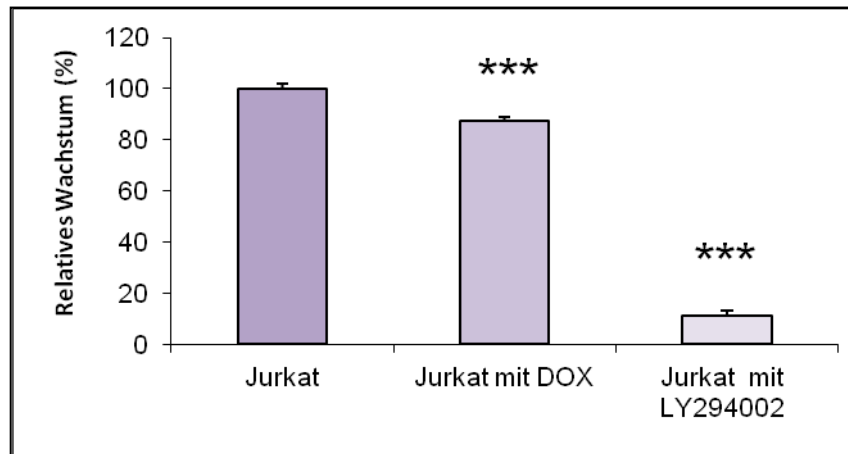


Abb. 26: Wachstum in Prozent der Zelllinie Jurkat #51 nach Zugabe von Doxycyclin oder LY 294002

Die Zellen wurden in Triplikaten mit Doxycyclin (10µg/ml, in 70%igem Ethanol gelöst), 70%igem Ethanol oder LY294002 behandelt und über 4 Tage kultiviert. Am 3. Tag wurde BrdU hinzugefügt und am 4. Tag der Anteil der BrdU-positiven Zellen im FACS-Gerät analysiert. Durch Doxycyclin wurde SHIP in den Jurkat #51-Zellen induziert, die Hemmung betrug daraufhin 22,5 % in 16 Stunden. Die Wachstumshemmung durch LY294002 betrug 88,8 %. (***) $p \leq 0,001$.

U937

Bei den U937-Zellen, die in 10 % FCS-haltigem Medium kultiviert und mit SHIP1 transduziert wurden, kann nach 16 Stunden BrdU-Einbau kein signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem Vektor SF91 transduziert wurden, festgestellt werden. Die Zellen, die die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante enthielten, zeigten interessanterweise einen Wachstumsvorteil von 3,5 % \pm 0,5 % ($p = 0,003$). (Abb. 29)

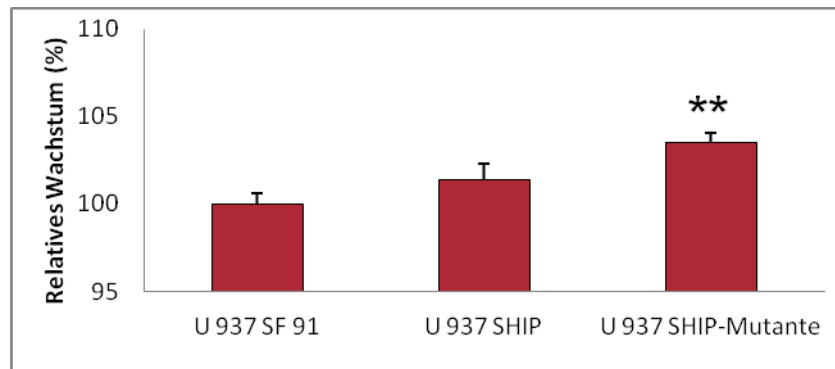


Abb. 27: Wachstum der Zelllinie U937 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die U937-Zellen, die mit der SHIP 1-Mutante transduziert wurden zeigten einen geringen aber signifikanten Wachstumsvorteil gegenüber der Vektorkontrolle. (**) $p \leq 0,01$.

In 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium zeigen die U937 SHIP1-Zellen jedoch eine Wachstumshemmung von $16,6 \% \pm 4 \%$ in 16 Stunden, im Vergleich zu den U937 SF91-Zellen ($p = 0,04$). Die U937 SHIP1-Mutante-Zellen zeigen keine signifikante Hemmung des Wachstums. (Abb. 30)

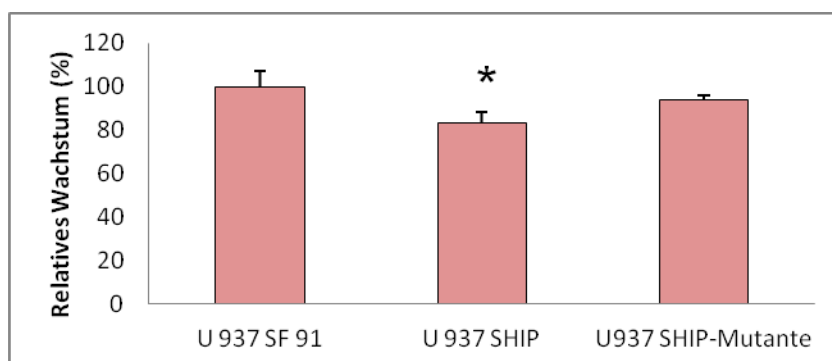


Abb. 28: Wachstum der Zelllinie U 937 in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Mit den Zellen wurde verfahren, wie in Abb. 26, doch wurde 12 Stunden vor der BrdU-Zugabe das Medium gewechselt und nur 0,5 % FCS hinzugegeben. Die Zellen, die mit SHIP transduziert wurden, zeigen einen Wachstumsnachteil von 16,6 % in Vergleich zum Vektor. (*) $p \leq 0,05$.

Eol-1

Nach 16 Stunden BrdU-Einbau in 10 % FCS-haltigem Nährmedium kann zwischen den Eol-1-Zellen, die mit SHIP1 transduziert worden sind, und denen, die nur SF91 enthielten, kein signifikanter Wachstumsunterschied festgestellt werden. Die Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, zeigen hingegen eine Hemmung des Wachstums um $5,2 \% \pm 1,5 \%$ ($p = 0,02$). (Abb. 31)

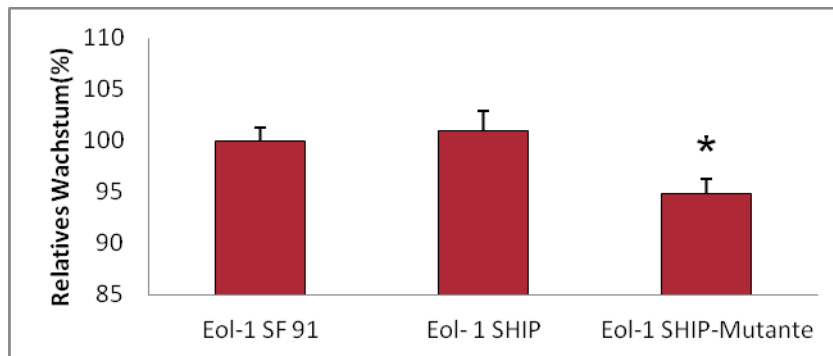


Abb. 29: Wachstum der Zelllinie Eol-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die Eol-1-Zellen, die mit der SHIP 1-Mutante transduziert wurden zeigten einen geringen aber signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber der Vektorkontrolle. (*) $p \leq 0,05$.

Kasumi-1

Zwischen den Kasumi-1-Zellen, die mit SHIP1 und denen, die mit SF91 transduziert wurden, besteht in 10 % FCS-haltigem Medium nach 16 Stunden kein signifikanter Wachstumsunterschied. Die SHIP1-Mutante hingegen weist einen Wachstumsnachteil von $6,5 \% \pm 1,8 \%$ im Vergleich zum Vektor auf ($p = 0,006$). (Abb. 32)

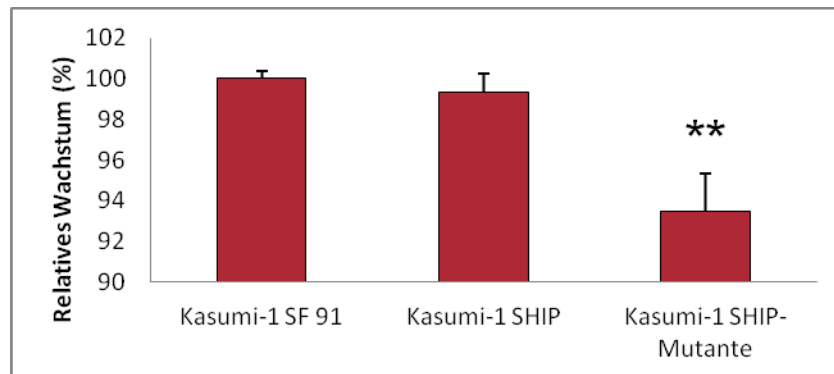


Abb. 30: Wachstum der Zelllinie Kasumi-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die Kasumi-1-Zellen, die mit der SHIP 1-Mutante transduziert wurden zeigten einen geringen aber signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber der Vektorkontrolle. (**) $p \leq 0,01$.

MV4-11

Bei den MV4-11-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, besteht in 10 % FCS-haltigem Medium nach 16 Stunden im Vergleich zu SF91 ein verstärktes Wachstum um $11,8 \% \pm 1,3 \%$ ($p = 0,009$). Die Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, zeigen im Vergleich zum Vektor eine Erhöhung des Wachstums um $16,1 \% \pm 1,3 \%$ ($p = 0,003$). (Abb. 33)

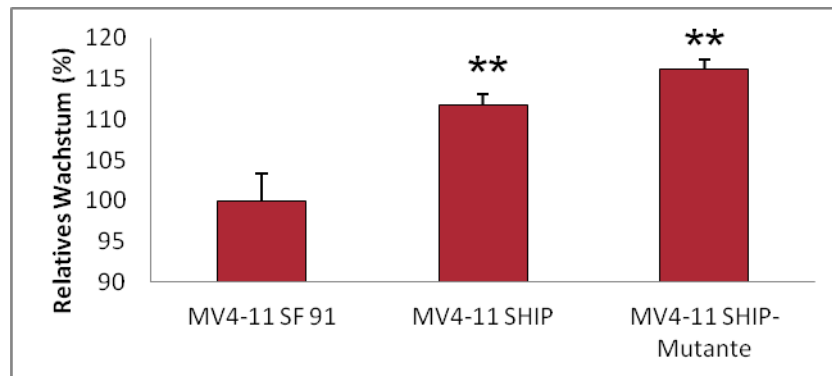


Abb. 31: Wachstum der Zelllinie MV4-11 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die MV4-11-Zellen, die mit der SHIP 1-Mutante transduziert wurden zeigten einen geringen aber signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber der Vektorkontrolle. (**) $p \leq 0,01$.

M1

Bei den M1-Zellen, die in 10 % FCS-haltigem Medium kultiviert und mit SHIP1 transduziert wurden, kann nach 16 Stunden BrdU-Einbau ein signifikanter Wachstumsnachteil im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem Vektor SF91 transduziert wurden, um $3,4 \% \pm 0,6 \%$ ($p = 0,003$) festgestellt werden. Die Zellen, die die SHIP1-Mutante enthielten, zeigten einen Wachstumsnachteil von $4,5 \% \pm 0,5 \%$ ($p = 0,0007$). (Abb. 34)

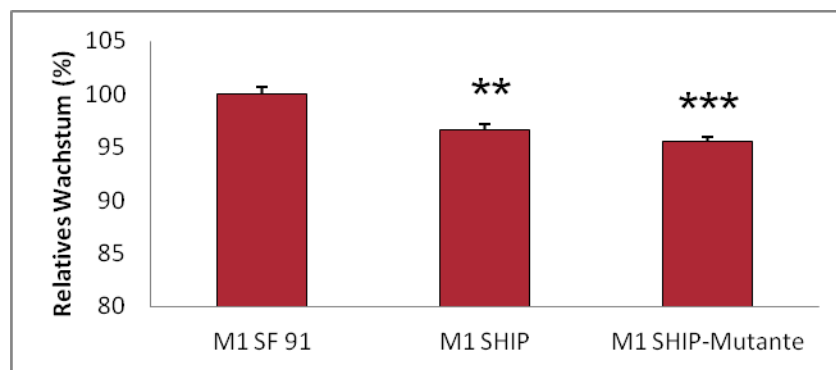


Abb. 32: Wachstum der Zelllinie M-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Die M1-Zellen, die mit der SHIP 1-Mutante transduziert wurden zeigten einen geringen aber signifikanten Wachstumsnachteil gegenüber der Vektorkontrolle. (**) $p \leq 0,01$.

Auch in dem 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium zeigen die M1 SHIP1-Zellen eine signifikante Wachstumshemmung im Vergleich zu den M1 SF91-Zellen. Die Hemmung beträgt $7,2 \% \pm 1,9 \%$ ($p = 0,009$). Die M1 SHIP1-Mutante-Zellen zeigen eine signifikante Hemmung des Wachstums um $4,5 \% \pm 1 \%$ ($p = 0,02$). (Abb. 35)

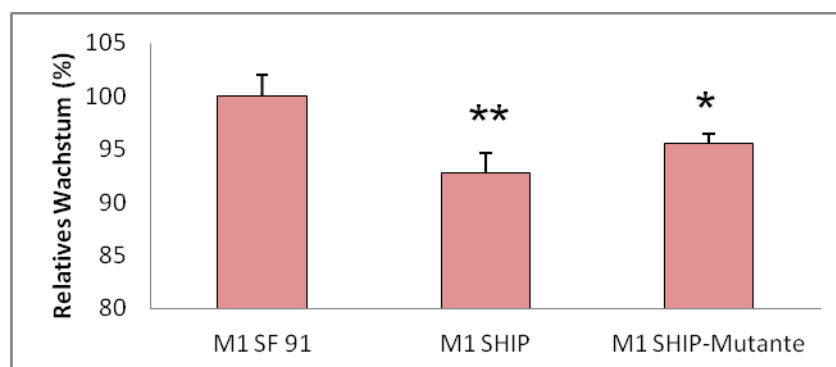


Abb. 33: Wachstum der Zelllinie M1 in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Mit den Zellen wurde verfahren, wie in Abb. 33, doch wurde 12 Stunden vor der BrdU-Zugabe das Medium gewechselt und nur 0,5 % FCS hinzugegeben. Die Zellen, die mit SHIP transduziert wurden, zeigen einen Wachstumsnachteil von 16,6 % in Vergleich zum Vektor. (**) $p \leq 0,01$. (*) $p \leq 0,05$.

K562

Bei den K562-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, besteht in 10 % FCS-haltigen Medium nach 16 Stunden im Vergleich zu SF91 ein verstärktes Wachstum um $13,2 \% \pm 1,7 \%$ ($p = 0,001$). Die Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, zeigen im Vergleich zum Vektor eine Erhöhung des Wachstums um $20,5 \% \pm 1,7 \%$ ($p = 0,0005$). (Abb. 36)

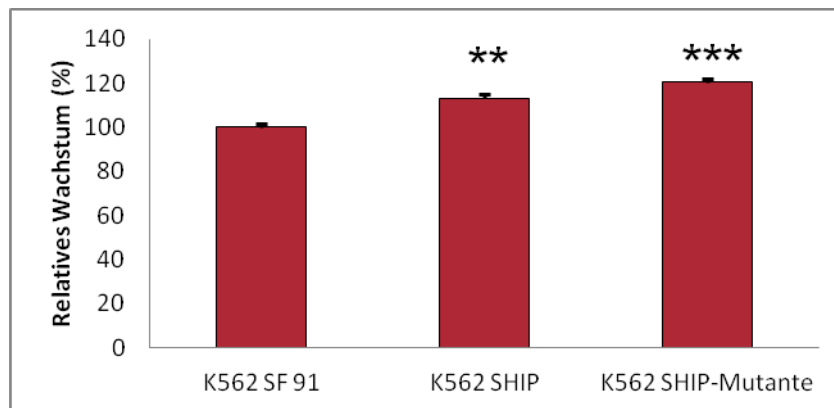


Abb. 34: Wachstum der Zelllinie K562 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert und anschließend über 16 Stunden mit der Base BrdU inkubiert. Nach Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen BrdU, wurde der BrdU-Einbau in die DNA der Zellen im FACS-Gerät gemessen. Auf der Ordinate ist das Wachstum in Prozent dargestellt. Das Wachstum der Zellen, die mit SF91 transduziert wurden, wurde gleich 100% gesetzt und das Wachstum der Zellen mit SHIP und SHIP-Mutante verglichen. SHIP und SHIP-Mutante haben einen signifikanten Wachstumsvorteil von 13,2 und 20,5 %. (***) bezeichnet die Signifikanz $p \leq 0,001$. (***) bezeichnet die Signifikanz $p \leq 0,001$.

