

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Onkologie, Hämatologie, Knochenmarkstransplantation mit Sektion Pneumologie

Onkologisches Zentrum

Hubertus Wald Tumorzentrum – Universitäres Cancer Center Hamburg

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Carsten Bokemeyer.

**Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf das ErbB3-  
Receptor Binding Protein1 (Ebp1) in der CML**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Mirja Rieke Bernhardt aus Neumünster

2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 10.10.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tim Brümmendorf

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Rutkowski

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Judith Dierlamm

**Für meine Familie**



**Inhaltsverzeichnis:**

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	V
1.	Fragestellung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Chronisch Myeloische Leukämie	2
2.1.1	Definition	2
2.1.2	Geschichte der CML	2
2.1.3	Epidemiologie und Ätiologie	3
2.1.4	Natürlicher Krankheitsverlauf	3
2.1.4.1	Die chronische Phase	4
2.1.4.2	Die Akzelerationsphase	4
2.1.4.3	Die Blastenkrise	5
2.1.5	Diagnostik	5
2.1.6	Das Philadelphia Chromosom und das bcr-abl Onkogen	6
2.1.6.1	Das Philadelphia Chromosom	6
2.1.6.2	Das bcr-abl Onkogen	7
2.1.6.3	Die BCR-ABL Signaltransduktion	8
2.1.7	Therapie der CML	9
2.1.7.1	Therapieziele	9
2.1.7.2	Wirkstoffe .	9
2.1.7.3	Wirkmechanismus von Imatinib	10
2.1.7.4	Wirkmechanismus von Imatinib in der	11
2.1.8	Probleme in der Therapie der CML	12
2.2	Das ErbB3 binding protein (Ebp1)	14
2.2.1	Vorkommen	15
2.2.2	Struktur	15
2.2.3	Funktionen	17
2.2.4	Isoformen von Ebp1	19
2.2.5	Interaktionen mit ErbB3	21
2.3	Die ErbB-Rezeptoren	22
2.3.1	Struktur und Funktion	23
2.3.2	Signaltransduktion	24
2.3.3	Die verschiedenen ErbB Rezeptoren .	26
2.3.3.1	EGFR (ErbB1, Her1)	26
2.3.3.2	ErbB2 (Her2neu)	27
2.3.3.3	ErbB3 (Her3)	28
2.3.3.4	ErbB4	29

3.	Material und Methoden	30
3.1	Material	30
3.1.1	Medien, Lösungen und Chemikalien	30
3.1.2	Puffer	33
3.1.3	Antikörper	35
3.1.3.1	Primärantikörper	35
3.1.3.2	Sekundärantikörper	36
3.1.4	Marker, Protein- und Nucleotideleiter	36
3.1.5	Zellen	37
3.1.5.1	K562	37
3.1.5.2	HL60	37
3.1.5.3	BV-173	37
3.1.5.4	Ba/F3	37
3.1.5.5	Ba/F3 - p210	38
3.1.5.6	Ba/F3 - T315I	38
3.1.5.7	Ba/F3 - M351T	38
3.1.5.8	Ba/F3 - E255K	38
3.1.5.9	LAMA-84	38
3.1.5.10	MEG-01	39
3.1.5.11	KYO-1	39
3.1.5.12	KCL-22	39
3.1.5.13	JURL-MK1	39
3.1.5.14	EM-2	39
3.1.6	Restriktionsenzyme und Puffer	40
3.1.7	Vektoren	40
3.1.8	Kits	40
3.1.9	Primer .	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Zellkultur	42
3.2.1.1	Auftauen von Zellen	42
3.2.1.2	Zellen kultivieren	42
3.2.1.3	Zellen zählen	42
3.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl mit dem Vi-Cell XR 2.03	43
3.2.1.5	Zellen einfrieren	43
3.2.1.6	Transfektion mittels Elektroporation	43
3.2.1.7	Stabile Transfektion	44
3.2.1.8	Zellen vorbereiten zum Sorten (Sortieren)	44
3.2.1.9	Cytospins	44
3.2.2	Proliferationsversuche	45
3.2.2.1	Proliferationsassay	45
3.2.2.2	MTT-Zytotoxizitätsassay	45
3.2.3	Durchflusszytometrie	46
3.2.3.1	Fixieren und Permeabilisieren von Zellen	46
3.2.3.2	Antikörperfärbung	46
3.2.4	Arbeiten mit DNA	47
3.2.4.1	Animpfen für Maxi Preps	47
3.2.4.2	Animpfen für Mini Preps .	47

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.4.3	DNA-Isolierung (Mini Prep)	48
3.2.4.4	DNA-Isolierung (Maxi Prep) mittels eines Kits der Firma Qiagen	48
3.2.4.5	Elution der DNA aus Whatman Papier	49
3.2.4.6	Elution von DNA-Banden aus einem Agarosegel	49
3.2.4.7	Konzentrationsmessung mit dem NanoDrop	50
3.2.4.8	Messung der DNA-Konzentration	50
3.2.4.9	Agarosegelelektrophorese	50
3.2.5	Arbeiten mit RNA	50
3.2.5.1	RNA-Isolierung mit Qiagen RNeasy Mini Kit	50
3.2.5.2	RNA-Isolierung mit Qiagen RNeasy plus Kit	51
3.2.5.3	RNA-Isolierung mittels Trizol	51
3.2.5.4	DNase-Verdau der RNA	52
3.2.5.5	Doppelter DNase-Verdau	53
3.2.5.6	Konzentrationsmessung RNA	53
3.2.5.7	Überprüfung der Reinheit von RNA	53
3.2.5.8	First Strand cDNA-Synthese	53
3.2.5.9	Konzentrationsmessung der cDNA	54
3.2.5.10	PCR	54
3.2.6	Arbeiten mit Bakterien	55
3.2.6.1	Restriktionsverdau	55
3.2.6.2	Transformation kompetenter Bakterien	55
3.2.7	Proteinbiochemie	56
3.2.7.1	Herstellung von Zelllysaten in Urea-Puffer	56
3.2.7.2	Herstellung von Zelllysaten in 150mM-Lysispuffer	56
3.2.7.3	BCA-Proteinassay	56
3.2.7.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford Protokoll	57
3.2.7.5	SDS-PAGE	58
3.2.7.6	Mini-2D-Gele	59
3.2.7.7	Western Blot	60
3.2.7.8	Semi Dry Blot	61
3.2.7.9	Coomassie-Färbung	62
3.2.7.10	Membrane-Stripping	62
3.2.7.11	Zellfraktionierung mit verschiedenen Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen	62
3.2.7.12	Zellfraktionierung: Isolierung von Zellkernen über einen Saccharosegradienten	63
3.2.8	Verwendete Statistik	63
4.	Ergebnisse	64
4.1	Ebp1 wird von verschiedenen humanen und murinen leukämischen Zelllinien exprimiert	65
4.1.1	Northern Blot Expressionsanalyse	65
4.1.2	Expressionsanalyse mittels RT-PCR	67
4.1.3	Western Blot Expressionsanalyse	69
4.1.4	Expressionsanalyse mit Hilfe von Mini 2D-Gelen	71
4.1.5	Durchflusszytometrische Expressionsanalyse	73

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2	Vorkommen von ErbB-Rezeptoren in leukämischen Zellen .	79
4.2.1	mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR	79
4.3	Nachweis von Ebp1 in humanem Patientenmaterial	82
4.3.1	mRNA-Expressionsanalyse in mononukleären Zellen mittels RT-PCR	82
4.3.2	mRNA-Expressionsanalyse in CD34 <sup>+</sup> -Zellen mittels RT-PCR	83
4.4	Nachweis von ErbB-Rezeptoren in humanem Patientenmaterial	86
4.4.1	RT-PCR Expressionsanalyse in mononukleären Zellen	86
4.4.2	Expressionsanalyse in CD 34 <sup>+</sup> Zellen mittels RT-PCR	86
4.5	Ebp1 ist in K562-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert	89
4.5.1	SDS-PAGE und Western Blot Analyse	89
4.5.2	Analyse mit Hilfe von 2D-Gelen	90
4.6	Die Ebp1-Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in K562-Zellen	91
4.6.1	DNA-Isolierung und Transfektion der unterschiedlichen Ebp1-Isoformen	91
4.6.2	Proliferationsassay	92
4.6.3	Zytotoxizitätsassay (MTT)	94
4.6.4	Einfluss einer BCR-ABL-Inhibition auf die zelluläre Lokalisation der Ebp1-Isoformen	96
5.	Diskussion	100
5.1	Ebp1 existiert in CML-Zelllinien und wird differentiell exprimiert	100
5.2	ErbB-Rezeptoren in hämatopoetischen Zellen	103
5.3	Verhalten der Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 in K562-Zellen	107
5.4	Zelluläre Lokalisation von Ebp1	110
5.5	Ausblick	111
6.	Zusammenfassung	113
7.	Literaturverzeichnis	115
8.	Anhang	126
	Lebenslauf	126
	Erklärung	127
	Publikationen	128
	Herstellerfirmen	129
	Geräte	131
	Verbrauchsmaterial	132
	PCR-Programme	135
	Danksagung	136

## II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABL	Abelson Tyrosinkinase
Akt	Proteinkinase B
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ALP	alkalische Leukozytenphosphatase
AML	Akute Myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AP	Akzelerierte Phase bei der CML
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATP	im genetischen Code: Methionin
B23	Nucleophosmin
B-ALL	B-lymphozytäre akute lymphatische Leukämie
BC	Blastenkrise ( <i>blast crisis</i> ) bei der CML
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
BCR-ABL	Philadelphia-Chromosom (t(9;22))
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cbl	E3 Ubiquitin Ligase
CCR	<i>complete cytogenetic response</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CK	Kreatinkinase
c-kit	KIT, CD117 oder Stammzellfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase)
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie

## Abkürzungsverzeichnis

---

CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMR	<i>complete molecular response</i>
Corp.	<i>Corporation</i>
CP	Chronische Phase bei der CML
CR	<i>cytogenetic response</i>
CrkL	<i>CRK-like protein</i>
d	Tag
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen GmbH
E2F	ein Transkriptionsfaktor
Ebp1	ErbB 3 <i>binding protein</i> 1
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
eiF	<i>eukaryotic translation initiation factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
F	<i>Forward (Primer)</i>
FAB	<i>French American British</i> , Klassifizierung der AML
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung ( <i>gravity</i> ), Gramm
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

GIST	gastrointestinaler Stromatumor
h	Stunde
HB-EGF	<i>Heparin-binding Epidermal Growth Factor</i>
HCl	Salzsäure
HR	<i>hematological response</i>
HRG	Heregulin (ein Wachstumsfaktor)
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
IM	Imatinib
JAK	Januskinase
K	Aminosäure Lysin
k	Kilo
Kac	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KMT	Knochenmarkstransplantation
l	Liter
LAR	<i>Luciferase Assay Reagent</i>
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
med.	<i>medicinae</i>
min	Minute
MNC	mononukleäre Zellen
MR	<i>molecular response</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol
Na	Natrium
Na-Acetat	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information (USA)</i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i> , Nervenwachstumsfaktor
NRG	Neuregulin (ein Wachstumsfaktor)
nm	Nanometer

## Abkürzungsverzeichnis

---

NP-40	Nonidet P-40
NPM	Nucleophosmin, auch B23
NSCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom ( <i>non-small cell lung cancer</i> )
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
P	pico-
P/S	Penicillin/Streptomycin
p53	ein Tumorsuppressorgen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	p21 aktivierte Ser/Thr Kinase
PCR	<i>partial cytogenetic response</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Ph <sup>+</sup>	Philadelphia-Chromosom-positiv
PI3	Phosphatidylinositol 3 oder Phosphoinositid 3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKR	<i>dsRNA-aktiviert protein kinase</i>
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
R	Reverse
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RAF	<i>rapidly growing fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma</i>
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
rer. nat.	<i>rerum naturalium</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RNP	Ribonukleoprotein (Protein, welches RNA enthält)
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Svedberg Einheit (bei Ribosomen), Sedimentationskoeffizient
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
Ser	Serin (Aminosäure)

## Abkürzungsverzeichnis

---

sog.	sogenannte/r
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STI 571	Imatinib
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyl-ethylendiamin
TGF- $\alpha$	transformierender Wachstumsfaktor ( <i>Transforming growth factor</i> ) $\alpha$
Thr	Threonin (Aminosäure)
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TLS	<i>Translocation in liposarcoma</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Tyr	Tyrosin
u oder U	<i>unit</i>
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volume/Volume
Vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
w/v	<i>Weight/Volume</i>
WR	<i>Working Reagent</i>
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Alpha
$\sigma$	Delta
$\mu$	Mikro

### 1. Fragestellung

Bei Voruntersuchungen zur Analyse des Protein-Expressionsmusters von BCR-ABL-positiven humanen K562-Zellen, welche mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt wurden, konnte die differenzielle Expression des ErbB3 bindenden Proteins Ebp1 nachgewiesen werden<sup>9</sup>. Die Expression von Ebp1 nahm bei der Behandlung mit diesem Tyrosinkinaseinhibitor ab.

Ebp1 ist in die Unterdrückung von Apoptose, in Zellproliferation sowie Differenzierungsvorgänge involviert. Dieses Protein bildet zwei verschiedene Isoformen. Die längere Form Ebp1-p48 unterdrückt Apoptose, wohingegen die kürzere Form Ebp1-p42 für die Steuerung der Zelldifferenzierung verantwortlich gemacht wird.

In dieser medizinischen Dissertationsarbeit sollen detailliert die Effekte von Imatinib auf das Protein Ebp1 in unterschiedlichen leukämischen Zellen untersucht werden.

*Für die hier vorliegende Arbeit ergeben sich daraus folgende Fragestellungen:*

- 1.) Wird das ErbB3 bindende Protein Ebp1 in unterschiedlichen leukämischen Zelllinien sowie in Primärmaterial (Blut von CML- und AML-Patienten und CD34<sup>+</sup>-Zellen) exprimiert?
- 2.) Lassen sich Unterschiede in der Expression von Ebp1 bei Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib darstellen?
- 3.) Werden die epidermalen Wachstumsfaktoren (ErbB1-4) ebenfalls in verschiedenen leukämischen Zelllinien sowie in Primärmaterial exprimiert?
- 4.) Lassen sich Unterschiede in der Expression der ErbB-Rezeptoren bei Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib darstellen?
- 5.) In welchem Zellkompartiment / welchen Zellkompartimenten ist Ebp1 detektierbar?
- 6.) In welchem Zellkompartiment treten die Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 in stabil transfizierten K562-Zellen auf, und gibt es Unterschiede zwischen mit Imatinib behandelten und unbehandelten transfizierten Zellen?

Die Bearbeitung dieser unterschiedlichen Fragestellungen dient der Suche nach möglichen neuen Zielstrukturen in der Therapie der CML, da die Entstehung von Resistenzen ein großes Problem im Verlauf dieser Erkrankung darstellt.

## 2. Einleitung

Leukämien repräsentieren mit einer Inzidenz von zwei bis acht Erkrankungen auf 100.000 Einwohner ein relativ häufiges Krankheitsbild. Aus diesem Grund ist es extrem wichtig, potente Therapieformen zu etablieren, welche ein längerfristiges Überleben der betroffenen Patienten oder eine vollständige Heilung zur Folge haben. Somit ist die medizinische Forschung stetig auf der Suche nach neuen therapeutischen Ansatzpunkten für eine effektive Therapie der unterschiedlichen Leukämieformen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach therapeutisch relevanten Zielstrukturen in der Chronisch Myeloischen Leukämie und deckt mögliche neue Ansatzpunkte auf.

### 2.1 Chronisch Myeloische Leukämie (CML)

#### 2.1.1 Definition

Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) handelt es sich um eine klonale Erkrankung der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, bei der es zu einer unkontrollierten Proliferation der myeloischen Zellen kommt<sup>109, 121</sup>. Die Differenzierungsfähigkeit dieser veränderten Stammzellen bleibt erhalten. Das Krankheitsbild der CML zählt definitionsgemäß zu den Myeloproliferativen Syndromen.

#### 2.1.2 Geschichte der CML

Das Krankheitsbild der Chronisch Myeloischen Leukämie wurde erstmals im Jahre 1845 von Virchow und Benett dokumentiert<sup>174</sup>. Doktor Virchow gebrauchte hierfür die Bezeichnung „Weißes Blut“ und beschrieb die charakteristische Morphologie einer linksverschobenen Myelopoese an einem ungefärbten Präparat.

Im Jahre 1870 erkannte Neumann, dass die beschriebenen Leukozyten aus dem Knochenmark stammen, und stellte die These auf, dass die CML auf einer Granulozytenüberproduktion beruhe<sup>118</sup>. Nowell und Hungerford fanden 1960 heraus, dass dem Pathomechanismus der Erkrankung ein spezifischer chromosomaler Defekt in den leukämischen Zellen zugrunde liegt. Dieser chromosomale Defekt wurde nach dem Ort seiner Entdeckung Philadelphia Chromosom (Ph) genannt<sup>119</sup>. Durch die Anwendung einer Bänderungs-Technik konnte Janet Rowley 1973 beweisen, dass das Philadelphia Chromosomen auf einer Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 beruht<sup>140</sup>. Mitte der 1980er Jahre konnte auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, dass bei der t(9;22) das zelluläre Onkogen *abl* (*c-abl*)<sup>11</sup> des Chromosoms 9 in die Bruchpunktregion *bcr* (*breakpoint cluster region*)<sup>63</sup> auf das Chromosom 22 transloziert wird. Im Jahr 1986

konnte das 210 kDa große BCR-ABL-Protein als Produkt des bcr-abl-Gens nachgewiesen werden. Seine pathogenetische Rolle<sup>105</sup> bei der Entstehung der CML konnte sowohl durch und *in-vitro* Transfektions- und *in-vivo* Transplantationsmodelle, als auch durch die Wirkung des ABL-Inhibitors STI571 bestätigt werden<sup>39</sup> und wird nachfolgend beschrieben.

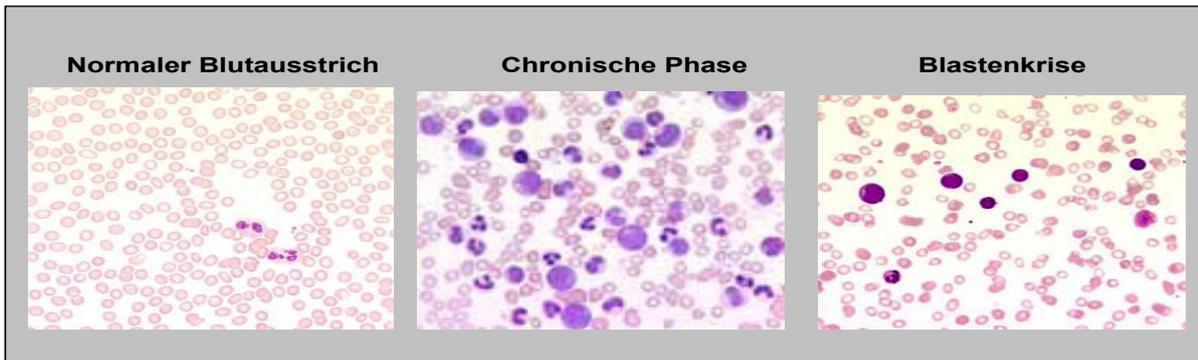
### 2.1.3 Epidemiologie und Ätiologie

Bei der CML handelt es sich um die zweithäufigste Form der chronischen Leukämien. Die Inzidenz der CML beträgt ohne geographische Variationen weltweit etwa 1,6 Neuerkrankungen pro 100 000 Erwachsene im Jahr und hat einen Anteil von 20% an allen Leukämien<sup>54, 94</sup>. Männer sind in der Regel häufiger betroffen als Frauen. Das mediane Alter bei Diagnosestellung liegt bei 55 Jahren. Nur ein kleiner Anteil von etwa zehn Prozent der Patienten erkrankt vor dem zwanzigsten Lebensjahr<sup>148</sup>.

Die CML basiert auf einem genetischen Defekt auf Ebene der Stammzellen. Es kommt zu Veränderungen einer solitären pluripotenten Stammzelle, die durch diesen Defekt hohe Proliferationsraten aufweist. Innerhalb der Stammzelle kommt es zu einer reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)). Ursächlich dafür können ionisierende Strahlen (Atombombenabwurf in Hiroshima<sup>80, 81, 132</sup>, Röntgen- und Gammastrahlung<sup>19, 34</sup>) oder eine Exposition gegenüber Benzol<sup>37</sup> sein. In der Mehrzahl der Fälle ist die Ätiologie jedoch unbekannt<sup>53</sup>. Nur in etwa fünf Prozent der Chronisch Myeloischen Leukämien tritt diese t(9;22)-Translokation nicht auf.

### 2.1.4 Natürlicher Krankheitsverlauf

In der Chronisch Myeloischen Leukämie gibt es drei verschiedene Krankheitsphasen (siehe Abbildung 1), die aufeinander folgen. Es handelt sich dabei um die chronische Phase, die Akzelerationsphase und die Blastenkrise (auch Blastenschub genannt). Die Blastenkrise stellt das Endstadium der Erkrankung dar. Seit Einführung neuer Therapieansätze mit Tyrosinkinaseinhibitoren in der chronischen Phase sind Blastenkrisen seltener geworden.



**Abbildung 1:** Blutausstrich eines gesunden Probanden (Normal) und eines Patienten mit CML in der Chronischen Phase (CP) sowie in der Blastenkrise (BC) (Med. Uniklinik Tübingen)

#### 2.1.4.1 Die chronische Phase

Die chronische Phase der CML zeichnet sich durch einen sehr schleichenden Krankheitsverlauf über mehrere Jahre aus und wird oftmals als Zufallsbefund im Rahmen von Routineuntersuchungen<sup>133</sup> diagnostiziert. Kennzeichnende Leitsymptome dieser Phase sind eine Leukozytose im Blutbild und eine stark vergrößerte Milz (Splénomegalie), die sich durch eine extrazelluläre Blutbildung erklären lässt. Auch die Leber kann pathologisch vergrößert sein.

Ein sehr typisches Charakteristikum der CP stellen eine Vermehrung der Zellen der myeloischen Reihe aller Differenzierungsstufen sowie oftmals eine deutliche Steigerung der Thrombopoese dar. Während eine Beteiligung der B-lymphozytären Reihe häufiger vorkommt, wird die Beteiligung der T-lymphozytären Reihe von Brümmendorf et al. kontrovers diskutiert<sup>22</sup>.

#### 2.1.4.2 Die Akzelerationsphase

Nach etwa vier bis sechs Jahren (bei prognostisch günstigen Verläufen auch nach acht bis zehn Jahren) kommt es zur Progression der Erkrankung: Die Patienten befinden sich in der sogenannten Akzelerationsphase, welche den Übergang zwischen chronischer Phase und Blastenkrise darstellt. Diese Phase zeichnet sich durch eine weiter zunehmende Leukozytose, eine stärkere Splénomegalie und zudem weitere Blutbildveränderungen aus. Das Blutbild zeigt zu diesem Zeitpunkt auch Zeichen einer Anämie (Hämoglobinabfall) und eine Verringerung der Thrombozytenzahl.

Im Differentialblutbild liegt der Blastenanteil zwischen zehn und 30 Prozent. Zusätzlich treten neben dem Philadelphia Chromosomen weitere zytogenetische chromosomale Aberrationen auf, wie beispielsweise das Isochromosom 17 oder eine Trisomie der Chromosomen 8 oder

19. Der Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert sich, therapeutische Dosissteigerungen werden notwendig

### **2.1.4.3 Die Blastenkrise**

Die Blastenkrise kann sich der Akzelerationsphase anschließen oder direkt aus der chronischen Phase hervorgehen<sup>135</sup>. Die Erkrankung imponiert nun in ihrem Verlauf eher wie eine akute Leukämie mit einer massiven Proliferation von unreifen, funktionslosen Leukozyten. Bei etwa zwei Dritteln der Patienten sind die Blasten myeloblastisch oder undifferenziert, bei einem Drittel haben sie einen lymphatischen Phänotyp<sup>61</sup>.

Der Blastenanteil im peripheren Blut und/oder im Knochenmark ist größer als 30 Prozent. Es befindet sich zudem zytologisch oder histologisch gesichert eine blastäre Infiltration außerhalb von Knochenmark, Lymphknoten oder Milz. Wird der Patient in diesem CML-Stadium nicht behandelt, führt die Blastenkrise innerhalb weniger Wochen zum Tod<sup>148</sup>. Im Median liegt die Dauer der Blastenkrise unter Chemotherapie zwischen drei und sechs Monaten<sup>43, 141</sup>. Auch der therapeutische Einsatz von Imatinib kann die mittlere Überlebenszeit nur auf etwa neun Monate steigern<sup>147</sup>.

Es treten in dieser Phase zudem weitere zytogenetische Veränderungen wie Mutationen und/oder Deletionen bei p53/mdm-2, Rb-1 oder ras auf<sup>26</sup>, welche einen möglichen Grund für die Transition in die Blastenkrise darstellen.

### **2.1.5 Diagnostik**

Verschiedene diagnostische Verfahren ermöglichen es, das Vorliegen einer Chronisch Myeloischen Leukämie aufzudecken. Schon bei der körperlichen Untersuchung der Patienten können neben einer Splenomegalie auch eine periphere Lymphadenopathie sowie Chlorome auffällig werden. Die Diagnose der CML wird meist mittels der Knochenmarkpunktion gestellt. Typischerweise finden sich im Knochenmark eine gesteigerte Megakaryopoese, Erythropoese und Myelopoese. Man spricht beim Knochenmarksausstrich in diesem Fall von einem bunten Bild mit pathologischer Linksverschiebung. Es kommt zudem zu qualitativen und quantitativen Veränderungen der Zellen, zu erkennen am Auftreten von Mikromegakaryozyten oder einer Vermehrung von basophilen oder eosinophilen Zellen.

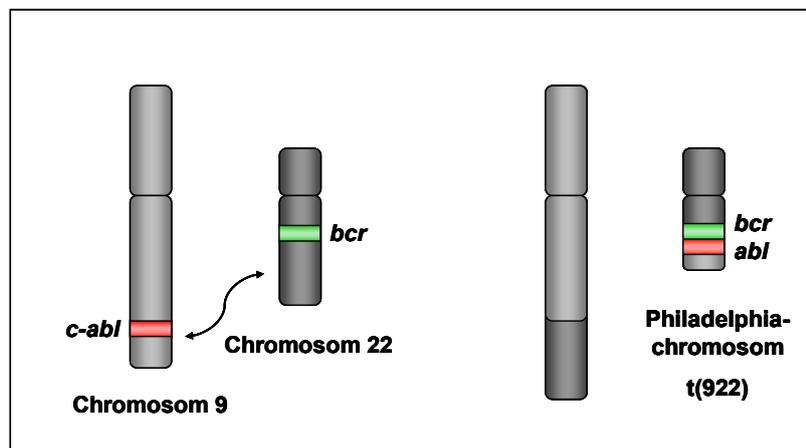
Im Blutbild imponiert bei einem Drittel der Patienten eine Thrombozytose, welche mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen einhergeht. Des Weiteren findet man eine Neutrophilie mit vielen eosinophilen und basophilen Zellen. Auch kann es zu einer leichten Anämie kommen. Ein erhöhter Laktatdehydrogenasewert (LDH) kennzeichnet ebenso wie ein erhöhter Harnsäuregehalt den Zellzerfall.

Zytogenetisch sind Philadelphia Chromosomen (in 95% der Fälle) und/oder das bcr-abl-Onkogen beweisend für die Erkrankung an CML. Ist keine t(9,22)-Translokation nachweisbar, verschlechtert sich die Prognose für die Patienten. Zytochemisch kann die alkalische Leukozytenphosphatase (ALP) erniedrigt sein.

## 2.1.6 Das Philadelphia Chromosom und das bcr-abl Onkogen

### 2.1.6.1 Das Philadelphia Chromosom

Die CML zeichnet sich im Vergleich zu anderen Leukämien durch eine spezifische, zytogenetische Anomalität – das sogenannte Philadelphia Chromosom (Ph<sup>+</sup>) - aus. Ursächlich für die Entstehung des Philadelphia Chromosoms ist eine reziproke Translokation t(9;22) zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22<sup>145</sup>. Der Chromosomenbruch liegt auf beiden Chromosomen jeweils im Bereich von Genen, die bei der zellulären Wachstumsregulation entscheidend sind. Diese Translokation führt zur Kopplung des bcr-Gens („breakpoint cluster region“) auf Chromosom 22 mit dem Gen für die Tyrosinkinase ABL (Abelson-Leukämievirus-ähnliche Tyrosinkinase) auf Chromosom 9, die bei der zellulären Wachstumsregulation eine wichtige Rolle spielt. Dabei entsteht das neue bcr-abl-Fusionsgen (siehe Abb. 2), welches für die Expression eines spezifischen Proteins, der konstitutiv aktiven Tyrosinkinase BCR-ABL, verantwortlich ist.



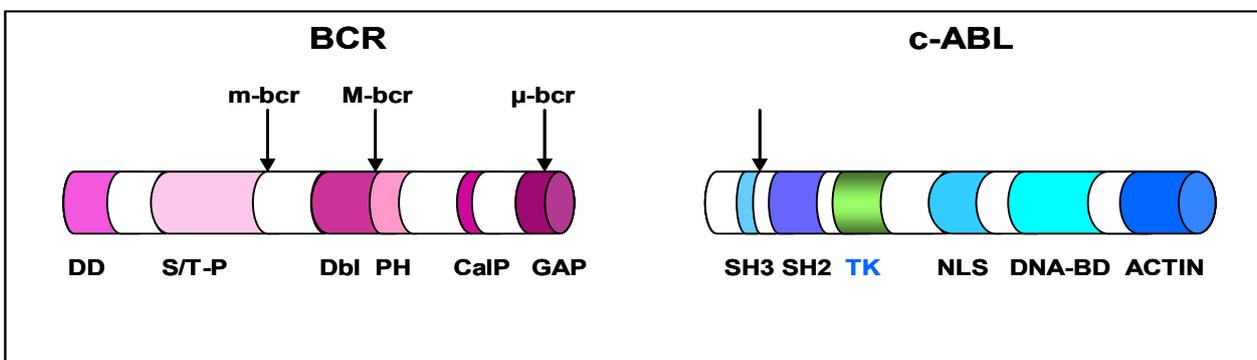
**Abbildung 2:** Philadelphia Chromosomen: Die Translokation der Chromosomen 9 und 22 führt zur Fusion der resultieren Bruchstücke. Das auf diese Art und Weise entstehende Philadelphia Chromosom exprimiert die abnorme Tyrosinkinase BCR-ABL, welche für die exzessive Vermehrung der leukämischen Zellen verantwortlich ist (Abb. In Anlehnung an Uni-med, A. Hochhaus, Chronische myeloische Leukämie, Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie, 2. Auflage, Seite 20)

### 2.1.6.2 Das bcr-abl Onkogen

Je nach Lage der Bruch- und Rekombinationsstellen der beteiligten Genabschnitte können drei verschiedene Fusionsproteine entstehen, die unterschiedliche Größen aufweisen. Diese Fusionsproteine werden entsprechend ihrem Molekulargewicht eingeteilt. Bei den an Chronisch Myeloischer Leukämie und bei einem Drittel der an Philadelphia Chromosom positiver (Ph+) Akuter Lymphatischer Leukämie (ALL) erkrankten Patienten überwiegt die Expression des Fusionsproteins p210, welches zumeist auf einer b2a2- oder b3a2-Fusion beruht. Der Bruchpunkt in bcr wird in diesem Fall „*major breakpoint cluster region*“ (M-bcr, vgl. Abb. 3) genannt. Das BCR-ABL p210-Fusionsprotein stimuliert durch die veränderte Tyrosinkinase-Aktivität die unkontrollierte Proliferation der betroffenen hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark und trägt somit ausschlaggebend zur Entstehung der CML bei <sup>41</sup>.

Nicht nur in der engen Korrelation zwischen dem Nachweis dieser BCR-ABL-Translokation und dem klinischen Bild einer CML wird die zentrale Bedeutung von BCR-ABL für die Entstehung der chronischen Phase der CML ersichtlich, sondern auch durch Transfektionsexperimente *in-vitro* <sup>38</sup> oder durch Transplantationsexperimente mit murinen BCR-ABL transfizierten Knochenmarkzellen in verschiedenen Tierexperimenten <sup>39</sup>.

Aufgrund der Tatsache, dass die Tyrosinkinaseaktivität von ABL dauerhaft aktiviert ist und die betroffenen Zellen unkontrolliert proliferieren können, führt die Fusion von BCR und ABL durch permanente Signaltransduktion zum einen zu einer Steigerung der Zellwachstumsrate, zum anderen wirkt sie anti-apoptotisch und bewirkt zudem eine Veränderung der adhäsiven Eigenschaften der hämatopoetischen Zellen gegenüber dem Knochenmarkstroma. Als Folge dessen lässt sich bei Diagnosestellung bzw. im unbehandelten Zustand der CML eine deutlich erhöhte Zahl unreifer myeloischer Zellen in Knochenmark und Blut der Patienten nachweisen <sup>41</sup>. Auch kann das Fusionsprotein BCR-ABL nicht mehr wie cABL in den Kern translozieren, sondern verbleibt im Zytoplasma <sup>173</sup>.



**Abbildung 3:** Das BCR-Gen (linke Seite) und das c-ABL-Gen (rechte Seite) (Abbildung in Anlehnung an <sup>41</sup>)

### 2.1.6.3 Die BCR-ABL Signaltransduktion

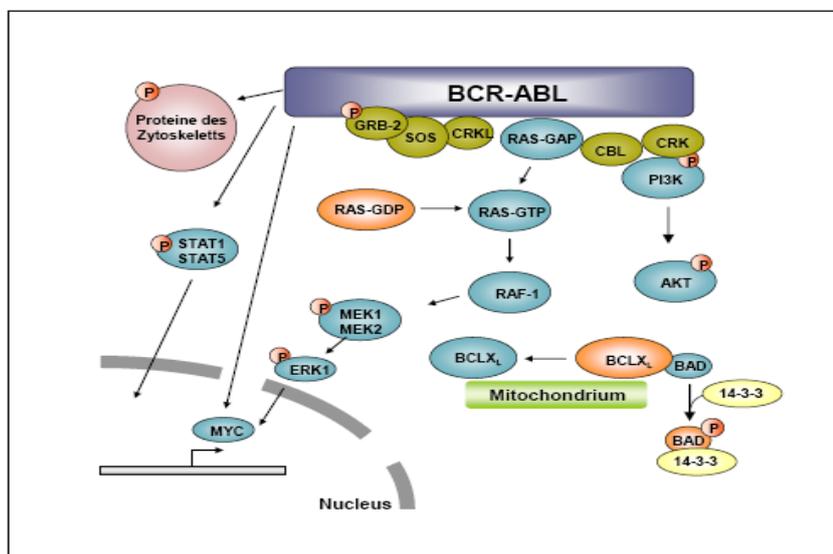
Am Anfang der Signaltransduktionskaskade steht die Phosphorylierung durch BCR-ABL. Davon ausgehend werden durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Interaktionspartnern die onkogenen Signale weitergeleitet. Somit kann das Fusionsprotein beispielsweise die mitochondriale Prozessierung von apoptotischen Signalen oder die Organisation des Zytoskeletts kontrollieren.

Für die Phosphorylierung zellulärer Substrate benötigt BCR-ABL die Bindung mit Adaptorproteinen, wie beispielsweise CRKL (*CRK-like Protein*) oder GRB-2 (*Growth-factor-receptor binding protein 2*)<sup>54</sup>, mit denen es Komplexe bildet.

Die wichtigsten *Downstreamtargets* in der Signalgebung (vgl. Abb. 4) von BCR-ABL sind beispielsweise STAT-Proteine (= *signal transducer and activator of transcription*), die anti-apoptotische Signale auslösen sowie der RAS/MAP-Signalweg und die Phosphatidylinositol-3-kinase (*PI-3 kinase*), welche beide durch BCR-ABL aktiviert werden.

Zusätzlich werden von BCR-ABL Adhäsionsproteine wie Paxillin oder FAK phosphoryliert, wodurch sich das Adhäsionsverhalten der betroffenen Zellen verändert und diese dadurch ins periphere Blut freigesetzt werden<sup>59, 142</sup>.

Des Weiteren kann BCR-ABL auch unabhängig von den bereits beschriebenen Signalwegen die Überexpression von c-myc induzieren, was eine Transformation von Fibroblasten zur Folge hat<sup>145, 146</sup>.



**Abbildung 4:** Signaltransduktionswege von BCR-ABL: Das durch das Philadelphia-Chromosom entstandene Fusionsprotein BCR-ABL ist für die Aktivierung einer Vielzahl von Signalkaskaden verantwortlich, die zur leukämischen Transformation der hämatopoetischen Stammzelle führen (Abbildung in Anlehnung an<sup>41</sup>).

### 2.1.7 Therapie der CML

#### 2.1.7.1 Therapieziele

Das Hauptziel der Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie beinhaltet die Stabilisierung des Blutbildes, das Erreichen eines hämatologischen (*hematological response* = HR), eines zytogenetischen (*cytogenetic response* = CR) und auch eines molekularen Ansprechens (*molecular response* = MR) <sup>73</sup>.

Wichtige Kennzeichen eines hämatologischen Ansprechens sind neben einer Normalisierung der Leukozytenzahlen im Differentialblutbild eine Eliminierung unreifer myeloischer Blasten sowie eine Beseitigung der Krankheitssymptome mit Stabilisierung des Therapieeffektes über mindestens vier Wochen. Ein vollständiges hämatologisches Ansprechen (*complete hematological response* = CHR) ist streng definiert: Die Leukozytenzahlen müssen Werte von unter  $10 \times 10^9$  Zellen/l erreichen, und die Thrombozytenwerte sollen unterhalb von  $450 \times 10^9/l$  liegen.

Im Gegensatz dazu spricht man bei einer Verminderung oder vollständigen Eliminierung Philadelphia-positiver Zellen von einem zytogenetischen Ansprechen (CCR = *complete cytogenetic response* = vollständige Entfernung von Ph+ Zellen; Ph+0%, PCR = *partial cytogenetic response* = Anteil der Ph+ Zellen zwischen 1% und 35%).

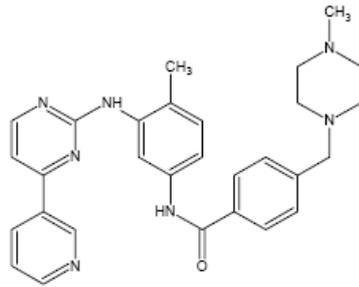
Bei der Überprüfung des molekularen Ansprechens wird die BCR-ABL mRNA mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion gemessen. Bei einem vollständigen molekularen Ansprechen (*complete molecular response* = CMR) ist das Fusionsprotein BCR-ABL nicht mehr detektierbar. Diese Überprüfung ist die sensitivste Methodik in der Beurteilung des Therapieansprechens <sup>56</sup>.

#### 2.1.7.2 Wirkstoffe

Für die Behandlung der CML stehen unterschiedliche Therapieoptionen zur Verfügung. Die einzig mögliche kurative Therapie ist auch heute noch die allogene (Geschwister- oder nichtverwandter Spender) Stammzelltransplantation. Rein zytoreduktive, jedoch nicht kurative Behandlungen werden zum einen mit Hydroxyurea (Hydroxycarbamid), welches die Umwandlung von Ribonukleotiden in Desoxyribonukleotide hemmt, oder zum anderen mit Arabinosylcytosin (Ara-C; Cytarabin) durchgeführt.

Seit seiner Einführung hat Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) eine erhebliche Bedeutung in der CML-Therapie gewonnen. Verantwortlich dafür sind das Erreichen von stabilen hämatologischen Remissionen bei etwa 70-80% der CML-Patienten, sowie teils lang andauernde komplette zytogenetische Remissionen in einem kleinen Prozentsatz der Fälle <sup>71</sup>. Interferon- $\alpha$  induziert in den Zielzellen eine Hemmung der Proliferation und steigert zudem die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen.

Die Einführung von Imatinib (Glivec®) <sup>23</sup> kann als Meilenstein in der Behandlung der CML gelten <sup>44</sup>. Bei dem Medikament Glivec® (Imatinibmesylat, auch unter der Bezeichnung STI 571 / GCP 57148 bekannt, siehe Abb. 5) handelt es sich nämlich um den ersten klinisch erprobten selektiven Tyrosinkinaseinhibitor und damit auch die erste spezifisch gezielte Krebstherapie.

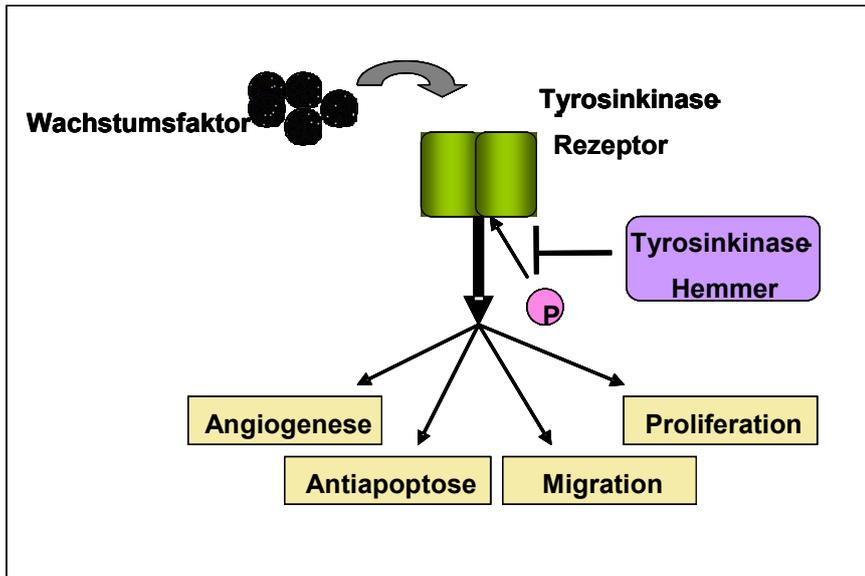


**Abbildung 5:** Chemische Struktur von Imatinib (Glivec®) (aus Produktinformation Novartis Oncology)

### 2.1.7.3 Wirkmechanismus von Imatinib

Imatinib hemmt spezifisch die BCR-ABL abhängige Signaltransduktion, indem es durch die Blockade von Tyrosinkinasen die Übertragung von Phosphatgruppen auf die Tyrosinreste anderer Substrate unterbindet. Dadurch werden zelluläre Signale, die für die Proliferation von bestimmten Tumorzellen essentiell sind, direkt beeinflusst (vgl. Abb. 6).

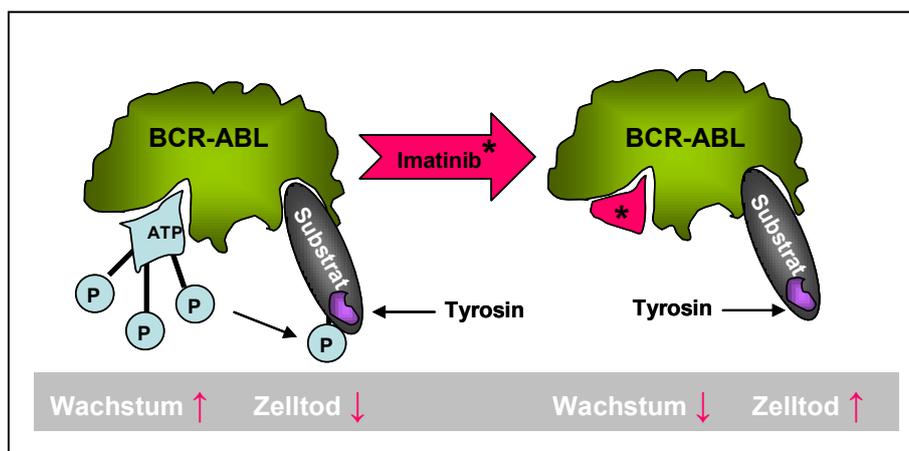
Imatinib stellt demnach einen potenten Inhibitor der Tyrosinkinase BCR-ABL dar. Weitere Zielmoleküle sind beispielsweise c-kit, welches bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) eine Rolle spielt, oder der PDGF-Rezeptor (*platelet-derived growth factor*), der bei myelodysplastischen und myeloproliferativen Erkrankungen zum Tragen kommt.



**Abbildung 6:** Wirkmechanismus von Tyrosinkinase-Inhibitoren, (Abbildung in Anlehnung an Produktinformation Glivec der Firma Novartis Oncology)

#### 2.1.7.4 Wirkmechanismus von Imatinib in der CML

Das Medikament Imatinib richtet sich direkt gegen das Fusionsprotein BCR-ABL, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, indem es kompetitiv die Bindungsstelle für ATP hemmt. Durch die Blockade dieser ATP-Bindungsstelle können keine Phosphatgruppen mehr von ATP auf die Tyrosinreste von Substraten übertragen werden, die von BCR-ABL beeinflusst werden (vgl. Abb. 7).



**Abbildung 7:** Zur Veranschaulichung der zentralen Rolle von BCR-ABL bei CML (linke Seite) sowie der zielgerichteten Hemmung von BCR-ABL durch Imatinib (rechte Seite), (Abbildung in Anlehnung an Produktinformation Glivec der Firma Novartis Oncology)

Aufgrund der inhibierten BCR-ABL abhängigen Tyrosin-Phosphorylierung findet eine verminderte Signaltransduktion innerhalb der Zelle statt, und die BCR-ABL-induzierte Zellproliferation, die für das Überleben der malignen leukämischen Zelle erforderlich ist, wird verhindert.

Das Medikament Imatinib wird als Therapie der ersten Wahl für Patienten mit einer neu diagnostizierten CML eingesetzt.

Die Patienten tolerieren dieses Medikament in der Regel gut. Typische Nebenwirkungen, die auftreten können, sind beispielsweise Übelkeit, Erbrechen, Ödemneigung oder Muskelkrämpfe. Weitere unerwünschte Wirkungen betreffen das blutbildende System, einhergehend mit einem Abfall der Anzahl von Erythrozyten, Leukozyten und der Thrombozyten im Blut<sup>44</sup>.

### **2.1.8 Probleme in der Therapie der CML**

Ein schwerwiegendes Problem in der Imatinib-Therapie ist die Entstehung von Resistenzen gegenüber Imatinib. Dem liegen die folgenden möglichen Mechanismen zugrunde: eine Überexpression des BCR-ABL-Proteins ausgelöst zum Beispiel durch die genomische Amplifikation von *bcr-abl*, eine gesteigerte Expression des P-Glykoproteins mit der Folge der Induktion einer Multi-Drug-Resistenz (MDR), eine Mutation der Tyrosinkinase-Domäne von BCR-ABL und ein gesteigerter Wirkspiegel des sauren  $\alpha$ 1-Glykoproteins mit der Konsequenz der gesteigerten Bindung von Imatinib. Sowohl die klonale Selektion von Blasten mit einer Vervielfachung des *bcr-abl*-Gens, als auch Punktmutationen, die eine Konformationsänderung der ATP-Bindungsstelle auslösen, wurden bei Patienten mit sekundärer Imatinib-Resistenz festgestellt<sup>8, 152</sup>.

Inzwischen sind erste Substanzen aus der Zweitgeneration, wie Nilotinib oder Dasatinib, in der Behandlung der CML zugelassen<sup>134</sup>. Diese sind in der Lage, BCR-ABL potenter als Imatinib zu hemmen, jedoch haben diese Moleküle keinerlei Wirkungskraft gegen die gefürchtete Mutation T315I in der ATP-Bindungsstelle von ABL. Aus diesem Grund wird aktuell intensiv in ersten klinischen Studien an Drittgenerations-TKI's geforscht, die gegen diese besondere Resistenz wirksam sind. Besonderes Augenmerk wird beispielsweise auf den Aurorakinaseinhibitor PHA-739358 und auf Ponatinib gelegt<sup>36, 57, 120</sup>.

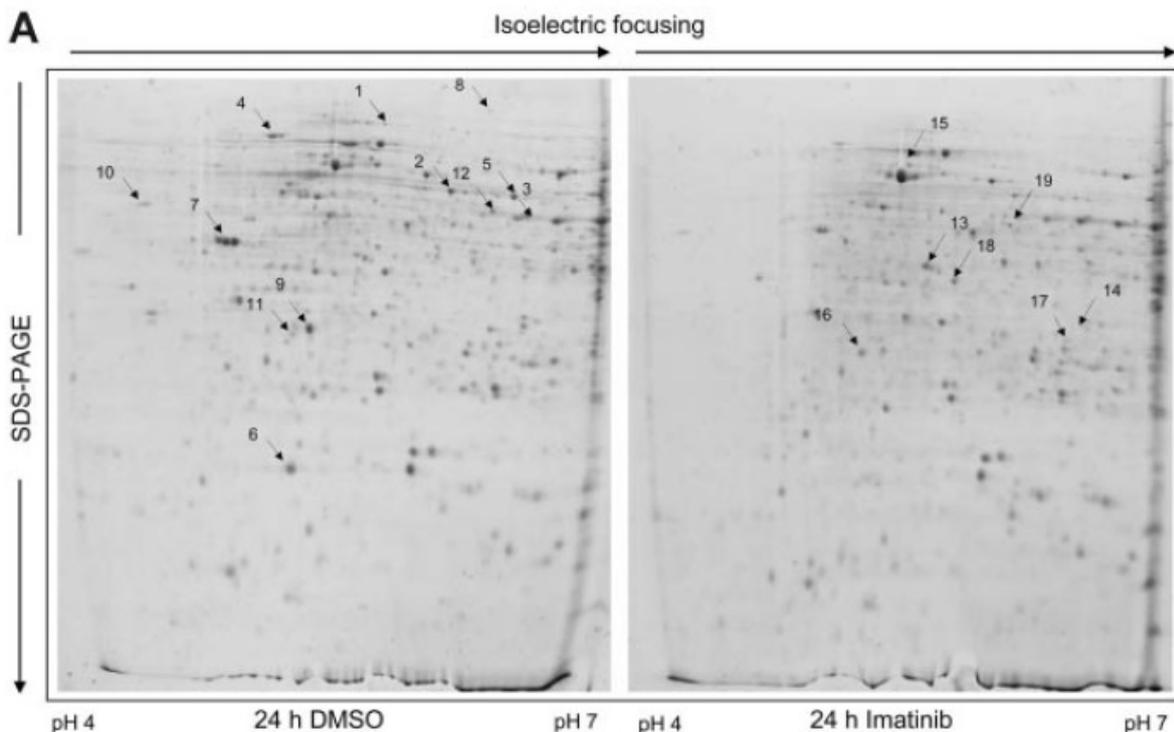
Das langfristige Ziel, welches der Behandlung der CML zugrunde gelegt werden soll, ist die Etablierung von Kombinationstherapien mit Tyrosinkinaseinhibitoren, Multi-*Target*-Substanzen oder anderen spezifischen Wirkstoffen, um durch gezieltes Angreifen an verschiedenen zellulären Zielstrukturen der Resistenzbildung entgegen wirken zu können<sup>55</sup>.

Ein weiteres Problem in der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren stellt nach der aktuellen Datenlage zudem die fehlende Eradikation der BCR-ABL-positiven pluripotenten

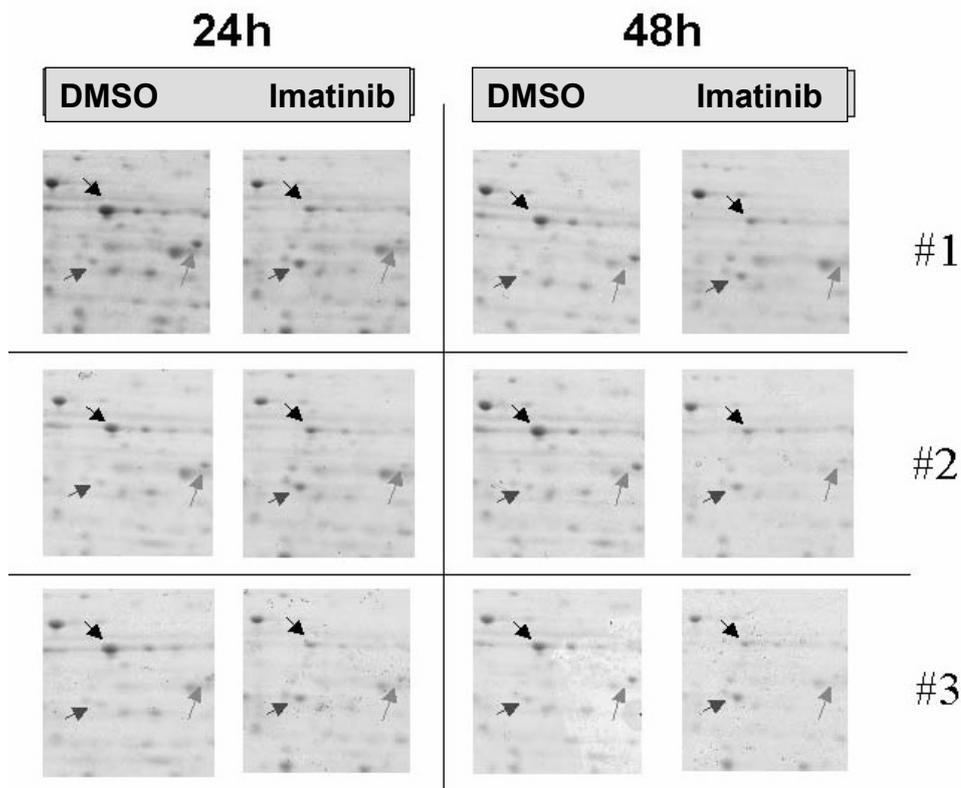
Progenitorzelle dar<sup>60</sup>. Aus diesem Grund steht die Suche nach neuen Zielstrukturen in der CML-Forschung im Fokus bei der Generierung neuer Therapieansätze.

Auf der Suche nach neuen Zielstrukturen erbrachte eine Proteinexpressionsanalyse in der CML-Zelllinie K562 von Balabanov et al. Hinweise darauf, dass es sich bei dem ErbB3 *binding protein* (Ebp1) um eine mögliche Zielstruktur handeln könnte, da dieses Protein mit einer Expressionsabnahme auf die Behandlung mit Imatinib dieser leukämischen Zelllinie reagiert<sup>9</sup>. Diese Arbeit stellt die Grundlage meiner Forschungsarbeit dar.

Die humane K562 CML-Zelllinie wurde für wahlweise 24 oder 48 Stunden mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit führte man mit den gewonnenen Proteinlysaten eine 2D-Gelelektrophorese durch. Dabei wurden die mit Imatinib behandelten Proben mit der mit DMSO behandelten Kontrolle im Proteinprofil, welches in Abbildung 8 dargestellt ist, verglichen. Mittels massenspektrometrischer Methoden konnten 19 differentiell exprimierte Proteine ermittelt werden<sup>9</sup>.



**Abbildung 8: Differentielle Expression von Proteinen in K562-Zellen unter Einfluss von Imatinib.** 2D Gelanalyse von Proteinen aus K562-Zellen: Proteinprofil von K562 Zellextrakten, die für 24 Stunden mit DMSO (links) oder 4 $\mu$ M Imatinib (rechts) behandelt wurden. Mit Pfeilen markierte Proteinspots wurden mittels MALDI-MS und ESI-MS/MS weiter charakterisiert, da sie differentiell unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor exprimiert wurden (aus<sup>9</sup>).



**Abbildung 9: Ebp1 wird unter Imatinib differentiell exprimiert.** 2D Gelanalyse von Proteinen aus K562-Zellen: Das Proteinprofil des Proteins Ebp1 im Vergleich zwischen mit DMSO behandelter Kontrolle und 24-/48-stündiger Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ( $4\mu\text{M}$ ) zeigt eine deutliche Abnahme der Protein-Expression unter Tyrosinkinase-Inhibition. Alle Pfeile zeigen das Protein Ebp1. (aus <sup>9</sup>).

Unter den zwölf im Expressionslevel herunterregulierten Proteinspots konnte zweimalig das Protein Ebp1 (Abb. 8: ↓3, 12) detektiert werden. Ebenfalls befand sich unter den sieben in der Expression hochregulierten Proteinspots ein Spot, welcher in der Massenspektrometrie ebenfalls als Ebp1 identifiziert werden konnte (Abb. 8: ↓19). Die Pfeile in Abbildung 9 markieren dabei das Proteinmuster von Ebp1 in vergrößerter Form. Es ist deutlich erkennbar, dass es zu einer Expressionsabnahme von Ebp1 bei mit Imatinib behandelten Zellen kam. Dieser Effekt ist sowohl nach 24, als auch nach 48 Stunden deutlich nachweisbar.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse die differentielle Expression von Ebp1 unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib.

## 2.2 Das ErbB3 binding protein (Ebp1)

Das ErbB3 bindende Protein (Ebp1) wurde ursprünglich durch *Two-Hybrid*-Analysen identifiziert <sup>100, 184</sup>. Es verhält sich homolog zu dem ebenfalls ErbB3 bindenden murinen p38-2G4 Protein <sup>136, 184, 194</sup>. P38-2G4 zeigt ein vom Zellzyklus abhängiges Expressionsmuster und

kann an DNA-Sequenzen binden. Bei beiden Proteinen handelt es sich um Mitglieder der mit Proliferation assoziierten Pa2g4 (2G4) Genfamilie<sup>76, 184</sup>. Das Protein Ebp1 interagiert mit der juxtamembranösen Domäne des ErbB3-Rezeptors<sup>184</sup>.

### 2.2.1 Vorkommen

Die mRNA von Ebp1 wird ubiquitär<sup>100, 184</sup> in humanen und murinen Geweben, wie Leber, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Muskel, Pankreas, Niere, Prostata und Brust sowie in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung exprimiert<sup>93, 179, 195 91</sup>.

Ebp1 ist sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern und dort vor allem im Nukleolus lokalisiert<sup>110, 184</sup>. Der im Nukleolus vorkommende Anteil des Proteins ist Teil eines Ribonukleinkomplexes oder mit ribosomaler RNA assoziiert<sup>18</sup> und könnte somit ebenfalls die Transkription beeinflussen<sup>192</sup>.

Northern Blot Analysen haben das Vorhandensein von zwei verschiedenen mRNA Transkripten, eines 1,7 kb (Hauptform) und eines 2,2 kb (Nebenform) Transkriptes, in mehreren menschlichen Organen wie Herz, Gehirn, Lunge, Pankreas, Skelettmuskel, Niere, Plazenta, Leber sowie in verschiedenen ErbB-exprimierenden Zelllinien beweisen können<sup>116, 184</sup>.

Ebp1 wurde auch in einer Vielzahl von Tumorzelllinien<sup>110, 143</sup> wie beispielsweise in Brust-, Prostata-<sup>186, 192</sup> und Mammakarzinom-Zelllinien, detektiert. Zudem wurde es in kolorektalen Tumoren<sup>112</sup> entdeckt. Es scheint in verschiedenen hämatologischen Tumorarten, wie z.B. anaplastischen großzelligen Lymphomen<sup>167</sup>, B- und T-Zell-Lymphomen<sup>108</sup> oder dem Burkitt Lymphom<sup>99, 161</sup>, überexprimiert zu sein. Auch kann es in Zellen vorkommen, die den ErbB3-Rezeptor nicht exprimieren<sup>178</sup>.

### 2.2.2 Struktur

Die humane Pa2g4 cDNA kodiert für ein Protein mit einer Gesamtlänge von 394 Aminosäuren und erscheint in der SDS-PAGE als singuläre Bande auf Höhe von 48 kDa<sup>160</sup>. Es handelt sich bei Ebp1 um ein Phosphoprotein<sup>98</sup> (siehe Abb.10), welches an den Aminosäuren Serin (Ser) und Threonin (Thr) phosphoryliert werden kann<sup>3</sup>.

Die Bindung an den ErbB3-Rezeptor<sup>192</sup> erfolgt über das C-terminale Ende des Proteins<sup>98</sup>. Seine Bindung an ErbB3 sowie die Phosphorylierung werden sowohl durch Heregulin (HRG), als auch durch die Proteinkinase C  $\delta$  vermittelt.

Bei Ebp1 handelt es sich um ein Protein mit einem nukleären Lokalisationssignal an seinem N- (AS 1-48) und C-Terminus (AS 301-394)<sup>75</sup>. Der C-Terminus enthält mehrere Aminosäuren (z.B. Ser360 und 363), an denen Ebp1 phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung von Ser360 (durch PKC  $\delta$ ) ist essentiell für seine Interaktion mit nukleärem AKT<sup>2</sup>, Caspase 3<sup>101</sup> und Bre I<sup>102</sup>. Eine Phosphorylierung von Ebp1 an Ser 363 ist

notwendig für seine Fähigkeit, durch Interaktionen mit Sin3A DNA zu binden<sup>3</sup>. Diese PKC Phosphorylierung diktiert ebenfalls die nukleoläre Lokalisation des Proteins<sup>100</sup> sowie die Bindung an ErbB3 und Proteinkinase B (Akt). Zudem wird Ebp1 durch die PKR (*dsRNA activated protein kinase*) phosphoryliert und kann über seinen C-Terminus an diese binden. Durch Beeinflussung der PKR kann Ebp1 als zellulärer Inhibitor der eIF2 $\alpha$ - (eukaryotischer Translationsinitiations-Faktor  $\alpha$ ) Phosphorylierung agieren<sup>161</sup>. An seiner Aminosäure Threonin 261 (Thr261) wird Ebp1 durch die p21-aktivierte Ser/Thr Kinase I (PAK I) phosphoryliert<sup>4</sup>. Diese PAK I Phosphorylierungsstelle ist wichtig für die funktionelle Aktivität in Brustkrebszellen. Mutationen in diesem Bereich unterbinden, dass Ebp1 Transkriptionsvorgänge und Zellwachstum inhibiert<sup>4</sup>.

Ebenfalls ist eine amphipathische helikale Domäne (AS 258-313) in Ebp1 bekannt, die Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen vermittelt. Ebp1 kann, bedingt durch seine Struktur, somit Proteine, RNA und DNA binden<sup>88, 111</sup> und besitzt dadurch unterschiedliche Einflussmöglichkeiten auf die Transkription sowie die posttranskriptionale Regulation mehrerer Gene.

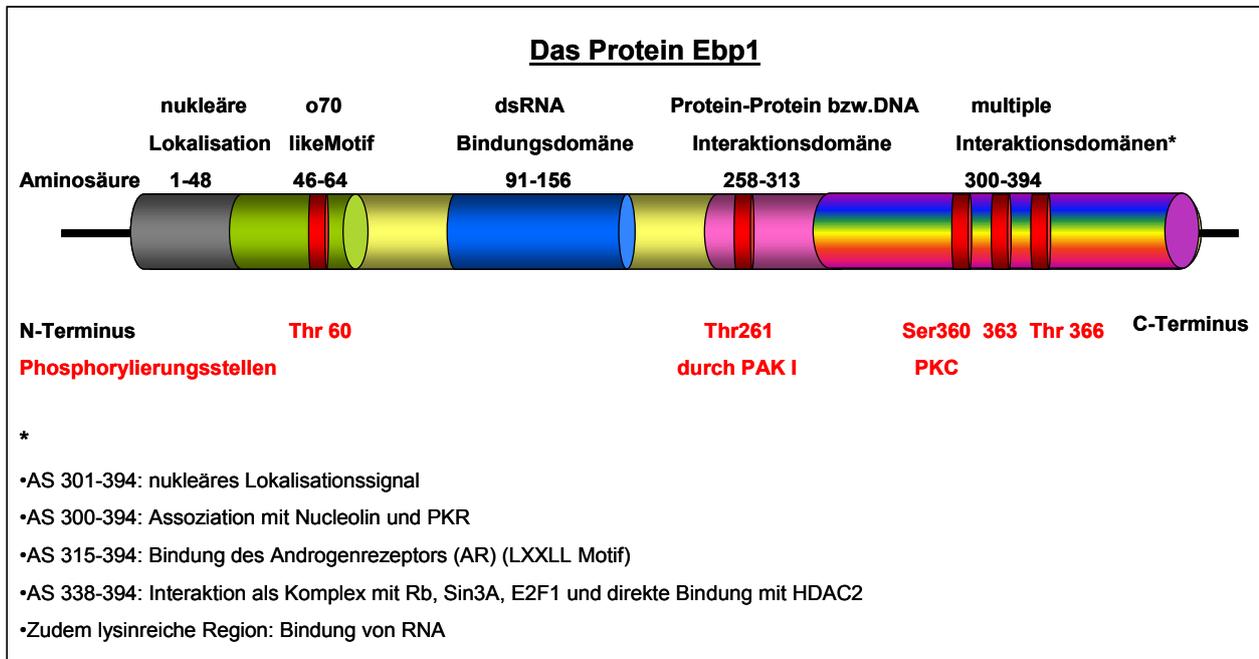
Zudem konnte in Ebp1 eine Domäne identifiziert werden, die dem  $\sigma^{70}$ -Motif ähnelt. Ebp1 scheint dieses  $\sigma^{70}$ -Motif sowohl für seine nukleoläre Lokalisation, als auch für seine wachstumshemmende Aktivität zu benötigen und bindet darüber direkt an RNA sowie an Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe<sup>35</sup>.

Der C-Terminus des Proteins weist ebenfalls eine ganze Reihe unterschiedlicher Bindungsstellen für Rezeptoren oder Proteine auf, beispielsweise für den Androgenrezeptor. Der Androgenrezeptor, ein Mitglied der nukleären Rezeptor-Superfamilie der Transkriptionsfaktoren, spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Progression von Prostatakrebs<sup>49, 82, 166</sup>. Hohe AR-Spiegel korrelieren mit dem Progress der Erkrankung<sup>72</sup>. Ebp1 hemmt die Aktivität des Androgenrezeptors, indem es posttranskriptional für eine Verminderung von dessen mRNA und damit der AR-Proteinlevel sorgt<sup>196, 197</sup> sowie durch zusätzliche Rekrutierung der Ko-Repressoren Sin3A<sup>190</sup> und HDAC2 (Histon Deacetylase 2)<sup>51</sup>. Damit inhibiert es durch Bindung von DNA, RNA oder Protein die durch den AR vermittelten Transkriptionsvorgänge<sup>194, 197</sup>. Die Domänen von Ebp1, welche mit Sin3A und HDAC2 interagieren, sind ebenfalls am C-Terminus des Proteins lokalisiert<sup>192</sup>. Meist werden beide Proteine in Form eines Komplexes an Ebp1 gebunden.

Auch das Retinoblastoma-Protein (Rb) ist ein Bindungspartner von Ebp1<sup>178, 188</sup>. Der Tumorsuppressor Rb ist ein wichtiger Modulator der Zellzyklusprogression und der zellulären Differenzierung. Er reguliert die zelluläre Proliferation durch seine Interaktion mit dem E2F-Transkriptionsfaktor und mit Histon Deacetylasen (HDACs). Über die Bindung von Rb kann Ebp1 ebenfalls E2F binden<sup>178, 188</sup>. Diese Assoziation beeinflusst die von Rb vermittelte Regulation der Transkription und könnte Auswirkung auf die Steuerung der antiproliferativen

Effekte von Ebp1 haben <sup>178, 188</sup>. Auch könnte die Interaktion mit Rb einen wichtigen Mechanismus der von Ebp1 induzierten Veränderungen in Zellproliferation und Differenzierung beweisen.

Über seinen C-Terminus spielt Ebp1 damit eine besondere Rolle in der Unterdrückung verschiedener Transkriptionsvorgänge und bei der ribosomalen Biogenese.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung des ErbB3 binding protein (Ebp1) mit einigen seiner funktionellen Domänen

### 2.2.3 Funktionen

Das ErbB3-bindende Protein, welches zu einer Familie von DNA/RNA-bindenden Proteinen gehört, ist essentiell für die zelluläre Proliferation <sup>195, 198</sup>, Differenzierung und Überleben von Zellen <sup>184, 195</sup>. Es scheint ebenfalls Zellwachstum und Proliferation in Pflanzen zu regulieren <sup>111</sup>, indem es in die Beeinflussung der Zellgröße, des Organwachstums sowie die Organentwicklung involviert ist <sup>102</sup>. Auch ist es wesentlich an apoptotischen Vorgängen beteiligt <sup>154</sup>.

Im Zellkern ist Ebp1 als Signalprotein für Zellwachstum und Differenzierung verantwortlich und fungiert als Transkriptionsfaktor oder als transkriptioneller Koregulator <sup>89</sup>.

Ebp1 unterdrückt bestimmte Transkriptionsvorgänge durch Interaktionen mit weiteren Komponenten anderer repressiver Komplexe, wie Rb, AR oder Sin3A. Außerdem ist Ebp1 an der Inhibition der Transkription von Zellzyklus-regulierenden Genen wie E2F1 <sup>68</sup>, Cyclin D, Cyclin E und c-myc <sup>192</sup> beteiligt.

Die E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren kontrolliert die Progression des Zellzyklus <sup>85, 189</sup>. Die Kooperation von Ebp1 <sup>84</sup> mit Sin3A, Rb und HDAC2 hat die stärksten Effekte auf die

Unterdrückung der von E2F1 vermittelten Transkription<sup>85</sup> (z.B. Inhibition der Transkription des E2F1-regulierten Cyclin E Promoters oder anderer E2F-regulierter Reportergene)<sup>193</sup>. Auch die Bindung von Ebp1 über einen Komplex mit Rb sowie dem E2F1-Transkriptionsfaktor an den E2F1-Promoter oder an E2F-regulierte Promotoren hemmt die Expression von vielen E2F-regulierten Genen<sup>85</sup>, was einen Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus mit einer Hemmung des Zellwachstums zur Folge hat. Als Zielgen von E2F<sup>85</sup>, trägt Ebp1 somit entscheidend zur Kontrolle des Zellwachstums bei<sup>74</sup>.

Im C-Terminus von Ebp1 kommt es außerdem zu einer Interaktion mit HDAC2 (Histon Deacetylase 2). HDAC Enzyme regulieren Gene, die in die Zellzyklusprogression involviert sind, und sind damit ebenfalls ein wichtiger Bestandteil bei der Unterdrückung von Transkriptionsvorgängen und Tumorgenese<sup>185, 192</sup>. Diese Enzyme werden zu E2F-Promotern rekrutiert, wo sie für die Acetylierung von Histonen verantwortlich sind und so die Chromatinstruktur modifizieren.

Während der Apoptose ist Ebp1 ein Substrat der aktiven Caspase 3, die für die Fragmentierung der DNA verantwortlich ist. Ebp1 konnte als ein Faktor aufgereinigt werden, welcher einen Beitrag zur Inhibition der apoptotischen DNA-Fragmentierung und damit zum Zellüberleben leistet.

Auch eine Assoziation zwischen Ebp1 und Nucleophosmin (NPM, B23) scheint essentiell für die Regulation der Zellproliferation sowie für die Unterdrückung von Apoptose zu sein<sup>123</sup>. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von rRNA. Es werden NPM sowohl Funktionen als Tumorsuppressor durch seine Interaktionen mit p53<sup>62, 123</sup>, jedoch auch als Onkogen zugeschrieben<sup>62, 123</sup>, da hohe Expressionslevel mit unkontrolliertem Zellwachstum und maligner Transformation in Verbindung stehen. NPM ist transloziert, mutiert oder bildet Fusionsproteine in vielen Formen von Lymphomen oder Leukämien (NPM-ALK, NPM-RARalpha und NPM-MLF1)<sup>48</sup>.

Ebp1 ist ebenfalls ein nukleäres dsRNA-Bindungsprotein (AS 91-156)<sup>161</sup>. Im Zytoplasma ist es mit der 40S Untereinheit von reifen Ribosomen verbunden<sup>195</sup>. Dadurch hat Ebp1 wachstumsregulierende Eigenschaften, beispielsweise in Bezug auf die Modulation der rRNA-Reifung und der ribosomalen Biosynthese<sup>88</sup>.

Ebp1 ist außerdem als Komponente des zytoplasmatischen bcl-2 mRNP (*messenger ribonucleoprotein particle*) Komplexes in leukämischen HL-60 Zellen beschrieben worden<sup>18</sup>. Es stabilisiert gemeinsam mit Nucleolin die bcl-2 mRNA in HL-60 Zellen<sup>18, 83</sup>. Bcl-2 steht für B-Zell bzw. Lymphom 2, ein potenter Inhibitor von Apoptose<sup>83</sup>. In vielen humanen Tumorentitäten mit erhöhten Leveln vorkommend<sup>115, 126, 157, 165</sup>, wurde bcl-2 als eines der ersten Proto-Onkogene identifiziert, welches das Überleben von Zellen verlängert. Eine

erhöhte Expression wird in verschiedenen hämatologischen Erkrankungen<sup>52, 138</sup>, wie der Chronisch Lymphatischen Leukämie<sup>126</sup>, beobachtet und kann ebenfalls zu Resistenzen beim Ansprechen auf Chemotherapien beitragen.

Eine Arbeitsgruppe beschreibt Ebp1 als immunogenes Protein, welches eine CD8-vermittelte Zellantwort auslösen und damit ein mögliches Tumor-Antigen für die Immuntherapie bei Patienten mit einem Kolonkarzinom darstellen kann<sup>143</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass Ebp1 die Transkriptase und RNA-Polymerase des Influenza-Virus inhibiert<sup>29, 74</sup>. Des Weiteren bescheinigt eine Studie Ebp1 Einfluß bei der Rinderpestvirusinfektion<sup>58</sup>, da es hierbei in viralen Einschlusskörperchen, in denen aktive Transkription und Replikation stattfinden, co-lokalisiert ist. Eine Überexpression von Ebp1 in infizierten Zellen hingegen hemmt die virale Transkription und damit die Multiplikation<sup>58</sup>.

Aufgrund der Interaktionen von Ebp1 mit dem Androgenrezeptor (AR) wurde dem Protein eine mögliche Rolle in der Entwicklung von hormonrefraktären Prostatakarzinomen durch die Hemmung des AR- und Heregulin (HRG)-stimulierten Wachstums zugeschrieben. Ebp1 stellt zudem einen potenten Suppressor in metastasierten Prostatakarzinomen sowie ebenfalls in Adenokarzinomen der Brust, des Ösophagus und des Pancreas dar<sup>186</sup>.

Ebp1 ist somit ein Effektor im ErbB3-Signalnetzwerk und in HRG-aktivierter Signalgebung<sup>185</sup>. Es agiert als potenter Tumorsuppressor<sup>122, 198</sup>, indem es das Wachstum von humanen ErbB2/3-positiven Brustkrebszelllinien<sup>104</sup> sowie auch bei Prostata-Zelllinien hemmt, wenn es überexprimiert wird<sup>68</sup>. Weiterhin löst es überexprimiert anti-tumoröse Effekte durch Blockade der DNA-Synthese beim oralen Plattenepithelzellkarzinom<sup>198</sup> aus, so dass dessen Wachstum und Metastasierung gehemmt werden<sup>198</sup>. Zudem fungiert es als ein therapeutisches Gen beim adenoidzystischen Karzinom<sup>185</sup>. Das Zellwachstum wird durch einen von Ebp1 ausgelösten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase oder G0/G1-Phase inhibiert<sup>97, 198</sup>. Darüber hinaus inhibiert es die Bildung von Zellkolonieformationen sowie das Wachstum auf Softagar und ist an der Induktion von Differenzierungsvorgängen beteiligt. Auch stellt die Überexpression von Ebp1 einen wirksamen Schutz vor Apoptose dar<sup>100</sup> und führt zur Hemmung der Transkription von zellzyklusregulierten Genen<sup>3</sup>.

ErbB3-bindende Proteine wie Ebp1 können durch die Kontrolle der physiologischen ErbB3-Level, der ErbB3 Aktivierung und als endogene Suppressoren von Tumorzellwachstum und Invasion von therapeutischem Nutzen sein<sup>122</sup>. Ein Verlust der verschiedenen ErbB3-Bindungsproteine könnte zu einer Überexpression des ErbB3-Rezeptors und damit zur konstitutiven Aktivierung nachgeschalteter Signalwege führen.

### 2.2.4 Isoformen von Ebp1

Das Pa2g4-Gen kodiert für zwei verschiedene Isoformen von Ebp1, welche in unterschiedlicher Art und Weise Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung vermitteln<sup>2</sup>.

<sup>102</sup>. Diese Isoformen verdanken ihre Namen ihrem Molekulargewicht: Ebp1-p42 und Ebp1-p48 <sup>100</sup>.

Sie entstehen durch drei verschiedene ATG Startcodons innerhalb des Leserasters am N-Terminus des Proteins. Bei Ebp1, welches vom ersten ATG translatiert wird, handelt es sich um die Ebp1-p48 Isoform. Die zweite existierende Isoform wird selten vom zweiten (Ebp1-p44), meist vom dritten ATG Codon (Ebp1-p42) generiert <sup>2, 101</sup>. Diese Isoformen zeichnen sich durch unterschiedliche Funktionen aus <sup>91</sup>.

Die am N-Terminus um 54 Aminosäuren längere und vorherrschende <sup>91</sup> Ebp1-p48 Form ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukelolus lokalisiert <sup>91</sup>. Diese Isoform hat als Hauptaufgaben die Unterdrückung von Apoptose sowie die Stimulierung der Proliferation und des Zellüberlebens. Sie trägt jedoch nicht zur Differenzierung von Zellen bei. Die Isoform Ebp1-p48 schützt die Zelle vor Caspase-3-vermittelter DNA-Fragmentierung während der Apoptose <sup>2, 100</sup>. Ebp1-p48 ist durch Phosphorylierung an der Stelle Ser360, vermittelt durch die Proteinkinase C  $\delta$  <sup>91</sup>, im Gegensatz zur Variante Ebp1-p42 nicht mehr durch die Caspase 3 spaltbar. Dadurch können Apoptose unterdrückt und die Überlebensdauer der Zelle gesteigert werden. Diese Isoform kann zudem maligne Konversionen bei verschiedenen Krebsentitäten, wie beispielsweise dem Glioblastom, induzieren <sup>86</sup>.

Die am N-Terminus um 54 Aminosäuren kürzere Isoform Ebp1-p42 hingegen befindet sich ausschließlich im Zytoplasma und hat als Hauptaufgaben die Differenzierung von Zellen <sup>2, 100, 123</sup> und die Unterdrückung der Zellproliferation <sup>100</sup>. Diese Form von Ebp1 weist deutlich geringere Expressionslevel als Ebp1-p48 auf <sup>123</sup>.

Weiterhin unterscheiden sich beide Isoformen hinsichtlich der Bindung und Aktivierung von Akt. Während p48 durch eine starke Bindung an das nukleäre Akt charakterisiert ist, was mit einer starken Akt-Aktivierung einhergeht, weist p42 neben einer schwachen Bindung auch nur eine sehr schwache Aktivierungsaktivität auf <sup>2</sup>. Diese Interaktion wird mittels Phosphorylierung durch die PKC  $\delta$  von Ebp1 auf Ser360 verstärkt <sup>2</sup>. Diese starke Akt-Aktivierung durch Ebp1-p48 begünstigt die antiapoptotische Aktivität <sup>91</sup>.

Auch hinsichtlich ihrer Bindung an NPM unterscheiden sich beide Isoformen. Während Ebp1-p42 nur spezifisch nach EGF-Stimulation im Nukleolus mit dem Protein assoziiert <sup>91</sup>, bindet die Form Ebp1-p48 konstant und sehr viel stärker an NPM <sup>123</sup>. Über seine Bindung an die Ebp1 Isoformen reguliert Nucleophosmin sowohl das zelluläre Überleben, als auch die Proliferation <sup>123</sup>. Durch die nukleäre Bindung von Ebp1-p48 mit NPM wird die Fragmentierung von DNA während der Apoptose verhindert <sup>123</sup>.

Im Gegensatz zu Ebp1-p48 kann die Isoform Ebp1-p42 auf den Aminosäuren Lysin 93 und 298 (K93 und K298) sumoyliert werden <sup>122</sup>. Die Sumoylierung wird durch TLS (*Translocation in Liposarcoma*) vermittelt, ein RNA-bindendes nukleäres Protein, welches in Prozessierung von prä-mRNA sowie nukleozytoplasmatisches *Shuttling* involviert ist <sup>122</sup>. Die Sumoylierung

vermittelt durch direkte Bindung eine nukleäre Translokation und wird für die antiproliferative sowie transkriptionsrepressive Aktivität von Ebp1-p42 verantwortlich gemacht<sup>122</sup>.

Die Isoform Ebp1-p42 könnte demnach einen potenten Tumorsuppressor<sup>122, 196</sup> in verschiedenen humanen Krebsentitäten darstellen, wohingegen Ebp1-p48 eher die Eigenschaften eines Onkogens aufweist<sup>102, 196 197 86</sup>.

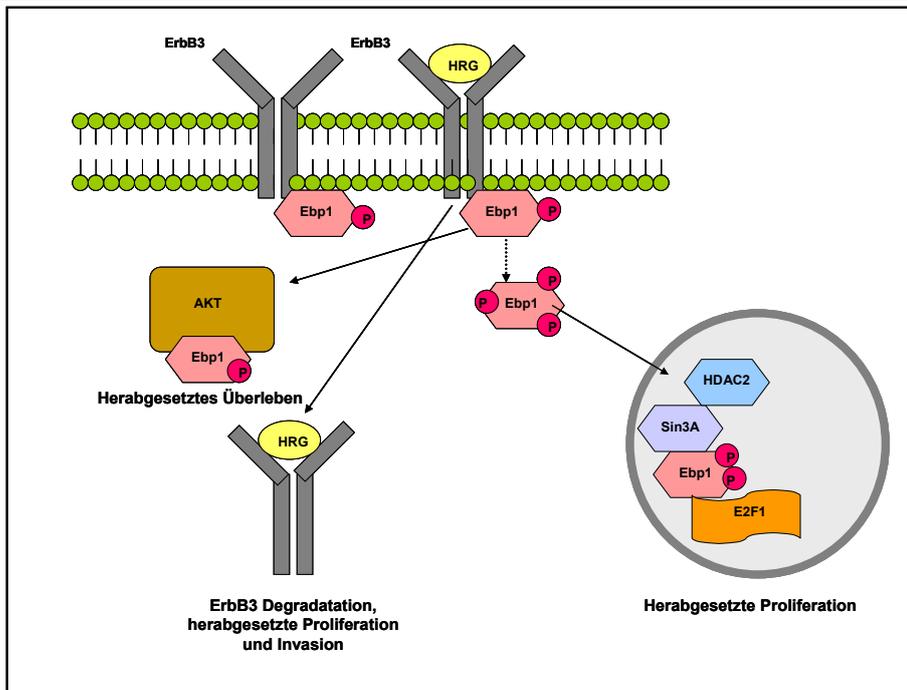
### 2.2.5 Interaktionen mit ErbB3

Ebp1 bindet an die juxtamembranöse Domäne des ErbB3-Rezeptors. Bei dieser Interaktion sind die ersten 15 Aminosäuren der juxtamembranösen Domäne von ErbB3 essentiell für die Ebp1-Bindung (vgl. Abb.11)<sup>97</sup>. Es reagiert mit ErbB3 in Abwesenheit der Phosphorylierung von dessen Tyrosinresten<sup>184</sup>. Mit anderen Rezeptoren der ErbB-Familie geht Ebp1 keine Bindung ein. Es besteht also die Möglichkeit, dass es sich bei Ebp1 um ein nachgeschaltetes Mitglied (sog. *Downstream-Member*) im ErbB3-Signalweg handeln könnte<sup>188</sup>. Es kann beispielsweise zur Rekrutierung der PI3-Kinase an ErbB3 führen.

Eine Behandlung der Zellen mit dem ErbB3/ErbB4-Liganden Heregulin (HRG) führt zur Dissoziation von Ebp1 und ErbB3, mit anschließender Translokation von Ebp1 aus dem Zytoplasma in den Zellkern<sup>184</sup>. Im Zellkern interagiert Ebp1 dann mit Proteinen, wie RB, HDAC2 und Sin3A, die wichtig für die Unterdrückung der Transkription sind<sup>68</sup>. Möglicherweise handelt es sich daher bei Ebp1 um einen Mediator der biologischen Effekte von HRG. Des Weiteren könnte es im Zellkern in die Vermittlung von Zellwachstum und Differenzierung einbezogen sein und somit als generelles Signalprotein fungieren.

Auch scheint die Phosphorylierung von Ebp1 durch die Proteinkinase C (PKC) für die Interaktion zwischen Ebp1 und ErbB3 wichtig zu sein. Wird nämlich die Phosphorylierung durch einen PKC-Inhibitor unterbrochen, kommt es ebenfalls zu einer Dissoziation des Proteins vom ErbB3-Rezeptor<sup>100</sup>.

Die Isoformen von Ebp1 reagieren unterschiedlich mit dem ErbB3-Rezeptor. Nur die kurze Ebp1-Isoform p42 scheint an die intrazelluläre Domäne von ErbB3 zu binden<sup>100</sup>. Eine Behandlung mit dem ErbB3-Liganden EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) verstärkt diese Bindung<sup>123</sup>. Im Gegensatz dazu assoziiert Ebp1-p48 nicht mit ErbB3, unabhängig von der Anwesenheit des Liganden EGF<sup>123</sup>. Möglicherweise sind die ErbB3-Bindungsstellen am N-Terminus bei Ebp1-p48 demaskiert. Auch spielt die Phosphorylierung durch die PKC eine essentielle Rolle bei dieser Assoziation<sup>2</sup>.



**Abbildung 11:** Interaktion von ErbB3 mit Ebp1 sowie nachgeschaltete Proteininteraktionen und ihre Folgen (in Anlehnung an Abbildung in <sup>68</sup>)

Aufgrund der Tatsache, dass eine Beziehung zwischen Ebp1 und dem ErbB3-Rezeptor existiert, stellt der Expressionsnachweis dieses Rezeptors sowie der weiteren ErbB-Rezeptoren in leukämischen Zellen einen essentiellen Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit dar.

Nachfolgend werden die einzelnen ErbB-Rezeptoren hinsichtlich ihrer Struktur, Funktion und individuellen Eigenschaften vorgestellt.

## 2.3 Die ErbB-Rezeptoren

Die ErbB Rezeptorfamilie beinhaltet vier Mitglieder <sup>191</sup>. Die Bezeichnung ErbB entstand aufgrund ihrer Homologie zum *erythroblastoma viral gene product*, v-erbB. Die einzelnen Mitglieder tragen die Bezeichnungen epidermaler Wachstumsfaktor EGFR (ErbB1), ErbB2 (Her2neu), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4) und werden in einer Vielzahl von Geweben, wie epithelalem, neuronalem und mesenchymalem Gewebe, exprimiert <sup>98, 163, 169</sup>.

Die verschiedenen Rezeptoren prägen nicht nur physiologische Prozesse <sup>12</sup> (Zellteilung, Proliferation, Differenzierung und Migration) <sup>92, 139</sup>, sondern gestalten als Proto-Onkogene die Pathogenese und Progression von verschiedenen humanen Krebsentitäten entscheidend mit <sup>6, 10, 12, 25, 153, 156</sup>. Auch bei Psoriasis oder Arteriosklerose ist ihr Einfluss nicht zu vernachlässigen <sup>32</sup>. Meist kommt es in diesen Fällen zu vermehrten Mutationen, die mit einer verstärkten Autophosphorylierung verbunden sind, oder zur Überexpression der jeweiligen Rezeptoren. Die Überexpression der ErbB-Familienmitglieder korreliert mit einer

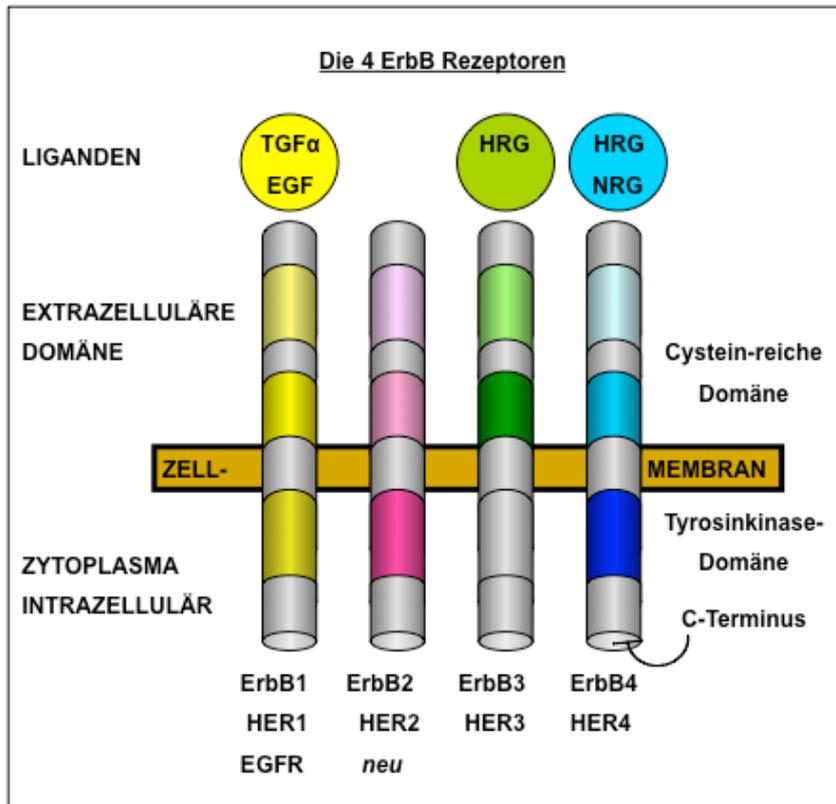
schlechteren Prognose bei Brust-<sup>163</sup>, Lungen-<sup>107, 127, 128</sup> Ovarial-<sup>92</sup> und gastrischen Adenokarzinomen<sup>50, 98</sup>. Therapien, die sich gegen die jeweiligen ErbB-Rezeptoren richten, befinden sich bereits im klinischen Gebrauch<sup>6, 10, 191</sup>.

### **2.3.1 Struktur und Funktion**

Bei den ErbB Rezeptoren handelt es sich um Rezeptor-Tyrosinkinasen<sup>12</sup>. Tyrosinkinasen katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe von einem ATP auf bestimmte Proteine und können auf diese Art und Weise die Aktivität dieser Proteine regulieren. Die ErbBs stellen Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren und andere Moleküle dar.

Strukturell zeichnen sich die ErbB Rezeptoren durch vier charakteristische Domänen aus (siehe Abb.12). Es gibt zunächst eine extrazelluläre, gefolgt von einer transmembranösen Domäne, an welche sich eine intrazelluläre Kinase- sowie eine intrazelluläre regulatorische Domäne anschließen.

Die extrazelluläre Domäne ist für die Bindung verschiedener Liganden wie EGF, HRG und NRG verantwortlich. Diese Ligandenbindungsdomäne besitzt vier Unterdomänen (I bis IV). Bei den Unterdomänen I und III handelt es sich um leucinreiche Abschnitte, welche besonders wichtig für die Ligandenbindung sind (L1 und L2). Bei den Subdomänen II und IV hingegen handelt es sich um laminähnliche und cysteinreiche Abschnitte (CR1 und CR2)<sup>32</sup>. Die transmembranöse Domäne reguliert die Rezeptoraktivität. Im zytoplasmatischen Bereich liegt die Tyrosinkinase-Domäne vor, welche für die Generierung weiterer Signale ins Zellinnere zuständig ist<sup>191</sup>.

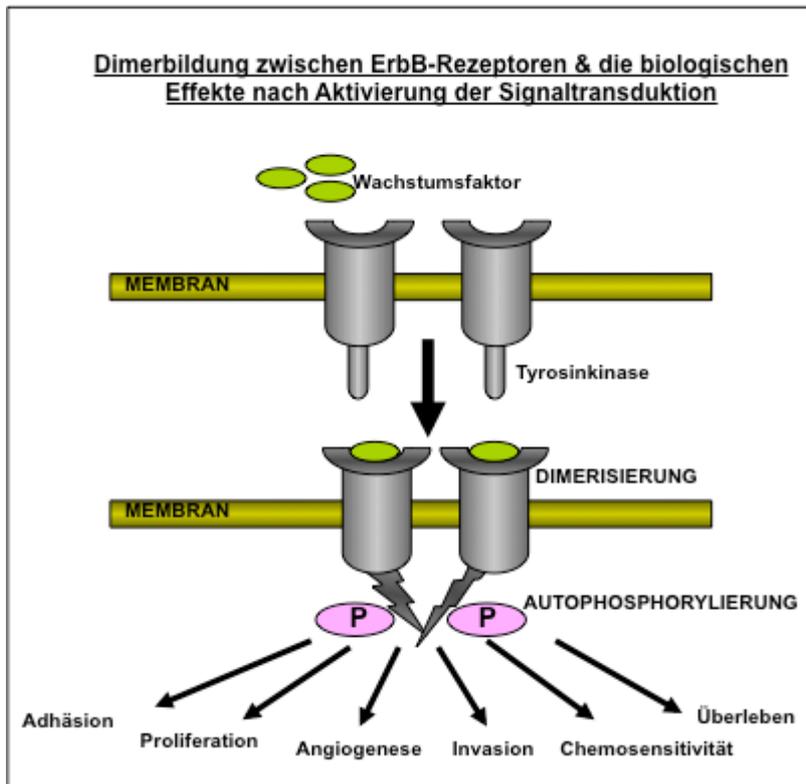


**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der vier verschiedenen ErbB-Rezeptoren mit einem Teil ihrer unterschiedlichen Liganden (in Anlehnung an <sup>20</sup>).

### 2.3.2 Signaltransduktion

Das Netzwerk der ErbB-Signaltransduktion zählt zu den mit am besten untersuchten Signaltransduktionskaskaden <sup>32</sup>. Das ErbB-Netzwerk besteht aus mindestens 13 Wachstumsfaktoren, welche als Liganden direkt an die drei Rezeptoren ErbB1, ErbB3 und ErbB4 binden.

Die funktionelle Basiseinheit der ErbB-Signalgebung ist ein Rezeptordimer, zu welchem jeder Partner einzigartige Eigenschaften beiträgt <sup>32</sup>. Durch Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne kommt es wahlweise zur Homo- oder Heterodimerbildung mit weiteren Mitgliedern der Rezeptorfamilie <sup>12, 150, 180, 181</sup>. Diese Dimerisierung stimuliert die Tyrosinkinaseaktivität und dadurch die Autophosphorylierung der Rezeptoren <sup>17</sup>. Somit können weitere Signalwege initiiert werden <sup>180, 181, 184</sup>, welche Überleben, Angiogenese, Proliferation, Invasion, Adhäsion und Chemosensitivität zur Folge haben (vgl. Abb.13) <sup>21</sup>.



**Abbildung 13:** Die Bildung von Dimeren zwischen den ErbB-Rezeptoren und die daraus resultierenden biologischen Effekte nach Aktivierung der Signaltransduktion (Abb. mit freundlicher Genehmigung in Anlehnung an Abb.3 aus Habilitationsschrift: „Die Bedeutung des Serumantigens des Onkoproteins HER-2/neu für die Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms“ von Diana Lüftner, Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin)

Es gibt in diesem Netzwerk verschiedene Systemkontrollen in Form positiver und negativer *Feedback*-Schleifen. Positive *Feedback*-Schleifen verlängern etwa das Stadium der Signalgebung, wohingegen aus negativen *Feedback*-Schleifen beispielsweise katalytische Inaktivierung oder Rezeptordegradation resultiert. ErbB2 sowie auto- und parakrine Schleifen von EGF-ähnlichen Liganden, wie Neuregulin (NRG)<sup>21</sup>, Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF) oder TGF- $\alpha$ , können als positive Regulatoren dieses ErbB-Netzwerkes angesehen werden<sup>13, 95, 177</sup>. Bei den negativen Regulatoren der ErbB-Signalgebung handelt es sich zum Beispiel um Cbl (E3 Ubiquitin Ligase) oder SOCS5 (*suppressor of cytokine signaling 5*).

Die Interaktionen zwischen Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren üben eine Kernfunktion in der normalen Zellregulation aus<sup>21, 182</sup>. Eine veränderte Aktivierung der ErbB-Rezeptoren bedingt die Entwicklung und Progression verschiedener Tumorentitäten<sup>125, 153, 154, 172</sup>. Daher stellen die unterschiedlichen ErbB-Rezeptoren wichtige Angriffspunkte in der Anti-Tumorthherapie dar<sup>64, 125</sup>.

### 2.3.3 Die verschiedenen ErbB-Rezeptoren

#### 2.3.3.1 EGFR (ErbB1, Her1)

Der *Epidermal Growth Factor Rezeptor* (EGFR) ist ein Schlüsselmolekül in Bezug auf Zellwachstum und Proliferation. Es handelt sich um ein 170 kDa großes Protein mit drei funktionellen Domänen: eine extrazelluläre Domäne am N-Terminus, welche für die Ligandenbindung verantwortlich ist, eine hydrophobe transmembranäre Domäne sowie die am C-Terminus liegende zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität.

Der autonome Rezeptor ist in der Lage, multiple Liganden zu binden. Zu den bisher bekannten Liganden gehören neben dem Epithelialen Wachstumsfaktor (EGF) auch TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ), Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*), Epiregulin sowie Neuregulin<sup>154</sup>. EGFR bildet nach Ligandenbindung sowohl Homodimere als auch drei funktionelle Heterodimere mit den anderen drei ErbB-Rezeptoren. Aus der Dimerisierung resultiert die Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase, die in der intrazellulären Domäne lokalisiert ist. Dieser Aktivierung liegt eine Autophosphorylierung der beiden Tyrosinreste des Rezeptordimers zugrunde. Verschiedene Botenproteine binden in der Folge an die phosphorylierte Stelle und leiten komplexe Signalkaskaden, wie die RAS-RAF-MAPK (Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen)<sup>42</sup> oder die STAT5 (*Signal Transducers and Activator of Transcription 5*) Kaskade, ins Innere der Zelle weiter<sup>32</sup>. Durch die aktivierten Signalkaskaden werden beispielsweise Apoptose inhibiert oder Angiogenese, Proliferation und Tumormetastasierung gefördert.

Eine Aktivierung oder Fehlregulierung der ErbB1-Rezeptor-Expression kann schnell zu einer malignen Transformation gesunder Zellen und somit zur Tumorentstehung oder Metastasierung führen<sup>50, 106</sup>. Auch weisen Karzinome, welche EGFR exprimieren, oftmals Resistenzen gegenüber Chemotherapien auf<sup>16, 33</sup>. Der ErbB1 Rezeptor ist in etwa 33-50% aller humanen epithelialen Tumoren dysreguliert<sup>153</sup>. Mutationen oder eine Überexpression des EGFR-Rezeptors, welche zu Genamplifikationen oder verstärkter Transkription führen, wurden in verschiedenen Tumorentitäten, wie zum Beispiel nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC)<sup>47, 107, 127, 128</sup>, Glioblastomen<sup>153</sup>, Brust-<sup>14, 137</sup>, Pancreas-<sup>50</sup> und Kopf-Halstumoren<sup>15, 106, 171</sup>, beobachtet und korrelieren in mehr als 80% der Fälle mit reduzierten Überlebensraten<sup>16, 32, 33</sup>.