4.3.2 Akt-Phosphorylierung nach Expression von SHIP1 mit dem Vektor SF91iGpre

Die Zellen wurden in Triplikaten mit den Viren, die die Helferzelllinie 293gp produzierte, infiziert. Die Viren übertrugen entweder den Vektor SF91iGpre mit EGFP, den Vektor SF91iGpre, in den SHIP1 kloniert wurde, oder den Vektor

SF91iGpre in den die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante D672A eingebracht wurde.

Die transduzierten Zellen wurden in dem Zellsortierer FACSAria nach EGFP-positiven und negativen Zellen sortiert und die EGFP-positiven Zellen wieder in Kultur genommen. Nach 14-21 Tagen wurden die Zellen in Triplikaten mit NP40-Puffer lysiert. Es wurden sowohl Zellen, die in 10 % FCS-haltigem als auch welche, die in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium gehalten wurden, lysiert. Daraufhin erfolgt eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford und eine Western Blot Analyse. Untersucht wurden dabei die Phosphorylierung von Akt, die als Zeichen der Aktivität des PI3-Kinase-Signalweges gilt, und die Expression von SHIP1. EGFP wurde detektiert, um sicherzustellen, dass die Zielzellen das Vektorkonstrukt bei der Transduktion aufgenommen hatten. Zum Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen wurden die Nitrocellulosemembranen des Western Blots mit dem Antikörper gegen das „house-keeping“-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) inkubiert.

Zur Auswertung der Western Blots wurden die phospho-Akt (p-Akt)- und SHIP1-Mengen in den jeweiligen Zelllinien auf GAPDH bezogen und statistisch ausgewertet. Die relative Expression von p-Akt und SHIP1 der Zellen, die mit SF91 transduziert wurden, wurde gleich 100 % gesetzt und die relative Expression von p-Akt und SHIP1 der Zellen, die mit SHIP1 oder der SHIP1-Mutante transduziert wurden, darauf bezogen.

U937

In dem 10 % FCS-haltigem Medium wird in den U937-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, p-Akt im Vergleich zu den Zellen, die nur mit SF91 transduziert wurden, zu $9 \% \pm 1,7 \%$ stärker exprimiert ($p = 0,0234$). Die SHIP1-Mutante-Zellen exprimieren $26 \% \pm 5 \%$ mehr p-Akt als die SF91-Zellen ($p = 0,0071$). Außerdem kommt es bei den mit SHIP1 transduzierten Zellen im Vergleich zu denen, die mit SF91 transduziert wurden, zu einer signifikanten Überexpression von SHIP1 von $83 \% \pm 7 \%$ ($p = 0,0011$). Und in den SHIP1-

Mutante-Zellen konnte eine signifikante Überexpression von SHIP1 von $88 \% \pm 7,5 \%$ festgestellt werden ($p = 0,001$). Der Vorgang der Transduktion mit dem Ko-Expressionsvektor SF91 war erfolgreich, da EGFP in allen transduzierten Zellen (SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante) exprimiert wird. (Abb. 37)

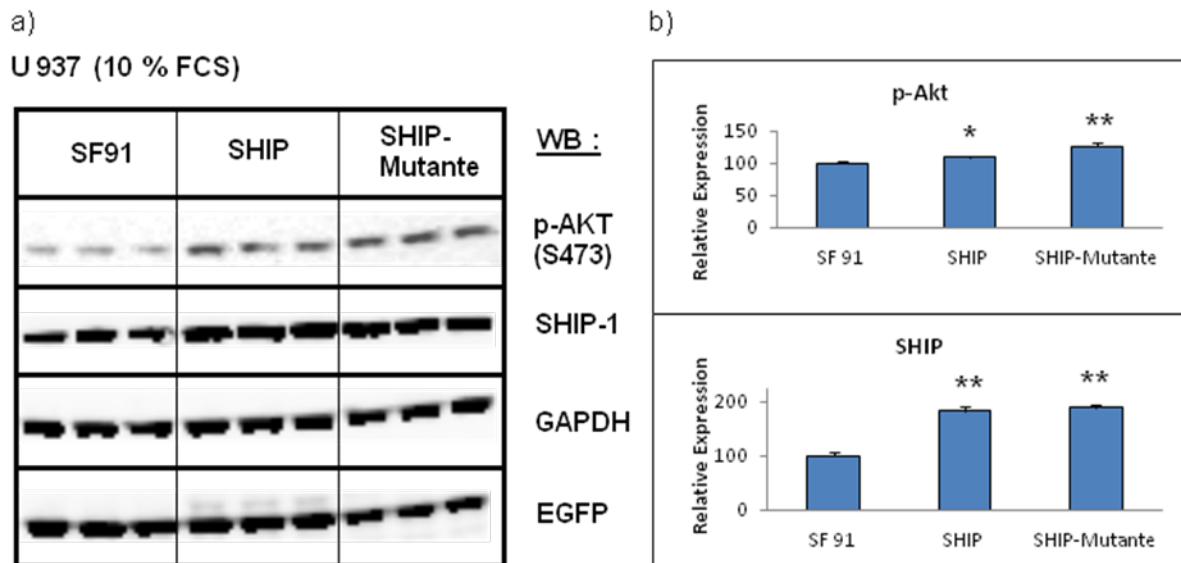


Abb 35: a) Western Blot der U937 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert, nach EGFP-positiven Zellen sortiert und 14 Tage expandiert. Die Zellen wurden in NP40-Puffer lysiert und mittels Western Blot Analyse auf die Expression von p-Akt und SHIP untersucht. a) Western Blot der U937-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 10 % FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den U937-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen, um Schwankungen der Proteinmengen beim Auftragen der Lysate auf das Gel, auszugleichen. (*) $p \leq 0,05$. (**) $p \leq 0,01$.

In dem 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium zeigen, die mit SHIP1 transduzierten U937-Zellen eine zu $36 \% \pm 1 \%$ geringere p-Akt-Expression, als die Zellen, die mit SF91 transduziert wurden ($p = 0,0029$). Die p-Akt-Expression der SHIP1-Mutante-Zellen ist zu $24 \% \pm 6 \%$ geringer als die der SF91-Zellen ($p = 0,0211$). SHIP1 wird sowohl in den Zellen, die mit SHIP1 transduziert, als auch in denen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, überexprimiert. In den SHIP1-

Zellen ist SHIP1 zu $46 \% \pm 8 \%$ ($p = 0,0365$) und in den SHIP1-Mutante-Zellen zu $47 \% \pm 8,5\%$ ($p = 0,0383$) stärker exprimiert als in den SF91-Zellen. Da EGFP in allen transduzierten Zellen im Western Blot nachweisbar war, kann die Transduktion als erfolgreich angesehen werden. (Abb. 38)

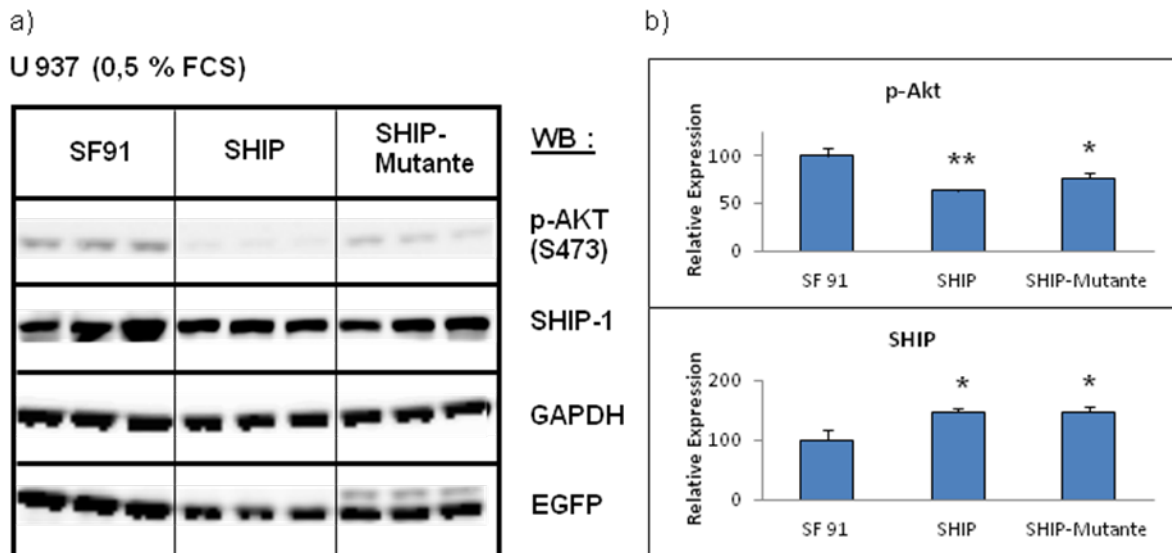


Abb 36: a) Western Blot der U 937 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden ähnlich behandelt, wie in 1), nur dass sie vor dem Lysieren für 24 Stunden in Medium mit nur 0,5 % FCS gehalten wurden. a) Western Blot der U937 mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 0,5% FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den U937-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen. (*) $p \leq 0,05$. (**) $p \leq 0,01$.

Cole

In dem 10 % FCS-haltigem Medium besteht nach 21-tägiger Kultivierung zwischen den Cole-Zellen, die mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transduziert wurden, kein signifikanter Unterschied bei der Expression von p-Akt. SHIP1 lässt sich sowohl in den mit SHIP1 als auch den mit der SHIP1-Mutante transduzierten Zellen überexprimieren. Bei den SHIP1-Zellen beträgt die Überexpression $18 \% \pm 6 \%$ ($p = 0,049$) und bei den SHIP1-Mutante-Zellen $15 \% \pm 4 \%$ ($p = 0,0347$). (Abb. 39)

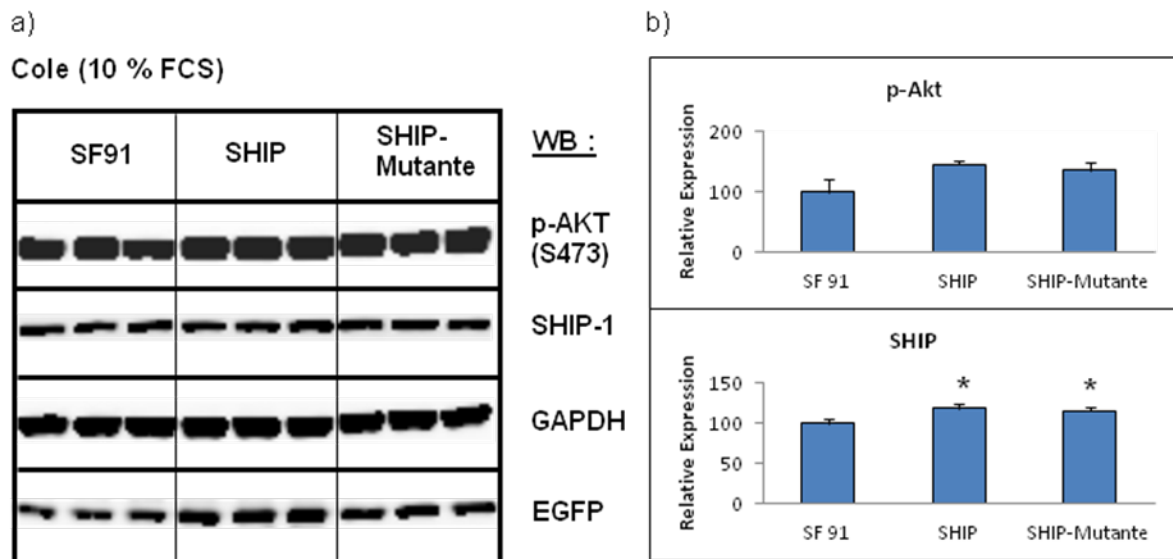


Abb. 37: a) Western Blot der Cole in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert, nach EGFP-positiven Zellen sortiert und 21 Tage expandiert. Die Zellen wurden in NP40-Puffer lysiert und mittels Western Blot Analyse auf die Expression von p-Akt und SHIP untersucht. a) Western Blot der Cole-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 10 % FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in % von p-Akt und SHIP in den Cole-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen. (*) $p \leq 0,05$.

In dem 0,5 % FCS-haltigem Medium hingegen lässt sich eine signifikante Reduktion der Expression von p-Akt um $39 \% \pm 11,5 \%$ in den Cole-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, im Vergleich zu den SF91-Zellen zeigen ($p = 0,021$). Die SHIP1-Mutante-Zellen weisen eine reduzierte Expression von p-Akt von $40,3 \% \pm 8 \%$ auf ($p = 0,015$). Eine signifikante Überexpression von SHIP1 konnte sowohl in den mit SHIP1 ($28 \% \pm 4,5 \%$; $p = 0,043$) als auch in den mit SHIP1-Mutante ($33 \% \pm 6 \%$; $p = 0,031$) transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Eine Expression von EGFP konnte in allen transduzierten Zellen gezeigt werden. (Abb. 40)

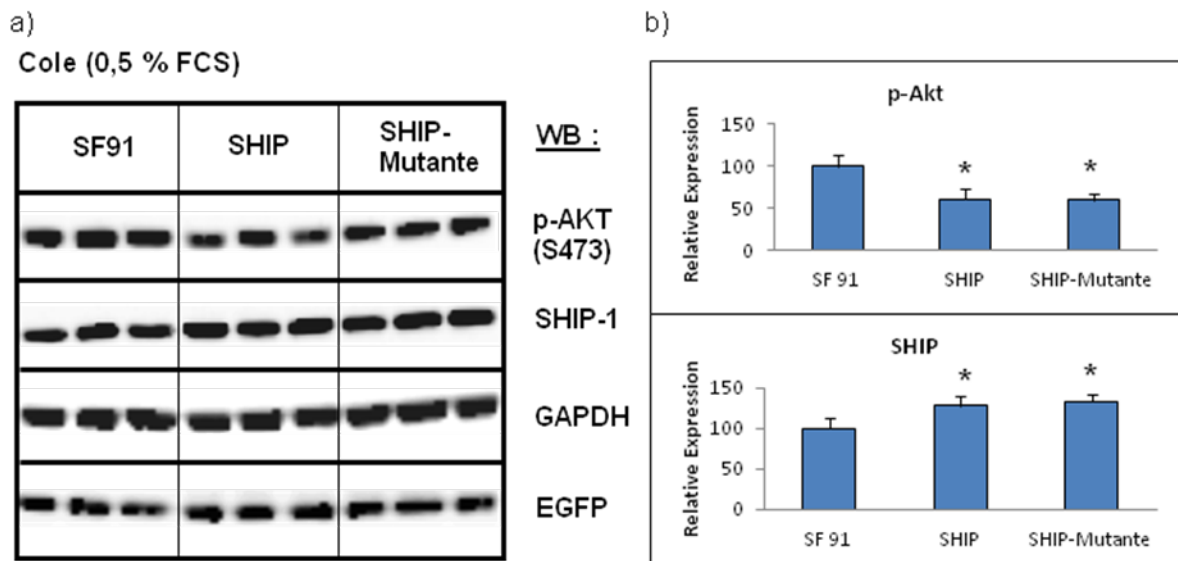


Abb. 38: Western Blot der Cole in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden ähnlich behandelt, wie in 1), nur dass sie vor dem Lysieren für 24 Stunden in Medium mit nur 0,5 % FCS gehalten wurden. a) Western Blot der Cole-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 0,5% FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den Cole-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen. (*) $p \leq 0,05$.

Eol-1

In dem 10 % FCS-haltigem Medium ergibt sich nach 3-wöchiger Kultivierung der Eol-1-Zellen eine signifikant geringere Expression von p-Akt in den Zellen, die mit SHIP1 oder SHIP1-Mutante transduziert wurden, als in denen, die mit SF91 transduziert wurden. In den SHIP-Zellen findet sich $40 \% \pm 1,5 \%$ ($p = 0,0002$) und in den SHIP1-Mutante-Zellen $40 \% \pm 10,5 \%$ ($p = 0,0016$) weniger p-Akt. SHIP wird in den SHIP1-Zellen zu $27 \% \pm 8,5 \%$ ($p = 0,024$) und in den SHIP1-Mutante-Zellen zu $96 \% \pm 20 \%$ ($p = 0,026$) überexprimiert. Die Expression von EGFP konnte für alle transduzierten Zellen gezeigt werden. (Abb. 41)

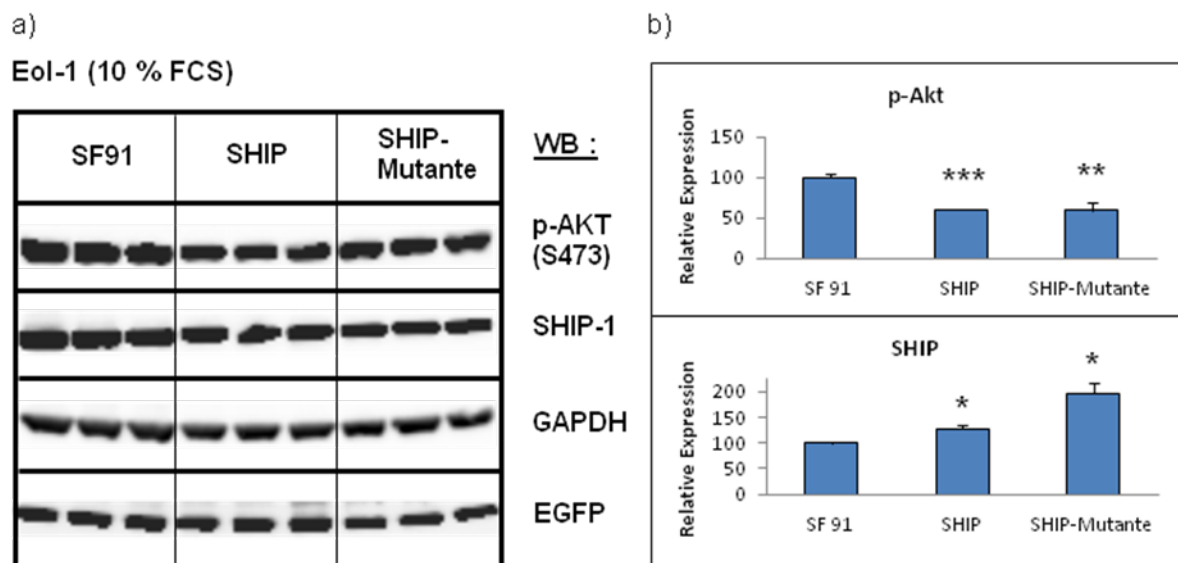


Abb. 39: a) Western Blot der Eol-1 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert, nach EGFP-positiven Zellen sortiert und 3 Wochen expandiert. Die Zellen wurden in NP40-Puffer lysiert und mittels Western Blot Analyse auf die Expression von p-Akt und SHIP untersucht. a) Western Blot der Eol-1-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 10 % FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den Eol-1-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen, um Schwankungen der Proteinmengen beim Auftragen der Lysate auf das Gel, auszugleichen. (*) $p \leq 0,05$. (**) $p \leq 0,01$. (***) $p \leq 0,001$

In 0,5 % FCS-haltigem Medium ergibt sich für die Eol-1-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, eine um $30,6 \% \pm 12,5 \%$ geringere Expression von p-Akt als bei den SF91-Zellen ($p = 0,031$). Die SHIP1-Mutante-Zellen exprimieren $30 \% \pm 6\%$ weniger p-Akt als die Zellen nur mit SF91 ($p = 0,018$). SHIP1 wird in den mit SHIP1 transduzierten Eol-1-Zellen zu $63 \% \pm 10 \%$ stärker exprimiert als in den SF91-Zellen ($p = 0,031$). In den SHIP1-Mutante-Zellen konnte eine um $97 \% \pm 8 \%$ stärkere Expression von SHIP1 nachgewiesen werden als in den Zellen, die mit SF91 transduziert wurden. EGFP konnte in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden, so dass die Transduktion erfolgreich war. (Abb. 42)

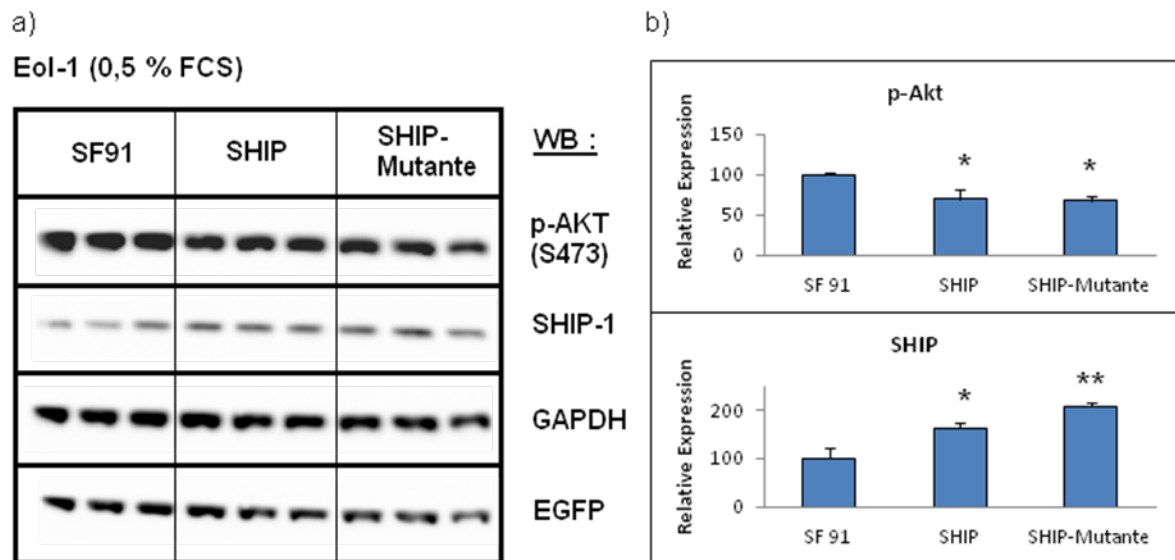


Abb. 40: a) Western Blot der Eo1-1 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden ähnlich behandelt, wie in 1), nur dass sie vor dem Lysieren für 24 Stunden in Medium mit nur 0,5 % FCS gehalten wurden. a) Western Blot der Eo1-1-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 0,5% FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den Eo1-1-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen. (*) $p \leq 0,05$. (**) $p \leq 0,01$.

M1

In 10 % FCS-haltigem Nährmedium zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Expression von p-Akt zwischen den M1-Zellen, die mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transduziert wurden. Die SHIP1-Zellen zeigen hingegen eine hoch signifikante Überexpression von SHIP1 von $607 \% \pm 9 \%$ im Vergleich zu den SF91-Zellen ($p = 0,0002$). Von den SHIP1-Mutante-Zellen wird SHIP1 um $327 \% \pm 18 \%$ stärker exprimiert als von den SF91-Zellen ($p = 0,0037$). Die Expression von EGFP konnte für alle transduzierten Zellen gezeigt werden. (Abb. 43)

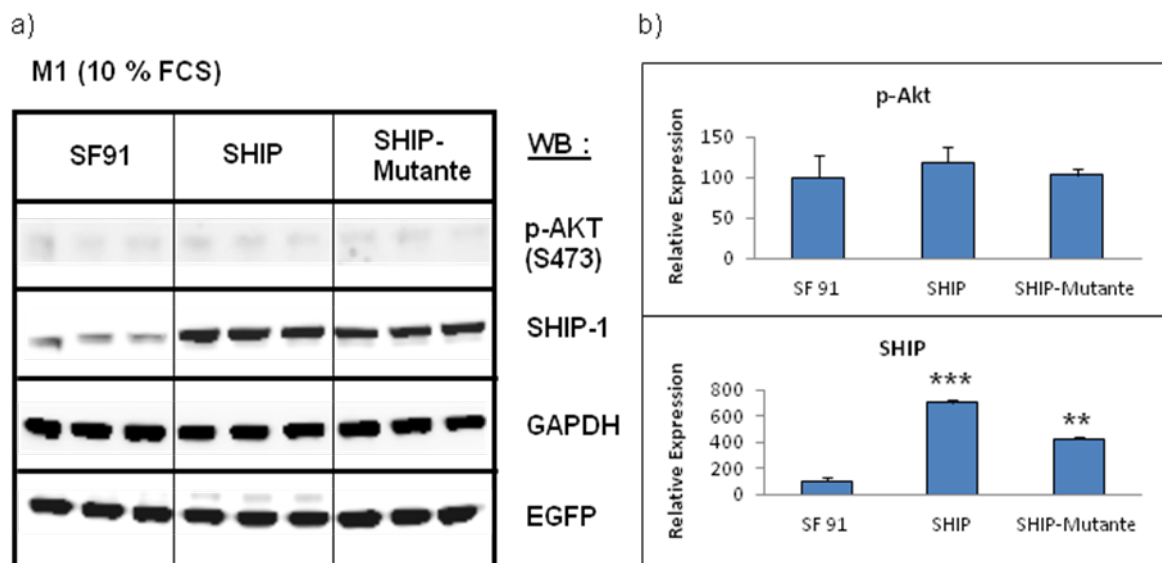


Abb. 41: a) Western Blot der M1 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert, nach EGFP-positiven Zellen sortiert und 14 Tage expandiert. Die Zellen wurden in NP40-Puffer lysiert und mittels Western Blot Analyse auf die Expression von p-Akt und SHIP untersucht. a) Western Blot der M1-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 10 % FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den M1-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen, um Schwankungen der Proteinmengen beim Auftragen der Lysate auf das Gel, auszugleichen. (**) $p \leq 0,01$. (***) $p \leq 0,001$.

Nach Kultivierung der M1-Zellen in 0,5 % FCS-haltigem Medium zeigt sich eine um $52,5 \% \pm 24,5 \%$ geringere Expression von p-Akt durch die SHIP1-Zellen als durch die SF91-Zellen ($p = 0,0274$). Die SHIP1-Mutante-Zellen zeigen eine schwache Überexpression von p-Akt um $11 \% \pm 9 \%$ ($p = 0,047$). SHIP1 wird in den mit SHIP1 transduzierten Zellen um $173,4 \% \pm 27 \%$ stärker exprimiert als in den Zellen, die mit SF91 transduziert wurden ($p = 0,0363$). In den SHIP1-Mutante-Zellen konnte eine Überexpression der SHIP1-Mutante von $176 \% \pm 6 \%$ nachgewiesen werden ($p = 0,0017$). EGFP konnte in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden. (Abb. 44)

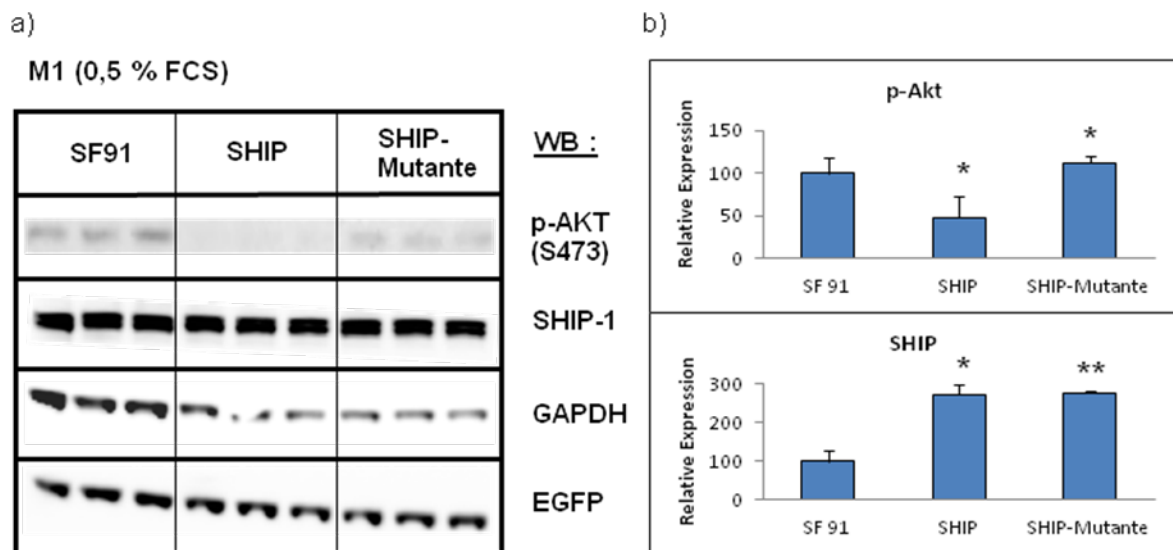


Abb. 42: a) Western Blot der M1 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden ähnlich behandelt, wie in 1), nur dass sie vor dem Lysieren für 24 Stunden in Medium mit nur 0,5 % FCS gehalten wurden. a) Western Blot der M1 mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 0,5% FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP-1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den M1-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen. (*) $p \leq 0,05$. (**) $p \leq 0,01$.

K562

Die K562-Zellen wurden in 0,5 % FCS-haltigem Medium kultiviert. In den SHIP1-Mutante-Zellen lässt sich im Vergleich zu den Vektor-Zellen $114 \% \pm 5 \%$ mehr p-Akt detektieren ($p = 0,003$). Zwischen den SHIP1 und den Vektorzellen ist der Unterschied nicht signifikant. SHIP1 lässt sich sowohl in den mit SHIP1 als auch denen mit SHIP1-Mutante transduzierten Zellen signifikant überexprimieren. In den SHIP1-Zellen beträgt die Überexpression $131 \% \pm 10 \%$ ($p = 0,002$) und in den SHIP1-Mutante-Zellen $151 \% \pm 6 \%$ ($p = 0,001$). EGFP konnte in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden. (Abb. 45)

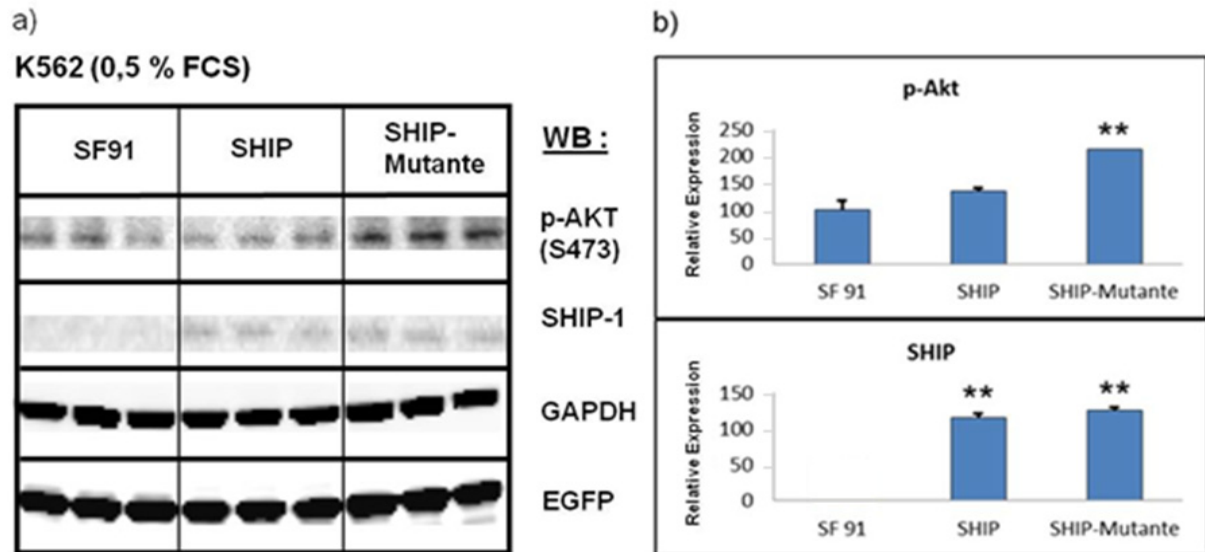


Abb. 43: a) Western Blot der K562 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von SHIP abgeglichen auf GAPDH

Die Zellen wurden mit SF91, SHIP oder SHIP-Mutante transduziert, nach EGFP-positiven Zellen sortiert und 14 Tage expandiert. Die Zellen wurden in NP40-Puffer lysiert und mittels Western Blot Analyse auf die Expression von p-Akt und SHIP untersucht. a) Western Blot der K562-Zellen mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante in 0,5 % FCS-haltigem Medium. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen p-Akt, SHIP1, GAPDH und EGFP inkubiert. b) Expression in Prozent von p-Akt und SHIP in den K562-Zellen, die mit SF91, SHIP und SHIP-Mutante transduziert wurden. Die Mengen von p-Akt und SHIP wurden auf GAPDH abgeglichen, um Schwankungen der Proteinmengen beim Auftragen der Lysate auf das Gel, auszugleichen. (**) $p \leq 0,01$.