Therapeutisch kommen niedermolekulare EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren zum Einsatz, die die Autophosphorylierung und damit die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade durch Anlagerung an die ATP-Bindungsstelle hemmen. Klinisch zugelassen sind bisher die beiden EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI's) Gefitinib und Erlotinib<sup>10, 17, 69</sup> für die Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Des Weiteren stellt der monoklonale Antikörper

Cetuximab, der sich gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors richtet und mit dessen Liganden konkurriert, einen zweiten Ansatz in der „targeted“ Therapie zum Beispiel von Kopf-Hals-Tumoren dar<sup>16, 33, 64</sup>.

### 2.3.3.2 ErbB2 (Her2neu)

Der 185 kDa große ErbB2-Rezeptor ist in seiner Funktion nicht autonom, da ihm die Fähigkeit fehlt, mit einem der Wachstumsfaktor-Liganden zu interagieren<sup>70, 87</sup> und damit die tyrosinspezifische Phosphorylierung des Rezeptors zu induzieren. Verantwortlich dafür ist die Struktur seiner extrazellulären Domäne, die an die ligandengebundene Form von EGFR erinnert. Starke Interaktionen zwischen den Subdomänen I und III führen jedoch zu einer Konformation, der es nicht möglich ist, einen Liganden zu binden. Es erfolgt daher die Bildung von Heterodimeren mit einem der anderen drei ErbB-Rezeptoren<sup>70, 114, 170</sup>, damit auch dieser Rezeptor zelluläre Aufgaben erfüllen kann. Heterodimere, die Her2/neu enthalten, zeichnen sich im Vergleich zu anderen ErbB-Heterodimerrezeptorkomplexen<sup>32</sup>, durch eine höhere Affinität für verschiedene Liganden aus. Durch die Dimerisierung werden unterschiedliche Signalkaskaden, einschließlich des Phosphatidylinositol-3-Kinase, und des *Mitogen Activated Protein* (MAP) Kinase-Signalweges, aktiviert. Diese steuern durch Regulation der Genexpression auf Transkriptions- und Translationsebene zelluläre Funktionen wie Zellüberleben, Proliferation, Adhäsion, Differenzierung und Migration von Zellen.

Beim Mammakarzinom sind hohe ErbB2-Level mit einem gesteigerten metastatischen Potential, einer größeren Transformationsaktivität und einer schlechteren Prognose (insbesondere bei der Therapie mit Tamoxifen<sup>104</sup>) verbunden<sup>1, 114</sup>. Außer beim Mammakarzinom<sup>12, 14, 79, 137, 169</sup> wird HER2/neu auch in weiteren Tumorentitäten wie beispielsweise Ovarial-<sup>12, 14, 117</sup>, Pankreas-<sup>50</sup>, Prostata-<sup>197</sup>, Bronchial-<sup>12, 47</sup>, Magen-<sup>12</sup> und Nasopharynxkarzinomen<sup>171</sup> sowie im Falle von akuten Leukämien überexprimiert<sup>12</sup>.

So sind diese Tumoren prinzipiell für Therapien zugänglich, die sich gegen ErbB2 richten<sup>25, 69, 77, 113, 149, 155, 176, 183</sup>. In der Klinik werden bereits die monoklonalen Antikörper Trastuzumab<sup>10, 64, 69</sup> und Pertuzumab<sup>64</sup> bei Her2/neu-positiven Mammakarzinomen eingesetzt. Ebenfalls existiert mit dem Medikament Lapatinib ein dualer Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor, der sowohl EGFR als auch HER2/neu hemmt.

Die Überexpression von ErbB2 ist eines der Hauptprobleme bei der Entwicklung von endokriner Resistenz in Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs-Zelllinien<sup>104</sup>. Daher ist die Senkung der ErbB2-Spiegel wichtig für die Generierung einer suffizienten Therapie.

Es zeigte sich, dass Ebp1 das Zellwachstum von ErbB2- und ErbB3-exprimierenden Brustkrebs Zellen als Antwort auf HRG-Stimulation hemmt und es damit zu einer Interaktion

mit HRG-induzierten Wachstumssignalen, wie beispielsweise zu einer Aktivierung von AKT, kommt <sup>104</sup>.

### 2.3.3.3 ErbB3 (Her3)

ErbB3 ist ein 180 kDa großes, im menschlichen Körper weit verbreitetes transmembranöses Glykoprotein <sup>97</sup>. Der Rezeptor existiert sowohl in normalen als auch in neoplastischen Geweben und befindet sich in Hirn, Leber, Pankreas, Brustdrüse <sup>12, 164, 169</sup>, Rückenmark, Prostata <sup>12</sup>, Nieren, Ovarien <sup>12</sup> und Lunge <sup>12, 65, 68</sup>. Auch dieser Rezeptor scheint eine Schlüsselrolle bei der Proliferation und Differenzierung von Brustkrebszellen zu spielen <sup>12, 137, 164, 193</sup>. Besonders in Zusammenarbeit mit ErbB2 kann der ErbB3-Rezeptor als Onkogen zur Zelltransformation und Tumorgenese beitragen <sup>12, 154</sup>.

ErbB3 ist wie ErbB2 auf die Interaktion mit anderen Rezeptoren angewiesen und daher nicht autonom. Im Gegensatz zu ErbB2, welcher nicht eigenständig Liganden binden kann, ist bei diesem Rezeptor die Tyrosinkinaseaktivität defekt <sup>65-67</sup>. Aus diesem Grund bildet der ErbB3-Rezeptor Heterodimer-Komplexe mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie <sup>28, 65, 67</sup>, welche in der Lage sind, potente zelluläre Signale zu generieren <sup>28</sup>. Diese Interaktion mit Bindungspartnern ist essentiell für die biologische Aktivität des Rezeptors <sup>68</sup>. Im Gegensatz zu anderen ErbB-Rezeptoren bildet ErbB3 jedoch keine stabilen ligandengebundenen Homodimere aus. Durch die Dimerisierung kommt es, wie bei den anderen ErbB-Rezeptoren, zur Phosphorylierung der rezeptoreigenen Tyrosinreste und damit zur Interaktion mit der im Signalweg nachgeschalteten PI3-Kinase <sup>164</sup>, die weitere Signale generiert <sup>12</sup>. Bewirkt werden kann die Aktivierung der mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK) oder des Protein B (Akt)-Signalweges<sup>3</sup>. Besonders nach Behandlung mit HRG dimerisiert der ErbB3-Rezeptor bevorzugt mit ErbB2 und bildet einen besonders starken Rezeptorkomplex aus, welcher eine Grundvoraussetzung für die Proliferation und Genese humaner Brustkrebszellen durch Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden darstellt <sup>164, 193, 196</sup>. Diese Co-Expression ist verknüpft mit einer kürzeren Überlebenszeit sowie mit dem vermehrten Auftreten von Resistenzen gegenüber Medikamenten, die gegen das Mammakarzinom zum Einsatz kommen <sup>68, 164</sup>.

Bei den Liganden des ErbB3-Rezeptors handelt es sich beispielsweise um EGF, Epiregulin, HRG, NRG <sup>164</sup> oder auch um das Protein Ebp1 <sup>4</sup>.

ErbB3-Überexpression findet sich in verschiedenen Krebsentitäten, wie bei Tumoren in Brust, Ovarien, Pankreas, Lunge <sup>47</sup>, Prostata, Gehirn, Leber und Magen <sup>184</sup>. In hämatopoetischen Neoplasien konnte in sieben verschiedenen unspezifischen Neoplasien kein messbares ErbB3 detektiert werden <sup>154</sup>. Erhöhte ErbB3-Expression ist meist mit einer schlechteren Prognose verbunden, da sie mit niedrigeren Überlebenschancen, Metastasierung, Tumorgöße, Lokalisation und Rezidivhäufigkeit korreliert. Der Rezeptor

scheint ebenfalls an der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Anti-Östrogenen sowie gegenüber ErbB-TKI, wie beispielsweise Gefitinib, beteiligt zu sein <sup>68</sup>. Die defekte bzw. fehlende Tyrosinkinaseaktivität des ErbB3-Rezeptors erschwert die Herstellung therapeutischer Mittel, und bis heute ist noch kein potenter Inhibitor zugelassen. Zur Zeit wird der Einsatz von siRNA gegen ErbB3 oder Akt beim Adenokarzinom der Lunge diskutiert <sup>154</sup>.

### 2.3.3.4 ErbB4

ErbB4 wurde als letztes Mitglied der ErbB-Familie aus einer humanen Brustkrebs-Zelllinie kloniert <sup>131</sup>. Der 180 kDa große Rezeptor ist ebenfalls autonom und differenzierungsassoziiert. Außerdem weist ErbB4 strukturelle Ähnlichkeiten und Erkennungs- beziehungsweise Signaleigenschaften mit dem ErbB1-Rezeptor auf <sup>27</sup>. Wie der EGFR bindet auch ErbB4 eine große Gruppe von Liganden, wie Betacellulin, Epigen, Epiregulin, HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), Heregulin (HRG) <sup>20</sup> und NRG1-4 <sup>124</sup>. ErbB4-Rezeptor-Expression findet man vor allem in Geweben von Herz, Niere, Milchdrüse und Zentralnervensystem.

Durch alternatives *Spleißen* sind mehrere Isoformen dieses Rezeptors erkennbar <sup>45, 46, 144</sup>. Beispielsweise ist eine juxtamembranöse Variante, die JMa-Isoform, durch Membranproteasen prozessierbar, wohingegen eine andere zytoplasmatische Isoform CYT1 eine Bindungsdomäne für die PI3-Kinase enthält <sup>46</sup>, welche die p85 Untereinheit der PI3-Kinase bindet. Die letztgenannte Isoform CYT1 ist in der Lage, über die Aktivierung des Shc/Ras/MAPK Signalwegs gleichermaßen die Synthese von DNA und die Proliferation zu stimulieren und außerdem über den PI3-Kinase-Signalweg Chemotaxis und Apoptose zu regulieren <sup>32</sup>.

ErbB4 spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären und neuralen Entwicklung <sup>32</sup> und ist beteiligt an Differenzierungsvorgängen, welche die Milchdrüse betreffen. Auch konnte der Rezeptor bei Mammakarzinomen nachgewiesen werden <sup>137</sup>.

Wie eingangs angeführt sollen in dieser medizinischen Dissertationsarbeit detailliert die Effekte von Imatinib auf das Protein Ebp1 und seine Isoformen in unterschiedlichen leukämischen Zellen auch im Hinblick auf mögliche neue Zielstrukturen in der Therapie der CML untersucht werden. Zudem befasst sich diese Arbeit mit dem Vorkommen der epidermalen Wachstumsfaktoren (ErbB1-4) in verschiedenen leukämischen Zelllinien sowie in Patientenmaterial und den sich daraus ergebene Konsequenzen.

### 3. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche basieren auf einem breiten Methodenspektrum in den verschiedenen Bereichen der Molekularbiologie. Die Methoden umfassen das Arbeiten mit DNA, RNA und Proteinen, sowie die Kultivierung verschiedener Zelllinien (Zellkultur). Zytotoxizitäts- nebst Proliferationsassays und auch FACS-Analysen und Elektronenmikroskopie wurden ebenfalls als Verfahren herangezogen.

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Medien, Lösungen und Chemikalien

*Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Medien und Chemikalien*

Name	Hersteller
10x Reaction Buffer für DNase	Sigma
5x First Strand	Invitrogen
Aceton	J.T.Baker
Acrylamid-Bis-Fertiglösung 40%	Merck
Agarose	Invitrogen
Albumin Standard 2.0 mg/ml (BCA Kit)	Pierce
Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
AMN 107	Novatis
Ampicillin 1000x	Sigma
Aprotinin	Applichem
BCA™ Protein Assay Reagent A & B	Pierce
Bradfordlösung	Bio-Rad
Brillant Blue G250	Roth
Bromphenolblau Na-Salz	Roth
CHAPS	Merck
Chloroform	Sigma
DEPC-Wasser	Invitrogen
DH5α Competent Cells	Invitrogen
DMEM + Glutamax	Gibco
DMSO (Dimethyl sulphoxide)	Sigma
DNaseI Amplification Grade 1 U/μl	Sigma
dNTP Mix	Invitrogen
DTT 0.1 M	Invitrogen
EDTA	Sigma / Roth
Essigsäure 96%	J.T.Baker

## Material und Methoden

Name	Hersteller
Ethanol	J.T.Baker
Ethanol vergällt	Geyer
Ethidiumbromid	Sigma
FCS	Gibco
Foetal Bovine serum (FBS)	Gibco
Formaldehyd	Roth
Formamid	Sigma / Merck
G418 Sulfate (1,5 mg/ml) STOCK 50 mg/ml	PAA
Glucose	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
HEPES	Roth
Interleukin 3	Strathmann Biotech AG
Iodoacetamide	Healthcare
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma
LB-Agar & Medium	Roth
Leupeptin	Sigma
Lipofektamin	Invitrogen
Magermilchpulver	Roth
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck / J.T.Baker
Mineralöl	Bio-Rad
Natrium Acetat	Roth
Natrium Chlorid (Sodium Chloride)	J.T.Baker
Natrium Desoxycholat	Sigma
Natrium Pyruvat 100x	Gibco
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T.Baker
Natriumorthovanadate	Sigma
Non-essential AS	Gibco
Nonidet P40	Applichem
Oligo dT Primer	Invitrogen
OPTI-Mem	Gibco
Paraformaldehyd	Roth
PBS BioWhittaker	Lonza
Pen Strep	Gibco
PeqGold MoSieve <sup>TM</sup> Agarose	Peqlab

## Material und Methoden

---

Name	Hersteller
Pierce ECL Western Blot Detecting	Thermo
Plasmocin	Amaxa GmbH
PLB (Passive Lysis Buffer) Stock 5x	Promega
PMSF	Appllichem
Ponceau-S	Sigma
Propanol	Fluka
Proteaseinhibitoren Compleat Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Protein G+A Agarose	Calbiochem
pUC 19 Control DNA	Invitrogen
Random Hexamer Primer	Invitrogen
Red Taq Ready Mix	Sigma
RNase A	Roth
RNase OUT (40 U/ml)	Invitrogen
RPMI-1640 + GlutaMAX (+) 25 mM Hepes	Gibco
Saccharose	Merck
Salzsäure 37% rauchend	Merck
Schwefelsäure	Fluka
SDS	Roth
Stop and Glo Buffer & Substrate 50x	Promega
Stop Solution (DNase Verdau)	Sigma
Superscript II RT	Invitrogen
Taq Ready Mix for PCR	Sigma
TEMED	Amersham
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trizema base	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Biochrom
Trypsin 0,5% + EDTA	Gibco
Tween	Sigma
Urea	Sigma

### 3.1.2 Puffer

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten angesetzten Puffer**

Name	Menge	Inhaltsstoffe
<b>150 mM (300/450 mM) Lysispuffer</b>	150 (300/450) mM 50 mM 1% 0,25% 1 mM 1 mM 10 µM 1 mM Ad 50 ml	NaCl 1 M Tris/HCl pH 7,6 NP-40 Na-Desoxycholat Natriumorthovanadate PMSF Leupeptin Aprotinin Millipore Wasser
<b>Äquilibrierungsgrundlösung (Mini 2D)</b>	6 M 4% 50 mM Ad 83,3 ml	Urea SDS 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 Millipore Wasser
<b>Äquilibrierungslösung A (Mini 2D)</b>	41,5 ml 1%	Äquilibrierungsgrundlösung DTT
<b>Äquilibrierungslösung B (Mini 2D)</b>	41,5 ml 4,8%	Äquilibrierungsgrundlösung Iodacetamid
<b>Äquilibrierungspuffer Semi Dry Blot</b>	200 (400) ml 5,82 (11,64) g 2,93 (5,86) g 1,88 (3,76) ml ad 1 (2) l	Methanol Tris base Glycin 20% SDS Millipore Wasser
<b>Blocking Solution</b>	5%	Magermilchpulver (BSA) gelöst in PBS-T oder TBS-T
<b>Blotting Puffer</b>	400 ml Ad 2000 ml	Methanol 1x SDS Laufpuffer
<b>Coomassie Staining Solution 4x</b>	8 g 4000 ml 220 ml  220 ml/Flasche 310 ml/Flasche	Coomassie G250 Millipore Wasser Konzentrierte Schwefelsäure Rühren über Nacht Filtrieren über Papierfilter und auf 2-l-Flaschen aliquotieren 10 M NaOH 100% TCA (Unter Rühren und auf Eis)
<b>Einfriermedium</b>	10% 90%	DMSO FCS
<b>Harnstoff Lysispuffer</b>	9 mM 4% 1% 1% 10 µg/ml Ad 50 ml	Harnstoff CHAPS Pharmalyte DTT Bromphenolblau Millipore Wasser
<b>Imatinib Gebrauchslösung</b>	10 mg Ad 1 ml	Imatinib Wasser:DMSO (1:1)

## Material und Methoden

Name	Menge	Inhaltsstoffe
<b>Loading Dye 4x</b>	2 ml 2 ml 100 µl 0,05 g Ad 5 ml	Glycerin 1M Tris-HCl, pH 6,7 1% Bromphenolblau DTT Millipore Wasser
<b>PBS-T</b>	2000 ml 0,05%	1x PBS Tween
<b>Puffer A (Zellkernextraktion)</b>	10 mM 10 mM 0,1 mM 0,1 mM 1 mM 1 mM Ad 50 ml	HEPES pH 7.9 KCl EDTA EGTA DTT PMSF Millipore Wasser
<b>Puffer C (Zellkernextraktion)</b>	20 mM 0,4 mM 1 mM 1 mM 1 mM 1 mM Ad 50 ml	HEPES pH 7.9 NaCl EDTA EGTA DTT PMSF Millipore Wasser
<b>Sammegel (4%)</b>	6,10 ml 1,33 ml 2,50 ml 50 µl 50 µl 10 µl	Wasser Acrylamid 30% 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 20% SDS APS 10% TEMED
<b>SDS-Laufpuffer 10x</b>	360 g 75 g 25 g Ad 2500	Glycin Tris-Base SDS Millipore Wasser
<b>Solution I (Mini Prep)</b>	50 mM 25 mM 10 mM 100 µg/ml Ad 50 ml	Glucose Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 RNase A Millipore Wasser
<b>Solution II (Mini Prep)</b>	0,2 N 0,5%	NaOH SDS
<b>Solution III (Mini Prep)</b>	25% 15% Ad 100 ml	Kac Essigsäure Millipore Wasser
<b>Stripping Solution</b>	100 mM Ad 100 ml	Glycin pH 2,9 Millipore Wasser
<b>TAE (50x)</b>	242 g 57,1 ml 100 ml Ad 1000 ml	Tris-base Essigsäure 0,5 M EDTA pH 8,0 Millipore Wasser

## Material und Methoden

Name	Menge	Inhaltsstoffe
<b>TBS</b>	50 mM 150 mM	Tris pH 8,0 NaCl
<b>TE</b>	10 mM 1 mM	Tris HCl pH 7,4 EDTA pH 8,0
<b>TKM Puffer</b> <i>(Zellkernisolierung über Saccharose Gradienten)</i>	50 mM 25 mM 5 mM 1 µl/ml TKM 1 µl/ml TKM 0,5 µl/ml TKM Ad 500 ml	Tris-HCl pH 7,5 KCl MgCl <sub>2</sub> PMSF (17,4 mg/ml) Aprotenin (10µM) Leupeptin (10µM) Millipore Wasser
<b>Zellkulturmedium für Suspensionszellen</b>	500 ml 50 ml 10 ml 5 ml 5 ml	RPMI Medium + Glutamin FCS Pen/Strep Natriumpyruvat Nichtessentielle Aminosäuren
<b>Trenngel (15%)</b>	2,35 ml 5,00 ml 2,50 ml 50 µl 50 µl 10 µl	Wasser Acrylamid 30% 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 20% SDS APS 10% TEMED

### 3.1.3 Antikörper

#### 3.1.3.1 Primärantikörper

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Antikörper

Name	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Laufhöhe	Hersteller
Anti-ABL	1:500/1:1000	Mouse	145 kDa	BD Biosciences
Anti-Actin	1:5000	Mouse	42 kDa	Calbiochem
Anti-GFP	1:1000	Mouse	27 kDa	Abcam
Anti-Vinculin, clone V284	1: 1000	Mouse	117 kDa	Upstate
Ebp1	1:5000	Rabbit	48 kDa	Upstate
eiF5a	1:5000	Mouse	18 kDa	BD
GAPDH	1:5000	Mouse	~40kDa	Chemicon Int.
HER2/ErbB2 (44E7) Mouse mAB	1:1000	Mouse	185 kDa	Cell Signaling
HER3/ErbB3 (1B2) Rabbit mAB	1:1000	Rabbit	185 kDa	Cell Signaling
Histon H3	1:5000	Rabbit	17 kDa	Epitomics
Hsp90	1:1000	Mouse	90 kDa	Cell Signaling
Lamin A/C	1:1000	Mouse	65/74 kDa	BD
Phospho (Ser/Thr) PKA	1:1000	Rabbit	BSA	Cell Signaling

Name	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Laufhöhe	Hersteller
Phospho c-Abl (Tyr 245)	1:1000	Rabbit	135 kDa	Cell Signaling
Phospho NPM (Thr 199)	1:1000	Rabbit	38 kDa	Cell Signaling
Phospho-CRKL (Tyr207)	1:2000	Rabbit	39 kDa	Cell Signaling
Phospho-HER3/ErbB3 (Thr 1289) (21D3) Rabbit mAB	1:1000	Rabbit	185 kDa	Cell Signaling
Phosphotyrosine-PY20	1:1000	Mouse	180 kDa	BD
VCP	1:4000 1:5000	Mouse	~97 kDa	Affiniti Bio Reagents
Vimentin	5µl/10 ml 1:2000	Mouse	57 kDa	BD

### 3.1.3.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 4:** Übersicht der verwendeten Sekundär-Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse Ig horseradish peroxidase-linked whole antibody (from sheep) GPR	1:10.000	GE Healthcare
Anti rabbit-IgG HRP-linked	1:10.000	Cell Signaling
Fluorescein (FITC) conjugate Affiniti Pure F(ab') <sub>2</sub> Anti-rabbit IgG (H+L)	1:100	Jackson Immuno Research

### 3.1.4 Marker, Protein- und Nukleotidleiter

**Tabelle 5:** Übersicht der verwendeten Marker

Name	Hersteller
SmartLadder (DNA Standard)	Eurogentec
SmartLadder SF (DNA Standard)	Eurogentec
Peq Gold 100bp DNA Leiter plus	Peqlab
Peq Gold Protein Marker IV (Prestained)	Peqlab
Rainbow Marker	GE Healthcare
Roti Mark Standard	Roth

### 3.1.5 Zellen

#### 3.1.5.1 K562

Bei K562 handelt es sich um eine humane Zelllinie, die 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53 Jahre alten Frau mit Chronisch Myeloischer Leukämie in myeloischer Blastenkrise gewonnen wurde <sup>103</sup>. Die Zellen tragen das Philadelphia-Chromosom mit einem bcr-abl b3-a2 Fusionsgen. Es sind Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von 30-40 Stunden. Diese Zelllinie habe ich von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bezogen. K562 wird als undifferenzierte, multipotente, hämatopoetische und maligne Zelllinie mit dem Potential zur spontanen Differenzierung in Vorläufer der erythrozytären, granulozytären oder monozytären Reihe beschrieben. Studien, die sich mit deren Oberflächeneigenschaften beschäftigen, beschreiben die K562-Zellen als humane Erythroleukämie <sup>7</sup>.

#### 3.1.5.2 HL-60

Diese humane BCR-ABL-negative Zelllinie wurde 1976 aus dem peripheren Blut einer 35 Jahre alten Frau mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML FAB M2) gewonnen <sup>40</sup>. Es handelt sich hierbei ebenfalls um Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von etwa 25 Stunden. In Kultur differenzieren bis zu zehn Prozent der Zellen spontan in Myelozyten, Metamyelozyten oder Neutrophile. Bezogen wurden diese Zellen von der DSMZ.

#### 3.1.5.3 BV-173

Diese Zelllinie weist die Eigenschaften einer humanen Vorläufer-B-Zell-Leukämie auf <sup>129</sup>. Die Zellen wurden aus dem peripheren Blut einer 45 Jahre alten Patientin mit CML in der lymphatischen Blastenkrise gewonnen und sind seit 1980 in Zellkultur. Kennzeichnend ist die Translokation t(9;22) mit dem b2-a2-Fusionsgen.

Die Zellen haben eine rundliche bis eliptoide Form und wachsen einzeln in Suspension mit einer Verdopplungszeit von ca. 48 Stunden. Die Zelllinie wurde ebenfalls von der DSMZ bezogen.

#### 3.1.5.4 Ba/F3

Es handelt sich hierbei um eine Interleukin 3 (IL-3)-abhängige murine B-Zelllinie, welche aus peripherem Blut gewonnen wurde. Von den morphologischen Eigenschaften her erscheint die Zelllinie meist in Form runder, zum Teil auch polymorpher Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von etwa 20 Stunden.

### **3.1.5.5 Ba/F3 -p210**

Die murine Zelllinie Ba/F3-p210 ist eine Imatinib-sensitive Zelllinie. Diese Zellen sind im Gegensatz zu den Ba/F3-Wildtyp-Zellen Bcr-Abl-positiv und nicht mehr auf die Zugabe von Interleukin 3 (IL-3) angewiesen. Morphologisch ähneln sie stark den Ba/F3-Zellen. Diese Zelllinie wurde uns mit freundlicher Unterstützung von N. P. Shah and C. L. Sawyers (University of California – Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt, die die Zelllinie mittels retroviraler Transduktion hergestellt haben.

### **3.1.5.6 Ba/F3 -T315I**

Hierbei handelt es sich um ein Bcr-Abl-positives und Imatinib-resistentes Zellerivat. Diese Zelllinie trägt eine der am meisten gefürchteten Mutationen in sich, die in der Chronisch Myeloischen Leukämie vorkommen kann. Die Mutation T315I macht die Zellen nicht nur Imatinib gegenüber resistent, sondern auch Zweitgenerations-Tyrosinkinase-Inhibitoren gegenüber. Lediglich der neuerdings zugelassene Tyrosinkinaseinhibitor Ponatinib richtet sich eben gegen diese spezielle Mutation <sup>36</sup>. Diese Zelllinie wurde uns mit freundlicher Unterstützung von N. P. Shah and C. L. Sawyers (University of California – Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt.

### **3.1.5.7 Ba/F3 -M351T**

Wie die zuvor beschriebene Ba/F3-T315I Zelllinie beinhaltet diese ebenfalls Imatinib-resistente murine Zelllinie eine weitere Bcr-Abl-Mutation: M351T. Diese Zelllinie wurde uns ebenfalls mit freundlicher Unterstützung von N. P. Shah and C. L. Sawyers (University of California – Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt.

### **3.1.5.8 Ba/F3 -E255K**

Auch diese mittels viraler Transfektion hergestellte Zelllinie beinhaltet eine Bcr-Abl-Mutation (E255K), welche der Zelle Resistenz gegenüber Imatinib verleiht. Die Imatinib-Resistenzen zwischen den einzelnen Ba/F3 -Mutationsvarianten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer IC<sub>50</sub> im MTT. Diese Zelllinie wurde uns mit freundlicher Unterstützung von N. P. Shah and C. L. Sawyers (University of California – Los Angeles, USA) zur Verfügung gestellt.

### **3.1.5.9 LAMA-84**

Die Lama-84-Zellen wurden aus dem peripheren Blut einer 29 Jahre alten Patientin mit Chronisch Myeloischer Leukämie, die fünf Jahre lang mit Busulfan behandelt wurde, gewonnen. Die Zellen stammen aus der Blastenkrise und exprimieren megakaryotische und euthyroide Marker. Morphologisch dominieren einzelne, runde bis polymorphe Zellen, die

teilweise leicht adhären sind. Sie teilen sich alle 50 Stunden und exprimieren das Fusionsgen bcr-abl (b3-a2).

### **3.1.5.10 MEG-01**

Wieder handelt es sich um Zellen der humanen Chronisch Myeloischen Leukämie in der megakaryozytischen Blastenkrise. Diese Zelllinie wurde 1983 aus dem Knochenmark eines 55-jährigen Mannes etabliert. Die MEG-01-Zellen wachsen singulär oder in kleinen Gruppen im Suspensionsmedium. Sie können zeitweise adhären Charakter aufweisen. Ihre Verdopplungszeit beträgt in der Regel 35 Stunden.

### **3.1.5.11 KYO-1**

Diese Zelllinie besitzt Charaktereigenschaften typisch für die Chronisch Myeloische Leukämie in der Blastenkrise. Aus dem peripheren Blut eines 22 Jahre alten Japaners gewonnen, exprimieren auch diese Zellen die Translokation t(9;22). Es handelt sich um runde Suspensionszellen, die zum Teil auch kleine Klumpen bilden können. Die Verdopplungszeit ist mit 40 bis 50 Stunden relativ lang.

### **3.1.5.12 KCL-22**

Diese runden Zellen wachsen in Suspension meist einzeln. Sie können sich jedoch auch zu kleineren Zellverbänden (so genannten *Clustern*) zusammenlagern. Sie verdoppeln sich innerhalb von 24 Stunden. Die KCL-22-Zellen stammen aus dem Pleuraerguss einer 32 Jahre alten Frau mit einer Philadelphia-Chromosomen-positiven CML in der Blastenkrise aus dem Jahr 1981. Sie enthalten sowohl das t(9;22)b2-a2-Fusionsgen, als auch eine p53-Mutation.

### **3.1.5.13 JURL-MK1**

Diese ebenfalls bei der DSMZ käuflich erworbenen runden und in kleinen Verbänden wachsenden Zellen stammen ursprünglich aus dem peripheren Blut eines 73-jährigen Mannes, der sich zum Entnahmezeitpunkt 1993 in der Blastenkrise der CML befand. Diese Zellen tragen das Philadelphia-Chromosomen und besitzen eine Verdopplungszeit von etwa 48 Stunden.

### **3.1.5.14 EM-2**

Die EM-2-Zellen stammen von einem fünfjährigen kaukasischen Mädchen im Rezidiv einer Philadelphia-positiven Chronisch Myeloischen Leukämie am Tag +28 nach einer Knochenmarkstransplantation. Diese Zelllinie zeichnet sich durch runde bis ovale Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von 35 bis 40 Stunden aus.

### 3.1.6 Restriktionsenzyme und Puffer

**Tabelle 6:** Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme und deren Puffer

Name	Puffer	Schnittstellen	Besonderheiten	Hersteller
BamH1	NEBU	5' GIGATCC 3' 3' CCTAGIG 5'	+ BSA 37°C	Biolabs
Bgl II	NEB3	5' AIGATCT 3' 3' TCTAGIA 5'	7 Stunden 37°C	Biolabs
EcoR I	EcoR I Puffer	5' GIAATTC3' 3' CTAAIG 5'	7 Stunden 37°C	
NCO I	NEB4	5' CIGATGG 3' 3' GGTACIC 5'	1 Stunde 37°C	Biolabs
Sac II	NEB4	5' CCGCIGG 3' 3' GGICGCC 5'	1 Stunde 37°C	Biolabs
Sma I	NEB4	5' CCCIGGG 3' 3' GGGICCC 5'	1 Stunde 37°C	Biolabs

### 3.1.7 Vektoren

**Tabelle 7:** Übersicht der verwendeten Vektoren

Name	Besonderheit	Hersteller
pEGFP-C2	Neomycin-selektierbar	Becton, Dickinson & Company
pGL Vektor DNA/pGL3 basic		

### 3.1.8 Kits

**Tabelle 8:** Übersicht der verwendeten Kits

Name	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Dual Luciferase Reporter System	Promega
Omniskript RT (50)	Qiagen
peqGold Total RNA Kit	Peqlab
Qiagen Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen
RNeasy plus Mini Kit (50)	Qiagen

### 3.1.9 Primer

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Primer

Name	Annealing Temp. [°C]	Sequenz	Konstruktgröße	Hersteller
18S	55	F: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3' R: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	80 bp	MWG Biotech
Ebp1	55	F: 5'-ACAGCCTGTGGCTGGGAAGGG-3' R: 5'-CTTCAAAGGGGAGAAGTG-3'	356 bp	MWG Biotech
Ebp1 complet	60	F: 5'-ACGAGGCTGCAGTGGTGGTA-3' R: 5'-AGGTGGAGAAGAAGTGCAGT-3'	1321 bp	MWG Biotech
GAPDH	55	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' R: 5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3'	175 bp	MWG Biotech
hErbB1	62	F: 5'-CAGCGCTACCTTGTCATTCA-3' F: 5'-TGCACTCAGAGAGCTCAGGA-3'	195 bp	MWG Biotech
hErbB2	62	F: 5'-CCATAACACCCACCTCTGCT-3' R: 5'-ACTGGCTGCAGTTGACACAC-3'	194 bp	MWG Biotech
hErbB3	62	F: 5'-GCCAATGAGTTCACCAGGAT-3' R: 5'-ACGTGGCCGATTAAGTGTTC-3'	243 bp	MWG Biotech
hErbB4	62	F: 5'-TTTCGGGAGTTTGAGAATGG-3' R: 5'-GAAACTGTTTGCCCCCTGTA-3'	183 bp	MWG Biotech
m/h NRG 1	62	F: 5'-TGAAAGACCTTTCAAACCCCTC-3' R: 5'-CTCTTCTGGTACAGCTCCTCCG-3'	130 bp	MWG Biotech
m/h NRG 2	62	F: 5'-GAAGATGAAGAGCCAGACGG-3' R: 5'-GTCCTTCCCAGGATGTTCT-3'	240 bp	MWG Biotech
m/h NRG 3	62	F: 5'-GACAGGATCCCATAAGCACTGT-3' R: 5'-GATGCCTTGAGGCTGTAGTTCT-3'	299 bp	MWG Biotech
mErbB1	62	F: 5'-AGCAAGGCTTCTTCAACAGC-3' R: 5'-AGACAGGTAGGCTGGGCAGT-3'	376 bp	MWG Biotech
mErbB2	62	F: 5'-GCTGGTCGATGCTGAAGAGT-3' R: 5'-GAGGTCATGTGGAGAGAGGC-3'	271bp	MWG Biotech
mErbB3	62/55	F: 5'-GGAGGCTTGTCTGGATTCT-3' R: 5'-GGGAGTAAGCAGGCTGTGT-3'	238 bp	MWG Biotech
mErbB4 cyt	62	F: 5'-TGCTGAGGAATATTTGGTCCCCCA-3' R: 5'-TCTGGTATGGTGTGGTTGTGGCT-3'	214 bp	MWG Biotech
mErbB4 J/M	62	F: 5'-GAAATGTCCAGATGGCCTACAG-3' R: 5'-AACGGCAAATGTCAGAGCCATG-3'	207 bp	MWG Biotech
RPLP0	55/60/62	F: 5'-TTGTGTTCCACCAAGGAGGAC-3' R: 5'-GACTCTTCCTTGGCTTCAAC-3'	649 bp	MWG Biotech

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

#### **3.2.1.1 Auftauen von Zellen**

Die Zellen werden aus Stickstoff oder aus dem -80°C-Tiefkühlschrank entnommen und in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Die Zellsuspension wird soweit aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen im Kryogefäß vorhanden ist. Es wird 1 ml Auftaumedium hinzugegeben. Im Anschluss daran werden die Zellen mit einer Pipette im Auftaumedium resuspendiert und in das Kulturmedium überführt.

Die aufgetauten Zellen werden für einige Stunden in diesem Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Zellsuspension bei 1500rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in der gewünschten Menge Kulturmedium resuspendiert.

#### **3.2.1.2 Zellen kultivieren**

Die verwendeten Suspensionszellkulturen werden in RPMI 1640 Medium mit zehn Prozent fötalem Kälberserum (FCS), 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nichtessentiellen Aminosäuren, 50 U Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37°C in einer fünf %igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Zellen werden in regelmäßigen Abständen passagiert. Dazu werden sie bei 1500rpm und 20°C für fünf Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das erhaltene Zellpellet in zwei bis zehn ml Kulturmedium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung werden die Zellen in Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte ausgesät. Den Ansätzen der wachstumsfaktorabhängigen Zelllinie Ba/F3 werden drei µl murines Interleukin-3 (m-IL-3) pro zehn ml Mediummenge zugesetzt.

#### **3.2.1.3 Zellen zählen**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe einer „Neubauer“-Zählkammer. Dazu werden zehn µl der jeweiligen Zellsuspension zusammen mit Trypanblau im Verhältnis 1:5 resuspendiert. Das verwendete Trypanblau dient dabei zur Färbung der toten Zellen. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aktiv zu eliminieren. Nach der Vitalfärbung werden die Zellen in die Neubauer-Zählkammer überführt und können gezählt werden. Auch kann jetzt der Anteil lebender und toter Zellen in der Zellkultur bestimmt werden.

Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation von Zellzahl mit Verdünnungsfaktor (5) und Kammerfaktor ( $10^4$ ). Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer lautet somit:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Anzahl der Zellen/Anzahl der ausgezählten Quadrate}) \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

### 3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Vi-Cell XR 2.03

Die Zellen, die sich im Medium befinden und deren Zellzahl bestimmt werden soll, werden in einem Volumen zwischen 0,5 und 2 ml in die vorgesehenen Messgefäße pipettiert und in den Drehteller des Gerätes Vi-Cell XR 2.03 gestellt.

Nach Benennung der Proben und Eingabe von Zellgröße/Zelltyp im Messprogramm arbeitet das Gerät selbständig. Zellen werden mit Hilfe der „*video capture technology*“ automatisch gezählt und mittels des Trypanblau-Farbstoffes in lebendige und tote Zellen unterteilt. Eine spezielle Software bestimmt, welche Zellen den Farbstoff aufgenommen haben und welche nicht.

Gemessene Daten, die neben der Angabe der totalen Zellzahl auch die Zahl der lebenden Zellen und die Vitalität in Prozent enthalten, werden in Microsoft Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA) ausgewertet.

### 3.2.1.5 Zellen einfrieren

Die Suspensionskultur wird für fünf Minuten bei 1500rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das die Zellen enthaltende Pellet wird in 1ml Einfriermedium resuspendiert, in die *Cryo Vials* überführt und für ca. drei Stunden bei -80°C in einem *Cryo 1°C Freezing Container* gelagert. Danach können die Zellsuspensionen entweder für kurze Zeit bei -80°C aufbewahrt werden oder in flüssigen Stickstoff überführt werden, wodurch ein deutlich längerer Aufenthalt möglich ist. Als Einfriermedium kam eine DMSO-Lösung, bestehend aus je 90% FCS und 10% DMSO, zur Verwendung.

### 3.2.1.6 Transfektion mittels Elektroporation

Pro Transfektion wird eine Zellmenge von  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt. Die Zellen werden bei 1500rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, und dem gewonnenen Pellet wird nach Absaugen des Überstandes eine Opti-Mem-Menge von 400 µl zugegeben. Mit Hilfe der Pipette wird das Zellpellet in diesem Medium resuspendiert. Diese Suspension wird in eine „*Gene Pulser*“ Küvette pipettiert, wobei pro Küvette werden 20 µg der zu transfizierenden DNA hinzugegeben werden.

Es folgt die eigentliche Elektroporation mit dem *Gene Pulser XCell* der Firma Bio-Rad. Für die jeweiligen Zelllinien herrschen unterschiedliche Pulserbedingungen:

Name der Zelllinie	Programm
K562	155 V 1000 $\mu$ F $\infty\Omega$
HL 60	140 V Pulse length 25 ms Pulse intens. .0 Cuv 2 mm

Nach der Elektroporation wird das DNA-Zell-OptiMem-Gemisch in der Küvette auf 1000  $\mu$ l mit Antibiotika-haltigem Selektionsmedium aufgefüllt und mit einer sterilen Glaspasteurpipette in eine kleine Zellkulturflasche, die bereits 9 ml des Selektionsmediums enthält, überführt.

### 3.2.1.7 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion sollen die transfizierten DNA-Konstrukte in das Genom der Zellen eingebaut werden. Nur die das Konstrukt tragenden Zellen sollen kultiviert werden. Aus diesem Grund sind die DNA-Konstrukte in einen Vektor kloniert worden, der neben einer GFP-*Site* auch eine Antibiotikaresistenz (Neomycin) für eukaryotische Zellen zu Selektionszwecken enthält.

Daher beinhaltet das Selektionsmedium für die Suspensionszellen zusätzlich zum PenStrep noch 1,5 mg/ml G418, um nur die Zellen, welche den gewünschten Vektor enthalten, selektionieren zu können.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops lassen sich Zellen detektieren, die den Vektor (und somit auch das DNA-Konstrukt) enthalten. Auch können die Zellen aufgrund des GFPs mittels Durchflusszytometrie auf Reinheit sortiert werden.

### 3.2.1.8 Zellen vorbereiten zum Sortieren (Sortieren)

Die Suspensionszellen werden ausgezählt. Die gewünschte Zellzahl (meist  $1 \times 10^7$  Zellen) wird im Medium für fünf Minuten bei 1500rpm abzentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 1 ml Selektionsmedium oder 1x PBS aufgenommen, so dass die Endkonzentration  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Medium beträgt. Die Zellen werden anschließend zum Sortieren gebracht. Es wird stets eine Kontrolle mit nicht transfizierten Zellen benötigt, um einen Überblick über die eigentliche Zellgröße zu behalten. In dieser Arbeit dienen K562-Zellen als Kontrollinstanz.

### 3.2.1.9 Cytospins

Transfizierte Zellen sollen mittels Cytospin auf einen Objektträger gebracht werden, um die konfokale Mikroskopie anwenden zu können.

Die Zellen werden geerntet und abzentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wird in 600 ml 1x PBS aufgenommen. Die Objektträger (Shandon Cryoträger) werden mit den Shandon *Filter Cards* in die entsprechenden Vorrichtungen eingelegt. Pro Objektträger werden 200 µl der jeweiligen Zellsuspension in die entsprechende Öffnung der Vorrichtung pipettiert. Daraufhin erfolgt eine Zentrifugation mit 400rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur in der Shandon Thermo Cytospin 4 Fuge. Anschließend werden die Objektträger für zehn Minuten in 4% Paraformaldehyd fixiert und nachfolgend dreimal für je zehn Minuten in 1x PBS gewaschen. Die Objektträger werden nach dem Trocknen im Dunkeln bis zur Weiterarbeit gelagert. Es folgt die konfokale Mikroskopie.

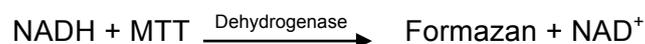
### 3.2.2 Proliferationsversuche

#### 3.2.2.1 Proliferationsassay

Die gewünschten Zellen der jeweilige Zelllinien werden in zu untersuchender Konzentration in Triplets auf einer 6-Well-Platte in einer Zellkonzentration zwischen 1 bis 4 x 10<sup>5</sup> Zellen in 3-4 ml Medium ausgesät. Die Zellen wachsen zunächst für drei bis vier Stunden im Inkubator bei 37°C. Im Anschluss an diese Inkubationszeit werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des zu untersuchenden Medikaments (hier Imatinib) behandelt. Die Zellen werden für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit Hilfe des Vi-Cells XR 2.03 ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl werden zwischen 1 bis 2 ml der Zellsuspension eingesetzt. Gewonnene Daten werden mittels in Microsoft Excel ausgewertet.

#### 3.2.2.2 MTT-Zytotoxizitätsassay

Unter MTT versteht man einen Zytotoxizitäts-Assay, welcher die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen unter Einfluss von Medikamenten oder anderen Stoffen in unterschiedlichen Konzentrationen bestimmen kann. Der MTT-Assay misst die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenase in lebenden Zellen, unabhängig davon, ob zum Zeitpunkt der Analyse DNA synthetisiert wird oder nicht. Das dabei verwendete, schwach gelbe Tetrazoliumsalz MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid] wird von den Suspensionszellen aufgenommen. In diesen wird es durch NADH in einer succinatabhängigen dehydrogenase-katalysierten Reaktion der aktiven Mitochondrien zum blau-violetten Formazan [1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan] reduziert:



Diese Reaktion ist irreversibel. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert die Zellen und setzt dadurch das gebildete Formazan frei. Die Intensität dieser Formazanlösung kann

anschließend photometrisch bei 570 nm am ELISA-Reader gemessen werden. Die Höhe der Absorption ist dabei proportional zur mitochondrialen Aktivität der Zellen.

Zur Durchführung des Testes werden die Zelllinien in einer Konzentration von  $9 \times 10^3$  Zellen / Well in 150  $\mu$ l des entsprechenden Zellmediums in „96-Well-Platten“ mit flachem Boden ausgesät. Die Zellen werden nun für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Vorinkubation werden die Zellsuspensionen mit je 50  $\mu$ l der Arzneistoff-Lösung in steigender Konzentration versetzt. Jede Konzentrationsstufe wird dabei neunfach angesetzt. Jeweils neun Wells mit reinem Kulturmedium ohne Zellsuspension und Arzneistoff dienen dabei als Hintergrund. Neun Wells mit Zellsuspension ohne Arzneistoff werden für die spätere Nullwertbestimmung benötigt. Die Platten werden erneut für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird jedem Well 10  $\mu$ l einer 10 mg/ml MTT-Lösung zugesetzt. Es folgt eine zweistündige Inkubation der Platten bei 37°C mit anschließender Zugabe von 90  $\mu$ l Lyse-Puffer (15% SDS in Dimethylformamid / Wasser 1:1; pH4.5), welche die Freisetzung des gebildeten Formazans durch Auflösen der Zellen initiiert. Die Platten werden mit Hilfe von Alufolie lichtundurchlässig verschlossen und schütteln über Nacht bei Raumtemperatur. Das Absorptionsspektrum der Proben wird mittels eines ELISA-Readers gemessen, wobei die Intensität der Farbentwicklung im direkten Verhältnis zur Anzahl der proliferierenden Zellen steht. Die Dosis-Wirkung-Beziehung und der IC<sub>50</sub>-Wert werden in Microsoft Excel übertragen und anschließend mit Hilfe der Calcosyn-Software nach der „median-effect method“ von Chou und Talalay<sup>30, 31</sup> bestimmt.

### 3.2.3 Durchflusszytometrie

#### 3.2.3.1 Fixieren und Permeabilisieren von Zellen

Die sich in der Suspension befindenden Zellen werden geerntet und für fünf Minuten bei 2000rpm abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit 1 ml eiskaltem 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Das erneut gewonnene Pellet wird zum Fixieren in 400  $\mu$ l 2% Paraformaldehyd (gelöst in 1x PBS) resuspendiert. Es schließt sich eine zehn-minütige Inkubationszeit bei 37°C an. Danach wird die Probe für eine Minute auf Eis gelagert und daraufhin zentrifugiert (fünf Minuten, 2000rpm, RT). Das resultierende Pellet wird anschließend in 200  $\mu$ l 90% Methanol (in 1x PBS) aufgenommen. Die Probe wird für eine halbe Stunde bei 4°C gelagert, bevor sie bis zur Weiterarbeit bei - 20°C eingefroren werden kann.

#### 3.2.3.2 Antikörperfärbung

Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden in dem gewünschten Volumen (meist zwischen 10 und 100  $\mu$ l) in 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Eine mögliche Kontrolle wird

auf drei Reaktionsgefäße verteilt (dies dient der Messung der Autofluoreszenz und Isotypkontrolle mit Hilfe des Antikörpers und Sekundärantikörpers).

Zunächst werden zu jeder Probe zwischen 500 und 1000 µl 0,5% BSA (gelöst in 1x PBS) gegeben. Es folgt eine fünf-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur. Der sich anschließenden Zentrifugation (fünf Minuten, 2000rpm, RT) folgt ein Absaugen des entstandenen Überstandes. Wieder werden zu jeder Probe zwischen 50 und 100 µl 0,5%iges BSA gegeben. Allen Proben, die mit dem eigentlichen Primärantikörper markiert werden sollen, wird der erste Antikörper in einer Konzentration von 1:50 hinzugefügt. Die Autofluoreszenz sowie die Isotypkontrolle bleiben unbeachtet. Alle Proben werden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit werden 1000 µl 0,5% BSA (in 1x PBS gelöst) zu den antikörperbehandelten Proben pipettiert. Diese werden im Anschluss zentrifugiert (fünf Minuten, 2000rpm, RT). Der Überstand wird erneut abgesaugt. In alle Proben, die bereits mit dem primären Antikörper behandelt wurden, sowie in die Proben für die Isotypkontrolle, wird ein FITC-*gelabelter* Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 gegeben. Die Proben werden abgedunkelt und zwischen 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1 ml 0,5% BSA (in 1x PBS gelöst) mit nachgeschalteter Zentrifugation zu den bereits genannten Konditionen. Der Überstand wird erneut entfernt, und das gewonnene Pellet wird in 300 µl 1x PBS (eiskalt) resuspendiert und in die für die Messung vorgesehenen Röhrchen überführt. Es schließt sich die Messung im Durchflusszytometer an.