5. Diskussion

Ein bedeutender Mechanismus, um die Aktivierungssignale der Zellen weiterzuleiten, ist die Phosphorylierung von Tyrosinresten (Scheijen und Griffin, 2002). Mittlerweile wurde eine große Zahl an Tyrosinkinassen identifiziert, die man in Rezeptor- und Nicht-Rezeptortyrosinkinassen unterteilen kann (Blume-Jansen und Hunter, 2001). Rezeptortyrosinkinassen leiten die extrazellulären Signale in das Zellinnere weiter, wodurch die Zellproliferation, Migration, Differenzierung und das Überleben der Zellen reguliert wird (Scheijen und Griffin, 2002). Mutationen in den Tyrosinkinassen führen häufig zu einer konstitutiven Aktivierung, wodurch die Regulationen der Zellwachstumsvorgänge gestört werden.

SHIP1 gehört zu der Gruppe der Inositol-5-Phosphatasen und wird in den Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. SHIP1 dephosphoryliert das zuvor von der Phosphatidylinositol-Kinase (PI3K) generierte Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat ($\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$) zu Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat ($\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$), sowie das Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat ($\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$) zu Inositol-1,3,4-trisphosphat ($\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$). Da $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ für die Relokalisation von Akt verantwortlich ist, führt der SHIP1-vermittelte Abbau von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ zur Hemmung von Akt.

SHIP1 spielt eine wichtige Rolle in der negativen Regulation antiapoptotischer und proliferationsfördernder Signale, die über Tyrosinkinassen vermittelt werden. In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob SHIP1 auch die durch konstitutiv aktivierte Tyrosinkinassen vermittelte Proliferation sowie die Stimulation des PI3K/Akt-Signalwegs inhibieren kann. Hierfür wurden Zelllinien mit verschiedenen Tyrosinkinasemutationen auf ihr Wachstumsverhalten und die Phosphorylierung von Akt nach einer retroviral-vermittelten Expression von SHIP1 untersucht. Dabei handelte es sich um die hämatopoetischen Zelllinien U937, Cole, Eo1-1, Kasumi-1, MV4-11, M1 und K562.

Die U937-Zelllinie weist verschiedene Chromosomenaberrationen auf. Vor allem die balancierte Translokation $t(10;11)(p13,q14)$ wird als ursächlich für die Leukämogenese angesehen (Dreyling et al., 1996; Strefford et al., 2001). In der

Zelllinie Cole ist die regulatorische p85 α -Untereinheit (85 kDa) der PI3K mutiert (Jücker et al., 2002). Die Zelllinie Eol-1 ist gekennzeichnet durch die Fusionstyrosinkinase FIP1L1-PDGFR α (Cools et al., 2004). Kasumi-1 ist eine AML-Zelllinie und beinhaltet sowohl eine Translokation t(8;21) als auch eine aktivierende Mutation in dem c-kit-Protoonkogen, nämlich im Codon 822 (Beghini et al., 2002). Die MV4-11 ist eine akute myeloische Leukämiezelllinie (AML-Zelllinie), mit der Translokation t(4;11)(q21;q23), die eine interne Tandemduplikation im FLT3-Rezeptor verursacht (Lange et al., 1987). Die M1 ist eine myeloische Mauszelllinie, der das Tumorsuppressorgen p53 fehlt. Eingebracht in Mäuse, entwickeln diese nach 35 Tagen eine akute myeloische Leukämie (Vesley et al., 2006). Die K562 ist eine erythroblastische CML-Zelllinie, die das Philadelphiachromosom besitzt. Dieses entsteht durch eine reziproke Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22, t(9;22)(q34;q11).

5.1 Endogene Expression von SHIP1

Das über Interaktionen seiner SH2-Domäne an die Plasmamembran rekrutierte SHIP1 dephosphoryliert das zuvor von der PI3K phosphorylierte PtdIns(3,4,5)P₃ zu PtdIns(3,4)P₂, sowie das Ins(1,3,4,5)P₄ zu Ins(1,3,4)P₃. Dabei benötigt SHIP1 eine 3-Phosphatgruppe an dem Inositolring des PIP₃, um das 5-Phosphat abspalten zu können (Damen et al., 1996). PIP₃ steht dann nur noch in geringerem Maße für die Rekrutierung und Aktivierung von Akt zur Verfügung. Schlussendlich führt dies zu einem verminderten Wachstum der jeweiligen Zellen, wie es bei der Jurkat-Zelllinie durch Überexpression von SHIP1 gezeigt werden konnte (Horn et al., 2004).

In Mausexperimenten konnte gezeigt werden, dass es bei einem Verlust von PTEN in T-Zellen zu letalen T-Zell-Lymphomen kommt. In B-Zellen konnte diese Beobachtung weder für PTEN noch für SHIP1 gemacht werden. Miletic und Mitarbeiter beschäftigten sich daher mit einer Mauslinie, der sowohl die Funktion von PTEN als auch von SHIP1 in den B-Zellen fehlt (PTEN/SHIP^{-/-}), und zeigten damit, dass so letale B-Zell-Lymphome hervorgerufen werden konnten. Diese

Studie zeigt, dass PTEN und SHIP1 kooperieren, um B-Zell-Lymphome zu unterdrücken, so dass die Autoren darauf schlossen, dass auch SHIP1 ein Tumorsuppressor sein könnte (Miletic et al., 2010).

Metzner und Mitarbeiter konnten in AML-Zellen zeigen, dass ein niedriger SHIP1-Spiegel in den untersuchten Zellen nicht unbedingt mit einer konstitutiven Aktivierung von Akt einhergeht. Es wurde daher vermutet, dass PTEN in diesen Zellen das PtdIns(3,4,5)P₃ gespalten hat (Metzner et al., 2009).

In allen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, bis auf die Zelllinie K562 konnte endogenes SHIP1 in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden. In der Literatur wurde dies bislang nur für die U937 gezeigt (Cameron et al., 1999). Sowohl Siegel et al. (1999) als auch Sattler et al. konnten keine SHIP1-Expression in K562-Zellen nachweisen. Sattler et al. und auch Ruschmann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese Fusionstyrosinkinase Bcr/Abl für eine reduzierte Expression von SHIP1 in CML-Zellen verantwortlich ist (Sattler et al., 1999; Ruschmann et al., 2010). SHIP1 wird entweder direkt durch Bcr/Abl oder indirekt durch die, durch Bcr/Abl aktivierte, Src Kinase phosphoryliert. Wahrscheinlich wird SHIP1 dann durch die E3 Ligase c-Cbl polyubiquitiniert und schlussendlich im Proteasom degradiert (Ruschmann et al., 2010). Die Zelllinie Jurkat exprimiert ebenfalls kein SHIP1, dies führt zu einem erhöhten p-Akt-Spiegel in den Zellen. Exprimiert man SHIP1 nun künstlich in den Jurkat-TetOn-SHIP1-Zellen führt dies zu einer Reduktion des p-Akt und einem verminderten Wachstum (Horn et al., 2004). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 sein.

5.2 Phosphorylierung von Akt

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg hat eine Schlüsselrolle in der Regulation der Proliferation, der Größe, des Wachstums und des Überlebens von Zellen. Um zu überprüfen, ob die PI3-Kinase in den untersuchten Zelllinien aktiv ist, wurde mit Hilfe von Western Blots die Phosphorylierung von Akt an dem Serinrest 473

bestimmt. Akt wird an dem Threoninrest 305 und dem Serinrest 473 phosphoryliert (Alessi et al., 1996), wodurch Akt wiederum andere Signalmoleküle phosphoryliert. Die Phosphorylierung am Threoninrest erfolgt durch die PDK1 (*phosphoinositid-dependent protein kinase 1*). Die Phosphorylierung am Serinrest 473 erfolgt durch mTORC2 (Gan et al., 2011; Tato et al., 2011).

Die Zelllinien U937, Cole und Eo1-1 zeigten ein sehr starkes p-Akt-S473-Signal, das auf eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in diesen Zelllinien schließen lässt. Die Zelllinie Jurkat wurde dabei als Positivkontrolle mit untersucht, da bei ihr eine konstitutive Aktivierung der PI3-Kinase bekannt ist und sie weder PTEN noch SHIP1 exprimiert (Horn et al., 2004). Bei den übrigen vier Zelllinien (Kasumi-1, MV4-11, M1 und K562) waren deutlich schwächere p-Akt-S473-Banden nachzuweisen, was darauf hindeuten könnte, dass der PI3K/Akt-Signalweg nicht der einzige Signalweg ist, den diese Zelllinien zum Wachsen und Überleben benötigen. Für die K562-Zellen konnte gezeigt werden, dass die PI3K durch BCR-ABL konstitutiv aktiviert wird. Dieses erfolgt einerseits direkt über die Phosphorylierung der p85 α -Untereinheit der PI3K und andererseits indirekt über den Ras/Raf/MAP-Kinase-Signalweg (Sattler et al., 1996; Goga et al., 1995; Melo et al., 1996) sowie über das Adapterprotein CrkL (Sattler et al., 1998 / 2001).

5.3 Ektope SHIP1-Expression und deren Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad von Akt

Die Zelllinien wurden mit SHIP1 und der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante transduziert, sortiert, etwa 14 bis 21 Tage expandiert und in NP40-Puffer lysiert. Die Lysate wurden mittels Western Blot auf die Expression von p-Akt, SHIP1 und EGFP untersucht. Zum Abgleich der Proteinmengen wurden die GAPDH-Mengen bestimmt.

In den Zelllinien U937, Cole, Eo1-1 und M1 ließ sich SHIP1 überexprimieren. Auch in den K562-Zellen war nach der Transduktion mit SHIP1 und SHIP1-Mutante SHIP1 nachweisbar. In den Vektorzellen fand sich, wie auch von Sattler et al. und

Siegel et al. publiziert, kein SHIP1 in K562-Zellen. Da auch das grünfluoreszierende Protein EGFP in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden konnte, konnte die Transduktion als erfolgreich angesehen werden. Die Zelllinien wurden sowohl in 10 % als auch in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium kultiviert.

Bei den Zelllinien U937, Cole, Eol-1 und M1 zeigen die mit SHIP1 transduzierten Zellen in 0,5 % FCS-haltigem Medium im Vergleich zu den Vektorzellen einen signifikant niedrigeren p-Akt-Gehalt (U937: 36 %, Cole: 39 %, Eol-1: 30 %, M1: 52,5 %). Wohingegen in 10% FCS-haltigem Medium die p-Akt-Werte schwanken. Die U937-SHIP1-Zellen zeigen im Vergleich zu den Vektorzellen einen leichten p-Akt-Anstieg (9%), die Cole-Zellen und die M1-Zellen einen nicht signifikanten Unterschied und die Eol-1-Zellen eine p-Akt-Reduktion um 40 %.

Bei der Zelllinie Cole ist ein Allel, das für die regulatorische Untereinheit p85 α der PI3K kodiert, so mutiert, dass eine c-terminal verkürzte Form (p76 α) resultiert. Die C-terminale SH2-Domäne ist dadurch nicht mehr funktionsfähig, so dass durch einen bisher unbekanntem Mechanismus die katalytische Untereinheit p110 der PI3K aktiviert wird. Infolgedessen ist der PI3K/Akt-Signalweg in den Cole Zellen konstitutiv aktiv. Dass eine Überexpression von SHIP1 in den Cole-Zellen den p-Akt-Spiegel senkt, wäre dementsprechend durch den durch die enzymatische Aktivität von SHIP1 verminderten PIP₃-Spiegel zu erklären.

Betrachtet man die p-Akt-Werte der Zellen, die mit der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante transduziert wurden, so kann man in den Zelllinien U937, Cole und Eol-1 in 0,5 % FCS-haltigem Medium ebenfalls eine signifikante Reduktion erkennen (U937: 24 %, Cole: 40 %, Eol-1: 30 %). Die Zelllinie M1 zeigt eine p-Akt-Steigerung nach Transduktion mit der SHIP1-Mutante von 11 %.

Eine mögliche Erklärung für die Reduktion des p-Akts durch die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante in der Zelllinie U937, Cole und Eol-1 wäre eine mit wt-SHIP1 konkurrierende Bindung der SHIP1-Mutante an Shc und Grb2 (Saxton et al., 1994; Kinoshita et al. 1995; Tridandapani et al., 1997). Die Bindung von SHIP1 an Shc erfolgt über die SH2-Domäne von SHIP1 und über das NPXY-Motiv von SHIP1 (Lioubin et al., 1996; Kavanaugh et al., 1996; Liu et al., 1997). Die SH2-

Domäne und das NPXY-Motiv sind in der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante nicht beschädigt, weshalb eine Hemmung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges erfolgen könnte. Sowohl SHIP1 als auch die SHIP1-Mutante könnten als Gerüstproteine (*scaffold protein*) fungieren. Windhorst und Mitarbeiter beschrieben für die Inositol-1,4,5-trisphosphat-3-Kinase-A (ITPKA) eine Aktin-bündelnde Funktion, die unabhängig von ihrer enzymatischen Aktivität vorhanden ist (Windhorst et al., 2011). Erneux et al. beschrieben die Möglichkeit, dass SHIP2 als Gerüst im Rahmen seiner Interaktion mit zytoskelettalen Proteinen fungiert (Erneux et al., 2011). SHIP2 wird in Makrophagen zur Stelle der Phagozytose rekrutiert und kolokalisiert sich dort mit F-Aktin (Ai et al., 2006, Erneux et al., 2011).

In 10 % FCS-haltigem Medium finden sich bei den SHIP1-Mutante-Zellen unterschiedliche Werte. In den U937-Zellen kann man eine p-Akt-Steigerung im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennen (26 %). Der Unterschied bei den Cole-Zellen war nicht signifikant, wohingegen die Eol-1-Zellen durch die SHIP1-Mutante eine p-Akt-Reduktion aufweisen (40 %). Myers und Mitarbeiter stellten fest, dass bei einem Vorhandensein einer enzymatisch inaktiven Mutante von PTEN, ein menschlicher Tumorsuppressor, es zu einer Akkumulation seines Substrates PIP₃ kommt. Daraus resultiert eine vermehrte Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges (Myers et al., 1998). Die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante könnte außerdem PIP₃ binden und damit zur Substratfalle werden (*substrate trapping*). PIP₃ würde somit vor dem Abbau durch andere Phosphatasen, wie PTEN, geschützt werden. Dieses wären eventuell mögliche Erklärungen für die erhöhten p-Akt-Werte durch die enzymatisch inaktive SHIP1-Mutante in den U937-Zellen und in 0,5 % FCS-haltigem Medium auch der M1- und K562-Zellen. Flint et al. beschrieben eine enzymatisch inaktive Mutante der Protein-Tyrosinphosphatase PTP1B, die in COS- und 293- Zellen mit dem endogenen PTP1B um Substrate konkurrierte, diese gebunden hat und dafür sorgte, dass vermehrt Phosphotyrosin an dem EGF-Rezeptor zu finden war (Flint et al., 1997).