### **3.2.4 Arbeiten mit DNA**

#### **3.2.4.1 Animpfen für Maxi Preps**

Eine Bakterieneinzelkolonie wird von einer Platte gepickt und in einer Vorkultur in 2-5 ml Medium für acht Stunden schüttelnderweise inkubiert. Diese Starterkultur wird im Verhältnis 1:500 bis 1:1000 in Antibiotika-haltigem Selektivmedium gelöst (100 ml Medium + 100-200 µl Starterkultur). Der Ansatz wird bei 37°C für 12-16 Stunden geschüttelt, damit die Bakterienkultur wachsen kann.

#### **3.2.4.2 Animpfen für Mini Preps**

Ein 15 ml-Falkonröhrchen wird mit 2 ml LB-Medium und dem jeweiligen Selektionsantibiotikum befüllt (1 µl Ampicillin + 1 ml LB-Medium). Nun wird mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze ein einzelner Klon von der mit Bakterienkolonien bewachsenen Agarplatte in das vorbereitete Falkonröhrchen gegeben. Das Röhrchen wird über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler geschwenkt. Am nächsten Tag zeichnet sich das

Bakterienwachstum durch eine milchig-trübe Färbung des Mediums aus. Die Suspension kann nun genutzt werden, um DNA daraus zu isolieren (siehe Mini Preps).

### **3.2.4.3 DNA-Isolierung (Mini Preps)**

Die Bakteriensuspension wird, sobald sie trüb ist, in ein 2 ml Eppendorftube überführt. Die Proben werden zentrifugiert (eine Minute, 14.000rpm, RT). Anschließend wird der Überstand abgegossen. Die Lyse der Bakterien erfolgt mit Hilfe von je 100 µl eiskalter Solution I, die 100 µg/ml RNase enthält. Die Proben werden mittels Vortexer resuspendiert. Es werden 200 µl frisch angesetzte Solution II hinzugegeben. Die Proben werden durch Schwenken gemischt und im Anschluss für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgt die Zugabe von 150 µl eiskalter Solution III. Wieder werden die Proben vermischt. Es schließt sich eine halbstündige Inkubationszeit auf Eis an. Nach deren Ablauf werden die Proben für zehn Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert, und der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgt die Zugabe von je 1 ml 100%igem Ethanol zu jeder Probe mit nachfolgender zehn-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm. Zu den erhaltenen Pellets wird je 1 ml 70%iger Ethanol pipettiert und erneut zentrifugiert (eine Minute, 14.000 rpm, RT). Das Pellet wird an der Luft getrocknet, bis es durchsichtig erscheint. Je nach Größe des Pellets erfolgt die Zugabe von 10-50 µl dEPC-Wasser oder TE-Puffer.

### **3.2.4.4 DNA-Isolierung (Maxi Prep) mittels eines Kits der Firma Qiagen**

Dieses Protokoll dient der Präparation von bis zu 500 µg *High-* oder *Low-copy* Plasmid- oder Cosmid-DNA. Vor Beginn des Versuchs werden die im Kit enthaltenen Lösungen nach Anleitung vorbereitet. Nun beginnt die eigentliche DNA-Isolierung. Die mit einer Einzelkolonie angeimpfte Kultur wird bei 6000 g für 15 Minuten bei 4°C mit Hilfe des SLC 6000-Rotors zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird in 10 ml P1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Dem Lysat werden 10 ml P2 zugegeben. Es folgt ein gründliches Vermischen der einzelnen Komponenten mit anschließender fünf-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt werden 10 ml des vorgekühlten Puffers P3 hinzugegeben und sofort durch schnelles Schwenken vermischt. Es schließt sich eine 20-minütige Inkubation auf Eis an. Bei 20.000 g wird 30 Minuten lang bei 4°C mit dem SS 34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, muss prompt vom Pellet entfernt werden. Über ein Qiagen-Tip 500 werden 10 ml QBT-Puffer zur Äquilibrierung der Säule gefügt. Im nächsten Schritt wird der Überstand auf die Säule gegeben. Die Qiagen-Tip 500 wird zweimalig mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die sich auf dem Tip befindende DNA wird mit 15 ml Puffer QF eluiert und in einem 50 ml Tube aufgefangen. Es schließt sich die Präzipitation der DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol zum Eluat an. Nach Zugabe des Isopropanols und sofortigem Mischen,

folgt eine Zentrifugation bei 15.000 g für 30 Minuten bei 4°C (oder 5000 g, 60 Minuten bei 4°C). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, und zum Pellet werden 5 ml 70%iger Ethanol gegeben. Erneut wird bei 15.000 g für zehn Minuten bei 4°C (oder 5000 g, 60 Minuten bei 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, und das Pellet wird für fünf bis zehn Minuten an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Pellet in einer geeigneten Menge Puffer (TE) oder Wasser gelöst.

### 3.2.4.5 Elution von DNA aus Whatman Papier

Zum Verschicken verschiedener Proben werden die DNA-haltige Lösung auf Whatmanfilterpapier pipettiert, die Umrisse mittels eines Bleistiftes markiert und anschließend trocknen gelassen. Abgedeckt mit Folie wird die DNA so in getrockneter Form verschickt. Um die DNA erneut in Lösung zu bringen, wird der mit Bleistift markierte Teil ausgeschnitten und in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 50 µl Milli Q Wasser wird das Gefäß bei 37°C für dreißig Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wird das Papier aus dem Reaktionsgefäß entfernt, so dass die DNA-Konzentration bestimmt werden kann.

### 3.2.4.6 Elution von DNA-Banden aus einem Agarosegel

Dieses Protokoll dient zum Extrahieren und Aufreinigen von 70 bp bis zehn kbp großer DNA aus Standard oder *low melt* Agarosegelen in TAE oder TBE Puffern.

Die Banden, welche die gewünschte DNA enthalten, werden mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus dem ein %-igen Agarosegel ausgeschnitten und anschließend in einem Eppendorf Reaktionstube gewogen. Pro ein Volumen Gel (1 Vol ~ 100 mg) werden drei Volumen QG-Puffer (1 Vol ~ 100 µl) hinzugefügt. Die Proben werden bei 50°C für zehn Minuten auf dem Heizblock geschüttelt, bis das Gelstück komplett gelöst ist. Wenn sich die Lösung im optimalen pH-Bereich befindet, ist ein gelber Farbumschlag als Indikator zu beobachten. Bei einem orange-violetten Farbumschlag werden der Lösung 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5.0 hinzugemischt. Ist eine Gelbfärbung der Lösung erreicht, wird 1 Gel Volumen Isopropanol (100 mg ~ 100 µl) zugefügt. Die DNA-Lösung wird auf eine Qiagen Säule, welche auf ein 2 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt wird, pipettiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 13.000 rpm. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird nachfolgend mit 500 µl QG Puffer beladen, wenn die später gewonnene DNA für Sequenzierungen benutzt werden soll. Es schließt sich ein erneuter Zentrifugationsschritt (eine Minute, 13.000 rpm, RT) an. Der Durchfluss wird wieder verworfen. Es werden nun 750 µl PE Puffer auf die Säule pipettiert, worauf eine zwei- bis fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur folgt. Es schließen sich zwei weitere Zentrifugationsschritte mit Entsorgung des Durchflusses an, um die verbleibenden Alkoholreste zu beseitigen. Die Säule wird auf ein neues 1,5 ml

Reaktionsgefäß gesetzt, und auf die Mitte der Säule werden 50 µl EB Puffer (auch Wasser ist hierfür möglich) pipettiert. Nach einer Zentrifugation zu bekannten Bedingungen enthält der gewonnene Durchfluss die aus dem Agarosegel eluierte DNA.

### **3.2.4.7 Konzentrationsmessung mit dem NanoDrop**

Bei den Konzentrationsmessungen mit dem NanoDrop von der Firma Paqlab werden nur noch sehr geringe Probemengen (2 µl) direkt eingesetzt. Die mitgelieferte Software bietet unterschiedliche Messprogramme (für Nucleinsäuren, Proteine, etc.). Nach Pipettieren des Blanks (dabei handelt es sich um den Puffer, in dem sich auch die Proben befinden) kann direkt die jeweilige Messung erfolgen. Alle Konzentrationen werden sogleich mit Hilfe der mitgelieferten Software angezeigt.

### **3.2.4.8 Messung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe des UV-Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben werden mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) im Verhältnis 1:20 verdünnt (5 µl DNA und 95 µl DEPC-Wasser), so dass sie im Absorptionsbereich zwischen 0.1 und 1.0 mit Hilfe des entsprechenden Programms im Photometer gemessen werden können. Als Blank dient der jeweilige Puffer.

### **3.2.4.9 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, die es ermöglicht Nucleinsäuren nach ihrer Größe und Struktur in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Es werden Agarosegele mit unterschiedlichem Agarosegehalt (ein bis fünf %) verwendet. Dazu wird der entsprechende Anteil der einen Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und anschließend in die Gelgießkammer der gewünschten Größe gegossen. Nach dem Polymerisieren der Agarose wird das Agarosegel in die Elektrophoresekammer überführt und ebenfalls mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die mit Laufpuffer versetzten Proben werden aufgetragen und die Nucleinsäuren bei 70-100V aufgetrennt. Zu Dokumentationszwecken werden die Agarosegele im UV-Licht fotografiert.

## **3.2.5 Arbeiten mit RNA**

### **3.2.5.1 RNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit**

Pro Ansatz werden  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet, aus denen mit Hilfe des Kits „Qiagen RNeasy Mini“ die RNA isoliert werden soll. Nachdem die Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit einem Medikament behandelt worden sind, werden sie geerntet und abzentrifugiert (fünf Minuten, 1500 rpm, RT). Nachfolgend werden sie zweimalig in 1x PBS gewaschen. Nach

dem Waschen wird das gewonnene Pellet in 600 µl des im Kit enthaltenen RLT-Puffers mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und gut darin resuspendiert, bis die Lyse der Zellen einsetzt. Zum homogenisierten Lysat werden 600 µl 70% Ethanol gegeben und gut vermischt. Die Suspension wird nun auf die *RNeasy mini colum* (Säule), welche sich auf einem mitgelieferten Sammelgefäß befindet, gegeben. Es folgt eine Zentrifugation (15 Sekunden, 14.000 rpm, RT). Der Durchlauf wird verworfen. Nun werden 700 µl des RW1-Puffers auf die Säule pipettiert. Es schließt sich ein erneuter Zentrifugationsschritt zu den oben beschriebenen Bedingungen an. Im Zuge dieser Arbeit wurde nach diesem Schritt ein DNase Verdau auf der Säule angeschlossen, um besonders reine RNA zu erhalten. Dazu werden 10 µl der gelösten DNase I zusammen mit 70 µl RDD auf die Säule gegeben, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss werden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 14.000 rpm, RT). Die Säule wird auf ein neues Sammelgefäß gesetzt, und es werden 500 µl des RPE Puffers hinzugegeben. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation (15 Sekunden, 14.000 rpm, RT) an. Wieder werden 500 µl RPE-Puffer über die Säule gegeben. Es folgen zwei Zentrifugationen (1: zwei Minuten, 2: eine Minute, 14.000 rpm, RT). Der Durchfluss wird jedes Mal verworfen, bevor 50 µl DEPC-Wasser auf die Säule gegeben wird. Nach Zentrifugation (eine Minute, 14.000 rpm, RT) wird der Durchlauf erneut auf die Säule gegeben und wieder abzentrifugiert (eine Minute, 14.000 rpm, RT). Der gewonnene Durchlauf enthält die eluierte RNA.

### **3.2.5.2 RNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy plus Kit**

Dieses Kit ist speziell hergestellt worden, um eine Kontamination der gewonnenen RNA mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Durchführung dieser Methode erfolgt nach dem mitgelieferten Protokoll. Die behandelten Zellen werden nach dem Waschen mit nachfolgendem Lysieren auf eine *gDNA Eliminator spin colum*, welche sich auf einem mitgelieferten Sammelgefäß befindet, gegeben. Es folgt eine Zentrifugation (30 Sekunden, 14.000rpm, RT). Die folgenden Arbeitsschritte decken sich mit den zuvor beschriebenen Vorgehensweisen aus dem Qiagen RNeasy Mini Kit-Protokoll.

### **3.2.5.3 RNA-Isolierung mittels Trizol**

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt unter anderem mittels der Trizol-Methode. Die geernteten Zellen werden zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für zehn Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Damit sollen die Reste des Mediums entfernt werden. Anschließend gibt man, je nach Größe des Zellpellets, 0,5 bis 1 ml Trizol zu den Pellets. Mit Hilfe einer Pipette wird das Zellpellet lysiert und danach für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 µl Chloroform.

Die Reaktionsgefäße werden vorsichtig geschwenkt, um den Inhalt gut zu vermischen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur werden diese dann abzentrifugiert (15 Minuten, 14.000 rpm, 4°C).

Nach diesem Zentrifugationsschritt entstehen drei unterschiedliche Phasen: eine obere wässrig-farblose Phase, welche die Gesamt-RNA enthält, eine Interphase, in der sich viele Proteine befinden, und eine untere Phenol/Chloroform-Phase. Die Separation erfolgt durch die Weiterarbeit mit der oberen wässrigen Phase, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird.

In den nächsten Schritten folgt die RNA-Präzipitation. Zur wässrigen Phase werden 500 µl Isopropanol gegeben. Wieder werden die Proben für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin zentrifugiert (15 Minuten, 14.000 rpm, 4°C). Der Probenüberstand wird nach diesem Zentrifugationsschritt vorsichtig verworfen, und das verbleibende RNA-Pellet wird mit 1 ml 75% Ethanol/DEPC- H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach vorsichtigem Vortexen der Proben folgt eine erneute Zentrifugation der Proben (zehn Minuten, 10.000 rpm, 4°C). Dieser Waschschrift wird insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend werden die RNA-Pellets getrocknet und schließlich DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Proben werden zuletzt für zehn Minuten bei 55°C auf einem Heizblock geschüttelt, um sicher zu gehen, dass sich die RNA vollständig im DEPC- H<sub>2</sub>O löst.

Um einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA vorzubeugen, wird im Anschluss ein DNase-Verdau durchgeführt.

### **3.2.5.4 Dnase-Verdau der RNA**

Für den DNase-Verdau kann ein beliebiges Volumen RNA gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde meist mit folgendem Ansatz gearbeitet:

16 µl der isolierten RNA

2 µl 10x Reaktion Buffer (Sigma)

2 µl Amplification Grade DNase I, 1U/µl (Sigma)

20 µl Gesamtvolumen

Die einzelnen Komponenten werden vorsichtig vermischt und 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird dem Ansatz 1 µl Stop Solution (Sigma) zur DNase-Inhibition zugefügt. Es folgt ein weiterer Inkubationsschritt für zehn Minuten bei 70°C. In diesem Schritt wird die DNase denaturiert. Nachfolgend wird der Ansatz bei geplanter Weiterarbeit zunächst auf Eis gestellt oder kann bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.5.5 Doppelter Dnase-Verdau

Das doppelte (dreifache...) DNase Verdau Verfahren ist bis zur Zugabe der DNase identisch mit dem des einfachen DNase Verdau. Es wird jedoch nach der 20-minütigen Inkubationszeit nicht die Stop Solution eingesetzt, sondern erneut die Amplification Grade DNase I, 1U/µl von der Firma Sigma. Wieder wird das Gemisch für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach kann erneut Amplification Grade DNase I, 1U/µl (Sigma) mit anschließender Inkubation hinzugegeben werden (dreifacher Verdau), oder die Reaktion wird durch Zugabe von Stop Solution mit darauffolgender zehn-minütiger Inkubation bei 70°C beendet.

### 3.2.5.6 Konzentrationsmessung RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe des UV-Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben werden mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) im Verhältnis 1:100 verdünnt (1 µl RNA und 99 µl DEPC-Wasser), so dass sie im Absorptionsbereich zwischen 0.1 und 1.0 mit Hilfe des RNA-Programms im Photometer gemessen werden können. Als Blankwertmessung dient der jeweilige Puffer.

### 3.2.5.7 Überprüfung der Reinheit von RNA

Um die Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen, wird eine PCR (Programm siehe Anhang), bei der als Template die gewonnene RNA eingesetzt wird, durchgeführt. Diese PCR wird mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels ausgewertet. Die Proben sind kontaminationsfrei, wenn unter UV-Licht keine Banden im Agarosegel detektierbar sind. Es wird dabei stets eine Positivkontrolle verwendet.

### 3.2.5.8 First Strand cDNA-Synthese

In ein 1,5 ml Eppendorfgefäß werden zu einer RNA-Menge (100 bis 150 ng) 1 µl Oligo-dT-Primer (500 µg/ml), 1 µl dNTP-Mix (10mM each) sowie PCR-Wasser pipettiert. Das Endvolumen beträgt 12 µl. Als Negativkontrolle wird anstelle der RNA 1 µl PCR-Wasser verwendet. Die Proben werden für fünf Minuten auf einen 65°C warmen Heizblock gestellt. Im Anschluss werden die Proben sofort auf Eis gekühlt. Vor Zugabe weiterer Bestandteile werden alle Proben kurz zentrifugiert (zehn Sekunden, 14.000 rpm, RT), um eventuelle Kondensationsreste vom Gefäßdeckel zu gewinnen. Im nächsten Schritt werden 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Rnase out den Proben zugeführt. Der Inhalt mit einem Endvolumen von 20 µl wird vorsichtig vermischt, und die Proben werden für zwei Minuten auf einem Heizblock bei 42°C inkubiert. Zu jeder Probe werden 1 µl (200 Units) Superscript II RT gegeben. Die Reverse Transkriptase kann komplementäre DNA (cDNA *-copy*-DNA) aus einer vorhandenen RNA-Matrize erstellen. Um dem Enzym die nötigen 3'-OH-Gruppen zu

liefern, werden die Oligo(dT)-Primer an den poly(A)-Schwanz des 3'-Endes der mRNA hybridisiert. Unter entsprechenden Bedingungen synthetisiert die Reverse Transkriptase mit den zugegebenen vier dNTP's (Desoxynucleotidtriphosphaten) nun eine Kopie der eingesetzten mRNA, ein cDNA-mRNA-Hybrid. Von jeder Probe werden je ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase hergestellt. Dieser Vorgang dient ebenfalls dem Ausschluss von Kontaminationen.

Die Proben werden erneut gut vermischt und für 50 Minuten bei 42°C auf einem Heizblock inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit erfolgt eine zweite fünfzehnminütige Inkubation der Proben bei 70°C. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wird die Konzentration der Proben mit Hilfe eines Photometers gemessen.

### **3.2.5.9 Konzentrationsmessung der cDNA**

Die Bestimmung der cDNA-Konzentration erfolgt mit Hilfe des UV-Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben werden mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) im Verhältnis 1:20 verdünnt (5 µl cDNA und 95 µl DEPC-Wasser), so dass sie im Absorptionsbereich zwischen 0.1 und 1.0 mit Hilfe des entsprechenden Programms im Photometer gemessen werden können. Als Blank dient meist der jeweilige Puffer.

### **3.2.5.10 PCR**

Diese Methode dient der Amplifikation bestimmter Sequenzen. Für die Polymerase Kettenreaktion werden unten genannte Inhaltsstoffe miteinander gemischt. Die Ansätze werden dazu wie folgt pipettiert:

150 ng cDNA

x µl PCR-Wasser

2 µl Primer Mix (10 mmol f+r)

12,5 µl Red Taq Ready Mix

25 µl Gesamtvolumen

Zu jeder PCR gehört eine Negativkontrolle, bei der statt der cDNA PCR-Wasser verwendet wird. Als Positivkontrolle dient cDNA, die sicher zu einem nachweisbaren Ergebnis führt. Abhängig vom verwendeten Primer und der erwarteten Konstruktgröße werden die Proben in unterschiedlichen Programmen (siehe Anhang) auf einem PCR-Gerät laufen gelassen.

### 3.2.6 Arbeiten mit Bakterien

#### 3.2.6.1 Restriktionsverdau

Bei dieser Methode können mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonucleasen definierte DNA-Fragmente gewonnen werden oder in einen Vektor klonierte DNA aus diesem herausgeschnitten werden.

Der Ansatz sieht im Allgemeinen wie folgt aus:

1U Enzym  
2 µl 10x Enzym-Puffer  
0,2-1 µg DNA  
Ad 20 µl Wasser  
20 µl Gesamtvolumen

Bei einigen Restriktionsendonucleasen muss dem Ansatz zusätzlich noch BSA zugesetzt werden. Die optimalen Temperaturen (meist 37°C), bei denen die jeweiligen Restriktionsendonucleasen arbeiten können, werden von den Hersteller definiert. Meist wird eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Auswertung des Verdaus erfolgt mit Hilfe der Größenbestimmung der enthaltenen Fragmente mittels Agarosegel.

#### 3.2.6.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Bakterien DH5α Competent Cells von der Firma Invitrogen werden vorsichtig auf Eis angetaut. Zu 25 µl der Bakterien werden 5 µl DNA-Lösung pipettiert und vorsichtig vermischt. Es wird ebenfalls mit einer Negativkontrolle (pUC 19 Kontroll DNA) gearbeitet. Das Bakterien-DNA-Gemisch wird für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt der Hitzeschock. Die Proben werden vom Eis direkt für 20 Sekunden in ein 37°C warmes Wasserbad eingetaucht und nach Ablauf dieser Zeit erneut für zwei Minuten auf Eis belassen. Nun werden zu jeder Probe 450 µl vorgewärmtes LB-Medium gegeben, und die Proben werden für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler geschwenkt. Im Anschluss werden die Proben zentrifugiert (fünf Minuten, 14.000 rpm, RT), und der jeweilige Überstand wird bis auf ein Restvolumen von ca. 100 µl abpipettiert. In diesem verbleibenden Restvolumen wird das Pellet resuspendiert. Etwa 30 µl dieser Suspension werden auf vorgewärmte, LB-Selektionsantibiotikum enthaltene Agarplatten mit Hilfe einer Impföse ausgestrichen, wobei die Platten luftdicht mit Hilfe von Parafilm verschlossen werden. Die Platten lagern über Nacht in einem 37°C warmen Inkubationsschrank.

Bei erfolgreicher Transformation zeigen sich auf den Platten Bakterienkolonien. Die pUC19-Kontroll-DNA-(Negativkontrolle)-Platte darf kein Bakterienwachstum aufweisen. Die Bakterienkolonien können nun weiterbearbeitet werden (siehe Animpfen für DNA-Isolierung).

### **3.2.7 Proteinbiochemie**

#### **3.2.7.1 Herstellung von Zelllysaten in Urea-Puffer**

Die ausgesäten Zellen werden geerntet und abzentrifugiert. Das bei der Zentrifugation gewonnene Pellet wird in 500 µl Urea-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Zur vollständigen Lyse werden die Proben für 20 Minuten bei 21°C auf einem Schüttler geschwenkt. Im Anschluss werden die Proben abzentrifugiert (20 Minuten, 14.000 rpm, RT). Der Überstand wird gesammelt und kann entweder weiterbearbeitet oder bei - 80°C gelagert werden.

#### **3.2.7.2 Herstellung von Zelllysaten in 150mM-Lysispuffer**

Die ausgesäten Zellen werden geerntet und abzentrifugiert. Das bei der Zentrifugation gewonnene Pellet wird in 500 µl 150 mM Lysispuffer aufgenommen und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nachfolgend werden die Proben zentrifugiert (20 Minuten, 14.000 rpm, 4°C). Der dabei gewonnene Überstand kann entweder direkt bearbeitet oder bis zur Weiterarbeit bei - 20°C gelagert werden.

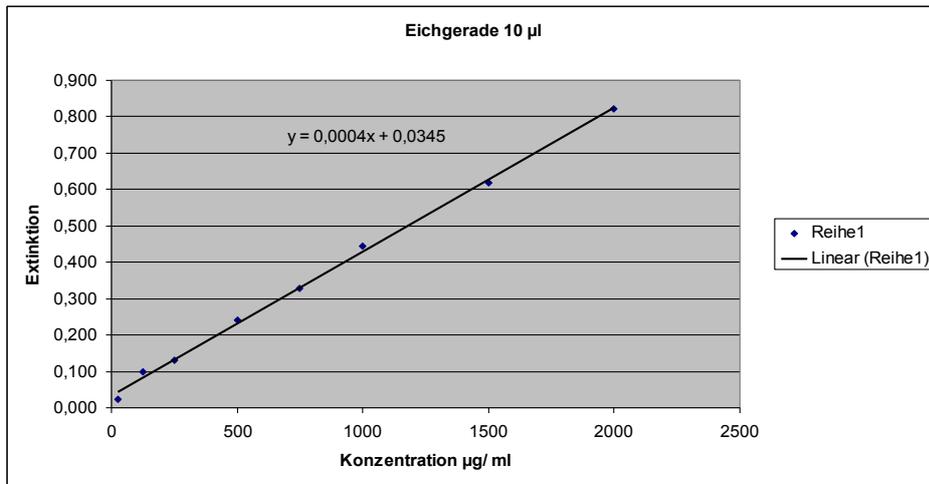
#### **3.2.7.3 BCA-Proteinassay**

Der BCA-Proteinassay dient der Proteinkonzentrationsbestimmung. Zunächst wird mit Hilfe des im Kit enthaltenen BSAs und des Puffers, in dem auch die Zellen lysiert worden sind, eine Eichkurve nach dem dort angegebenen Schema pipettiert.

Hierauf wird die im Kit enthaltene Working Reagent (WR) hergestellt. Die fertige Lösung kann einige Tage lang bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die benötigten Felder einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit rundem Boden werden zunächst mit 200 µl WR befüllt. Im Anschluss erfolgt die Zugabe von je 10 µl Probe. Von jeder Probe, einschließlich der Proben aus der Eichreihe, wird eine Dreifachbestimmung gemacht.

Die Platte wird für 30 Sekunden im Schüttelprogramm des ELISA-Readers geschwenkt. Es folgen das Verschließen der Mikrotiterplatte und eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Nach diesem Inkubationsschritt wird die Platte für fünf Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die sich anschließende Messung der Proteinkonzentration mit dem ELISA-Reader muss innerhalb von zehn Minuten bei 562 nm erfolgen.

Mit Hilfe eines Excel-Programms werden die Meßwerte analysiert:



### 3.2.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford Protokoll

Zunächst werden zwei unterschiedlich konzentrierte Lösungen (Lösung A und Lösung B) für die Eichgerade hergestellt. Lösung A beinhaltet 50  $\mu\text{l}$  BSA-Stammlösung (100 mg/ml) sowie 950  $\mu\text{l}$  des Lysispuffers, in dem sich auch das später zu messende Proteingemisch befindet. Lösung B enthält ebenfalls 950  $\mu\text{l}$  dieses Lysispuffers, jedoch anstelle von BSA 50  $\mu\text{l}$  Wasser.

Werden geringe Proteinkonzentrationen erwartet, bietet sich das folgende Pipettierschema für die entsprechende Eichgerade an:

Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	5	4	3	2	1	0,75	0,5	0,25	0,1	0
Lösung A [ $\mu\text{l}$ ]	100	80	60	40	20	15	10	5	2	0
Lösung B [ $\mu\text{l}$ ]	0	20	40	60	80	85	90	95	98	100

Für höhere Proteinkonzentrationen wählt man das Pipettierschema für die unten stehende Eichgerade:

Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	10	8	6	4	2	1	0,5	0
Lösung A [ $\mu\text{l}$ ]	100	80	60	40	20	10	5	0
Lösung B [ $\mu\text{l}$ ]	0	20	40	60	80	90	95	100

Von jeder Konzentration, die man durch das Pipettieren der Eichgerade erhalten hat, werden 30 µl eingesetzt. Zu dieser Menge werden zusätzlich noch 30 µl 0,1 M Salzsäure (HCl) sowie 240 µl Wasser gemischt.

Im Anschluss werden die Proben mit der noch unbekanntem Proteinkonzentration vorbereitet. Auch in diesem Fall werden von jeder Probe, deren Konzentration bestimmt werden soll, 30 µl unverdünnt eingesetzt und mit 30 µl 0,1 M Salzsäure (HCl) und 240 µl Wasser vermischt.

Im letzten Schritt erfolgt die Herstellung einer Blindprobe (Blank). Diese enthält 30 µl des Lysispuffers sowie ebenfalls 30 µl 0,1 M Salzsäure (HCl) und 240 µl Wasser.

Alle Proben werden nun für die Messung im Photometer präpariert. Zunächst wird Bradford-Lösung im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und mit Hilfe eines Faltenfilters filtriert. Von den bereitgestellten Proben werden 25 µl mit 875 µl dieser Bradford-Lösung vermengt. Es folgt eine Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Proben mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem vom Gerät vorgegebenen Programm gemessen. Zunächst erstellt das Gerät anhand der entsprechenden Proben die Eichgerade. Gemäß dieser vorgegebenen Konzentrationen können anschließend die Proben mit der unbekanntem Proteinkonzentration analysiert werden.

### **3.2.7.5 SDS-PAGE**

SDS-PAGE ist die Kurzbezeichnung für *Sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide-gel-electrophoresis* und dient in der Biochemie als analytische Methode zur Trennung von Proteingemischen in einem elektrischen Feld.

Bei dieser Methode wird das Trenngel hergestellt (die Prozentigkeit richtet sich hierbei nach der erwarteten Proteingröße). Die Trenngelsuspension wird gut vermischt und blasenfrei in die dafür vorgesehene Gelkammer bis zu einer Markierung gegossen oder pipettiert und abschließend mit Isopropanol überschichtet. Das noch flüssige Gel braucht etwa eine halbe Stunde, bis es polymerisiert ist.

Es folgt die Zubereitung des Sammelgels, dessen Prozentigkeit weit unter der des Trenngels liegt. Die Mischung wird anschließend auf das polymerisierte Trenngel pipettiert. In das noch flüssige Gel wird ein Kamm mit den entsprechenden Taschen gesteckt. Auch das Sammelgel muss polymerisieren.

Das fertige Gel wird in eine Laufkammer gesetzt, in der sich bereits ein entsprechender Laufpuffer befindet. Der Kamm wird vorsichtig aus dem Gel entfernt, und die vorbereiteten Proben, die das Proteingemisch enthalten, können samt passendem Marker aufgetragen werden. Es wird elektrische Spannung an die Gelkammer angeschlossen, damit das Proteingemisch entsprechend seiner Größe im elektrischen Feld wandern kann. Beim

Durchwandern des Sammelgels wird mit einer kleineren Spannung begonnen. Treten die Proben in das Trenngel ein, kann die Spannung erhöht werden.

Die Dauer der Gelelektrophorese ist sowohl von der Proteingröße, als auch von der angelegten Spannung abhängig.

### 3.2.7.6 Mini-2D-Gele

Die Methode der Mini-2D-Gelelektrophorese erstreckt sich über drei aufeinander folgende Tage. Am ersten Tag müssen die Proben vorbereitet werden. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung der sich im Harnstoff-Lysispuffer befindlichen Zelllysate soll die jeweilige Proteinkonzentration für einen sieben cm langen Gelstreifen 20 µg Protein pro 125 µl Harnstoff-Lysispuffer betragen. Die Gelstreifen werden nach Entfernung des Plastikschutzstreifens vorsichtig in ein 15-ml Falcon Tube geschoben und anschließend so gedreht, dass die Gelseite nach unten zeigt. Die vorbereitete Proteinlösung wird nun zwischen Gelstreifen und Gefäßwand pipettiert, wobei möglichst keine Luftblasen entstehen sollen. Das Proteingemisch soll dabei vollständig über den Streifen verteilt sein. Zum Schutz vor Dehydratation wird das Gefäß komplett mit einem Deckel verschlossen und waagrecht für etwa zwölf Stunden bei Raumtemperatur belassen (Hydratisieren).

Am zweiten Tag schließt sich die erste Dimension in der IEF-Kammer an. Kleine „*Electrode Wicks*“ werden mit MilliQ-H<sub>2</sub>O angefeuchtet, abtropfen gelassen und auf die jeweiligen Elektroden gelegt. Die Gelstreifen werden mit der Gelseite nach unten (+ auf +) linksbündig in die IEF-Kammer gelegt. Es muss darauf geachtet werden, dass das Gel direkt auf den Elektroden liegt und keine Luftblasen vorhanden sind. Die Gelstreifen werden nun jeweils mit 1,5 ml Mineralöl abgedeckt, und der Deckel wird auf die IEF-Kammer gelegt.

Die Laufkonditionen sind wie folgt festgelegt:

Laufkonditionen	Zeit	Volt [V]
1 Einlaufzeit 	30 Minuten	250
2 Laufzeit linear 	5000 Voltstunden	5000
3 weitere Laufzeit 	5000 Voltstunden	5000
4 Schutz	2 Stunden	500

Nach Abschluss der ersten Dimension werden die Streifen entnommen, das Mineralöl wird durch Abtropfenlassen entfernt, und die Streifen werden in verschlossenen 15ml-Falcon-Tubes über Nacht bei - 80°C eingefroren.

Am dritten Tag folgt die zweite Dimension in Form eines Western Blots. Das flüssige Gel wird bis ca. einem cm unter den Rand der Vorrichtung gegossen und im Anschluss mit 1 ml Isopropanol überschichtet.

Während das Gel polymerisiert, werden die Gelstreifen aufgetaut und weiterbearbeitet. Für den Lauf in der Elektrophoresekammer müssen die Gelstreifen äquilibriert werden. Dazu werden die Gelstreifen zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur in der Äquilibrierungslösung A auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgegossen. Nun werden die Gelstreifen für 15 Minuten in der Äquilibrierungslösung B bei Raumtemperatur geschwenkt. Wieder wird nach Ablauf der Zeit die Lösung abgegossen. In der Zeit, während die Streifen in Lösung B inkubieren, wird das Gel weiterbearbeitet. Kleine „*Elektrode-Wicks*“ werden mit Rainbow Marker getränkt (ca. 10 µl) und linksseitig auf das Trenngel gelegt. Das Gel wird mit ca. 4 ml „Sammelgel“ (0,6% Agarose + Bromphenolblau) überschichtet, und die Gelstreifen werden in das noch flüssige „Sammelgel“ aufgelegt. Dabei sollte das Gel nach vorne zeigen und die +-Seite rechts liegen. Danach erfolgt eine SDS-PAGE für ca. 2,5 Stunden bei 95 V mit anschließendem Western Blot (siehe entsprechendes Protokoll).

### 3.2.7.7 Western Blot

Für jedes in der SDS-PAGE gelaufene Gel wird eine Membran und viermal Whatman-Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten. Vom Gel selbst wird das Sammelgel abgeschnitten, bevor verschiedene Plastikschaalen befüllt werden: drei Schalen mit Blotting-Puffer und eine mit Schale Milli-Q-Wasser. Die Membran wird mit Hilfe einer Pinzette zwischen den blauen Papierblättern entfernt, circa eine Minute in die Schale mit Milli-Q-Wasser gelegt und danach in die Blotting Puffer Schale gegeben. Das zur Blotting-Aparatur gehörende Frottee sowie das Whatman-Papier werden im Blotting-Puffer getränkt.

Der Blotaufbau sieht wie im Folgenden beschrieben aus:

1. Schwarze Seite
2. Frottee
3. 2 x Whatman
4. Gel
5. Membran
6. 2 x Whatman
7. Frottee
8. Weiße Seite

Während die einzelnen Lagen aufgebaut werden, müssen entstehende Blasen immer mit Hilfe einer Plastikpipette zwischen den einzelnen Schichten entfernt werden. Die Kammer wird komplett mit Blotting-Puffer gefüllt. Es wird für 45 Minuten bei 340 mA im Kühlschrank geblotet. Im Anschluss an das Blotten der Proteine vom Gel auf die Membran muss die Membran geblockt werden. Das Blocken dient dem Absättigen der Proteinbindungsstellen auf der Membran. Dazu werden der Blot auseinandgebaut und die Membran für eine

Stunde in Blocking-Lösung (fünf Prozent Magermilch in 1x TBS-T gelöst, 10 ml) bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank auf einem elektrischen Schüttler geschwenkt. Es schließt sich die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper an (Antikörper in der gewünschten Verdünnung in 5% Magermilch in 1x TBS-T oder 1x PBS-T). Die Inkubationszeiten sind antikörperabhängig und können zwischen einer Stunde bei Raumtemperatur und mehr als zwölf Stunden (meist über Nacht) bei 4°C variieren. Es folgt ein dreimaliges Waschen der Membran mit 1x TBS-T oder PBS-T. Nun muss mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden. Wieder folgt das dreimalige Waschen der Membran zu den bereits genannten Bedingungen. Daraufhin wird die Membran mit Färbelösung behandelt (*Western-Blot-Detecting-Reagenz/ECL*). Die Färbelösung wird deckend auf die Membran pipettiert und für etwa eine Minute darauf belassen. Die Membran wird in eine Filmkassette, worauf der Film entwickelt wird. Dies geschieht nach der Anleitung der jeweiligen Entwicklermaschine. Man wählt unterschiedliche Belichtungszeiten (Start: eine Minute +/-) und erhält daraufhin einen Röntgenfilm, der unterschiedliche Bandenmuster trägt. Der Marker, der sich auf der Membran, jedoch nicht auf dem Film befindet, muss per Hand auf den Film übertragen werden, um ein Maß für die Größe der Banden gewährleisten zu können.

### **3.2.7.8 Semi-Dry-Blot**

Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran wird vor dem eigentlichen Blotten wie folgt behandelt.

Zunächst wird die Membran für zehn bis 15 Sekunden in Methanol gegeben und anschließend für zwei Minuten in destilliertem Wasser gelagert. Es schließt sich eine fünfminütige Inkubationszeit in der vorbereiteten Äquibrierungslösung an. Auch das Gel aus der SDS-PAGE muss vor dem Blotten mindestens zehn Minuten (kann bis zu 1 Stunde anhalten) in Äquibrierungslösung belassen werden. Während der Inkubationszeit wird Whatman-Papier ebenfalls auf die Größe von Gel und Membran zugeschnitten und in Äquibrierungslösung angefeuchtet.

Im Anschluss erfolgt der Aufbau des Semi-Dry-Blots nach den Angaben des Protokolls der Firma Biorad® zur Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell by Biorad ©. Geblottet wird für 15 Minuten bei 20 V. Nach dem Blotten können die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran geblockt werden. Eine schnelle Methode ist das Blocken der Membran in Methanol. Dazu wird die Membran für 15 Sekunden in Methanol gegeben und anschließend auf Filterpapier getrocknet. Es schließt sich, wie bereits beim Western Blot beschrieben, die Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper und nachfolgenden Schritten an.

### 3.2.7.9 Coomassie-Färbung

Unmittelbar nach Abschluss der Elektrophorese werden die SDS-Gele über Nacht in Coomassie-Lösung geschwenkt. Im nächsten Schritt werden die Gele in destilliertem Wasser entfärbt. Dabei muss das Wasser mehrfach gewechselt werden. Die Gele können dann in eine Plastikfolie eingeschweißt werden, damit sie vor Austrocknung geschützt sind.

### 3.2.7.10 Membrane-Stripping

Die Membran wird für eine Stunde in Stripping-Solution gewaschen. Nachfolgend schließen sich zwei Waschstufen von je 15 Minuten Dauer in 1x PBS-T an. Im letzten Schritt wird die Membran für eine Stunde mit 5% Magermilch, gelöst in 1x PBS-T, geschwenkt (Blocken der Membran).

### 3.2.7.11 Zellfraktionierung mit verschiedenen Puffern unterschiedlicher Salzkonzentrationen

Die Ausgangszellmenge bei diesem Protokoll beträgt  $1 \times 10^7$  Zellen. Zunächst erfolgt das Abzentrifugieren der gewünschten Zellen. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet anschließend mit 1 ml, dann mit 9 ml kaltem 1x PBS resuspendiert. Wieder wird zentrifugiert (1500 rpm, zehn Minuten, 4°C) und der Überstand abgegossen. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt, damit das Suspensionsmedium vollständig von den Zellen gewaschen wird. Die Zellen werden in 1 ml kaltem 1x PBS resuspendiert und in Eppendorf Gefäße überführt. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm für 45 Sekunden bei Raumtemperatur an. Das gewonnene Pellet wird in 400 µl (200 µl) eiskaltem Puffer A resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Probe wird auf jeweils 200 µl aufgeteilt, und es folgt die Zugabe von 25 µl (12,5 µl) 10%iger NP-40 Lösung. Nun werden die Ansätze bei 4°C für  $1^{1/2}$  Minuten geschüttelt. Wieder schließt sich ein Zentrifugationsschritt mit 14.000 rpm für 60 Sekunden bei Raumtemperatur zur Sedimentation der Zellkerne an. Danach wird der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und aufbewahrt. Dieser Überstand enthält die zytoplasmatische Fraktion. Zum Pellet werden 50 µl Puffer C gegeben, und es folgt ein 20-minütiges starkes Schütteln bei 4°C. In diesem Schritt kommt es zur Zellkernlyse und somit zur Freisetzung der Chromatin-assoziierten Proteine. Wieder wird mit 13.000 rpm für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Zellkern-Fraktion und kann nach der Proteinkonzentrationsbestimmung für weitere Versuche genutzt werden.

### **3.2.7.12 Zellfraktionierung: Isolierung von Zellkernen über einen Saccharosegradienten**

Diese Methode wird komplett auf Eis durchgeführt. Pro Ansatz sollten  $5 \times 10^7$  (besser  $1 \times 10^8$ ) Zellen verwendet werden. Zunächst folgt das Abzentrifugieren der gewünschten Zellen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet anschließend mit 10 ml kaltem 1x PBS resuspendiert. Erneut wird zentrifugiert (1500 rpm, zehn Minuten, 4°C) und der Überstand abgegossen. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt, damit das Suspensionsmedium vollständig von den Zellen gewaschen wird. Das dabei gewonnene Zellpellet wird in 10 ml TKM-Puffer+ 0,25% NP-40 + Proteaseinhibitoren resuspendiert und für fünf Minuten auf Eis gelagert. Es schließt sich eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 1100 rpm (4°C) an. Der dabei entstandene Überstand enthält den zytoplasmatischen Teil. Das Pellet wird in 10 ml TKM ohne NP-40 + Proteaseinhibitoren aufgenommen, bevor erneut für zehn Minuten bei 1100rpm (4°C) zentrifugiert wird. Das dabei gewonnene Pellet wird in 3 ml TKM + 0,25 M Saccharose + Proteaseinhibitoren aufgenommen und in ein kleines Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Lösung wird mit 3 ml 2,5 M TKM unterschichtet und mit TKM + 0,25 M Saccharose überschichtet. Es folgt eine Ultrazentrifugation für vier Stunden mit 37.000 rpm bei 4°C. Die nukleäre Fraktion, die sich durch eine weiße scharf begrenzte Schicht im Zentrifugenröhrchen auszeichnet, wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Falcon-Gefäß pipettiert. Es folgt die Zugabe von 10 ml eiskaltem 1x PBS mit nachfolgender zehn-minütiger Zentrifugation bei 3500 rpm und 4°C mit Verwerfen des Überstandes. Dieser Schritt wird dreifach durchgeführt. Zu dem gewaschenen Pellet wird Lysispuffer zur Zellkernlyse pipettiert. Bei Verwendung des 150 mM-Lysispuffers werden die Proben für zehn Minuten auf Eis gelagert und nachfolgend für 20 Minuten bei 14000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand, der die nukleäre Fraktion enthält, wird bis zum weiteren Gebrauch bei - 20°C gelagert.

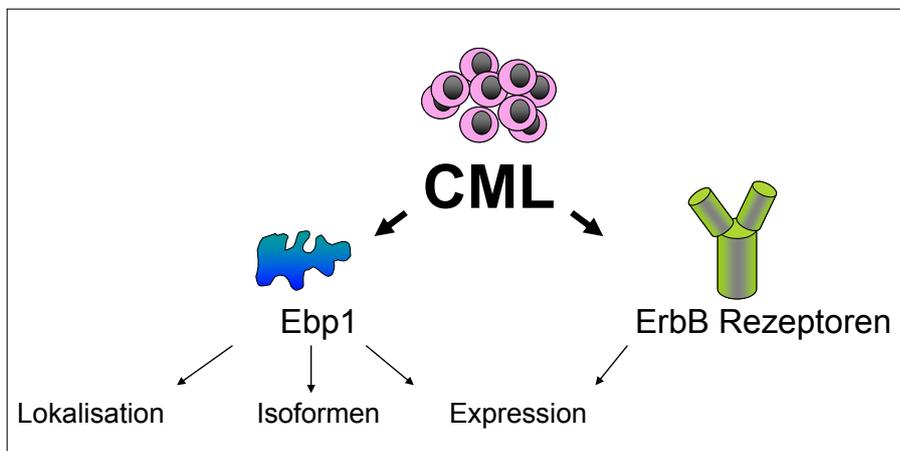
### **3.2.8 Verwendete Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des zwei-seitigen t-Tests für ungepaarte Proben sowohl mit Hilfe des Programms Microsoft Excel, als auch mit GraphPad Prism. Das Signifikanzniveau wurde für p-Werte kleiner als 0.05 bzw. 0.01 festgelegt. Alle Proben wurden in einer Dreifachbestimmung gemessen.

## 4. Ergebnisse

Bei der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) kommen heute Tyrosinkinaseinhibitoren, wie beispielsweise Imatinib, als therapeutische Maßnahme zum Einsatz. Diese Medikamente besitzen nicht nur großen Einfluss auf Dauer und Progression der Erkrankung, sondern auch auf verschiedene Proteine innerhalb der leukämischen Zellen. Ein großes Problem stellt jedoch die Entstehung von Resistenzen gegenüber der existierenden Therapie dar. Aus diesem Grund wird forciert nach neuen Zielstrukturen in der Behandlung der CML geforscht.

Wie einleitend beschrieben beschäftigt sich diese Arbeit mit dem unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib differenziell exprimierten Protein Ebp1 in leukämischen Zellen (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Schematische Übersicht der Arbeit

Mittels verschiedener Methoden wurde untersucht, ob Ebp1 außer in K562-Zellen auch in weiteren leukämischen Zelllinien, sowohl humaner als auch muriner Herkunft, zu finden ist. Gleichwohl wurde das Vorhandensein von Ebp1 in Patientenmaterial überprüft. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf Ebp1 in diesen Zellen. Die zelluläre Lokalisation von Ebp1 in K562-Zellen ist ebenfalls ein elementares Untersuchungsobjekt dieser Arbeit.

Die Überprüfung der Expression der vier verschiedenen epidermalen Wachstumsfaktoren erfolgte in gleicher Weise, da Ebp1 nachweislich an den ErbB3-Rezeptor bindet. Auch in diesem Zusammenhang wurde die Rolle von Imatinib untersucht (Abb.14).

Ein weiterer Abschnitt der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche befasste sich mit den Effekten der beiden Isoformen von Ebp1 (Ebp1-p42 und Ebp1-p48) auf K562-Zellen hinsichtlich Proliferation, Zytotoxizität und Apoptose.

### **4.1 Ebp1 wird in verschiedenen humanen und murinen leukämischen Zelllinien exprimiert**

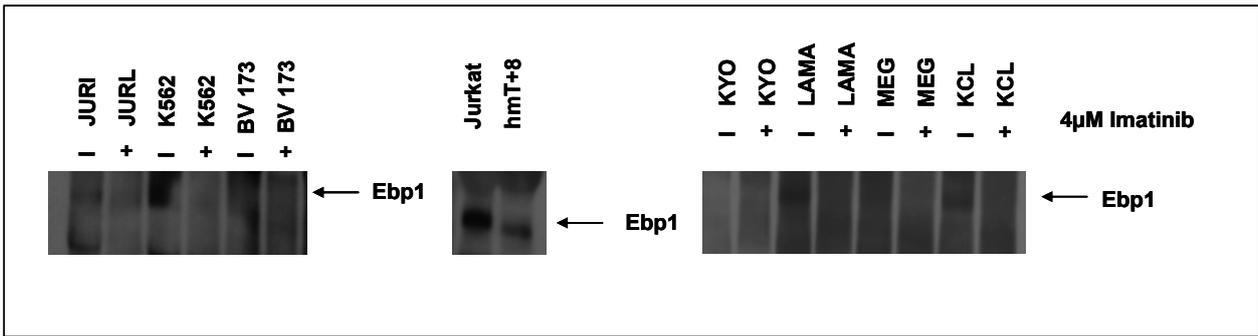
#### **4.1.1 Northern Blot-Expressionsanalyse**

Um einen Überblick über die Expression von Ebp1 zu bekommen, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt.

Dazu wurden verschiedene humane und murine CML-Zelllinien für 24 Stunden wahlweise mit 4 µM des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib oder mit einer DMSO-Kontrolle (DMSO:Wasser = 1:1) behandelt. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde aus den gewonnenen Zellpellets mit Hilfe der Trizol-Chloroform Methode, sowie mit Hilfe verschiedener Kits der Firma Qiagen, RNA isoliert. Nach Kontrolle auf Kontamination mit genomischer DNA konnten die unterschiedlichen RNA-Proben an die Universität Greifswald (Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie) geschickt werden, wo mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. rer. nat. Heike Junker die Northern Blot-Analysen durchgeführt wurden.

Die auf den Röntgenfilmen abgebildeten Bandenmuster (Abb. 15 und 16) zeigen folgende Ergebnisse:

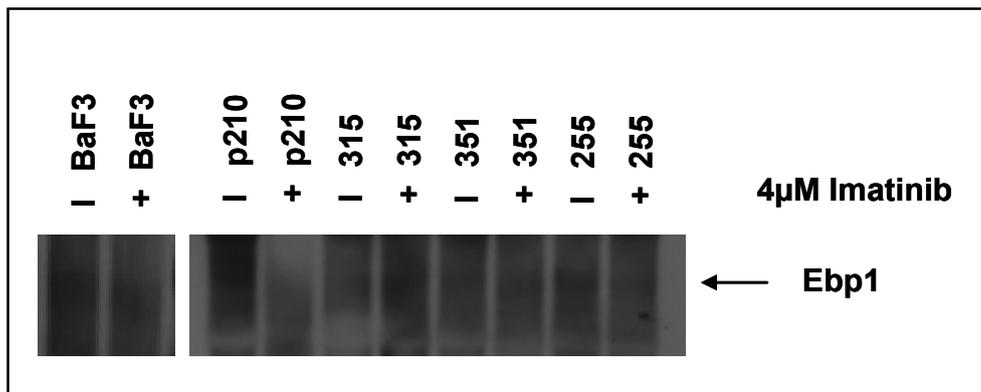
Bei Jurkat und hmT+8 handelt es sich um die Positivkontrollen. Bei den humanen Ph<sup>+</sup>-CML-Zelllinien JURL-MK1, K562, LAMA-84 und KCL-22 scheint die Expression von Ebp1 unter Tyrosinkinaseinhibitor-Behandlung abzunehmen (Abb. 15), da die hier spezifisch detektierte Bande (Pfeil, Abb.15) deutlich schwächer ausgeprägt ist als bei der mit DMSO behandelten Kontrolle. Dies macht deutlich, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, welcher die BCR-ABL-aktive Tyrosinkinase hemmt, möglicherweise einen hemmenden Effekt auf die mRNA von Ebp1 hat oder auf Promoterebene die Transkriptionsrate verringern könnte.



**Abbildung 15:** Die mRNA-Expression von Ebp1 in verschiedenen humanen leukämischen Zelllinien wird von Imatinib beeinflusst. Northern Blot mit humanen Zelllinien: unterschiedliche humane Zelllinien unter der Behandlung mit 4 µM Imatinib für 24 Stunden.

Auch bei den murinen Zelllinien, die nach dem gleichen Prinzip wie die humanen Zelllinien behandelt wurden, zeigte sich in einer der Zelllinien ein Effekt von 4 µM Imatinib auf die mRNA von Ebp1 (Abb. 16). Nur Ebp1 in der Imatinib-sensitiven BCR-ABL-positiven Zelllinie Ba/F3-p210 reagierte mit einem abgeschwächten Ebp1-Expressionsmuster auf die Tyrosinkinase-Inhibition (Pfeil, Abb.16). Die BCR-ABL-negative Ba/F3-Zelllinie und die BCR-ABL-Mutanten M351T, T315I und E255K ließen keine Änderung im Expressionsmuster von Ebp1 erkennen.

Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Ebp1-Expression und dem Einfluss der BCR-ABL-Tyrosinkinase-Aktivität hin, da ein Expressionsrückgang von Ebp1 nur in BCR-ABL-positiven Ba/F3-p210 Zellen zu beobachten ist, jedoch nicht in der BCR-ABL-negativen Zelllinie Ba/F3 oder den verschiedenen Imatinib-resistenten Mutanten (M351T, T315I und E255K).



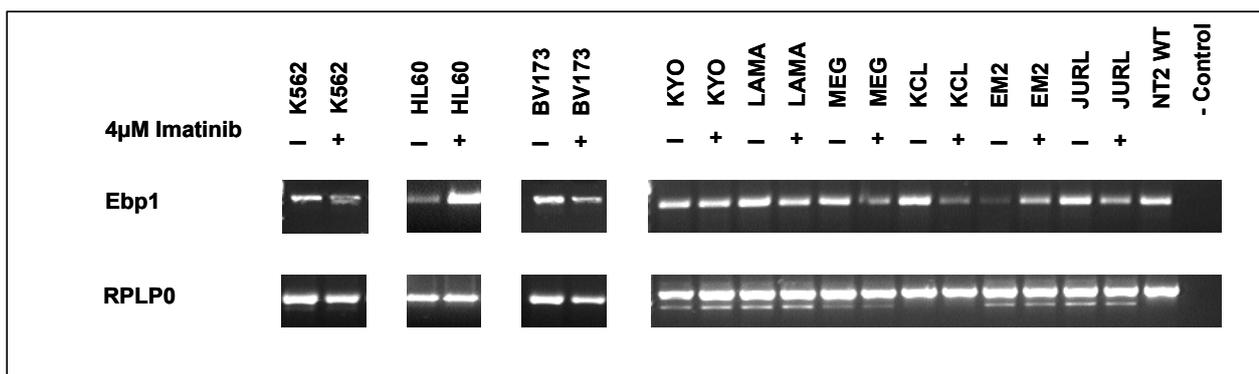
**Abbildung 16:** Die mRNA-Expression von Ebp1 in verschiedenen murinen leukämischen Zelllinien wird von Imatinib beeinflusst. Northern Blot mit unterschiedlichen murinen Zelllinien, welche für 24 Stunden mit 4 µM Imatinib behandelt wurden

#### 4.1.2 Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Da die Northern Blot Analysen nicht hundertprozentig auswertbar waren, haben wir eine zweite Methode zur Analyse der mRNA-Expression verwendet. Auch mittels RT-PCR wurde die Ebp1-Expression unter dem Einfluss von 4  $\mu$ M Imatinib untersucht.

Zunächst wurden sowohl humane als auch murine Zellen in einer Zellkonzentration zwischen  $1-5 \times 10^6$  ausgesät und für 24 Stunden mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt. Bei den humanen Zellen handelte es sich um die BCR-ABL-positiven CML-Zelllinien K562, BV173, LAMA-84, MEG-01, KYO-1, KCL-22, Jurl-MK sowie EM2. Als BCR-ABL-negative Zelllinie wurde HL-60 ausgewählt. Die murinen Zelllinien, die hier zur Verwendung kamen, hießen Ba/F3, Ba/F3 -p210, T315I, M351T und E255K. Bei NT2 handelt es sich um die Positivkontrolle.

Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit wurde aus den gewonnenen Zellpellets mittels der Trizol-Chloroform-Methode RNA gewonnen. Die Konzentrationsmessung erfolgte mittels unterschiedlicher Photometer. Danach wurde die RNA auf mögliche genomische Kontaminationen untersucht und durch die First Strand cDNA Synthese in cDNA umgeschrieben. Nach erneuter Konzentrationsmessung konnte die hergestellte cDNA für unterschiedliche PCR-Reaktionen mit einem Ebp1 Primer sowie einem Primerpaar für das Kontroll-Gen RPLP0 genutzt werden. Die für die PCR angewandten Konditionen sind unter „Material und Methoden“ sowie im Anhang ausführlich beschrieben. Die PCR-Produkte wurden in der Folge auf ein 2%-iges Ethidiumbromidgel aufgetragen und mittels einer UV Kamera abfotografiert (Abb. 17).



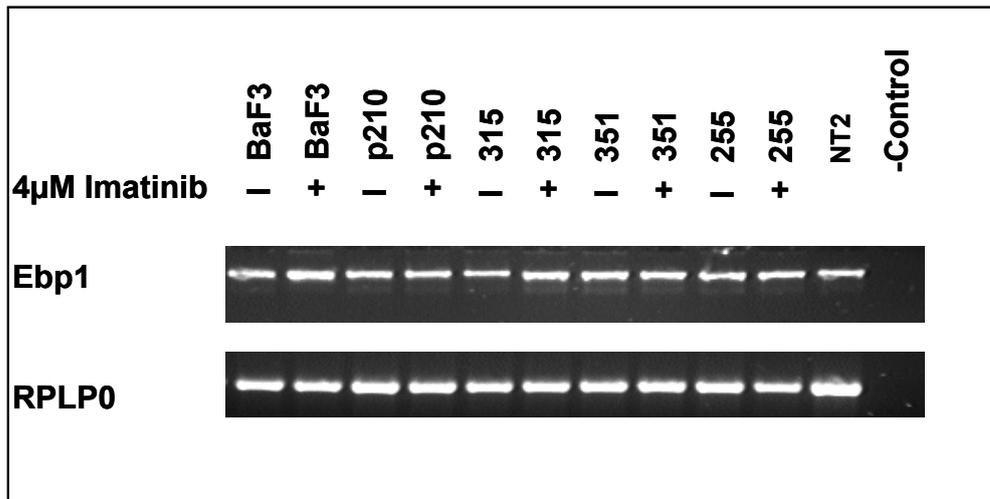
**Abbildung 17:** Die mRNA von Ebp1 wird in verschiedenen humanen leukämischen Zelllinien unter dem Einfluss von Imatinib differentiell exprimiert. Verschiedene RT-PCR-Ansätze mit humanen Leukämie-Zelllinien, welche für 24 Stunden mit 4  $\mu$ M Imatinib behandelt wurden

Das Expressionsmuster der mRNA von Ebp1 in Abbildung 17 ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Expression bei der mit Imatinib behandelten BCR-ABL-positiven K562-Zelllinie. Die ebenfalls BCR-ABL-positive BV173-Zelllinie ist jedoch in diesem Fall nicht sonderlich aussagekräftig. Zwar verringert sich die mRNA-Expression von Ebp1 in der mit Imatinib behandelten Probe, allerdings nimmt auch in der Kontrolle die mRNA-Expression des Kontroll-Gens RPLP0 ab, so dass man nicht wie bei K562, von einem eindeutigen Effekt sprechen kann.

Mit Ausnahme der BV173-Zellen, zeigt die Kontrolle mit RPLP0 hingegen keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. In der BCR-ABL-negativen AML-Zelllinie existieren keine Unterschiede im mRNA-Expressionsmuster. Zumindest bei den K562-Zellen kann von einem BCR-ABL-spezifischen Effekt auf das mRNA-Expressionsmuster die Rede sein.

Abbildung 17 zeigt zudem die Expression von Ebp1 in sechs weiteren behandelten versus unbehandelten Ph<sup>+</sup> humanen CML-Zelllinien. Die Kontrolle der Expression erfolgt ebenfalls durch RPLP0. Bei RPLP0 zeigen sich keinerlei Expressionsunterschiede in Bezug auf die Imatinib-Behandlung. KYO-1 zeigt beim Ebp1-Primerpaar keine Unterschiede in der mRNA-Expression hinsichtlich einer Behandlung mit Imatinib. Dahingegen sind bei den Zelllinien LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und JURL-MK deutliche Rückgänge in der Ebp1-mRNA-Expression unter Behandlung mit 4 µM des Tyrosinkinaseinhibitors zu beobachten. EM2 verhält sich erstaunlicherweise gegensätzlich zu den vier zuvor genannten Zelllinien.

Auch das mRNA-Expressionsmuster von Ebp1 in murinen Zellen wurde untersucht (Abb. 18). Bei den murinen Zellen handelt es sich wie bei der Northern Blot Analyse um Ba/F3 Zellen sowie um die jeweiligen Mutanten mit unterschiedlichen BCR-ABL-Mutationen, welche zum Teil eine Resistenz gegenüber Imatinib an den Tag legen.



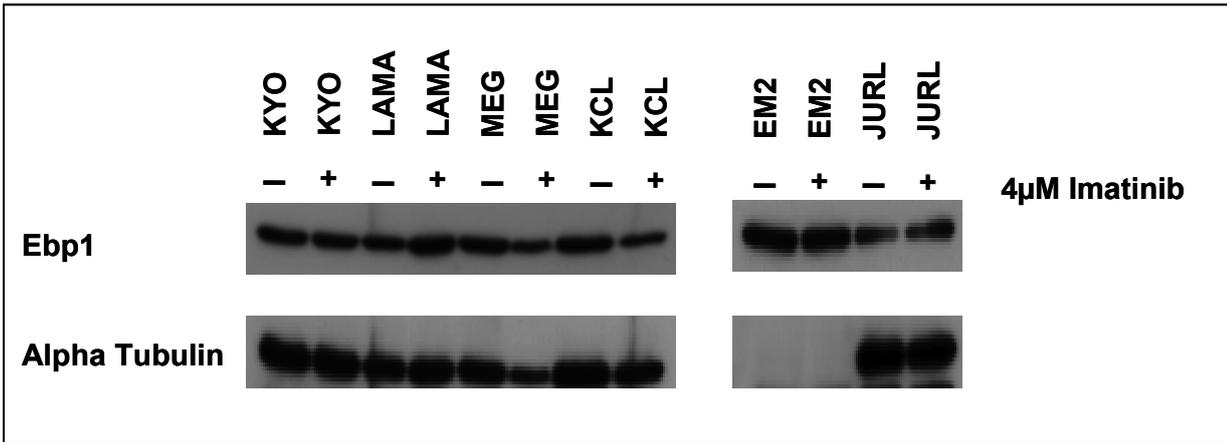
**Abbildung 18:** Die mRNA von *Ebp1* wird in verschiedenen murinen leukämischen Zelllinien unter dem Einfluss von Imatinib teilweise differentiell exprimiert. RT-PCR mit verschiedenen murinen Zelllinien, welche für 24 Stunden mit 4 μM Imatinib behandelt wurden

Im Vergleich zu der Northern Blot Analyse, bei der eine mRNA-Expressionsminderung von *Ebp1* in den mit Imatinib behandelten Ba/F3-p210-Zellen zu beobachten war, werden die Expressionsunterschiede mit Hilfe der RT-PCR nicht deutlich (Abb. 18). Die RPLP0-Kontrolle stellt sich zwar gleichmäßig dar, jedoch sind die Expressionsschwankungen von *Ebp1* hier nicht eindeutig beweisbar.

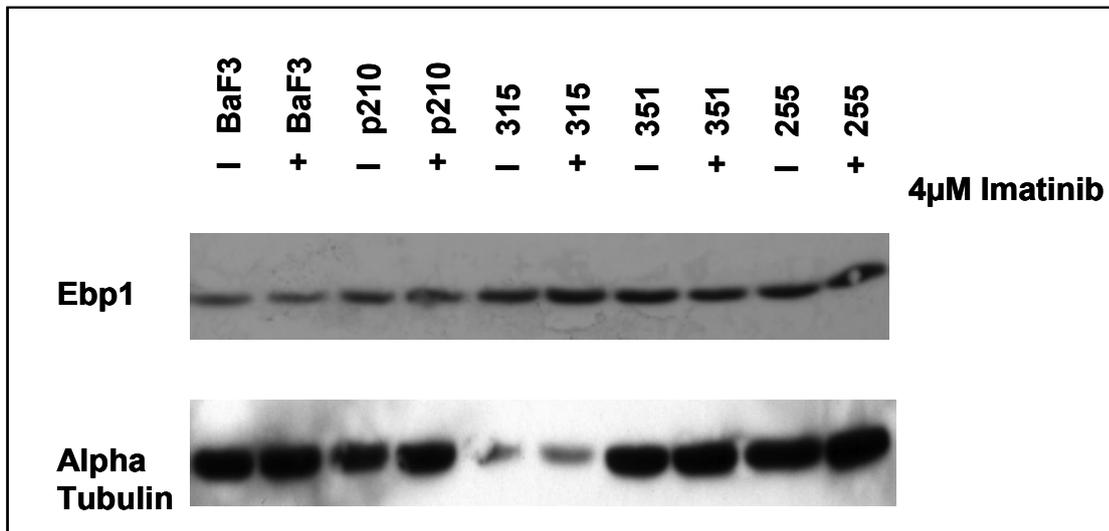
#### 4.1.3 Western Blot Expressionsanalyse

Auch auf Proteinebene haben wir versucht, Expressionsunterschiede von *Ebp1* darzustellen, um die von Balabanov et al. beschriebene differentielle Expression von *Ebp1*<sup>9</sup> (Abb. 8 und 9) zu verifizieren.

Sowohl von den humanen als auch von den murinen Zelllinien wurden im nächsten Schritt eine SDS-PAGE mit anschließender Western Blot Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden wie in den vorangegangenen Experimenten in einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  ausgesät und anschließend für 24 Stunden mit 4 μM Imatinib oder mit einem DMSO-Wasser-Gemisch als Kontrolle behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit in einem 150 mM-Lysispuffer. Nach der Konzentrationsbestimmung mittels des BCA-Protokolls, wurde das SDS-Gel mit je 10-20 μg der entsprechenden Probe beladen. Als das Gel durchgelaufen war, wurden wahlweise ein herkömmlicher oder ein Semi-Dry-Blot durchgeführt. Die gewonnenen Membranen wurden mit einem *Ebp1*-Antikörper inkubiert. Zur Kontrolle wurde die Membran im Anschluss mit einem Alpha-Tubulinantikörper behandelt. Die entwickelten Filme zeigten das folgende Bandenmuster (Abb. 19 und 20).



**Abbildung 19: Ebp1 wird in humanen leukämischen Zelllinien exprimiert.** Western Blot Analyse mit verschiedenen humanen Leukämie-Zelllinien nach 24 Stunden Behandlung mit 4 μM Imatinib. Bei den genutzten Antikörpern handelte es sich um Ebp1 und um Alpha-Tubulin



**Abbildung 20: Ebp1 wird in murinen leukämischen Zelllinien exprimiert.** Western Blot Analyse mit verschiedenen murinen Leukämie-Zelllinien nach für 24 Stunden Behandlung mit 4 μM Imatinib. Bei den genutzten Antikörpern handelte es sich um Ebp1 und um Alpha-Tubulin

Bei allen Zelllinien konnte mit Hilfe des Ebp1-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 eine singuläre Proteinbande auf Höhe von 48 kDa detektiert werden (Abb.19 und 20). Bei dieser Bande handelt es sich um das Protein Ebp1.

Diese Proteinbande variiert in der Expressionsintensität jedoch nicht im Vergleich zwischen unbehandelter und behandelter Probe. Auch geringere Antikörperkonzentrationen konnten keine Unterschiede in der Proteinexpression aufdecken. Diese Methode zeigt daher nicht eindeutig die gleichen Ergebnisse wie die Northern Blot-Analyse oder die RT-Polymerase-

Kettenreaktion (Vgl. 4.1.1 und 4.1.2). Die Kontrolle in Form der Alpha-Tubulinbande stellt sich relativ gleichmäßig dar und ist als Kontrolle gut geeignet. Eine Ausnahme bildet dabei allerdings die Zelllinie EM2 (Abb. 19). Hier konnte in keinem Assay das Alpha-Tubulin-Protein nachgewiesen werden, was zu der Annahme führt, dass diese Zellen dieses Protein nicht exprimieren. Da jedoch auch bei dieser Zelllinie keine wesentlichen Unterschiede im Expressionsmuster des Proteins Ebp1 detektierbar sind, wurde nicht nach einer weiteren möglichen Kontrolle gesucht.

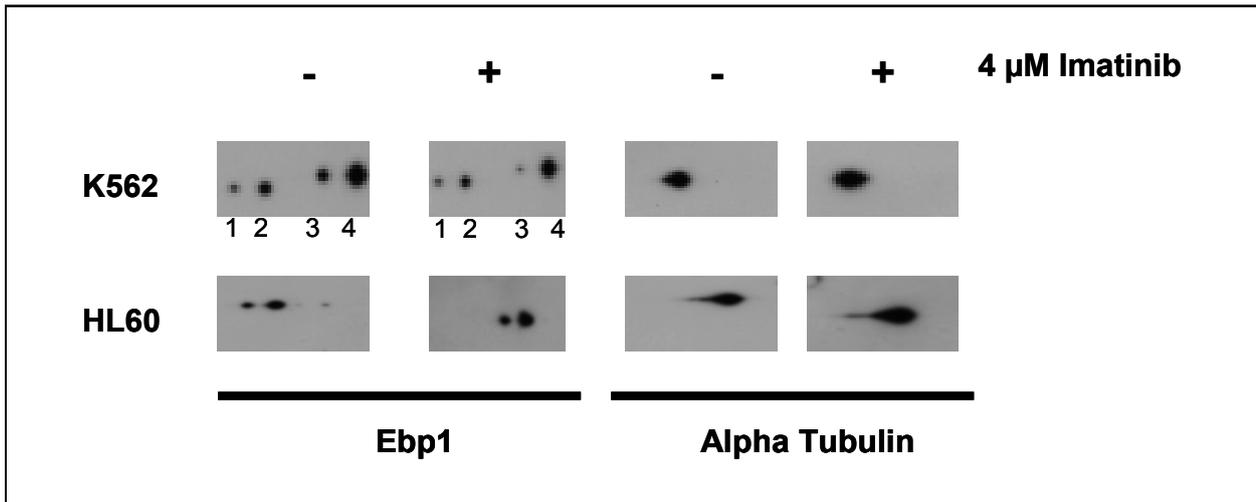
Die Proteinanalyse sichert in diesem Fall nicht die Aussagen, die in der von Balabanov et al. beschriebenen Proteomanalyse getroffen wurden (Abb. 8 und 9). Wir konnten jedoch nachweisen, dass Ebp1 in allen untersuchten Zellen exprimiert wird.

### **4.1.4 Expressionsanalyse mit Hilfe von Mini-2D-Gelen**

Da wir in unseren Vorarbeiten in den 2D-Gelen insgesamt drei Spots als Ebp1 identifizieren konnten und diese eine differentielle Expression zeigten, jedoch hier alle bei einem gleichem Molekulargewicht liefen, ist es möglich, dass eine posttranslationale Modifikation zu diesem Muster führte. Da dies in einer normalen 1 D PAGE nicht nachweisbar ist, haben wir uns entschieden, 2D-Western Blots durchzuführen. Mit deren Hilfe sollte erneut das Protein-Spot-Muster von Ebp1 untersucht werden.

Auch bei diesem Experiment wurden die K562- und HL-60-Zellen zu den unter 4.1.3 beschriebenen Konditionen ausgesät und entsprechend mit Imatinib behandelt.

Nach Ernten der Zellen wurden die Zellpellets in Ureapuffer lysiert. Die Konzentrationen der jeweiligen Proben wurden mit Hilfe der Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmungsmethode festgestellt. Es folgte die Hydratisierung der Gelstreifen, welche später für die erste Dimension eingesetzt werden sollten, mit jeweils 20 µg (bei einigen Versuchen auch mit Konzentrationen zwischen 40-100 µg) der entsprechenden Probe. Nach Ablauf der Hydratisierungszeit wurde die erste Dimension in der IEF-Kammer zu den in „Material und Methoden“ genannten Bedingungen gestartet. Die sich anschließende SDS-PAGE nebst Western Blot Analyse stellte die Grundlage der zweiten Dimension dar. Die durch den Western Blot gewonnenen Membranen wurden zunächst mit einem Antikörper gegen Ebp1 inkubiert und in der Folge mit einem Alpha-Tubulin-Kontrollantikörper behandelt. Das sich ergebende Protein-Spot-Muster (Abb. 21) lässt die folgenden Ergebnisse erkennen:



**Abbildung 21: Ebp1 wird in humanen leukämischen Zelllinien unter dem Einfluss von Imatinib differentiell exprimiert.** Mini 2D-Gel-Analyse mit den humanen leukämischen Zelllinien, welche für 24 Stunden mit 4 µM Imatinib behandelt wurden. Bei den genutzten Antikörpern handelte es sich um Ebp1 und Alpha Tubulin.

Die Zelllinie K562 weist bei den unbehandelten Proben (nur mit DMSO-Wasser-Gemisch behandelt) vier unterschiedlich stark exprimierte Ebp1-Proteinspots auf (Abb. 21). Bei der Behandlung mit Alpha-Tubulin ist ein singulärer Spot detektierbar. Die mit 4 µM Imatinib behandelten K562-Proben zeigen bei der Detektion des Proteins Ebp1 eine deutliche Abweichung vom Spotmuster verglichen mit den unbehandelten Proben.

Die Spots 1 und 3 der mit Imatinib behandelten Probe sind deutlich schwächer exprimiert als in der unbehandelten Kontrolle, zum Teil sind sie auch nicht mehr detektierbar (hier nicht gezeigt). Auch weisen die Spots 2 und 4 unter Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor eine abgeschwächte Expression auf, die zudem nicht so ausgeprägt ist, wie bei den Spots 1 und 3 (Abb. 21). Im Vergleich dazu ist der Spot, der nach Alpha-Tubulin-Behandlung detektiert werden kann, sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Proben in seiner Größe konstant (Abb. 21).

Die BCR-ABL-negative HL-60 zeigt kein abgeschwächtes Expressionsmuster von Ebp1 unter Imatinib Behandlung bei konstanter Alpha-Tubulin-Spotgröße (Abb. 21).

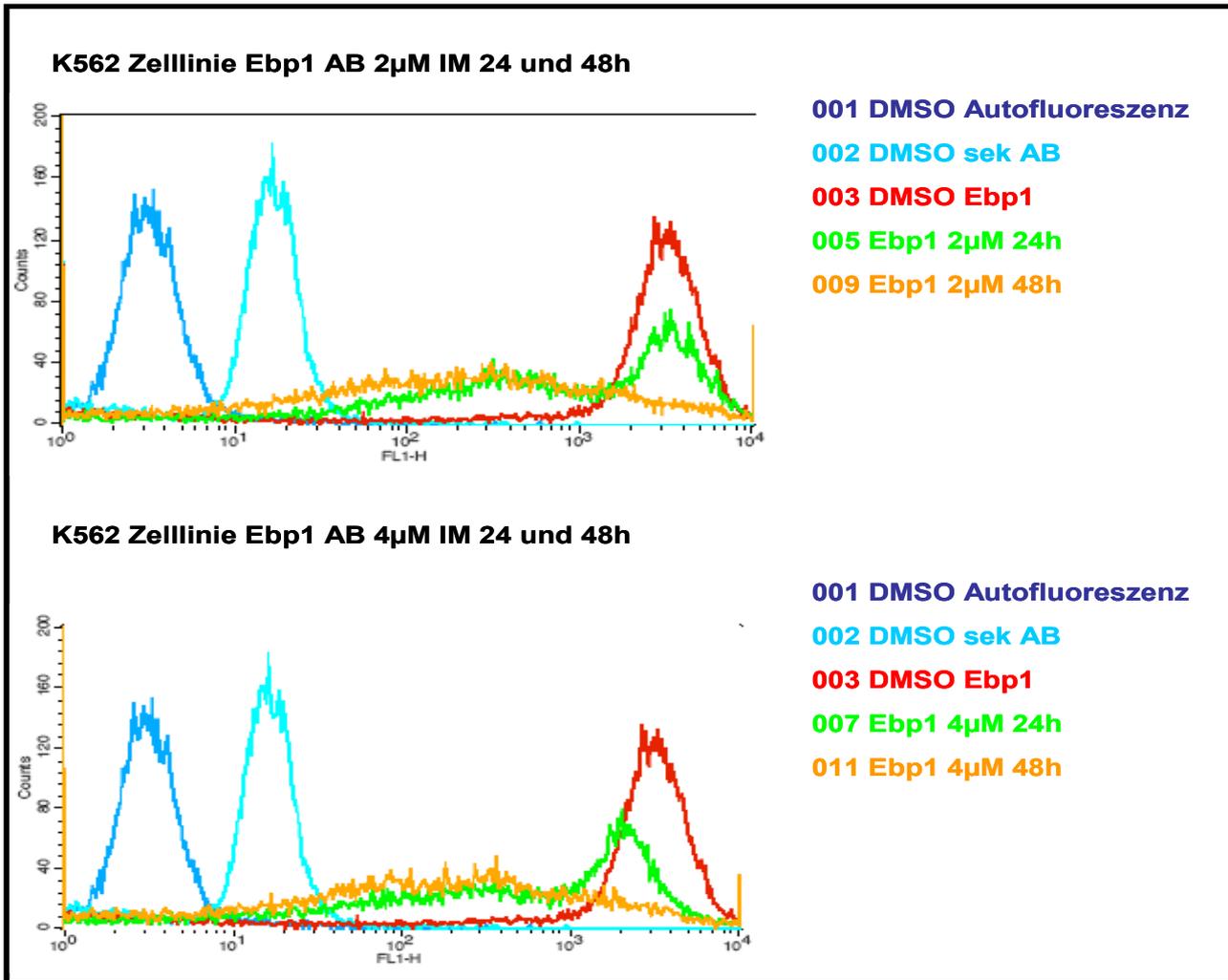
Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sich Ebp1 nicht in der Gesamtexpression verändert, sondern dass es nach der Inhibition von BCR-ABL vermutlich eine posttranslationale Modifikation von Ebp1 verändert wird. Dies könnte beispielsweise eine Phosphorylierung sein.

### 4.1.5 Durchflusszytometrische Expressionsanalyse

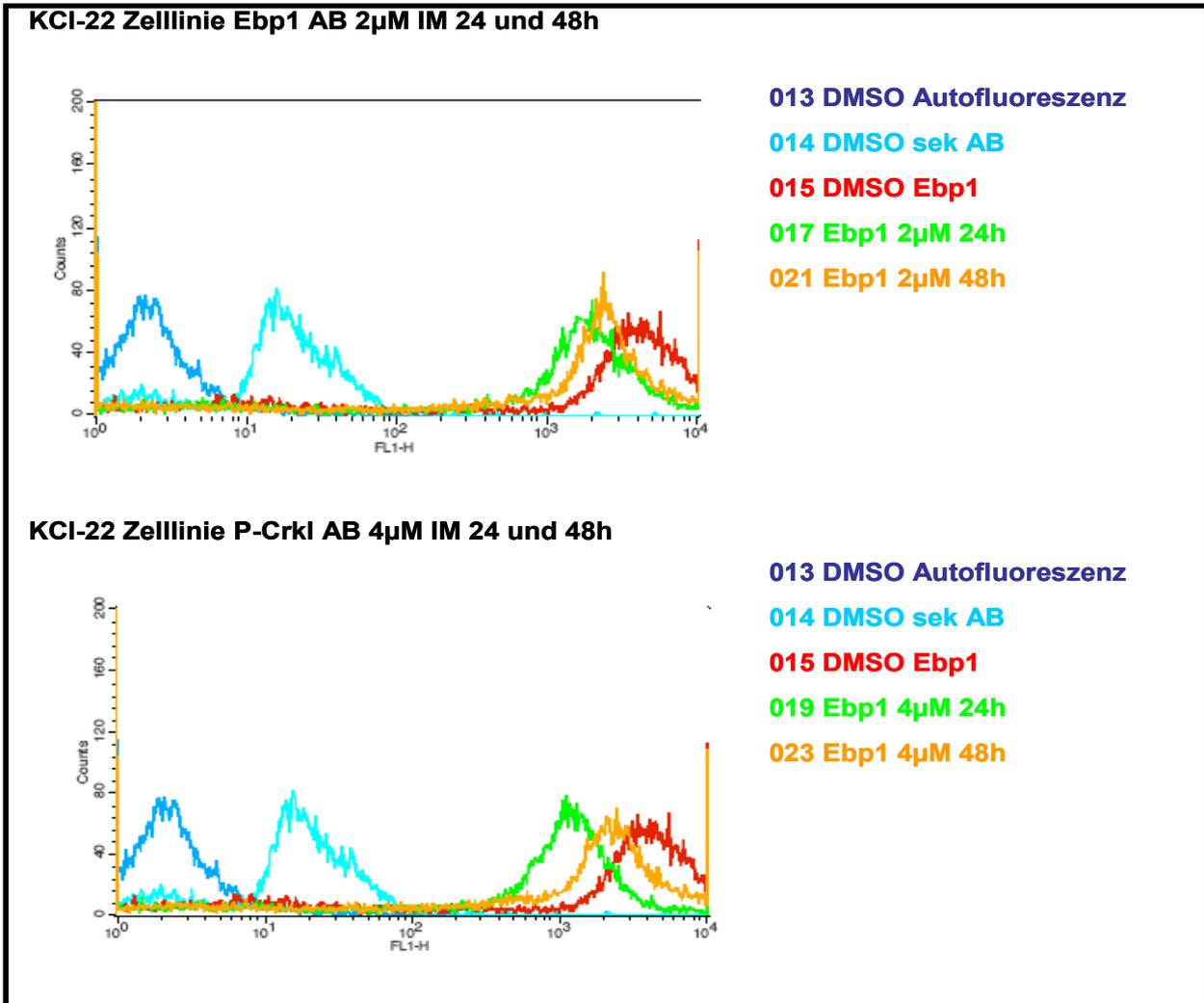
Mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungsmethoden wurde die Expression von Ebp1 unter unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen mit der Expression von Kontrollzellen (behandelt mit einem DMSO-Wasser-Gemisch) verglichen. Dieser Assay sollte die von Balabanov et al. (vgl. Einleitung) beschriebene differentielle Expression unter Tyrosinkinaseinhibition von dem Protein Ebp1 in ausgewählten Zelllinien zusätzlich beweisen.

Es wurden die durch Vorversuche (hier nicht gezeigt) ausgewählten Zelllinien K562 und KCL-22 in einer Zellkonzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen in Zellkulturmedium ausgesät und im Anschluss mit zwei unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen (2 und 4  $\mu\text{M}$ ) sowohl für 24 als auch 48 Stunden behandelt.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und zweimalig gewaschen. Im Anschluss wurden die jeweiligen Zellpellets mit Hilfe von Paraformaldehyd und 90%igem Methanol fixiert und permeabilisiert (vgl. „Material und Methoden“). Es folgte eine Antikörperfärbung (vgl. „Material und Methoden“) der vorbehandelten Zellen. Neben der Autofluoreszenz und der Isotypkontrolle wurden die Zellen sowohl mit Ebp1-, als auch mit Phosphor-CRKL-Antikörpern markiert und daraufhin durchflusszytometrisch mit dem FACS-Calibur ausgewertet.



**Abbildung 22:** Die Expression von Ebp1 nimmt in K562-Zellen unter Imatinib-Behandlung ab. FACS-Analyse von K562-Zellen behandelt mit 2 / 4  $\mu$ M Imatinib für 24 / 48 Stunden, links: Darstellung der Profile von Autofluoreszenz (dunkelblau), FITC-gelabelten Sekundärantikörper (hellblau), sowie Ebp1 in unbehandelten (rot), bzw. mit 2  $\mu$ M (grün) / 4  $\mu$ M (orange) Imatinib über 24 / 48 Stunden behandelten K562-Zellen



**Abbildung 23: Die Expressionsunterschiede von Ebp1 in KCL-22-Zellen unter Imatinib-Behandlung sind nur gering.** FACS-Analyse von KCL-22-Zellen behandelt mit 2 / 4  $\mu$ M Imatinib für 24 / 48 Stunden, links: Darstellung der Profile von Autofluoreszenz (dunkelblau), FITC-gelabelten Sekundärantikörper (hellblau), sowie Ebp1 in unbehandelten (rot), bzw. mit 2  $\mu$ M (grün) / 4  $\mu$ M (orange) Imatinib über 24 / 48 Stunden behandelten KCL-22-Zellen

Die Untersuchung der Expression von Ebp1 unter dem Einfluss von Imatinib in K562- und KCL-22-Zellen ergab durchflusszytometrisch die in den Abbildungen 22 und 23 dargestellten FACS-Profile.

In den Abbildungen 22 und 23 werden die verschiedenen Fluoreszenzprofile der bereits vorgestellten Proben in einem Diagramm, welches Fluoreszenzintensität (x-Achse, FL1-H) Ereignissen (y-Achse, counts) gegenüberstellt, veranschaulicht. Die Höhe der Ereignisse kann mit der Zellzahl gleichgesetzt werden.

In der Abbildung 22 lassen sich die Effekte von Imatinib auf K562-Zellen demonstrieren. Zum einen zeigen sich die Kontrollzellen, die entweder nicht angefärbt (Autofluoreszenz), mit dem FITC-Sekundärantikörper (Isotypkontrolle) oder aber mit dem Ebp1- und dem FITC-Sekundärantikörper behandelt wurden. Des Weiteren sieht man die mit unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  und 4  $\mu\text{M}$  für 24 bzw. 48 Stunden behandelten und mit Ebp1- und FITC-Antikörpern gefärbten K562-Zellen.

Eine Analyse von Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Zellpopulationen zeigte, dass sich Größe und Granularität der Imatinib-behandelten Zellen veränderten. Sowohl Größe, als auch Granularität der Zellen nahmen ab (hier nicht gezeigt). Die Zellen wurden apoptotisch, was auch mikroskopisch gut sichtbar war. Damit hemmt Imatinib auch unter Anwendung dieser Methode nachweisbar das Wachstum von Zellen.

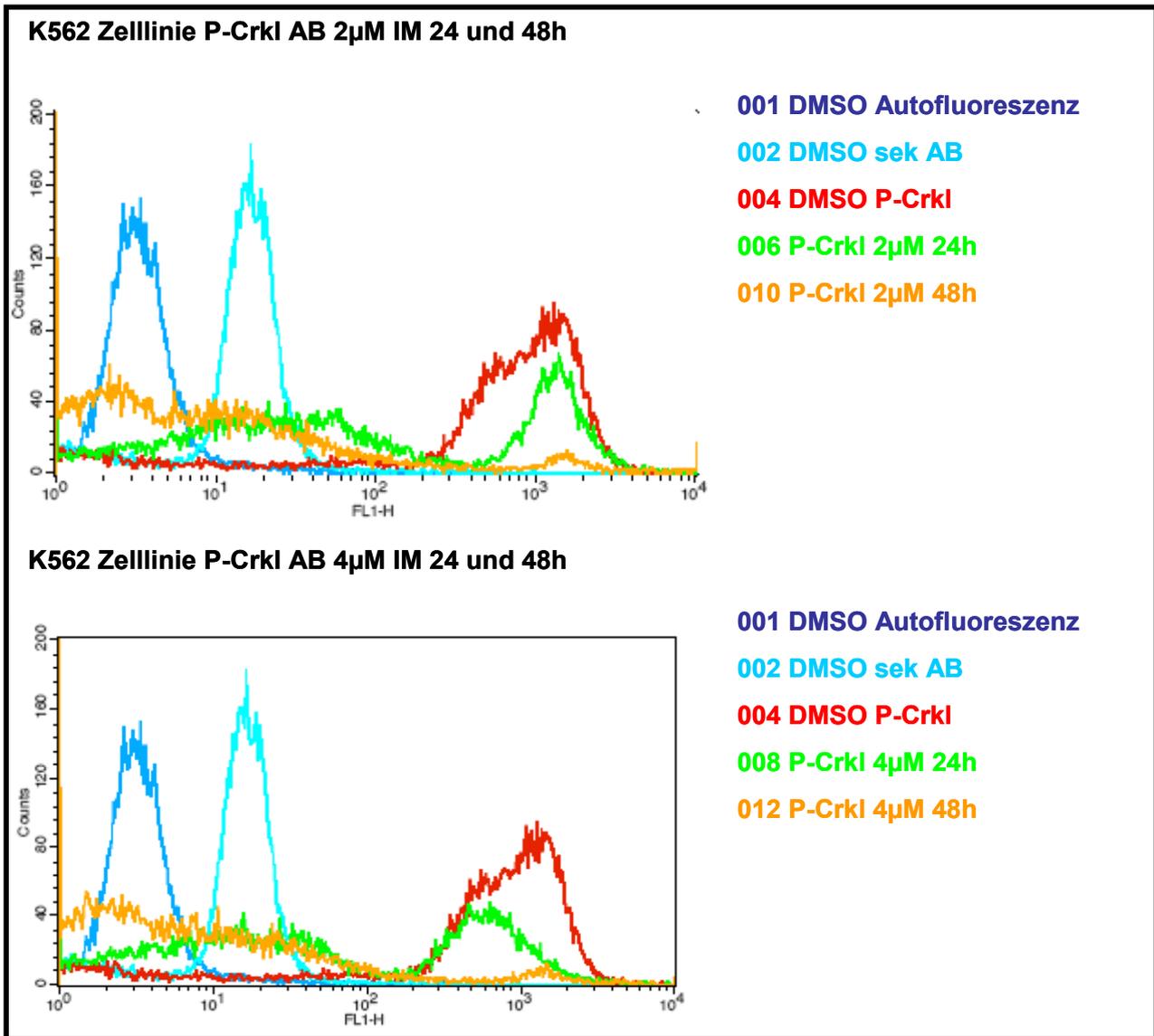
In Abbildung 22 zeigt die dunkelblaue Kurve, dass unbehandelte ungefärbte K562-Zellen bereits ein geringes Maß an Autofluoreszenz bei hoher Ereigniszahl besitzen. Die Isotypkontrolle weist ebenfalls eine höhere Fluoreszenzintensität bei vielen Ereignissen auf. Die mit Ebp1/FITC gefärbte Kontrolle ist durch ein hohes Maß an Fluoreszenz sowie eine hohe Zellzahl gekennzeichnet.

Erst die Zugabe von Imatinib beider Konzentrationen führte sowohl nach 24, als auch nach 48 Stunden zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl (*counts*). Der Effekt ist nach 48 Stunden noch stärker sichtbar. Ebenfalls kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Während nach 24 Stunden bei beiden Konzentrationen eine doppelgipfelige Kurve sichtbar ist, zeigt sich nach 48 Stunden eine deutliche Verschiebung hin zur geringeren Fluoreszenzintensität.

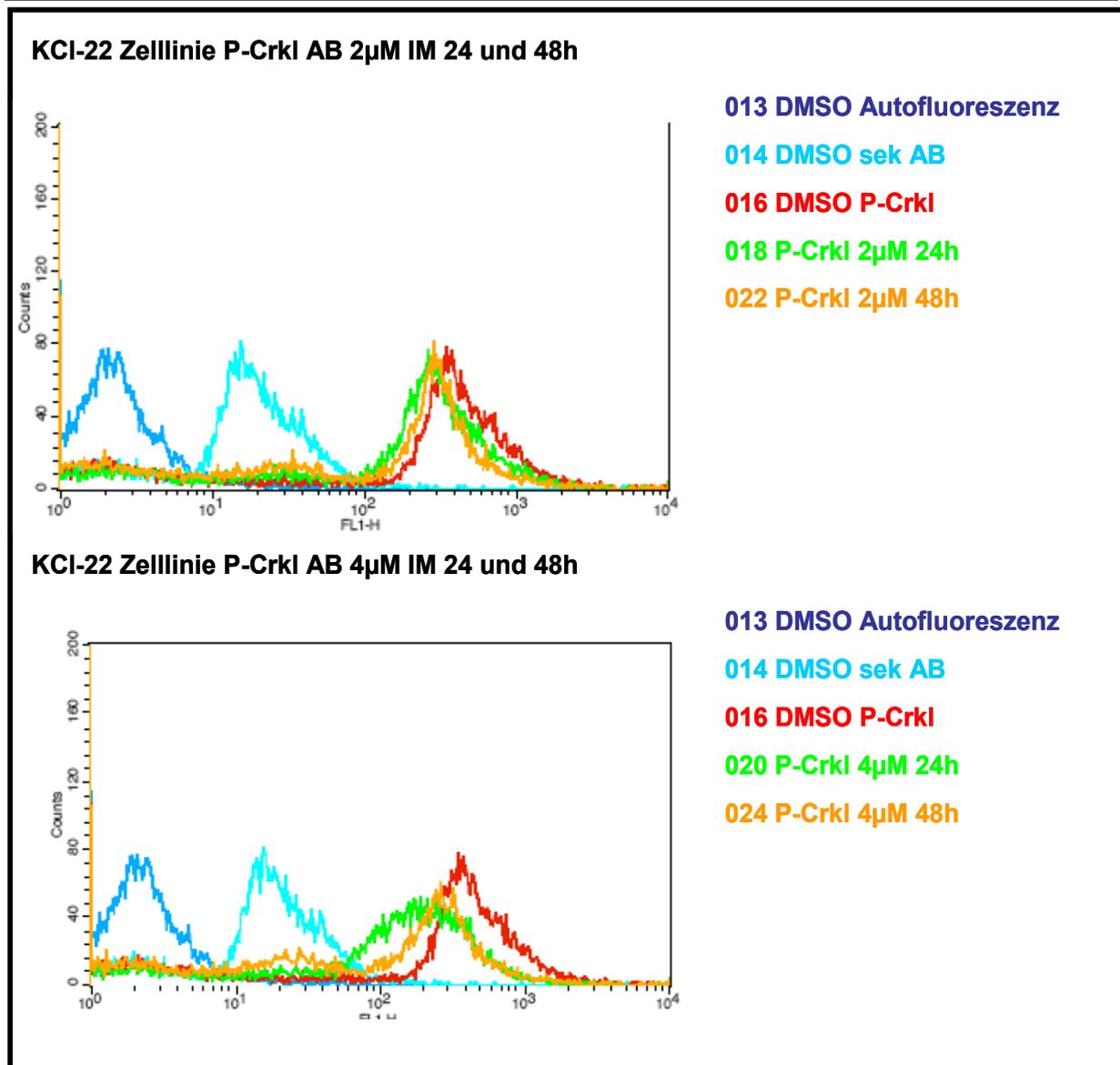
Der gleiche Ansatz wurde auch bei KCL-22 Zellen angewendet (Abb. 23). Wieder kam es unter Imatinib-Behandlung zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle. Die Effekte auf Zellgröße und Zellzahl waren hier jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie bei den zuvor beschriebenen K562-Zellen.

Die Ergebnisse machen ersichtlich, dass Imatinib besonders in K562-Zellen einen erkennbaren Effekt auf das Protein Ebp1 besitzt und unterstützen damit die These der von Balabanov et al. (vgl. Einleitung) beschriebenen Expressionsabnahme des Proteins Ebp1 unter Tyrosinkinase-Inhibition.

In einem zweiten Ansatz wurde zudem die Expression von Phospho-CRKL in mit Imatinib behandelten Zellen und in Kontrollzellen untersucht. Phospho-CRKL soll die Wirkung von Imatinib weiter veranschaulichen, da es nachweislich durch die BCR-ABL Tyrosinkinase beeinflusst wird.



**Abbildung 24:** Die Expression von Phospho-CRKL nimmt in K562-Zellen unter *Imatinib- Behandlung* ab. FACS-Analyse von K562 Zellen behandelt mit 2 / 4  $\mu$ M Imatinib für 24 / 48 Stunden, links: Darstellung der Profile von Autofluoreszenz (dunkelblau), FITC-gelabelten Sekundärantikörper (hellblau), sowie P-CRKL in unbehandelten (rot), bzw. mit 2  $\mu$ M (grün) / 4  $\mu$ M (orange) Imatinib für 24 / 48 Stunden behandelten K562-Zellen



**Abbildung 25: Die Expressionsunterschiede von Phospho-CRKL in KCL-22-Zellen unter Imatinib-Behandlung sind geringer als in K562-Zellen.** FACS-Analyse von KCL-22-Zellen behandelt mit 2 / 4 µM Imatinib für 24 / 48 Stunden, links: Darstellung der Profile von Autofluoreszenz (dunkelblau), FITC-gelabelten Sekundärantikörper (hellblau), sowie P-CRKL in unbehandelten (rot), bzw. mit 2 µM (grün) / 4 µM (orange) Imatinib über 24 / 48 Stunden behandelten KCL-22 Zellen;

Im Gegensatz zu den in Abbildung 25 dargestellten KCL-22-Zellen zeigen die in Abbildung 24 dargestellten K562-Zellen eine deutlichere Reaktion des Proteins Phospho-CRKL (P-CRKL) auf die Tyrosinkinase-Inhibierung durch Imatinib.

Wieder kam es unter Imatinib-Behandlung neben einer Abnahme von Zellgröße und Granularität (nicht gezeigt) zu einem Rückgang der Zellzahl sowie der Fluoreszenzintensität von P-CRKL (vgl. Abb. 24) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Nach 48 Stunden war dieser Effekt noch intensiver als nach 24 Stunden.

Diese Effekte waren bei der Zelllinie KCL-22 (vgl. Abb. 25) bei 2  $\mu\text{M}$  Imatinib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur sehr schwach ausgeprägt. Erst unter 4  $\mu\text{M}$  Imatinib stellte sich ein sichtbarer Verlust an Fluoreszenzintensität und Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle ein (vgl. Abb. 25).

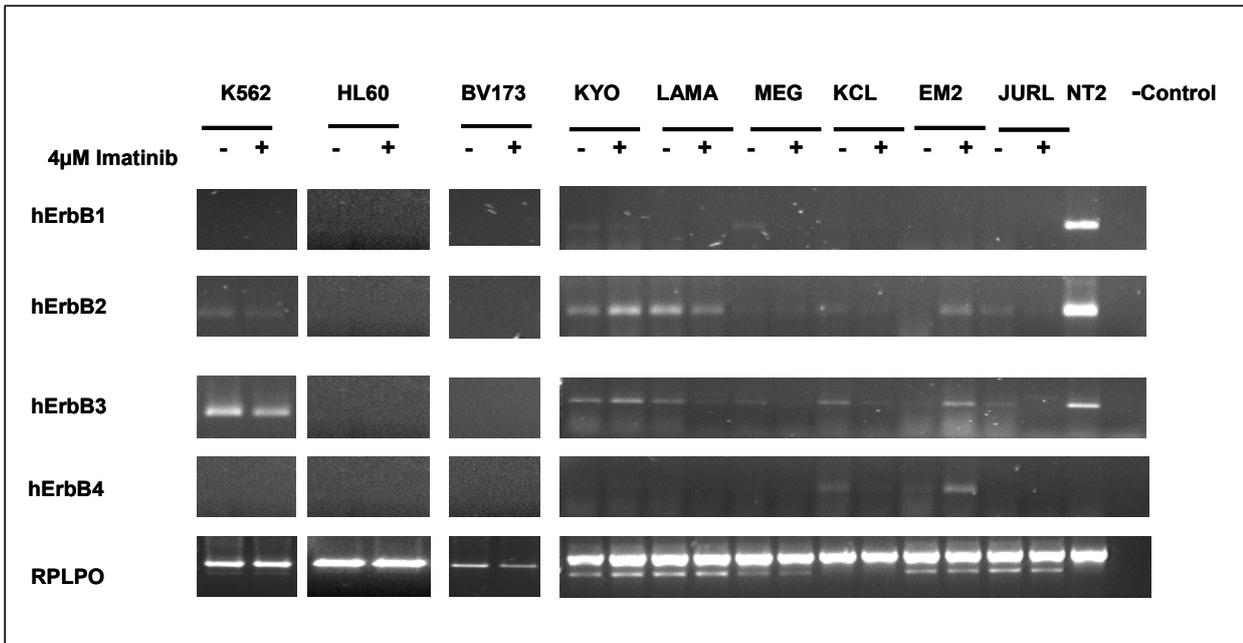
Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib signifikanten Einfluss auf die beiden Proteine P-CRKL und Ebp1 nimmt, da die Expression beider Proteine unter Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors deutlich rückläufig ist.