SHIP1 wurde in den SHIP1-transduzierten Eol-1-Zellen deutlich weniger überexprimiert, als die SHIP1-Mutante (27 zu 96 % in 10 % FCS und 63 zu 97 % in 0,5 % FCS), dennoch ergaben sich für beide Zellpopulationen im Vergleich zu

den Vektorzellen ähnlich erniedrigte p-Akt-Werte (40 zu 41 % in 10 % FCS und 31 zu 30,6 % in 0,5 % FCS). Das könnte darauf hindeuten, dass, wie eventuell auch bei den U937-Zellen zu sehen, die SHIP1-Mutante noch eine geringe Restaktivität besitzt, wodurch aber dennoch höhere SHIP1-Mutante-Spiegel als SHIP1-Spiegel benötigt werden, um die gleiche Erniedrigung des p-Akt-Wertes hervorzurufen.

Von den Versuchen mit den K562-Zellen konnte lediglich der Western Blot in 0,5% FCS-haltigem Medium ausgewertet werden. Dort zeigte sich eine signifikante Erhöhung von p-Akt in den SHIP1-Mutante-Zellen. Es gibt einige Berichte, die beschreiben, dass enzymatisch inaktive Phosphatasen eine Hyperphosphorylierung verschiedener Substrate verursachen können. Sun et al. konnten zeigen, dass eine enzymatisch inaktive Mutante von MKP-1 an die p-42-MAP-Kinase bindet und somit die Dephosphorylierung durch den Wildtyp der MKP-1 blockiert. Es resultiert eine Überaktivität des MAP-Kinase-Signalweges (Sun et al., 1993). Ebenso wie auch für die U937-Zellen können für die Zelllinie K562 die Ergebnisse von Myers und Mitarbeiter zur Erklärung der erhöhten p-Akt-Werte in den SHIP1-Mutante-Zellen herangezogen werden. In den SHIP1-Zellen konnte ebenfalls vermehrt p-Akt nachgewiesen werden, dieser Unterschied war jedoch aufgrund von Schwankungen der Werte nicht signifikant.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass die Senkung des p-Akt-Wertes in den untersuchten Zellen nur bei der Zelllinie M1 auf einen spezifischen Effekt der enzymatisch aktiven Form von SHIP1 zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu führt in den Zellen U937, Cole und Eol-1 sowohl die Expression der enzymatisch aktiven wie auch der inaktiven Form von SHIP1 zur Reduktion des pAkt-S473-Spiegels.

Western Blot nach Transduktion (Messung von SHIP1 und p-Akt)					
Zelllinie	FCS	Endogen		Transduktion	
		SHIP1	p-Akt	SHIP1 (Differenz in %)	SHIP1-Mutante (Differenz in %)
U937	10%	+	++	SHIP + 89 **	SHIP + 88 **
				p-akt + 9 *	p-akt + 26 *
	0,5%			SHIP + 46 *	SHIP + 47 *
				p-akt - 36 **	p-akt - 24 *
Cole	10%	+	++	SHIP + 18 *	SHIP + 15 *
				p-akt n.s.	p-akt n.s.
	0,5%			SHIP + 28 *	SHIP + 33 *
				p-akt - 39 *	p-akt - 40 *
Eol-1	10%	++	++	SHIP + 27 *	SHIP + 96 *
				p-akt - 40 ***	p-akt - 40 **
	0,5%			SHIP + 63 *	SHIP + 97 **
				p-akt - 30 *	p-akt - 30 *
M1	10%	+	(+)	SHIP + 607 ***	SHIP + 327 **
				p-akt n.s.	p-akt n.s.
	0,5%			SHIP + 173 *	SHIP + 176 **
				p-akt - 52 *	p-akt + 11 *
K562	10%	+	(+)	SHIP n.d.	SHIP n.d.
				p-akt n.d.	p-akt n.d.
	0,5%			SHIP + 131 **	SHIP + 151 **
				p-akt n.s.	p-akt + 114 **
Jurkat-TetOn-SHIP1	10%	-	+++	n.d.	n.d.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blot Analysen der verschiedenen Zelllinien

Dargestellt sind die erhobenen Ergebnisse der Western Blot Analysen der verschiedenen Zelllinien. Zusehen ist die Stärke der endogenen SHIP und p-Akt-Expression der verschiedenen Zelllinien. - negativ, (+) schwach positiv, + positiv, ++ stark positiv, +++ sehr stark positiv. Weiterhin sind die Ergebnisse nach Transduktion der jeweiligen Zelllinien mit SHIP und SHIP-Mutante in jeweils 10 % und 0,5% FCS-haltigem Medium dargestellt. Die einzelne Zahl beschreibt die Differenz der Expression von SHIP oder p-Akt in Prozent, bezogen wurde sich auf die Vektorkontrolle, die mit 100 % gleichgesetzt wurde. n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht durchgeführt. (*) $p \leq 0,05$. (***) $p \leq 0,001$.

5.4 Hemmung des Zellwachstums

Da SHIP1 ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalwegs ist, wurde untersucht, ob eine Überexpression von SHIP1 das Wachstum der Leukämiezelllinien beeinflussen kann. Metzner et al. (2007, 2009) konnten bereits bestätigen, dass SHIP1 das Wachstum von juvenilen myelomonozytären Leukämiezellen (JMML) und akuten myeloischen Leukämiezellen (AML) hemmt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Leukämiezelllinien wurden mit dem retroviralen Vektor SF91iGpre infiziert, in den entweder SHIP1 oder eine enzymatisch inaktive Form von SHIP1 (D672A) kloniert wurde. Als Koexpressionsvektor exprimiert SF91iGpre außerdem das grün fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Der Vektor SF91 wurde als Kontrolle eingesetzt, damit ausgeschlossen werden konnte, dass eine eventuelle Wachstumshemmung der Zellen auf die retrovirale Transduktion zurückzuführen war. Weiterhin wurde eine enzymatisch inaktive Mutante von SHIP1 (D672A) verwendet, um mögliche Effekte von SHIP1, die unabhängig von der enzymatischen Aktivität sind, erkennen zu können.

5.4.1 Hemmung des Zellwachstum durch PI3K-Hemmstoff LY294002

Um festzustellen, ob die Proliferation der beschriebenen Zelllinien von der Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges abhängt, wurden die Zelllinien dem PI3-Kinase-Hemmstoff LY 294002 ausgesetzt. Es wurden Wachstumskinetiken von unbehandelten und behandelten Zellen angefertigt. Anhand dieser Daten konnte für alle untersuchten Zelllinien eine hoch signifikante Wachstumshemmung durch den PI3K-Hemmstoff festgestellt werden. Im Vergleich zu den Zellen ohne Hemmstoff lässt sich das Wachstum der Zelllinien Jurkat zu 97,3 %, U937 zu 92,8%, Cole zu 98,8 %, Eol-1 zu 97,3 %, Kasumi-1 zu 97,7 %, MV4-11 zu 99,6 %, M1 zu 97,8 % und K562 zu 90,7 % durch LY 294002 hemmen.

Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Wachstumshemmung auch auf die Hemmung anderer Signalwege als den PI3K/Akt-Signalweg zurückzuführen sein könnte, da es sich bei LY 294002 um einen pharmakologischen Hemmstoff handelt, dessen Wirkungen auf andere Enzyme als die PI3-Kinase beschrieben wurde (Stein et al., 2001; Bondar et al., 2002).

Dennoch war die Erstellung der Wachstumskinetiken ein wichtiges Vorexperiment, um zu untersuchen, ob der PI3K/Akt-Signalweg zum Wachstum der beschriebenen Zelllinien beiträgt. Hätte man keine Hemmung des Wachstums

nach Behandlung mit LY294002 gefunden, so wäre eine funktionelle Beteiligung der PI3K für das Wachstum der untersuchten Zelllinien sehr unwahrscheinlich gewesen.

5.4.2 Proliferationsuntersuchungen nach Transduktion mit SHIP1 und SHIP1-Mutante

Die Untersuchung der Proliferation der Leukämiezelllinien wurde unter Zuhilfenahme zweier verschiedener Methoden durchgeführt. Einerseits wurden nach der Transduktion, Sortierung und Kultivierung der Leukämiezelllinien die Zellzahlen mittels Neubauer-Zählkammer über sechs Tage bestimmt und Wachstumskinetiken angefertigt. Das Wachstumsverhalten der transduzierten Zelllinien wurde sowohl in Nährmedien mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) als auch in Nährmedien mit 0,5 % FCS untersucht (Pirkmajer und Chibalin, 2011). Andererseits wurde in einem davon unabhängigen Experiment der BrdU-APC-Assay (BD Biosciences Pharmingen) durchgeführt.

Der Vorteil des BrdU-APC-Assays im Vergleich zur Erstellung von Wachstumskinetiken ist die deutlich zeitnähere Messung der Proliferation nach der Transduktion. Hierdurch können Selektionseffekte, die bei der längeren Kultivierung nach der Sortierung stattfinden könnten, weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Zählung der Zellen durch das FACS-Gerät ist wesentlich genauer, als mit dem menschlichen Auge. Die Wahrscheinlichkeit von Pipettierfehlern ist geringer, so dass die Zellzahlen in den Triplikaten weniger schwanken.

Nach der Transduktion mit entweder nur dem Vektor SF91, SF91 mit SHIP1 oder SF91 mit der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante (V672A) wurden die Zellen für 16 Stunden mit BrdU inkubiert und daraufhin das eingebaute BrdU mit Antikörpern gegen BrdU, die APC-gekoppelt waren, markiert. Mittels FACS-Gerät wurde der Prozentsatz der BrdU-APC-positiven Zellen innerhalb der EGFP-positiven Zellpopulation bestimmt.

In den Wachstumskinetiken über 6 Tage in 10 % FCS-haltigem Medium zeigten sich für alle transduzierten Zellen der Zelllinien U937, Cole und Eol-1 keine signifikanten Wachstumsunterschiede. Dieses deckt sich mit dem BrdU-Assay bei den SHIP1-transduzierten Zellen. Die U937-Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, wiesen jedoch einen Wachstumsvorteil von 3,5 % auf, was zu dem gesteigerten p-Akt-Spiegel passt, der im Western Blot beobachtet wurde. In den Wachstumskinetiken zeigte sich zwar nach 2 Tagen ein Wachstumsunterschied von 5,2 % zu Gunsten der SHIP1-Mutante. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Lou und Mitarbeiter transduzierten die U937-Zellen ebenfalls mit einer enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante, die jedoch an einer anderen Stelle mutiert war (V684E). In diesem Experiment zeigte die SHIP1-Mutante einen wachstumsfördernden Effekt (Lou et al., 2003). Auch die Daten der Eol-1-SHIP1-Mutante-Zellen aus dem BrdU-Assay decken sich mit den Western Blot –Daten. Es zeigt sich eine Reduktion des Wachstums um 5,2 % bei einem Abfall des p-Akt-Spiegels um 40 %. In der Wachstumskinetik konnte nach 48 Stunden ein Wachstumsnachteil der Eol-1-SHIP1-Mutante von 11,2 % festgestellt werden, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Die Eol-1-SHIP1-Zellen zeigten im Western Blot ebenfalls eine Verringerung des p-Akt, dies spiegelt sich jedoch weder in der Wachstumskinetik als auch in dem BrdU-APC-Assay wider. Ein bestätigendes Experiment mit dem BrdU-APC-Assay bei den Cole-Zellen ließ sich leider nicht durchführen, da die Zelllinie sich erstaunlicherweise nicht mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper APC markieren ließ. Ob BrdU gar nicht erst in die DNA eingebaut wurde oder der Antikörper gegen BrdU nicht binden konnte lässt sich nicht genau sagen. Eventuell verfügt die Zelllinie über Transporter, ähnlich wie die *multi drug resistance transporter* (MDR Transporter), die zellfremde Stoffe wie BrdU aus der Zelle ausschleusen können. Stammzellen besitzen verschiedene MDR Transporter, wie ABCG2 oder MDR1, die Xenobiotika und andere Toxine aus der Zelle schleusen und sie damit sehr widerstandsfähig machen (Donnenberg et al., 2009)

Erst als die transduzierten Zellen in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium kultiviert wurden, konnte bei den U937-, Cole- und Eol-1-Zellen, die mit SHIP1 transduziert

wurden eine signifikante Wachstumsreduktion von 70,7 %, 62,6 % und 22 % nach sechs Tagen gezeigt werden. Für die U937-SHIP1-Zellen konnte im BrdU-APC-Assay eine Wachstumshemmung von 16,6 % gefunden werden. Die Wachstumsreduktion der SHIP1-Zellen wurde bei allen 3 Zelllinien durch eine Reduktion der p-Akt-Expression im Western Blot unterstrichen. Die Unterschiede bei den U937-SHIP1-Mutante-Zellen sowohl in der Wachstumskinetik als auch im BrdU-Assay waren nicht signifikant. Im Western Blot zeigt sich verminderte p-Akt-Expression. Die Cole-SHIP1-Mutante-Zellen wuchsen in der Wachstumskinetik 21,8 % schlechter als die Vektorkontrolle, dies steht in Übereinstimmung mit dem erniedrigten p-Akt-Spiegel im Western Blot. Die Messungen der Proliferation sowohl in 2,5 % als auch in 0,5 % FCS-haltigem Medium waren für die Eol-1-Zellen nicht erfolgreich, da diese nur ungenügend BrdU in die DNA eingebaut hatten. Die Eol-1-Zellen reagieren auf reduzierte Wachstumsbedingungen offenbar mit einem stark verlangsamten Zellzyklus, sodass sich dem beobachteten Zeitfenster von 16 Stunden für eine adäquate Auswertung zu wenige Zellen teilten.

Die nach Expression von SHIP1 beobachtete Wachstumshemmung könnte einerseits darin begründet sein, dass SHIP1 das primäre Produkt der PI3-Kinase, nämlich PI(3,4,5)P₃ hydrolysiert. Für die PI3-Kinase wurde beschrieben, dass sie die Proliferation fördert und Apoptose verhindert (Yao und Cooper, 1995). Alternativ könnte auch die Konkurrenz von SHIP1 und Grb2 um die Bindung an Shc zu einem verminderten Wachstum führen. Wenn SHIP1 anstatt von Grb2 eine Bindung mit Shc eingeht, wird die Aktivität des Ras/Raf/MAPK-Signalwegs reduziert, der ebenfalls wachstumsfördernde und apoptosehemmende Wirkung hat (Saxton et al., 1994; Kinoshita et al. 1995; Tridandapani et al., 1997). Luo et al. konnten für K562-Zellen zeigen, dass die mit SHIP1 transduzierten Zellen sensibler auf einen kompletten Serumentzug reagieren und im Gegensatz zu den Vektor- und SHIP1-Mutante-Zellen vermehrt in Apoptose gehen (Lou et al., 2003).

Die Zelllinie Eol-1 ist gekennzeichnet durch die Fusionstyrokinase FIP1L1-PDGFR α . PDGFR α (*Platelet derived growth factor receptor A*) ist eine Rezeptortyrokinase, die den Ras/Raf MAPK-Signalweg aktiviert. Durch die Deletion bei der Fusion verliert PDGFR α die Transmembrandomäne und die

Juxtamembranregion, sodass FIP1L1-PDGFR α im Zytosol lokalisiert ist. Da Ras durch Farnesylreste an der Zellmembran lokalisiert ist, kann der MAPK-Signalweg durch FIP1L1-PDGFR α nicht aktiviert werden. FIP1L1-PDGFR α kann jedoch aufgrund der zytoplasmatischen Lokalisation andere Signalmoleküle binden als PDGFR α allein und so zum Beispiel STAT5 aktivieren (Cools et al., 2004). Dies könnte erklären, warum die Hemmung von SHIP1 nicht so ausgeprägt ist, wie bei den Zelllinien U 937 und Cole.

Die Zelllinie K562 zeigte als einzige Zelllinie in 10 % FCS-haltigem Medium den wachstumshemmenden Effekt von SHIP1. Die Zellzahlen, der mit SHIP1 transduzierten Zellen waren am sechsten Tag um 26 % geringer als die der Vektorzellen. Lou et al. zeigten für die K562-Zellen, die mit SHIP1 transduziert wurden, eine Wachstumshemmung in 5 % FCS-haltigem Nährmedium (Lou et al., 2003). Im BrdU-APC-Assay wurde eine Wachstumssteigerung um 13,2 % nachgewiesen, was sowohl der Wachstumskinetik, als auch den Literaturangaben widerspricht. Für die SHIP1-Mutante konnte nach sechs Tagen kein signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zu den Vektor-Zellen festgestellt werden. Im BrdU-APC-Assay war jedoch eine Wachstumssteigerung von 20,5 % nachweisbar. Es zeigten sowohl die SHIP1- (42,4 %) als auch die SHIP1-Mutante-Zellen (54,3 %) in 0,5 % FCS-haltigem Medium ein stärkeres Wachstum als die Vektor-Zellen. Lou und Mitarbeiter konnten ebenfalls zeigen, dass das Wachstum der mit der SHIP1-Mutante (V684E) transduzierten Zellen in 0,5 % FCS-haltigem Medium deutlich ausgeprägter war, als das der Vektor Zellen. Diese Ergebnisse werden durch eine verstärkte p-Akt-Expression im Western Blot gedeckt.