## 4.2 Vorkommen von ErbB-Rezeptoren in leukämischen Zelllinien

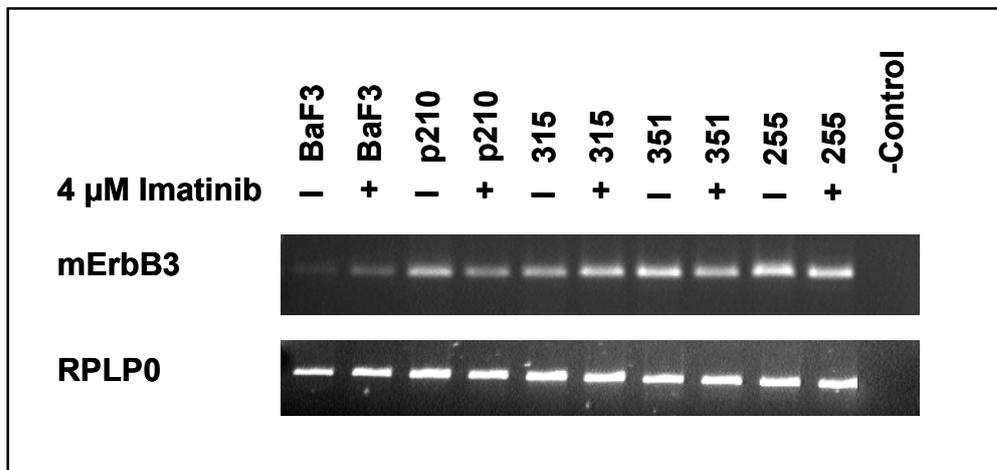
### 4.2.1 mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR

Da es sich bei Ebp1 um einen Bindungspartner des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors3 (ErbB3) handelt, sollte ein Vorkommen der unterschiedlichen ErbB-Rezeptor-mRNA in leukämischen Zellen ebenfalls überprüft werden.

Alle bereits verwendeten humanen und murinen Zelllinien kamen auch bei dieser Methode wieder zum Einsatz. Zunächst wurden zwischen  $1-5 \times 10^6$  Zellen ausgesät und für 24 Stunden mit 4  $\mu\text{M}$  Imatinib behandelt. Die unbehandelte Kontrolle wurde mit der gleichen Menge DMSO-Wasser-Gemisch inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, und mittels der Trizol-Chloroform-Methode konnte RNA isoliert werden, die in cDNA umgeschrieben wurde. Für die sich anschließenden Polymerase-Kettenreaktionen (siehe Anhang) mit verschiedenen ErbB-Primerpaaren wurden zwischen 100 bis 150 ng cDNA als *Template* eingesetzt. Die gewonnenen Produkte wurden auf ein 2%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen und nach einer Laufzeit von etwa 60 Minuten bei 90 Volt mit Hilfe einer UV-Kamera abfotografiert. Es entstanden dabei die folgenden Abbildungen (Abb. 26 und 27):



**Abbildung 26: Humane Leukämie-Zelllinien exprimieren teilweise die mRNA der verschiedenen ErbB-Rezeptoren.** RT-PCR mit cDNA verschiedener humaner leukämischer Zelllinien für 24 Stunden +/- 4  $\mu$ M Imatinib mit Primern für die ErbB-Rezeptoren 1 bis 4.



**Abbildung 27: Murine leukämische Zelllinien exprimieren ErbB3-mRNA.** RT-PCR mit cDNA verschiedener muriner leukämischer Zelllinien für 24 Stunden inkubiert mit +/- 4  $\mu$ M Imatinib mit Primern für die ErbB-Rezeptoren 1 bis 4. Gezeigt werden nur die Gelabschnitte für die Primerpaare ErbB3 und RPLP0

Die Auswertung der PCR-Gele führte zu folgenden Ergebnissen: Nachdem in allen Zelllinien Ebp1 nachgewiesen werden konnte, war es von besonderem Interesse, die mRNA des Bindungspartners ErbB3 von Ebp1 nachzuweisen.

Mit Hilfe spezifischer Primer sollte nicht nur dieser, sondern auch die mRNA der restlichen drei bekannten ErbB-Rezeptoren (ErbB1, ErbB2 und ErbB4) als möglichen Bindungspartnern in den leukämischen Zelllinien nachgewiesen werden. Wie bei den Vorversuchen diente auch hier NT2 als Positivkontrolle (außer bei ErbB4). Wie die Abbildungen 26 und 27 zeigen, wird in allen leukämischen Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinien HL-60 und BV173 (vgl. Abb. 26), die mRNA des ErbB3-Rezeptors exprimiert.

Zusätzlich kommt es zur mRNA-Expression anderer ErbB-Rezeptoren in den verschiedenen Zelllinien. So wird beispielsweise die mRNA des ErbB1-Rezeptors von den Zelllinien MEG-01 sowie KYO-1 exprimiert (vgl. Abb. 26). Diese beiden Zelllinien, analog zu den Zelllinien LAMA-84 und K562, exprimieren zudem auch ErbB2-mRNA (vgl. Abb. 26). Es ist ebenfalls eine schwache ErbB2-Bande in den Zelllinien KCL-22, EM2 und JURL-MK detektierbar (vgl. Abb. 26). Eine Sonderstellung nehmen die Zelllinien KCL-22 und EM2 ein. Hier konnte im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien ErbB4-mRNA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 26). Bei den murinen Zellen kann nur ErbB3-mRNA nachgewiesen werden (vgl. Abb. 27). Alle anderen ErbB-Rezeptor-mRNAs werden in diesem Fall nicht exprimiert. Aus diesem Grund wird in der Abbildung 27 nur die Expression der ErbB3-mRNA und der RPLP0-Kontrolle gezeigt.

Hinsichtlich der Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib lassen sich keine vollkommen eindeutigen Rückschlüsse ziehen. Bei konstantbleibender RPLP0-Kontrolle kam es vor allem bei K562 (vgl. Abb. 26), Ba/F3-p210 (vgl. Abb. 27), LAMA-84, KCL-22, MEG-01 und JURL-MK (vgl. Abb. 26) zu einer sichtbaren Abnahme in der Expression von ErbB3-mRNA in den mit Imatinib behandelten Proben. Auch die murine Zelllinie M351T (vgl. Abb. 27) weist eine schwach abnehmende mRNA-Expressionstendenz von ErbB3 unter Tyrosinkinaseinhibition auf.

Die ohnehin schon sehr geringe mRNA-Expression von ErbB1 in den Zelllinien KYO-1 und MEG-01 scheint unter Imatinib ebenfalls schwächer zu werden (vgl. Abb. 26). Schwächere ErbB2-mRNA-Banden unter Imatinib-Behandlung finden sich bei K562 (vgl. Abb. 26), JURL-MK und LAMA-84 Zellen (Abb. 26) wieder. Bei der MEG-01- und der KCL-22-Zelllinie (vgl. Abb. 26) hingegen kann diesbezüglich keine Aussage getroffen werden, da die Expression im Allgemeinen sowohl in der unbehandelten Kontrolle, als auch in den behandelten Proben äußerst schwach ist. Im Vergleich dazu wird die Expression von ErbB2-mRNA in den Zellen von KYO-1 und EM2 (vgl. Abb. 26) unter Tyrosinkinase-Inhibitor-Behandlung stärker.

Die EM2-Zellen weisen ebenfalls eine ansteigende Expression von ErbB4-mRNA unter Imatinib-Therapie auf (vgl. Abb. 26). Konträr dazu reagiert KCL-22 mit abnehmenden Expressionsraten von ErbB4-mRNA auf Imatinib-Behandlung (vgl. Abb. 26).

In den meisten unterschiedlichen leukämischen Zelllinien konnte somit mRNA nicht nur des ErbB3-Rezeptors, sondern auch der weiteren Vertreter aus der ErbB-Rezeptorfamilie

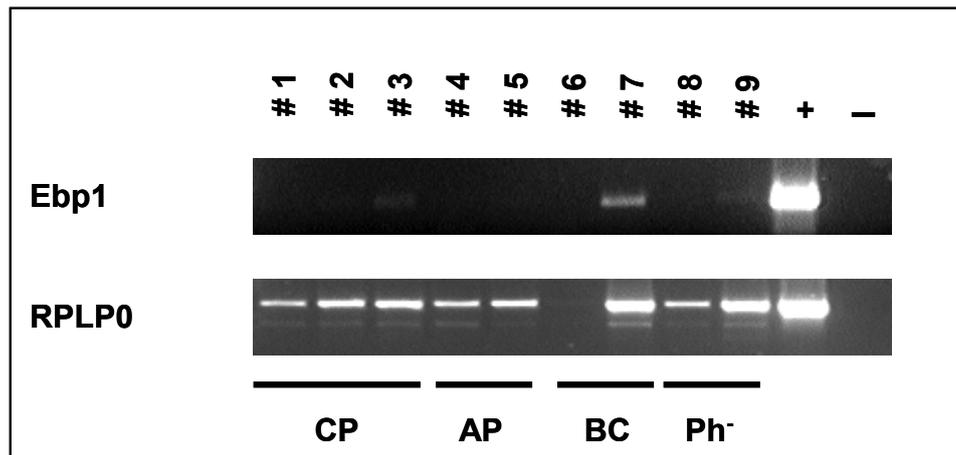
nachgewiesen werden. Der Einfluss von Imatinib auf die mRNA-Expression der Rezeptoren ist nicht eindeutig klärbar.

### **4.3 Nachweis von Ebp1 in humanem Patientenmaterial**

#### **4.3.1 mRNA-Expressionsanalyse in mononukleären Zellen mittels RT-PCR**

Zusätzlich zum Beweis der Ebp1-Expression in leukämischen Zelllinien sollte auch ein direkter Nachweis von Ebp1-mRNA mittels RT-PCR in Primärmaterial (peripherem Blut) von Patienten, die an Chronisch Myeloischer Leukämie erkrankt sind, erfolgen.

Bei diesen Primärmaterialproben handelte es sich um drei Blutproben von verschiedenen Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der chronischen Phase der CML befanden und noch keine Therapie bekommen hatten. Zwei Proben stammten von unbehandelten Patienten in der akzelerierten Phase der CML, und zwei weitere Blutproben wurden Patienten entnommen, die zum Entnahmezeitpunkt die Blastenkrise der Erkrankung durchliefen und ebenfalls noch keine Therapie erhalten hatten. Zu Vergleichszwecken wurden auch die Blutproben von zwei Philadelphia-Chromosom-negativen, jedoch schon behandelten CML-Patienten zu Rate gezogen. Zunächst wurde RNA aus mononukleären Zellen (MNC) isoliert. Diese Isolierung erfolgte eingangs mit Hilfe verschiedener RNA-Isolierkits der Firma Qiagen, resultierte jedoch in einer hohen Kontaminationsrate mit genomischer DNA. Nach Nutzung der Trizol-Chloroform-Methode (vgl. „Material und Methoden“), war diese Kontamination nicht mehr nachweisbar, und die gewonnene RNA wurde mit Hilfe der First Strand cDNA-Methode in cDNA umgeschrieben. Nach erfolgter Konzentrationsmessung wurden zwischen 150 und 200 ng für die sich anschließende Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind unter „Material und Methoden“ ausführlich beschrieben. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss auf ein ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht abfotografiert (vgl. Abb. 28)



**Abbildung 28:** Die mRNA von Ebp1 kann in humanen mononukleären Zellen einiger weniger Patienten nachgewiesen werden. RT-PCR: cDNA isoliert aus mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut von CML-Patienten, die sich zum Entnahmezeitpunkt in unterschiedlichen Phasen der Erkrankung befanden

Die Auswertung des PCR-Gels zeigte nur ein schwaches Bandenmuster für die mRNA-Expression von Ebp1 bei einem Patienten in der chronischen Phase (#3 in Abb. 28) sowie bei einem weiteren Patienten in der Blastenkrise (#7 in Abb. 28). Zusätzlich ließen sich eine sehr schwache Bande bei einem der Philadelphia-Chromosom-negativen CML-Patienten (#9 in Abb. 28) und eine kaum sichtbare Bande bei Patient #2 (Abb. 28) erkennen. Die Expression der RPLP0-Kontrolle war mit Ausnahme von Patient #6 (Abb. 28) gut, wenn auch nicht vollkommen regelmäßig darstellbar. Bei der verwendeten Positivkontrolle handelte es sich um NT2-Zellen.

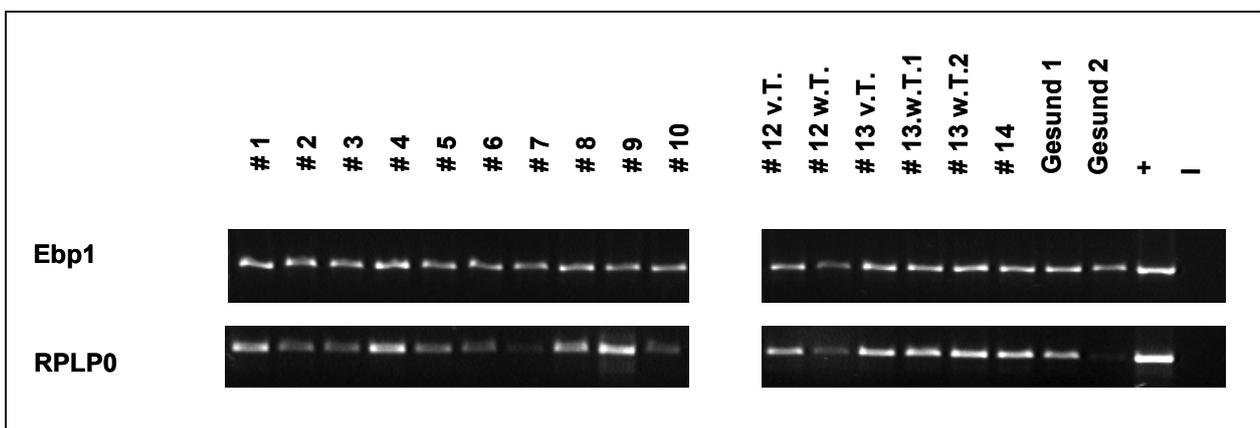
Zunächst lässt sich sagen, dass die mRNA von Ebp1 auch in Patientenmaterial nachweisbar ist. Jedoch gab es bei der Nutzung von MNCs keine nennenswerten Expressionsunterschiede in den verschiedenen Phasen dieser Leukämieform. Auch scheint es keinen Unterschied zu machen, ob das Material von Philadelphia-Chromosom-positiven oder -negativen Spendern stammt, bzw. ob eine medikamentöse Therapie bereits begonnen wurde (vgl. #3 und #9 Abb. 28), da Ebp1-mRNA in beiden Fällen nachweisbar ist.

#### 4.3.2 mRNA-Expressionsanalyse in CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels RT-PCR

Im nächsten Schritt wurde mit aus Spenderblut isolierten CD34<sup>+</sup>-Zellen gearbeitet. Bei CD34<sup>+</sup>-Zellen handelt es sich um pluripotente Stamm- und Vorläuferzellen, die als Oberflächenantigen CD34<sup>+</sup> tragen. Erfahrungsgemäß ist die Ausbeute bei diesen Zellen an RNA deutlich höher als bei herkömmlichen mononukleären Zellen (MNC).

## Ergebnisse

Auch hier wurde also RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es wurden erneut 150 ng cDNA-*Template* für die sich anschließende Polymerase Kettenreaktion eingesetzt. In einem ersten Ansatz wurden Patientenproben aus verschiedenen Stadien der CML verwendet (siehe Legende in Abb. 29), sowie bereits therapierte und nicht behandelte Patienten auf Unterschiede hinsichtlich der Ebp1-Expression untersucht (vgl. Abb. 29). Die Patienten #1, 2, 7, 12 und 14 befanden sich zum Entnahmezeitpunkt in der chronischen Phase der CML. Bei Patient 3 handelte es sich um einen Patienten mit Ph<sup>-</sup>-CML, welcher zum Entnahmezeitpunkt unter Litalir-Therapie stand. Die CD34<sup>+</sup>-Zellen von den Proben #8, 10 und 13 waren aus Patienten gewonnen, die sich zum Entnahmezeitpunkt in der akzelerierten Phase der Erkrankung befanden. Die Blastenkrise durchliefen zum Entnahmezeitpunkt die noch unbehandelten Patienten #4, 5 und 9. Die Probe #6 kann keinem Erkrankungsstadium zugeordnet werden. Bei den Patienten #12 und 13 konnten sowohl vor Therapiebeginn, als auch unter laufender Therapie Proben (Litalir #12 und Imatinib #13) gewonnen werden.



**Abbildung 29: Die mRNA-Expression von Ebp1 in Primärmaterial zeigt Unterschiede in verschiedenen Stadien der CML. RT-PCR mit cDNA isoliert aus CD34<sup>+</sup>-Zellen sowohl von CML- als auch von gesunden Patienten. Die Patientenproben entsprechen folgenden Diagnosen:**

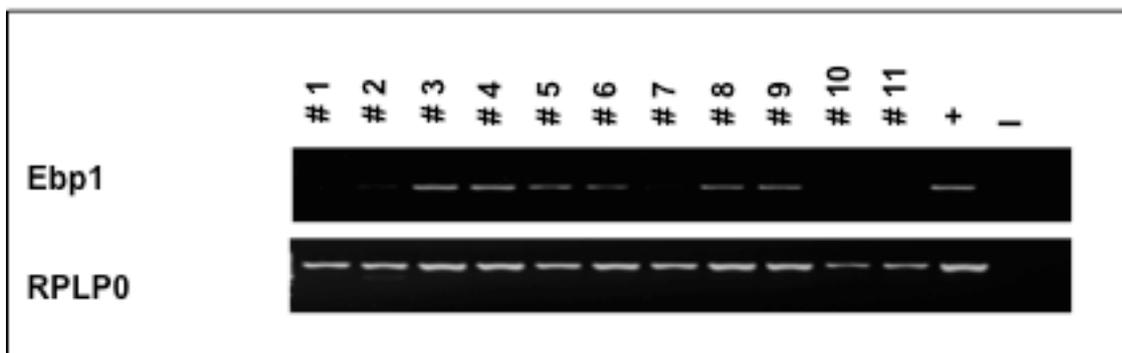
# 1 Chronische Phase (CP), Ph+	# 9 BC, Ph+	# 14 CP
# 2 CP	# 10 AP	# Gesund 1
# 3 CML Ph-	# 11 nicht gezeigt	# Gesund 2
# 4 Blastenkrise (BC)	# 12 v.T. CP, Ph+ (vor Therapie)	+ NT2 Zellen
# 5 BC, t-Zell BC	# 12 w.T. CP, Ph+ (während Therapie)	
# 6 CML Ph+	# 13 v.T. AP	
# 7 CP	# 13 w.T. AP	
# 8 AP, Ph+	# 13 w.T. AP	

Alle Proben zeigen in Abbildung 29 eine Expression von Ebp1-mRNA bei ebenfalls darstellbarer RPLP0-Kontrolle (Kontroll-Gen).

Es existieren jedoch keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Expression im Vergleich zwischen gesunden Spendern und CML-Patienten sowie zwischen den einzelnen Phasen der CML. Auch nimmt die Expressionsstärke von Ebp1-mRNA nicht unter Therapiebedingungen ab (vgl. Abb. 29: #12 und #13).

Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass Ebp1-mRNA zwar in CD34<sup>+</sup>-Zellen vorhanden ist, durch seine Expressions-Schwankungen jedoch keine Regelmäßigkeiten erkennen lässt, die eine prognostische Aussage zulassen würden.

Ein zweiter Versuchsansatz beschäftigt sich in der Hoffnung auf höhere Aussagekraft mit der Expression von Ebp1 in Proben von Patienten, die sich zum Entnahmezeitpunkt mit Ausnahme von Probe #9 im Stadium der Blastenkrise befanden. Wie bereits beschrieben, scheint hier nämlich die Proteinexpression stärker zu sein (vgl. Abb. 30). Die Positivkontrolle stellten K562-Zellen dar. Bei Probe #9 handelt es sich um CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Blut eines noch nicht therapierten Patienten, der sich in der chronischen Phase befand. Die Patienten #1, 2, 3, 5, 9 und 10 waren zum Entnahmezeitpunkt noch nicht hinsichtlich ihrer Erkrankung therapiert worden. Die Patienten #4, 7 und 8 hatten zum Entnahmezeitpunkt bereits eine medikamentöse Therapie in Form von Litalir (#4 und 8) oder Imatinib (#7) erhalten. Probe #11 entstammt einem gesunden Patienten.



**Abbildung 30: Patienten, welche sich in der Blastenkrise der CML befinden, exprimieren teilweise Ebp1-mRNA.** Expression von Ebp1-mRNA in Primärmaterial: RT-PCR mit cDNA isoliert aus CD34<sup>+</sup>-Zellen von Patienten, die sich zum Entnahmezeitpunkt im Stadium der Blastenkrise befanden.

Die Expression von Ebp1 zeigt sich im Vergleich zur konstanten RPLP0-Kontrolle in den unterschiedlichen Proben sehr variabel. Einige Spender exprimieren Ebp1 relativ stark (vgl. Abb. 30 # 3-6, 8 und 9), wohingegen die Proben #2 und #7 nur schwache Banden erkennen lassen. Bei den Spendern #1, 10 und 11 ist Ebp1-mRNA mittels PCR nicht nachweisbar.

Dabei spielt es kaum eine Rolle, ob es sich um therapierte oder nicht therapierte bzw. gesunde Patienten handelt.

Da Ebp1 diese starken mRNA-Expressionsunterschiede bei den verschiedenen Patientenproben aufweist, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob und welche Rolle Ebp1 in der Blastenkrise der CML spielt.

### **4.4 Nachweis von ErbB-Rezeptoren in humanem Patientenmaterial**

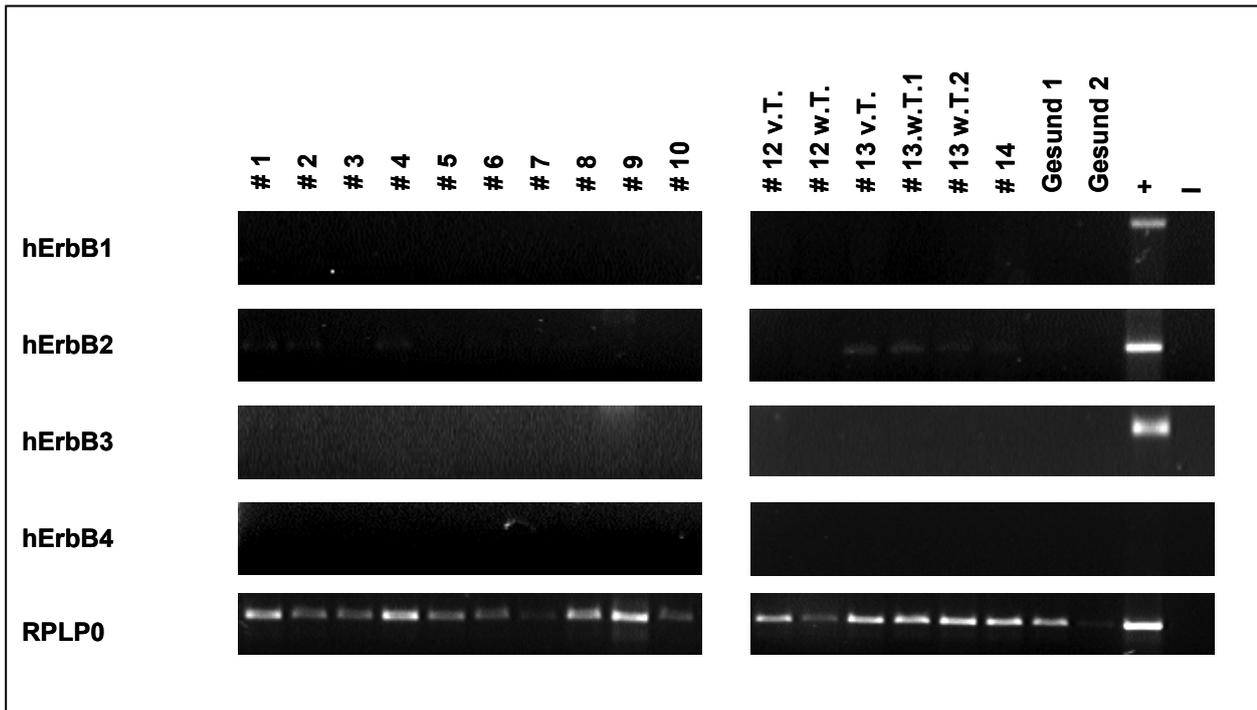
#### **4.4.1 RT-PCR- Expressionsanalyse in mononukleären Zellen**

Die Proben, die bereits in 4.3.1 zum Einsatz kamen, wurden zusätzlich auch auf mRNA-Expression der verschiedenen ErbB-Rezeptoren untersucht. Mit der gewonnenen cDNA wurden PCRs mit den ErbB-Primerpaaren (ErbB1 bis ErbB4) durchgeführt und mit Hilfe eines ethidiumbromidgefärbten Agarosegels unter einer UV-Lampe abfotografiert.

Es konnte keine mRNA-Expression bei den verschiedenen epithelialen Rezeptoren nachgewiesen werden. Lediglich die RPLP0-Kontrolle ließ sich darstellen (nicht abgebildet). Aufgrund der geringeren RNA-Ausbeute und der fehlenden Nachweisbarkeit der ErbB-Rezeptoren folgten im nächsten Schritt CD34<sup>+</sup> -Zellen um eine höhere Aussagekraft zu erzielen.

#### **4.4.2 Expressionsanalyse in CD34<sup>+</sup> -Zellen mittels RT-PCR**

Bei dieser Analyse wurden die unter Punkt 4.3.2 beschriebenen Proben für eine PCR angewendet. Zunächst wurden Proben aus unterschiedlichen CML Stadien sowie von gesunden Spendern untersucht (vgl. Abb. 31).

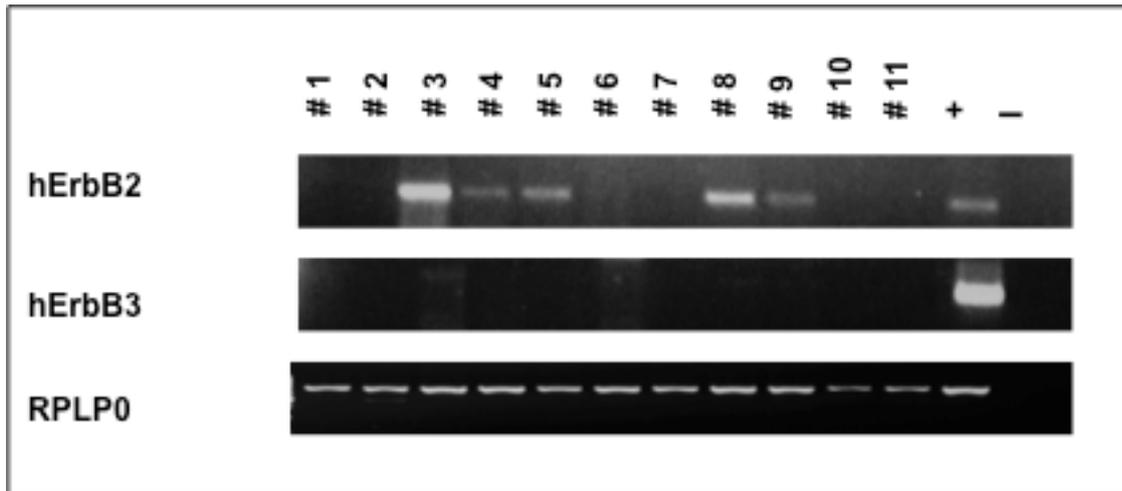


**Abbildung 31: Die mRNA des ErbB2-Rezeptors wird in unterschiedlichen humanen CD34<sup>+</sup>-Zellen exprimiert. RT-PCR mit cDNA isoliert aus CD34<sup>+</sup>-Zellen sowohl von CML- als auch von gesunden Patienten. Patientenproben sind identisch mit denen aus Abbildung 29**

In den Patientenproben aus den unterschiedlichen CML-Stadien gab es keine Expression von mRNA der ErbB-Rezeptoren ErbB1, ErbB3 und ErbB4, jedoch bei ErbB2 (Abb. 31).

Die Patientenproben # 1, 2, 4, 6, 8, 13 v.T., 13 w.T.1, 13 w.T.2 und 14 sowie der gesunde Spender # Gesund 1 zeigten eine Bande für die Expression von ErbB2-mRNA bei 194 kb (vgl. Abb. 31). Es existierte jedoch kein Unterschied in der Expression im Vergleich zwischen gesunden und an CML erkrankten Spendern bzw. zwischen den verschiedenen Stadien der Erkrankung. Auch scheint die Therapie die Expression nicht zu beeinflussen, da die Expressionsstärke von ErbB2 bei Patient #13 während der Therapie im Vergleich zur mRNA-Expression von ErbB2 vor der Therapie nicht abnimmt.

In einem zweiten Ansatz wurden auch die Proben (identisch mit den unter 4.3.2 und in Abb. 30 beschriebenen Proben) von Spendern, die sich zum Entnahmezeitpunkt mit einer Ausnahme (#6) in der Blastenkrise befanden, auf Expression der ErbB-Rezeptoren untersucht (vgl. Abb. 32: Zur besseren Übersicht sind nur ErbB2 und 3 sowie RPLP0 dargestellt).



**Abbildung 32: Patienten im Stadium der Blastenkrise exprimieren teilweise mRNA der Rezeptoren ErbB2 und ErbB3.** RT-PCR mit cDNA isoliert aus CD34<sup>+</sup>-Zellen von Patienten, die sich zum Entnahmezeitpunkt in der Blastenkrise der CML befanden. Patientenproben sind identisch mit denen aus Abbildung 30

Bei einer gleichmäßigen Expression des Kontrollgens RPLP0 in allen Proben (mit Ausnahme der Negativ-Kontrolle) zeigten drei Proben eine schwache mRNA-Expression des ErbB3-Rezeptors (vgl. Abb. 32, Proben # 3, 8 und 9), welche im vorangegangenen Versuch nicht nachgewiesen werden konnte.

Wie im Vorversuch (vgl. Abb. 31) konnte bei Patienten im Stadium der Blastenkrise ebenfalls eine Expression des ErbB2-Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 32, Proben #3, 4, 5, 6, 8 und 9). Die Expressionsstärke variiert jedoch stark in den verschiedenen Spendern auch unabhängig davon, ob eine medikamentöse Therapie stattgefunden hat oder nicht. Patient #3 zeigt eine sehr deutliche Expression, wohingegen die des Patienten #4 nur sehr schwach ist. Jedoch ist in diesen beiden Proben beispielsweise die Ebp1-mRNA stark detektierbar (vgl. Abb. 30).

Die Patienten #3, 8 und 9 (vgl. Abb. 32) zeigen folglich eine mRNA-Expression sowohl von ErbB2, als auch von ErbB3.

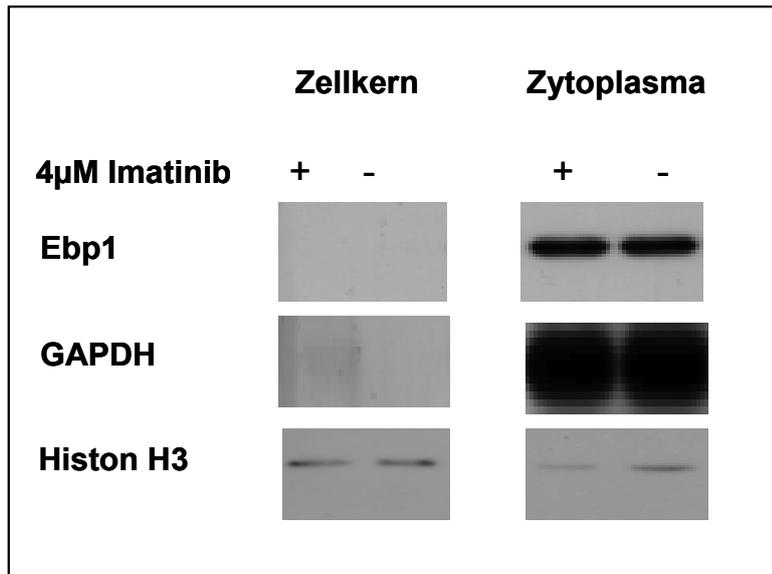
Im Vergleich zu den zuvor gewählten leukämischen Zelllinien ist ein Nachweis von mRNA des ErbB3-Rezeptors hier eher selten. Jedoch weisen die Patientenproben eine häufig detektierbare mRNA-Expression des ErbB2-Rezeptors auf.

## **4.5 Ebp1 ist in K562-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert**

### **4.5.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse**

Ebp1 scheint in unterschiedlichen Zellkompartimenten angesiedelt zu sein. Die genaue Lokalisation des Proteins in K562-Zellen wurde jedoch zuvor noch nicht untersucht.

Um die zelluläre Lokalisation von Ebp1 in K562-Zellen bestimmen zu können, wurden zunächst  $1 \times 10^8$  Zellen pro Ansatz ausgesät und über 24 Stunden mit  $4 \mu\text{M}$  Imatinib behandelt (Kontrolle: entsprechende Menge eines DMSO-Wasser-Gemisches). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die einzelnen Zellkompartimente isoliert. Dies geschah entweder über einen Saccharosegradienten mit Hilfe von Ultrazentrifugation (vgl. „Material und Methoden“) oder mittels eines Protokolls, welches verschiedene Puffer in unterschiedlich hoher Salzkonzentration nutzt (siehe „Material und Methoden“). Eindeutig bessere Ergebnisse lieferte die Saccharose-Methode. Nach Erhalt der jeweiligen Fraktionen (Zytoplasma +/- Imatinib und Zellkern +/- Imatinib) schloss sich die Konzentrationsbestimmung nach der BCA-Methode an. Für die sich anschließende SDS-PAGE wurden  $10 \mu\text{g}$  der jeweiligen Probe auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das folgende Blotten auf die Nitrozellulosemembran erfolgte nach der Semi-Dry-Blot Methode. Die Membran wurde zunächst mit einem Histon H3-Antikörper zum Nachweis der Zellkernfraktion inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit einem GAPDH-Antikörper behandelt, um die gelungene Trennung der zytoplasmatischen Fraktion zu beweisen. Im letzten Schritt folgte die Inkubation mit dem Ebp1-Antikörper zum Nachweis der zellulären Lokalisation dieses Proteins (vgl. Abb. 33).



**Abbildung 33: Ebp1 ist in K562-Zellen im Zytoplasma lokalisiert.** Expression von Ebp1 in verschiedenen Zellkompartimenten: Western Blot mit behandelten und unbehandelten (24 Stunden, +/- 4 µM Imatinib) zellulären K562-Fraktionen: Zellkern versus Zytoplasma. Untersuchung der Lokalisation von Ebp1.

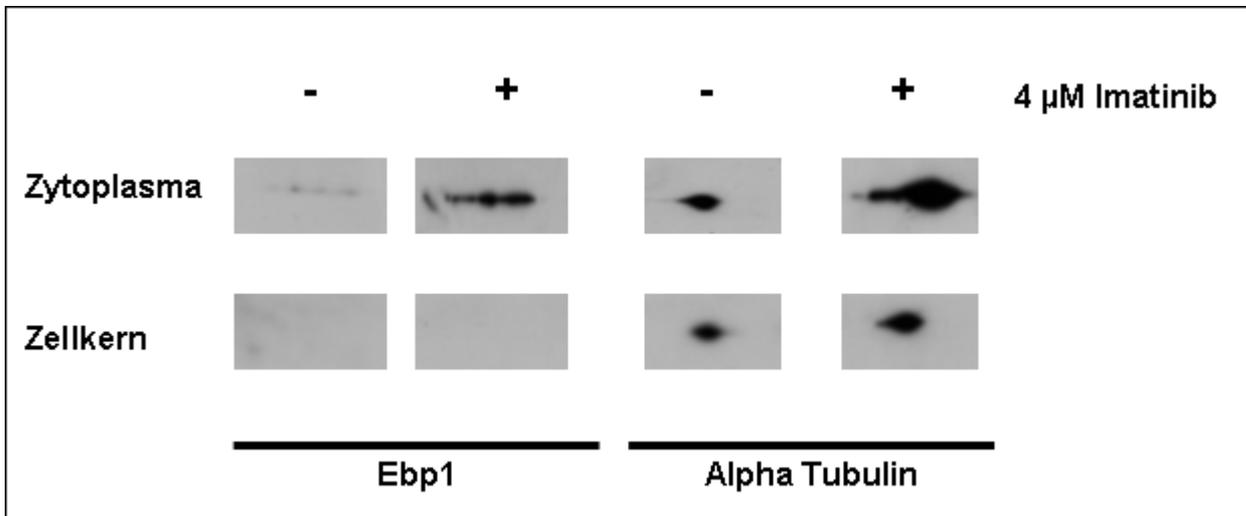
Wie sich in Abbildung 33 zeigt, ist die Trennung in die unterschiedlichen Zellkompartimente relativ sauber durchgeführt worden. In der zytoplasmatischen Fraktion sind noch Zellkernreste vorhanden (schwache Histon H3-Bande in dieser Fraktion). In den Zellkernlysaten sind keine zytoplasmatischen Anteile mehr detektierbar (keine GAPDH-Bande). Es zeigt sich deutlich, dass Ebp1 ausschließlich im Zytoplasma der leukämischen K562-Zelllinie lokalisiert ist. Auch unter der Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib kommt es zu keiner Translokation des Proteins in den Nukleus.

Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen lautet demnach, dass Imatinib keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ebp1 zu besitzen scheint. Auch ändert sich an der Expressionsstärke dieses Proteins in den behandelten Proben nichts im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

#### 4.5.2 Analyse mit Hilfe von 2D-Gelen

In dieser zweiten Methode, die ebenfalls Aufschluss über die Lokalisation des Proteins Ebp1 geben soll, wurden K562-Zellen wie unter 4.5.1 beschrieben ausgesät und mit Imatinib behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden aus den gewonnenen Zellpellets eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion über einen Saccharosegradienten gewonnen. Im Anschluss an die Messung der Proteinkonzentration wurden je 40 µg der jeweiligen Probe zur Hydratisierung auf die entsprechenden Gelstreifen aufgetragen. Nach Abschluss der

ersten und zweiten Dimension wurden die gewonnenen Membranen zunächst mit dem Ebp1-Antikörper und anschließend zur Ladungskontrolle mit einem Alpha Tubulin Antikörper inkubiert (vgl. Abb. 34).



**Abbildung 34: Ebp1 zeigt in K562-Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation.** Zellfraktionierung von K562-Zellen (24 Stunden, +/- 4 μM Imatinib): Western Blot mit behandelten und unbehandelten zellulären K562-Fractionen: Zellkern versus Zytoplasma. Untersuchung der Lokalisation von Ebp1.

Wie auf der Abbildung 34 deutlich zu erkennen ist, befindet sich Ebp1 auch bei dieser Methode ausschließlich im Zytoplasma. Die Ladungskontrolle mit Alpha Tubulin ist sowohl in der zytoplasmatischen, als auch in der nukleären Fraktion nachweisbar.

Ob ein Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf Ebp1 vorliegt, lässt sich in diesem Fall nicht genau sagen, da die Ladungskontrolle bei den mit Imatinib behandelten Proben deutlich stärker ist, als bei den nicht behandelten Proben. Auf weitere Untersuchung auf Reinheit der jeweiligen Fraktionen mittels Histon H3- oder GAPDH-Antikörpern wurde daher in diesem Fall verzichtet.

#### **4.6 Die Ebp1-Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten in K562-Zellen**

##### **4.6.1 DNA-Isolierung & Transfektion der unterschiedlichen Ebp1-Isoformen**

Mit freundlicher Genehmigung von Zhixue Liu (Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, 615 Michael Street, Atlanta, GA) wurden uns die verwendeten Ebp-Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 als Expressionsvektoren

zugeschickt. Die jeweiligen Ebp1-Konstrukte wurden zuvor in einen pGFP-C2-Vektor hineinkloniert.

Zunächst wurde eine Transformation dieser Konstrukte in kompetente Bakterien durchgeführt. Nach dem Ausplattieren auf kanamycinhaltigen LB-Platten konnten nach etwa zwölf Stunden mehrere Klone von den jeweiligen Platten gewonnen werden, die für die anschließende DNA-Isolierung genutzt werden konnten. Nach Isolierung der DNA wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdau überprüft, ob die jeweiligen Konstrukte in der richtigen Größe vorlagen. Als Restriktionsenzyme wurden Bgl II und EcoR I verwendet.

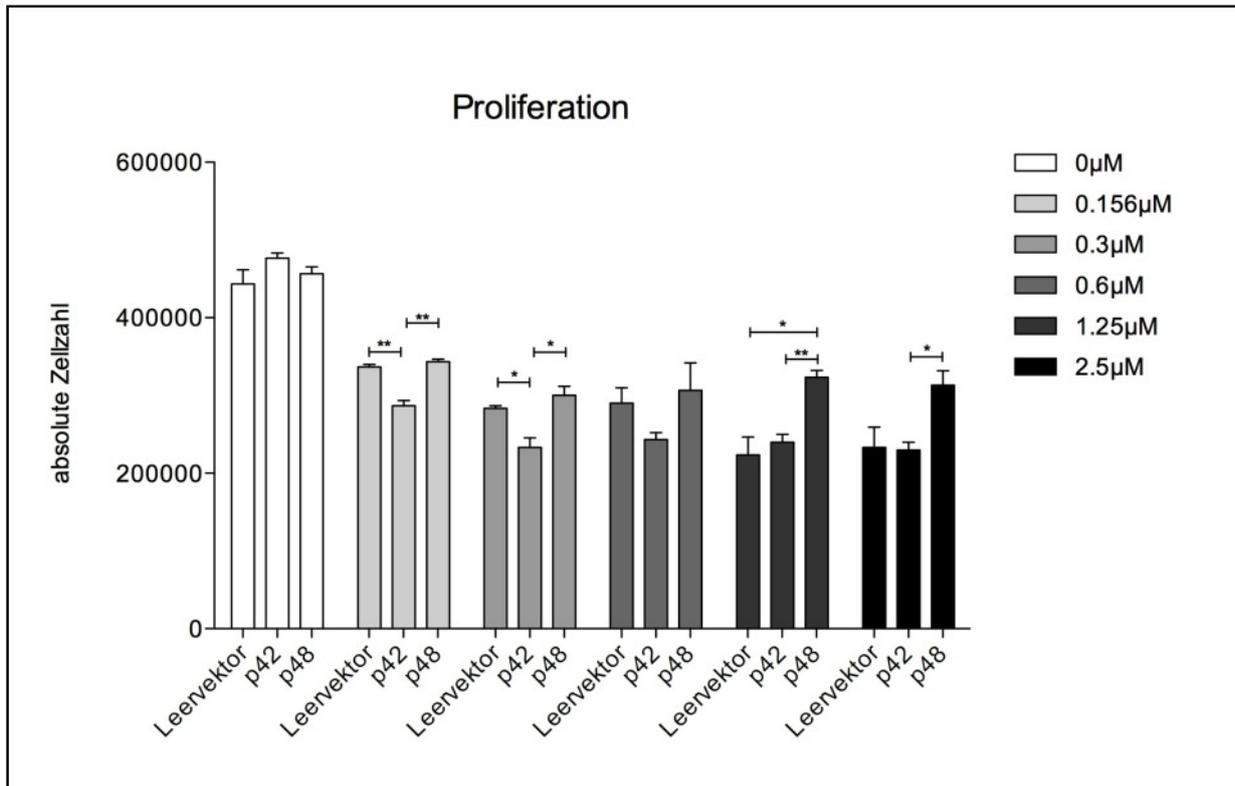
Die Proben, die optimale Ergebnisse in Bezug auf die Konstruktgröße erzielten, wurden erneut in kompetente Bakterien transformiert. Die auf den Platten gewachsenen Ebp1-Klone wurden über Nacht in LB-Medium vermehrt. Es wurde weitere DNA in Form von Maxi Preps isoliert (vgl. „Material und Methoden“). Die gewonnene DNA konnte im Anschluss an die Konzentrationsmessung mittels Elektroporation in K562-Zellen transfiziert werden. Zusätzlich zu den zwei verschiedenen Ebp1-Konstrukten (Ebp1-p42 und Ebp1 p48) wurden weitere K562-Zellen zudem mit dem Leervektor pGFP-C2 als spätere Kontrolle transfiziert.

Die Zellen wurden mit Hilfe von durchflusszytometrischen Methoden mehrmalig auf Reinheit sortiert. Nach dem Erreichen einer mindestens 70%igen GFP-positiven Rate konnten die Zellen für weitere Versuche genutzt werden.

### **4.6.2 Proliferationsassay**

Mit Hilfe des Proliferationsassays von K562-Zellen sollte im Vorwege überprüft werden, ob Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den beiden Ebp1-Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 im Vergleich zur mit dem Leervektor pGFP-C2 transfizierten Kontrolle bei der Behandlung mit Imatinib existieren.

Die unterschiedlich transfizierten K562-Zellen (K562-pGFP-C2, K562-Ebp1-p42 und K562-Ebp1-p48) wurden zu den in „Material und Methoden“ beschriebenen Konditionen ausgesät und mit unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen (0; 0,156; 0,3; 0,6; 1,25 und 2,5  $\mu\text{M}$ ) für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellzahlen sowie der Anteil der lebendigen und toten Zellen mit Hilfe des Vi-Cells XR 2.03 bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism ausgewertet (vgl. Abb. 35).



**Abbildung 35: Das Wachstum der Isoform Ebp1-p48 wird durch Imatinib nicht so stark gehemmt wie das von Ebp1-p42.** Proliferationsassay mit stabil transfizierten K562-Zellen. Die Zellen wurden mit dem Leervektor pGFP-C2 (Kontrolle), Ebp1-p42 und Ebp1-p48 transfiziert und unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen ausgesetzt. Darstellung der lebenden Zellen bei verschiedenen Imatinib-Konzentrationen.

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

Die Diagramme, die in Abbildung 35 dargestellt sind, zeigen folgende Ergebnisse: In Abbildung 35 sind auf der x-Achse die jeweiligen Zellen (transfiziert mit dem Leervektor, Ebp1-p42 und Ebp1-p48) bei unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen (0 bis 2,5 µM) im Vergleich zu der absoluten Zellzahl auf der y-Achse angegeben. Bei den unbehandelten Zellen (0 µM Imatinib) lassen sich bei allen drei Konstrukten (Kontrollvektor, Ebp1-p42 und Ebp1-p48) mehr als 400.000 lebende Zellen dokumentieren. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Bei steigender Imatinib-Konzentration ist jedoch deutlich ablesbar, dass die mit dem Kontrollvektor sowie mit dem Konstrukt Ebp1-p42 transfizierten Zellen wesentlich niedrigere Zellzahlen als die mit Ebp1-p48 transfizierten K562-Zellen besitzen. Die Kontrolle und das Konstrukt Ebp1-p42 verhalten sich relativ ähnlich. Jedoch wird das Wachstum des Konstruktes Ebp1-p42 bei Konzentrationen von 0,156 bzw. 0,3 µM Imatinib sogar noch stärker gehemmt als das des Leervektors ( $p < 0,01$  bei 0,156 µM und  $p < 0,05$  bei 0,3 µM). Bei einer Imatinib-Konzentration von 1,25 µM sind im Vergleich zu pGFP-C2 und Ebp1-p42 bis zu 100.000 lebende Zellen mehr beim Konstrukt Ebp1-p48

zählbar. Diese Unterschiede sind bei dieser Konzentration insofern signifikant ( $p < 0,05$  zwischen Ebp1-p48 und Leervektor, und  $p < 0,01$  zwischen Ebp1-p42 und Ebp1-p48) als dass die Isoform Ebp1-p48 hinsichtlich eines Zellsterbens nicht so stark auf die Behandlung mit Imatinib reagiert.

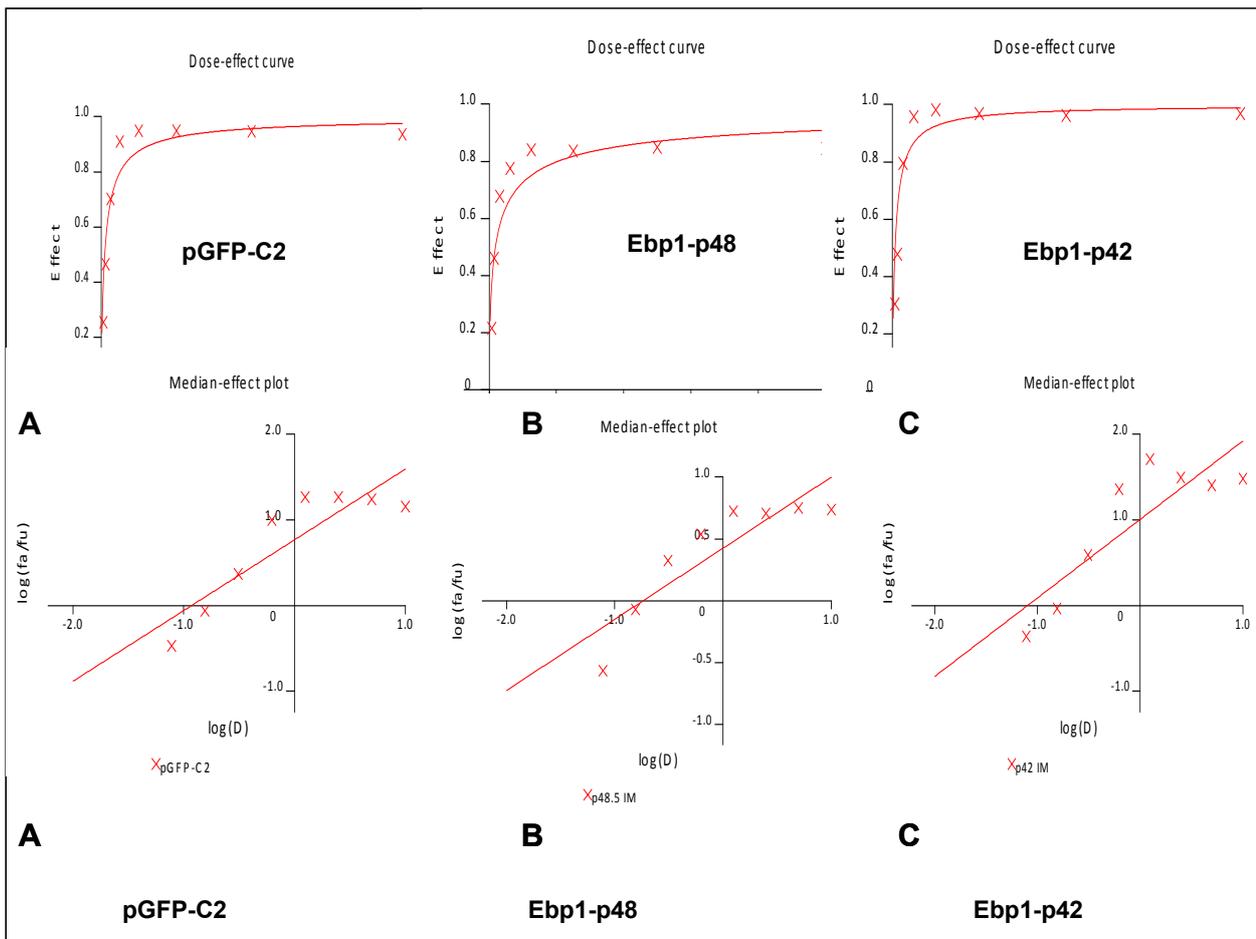
Bei der Betrachtung der lebenden Zellen (hier nicht dargestellt) zeigt sich auch, dass es bei den unterschiedlichen Imatinib-Konzentrationen bei der Isoform Ebp1-p48 nie zu weniger als 80% viabler Zellen kommt. Im Gegensatz dazu sinkt der Anteil der lebenden Zellen in der pGFP-C2 Kontrolle bis auf 70% (2,5  $\mu\text{M}$  Imatinib), und bei der Ebp1-p42-Isoform sogar unter 70% (0,6-2,5  $\mu\text{M}$  Imatinib). Abermals sind diese Unterschiede bei 1,25  $\mu\text{M}$  signifikant ( $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass die Isoform Ebp1-p48 in ihrem Wachstumsverhalten nicht so stark auf die Tyrosinkinase-Inhibition durch Imatinib reagiert wie der Leervektor oder die Isoform Ebp1-p42. Die mit Ebp1-p42 transfizierten Zellen verhalten sich ähnlich wie die pGFP-C2-transfizierten K562-Kontrollzellen.

### **4.6.3 Zytotoxizitäts- Assay (MTT)**

Die Lebensfähigkeit der mit den Isoformen transfizierten K562-Zellen sowie die mit pGFP-C2-transfizierte Kontrolle unter steigenden Imatinib-Konzentrationen wurde mit Hilfe des MTT-Zytotoxizitätstests (wie in „Material und Methoden“ beschrieben) überprüft.

Da die Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle ausüben, galt unser besonderes Interesse der Frage, wie sich die transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle hinsichtlich ihres Ansprechens auf das Medikament verhalten (vgl. Abb. 36).



**Abbildung 36 oben:** Es gibt keine Unterschiede zwischen den Ebp1-Isoformen hinsichtlich des mittleren IC<sub>50</sub>-Wertes. MTT-Zytotoxizitätsassay: Dosis-Wirkungskurven von Imatinib auf K562-pGFP-C2 (A), K562-Ebp1-p48 (B) und K562-Ebp1-p42 (C).

**Unten:** Die „Median-Effekt-Gleichung“ ermöglicht die Kalkulation der IC<sub>50</sub> über den Schnittpunkt der Regressionsgerade mit der x-Achse. (D = Dosis; Fa = fraction affected; Fu = fraction uneffected)

Die so ermittelte mittlere IC<sub>50</sub> (± S.D.) betrug für Kontrolle K562-pGFP-C2 0,12 µM Imatinib, während die Isotyp-transfizierten Zellen bei K562-Ebp1-p42 mit 0,15 µM, und bei K562-Ebp1-p48 mit 0,18 µM auf die 48-stündige Inkubation mit Imatinib reagierten.

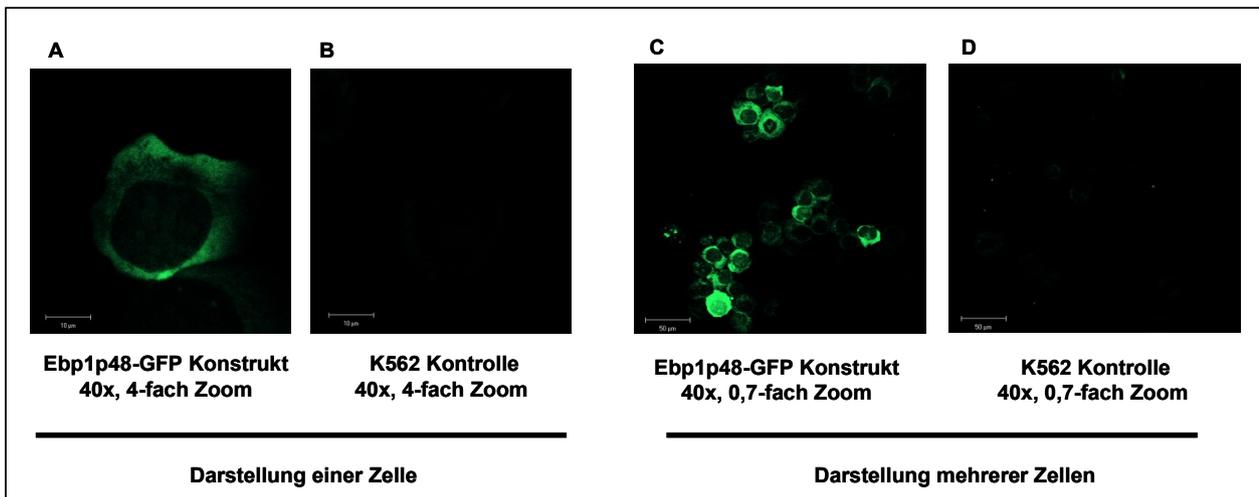
Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich folgern, dass hinsichtlich der Lebensfähigkeit der unterschiedlichen Konstrukte unter Tyrosinkinaseinhibition keine deutlichen Unterschiede vorliegen.

Die mit den Ebp1-Konstrukten transfizierten K562-Zellen verhalten sich bezüglich ihres Ansprechens auf Imatinib wie die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen. Der mittlere IC<sub>50</sub>-Wert ist bei allen drei Ansätzen nahezu identisch.

#### 4.6.3.1 Einfluss einer BCR-ABL-Inhibition auf die zelluläre Lokalisation der Ebp1-Isoformen

Die mit den Ebp1-Konstrukten und dem pGFP-C2-Vektor transfizierten Zellen wurden zusammen mit nicht-transfizierten K562-Zellen für weitere Versuche genutzt.

Zunächst wurden Cytospins mit je  $1 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz durchgeführt. Im ersten Durchgang wurden nur nicht-transfizierte K562-Zellen und mit dem Ebp1-p48 Konstrukt transfizierte K562-Zellen eingesetzt, um die Durchführbarkeit und Aussagekraft der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zu überprüfen (vgl. Abb. 37). Die luftgetrockneten Objektträger wurden von Dr. med. Tobias Meyer (Universität Hamburg Eppendorf, Abteilung für Nephrologie) unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und abfotografiert (vgl. Abb. 37-39).

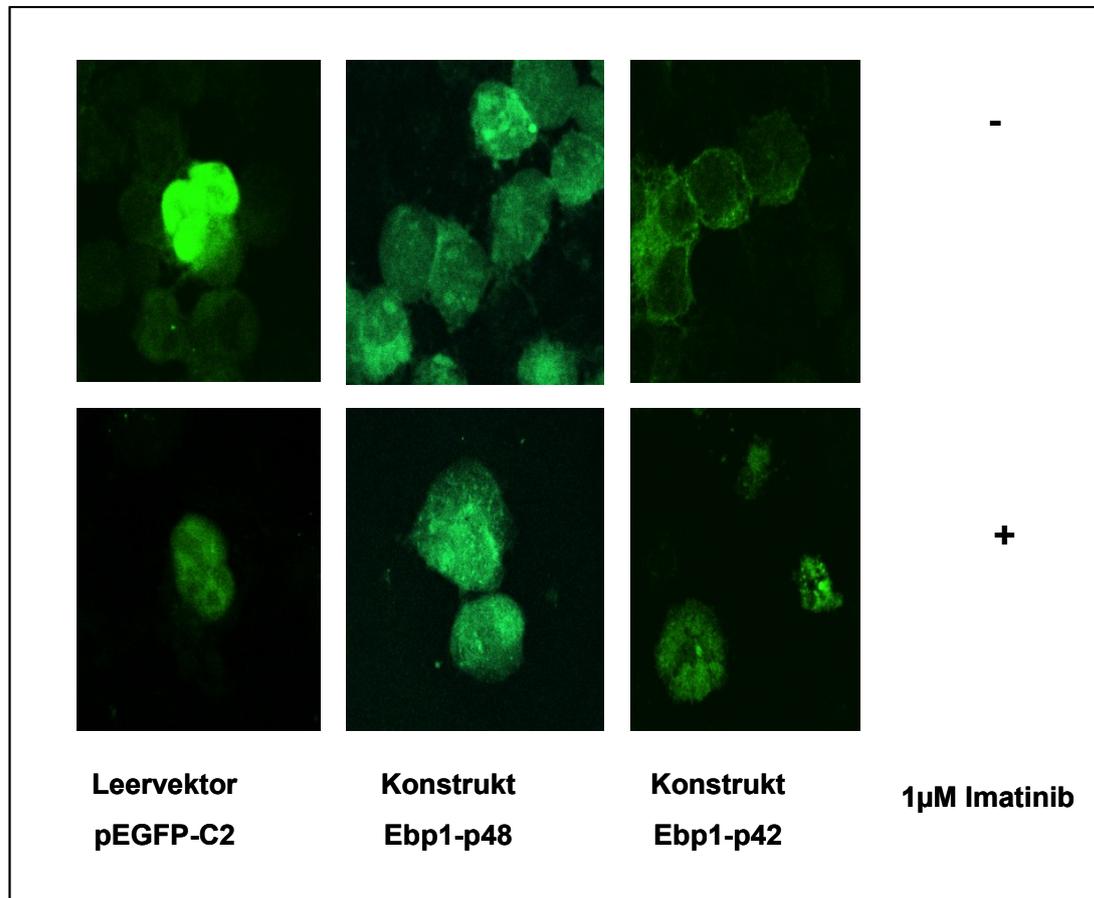


**Abbildung 37:** *Ebp1-p48 kommt sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma vor. Stabile Transfektion von K562-Zellen mit dem Konstrukt Ebp1-p48. Fluoreszenzmikroskopische Gegenüberstellung von nicht-transfizierten K562-Zellen und mit dem Ebp1-Konstrukt Ebp1-p48 transfizierten K562-Zellen. Darstellung von jeweils einer Zelle (linke Seite A und B) und mehrerer Zellen (rechte Seite C und D).*

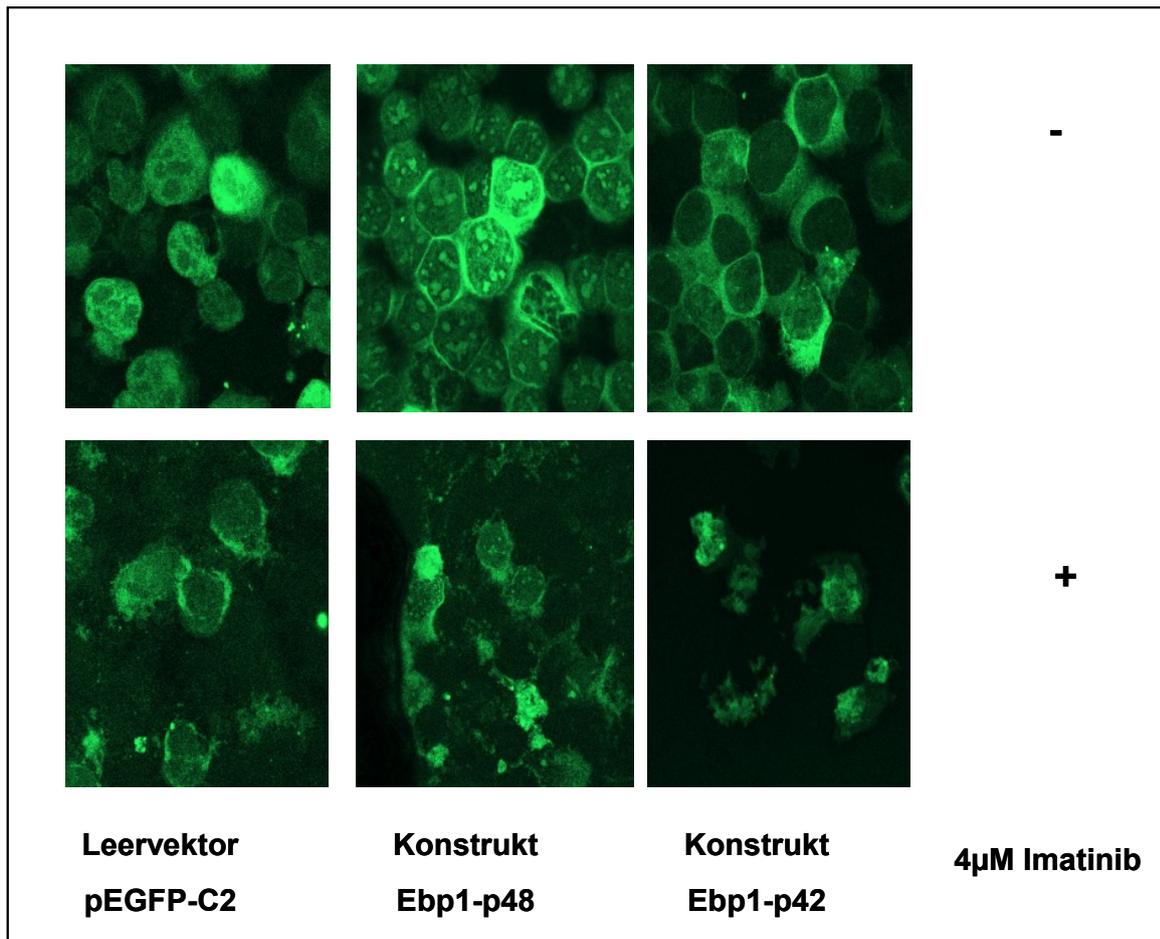
Es zeigte sich deutlich, dass die nicht transfizierten K562-Zellen nur ein geringes Maß an Autofluoreszenz besitzen. Im Gegensatz dazu fluoreszieren die mit Ebp1-p48 transfizierten K562-Zellen in einem klar erkennbaren Grünton unter dem Fluoreszenzmikroskop. Des Weiteren lässt sich erkennen, dass die Isoform Ebp1-p48 sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleolus lokalisiert ist.

Im nächsten Schritt wurden alle mit den unterschiedlichen Ebp1-Konstrukten (Ebp1-p42 und Ebp1-p48) und mit dem Leervektor pGFP-C2 transfizierten K562-Zellen über 24 Stunden mit

dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib beziehungsweise mit einem Wasser-DMSO-Gemisch behandelt. Die gewählten Imatinib-Konzentrationen lagen dabei bei 1  $\mu$ M und 4  $\mu$ M (vgl. Abb. 38 und 39).



**Abbildung 38:** *Ebp1-p48* kommt sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma unabhängig von einer Behandlung mit Imatinib vor. *Ebp1-p42* shuttelt unter Tyrosinkinase-Inhibition in den Zellkern. Stabile Transfektion von K562-Zellen mit *Ebp1*-Isoformen (*Ebp1-p42* und *Ebp1-p48* sowie mit einem Leervektor pEGFP-C2): Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit *Ebp1-p42*, *Ebp1-p48* und pEGFP-C2 transfizierten K562-Zellen, +/- 1  $\mu$ M Imatinib für 24 Stunden.



**Abbildung 39: Ebp1-p48 kommt sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma unabhängig von einer Behandlung mit Imatinib vor. Ebp1-p42 shuttelt unter Tyrosinkinase-Inhibition in den Zellkern. Stabile Transfektion von K562-Zellen mit Ebp1-Isoformen (Ebp1-p42 und Ebp1-p48 sowie mit dem Leervektor pEGFP-C2) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der mit Ebp1-p42, Ebp1-p42 und pGFP-C2 transfizierten K562-Zellen, +/- 4 µM Imatinib für 24 Stunden.**

In den Abbildungen 38 und 39 sind die jeweiligen Zellpopulationen deutlich erkennbar. Gleiches gilt für die Verteilung der GFP-markierten Ebp1-Konstrukte sowie die Lokalisation des Vektors durch eine stärkere Grünfärbung der Zellen.

Die mit dem Leervektor pGFP-C2 transfizierten Zellen werden durch eine markante Fluoreszenzanreicherung im Zytoplasma auffällig. Die Lokalisation des Leervektors ist dementsprechend im Zytoplasma. Bei den zwei Ebp1-Isoformen lassen sich unterschiedliche Beobachtungen machen.

Die Ebp1-p42-Isoform ist bei den mit diesem Konstrukt transfizierten unbehandelten K562-Zellen ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion ansässig. Die Isoform Ebp1-p48 tritt in den K562-transfizierten Zellen sowohl im Zellkern, als auch in der zytoplasmatischen

Fraktion auf. Bei der Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib scheint es bei Ebp1-p42 zu einer Translokation in den Zellkern zu kommen. Bei den mit Ebp1-p48 transfizierten Zellen ist keine Translokation unter Imatinib-Behandlung erkennbar. Die Zelle im Allgemeinen reagiert auf die Behandlung mit dem Medikament mit beginnender (vgl. Abb. 38) oder stattgefunderer (vgl. Abb. 39) Apoptose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nur bei den mit Ebp1-p42 transfizierten K562-Zellen zu einer Abweichung innerhalb der zellulären Lokalisation der transfizierten Konstrukte unter Imatinib-Behandlung kommt. Zu beobachten ist ein *Shuttling* des Ebp1-p42-Konstruktes in den Zellkern. Die Behandlung mit Imatinib hat jedoch keinen Einfluss auf den zellulären Aufenthalt von mit Ebp1-p48 oder mit dem Leervektor transfizierten K562-Zellen, da es in keiner der transfizierten K562-Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibition zu einer Translokation in ein anderes Zellkompartiment der Ebp1-Konstrukte kommt.

Welche Bedeutung diese Translokation der Isoform Ebp1-p42 in den Zellkern unter Tyrosinkinaseinhibition hat, bedarf weiterer Klärung.

### 5. Diskussion

Die Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib ist ein herausragendes Beispiel für den Erfolg von zielgerichteten Therapieansätzen (sog. "*molecular targeted therapy*") bei der Behandlung verschiedener Tumorentitäten und Leukämieformen. Imatinib verlängert die Dauer der Chronischen Phase der CML signifikant<sup>23, 44</sup> und kann die Progression der Erkrankung in die Blastenkrise deutlich hinauszögern. Jedoch wurde in Subgruppen von CML-Patienten das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib beobachtet<sup>152</sup>. Dies zeigt, dass die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren nicht kurativ ist, sondern zu einer minimalen Resterkrankung führt.

Neben der Entwicklung von Zweit- und Drittgenerations-Tyrosinkinaseinhibitoren bestehen neue Therapieansätze in der Kombination von Tyrosinkinase-Inhibition und Angriffspunkten, die auf weiteren Signalwegen innerhalb der Krebszelle liegen<sup>57</sup>.

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet eine globale Proteomanalyse von Balabanov et al., die an der BCR-ABL-positiven K562-Zelllinie durchgeführt wurde<sup>9</sup>. In diesem Screeningverfahren konnte das Protein ErbB3 bindende Protein 1 (Ebp1) detektiert werden, welches unter dem Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib differentiell exprimiert wird und somit ein neues potentiell therapeutisches Ziel bei Ph<sup>+</sup>- Leukämien darstellen könnte<sup>9</sup>.

Daher wird in dieser Arbeit die Bedeutung des Proteins Ebp1 sowie die der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (ErbB1-4) unter Einfluss von Imatinib in Hinblick auf mögliche Ziele neuer Behandlungsstrategien untersucht.

#### 5.1 Ebp1 existiert in CML-Zelllinien und wird differentiell exprimiert

Aufgrund der differentiellen Expression unter Behandlung mit einem Tyrosinkinaseinhibitor schien das ErbB3 bindende Protein (Ebp1) ein interessanter Kandidat für weitere detailliertere Forschungsansätze zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden wie Northern Blot, Durchflusszytometrie, sowie RNA- und Proteomanalysen die Expression von Ebp1 in allen untersuchten humanen und murinen leukämischen Zelllinien nachgewiesen werden. Auch gelang ein Nachweis von Ebp1-mRNA in Patientenmaterial.

Häufig zeigte sich dabei eine differentielle Expression des Proteins oder seiner mRNA unter Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib. Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen und früheren Daten können wir man schlussfolgern, dass Ebp1 unter dem Einfluss von Imatinib ubiquitär<sup>100, 184</sup> und oftmals differentiell exprimiert wird. Zudem implizieren unsere Untersuchungsergebnisse im Hinblick auf eine durchgeführte transiente Transfektion von

K562 und HL60 mit einer BCR-ABL-Wiltyppvariante und einer kinasedefekten Variante (nicht gezeigt), dass die Expression von Ebp1 abhängig vom Phosphorylierungsstatus ist.

Besonders die K562-Zellen weisen, wie in der vorausgehenden globalen Proteomanalyse von Balabanov et al. bereits gezeigt<sup>9</sup>, einen deutlichen Rückgang des Proteins oder seiner mRNA unter Tyrosinkinase-Inhibition auf. Wir konnten diese Ergebnisse mit Hilfe von vier unterschiedlichen Methoden (Northern Blot, FACS-Analyse, RT-PCR und Mini 2D-Gelen) in Bezug auf die K562-Zellen nachweisen. Mittels Western Blot-Methode gelang eine Ergebnisreproduktion jedoch nicht. Auch weitere humane leukämische Zelllinien in der Blastenkrise, wie LAMA-84, MEG-01, KCL-22 und JURL-MK1 sowie die BCR-ABL-positive murine Zelllinie Ba/F3-p210 zeigen eine differentielle mRNA-Expression von Ebp1 unter Imatinib-Behandlung. Jedoch stellt sich dieser Effekt nicht in allen durchgeführten Versuchsansätzen ein. In Zelllinien, die BCR-ABL-negativ sind, wie beispielsweise murine Ba/F3 Zellen sowie die Imatinib-resistenten murinen Zelllinien Ba/F3-T315I, Ba/F3-M351T und Ba/F3-E255K, ließ sich dieser Effekt zumindest in den durchgeführten Northern Blot Analysen nicht nachweisen.

Die durch die Behandlung von Imatinib abgeschwächte Ebp1-RNA-Expression, welche sich auf Northern Blot Ebene ausschließlich in BCR-ABL-positiven Zelllinien nachweisen lässt, legt die Vermutung nahe, dass Ebp1 in die von BCR-ABL-vermittelte maligne Transformation von hämatopoetischen Zellen involviert ist. In den BCR-ABL-negativen Zelllinien HL-60 und Ba/F3 oder den Imatinib-resistenten murinen Zelllinien Ba/F3-T315I, Ba/F3-M351T und Ba/F3-E255K ließ sich dieser Effekt hingegen nicht nachweisen, was diese Hypothese stützt. Mögliche Ursachen für die variierenden Ergebnisse bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen können in den Methoden selbst begründet sein. Die Northern Blot Analyse stellt durch die Detektion mit sehr spezifischen Sonden eine hochempfindliche Methode dar, um mögliche, auch sehr geringe, Expressionsunterschiede aufzudecken. Selbiges gilt für die RT-PCR, welche durch den Einsatz von spezifischen Primern eine sehr aussagekräftige Analysemöglichkeit darstellt.

Mittels Western Blot hingegen konnte nur der Nachweis von Ebp1 in allen untersuchten Zelllinien erbracht werden. Expressionsunterschiede unter Imatinib-Behandlung ließen sich dabei nicht darstellen. Für diese Tatsache gibt es mehrere Erklärungen. Neben der Hypothese, dass keine relevanten Unterschiede im Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen existieren, können Schwankungen in der Proteinauftragsmenge beim Beladen der Gele sowie geringe Varianzen in den Protein-Konzentrationsbestimmungen für die nicht nachweisbaren Unterschiede in den Zellen verantwortlich sein. Auch der verwendete Ebp1-Antikörper bildet einen kritischen Faktor. Da der Ebp1-Antikörper schon bei extrem hohen Verdünnungen und sehr geringen Belichtungszeiten eine spezifische

Bande auf dem Röntgenfilm liefert, lässt sich nicht ausschließen, dass leichte Expressionsunterschiede im Ebp1-Expressionsmuster existieren, welche jedoch aufgrund der hohen Ebp1-Antikörper-Spezifität nicht sichtbar zu machen sind.

Die Mini 2D-Gelanalyse konnte die Ergebnisse der globalen Proteomanalyse von Balabanov et al. für die differentielle Expression von Ebp1 in K562-Zellen unter Tyrosinkinase-Inhibition zwar bestätigen<sup>9</sup>, zeigte jedoch in den anderen verwendeten Zelllinien keine aussagekräftigen Tendenzen auf. Ursächlich hierfür könnten wiederum Fehler im Bereich der Proteinkonzentrationsmessung oder bei der Beladung der Gelstreifen mit den jeweiligen Proben sein. Auch könnten individuelle Unterschiede in den verwendeten Zelllinien dafür verantwortlich sein, was einen generellen Effekt auf die CML dann eher unwahrscheinlich macht.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen, dass Ebp1 ubiquitär<sup>93, 100, 179, 184, 195</sup> exprimiert wird und damit, wie schon für verschiedene Lymphomarten<sup>99, 108, 161, 167</sup> oder die leukämische HL-60-Zelllinie<sup>100</sup> vorbeschrieben, auch in anderen hämatologischen Erkrankungen, wie in unserem Fall der CML, vorkommt. Ein Vorkommen in Blutproben von gesunden Spendern konnte durch diese Arbeit ebenfalls bewiesen werden.

Die genaue Rolle von Ebp1 in der Pathogenese oder im Krankheitsverlauf der CML ist zwar weiterhin unbekannt, allerdings sind zwei Funktionen denkbar. Es zeigte sich einerseits, dass Ebp1 während der Apoptose als Substrat der Caspase 3 fungieren kann und auf diese Weise die apoptotische DNA-Fragmentierung verhindert<sup>2, 101</sup>. Diese Eigenschaft zeichnet das Protein Ebp1 eher als protoonkogenes Protein aus. Darüber hinaus bezeugen Berichte, dass eine Interaktion von Ebp1 mit dem Protein Nucleophosmin (NPM, B23) essentiell für die Unterdrückung von Apoptose und für die Regulation der Zellproliferation zu sein scheint<sup>123</sup>. NPM werden zudem Eigenschaften sowohl als Proto-Onkogen, als auch als Tumorsuppressor zugeschrieben, da auch hier hohe Expressionslevel mit unkontrolliertem Zellwachstum und maligner Transformation in Verbindung gebracht werden<sup>48, 62, 123</sup>.

In HL-60-Zellen konnte Ebp1 als eine Komponente des bcl-2-mRNP-Komplexes identifiziert werden, wo es für die Stabilisierung der bcl-2 mRNA verantwortlich ist<sup>18, 83</sup>. Bei bcl-2 handelt es sich um eines der ersten detektierten Proto-Onkogene, welches durch Inhibition von Apoptose das Zellüberleben verlängert. Bei unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen<sup>52, 138</sup>, wie beispielsweise der Chronisch Lymphatischen Leukämie<sup>126</sup>, zeigen sich erhöhte Expressionslevel von Ebp1. Zudem wird es mit dem Auftreten von Resistenzen bei der chemotherapeutischen Behandlung in Verbindung gebracht<sup>115, 126, 165</sup>.

Zum anderen haben weitere Studien gezeigt, dass Ebp1 ebenfalls Eigenschaften als potenter Tumorsuppressor besitzt<sup>122, 198</sup>. Gerade am Beispiel von Brust- oder Prostatakarzinom-Zelllinien<sup>51, 68, 104</sup> wird deutlich, dass eine Überexpression von Ebp1 mit Wachstumshemmungen durch Zellzyklusarrest in der G2/M- oder der G0/G1-Phase sowie

mit einem geringeren metastatischen Potential einhergeht<sup>97, 198</sup>. Dabei interagiert Ebp1 beispielsweise mit dem Androgenrezeptor (AR), welcher innerhalb von Prostatakrebszelllinien eine deutlich erhöhte Expression aufweist. Ebp1 hemmt dessen Aktivität durch Reduktion der mRNA und damit verbunden auch der Proteinlevel<sup>49, 72, 82, 166, 187, 190, 196</sup>. Durch Interaktionen mit Rb konnte Ebp1 eine Rolle in der Steuerung antiproliferativer Effekte durch Unterdrückung bestimmter Transkriptionsvorgänge zugewiesen werden<sup>178, 188</sup>. Beispielsweise hat die Kooperation von Ebp1 mit Sin3A und HDAC2<sup>51, 190</sup> zusammen mit Rb sehr starken Einfluss auf die Unterdrückung der vom Transkriptionsfaktor E2F1 vermittelten Transkription<sup>188</sup>. E2F ist zuständig für die Kontrolle des Zellzyklus sowie für die Biosynthese von DNA. Auf diese Weise wird das Zellwachstum gehemmt, und die mögliche Tumorgenese kann unterdrückt werden<sup>189</sup>. Auch wird die Transkription neben der von E2F1 von weiteren zellzyklusregulierenden Genen, wie beispielsweise Cyclin D, Cyclin E oder c-myc, von Ebp1 inhibiert<sup>192</sup>. Somit hat Ebp1 eine wichtige Kontrollfunktion über den Zellzyklus inne und kann als Tumorsuppressor agieren.

Ebp1 scheint also somit protoonkogene und auch tumorsuppressive Eigenschaften zu besitzen. Möglicherweise lässt sich diese Tatsache durch die Existenz der zwei Ebp1-Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48, welchen ebenfalls gegensätzliche Funktionen zugeschrieben werden, erklären<sup>35, 91</sup>. Daraus ergeben sich neue Möglichkeiten in der Therapie der Imatinib-resistenten und Zweitgenerations-Tyrosinkinase-Inhibitor-resistenten CML.

In wieweit Ebp1 dabei eine wichtige Rolle in der Entstehung, der Progression und der Therapie der CML spielt, bedarf weiterer Klärung.

## 5.2 ErbB-Rezeptoren in hämatopoetischen Zellen

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf einer möglichen Detektion der unterschiedlichen vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie in hämatopoetischen Zellen vor dem Hintergrund, dass es sich bei Ebp1 um ein ErbB3 bindendes Protein handelt<sup>179</sup>. Die ErbB-Rezeptoren sind an bestimmten physiologischen Prozessen, wie Zellteilung, Differenzierung und Proliferation, beteiligt<sup>12, 92, 139</sup>. Des Weiteren spielen sie jedoch auch nachgewiesener Weise eine entscheidende Rolle als potentielle Proto-Onkogene bei der Pathogenese und Progression verschiedener humaner Krebsentitäten<sup>6, 10, 12, 25, 153, 156</sup>. Meist korreliert eine Überexpression der jeweiligen Rezeptoren mit einer schlechteren Prognose sowie einem schlechteren Ansprechen auf mögliche therapeutische Maßnahmen<sup>50, 92, 107, 127, 128, 163</sup>. Aus diesem Grund war ein Nachweis eben dieser Rezeptoren in leukämischen Zellen

für uns von großem Interesse. Auch hat der Einfluss von Imatinib auf die Rezeptoren einen Teil unserer Studien dargestellt.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit eine Expression der verschiedenen ErbB-Rezeptoren in unterschiedlichen humanen und murinen Zelllinien sowie in Primärmaterial mittels RNA-Analyse nachweisen.

Alle von uns untersuchten leukämischen Zelllinien, mit Ausnahme der Zelllinien HL-60 und BV173, zeigten eine mRNA-Expression des ErbB3-Rezeptors. Im humanen Patientenmaterial ließ sich jedoch nur bei einem Teil der Proben ein positiver ErbB3-Nachweis erbringen. Somit existiert in den meisten Zelllinien der potentielle Bindungspartner von Ebp1. Dies ist von besonderer Bedeutung, da es sich bei den ErbB-Rezeptoren um epidermale Rezeptoren handelt. Ein Auftreten des ErbB3-Rezeptors in CML-Zellen scheint bisher noch nicht in der Fachliteratur beschrieben worden zu sein<sup>179</sup>. Einige Arbeiten thematisieren jedoch eine Expression von Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie in lymphoiden Zellen von CML-Patienten oder ein Auftreten dieser Rezeptoren beim Krankheitsbild der lymphoblastischen Leukämie<sup>24, 78, 113, 158</sup>.

Im Vergleich zu den zuvor gewählten leukämischen Zelllinien ist eine Detektion von mRNA des ErbB3-Rezeptors in Primärmaterial eher selten. Im Gegensatz dazu weisen die Patientenproben jedoch häufig eine detektierbare mRNA-Expression des ErbB2-Rezeptors auf. Diese Expression findet allerdings auch in gesunden Spendern statt. In wenigen leukämischen Zelllinien aus der Blastenkrise der CML konnte zudem ein positiver Nachweis von mRNA des ErbB1- und des ErbB4-Rezeptors erbracht werden. In den MEG-01 und KYO-1 Zellen konnte ErbB1-mRNA detektiert werden. Dies deckt sich mit der Aussage früherer Arbeiten, in denen keine Detektion von EGFR in K562-Zellen nachgewiesen werden konnte<sup>5, 24, 78</sup>. In EM2- und KCL-22-Zellen fand sich ErbB4-mRNA. Im Blut der untersuchten Patienten ergab sich kein Nachweis dieser beiden Rezeptoren.

Die Rezeptoren ErbB1 und ErbB4 scheinen in den untersuchten Zellen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da sie nur in wenigen hämatopoetischen Zelllinien, jedoch nicht in Primärmaterial detektiert werden konnten. Bei ErbB1 handelt es sich um ein Schlüsselmolekül in Bezug auf zelluläres Wachstum. Es ist offenbar von essentieller Bedeutung in der Inhibierung von Apoptose, in der Proliferation von Zellen, der Angiogenese sowie der Tumorgenese<sup>158</sup>. Ein überexprimierter oder mutierter ErbB1-Rezeptor ist in Tumorentitäten wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom sowie in Glioblastomen, Brust-, Pankreas- und Kopf-Halstumoren bekannt<sup>14, 15, 47, 106, 107, 127, 128, 137, 153, 171</sup> und korreliert mit einer verringerten Überlebensrate<sup>16, 32, 33</sup>. Eine Arbeitsgruppe beschreibt zudem das Auftreten des ErbB1-Rezeptors in der B-ALL<sup>158</sup>. Ein Beweis von EGFR in K562- oder HL-60-Zellen konnte auch in vorausgehenden Arbeiten nicht erbracht werden<sup>5, 78, 162</sup>.

Ein Vorkommen von ErbB4 ist für Brustkrebszelllinien<sup>137</sup> sowie Gewebe des Herzens, der Milchdrüse, der Niere und des zentralen Nervensystems vorbeschrieben<sup>32</sup>.

Die mRNA des ErbB3 Rezeptors als potentiell Interaktionspartner von Ebp1 hingegen wurde in unseren Versuchen von allen Zelllinien mit Ausnahme von HL-60 und BV173 exprimiert. Ebenso konnte mRNA von ErbB3 sowohl in CD34<sup>+</sup>-Zellmaterial von Patienten, als auch von einem gesunden Spender nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass ErbB3 sowohl in normalem als auch in neoplastischem Gewebe zu finden ist<sup>100, 110, 143, 184</sup>. So ist bereits ein Vorkommen des ErbB3 Rezeptors in Gewebe von Hirn, Leber, Pankreas, Brustdrüse, Rückenmark, Prostata, Niere, Ovarien und Lunge von verschiedenen Autoren beschrieben worden<sup>12, 65, 68, 164, 169</sup>. Zudem wird dem Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der Proliferation und Differenzierung von Brustkrebszellen nachgesagt<sup>12, 137, 163, 164, 193</sup>. In verschiedenen Publikationen ist eine Überexpression des Rezeptors bei Tumoren von Brust, Ovarien, Pankreas, Lunge, Prostata, Hirn und Gastrointestinaltrakt mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf Gesamtüberleben, Metastasierung, Tumorgröße, Lokalisation und Rezidivhäufigkeit sowie Auftreten von Therapieresistenz assoziiert<sup>47, 68, 164, 184</sup>. Auch spielt die Heterodimerisierung mit dem ErbB2-Rezeptor unter Heregulin-Behandlung eine entscheidende Rolle beim Auftreten von Resistenzen und der verkürzten Überlebenszeit in der Untersuchung von Brustkrebszelllinien<sup>68, 164</sup>. Das Heterodimer ErbB2/ErbB3 scheint als Onkogen zur Zelltransformation und Tumorgenese beizutragen<sup>164, 193</sup>.

In dieser Arbeit wurde ErbB2-mRNA, mit Ausnahme der murinen Zelllinien sowie HL-60 und BV173, von allen restlichen untersuchten Zelllinien exprimiert. Dies deckt sich nicht mit vorangegangenen Studien, welche eine Detektion des ErbB2-Transkripts, jedoch nicht des ErbB2-Proteins in HL60-Zellen beschreiben<sup>162</sup>. Zudem gelang der Nachweis von mRNA dieses Rezeptors in dem von uns untersuchten Patientenmaterial - hier sogar stärker exprimiert als die ErbB3-Rezeptor-mRNA. Der ErbB2- (auch Her2neu-) Rezeptor spielt besonders bei der Entwicklung von Mammakarzinomen eine wichtige Rolle<sup>12, 14, 79, 137, 169</sup>. Ein Auftreten von ErbB2-Transkripten wurde bereits für einige leukämische Zelllinien vorbeschrieben, jedoch nicht für die K562-Zellen<sup>5, 78, 162</sup>. Erhöhte Rezeptorspiegel sind mit einer gesteigerten Transformationsaktivität sowie mit einem erhöhten metastatischen Potential, und damit mit einer schlechteren Prognose verbunden<sup>1, 104, 114</sup>. Diese Tatsache lässt sich ebenfalls bei Neoplasien des Pankreas, der Ovarien, des Magens und des Nasopharynx sowie in Bezug auf Bronchialkarzinome nachweisen<sup>12, 14, 47, 50, 171</sup>.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit ein Auftreten von mRNA aller vier Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie in unterschiedlicher Expressionshäufigkeit in leukämischen Zellen aufzeigen.

Das von uns demonstrierte Auftreten aller Rezeptoren der ErbB-Familie in leukämischen Zellen deckt sich nur bedingt mit den Aussagen früherer Publikationen<sup>90, 96</sup>. Die Arbeitsgruppe Kraus et al. konnte im Jahre 1989 keinen Nachweis eben dieser Rezeptoren in sieben verschiedenen Tumorlinien hämatopoetischen Ursprungs erbringen<sup>90</sup>. Die Verfasser berichten jedoch von einer Expression der Rezeptoren ErbB1 und ErbB2 in Fibroblasten. Brühning et al. erbrachten 1995 den bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht dokumentierten Nachweis der Expression von Her2-mRNA im peripheren Blut und Knochenmark gesunder Patienten sowie in leukämischen Blasten von Patienten mit akuter lymphoblastärer Leukämie, wie ALL, AML, CLL und CML<sup>24</sup>. Das Zelloberflächenprotein Her2 konnte jedoch nur in einer Untergruppe leukämischer Blasten (B-ALL) detektiert werden<sup>24</sup>. Leone et al. beschrieben ebenfalls 2003 die Expression von ErbB2 in mononukleären Zellen, im Knochenmark, sowie im peripheren Blut und äußerten die Hypothese, dass ErbB2 möglicherweise den Proliferationsmechanismus hämatopoetischer Zellen beeinflusst<sup>96</sup>. Andererseits konnte in CD34<sup>+</sup>-positiven Progenitorzellen im Jahre 1998 kein Nachweis der ErbB1- und ErbB2-Rezeptoren erbracht werden<sup>159</sup>. Eine Detektion von ErbB3 gelang bisher nur in einer Myelomzelllinie, welche weitere Rezeptoren dieser Familie jedoch nicht exprimierte<sup>175</sup>.

Eine mRNA-Expression weiterer Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie in K562-Zellen konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden<sup>78, 130, 151</sup>. In dieser Arbeit konnten wir jedoch sowohl ein Vorkommen von ErbB2-mRNA, als auch von ErbB3-mRNA in eben diesen Zellen dokumentieren. Ein positiver Nachweis für ErbB2, ErbB3 und ErbB4 wird für die AML-Zelllinie HL-60 von Trinks et al. beschrieben<sup>168</sup>. Diese Aussage deckt sich nicht mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen. Wir konnten bei der Zelllinie HL-60 keinen Beweis für ein Vorkommen der ErbB-Rezeptoren erbringen.

Hinsichtlich des Einflusses des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib auf die Expression der jeweiligen ErbB Rezeptoren ließ sich keine einheitliche Aussage treffen. Da Imatinib keinen direkten Effekt auf die Expression der unterschiedlichen Rezeptoren auszuüben scheint, ist es am wahrscheinlichsten, dass die Zellen als Ganzes von der Behandlung betroffen sind und mehr oder weniger stark mit einer Abnahme ihrer Expression auf Tyrosinkinase-Inhibition reagieren.

Die hier gewonnenen Ergebnisse stellen somit ein Novum im Nachweis von mRNA, insbesondere des ErbB3-Rezeptors, in Zellen der CML dar, denn zuvor konnte keine Expression eben dieses Rezeptors in K562-Zellen beschrieben werden<sup>78</sup>. Der Nachweis von mRNA der unterschiedlichen Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie könnte demnach neue Erkenntnisse für die Pathogenese und die Therapie der CML bringen. Möglicherweise spielen diese Rezeptoren ebenfalls eine Rolle, welche essentiell für die Signalgebung innerhalb dieser hämatopoetischen Zellen ist. Denkbar ist auch, dass eine Überexpression

mit einer schlechteren Prognose oder einer verkürzten Überlebenszeit, beispielsweise bei Mamma- oder Prostatakarzinomen, assoziiert ist <sup>1, 104, 114</sup>.

Damit ergeben sich mögliche neue Ansätze in der Therapie der CML, da bereits potente Inhibitoren für einige der ErbB-Rezeptoren therapeutisch verfügbar sind. Ob und inwieweit jedoch eine Beteiligung dieser vier Rezeptoren an der Entstehung und Progression der CML besteht, bedarf weiterer Forschungsarbeit.

### **5.3 Verhalten der Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 in K562-Zellen**

Liu et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass das Protein Ebp1 aus der Pa2g4-Genfamilie für zwei verschiedene Isoformen von Ebp1 kodiert, welche in unterschiedlicher Art und Weise die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen regulieren <sup>91, 100</sup>. Die längere und dominantere Ebp1-p48 Form, welche sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert ist, unterdrückt Apoptose und stimuliert Proliferationsvorgänge und damit das Überleben der Zellen <sup>91</sup>. Hauptaufgabe der kürzeren Ebp1-p42-Isoform ist neben der Differenzierung von Zellen ein Unterdrücken der Proliferation <sup>91</sup>. Auch bei der Bindung an den ErbB3-Rezeptor weisen beide Formen deutliche Unterschiede auf. Während die Isoform Ebp1-p42 an die intrazelluläre Domäne von ErbB3 bindet, gibt es keine Assoziation von Ebp1-p48 mit diesem Rezeptor <sup>100</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse der beiden Isoformen auf die Leukämiezelllinie K562 untersucht. Zunächst wurden dafür K562 Zellen mit den jeweiligen Isoformen von Ebp1 (p42 und p48) nebst Kontrolle (Leervektor pGFP-C2) stabil transfiziert und anschließend im Hinblick auf Proliferation, Zytotoxizität, Lokalisation und Expressionsstärke untersucht. Die Zellen wurden zudem mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib behandelt und dessen Einflüsse auf die jeweiligen Isoformen analysiert.

Im durchgeführten Proliferationsassay ergab sich unter steigenden Imatinib-Konzentrationen ein deutlicher Rückgang der Zellzahlen bei allen Konstrukten (Ebp1-p48, Ebp1-p42 und Kontrolle Ebp1-pGFP-C2). Wir konnten jedoch auch zeigen, dass die Zellzahlen der mit Ebp1-p42 transfizierten Zellen sowie der Kontrollzellen (Ebp1-pGFP-C2) signifikant geringer waren als die der mit Ebp1-p48 transfizierten K562-Zellen. Wir schlussfolgerten aus dieser Beobachtung, dass die Isoform Ebp1-p48 in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zum Leervektor oder den Ebp1-p42-transfizierten K562-Zellen nicht so stark auf die Tyrosinkinase-Inhibition durch Imatinib reagiert. Aus diesem Grund führten wir zusätzlich einen MTT-Zytotoxizitätsassay durch, mit dessen Hilfe die Tyrosinkinase-Hemmung auf die unterschiedlichen Zellen analysiert werden sollte. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten

Unterschiede hinsichtlich des Ansprechens auf das Medikament. Die mittlere IC50 war in allen transfizierten Zellen nahezu identisch.

Natürlich ist es möglich, dass diese inkongruenten Ergebnisse auf die zugrundeliegenden Methoden und damit auf Ungenauigkeiten bei den unterschiedlichen Messungen zurückzuführen sind. Gerade Zählversuche unterliegen erfahrungsgemäß großen individuellen Schwankungen. Um eine höchstmögliche Genauigkeit zu erzielen, wurden jedoch alle von uns durchgeführten Zählversuche in Triplet-Bestimmungen und zu drei voneinander unabhängigen Zeitpunkten durchgeführt. Gleiches galt für den MTT-Zytotoxizitätstest. Auch erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Zellzahl nicht mittels Neubauer-Zählkammer, welche bei großen Zellzahlen hohen Zählgenauigkeiten unterliegt, sondern mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Vi-Cell XR 2.03). So konnten die Zählgenauigkeiten noch weiter minimiert werden.

Zudem könnten zusätzliche genetische Veränderungen in den untersuchten K562-Zellen entstanden sein, da diese über einen langen Zeitraum mittels zellkulturtechnischer Methoden kultiviert werden mussten, bis eine ausreichende Menge an stabil mit den Ebp1-Isoformen transfizierten K562-Zellen vorhanden war, welche für die beobachteten Veränderungen verantwortlich sind.

Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib gar keinen direkten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der verschiedenen Isoformen hat, sondern das Zellwachstum der leukämischen Zelllinie K562 hemmt, indem er sich, wie vorbeschrieben, gegen das hier vorkommende Fusionsprotein BCR-ABL, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, richtet und somit aufgrund der damit verbundenen fehlenden Tyrosinphosphorylierung die Signaltransduktion innerhalb der Zelle unterbindet. Dies erklärt die Abnahme der Zellzahlen in allen drei Ansätzen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Isoform Ebp1-p48 wichtige Funktionen in der Unterdrückung der Apoptose, der Stimulation von Proliferation und bei der Vermittlung des Zellüberlebens übernimmt<sup>100</sup>, ist es viel wahrscheinlicher, dass eben diese Funktionen bei der Transfektion der K562-Zellen mit Ebp1-p48 in Bezug auf das Wachstumsverhalten zum Tragen kamen. Möglicherweise kommt es durch Überexpression der Ebp1-p48-Variante zu einem Selektionsvorteil der p48-transfizierten K562-Zellen, welcher mit einer im Vergleich höheren Zellzahl sowie geringerem Zelluntergang vergesellschaftet ist als bei der Kontrolle und der p42-Ebp1-Variante. Wir konnten daher übereinstimmend mit Lui et al. zeigen, dass Ebp1-p48 eher protoonkogene Eigenschaften aufweist, während die Isoform p42 als möglicher Tumorsuppressor agiert<sup>102</sup>.