Die K562 ist eine der Zelllinien, die die Fusionstyrosinkinase BCR/ABL exprimieren. Für das BCR/ABL-Onkogen ist bekannt, dass es eine chronische myeloische Leukämie verursacht. Sattler et al. konnten zeigen, dass BCR/ABL nicht nur die Halbwertszeit des SHIP1-Proteins verkürzt, sondern auch die Menge an SHIP1-mRNA herunter reguliert. Nach der Hemmung von BCR/ABL durch den Tyrosinkinasehemmstoff Imatinib (STI571) wurde SHIP1 in BaF3-Zellen wieder exprimiert. Nach einer Überexpression von SHIP1 in selbigen Zellen konnten jedoch keine reduzierten Wachstumsraten festgestellt werden (Sattler et al., 1999).

Die Proliferation der Zelllinien Kasumi-1 und MV-4-11 nach Transduktion mit SHIP1 konnte nur unzureichend untersucht werden. Nach dem Sortieren der EGFP-positiven Zellen sind diese Zelllinien nicht ausreichend wieder in Kultur angewachsen, sodass keine aussagekräftigen Proliferationsdaten nach sechs Tagen vorliegen. Um das Problem des Sortierens der Zellen in dem Zellsortierer FacsAria zu umgehen, wurden die Proliferationsuntersuchungen mit dem BrdU-APC-Assay durchgeführt.

Die Zelllinie Kasumi-1 zeigte nach Transduktion mit SHIP1 in dem BrdU-APC-Assay keinen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich zu den Zellen, die mit SF91 transduziert wurden. Interessanterweise konnte bei den Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden eine signifikante Wachstumsreduktion von 6,5 % festgestellt werden. Der Wachstumsnachteil könnte durch die Hemmung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges durch die Bindung der SHIP1-Mutante an Shc zustande kommen. Kasumi-1 zeichnet sich unter anderem durch eine Punktmutation in dem Codon 822 in der A-Schleife der Rezeptortyrosinkinase KIT aus, wodurch der Rezeptor konstitutiv phosphoryliert ist. Vanderwinden et al. konnten zeigen, dass die KIT-Mutanten KIT^{K641E} und KIT^{del559}, die auch konstitutiv phosphoryliert sind, den SHIP1-Spiegel in der Zelle beeinflussen können. Durch Zugabe des Tyrosinkinasehemmstoffes Imatinib nahm die Phosphorylierung des KIT-Rezeptors ab und die Proteinmenge von SHIP1 wurde in beiden KIT-Mutanten erhöht. Nach dem Auswaschen des Hemmstoffes wurde nach 24 Stunden eine überschießende KIT-Phosphorylierung beobachtet und die SHIP1-Menge sank wieder (Vanderwinden et al., 2006). Das könnte eventuell erklären, warum eine Überexpression von SHIP1 nicht zu einer Wachstumsverlangsamung in den Kasumi-1-Zellen geführt hat. Etwas Ähnliches wurde auch von Sattler et al. nach Überexpression von SHIP1 in den BaF3-Zellen mit BCR/ABL beschrieben. Diese Tyrosinkinase beeinflusst die Proteinmenge von SHIP1 ebenfalls negativ (Sattler et al., 1999).

In dem BrdU-APC-Assay konnte für die Zelllinie MV4-11 in 10 % FCS-haltigem Medium sowohl für die SHIP1- (11,8 %) als auch für die SHIP1-Mutante-Zellen (16 %) eine Wachstumssteigerung festgestellt werden. Dieses könnte eventuell, wie schon bei den Wachstumskinetiken der K562-Zellen beschrieben, auf eine

Hyperphosphorylierung von Substrat aufgrund der enzymatisch inaktiven Phosphatase zurückzuführen sein. In der Zelllinie MV4-11 ist der Flt3-Rezeptor mutiert. Durch die interne Tandemduplikation sind 30 Basenpaare dupliziert, das führt zu einer konstitutiven Phosphorylierung und Aktivierung des Rezeptors. Infolge der verstärkten Phosphorylierung wird Shc vermehrt an den Rezeptor rekrutiert, so dass der Ras/Raf/MAPK-Signalweg aktiviert wird. Durch die vermehrte Rekrutierung von Shc bindet auch SHIP1 an Shc und wird phosphoryliert. Das wiederum hemmt den Ras/Raf/MAPK-Signalweg (Zhang et al., 1999). Die regulatorische Untereinheit p85 der PI3-Kinase bindet in BaF3-Zellen nicht direkt an den humanen Flt3-Rezeptor, sondern bildet einen Komplex mit SH2, SHIP1 und einem tyrosinphosphorylierten 100 kDa-Protein (Zhang and Broxmeyer, 1999). Welche Rolle SHIP1 in diesem Komplex spielt ist noch nicht bekannt. Vielleicht aber führt eine Überexpression von SHIP1 zu einer vermehrten Bildung dieses Komplexes, sodass es zu einer Wachstumsstimulation kommt.

Für die M1-Zelllinie konnte in dem BrdU-APC-Assay sowohl in 10 % als auch in 0,5 % FCS-haltigem Medium ein signifikanter Wachstumsnachteil der M1 SHIP1-Zellen festgestellt werden (3,4 % und 7,2 %). Im Western Blot zeigte sich nur unter reduzierten Serumbedingungen eine Reduktion der p-Akt-Expression. Bei den Zellen, die mit der SHIP1-Mutante transduziert wurden, konnte sowohl in 10 % als auch in 0,5 % FCS-haltigem Medium eine Wachstumshemmung von 4,5 % beobachtet werden. Im Western Blot zeigt sich interessanterweise eine leichte Steigerung der p-Akt-Expression in 0,5 % FCS-haltigem Medium. Dieses Experiment zeigt, dass eine Hemmung des Wachstums durch enzymatisch aktives SHIP1 durch reduzierte Wachstumsbedingungen in diesen Zellen verstärkt werden kann.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich die Daten aus Experimenten (Wachstumskinetik, BrdU-APC-Assay und Western Blot) bis auf beschriebene Ausnahmen decken. Es konnte bei den Zelllinien U937, Cole, Eo1-1 und M1 nach Transduktion mit dem enzymatisch aktiven SHIP1 eine signifikante Hemmung des Wachstums verzeichnet werden, die am ehesten auf eine Reduktion der Phosphorylierung von Akt und somit einer Hemmung der PI3K/Akt-Signalweges zurückzuführen ist.

Zelllinie	FCS	Wachstumskinetik (6 Tage)			Proliferationsassay (16 Stunden)	
		SHIP1 (Differenz in %)	SHIP1-Mutante (Differenz in %)	LY 294002 (8 Tage) (Differenz in %)	SHIP1 (Differenz in %)	SHIP1-Mutante (Differenz in %)
U937	10%	n.s.	n.s.	-92,8 ***	n.s.	+3,5 *
	0,5%	-70,7 *	n.s.		-16,6 *	n.s.
Cole	10%	n.s.	n.s.	-98,8 ***	n.d.	n.d.
	0,5%	-62,6 *	-21,8 *		n.d.	n.d.
Eol-1	10%	n.s.	n.s.	-97,3 ***	n.s.	-5,2 *
	0,5%	-22	n.s.		n.d.	n.d.
M1	10%	n.d.	n.d.	-97,8 ***	-3,4 *	-4,5 *
	0,5%	n.d.	n.d.		-7,2 *	-4,5 *
K562	10%	26 *	n.s.	-90,7 ***	+13,2 *	+20,5 *
	0,5%	+42,4 *	n.s.		n.d.	n.d.
Kasumi	10%	n.d.	n.d.	-97,7 ***	n.s.	-6,5 *
	0,5%	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
MV 4-11	10%	n.d.	n.d.	-99,6 ***	+11,8 *	+16 *
	0,5%	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.
Jurkat-TetOn-SHIP1	10%	n.d.	n.d.	-97,3 ***	+ Dox - 22,5 *	n.d.
					+ LY - 88,8 *	

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Wachstumskinetik und des Proliferationsassays der verschiedenen Zelllinien

Dargestellt sind die erhobenen Ergebnisse der Wachstumskinetik und des Proliferationsassays (BrdU-APC) nach Transduktion der jeweiligen Zelllinien mit SHIP1 und SHIP1-Mutante, jeweils in 10 % und 0,5% FCS-haltigem Medium. Weiterhin sind die Ergebnisse des Hemmversuches mit LY 294002 dargestellt. Die einzelne Zahl beschreibt die Differenz des Wachstums in Prozent, bezogen wurde sich auf die Vektorkontrolle, bzw. bei LY 29004 auf die ungehemmte Kontrolle, die mit 100 % gleichgesetzt wurde. n.s.: nicht signifikant; n.d.: nicht durchgeführt. + DOX: nach Zugabe von Doxycyclin, +LY: nach Zugabe von LY 294002. (*) $p \leq 0,05$. (***) $p \leq 0,001$.

6. Zusammenfassung

Die Inositol-5-Phosphatase SHIP1 gehört zu den negativen Regulatoren der wachstumsvermittelnden Signalwege in hämatopoetischen Zellen, wie dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweg. Der Phänotyp der SHIP1-*knockout*-Maus ist durch eine erhöhte Anzahl von myeloischen Vorläuferzellen in Knochenmark und Milz gekennzeichnet.

In dieser Arbeit wurden sieben Leukämiezelllinien mit konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase auf die Beeinflussbarkeit des Zellwachstums durch eine Überexpression von SHIP1 untersucht. Zuerst wurde überprüft, ob in den ausgewählten Leukämiezelllinien U937, Cole, Eo1-1, K562, Kasumi-1, MV4-11 und M1 der PI3K/Akt-Signalweg konstitutiv aktiviert ist, indem mittels Western Blot die phosphorylierte Form von Akt (p-Akt-S473) nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde die Hemmbarkeit der Proliferation durch den PI3-Kinase-Hemmstoff LY 294002 untersucht. In allen 7 untersuchten Zelllinien außer Kasumi-1 konnte p-Akt-S473 nachgewiesen werden und auch die Proliferation aller Zelllinien war durch LY 294002 fast vollständig hemmbar.

Daraufhin wurden die Zelllinien mit dem retroviralen Vektor SF91 mit EGFP, SF91 mit EGFP und SHIP1 oder SF91 mit EGFP und einer enzymatisch inaktiven Form von SHIP1 (D672A) transduziert und sortiert.

In den Zelllinien U937, Cole, Eo1-1, K562 und M1 ließ sich SHIP1 überexprimieren. Da auch das grünfluoreszierende Protein EGFP in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden konnte, konnte die Transduktion als erfolgreich angesehen werden. Die Zelllinien wurden nach der Sortierung der EGFP⁺-positiven Zellen sowohl in 10 % als in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium kultiviert. Hierbei zeigte sich ein Wachstumsnachteil der mit SHIP1 transduzierten Zellen bei den Zelllinien U937, Cole und Eo1-1 nur unter serumreduzierten Bedingungen. Für die mit SHIP1 transduzierten U937-Zellen wurden im Vergleich zu der Vektorkontrolle im BrdU-APC-Assay nach 16 Stunden 16,6 % und mit Hilfe einer Wachstumskinetik nach 6 Tagen 70,7 % weniger Zellen gezählt. Bei der Zelllinie Cole belief sich die Wachstumshemmung nach Transduktion mit SHIP1 nach 6 Tagen auf 62.6 %, bei

den EOL-1-Zellen auf 22 %. Im Vergleich zu den Vektorzellen wurde in den mit SHIP1 transduzierten Zellen der Zelllinien U937, Cole und Eol-1 signifikant weniger p-Akt exprimiert. Die Zelllinie M1 wies nach Serumreduktion einen Wachstumsnachteil der SHIP1-Zellen von 7,2 % in 16 Stunden auf. In einem Western Blot zeigte sich eine im Vergleich zu den Vektorzellen erniedrigte p-Akt-Expression um 52 %.

Interessanterweise scheinen die mit der SHIP1-Mutante transduzierten Zellen der Zelllinien Eol-1, Kasumi-1 und M1 im Vergleich zu den Vektorzellen einen kurzfristigen Wachstumsnachteil, gemessen in 16 Stunden mit dem BrdU-APC-Assay, aufzuweisen. Ein negativer Effekt auf die p-Akt-Expression konnte in den in 0,5 % FCS-haltigen Medium kultivierten SHIP1-Mutante-Zellen der Zelllinien U937, Cole und Eol-1 (hier auch in 10 % FCS-haltigem Medium gezeigt) nachgewiesen werden. In den Zelllinien K562 und MV4-11 zeigten sowohl die SHIP1- als auch die SHIP1-Mutante-Zellen eine gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den SF91-Zellen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich das Wachstum der Leukämiezelllinien U937, Cole, Eol-1 und M1 *in vitro* nach Serumreduktion durch die Überexpression der Inositol-5-Phosphatase SHIP1 signifikant hemmen lässt. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob sich die Proliferation auch *in vivo* durch SHIP1 reduzieren lässt. Hierzu müsste das Wachstum dieser mit SHIP1 transduzierten Zelllinien in Mäusen untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Abu-Duhier, F., Goodeve, A., Wilson, G., Care, R., Peake, I., & Reilly, J. (2001). Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematology*(113), pp. 983-988.
- Ai, J., Maturu, A., Johnson, W., Wang, Y., Marsh, C., Tridandapani, S. (2006). The inositol phosphatase SHIP-2 down-regulates FcγR-mediated phagocytosis in murine macrophages independently of SHIP-1. *Blood* (107), pp. 813-820.
- Alessi, D., Andjelkovic, M., Caudwel, I. B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., et al. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*(15(23)), pp. 6541-6551.
- Ashman, L. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor c-Kit. *Int J Biochem Cell Biol*(31), pp. 1037–1051.
- Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K., & Kamada, N. (1991). Establishment of a Human Acute Myeloid Leukemia Cell Line (Kasumi-1) with 8;21 Chromosome Translocation. *Blood*(77), pp. 2031-2036.
- Beghini, A. (2002). Amplification of a novel c-kit activating mutation Asn822-Lys in the Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-Kit mutant model for acute myeloid leukaemia. *The Hematology Journal*(3), pp. 157-163.
- Berger, R., Le Coniat, M., Derré, J., Vecchione, D., & Chen, S. (1989). Chromosomal rearrangement on chromosome 11q14-q21 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*(3), pp. 560-562.
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*(411), pp. 355-365.
- Bondar, V., Sweeney-Gotsch, B., Andreeff, M., Mills, G., & McConkey, D. (2002). Inhibition of the Phosphatidylinositol 3`-Kinase-AKT Pathway Induces Apoptosis in Pacreatic Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. *Mol Cancer Ther*(1), pp. 989-997.

- Brasel, K., Escobar, S., Anderberg, R., de Vries, P., Gruss, H., & Lyman, S. (1995). Expression of the flt3 receptor and its ligand on hematopoietic cells. *Leukemia*(9), pp. 1212-1218.
- Broccoli, D. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(92), pp. 9082-9086.
- Bruyins C, Pesesse X, Moreau C, Blero D, Erneux C. (1999). The two SH2-domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 are coexpressed in human T lymphocytes. *Biol Chem.* (380), pp. 969-974.
- Cameron, AJ., Allen JM. (1999). The human high-affinity immunoglobulin G receptor activates SH2-containing inositol phosphatase (SHIP). *Immunology*(97(4)), pp. 641-647.
- Carlson, K., Vignon, C., Bohlander, S., Martinez-Climent, J., Le Beau, M., & Rowley, J. (2000). Identification and molecular characterization of CALM/AF10 fusion products in T cell acute lymphoblastic leukemia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*(14), pp. 100-104.
- Carter, M., Kalwinsky, D., Mirro, J. J., Behm, F., Head, D., Huddleston, T., et al. (1991). The t(10;11)(p14;q21) translocation in three children with acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*(5), pp. 561-565.
- Cashmann, J., Eaves, A., & Eaves, C. (1985). Regulated proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells in long-term human marrow cultures. *Blood*(66), pp. 1002-1005.
- Cassileth, P., Harrington, D., Hines, J., Oken, M., Mazza, J., McGlave, P., et al. (1988). Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*(6(4)), pp. 583-587.
- Clark, B., & Keating, A. (1995). Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*(770), pp. 70-78.
- Condé, C., Gloire, G., & Piette, J. (2011). Enzymatic and non-enzymatic activities of SHIP-1 in signal transduction and cancer. *Biochem Pharmacol*(Article in press).

- Constinean, S., Sandhu, S., Pedersen, I., Tili, E., Trotta, R., & Perrotti, D. (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), pp. 1374-1382.
- Constinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., & Heerema, N. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*(103), pp. 7024-7029.
- Cools, J. (2004). The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukaemia. *Blood*(103), pp. 2802-2805.
- Cully, M., You, H., Levine, A., & Mak, T. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*(6), pp. 184-192.
- Damen, J. (1993). Erythropoietin stimulates the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and a 145-kD tyrosine phosphrylated protein. *Blood*(82), pp. 2296-2303.
- Damen, J. (1998). Multiple forms of the SH2-containing Inositol Phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood*(92), pp. 1199-1205.
- Damen, J., Liu, L., Rosten, P., Humphries, R., Jefferson, A., Majerus, P., et al. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*(93), pp. 1689-1693.
- de Parseval, N., Fichelson, S., Mayeux, P., Gisselbrecht, S., & Sola, B. (1993). Expression of functional beta-platelet-derived growth factor receptors on hematopoietic cell lines. *Cytokine*(5), pp. 8-15.
- Delhommeau, F. (2006). Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*(63), pp. 2939-2953.

- Dohner, H., Estey, E., Amadori, S., Appelbaum, F., Buchner, T., Burnett, A., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*(115(3)), pp. 453-474.
- Donnenberg VS, Meyer EM, Donnenberg AD. (2009). Measurement of multiple drug resistance transporter activity in putative cancer stem/progenitor cells. *Methods Mol Biol.* (568), pp. 261-279.
- Dreyling, M., Martinez-Climent, J., Zheng, M., Mao, J., Rowley, J., & Bohlander, S. (1996). The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(93), pp. 4804-4809.
- Eder, M. (1999). Monitoring of BCR-ABL expression using real time RT-PCR in CML after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia*(13), pp. 1383-1389.
- Eis, P., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., & Gomez, M. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*(102), pp. 3627-3632.
- Endo, T., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., et al. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*(387), pp. 921-924.
- Engelhardt, M. (1997). *Blood*(90), pp. 182-193.
- Erneux, C., Edimo W, Deneubourg, L., Pirson, I. (2011). SHIP2 Multiple Functions: A Balance Between a Negative Control of PtdIns(3,4,5)P3 Level, a Positive Control of PtdIns(3,4)P2 Production, and Intrinsic Docking Properties. *J. of Cell Biochem.* (112), pp. 2203-2209.
- Fathi, A., & Levis, M. (2008). Lestaurtinib: a multi-targeted FLT3 inhibitor. *Expert Rev Hematol*(2), pp. 17-26.
- Fialkow, P. (1987). *New England Journal of Medicine*(317), pp. 468–473.

- Fischkoff, S., Testa, J., & Schiffer, C. (1988). Acute eosinophilic leukemia with a (10;11) chromosomal translocation. *Leukemia*(2), pp. 394-397.
- Fletcher, J., & Rubin, B. (2007). KIT mutations in GIST. *Current Opinion in Genetics & Development*(17), pp. 3-7.
- Flint, A., Tiganis, T., Barford, D., Tonks, N. (1997). Development of “substrate-trapping” mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94), pp. 1680–1685.
- Foss, B. (2001). Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts. *Eur. J. Haematol.*(67), pp. 267-278.
- Fukuda, R., Hayashi, A., Utsunomiya, A., Nukada, Y., Fukui, R., & Itoh, K. (2005). Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci USA*(102), pp. 15213-15218.
- Fukuda, R., Tsuchiya, K., Suzuki, K., Itoh, K., Fujita, J., & Utsunomiya, A. (2009). Human T-cell leukemia virus type I tax down-regulates the expression of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate inositol phosphatases via the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*(284), pp. 2680-2089.
- Furitsu, T. (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J. Clin. Invest.*(92), pp. 1736-1744.
- Gang, X., Wang, J., Su, B., & Wu, D. (2011). Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*(286(2)), pp. 10998-11002.
- Geier, S. (1997). The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood*(89), pp. 1876-1885.

- Gilby, D., Goodeve, A., Winship, P., Valk, P., Delwel, R., & Reilly, J. (2007). Gene structure, expression profiling and mutation analysis of the tumour suppressor SHIP1 in Caucasian acute myeloid leukaemia. *Leukemia*(21), pp. 2390-2393.
- Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D., Saffran, D., & Witte, O. (1995). Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*(82), pp. 981-988.
- Golub, T., Barker, G., Lovett, M., & Gilliland, D. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*(77), pp. 307-316.
- Gotlib, J. (2004). The FIP1L1-PDGFR α fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood*(103), pp. 2879-2891.
- Groupe Française de Cytogénétique Hématologique. (1991). t(10;11)(p13-14;q14-21): a new recurrent translocation in T-cell acute lymphoblastic leukemias. *Genes Chromosomes Cancer*(3), pp. 411-415.
- Hanahan, & Weinberg. (2000). *Cell*(100), pp. 57-70.
- Hayflick, L. (1997). *Biochemistry*(62), pp. 1180-1190.
- Helgason, C., Damen, J., Rosten, P., Grewal, R., Sorensen, P., Chappel, S., et al. (1998). Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev*(12), pp. 1610-1620.
- Horn, S. (2004). Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 β signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle. *Leukemia*(18), pp. 1839-1849.
- Huber, M., Helgason, C., Damen, J., Liu, L., Humphries, R., & Krystal, G. (1998). The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*(95), pp. 11330-11335.

- Isnardi, I., Bruhns, P., Bismuth, G., Fridman, W., & Daeron, M. (2006). The SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP 1 is recruited to the intracytoplasmatic domain of human FcγRIIB and is mandatory for negative regulation of B cell activation. *Immunol Lett*(104), pp. 156-165.
- Jones, D. (1985). Phenotypic Analysis of an established cell line derived from a patient with Hodgkin's Disease (HD). *Hematological Oncology*(3), pp. 133-145.
- Jücker, M. (2002). Expression of a mutated form of the p85α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line (CO). *Leukemia*(16), pp. 894-901.
- Kantarjian, H., Cortes, J., & Guilhot, F. (2007). Diagnosis and management of chronic myeloid leukemia: a survey of American and European practice patterns. *Cancer*(109), p. 1365.
- Karp, J., Gojo, I., Pili, R., Gocke, C., Greer, J., Guo, C., et al. (2004). Targeting vascular endothelial growth factor for relapsed and refractory adult acute myelogenous leukemias: therapy with sequential 1-β-d-arabinofuranosylcytosine, mitoxantrone, and bevacizumab. *Clinical Cancer Research*(10), pp. 3577–3585.
- Kavanaugh, W. (1994). An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science*(266), pp. 1862-1865.
- Kavanaugh, W. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase from signaling complexes with Shc und Grb2. *Current Biology*(4), pp. 438-445.
- Kennah, M., Yau, T., Nodwell, M., Krystal, G., Andersen, R., & Ong, C. (2009). Activation of SHIP via a small molecule agonist kills multiple myeloma cells. *Exp Hematol*(37), pp. 1274-1283.
- Kerr, W. (2008). A role for SHIP in stem cell biology and transplantation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*(3), pp. 99-106.

- Kerr, W., Heller, M., & Herzenberg, L. (1996). Analysis of lipopolysaccharide-response genes in B-lineage cells demonstrates that they can have differentiation stage-restricted expression and contain SH2 domains. *Proc Natl Acad Sci USA*(93), pp. 3947-3952.
- Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K., & Miyajima, A. (1995). Suppression of apoptotic death in hematopoietic cells by signalling through the IL-3/GM-CSF receptors. *EMBO J.*(14), pp. 266-275.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., et al. (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*(11), pp. 1447-1452.
- Klein, G. (1995). The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*(51(9-10)), pp. 914-926.
- Koch, C. (1991). SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*(252), pp. 668-674.
- Kolitz, J. (2006). Current therapeutic strategies for acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.*(134(6)), pp. 555-572.
- Koncz, G., Tóth, G., Bökönyi, G., Kéri, G., Pecht, I., Medgyesi, D., et al. (2001). Co-clustering of Fcγ and B cell receptors induces dephosphorylation of the Grb2-associated binder 1 docking protein. *Eur J Biochem*(268), pp. 3898–3906.
- Kumar, C. (2011). Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes and Cancer*(2 (2)), pp. 95-107.
- Kumon, K., Kobayashi, H., Maseki, N., Sakashita, A., Sakurai, M., Tanizawa, A., et al. (1999). Mixed-lineage leukemia with t(10;11)(p13;q21): an analysis of AF10-CALM and CALM-AF10 fusion mRNAs and clinical features. *Genes Chromosomes Cancer*.(25), pp. 33-39.
- Lavagna-Sévenier, C., Marchetto, S., Birnbaum, D., & Rosnet, O. (1998). The CBL-related protein CBLB participates in FLT3 and interleukin-7 receptor signal transduction in pro-B cells. *J Biol Chem.*(273(24)), pp. 14962-14967.

- Lee, S. (2000). Chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*(111), p. 993.
- Lierman, E. (2006). Sorafenib is a potent inhibitor of FIP1L1-PDGFR α and the imatinib-resistant FIP1L1-PDGFR α T674I mutant. *Blood*(108), pp. 1374-1376.
- Linnekin, D. (1999). Early signaling pathways activated by c-kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol*(31), pp. 1053–1074.
- Lioubin, M. (1994). Shc, Grb2, Sos1 and a 150-kilodalton tyrosine-phosphorylated protein form complexes with Fms in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.*(14), pp. 5682-5691.
- Lioubin, M., Algate, P., Tsai, S., Carlberg, K., Aebersold, A., & Rohrschneider, L. (1996). p150 SHIP, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes & Development*(10), pp. 1084-1095.
- List, A., Kurtin, S., Roe, D., Buresh, A., Mahadevan, D., Fuchs, D., et al. (2005). Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine*(352), pp. 549–557.
- Liu, L. (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), pp. 6926-6935.
- Liu, Y., Jenkins, B., Shin, J., & Rohrschneider, L. (2001). Scaffolding protein Gab2 mediates differentiation signaling downstream of Fms receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.*(21), pp. 3047–3056.
- Longley, B. (1999). Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Medical Science*(96), pp. 1609-1614.
- Lucas, D., & Rohrschneider, L. (1999). A novel spliced form of SH2-containing inositol phosphatase is expressed during myeloid development. *Blood*(93), pp. 1922-1933.

- Luchetti, F. (1999). The K 562 chronic myeloid leukaemia cell line undergoes apoptosis in response to interferon- α . *Hematologica*(83), pp. 974-980.
- Luo, J., Yoshida, H., Komura, S., Ohishi, N., Pan, L, et al. (2003). Possible dominant-negative mutation of the SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Leukemia*(17), pp. 1-8.
- Magnusson, M., Meade, K., Brown, K., Arthur, D., Krueger, L., Barrett, A., et al. (2001). Rabaptin-5 is a novel fusion partner to platelet-derived growth factor beta receptor in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*(98), pp. 2518-2525.
- Majerus, P. (1999). The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J Biol. Chem.*(274), pp. 10669-10672.
- Marcucci, M. G., Stock, W., Dai, G., Klisovic, R., Liu, S., Klisovic, M., et al. (2005). Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *Journal of Clinical Oncology*(23), pp. 3404–3411.
- Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., et al. (1989). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*(243), pp. 800-804.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., et al. (1997). Cis, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*(89), pp. 3148-3154.
- Mayani, H. (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. (10(6)), pp. 1041-1047.
- Mayer, R., Davis, R., Schiffer, C., Berg, D., Powell, B., Schulman, P., et al. (1994). Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med*(331(14)), pp. 896-903.

- McCulloch, E. (1979). *Blood Cells*(5), pp. 261–282.
- Meierhoff, G., Dehmel, U., Gruss, H., Rosnet, O., Birnbaum, D., Quentmeier, H., et al. (1995). Expression of FLT3 receptor and FLT3-ligand in human leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*(9), pp. 1368-1372.
- Melo, J. (1996). The molecular biology of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia*(10), pp. 751-756.
- Meshinchi, S., Woods, W., Stirewalt, D., Sweetser, D., Buckley, J., Tjoa, T., et al. (2001). Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood*(97), pp. 89-94.
- Metcalf, D. (2007). On Hematopoietic Stem Cell Fate. *Immunity*(26), pp. 669-673.
- Metzner, A. (2007). Gene transfer of SHIP-1 inhibits proliferation of juvenile myelomonocytic leukemia cells carrying KRAS2 or PTPN11 mutations. *Gene Therapy*(14), pp. 699-703.
- Metzner, A., Precht, C., Fehse, B., Fiedler, W., Stocking, C., Günther, A., et al. (2009). Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D. *Gene Ther*(16(4)), pp. 570-573.
- Miletic, A., Anzelon-Mills, A., Mills, D., Omori, S., Pedersen, I., Shin, D.-M., et al. (2010). Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases. *J. Exp. Med*(207 (11)), pp. 2407-2420.
- Mulligan, R. (1993). The basic science of gene therapy. *Science*(260), pp. 926-932.
- Myers, M., Pass, I., Batty, I., Van der Kaay, J., Stolarov, J., Hemmings, B., et al. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*(95), pp. 13513-13518.
- Nagata, H., Worobec, A., Oh, C., Chowdhury, B., Tannenbaum, S., Suzuki, Y., et al. (1995). Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who

- have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(92), pp. 10560-10564.
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., et al. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*(387), pp. 924-928.
- Nalaskowski, MM. Metzner A, Brehm MA, Labiadh S, Brauer H, Grabinski N, Mayr GW, Jücker M. (2011). The inositol 5-phosphatase SHIP1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein and enzymatically active in cell nuclei. *Cell Signal.*, Epub ahead of print.
- Narita, M., Shimizu, K., Hayashi, Y., Taki, T., Taniwaki, M., Hosoda, F., et al. (1999). Consistent detection of CALM-AF10 chimaeric transcripts in haematological malignancies with t(10;11)(p13;q14) and identification of novel transcripts. *Br J Haematol.*(105), pp. 928-937.
- Ngyuen, N., Maxwell, M., Ooms, L., Davies, E., Hilton, A., & Collinge, J. (2011). An ENU-induced mouse mutant of SHIP 1 reveals a critical role of the stem cell isoform for suppression of macrophage activation. *Blood*(117(20)), pp. 5362-5371.
- Nicholls, S., Winter, S., Mottram, R., Miyan, J., & Whetton, A. (1999). Flt3 ligand can promote survival and macrophage development without proliferation in myeloid progenitor cells. *Experimental Hematology*(27), pp. 663-672.
- O'Connell, R., Chaudhuri, A., Rao, D., & Baltimore, D. (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci USA*(106), pp. 7113-7118.
- O'Connell, R., Rao, D., Chaudhuri, A., Boldin, M., Taganov, K., & Nicoll, J. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*(205), pp. 585-594.
- Ong, C., Ming-Lum, A., Nodwell, M., Ghanipour, A., Yang, L., & Williams, D. (2007). Small-molecule agonist of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood*(110), pp. 1942-1949.