In einem zweiten Ansatz konnten mittels Zytopinanalysen und nachfolgend durchgeführter Fluoreszenzmikroskopie ebenfalls Aussagen über die Lokalisation der unterschiedlichen

Ebp-Isoformen innerhalb der transfizierten K562 Zellen getroffen werden. Es zeigte sich, dass die Isoform Ebp1-p48 sowohl bei den unbehandelten, als auch bei den mit Imatinib behandelten Zellen im Zellkern und auch im Zytoplasma detektiert werden konnte. Dahingegen war Ebp1-p42 in den unbehandelten Zellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert <sup>100</sup>. Eine Behandlung mit dem Medikament Imatinib in unterschiedlichen Konzentrationen führte zu keiner Translokation der Isoform Ebp1-p48 in ein anderes Zellkompartiment, sondern verursachte lediglich (beginnende) Apoptose der untersuchten Zelllinie. In den mit Ebp1-p42 stabil transfizierten Zellen kam es unter Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zu einer Translokation von Ebp1-p42 vom Zytoplasma in den Zellkern.

Diese Ergebnisse untermauern die bereits in der Literatur vorbeschriebene Lokalisation der verschiedenen Isoformen von Ebp1 <sup>91, 100</sup> in den bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersuchten unbehandelten K562 Zellen. Eine Behandlung mit HRG führt nach Angaben der Fachliteratur zu einer Dissoziation von Ebp1-p42 und dem ErbB3-Rezeptor <sup>184</sup> mit nachfolgender Dislokation von Ebp1-p42 aus dem Zytoplasma in den Zellkern <sup>184 100</sup>. Die Imatinib-Behandlung scheint ebenfalls für einen Zellkompartimentwechsel von Ebp1-p42 vom Zytoplasma in den Nukleus verantwortlich zu sein. Möglicherweise kommt es auch in diesem Fall zu einer Dissoziation von ErbB3.

Einen interessanten Forschungsansatz für weitere Untersuchungen stellt daher beispielsweise die Behandlung der unterschiedlich transfizierten K562-Zellen mit Heregulin oder mit einem Inhibitor der Proteinkinase C $\delta$  dar.

Die Phosphorylierung von Ebp1-p48 durch die Proteinkinase C $\delta$  schützt die Zelle nachweislich vor apoptotischer Spaltung durch die Caspase 3 und scheint zudem für die fehlende Assoziation mit dem ErbB3-Rezeptor verantwortlich zu sein <sup>2, 100</sup>. Möglicherweise ändert sich durch Hemmung der Proteinkinase C $\delta$  die zelluläre Lokalisation der Isoform unter der zusätzlichen Behandlung mit Imatinib. Auch sollten die Effekte von Heregulin in Zusammenhang mit einer Imatinib-Behandlung untersucht werden. HRG sorgt bekanntermaßen für eine Dissoziation von Ebp1-p42 und dem ErbB3-Rezeptor <sup>184</sup>. Imatinib scheint den gleichen Effekt auf Ebp1-p42 auszuüben. Es wäre daher interessant zu erforschen, ob der Kompartimentswechsel unter dualer Therapie (HRG und Imatinib) verstärkt zu beobachten ist.

Möglicherweise führen diese zwei theoretischen Ansätze zu neuen Erkenntnissen bezüglich des Verhaltens der beiden Isoformen in K562-Zellen.

### 5.4 Zelluläre Lokalisation von Ebp1

Im Hinblick auf die Lokalisation der beiden Ebp1-Isoformen untersuchten wir in dieser Arbeit zudem den möglichen zellulären Aufenthaltsort von Ebp1 auch ohne vorausgegangene Transfektion in K562-Zellen. Mittels verschiedener Methoden der Zellfraktionierung erfolgte die Separation von unterschiedlichen Zellkompartimenten aus den K562-Zellen. Zuvor wurden die Zellen mit Imatinib behandelt. Die Ergebnisauswertung wurde auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots und mit Mini 2D-Gelen durchgeführt.

Es zeigte sich in beiden Ansätzen deutlich, dass Ebp1 nur im Zytoplasma nachweisbar war. Vor dem Hintergrund, dass sich die Isoform Ebp1-p48 sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma aufhält, wohingegen Ebp1-p42 ausschließlich im Zytoplasma anzutreffen ist<sup>100</sup>, lassen unsere Untersuchungsergebnisse die folgenden Schlüsse zu. Einerseits ist es möglich, dass nur die Isoform Ebp1-p42 physiologisch in K562-Zellen vorkommt. Für diese Isoform ist das Zytoplasma als alleiniger Aufenthaltsort in der Fachliteratur beschrieben worden<sup>2, 100</sup>. Zu einer Translokation in den Zellkern kommt es wie bereits erwähnt in der Folge einer Dissoziation vom ErbB3-Rezeptor nach Behandlung der Zellen mit dem ErbB3/ErbB4-Liganden Heregulin<sup>184</sup>.

Möglicherweise ist auch die Expression der Isoform Ebp1-p48 in diesen Zellen nur sehr schwach ausgeprägt. Jedoch ist diese Theorie eher unwahrscheinlich, da diese Isoform als die stärker exprimierte Form vorbeschrieben ist<sup>91, 123</sup>. Zum anderen ist auch der verwendete Ebp1-Antikörper sehr spezifisch, so dass selbst kleinste Proteinmengen meist erkannt werden können.

Zudem kommt es unter Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zu keiner zellulären Translokation des Proteins beispielsweise vom Zytoplasma in den Nukleus, wie es unter Behandlung mit dem in der Fachliteratur beschriebenen Heregulin der Fall wäre<sup>184</sup>. Eine Behandlung mit Heregulin sollte daher in weiteren Forschungsansätzen geprüft werden. Darüber hinaus könnte der Einsatz von spezifischen Antikörpern, welche sich gegen die jeweiligen Isoformen richten, zu weiteren Erkenntnissen führen, insofern sie aufdecken, welche Isoformen von Ebp1 physiologisch in K56-Zellen vorkommen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die von uns detektierte zelluläre Ebp1-Lokalisation liegt in der Methode der Zellfraktionierung selbst begründet. Durch den schwachen Nachweis von Histonbanden in der zytoplasmatischen Fraktion wird deutlich, dass eine vollständige Zellkompartimentseparation nicht ausreichend gelungen ist. Daher besteht die Möglichkeit, dass sich im Zytoplasma ebenfalls noch nukleäre Anteile befanden, welche das Ergebnis im Hinblick auf den zellulären Aufenthaltsort von Ebp1 beeinflussten. Aus diesem Grund lässt sich keine hundertprozentig sichere Aussage über die Lokalisation von Ebp1 in K562-Zellen treffen. In zukünftigen Forschungsansätzen sollte versucht werden, eine striktere Trennung

der beiden Zellkompartimente zu erreichen, um eine höhere Aussagekraft zu erhalten. Zudem sollte zur besseren Vergleichsmöglichkeit die Ebp1-Lokalisation auch in weiteren leukämischen Zelllinien untersucht werden. So kann eine generelle Aussage über den Aufenthaltsort von Ebp1 in diesen Zellen getroffen werden. Welchen pathognomonischen Hintergrund und welche Folgen die zelluläre Lokalisation hat, bleibt unbekannt und bedarf der weiteren Klärung.

### 5.5 Ausblick

Aufgrund der Konfrontation mit immer neuen Resistenzmechanismen in der zielgerichteten Therapie der Chronisch Myeloischen Leukämie ist es von immenser Bedeutung, neue Therapieansätze und Angriffspunkte in weiteren Signalwegen innerhalb der Krebszelle zu verfolgen. Es zeigt sich beispielsweise, dass die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren zwar sehr spezifisch, jedoch nicht immer kurativ ist, sondern lediglich zu einer minimalen Resterkrankung führt. Um ein längerfristiges Überleben der betroffenen Patienten zu gewährleisten, ist es wichtig, neue kurative Therapieoptionen zu schaffen. Zum aktuellen Zeitpunkt werden daher schon Kombinationstherapien von Tyrosinkinaseinhibitoren mit anderen Substanzen, welche sich gegen andere molekulare Ziele innerhalb der malignen Zelle richten, verstärkt evaluiert<sup>9, 57</sup>.

Bereits bei der Untersuchung von Mammakarzinomen hat sich gezeigt, dass Ebp1 in der Lage ist, die Aktivität des ErbB2-Promoters zu hemmen und dadurch das ErbB2-Proteinlevel in den Zellen, welche ErbB2 überexprimieren, senkt und somit einen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität besitzt<sup>104</sup>. Diese Tatsache führt zu einer höheren Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Tamoxifen. Man könnte postulieren, dass die Regulation der ErbB2- und ebenfalls der ErbB3-Aktivität durch Proteine wie Ebp1 eine neue therapeutische Option in der Behandlung dieser Tumorentität darstellt. Auch bei weiteren malignen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Prostatakarzinom oder dem oralen Plattenepithelzellkarzinom, werden Ebp1 antitumoröse Effekte zugeschrieben<sup>68, 198</sup>. Eine Überexpression von Ebp1 scheint jedoch auch einen wirksamen Schutz vor Apoptose darzustellen<sup>100, 122, 198</sup>. Es ist hingegen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, ob Ebp1 protoonkogene oder tumorsuppressive Effekte in den CML-Zellen ausübt.

Der von uns erbrachte Nachweis bestimmter Rezeptoren der ErbB-Familie erweitert das Feld der therapeutischen Möglichkeiten zusätzlich. Aktuell existieren bereits klinisch zugelassene Inhibitoren für unterschiedliche ErbB-Rezeptoren. In der Therapie von NSCLC werden beispielsweise die Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib, welche sich gegen den EGFR richten, eingesetzt<sup>10, 17, 69</sup>. Zudem werden Kopf-Hals-Tumoren mit dem monoklonalen

Antikörper Cetuximab therapiert, welcher sich ebenfalls gegen ErbB1 richtet<sup>16, 33, 64</sup>. Die Substanzen Trastuzumab und Pertuxumab, ebenfalls monoklonale Antikörper, kommen bei der Therapie von Her2/neu-positiven Mammakarzinomen zum Einsatz<sup>10, 64, 69</sup>. Zudem existiert mit Lepadatinib ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor, welcher sich sowohl gegen ErbB1, als auch gegen ErbB2 richtet. ErbB3 hemmende Substanzen befinden sich derzeit noch in der Erprobungsphase. Möglicherweise spielen die unterschiedlichen ErbB-Rezeptoren, welche wir in leukämischen Zellen nachweisen konnten, ebenfalls eine Rolle bei der Entwicklung, der Progression oder der therapeutischen Resistenz der CML. Sollte dies der Fall sein, stehen mit den genannten Substanzen neue therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit geben daher wichtige Hinweise für mögliche neue Therapieansätze und unterstützen die Annahme, dass die Rolle der ErbB-Rezeptoren sowie die des Proteins Ebp1 in der Therapie der CML weiter evaluiert werden sollte. Besonders interessant ist dabei die weitere Erforschung der Bedeutung der jeweiligen ErbB-Rezeptoren im Krankheitsgeschehen der CML.

### 6. Zusammenfassung

Bei der Behandlung verschiedener Leukämieformen stehen aktuell zielgerichtete Therapieansätze im Fokus. Die Therapie der CML mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib ist ein herausragendes Beispiel für den Erfolg solcher zielgerichteten Therapieansätze. Durch die Einführung von Imatinib konnte die Dauer der chronischen Phase der CML signifikant verlängert werden. Auch konnte die Progression der Erkrankung in die Blastenkrise deutlich hinausgezögert werden. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib erfordert jedoch neue Therapieansätze, welche sich beispielsweise gegen Signalwege innerhalb der Krebszelle richten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Proteins Ebp1 sowie die der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren unter Einfluss von Imatinib in Hinblick auf mögliche Ziele neuer Behandlungsstrategien untersucht.

Ebp1 ist involviert in die Unterdrückung von Apoptose, in Zellproliferation sowie in Differenzierungsvorgänge innerhalb der Zelle. Es sind zwei verschiedene Isoformen bekannt. Die längere Form Ebp1-p48 unterdrückt Apoptose, wohingegen die kürzere Form Ebp1-p42 für die Steuerung der Zelldifferenzierung verantwortlich gemacht wird.

Die ErbB-Rezeptoren sind an physiologischen Prozessen, wie Zellteilung, Differenzierung und Proliferation beteiligt. Zudem spielen sie eine entscheidende Rolle als potentielle Proto-Onkogene bei der Pathogenese und Progression verschiedener humaner Krebsentitäten<sup>6, 10, 12, 25, 153, 156</sup>. Meist korreliert ihre Überexpression mit einer schlechteren Prognose sowie einem schlechteren Ansprechen auf mögliche Therapien.

Wir konnten zeigen, dass Ebp1 ubiquitär in allen von uns untersuchten leukämischen Zelllinien und im Blut von Patienten nebst gesunden Spendern nachweisbar ist. Zudem ließ sich mittels unterschiedlicher Methoden eine abgeschwächte Proteinexpression unter dem Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib in unterschiedlichen Zelllinien insbesondere von K562-Zellen beweisen. In der vorliegenden Arbeit gelang zudem der Nachweis von verschiedenen Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie in leukämischen Zellen. Diese Tatsache stellt ein Novum dar, da es sich hier eigentlich um epidermale Rezeptoren handelt, deren Existenz bislang kaum in leukämischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Eine differentielle Expression unter dem Einfluss von Imatinib hingegen konnte hier nicht dokumentiert werden.

Die Imatinib-Behandlung hat jedoch Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der Isoform Ebp1-p42. Im Rahmen einer stabilen Transfektion von K562-Zellen mit den Isoformen Ebp1-p42 und Ebp1-p48 konnte eine Translokation von Ebp1-p42 vom Zytoplasma in den Zellkern nachgewiesen werden. Dieser Effekt lässt sich bei Ebp1-p48-transfizierten K562-Zellen nicht nachweisen.

Aufgrund der Tatsache, dass Ebp1 sowohl protoonkogene, als auch tumorsuppressive Eigenschaften zu besitzen scheint, ergeben sich potentielle neue Möglichkeiten in der Therapie der Imatinib-resistenten und Zweitgenerations-Tyrosinkinaseinhibitor-resistenten CML. Auch der Nachweis der unterschiedlichen Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie könnte demnach neue Erkenntnisse in der Pathogenese und der Therapie der CML bringen. Möglicherweise spielen diese Rezeptoren ebenfalls eine Rolle, welche essentiell für die Signalgebung innerhalb dieser hämatopoetischen Zellen ist. Ob oder inwieweit Ebp1 bzw. die einzelnen ErbB-Rezeptoren auf die Entstehung, die Progression und die Therapie der CML einwirken, bleibt jedoch unbekannt und bedarf daher weiterer Klärung.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ahmed KM, Cao N, Li JJ (2006) HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res* 26: 4235-4243
2. Ahn JY, Liu X, Liu Z, Pereira L, Cheng D, Peng J, Wade PA, Hamburger AW, Ye K (2006) Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. *EMBO J* 25: 2083-2095
3. Akinmade D, Lee M, Zhang Y, Hamburger AW (2007) Ebp1-mediated inhibition of cell growth requires serine 363 phosphorylation. *Int J Oncol* 31: 851-858
4. Akinmade D, Talukder AH, Zhang Y, Luo WM, Kumar R, Hamburger AW (2008) Phosphorylation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by p21-activated kinase 1 in breast cancer cells. *Br J Cancer* 98: 1132-1140
5. Allen H, Hsuan J, Clark S, Maziarz R, Waterfield MD, Flavell RA, Haley J (1990) Expression of epidermal-growth-factor receptor in the K562 cell line by transfection. *Altered receptor biochemistry. Biochem J* 271: 785-790
6. Anderson NG, Ahmad T (2002) ErbB receptor tyrosine kinase inhibitors as therapeutic agents. *Front Biosci* 7: d1926-1940
7. Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG (1979) K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer* 23: 143-147
8. Apperley JF (2007) Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 8: 1018-1029
9. Balabanov S, Gontarewicz A, Ziegler P, Hartmann U, Kammer W, Copland M, Brassat U, Priemer M, Hauber I, Wilhelm T, Schwarz G, Kanz L, Bokemeyer C, Hauber J, Holyoake TL, Nordheim A, Brummendorf TH (2007) Hypusination of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A): a novel therapeutic target in BCR-ABL-positive leukemias identified by a proteomics approach. *Blood* 109: 1701-1711
10. Baron AT, Wilken JA, Haggstrom DE, Goodrich ST, Maihle NJ (2009) Clinical implementation of soluble EGFR (sEGFR) as a theragnostic serum biomarker of breast, lung and ovarian cancer. *IDrugs* 12: 302-308
11. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, Grosveld G, Ferguson-Smith MA, Davies T, Stone M, et al. (1983) Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-280
12. Baselga J, Swain SM (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9: 463-475
13. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996) All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271: 5251-5257
14. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Bender HG (1993) [The erbB gene family: significance for tumor development, prognosis and new therapeutic modalities]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 53: 742-753
15. Bernier J, Bentzen SM, Vermorken JB (2009) Molecular therapy in head and neck oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 6: 266-277
16. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354: 567-578
17. Bose R, Zhang X (2009) The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition. *Exp Cell Res* 315: 649-658
18. Bose SK, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Spicer EK (2006) Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes. *Biochem J* 396: 99-107
19. Brandt L (1985) Environmental factors and leukaemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 2: 7-10

20. Breuleux M (2007) Role of heregulin in human cancer. *Cell Mol Life Sci* 64: 2358-2377
21. Britsch S (2007) The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190: 1-65
22. Brummendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, Eaves AC, Lansdorp PM (2000) Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95: 1883-1890
23. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, Lydon NB (1996) Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56: 100-104
24. Buhring HJ, Sures I, Jallal B, Weiss FU, Busch FW, Ludwig WD, Handgretinger R, Waller HD, Ullrich A (1995) The receptor tyrosine kinase p185HER2 is expressed on a subset of B-lymphoid blasts from patients with acute lymphoblastic leukemia and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 86: 1916-1923
25. Burgess AW (2008) EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* 26: 263-274
26. Calabretta B, Perrotti D (2004) The biology of CML blast crisis. *Blood* 103: 4010-4022
27. Carpenter G (2003) ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 284: 66-77
28. Carraway CA, Carraway KL (2007) Sequestration and segregation of receptor kinases in epithelial cells: implications for ErbB2 oncogenesis. *Sci STKE* 2007: re3
29. Carter CJ (2008) Schizophrenia Susceptibility Genes Directly Implicated in the Life Cycles of Pathogens: Cytomegalovirus, Influenza, Herpes simplex, Rubella, and Toxoplasma gondii. *Schizophr Bull*
30. Chou TC, Talalay P (1981) Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* 115: 207-216
31. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55
32. Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 505-516
33. Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, Vokes EE (2003) Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 21: 1980-1987
34. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, Boni M, Bernasconi C (1995) Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol* 70: 79-82
35. Corso C, Pisapia L, Citro A, Cicatiello V, Barba P, Cigliano L, Abrescia P, Maffei A, Manco G, Del Pozzo G EBP1 and DRBP76/NF90 binding proteins are included in the major histocompatibility complex class II RNA operon. *Nucleic Acids Res* 39: 7263-7275
36. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, Hu S, Narasimhan NI, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Druker BJ, Deininger MW, Talpaz M (2012) Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 367: 2075-2088
37. Cronkite EP (1987) Chemical leukemogenesis: benzene as a model. *Semin Hematol* 24: 2-11
38. Daley GQ, Baltimore D (1988) Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9312-9316
39. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247: 824-830

40. Dalton WT, Jr., Ahearn MJ, McCredie KB, Freireich EJ, Stass SA, Trujillo JM (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71: 242-247
41. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-3356
42. Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R (2003) Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 159: 283-300
43. Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, Cork A, Estey E, Pierce S, Keating M (1993) Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *Am J Med* 94: 69-74
44. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344: 1031-1037
45. Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, Klagsbrun M (1997) A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* 272: 26761-26768
46. Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M (1999) Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18: 2607-2615
47. Engelman JA, Cantley LC (2006) The role of the ErbB family members in non-small cell lung cancers sensitive to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* 12: 4372s-4376s
48. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, Mandelli F, Mecucci C, Martelli MF (2007) Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 92: 519-532
49. Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 34-45
50. Friess H, Berberat P, Schilling M, Kunz J, Korc M, Buchler MW (1996) Pancreatic cancer: the potential clinical relevance of alterations in growth factors and their receptors. *J Mol Med* 74: 35-42
51. Gannon PO, Koumakpayi IH, Le Page C, Karakiewicz PI, Mes-Masson AM, Saad F (2008) Ebp1 expression in benign and malignant prostate. *Cancer Cell Int* 8: 18
52. Gao G, Dou QP (2000) G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells. *Mol Pharmacol* 58: 1001-1010
53. Goldman JM (1989) Recent advances in molecular biology of chronic myeloid leukaemia: is the pathogenetic puzzle approaching solution? *Bone Marrow Transplant* 4 Suppl 1: 129-130
54. Goldman JM, Melo JV (2003) Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349: 1451-1464
55. Goldman JM, Melo JV (2008) BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia--how does it work? *Acta Haematol* 119: 212-217
56. Goldman JM (2009) Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 453-460
57. Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brummendorf TH (2008) Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 111: 4355-4364
58. Gopinath M, Raju S, Honda A, Shaila MS Host factor Ebp1 inhibits rinderpest virus transcription in vivo. *Arch Virol* 155: 455-462

59. Gotoh A, Miyazawa K, Ohyashiki K, Tauchi T, Boswell HS, Broxmeyer HE, Toyama K (1995) Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp Hematol* 23: 1153-1159
60. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, Pearson C, Alcorn MJ, Richmond L, Holyoake TL (2002) Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99: 319-325
61. Griffin JD, Todd RF, 3rd, Ritz J, Nadler LM, Canellos GP, Rosenthal D, Gallivan M, Beveridge RP, Weinstein H, Karp D, Schlossman SF (1983) Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia. *Blood* 61: 85-91
62. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP (2005) Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437: 147-153
63. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36: 93-99
64. Groner B, Hartmann C, Wels W (2004) Therapeutic antibodies. *Curr Mol Med* 4: 539-547
65. Gullick WJ (1996) The c-erbB3/HER3 receptor in human cancer. *Cancer Surv* 27: 339-349
66. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8132-8136
67. Halford MM, Stacker SA (2001) Revelations of the RYK receptor. *Bioessays* 23: 34-45
68. Hamburger AW (2008) The role of ErbB3 and its binding partners in breast cancer progression and resistance to hormone and tyrosine kinase directed therapies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 225-233
69. Hamid O (2004) Emerging treatments in oncology: focus on tyrosine kinase (erbB) receptor inhibitors. *J Am Pharm Assoc* (2003) 44: 52-58
70. Harari D, Yarden Y (2000) Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19: 6102-6114
71. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queisser W, Loffler H, Hochhaus A, Heinze B, et al. (1994) Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84: 4064-4077
72. Heinlein CA, Chang C (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25: 276-308
73. Hochhaus A (2011) Educational session: managing chronic myeloid leukemia as a chronic disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 128-135
74. Honda A, Okamoto T, Ishihama A (2007) Host factor Ebp1: selective inhibitor of influenza virus transcriptase. *Genes Cells* 12: 133-142
75. Honda A (2008) Role of host protein Ebp1 in influenza virus growth: intracellular localization of Ebp1 in virus-infected and uninfected cells. *J Biotechnol* 133: 208-212
76. Horvath BM, Magyar Z, Zhang Y, Hamburger AW, Bako L, Visser RG, Bachem CW, Bogre L (2006) EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO J* 25: 4909-4920
77. Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC, Ling D (1992) Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett* 65: 215-220
78. Huang HL, Chen YC, Huang YC, Yang KC, Pan H, Shih SP, Chen YJ Lapatinib induces autophagy, apoptosis and megakaryocytic differentiation in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *PLoS One* 6: e29014
79. Hynes NE (1996) ErbB2 activation and signal transduction in normal and malignant mammary cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1: 199-206
80. Ichimaru M, Ichimaru T, Belsky JL (1978) Incidence of leukemia in atomic bomb survivors belonging to a fixed cohort in Hiroshima and Nagasaki, 1950--71. *Radiation*

- dose, years after exposure, age at exposure, and type of leukemia. *J Radiat Res (Tokyo)* 19: 262-282
81. Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, Matsuo T (1991) Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res (Tokyo)* 32 Suppl 2: 14-19
  82. Isaacs JT, Isaacs WB (2004) Androgen receptor outwits prostate cancer drugs. *Nat Med* 10: 26-27
  83. Ishimaru D, Ramalingam S, Sengupta TK, Bandyopadhyay S, Dellis S, Tholanikunnel BG, Fernandes DJ, Spicer EK (2009) Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 7: 1354-1366
  84. Jordan KL, Evans DL, Steelman S, Hall DJ (1996) Isolation of two novel cDNAs whose products associate with the amino terminus of the E2F1 transcription factor. *Biochemistry* 35: 12320-12328
  85. Judah D, Chang WY, Dagnino L EBP1 is a novel E2F target gene regulated by transforming growth factor-beta. *PLoS One* 5: e13941
  86. Kim CK, Nguyen TL, Joo KM, Nam DH, Park J, Lee KH, Cho SW, Ahn JY Negative regulation of p53 by the long isoform of ErbB3 binding protein Ebp1 in brain tumors. *Cancer Res* 70: 9730-9741
  87. Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4995-5000
  88. Kowalinski E, Bange G, Bradatsch B, Hurt E, Wild K, Sinning I (2007) The crystal structure of Ebp1 reveals a methionine aminopeptidase fold as binding platform for multiple interactions. *FEBS Lett* 581: 4450-4454
  89. Kowalinski E, Bange G, Wild K, Sinning I (2007) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the proliferation-associated protein Ebp1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63: 768-770
  90. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9193-9197
  91. Kwon IS, Ahn JY p48 Ebp1 acts as a downstream mediator of Trk signaling in neurons, contributing neuronal differentiation. *Neurochem Int* 58: 215-223
  92. Lafky JM, Wilken JA, Baron AT, Maihle NJ (2008) Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1785: 232-265
  93. Lamartine J, Seri M, Cinti R, Heitzmann F, Creaven M, Radomski N, Jost E, Lenoir GM, Romeo G, Sylla BS (1997) Molecular cloning and mapping of a human cDNA (PA2G4) that encodes a protein highly homologous to the mouse cell cycle protein p38-2G4. *Cytogenet Cell Genet* 78: 31-35
  94. Lee SJ (2000) Chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 111: 993-1009
  95. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y (1998) Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 17: 3385-3397
  96. Leone F, Perissinotto E, Cavalloni G, Fonsato V, Bruno S, Surrenti N, Hong D, Capaldi A, Geuna M, Piacibello W, Aglietta M (2003) Expression of the c-ErbB-2/HER2 proto-oncogene in normal hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 74: 593-601
  97. Lessor TJ, Yoo JY, Xia X, Woodford N, Hamburger AW (2000) Ectopic expression of the ErbB-3 binding protein ebp1 inhibits growth and induces differentiation of human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 183: 321-329
  98. Lessor TJ, Hamburger AW (2001) Regulation of the ErbB3 binding protein Ebp1 by protein kinase C. *Mol Cell Endocrinol* 175: 185-191
  99. Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8164-8169

100. Liu Z, Ahn JY, Liu X, Ye K (2006) Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10917-10922
101. Liu Z, Liu X, Nakayama KI, Nakayama K, Ye K (2007) Protein kinase C-delta phosphorylates Ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival. *J Neurochem* 100: 1278-1288
102. Liu Z, Oh SM, Okada M, Liu X, Cheng D, Peng J, Brat DJ, Sun SY, Zhou W, Gu W, Ye K (2009) Human BRE1 is an E3 ubiquitin ligase for Ebp1 tumor suppressor. *Mol Biol Cell* 20: 757-768
103. Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334
104. Lu Y, Zhou H, Chen W, Zhang Y, Hamburger AW The ErbB3 binding protein EBP1 regulates ErbB2 protein levels and tamoxifen sensitivity in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*
105. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247: 1079-1082
106. Lui VW, Grandis JR (2002) EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 22: 1-11
107. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139
108. Marinkovic D, Marinkovic T, Kokai E, Barth T, Moller P, Wirth T (2004) Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis. *Nucleic Acids Res* 32: 5368-5378
109. Melo JV, Barnes DJ (2007) Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 441-453
110. Mohd Omar MF, Huang N, Ou K, Yu K, Putti TC, Jikuya H, Ichikawa T, Nishimura O, Tan P, Salto-Tellez M (2009) Molecular-assisted immunohistochemical optimization. *Acta Histochem*
111. Monie TP, Perrin AJ, Birtley JR, Sweeney TR, Karakasiliotis I, Chaudhry Y, Roberts LO, Matthews S, Goodfellow IG, Curry S (2007) Structural insights into the transcriptional and translational roles of Ebp1. *EMBO J* 26: 3936-3944
112. Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, Kuehl PM, Langenberg P, Meltzer SJ, Stine OC (2001) Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 61: 6046-6049
113. Muller MR, Grunebach F, Kayser K, Vogel W, Nencioni A, Brugger W, Kanz L, Brossart P (2003) Expression of her-2/neu on acute lymphoblastic leukemias: implications for the development of immunotherapeutic approaches. *Clin Cancer Res* 9: 3448-3453
114. Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin TM, Szolosi J (1999) Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 5: 255-271
115. Nahta R, Esteva FJ (2003) Bcl-2 antisense oligonucleotides: a potential novel strategy for the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 30: 143-149
116. Nakagawa K, Kawabata S, Nakashima Y, Iwanaga S, Sueishi K (1997) Tissue distribution and subcellular localization of rabbit liver metalloendopeptidase. *J Histochem Cytochem* 45: 41-47
117. Negro A, Brar BK, Lee KF (2004) Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res* 59: 1-12
118. Neumann E (1870) Ein Fall Von Leukämie Mit Erkrankung Des Knochenmarks. . *Archive der Heilkunde*
119. Nowell PC (1962) The minute chromosome (Phl) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* 8: 65-66

120. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, Adrian LT, Zhou T, Huang WS, Xu Q, Metcalf CA, 3rd, Tyner JW, Loriaux MM, Corbin AS, Wardwell S, Ning Y, Keats JA, Wang Y, Sundaramoorthi R, Thomas M, Zhou D, Snodgrass J, Commodore L, Sawyer TK, Dalgarno DC, Deininger MW, Druker BJ, Clackson T (2009) AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 16: 401-412
121. O'Hare T, Zabriskie MS, Eiring AM, Deininger MW (2012) Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 12: 513-526
122. Oh SM, Liu Z, Okada M, Jang SW, Liu X, Chan CB, Luo H, Ye K (2009) Ebp1 sumoylation, regulated by TLS/FUS E3 ligase, is required for its anti-proliferative activity. *Oncogene*
123. Okada M, Jang SW, Ye K (2007) Ebp1 association with nucleophosmin/B23 is essential for regulating cell proliferation and suppressing apoptosis. *J Biol Chem* 282: 36744-36754
124. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19: 3159-3167
125. Ono M, Kuwano M (2006) Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 12: 7242-7251
126. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, Stuart RK, Spicer EK, Fernandes DJ (2007) Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 109: 3069-3075
127. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-1500
128. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004) EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13306-13311
129. Pegoraro L, Matera L, Ritz J, Levis A, Palumbo A, Biagini G (1983) Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst* 70: 447-453
130. Penuel E, Akita RW, Sliwkowski MX (2002) Identification of a region within the ErbB2/HER2 intracellular domain that is necessary for ligand-independent association. *J Biol Chem* 277: 28468-28473
131. Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M (1993) Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1746-1750
132. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T, et al. (1994) Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 137: S68-97
133. Quintas-Cardama A, Cortes JE (2006) Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 81: 973-988
134. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Cortes J (2007) Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 6: 834-848
135. Radich JP (2011) The biology of chronic myelogenous leukemia progression: who, what, where, and why? *Hematol Oncol Clin North Am* 25: 967-980, v
136. Radomski N, Jost E (1995) Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle. *Exp Cell Res* 220: 434-445
137. Rajkumar T, Gullick WJ (1994) The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 29: 3-9
138. Reed JC (1997) Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Pharmacol* 41: 501-532

139. Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B (2008) Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* 129: 563-578
140. Rowley JD (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293
141. Sacchi S, Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Rios MB, Giles FJ, Beran M, Koller CA, Keating MJ, Talpaz M (1999) Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. *Cancer* 86: 2632-2641
142. Salgia R, Li JL, Lo SH, Brunkhorst B, Kansas GS, Sobhany ES, Sun Y, Pisick E, Hallek M, Ernst T, et al. (1995) Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem* 270: 5039-5047
143. Santegoets SJ, Schreurs MW, Reurs AW, Lindenberg JJ, Kueter EW, van den Eertwegh AJ, Hooijberg E, Brandwijk RJ, Hufton SE, Hoogenboom HR, Scheper RJ, Somers VA, de Gruijl TD (2007) Identification and characterization of ErbB-3-binding protein-1 as a target for immunotherapy. *J Immunol* 179: 2005-2012
144. Sawyer C, Hiles I, Page M, Crompton M, Dean C (1998) Two erbB-4 transcripts are expressed in normal breast and in most breast cancers. *Oncogene* 17: 919-924
145. Sawyers CL (1992) The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surv* 15: 37-51
146. Sawyers CL (1993) The role of myc in transformation by BCR-ABL. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1: 45-46
147. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99: 3530-3539
148. Schiffer CA (2007) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 357: 258-265
149. Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, Manning J, Zhao XY, Fang K, Roth JA (1989) Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 49: 4968-4971
150. Schreiber AB, Libermann TA, Lax I, Yarden Y, Schlessinger J (1983) Biological role of epidermal growth factor-receptor clustering. Investigation with monoclonal anti-receptor antibodies. *J Biol Chem* 258: 846-853
151. Semba K, Kamata N, Toyoshima K, Yamamoto T (1985) A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6497-6501
152. Shah NP, Sawyers CL (2003) Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22: 7389-7395
153. Sibilina M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M (2007) The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75: 770-787
154. Sithanandam G, Anderson LM (2008) The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 15: 413-448
155. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244: 707-712
156. Slichenmyer WJ, Elliott WL, Fry DW (2001) CI-1033, a pan-erbB tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol* 28: 80-85

157. Soundararajan S, Chen W, Spicer EK, Courtenay-Luck N, Fernandes DJ (2008) The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells. *Cancer Res* 68: 2358-2365
158. Spengeman JD, Green TD, McCubrey JA, Bertrand FE (2005) Activated EGFR promotes the survival of B-lineage acute leukemia in the absence of stromal cells. *Cell Cycle* 4: 483-487
159. Spyridonidis A, Schmidt M, Bernhardt W, Papadimitriou A, Azemar M, Wels W, Groner B, Henschler R (1998) Purging of mammary carcinoma cells during ex vivo culture of CD34+ hematopoietic progenitor cells with recombinant immunotoxins. *Blood* 91: 1820-1827
160. Squatrito M, Mancino M, Donzelli M, Areces LB, Draetta GF (2004) EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. *Oncogene* 23: 4454-4465
161. Squatrito M, Mancino M, Sala L, Draetta GF (2006) Ebp1 is a dsRNA-binding protein associated with ribosomes that modulates eIF2alpha phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 859-868
162. Stegmaier K, Corsello SM, Ross KN, Wong JS, Deangelo DJ, Golub TR (2005) Gefitinib induces myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 2841-2848
163. Stern DF (2003) ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 284: 89-98
164. Stern DF (2008) ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13: 215-223
165. Steube KG, Jadau A, Teepe D, Drexler HG (1995) Expression of bcl-2 mRNA and protein in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 9: 1841-1846
166. Taplin ME, Balk SP (2004) Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *J Cell Biochem* 91: 483-490
167. Thorns C, Gaiser T, Lange K, Merz H, Feller AC (2002) cDNA arrays: gene expression profiles of Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma cell lines. *Pathol Int* 52: 578-585
168. Trinks C, Djerf EA, Hallbeck AL, Jonsson JI, Walz TM The pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor canertinib induces ErbB-independent apoptosis in human leukemia (HL-60 and U-937) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 6-10
169. Troyer KL, Lee DC (2001) Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 7-21
170. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 16: 5276-5287
171. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E (2008) The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol* 44: 315-324
172. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecky A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359: 1116-1127
173. Vigneri P, Wang JY (2001) Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 7: 228-234
174. Virchow R (1845) Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 36: 151-156
175. Walters DK, French JD, Arendt BK, Jelinek DF (2003) Atypical expression of ErbB3 in myeloma cells: cross-talk between ErbB3 and the interferon-alpha signaling complex. *Oncogene* 22: 3598-3607
176. Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, Williams WV, Cohen JA, Kern JA (1990) Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50: 421-425

177. Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS (1999) ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 274: 8865-8874
178. Xia X, Cheng A, Lessor T, Zhang Y, Hamburger AW (2001) Ebp1, an ErbB-3 binding protein, interacts with Rb and affects Rb transcriptional regulation. *J Cell Physiol* 187: 209-217
179. Xia X, Lessor TJ, Zhang Y, Woodford N, Hamburger AW (2001) Analysis of the expression pattern of Ebp1, an ErbB-3-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 240-244
180. Yarden Y, Schlessinger J (1987) Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 26: 1434-1442
181. Yarden Y, Schlessinger J (1987) Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26: 1443-1451
182. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137
183. Yokota J, Yamamoto T, Miyajima N, Toyoshima K, Nomura N, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M, Sugimura T (1988) Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue. *Oncogene* 2: 283-287
184. Yoo JY, Wang XW, Rishi AK, Lessor T, Xia XM, Gustafson TA, Hamburger AW (2000) Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin. *Br J Cancer* 82: 683-690
185. Yu Y, Chen W, Zhang Y, Hamburger AW, Pan H, Zhang Z (2007) Suppression of salivary adenoid cystic carcinoma growth and metastasis by ErbB3 binding protein Ebp1 gene transfer. *Int J Cancer* 120: 1909-1913
186. Zhang Y, Ali TZ, Zhou H, D'Souza DR, Lu Y, Jaffe J, Liu Z, Passaniti A, Hamburger AW ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer. *Cancer Res* 70: 240-248
187. Zhang Y, Fondell JD, Wang Q, Xia X, Cheng A, Lu ML, Hamburger AW (2002) Repression of androgen receptor mediated transcription by the ErbB-3 binding protein, Ebp1. *Oncogene* 21: 5609-5618
188. Zhang Y, Woodford N, Xia X, Hamburger AW (2003) Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* 31: 2168-2177
189. Zhang Y, Hamburger AW (2004) Heregulin regulates the ability of the ErbB3-binding protein Ebp1 to bind E2F promoter elements and repress E2F-mediated transcription. *J Biol Chem* 279: 26126-26133
190. Zhang Y, Akinmade D, Hamburger AW (2005) The ErbB3 binding protein Ebp1 interacts with Sin3A to repress E2F1 and AR-mediated transcription. *Nucleic Acids Res* 33: 6024-6033
191. Zhang Y, Hamburger AW (2005) Specificity and heregulin regulation of Ebp1 (ErbB3 binding protein 1) mediated repression of androgen receptor signalling. *Br J Cancer* 92: 140-146
192. Zhang Y, Wang XW, Jelovac D, Nakanishi T, Yu MH, Akinmade D, Goloubeva O, Ross DD, Brodie A, Hamburger AW (2005) The ErbB3-binding protein Ebp1 suppresses androgen receptor-mediated gene transcription and tumorigenesis of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9890-9895
193. Zhang Y, Akinmade D, Hamburger AW (2008) Inhibition of heregulin mediated MCF-7 breast cancer cell growth by the ErbB3 binding protein EBP1. *Cancer Lett* 265: 298-306
194. Zhang Y, Linn D, Liu Z, Melamed J, Tavora F, Young CY, Burger AM, Hamburger AW (2008) EBP1, an ErbB3-binding protein, is decreased in prostate cancer and implicated in hormone resistance. *Mol Cancer Ther* 7: 3176-3186

195. Zhang Y, Lu Y, Zhou H, Lee M, Liu Z, Hassel BA, Hamburger AW (2008) Alterations in cell growth and signaling in ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) deficient mice. *BMC Cell Biol* 9: 69
196. Zhou H, Mazan-Mamczarz K, Martindale JL, Barker A, Liu Z, Gorospe M, Leedman PJ, Gartenhaus RB, Hamburger AW, Zhang Y Post-transcriptional regulation of androgen receptor mRNA by an ErbB3 binding protein 1 in prostate cancer. *Nucleic Acids Res* 38: 3619-3631
197. Zhou H, Zhang Y, Hamburger AW EBP1 inhibits translation of androgen receptor mRNA in castration resistant prostate cancer cells. *Anticancer Res* 31: 3129-3135
198. Zhou X, Chen W, Zhang Y, Sun J, Wang Q, Yu Y (2009) Potential therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma by ErbB3-binding protein 1 gene transfer. *J Cancer Res Clin Oncol*

## **Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## Erklärung

### **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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Mirja Rieke Bernhardt

## Publikationen

### Abstracts

#### Buchbeitrag

Balabanov S, Brassat U, Bernhardt M, Kob V, Gontarewicz A, Brümmendorf TH

Telomere and stem cell biology biology in chronic myeloid leukemia

*Stem cell and their potential for clinical Application, Springer-Verlag 2008,*

ISBN 978-1-40206468-5

**50<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, San Fransisco, CA Moscone Center, USA,  
Dec.6-9 2008**

**Chronic Myeloid Leukemia - Response and Prognosis**

***Identification of Novel Biomarkers for Prediction of Response to Tyrosine Kinase  
Inhibitors (TKIs) by Proteomic Profiling of Imatinib as well as 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> Generation  
TKIs in Vitro***

*Stefan Balabanov, MD/PhD<sup>1\*</sup>, Thoma Wilhelm, PhD<sup>1\*</sup>, Simone Venz, PhD<sup>2\*</sup>, Christine  
Barret<sup>1\*</sup>, Gunhild Keller, MD<sup>1\*</sup>, Mirja Bernhardt<sup>1\*</sup>, Artur Gontarewicz, MD<sup>1\*</sup>, Melanie Braig,  
PhD<sup>1\*</sup>, Reinhard Walther, PhD<sup>2\*</sup> and Tim H. Brummendorf, MD<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Klinik für Onkologie und Hämatologie, Hubertus-Wald-Tumorzentrum-Universitäres Cancer  
Center Hamburg (UCCH), University Hospital Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg,  
Germany*

*<sup>2</sup>Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt Universität  
Greifswald, Greifswald*

## Herstellerfirmen

**Tabelle 10:** Übersicht der Herstellerfirmen

<b>Name</b>	<b>Anschrift</b>
Abcam	Cambridge, MA, USA
Affinity Bio Reagent	Rockford, IL 61105 USA
Amaxa	Walkersville, MD 21793 , USA
Amersham Biosciences	Sunnyvale, CA 94086, United States
Ansell	München, Germany
Applichem	Darmstadt, Germany
BD	Franklin Lakes, NJ USA 07417
Beckman-Coulter	Fullerton, CA 92834-3100 USA
Binder	Tuttlingen, Germany
Bio-Rad	Hercules, CA 94547, USA
Bosch	Stuttgart, Germany
Calbiochem	San Diego, USA
Canon	Amsterdam, Netherlands
Cell Signaling	Danvers, MA 01923, USA
Colora	Maryland, USA
Cryo Anlagenbau	Wilnsdorf, Germany
Diversifield Biotech	Boston, MA 02132, USA
Edmund Bühler	Hechingen, Germany
Elkay	Hampshire RG24 8LJ, United Kingdom
Epitomics	Kalifornien, USA
Eppendorf	Hamburg, Germany
Falkon (=BD Biosciences)	Franklin Lakes, NJ USA 07417
Fluka (Sigma Aldrich)	St. Louis, MO, USA
GE Healthcare	München, Germany
GEHO Pack Service	Heidgraben, Germany
Gerhardt	Königswinter, Germany
Geyer	Renningen, Germany
Gibco	Carlsbad, CA 92008, USA
Greiner bio-one	Frickenhausen, Germany
Hanna (PCE-Group)	Meschede, Germany
Hartmann	Heidenheim, Germany
Heidolph	Schwabach, Germany
Heraeus	Hanau, Germany
Hilab	Internet, Germany
Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Germany
HLC Bio Tech	Bovenden, Germany
Integra Biosciences	Fernwald, Germany

Invitrogen / Gibco	Carlsbad, CA 92008, USA
J.T. Baker	Phillipsburg NJ 08865, U.S.A.
Jackson Immuno Research	West Grove, PA, USA
Janke u. Kunkel (IKA Labortechnik)	Staufen, Germany
Jena Glas	Zwiesel, Germany
Kirsch	Offenburg, Germany
Lauda	Lauda-Königshofen, Germany
Lonza	Basel, Switzerland
Merck	Darmstadt, Germany
Mettler Toledo	Giessen, Germany
Microsoft Corporation	Seattle, WA, USA
Millipore	Billerica, MA 01821, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
Mitsubishi	Tokyo, Japan
MWG Biotech	Ebersberg, Germany
Nalgene	Rochester, NY 14625 U.S.A.
Neuberger	Freiburg, Germany
New Brunswick	Edison, NJ 08818-4005 USA
New England Biolabs	Ipswich, MA 01938-2723, USA
PAA	Pasching, Austria
PeqLab	Erlangen, Germany
Perkin Elmer	Waltham, Massachusetts 02451, USA
Pierce	Rockford, IL 61105 USA
Privileg	Fürth, Germany
Promega	Madison, WI 53711 USA
Qiagen	Hilden, Germany
Roche	Mannheim, Germany
Roth	Karlsruhe, Germany
Sartorius	Göttingen, Germany
Schleicher & Schuell	Dassel, Germany
Schott	Mainz, Germany
Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Simport	Beloil, Qc J3G 4S5, Canada
Stratagene	La Jolla, CA 92037, USA
Thermo	Waltham, MA 02454, USA
Universitätszentrallager	Hamburg, , Germany
Upstate	Danvers, MA 01923, USA
Uvex	Fürth, Germany
Vitlab	Großostheim, Germany
Vitlab	Großostheim, Germany
VWR	Darmstadt, Germany

Zeiss  
Zymed

Jena, Germany  
South San Francisco, CA 94080, USA

## Geräte

**Tabelle 11:** Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
-20°C Gefrierschrank	Kirsch, Liebherr, Premium
2D Elektrophorese-Anlage, Protean Plus	Bio-Rad
-80°C Gefrierschrank	Heraeus
Absaugpumpe	Neuberger, HLC Bio Tech
Biofuge 13 R	Heraeus
Brutschrank	Heraeus
CO <sub>2</sub> - Inkubator	Binder, Thermo Electron
Concentrator	Eppendorf
Densitometer (Scanner), GS-800	Bio-Rad
Drucker	Mitsubishi
Einschweißgerät	GEHO Pack Service
Elektrophorese-Gelkammer groß, mittel und klein (sub cell GT)	Bio-Rad
Elektrophorese-Gerät (mini protean III)	Bio-Rad
Elektrophorese-Gerät, SE 400	Amersham Biosciences
Elektrophorese-Kammer	Bio-rad, PeqLab
FACS Calibur	Becton Dickinson
Gel-Dokumentationsgerät, Cabinet Eagle Eye II	Stratagene
Gene Pulser Xcell Total System	Bio-Rad
Große Kühlzentrifuge, 5810 R	Eppendorf
Große Zentrifuge, Minifuge RF	Heraeus
Großes Wasserbad	GFL
Heizblock mit Magnetrührer, Ikamag Ret (MR 2002)	Janke u. Kunkel, Heidolph
Inkubationsschüttler	New Brunswick
Inkubator	Memmert
Kamera	Stratagene
Kamera-Set / Kompakt Digital	Canon/Zeiss
Kleines Wasserbad	Köttermann
Kühlschrank	Bosch, Liebherr, Privileg
Lagerbehälter LN 2 (für Stickstoff)	Cryo Anlagenbau
Leuchttisch	Rex
Mikrokühlzentrifuge 5402	Eppendorf
Mikroskope	Zeiss
Mikrowelle	ETV

## Anhang

Mikrozentrifuge 5415 C	Eppendorf
Mikrozentrifuge, Biofuge 13	Heraeus
Millipore-Anlage	Millipore
Mischer, Vortex REAX 2000 (VF2)	Heidolph, Janke u. Kunkel
Multi-Pipettor	Eppendorf
Nanodrop PC	PeqLab
PCR-Gerät Sprint	Hybaid
pH Meter, Microprocessor pH 211	Hanna
Pipettor	Hirschmann
Power Supply für Gelelektrophoresen	Pharmacia
Power Supply, PowerPac	Bio-Rad
PowerSupply, EV 261	Consort
Schüttler	GFL 3015
Schüttler	Heidolph
Schüttler, LS 10	Gerhardt
Schüttler, SM 25	Edmund Bühler
Sicherheitswerkbank (S2), HS 15	Heraeus
Spectrophotometer Nanodrop, ND 1000	PeqLab
Spectrophotometer, DU 530	Beckmann
Spektrophotometer, Multilabel Counter 1420	Perkin Elmer
Sterile Werkbank (S1), HB 2448 S	Heraeus
Stickstoffbehälter, Cryo Plus 1	Thermo Electron
Thermocycler	Bio-Rad
Thermomixer	Eppendorf
Trans Blot Modul	Bio-Rad
TransBlot Cell	Bio-Rad
Ultramikrowaage	Sartorius
Vi-Cell XR 2.03	Beckman-Coulter
Waage, 1216 MP	Sartorius
Waage