- Oostendorp, R. (2003). Zytokine, Zytokinrezeptoren und die hämatopoetische Stammzelle. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*(46), pp. 225–232.
- Parcells, B. (2006). FMS-Like Tyrosine Kinase 3 in Normal Hematopoiesis and Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells*(24), pp. 1174-1184.
- Pedersen, I., Otero, D., Kao, E., Miletic, A., Hother, C., & Ralfkiaer, E. (2009). Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO Mol Med*(1), pp. 288-295.
- Phee, H., Rodgers, W., & Coggeshall, K. (2001). Visualization of negative signaling in B cells by quantitative confocal microscopy. *Mol. Cell. Biol.*(24), pp. 8615-8625.
- Pirkmajer, S., & Chibalin, A. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol.*
- Quentmeier, H. (2003). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia*(17), pp. 120-124.
- Rohrschneider, L. (2000). Structure, funktion and biology of SHIP proteins. *Genes & Development*(14), pp. 505-520.
- Rombouts, W., Blokland, I., Löwenberg, B., & Ploemacher, R. (2000). Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene. *Leukemia*(14), pp. 675-683.
- Ross, T., Bernard, O., Berger, R., & Gilliland, D. (1998). Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFbetaR) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2). *Blood*(91), pp. 4419-4426.
- Rufer, N. (1999). *J. Exp. Med.*(190), pp. 157-167.
- Ruschmann, J., Ho, V., Atignano, F., Kuroda, E., Lam, V., & Ibaraki, M. (2010). Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Exp Hematol*(38), pp. 392-402.

- Sait, S., Dal Cin, P., & Sandberg, A. (1987). Recurrent involvement of 11q13 in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*(26), pp. 351-354.
- Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K., & Berk, B. (2001). Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol. Cell. Boil.*(21), pp. 6387-6394.
- Sattler, M. (1999). BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*(19), pp. 7473-7480.
- Sattler, M., & Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia*(12(5)), pp. 637-644.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, MA, et al. (1996). The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*(12), pp. 839-846.
- Sattler, M., Verma, S., Pride, Y., Salgia, R., & Rohrschneider, L. (2001). SHIP1, an SH2 Domain Containing Polyinositol-5-phosphatase, Regulates Migration through Two Critical Tyrosine Residues and Forms a Novel Signaling Complex with DOK1 and CRKL. *J Biol Chem*(276), pp. 2451-2458.
- Schaffhausen, B. (1995). SH2 domain structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.*(1242), pp. 61-75.
- Severin, S., Gratacap, M., Lenain, N., Alvarez, L., Hollande, E., Penninger, J., et al. (2007). Deficiency of Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 affects platelet responses and thrombus growth. *J. Clin. Invest.*(117), pp. 944-952.
- Sharma, S., Murai, F., Miyanochara, A., & Friedmann, T. (1997). Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient in viral envelope become infectious in

- the presence of lipofection reagents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(94), pp. 10803–10808.
- Shivdasani & Orkin. (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*(87), pp. 4025-4039.
- Siegel, J., Li, Y., Whyte, P.(1999). SHIP-mediated inhibition of K562 erythroid differentiation requires an intact catalytic domain and Shc binding site. *Oncogene*(18), pp. 7135-7148.
- Songyang, Z. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*(72), pp. 767-778.
- Songyang, Z. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*(72), pp. 767-778.
- Stapnes, C., Gjertsen, B., Reikvam, H., & Bruserud, O. (2009). Targeted therapy in acute myeloid leukaemia: current status and future directions. *Expert Opin Investig Drugs*(18), pp. 433-455.
- Starr, R., Willson, T., Viney, E., Murray, L., Rayner, J., Jenkins, B., et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*(387), pp. 917-921.
- Stein, R. (2001). Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*(1), pp. 237-248.
- Stone, R., DeAngelo, D., Klimek, V., & al., e. (2005). Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC412. *Blood*(105), pp. 54-60.
- Stover, E. (2006). Activation of FIP1L1-PDGFR α requires disruption of the juxtamembran domain of PDGFR α and is FIP1L1-independent. *PNAS*(103), pp. 8078-8083.
- Strefford, J., Foot, N., Chaplin, T., Neat, M., Oliver, R., Young, B., et al. (2001). The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative

- genomic hybridisation and multi-plex FISH. *Cytogenet Cell Genet.*(94), pp. 9-14.
- Sun, H., Charles, C., Lau, L., & Tonks, N. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell*(75), pp. 487-493.
- Sundström, C., & Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.*(17), pp. 565-577.
- Takeshita, S., Namba, N., Zhao, J., Jiang, Y., Genant, H., Silva, M., et al. (2002). SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nature Med.*(8), pp. 943-949.
- Tato, I., Bartrons, R., Ventura, F., & Rosa, J. (2011). Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *J Biol Chem*(286(8)), pp. 6128-6142.
- Tavassoli, M. (1991). Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview. *Blood Cells*(17(2)), pp. 269-286.
- Thirman, M., Gil, I. H., Burnett, R., Mbangkollo, D., McCabe, N., Kobayashi, H., et al. (1993). Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med.*(329), pp. 909-914.
- Tu, Z., Ninos, J., Ma, Z., Wang, J., Lemos, M., Desponts, C., et al. (2001). Embryonic and hematopoietic stem cells express a novel SH2-containing inositol 5'-phosphatase isoform that partners with the Grb2 adapter protein. *Blood*(98), pp. 2028-2038.
- Valderrama-Carvajal, H., Cocolakis, E., Lacerte, A., Lee, E., Krystal, G., Ali, S., et al. (2002). Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nature Cell Biol.*(4), pp. 963-969.
- Vanderwinden, J., Wang, D., N, P., Mignon, S., Isozaki, K., & Erneux, C. (2006). Differences in signaling pathways and expression level of the

- phosphoinositide phosphatase SHIP1 between two oncogenic mutants of the receptor tyrosine kinase KIT. *Cellular Signalling*(18), pp. 661-669.
- Vazquez, F., & Devreotes, P. (2006). Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle*(5), pp. 1523-1527.
- Vesley, D. (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates interleukin-6 protection against p53-induced apoptosis in M1 myeloid leukemic cells. *Oncogene*, pp. 1-10.
- Wang, J., Howson, J., Ghansah, T., Despoants, C., Ninos, J., May, S., et al. (2002). Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation. *Science*(295), pp. 2094-2097.
- Warner, J. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene*(23), pp. 7164-7177.
- Windhorst S, Kalinina T, Schmid K, Blechner C, Kriebitzsch N, Hinsch R, Chang L, Herich L, Schumacher U, Mayr GW. (2011). Functional role of inositol-1,4,5-trisphosphate-3-kinase-A for motility of malignant transformed cells. *Int J Cancer*. (129): pp.1300-1309.
- Xia, Q. (2005). Proteomic analysis of interleukin 6-induced differentiation in mouse myeloid leukemia cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*(37), pp. 1197-1207.
- Xu, F., Taki, T., Yang, H., Hanada, R., Hongo, T., Ohnishi, H., et al. (1999). Tandem duplication of the FLT3 gene is found in acute lymphoblastic leukaemia as well as acute myeloid leukaemia but not in myelodysplastic syndrome or juvenile chronic myelogenous leukaemia in children. *Br. J. Haematol.*(105), pp. 155-162.
- Yamamoto, Y., Kiyoi, H., Nakano, Y., Suzuki, R., Kodera, Y., Miyawaki, S., et al. (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*(97), pp. 2434-2439.

- Yao, R., & Cooper, G. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*(267), pp. 2003-2006.
- Yarden, Y. (1987). Human proto-oncogen c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.*(6), pp. 3341-3351.
- Yi, T., Mui, A., G, K., & Ihle, J. (1993). Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin - 3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3 induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.*(13), pp. 7577-7586.
- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N., Gilbert, D., Copeland, N., et al. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2 - containinprotein that binds to tyrosinephosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*(14), pp. 2816-2826.
- Zhang, S., & Broxmeyer, H. (1999). p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(254), pp. 440-445.
- Zhang, S., & Broxmeyer, H. (2000). Flt3 Ligand Induces Tyrosine Phosphorylation of Gab1 and Gab2 and Their Association with Shp-2, Grb2, and PI3 Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*(277), pp. 195-199.
- Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., et al. (2000). Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J Exp Med.*(192), pp. 719-728.
- Zhang, S., Mantel, C., & Broxmeyer, H. (1999). Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells. *J Leukoc Biol.*(65(3)), pp. 372-380.
- Zhu, & Emerson. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*(21), pp. 3295-3313.

- Zippo, A., De Robertis, A., Bardelli, M., Galvagni, F., & Oliviero, S. (2004). Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*(103), pp. 4536–4544.
- Zon, L. (1995). Developmental Biology of Hematopoiesis. *Blood*(86(8)), pp. 2876-2891.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

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

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ins	Inositol
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
LTR	(<i>long terminal repeat</i>)
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minute
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NP40	Nonylphenylpolyethylenglykol
OMF	Osteomyelofibrose
OCRL	oculo-cerebro-renales / Lowe-Syndrom
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	Polycythaemia vera
PDK	Phosphoinosit-abhängige Proteinkinase (<i>phosphoinositid-dependent protein kinase</i>)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethansulfonyl fluorid
PtdIns(3,4)P ₂	Phosphatidylinositol-(3,4)-biphosphat

PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat
PtdIns(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PTB-Domäne	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne (<i>phosphotyrosine binding domain</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SH-Domäne	Src-Homologiedomäne (<i>Src homology domain</i>)
Shc	(<i>SH2-containing collagen-related protein</i>)
SHIP	Src-Homologie-2 beinhaltende Insositol-5'-Phosphatase
TCA	Trichloressigsäure (<i>trichlor acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPO	Thrombopoetin
TRE	(<i>tetracycline-response-element</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell Rezeptor
U	Einheit (<i>unit</i>)
VSV	Vesiculo Stomtitis Virus
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Hämatopoese	10
Abb. 2: Hypothetische Interaktionen von Signalmolekülen mit menschlichen Klasse III Rezeptortyrosinkinasen (RTK).....	14
Abb. 3: <i>SH2-containing</i> Inositol-5-Phosphatase (SHIP)	16
Abb. 4: Altersspezifische Inzidenz von Leukämien in den USA von 2002 - 2006 ...	28
Abb. 5: Retroviraler Vektor SF91iGpre.....	40
Abb. 6: FLT3-Rezeptor.....	43
Abb. 7: Vergleich der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase p85 α mit der in den Cole-Zellen vorkommenden mutierten Form p76 α	44
Abb. 8: Fusion von FIP1L1 mit PDGFRA	47
Abb. 9: EGFP-positive-Suspensionszellen.....	57
Abb. 10: FACS-Analyse der mit BrdU-APC gefärbten und eGFP exprimierenden Zellen	58
Abb. 11: K562 mit BCR/ABL- Fusionsgen.....	69
Abb. 12: EOL-1 mit FIP1L1/PDGFRA-Fusionen.....	69
Abb. 13: MV 4-11 mit Flt3-Tandemduplikation	70
Abb. 14: Kasumi-1 mit c-kit-Punktmutation	70
Abb. 15: Detektierung von p-Akt (Ser473) in Zelllinien Jurkat, U937, Cole, Eol-1, MV4-11, M1 und K562 im Western Blot	71
Abb. 16: Wachstumskinetiken der Zelllinien Cole und Jurkat mit und ohne Hemmstoff LY294002.....	72
Abb. 17: a) Wachstumskinetik der Zelllinie K562 mit und ohne Hemmstoff LY294002; b) Prozentsatz der gestorbenen K562 Zellen als Anteil der Gesamtzellzahl mit und ohne Hemmstoff LY294002.....	72
Abb. 18: Wachstumskinetik der Zelllinie U937 am 6.Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium.....	77
Abb. 19: Wachstumskinetik der Zelllinie U937 am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium.....	77
Abb. 20: Wachstumskinetik der Zelllinie Cole am 6.Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium.....	78

Abb. 21: Wachstumskinetik der Zelllinie Cole am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium.....	78
Abb. 22: Wachstumskinetik der Zelllinie Eol-1 am 6.Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium.....	79
Abb. 23: Wachstumskinetik der Zelllinie Eol-1 am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium.....	79
Abbildung 24: Wachstumskinetik der Zelllinie K562 am 6.Tag in 10 % FCS-haltigem Nährmedium	80
Abb: 25: Wachstumskinetik der Zelllinie K562 am 6.Tag in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium.....	81
Abb. 26: Wachstum in Prozent der Zelllinie Jurkat #51 nach Zugabe von Doxycyclin oder LY 294002.....	82
Abb. 27: Wachstum der Zelllinie U937 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	83
Abb. 28: Wachstum der Zelllinie U 937 in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	83
Abb. 29: Wachstum der Zelllinie Eol-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	84
Abb. 30: Wachstum der Zelllinie Kasumi-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden	85
Abb. 31: Wachstum der Zelllinie MV4-11 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	86
Abb. 32: Wachstum der Zelllinie M-1 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	87
Abb. 33: Wachstum der Zelllinie M1 in 0,5 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	87
Abb. 34: Wachstum der Zelllinie K562 in 10 % FCS-haltigem Nährmedium nach 16 Stunden.....	88
Abb 35: a) Western Blot der U937 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	90
Abb 36: a) Western Blot der U 937 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	91

Abb. 37: a) Western Blot der Cole in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	92
Abb. 38: Western Blot der Cole in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	93
Abb. 39: a) Western Blot der Eol-1 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	94
Abb. 40: a) Western Blot der Eol-1 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	95
Abb. 41: a) Western Blot der M1 in 10% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von p-Akt und SHIP abgeglichen auf GAPDH	96
Abb. 42: a) Western Blot der M1 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von SHIP abgeglichen auf GAPDH.....	97
Abb. 43: a) Western Blot der K562 in 0,5% FCS-haltigem Medium; b) Relative Expression von SHIP abgeglichen auf GAPDH.....	98

8.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2007 bis Februar 2012 in der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefertigt. Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

PD Dr. Manfred Jücker gebührt mein größter Dank, da er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Dissertation in seinen Räumen durchzuführen. Während dieser Zeit und natürlich auch noch danach stand er mir mit Rat und Tat zu Seite.

Prof. Dr. G. W. Mayr ist für die Möglichkeit zu danken, dass ich meine Arbeit am Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie durchführen konnte.

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

Frau Dr. Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie Hamburg, danke ich für die Bereitstellung des retroviralen Vektors. Arne Düsedau hat mit großer Ausdauer meine Zellen sortiert.

Meine Zeit in dem Labor ist durch viele Menschen und Ihre Freundlichkeit sehr angenehm gemacht worden. Anja Meier und Elion Hoxha haben mir einen Großteil meiner Methodik beigebracht. Mit Bianca Hofmann und Katharina Grupp stand ich oft Seite während der Versuchsdurchführung. Wiebke Wegner hat mir immer besonders geholfen, wenn es um die Durchführung meiner Experimente ging.

Florian Ewald möchte ich danken, weil er mich in der Zeit vor allem seelisch unterstützt hat und nie ungehalten war, wenn ich erst spät nach Hause kam.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich in allem, was ich mir vorgenommen habe, ohne Ressentiment unterstützt haben, sei es seelisch oder auch finanziell. Daher möchte ich diese Arbeit ihnen widmen.

8.4 Lebenslauf

<u>Name:</u>	Clarissa Viola Precht
<u>Geboren am:</u>	31.03.1985 in Hamburg
<u>Eltern:</u>	Vater: Dr. Ulrich Precht (Zahnarzt) Mutter: Dr. Kirsten Keutken-Precht (FÄ für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie)
<u>Ausbildung:</u>	
08/1990 - 06/1995	Vor- und Grundschule Tornquiststraße
08/1995 - 06/2004	Kaiser-Friedrich-Ufer-Gymnasium
06/2004	Allgemeine Hochschulreife
10/2004 - 10/2010	Humanmedizinstudium in Hamburg
08/2006	1. Ärztliche Vorprüfung
10-11/2010	Ärztliche Prüfung/ Approbation
10/2010	Beginn des Zahnmedizinstudiums in Hamburg
01/2011	Weiterbildungsassistentin zum Facharzt für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
<u>Publikation:</u>	Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D. Metzner A, Precht C , Fehse B, Fiedler W, Stocking C, Günther A, Mayr GW, Jücker M. <i>Gene Ther.</i> 2009 Apr; 16 (4):570-3.

Hamburg, den 27.02.2012

8.5 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: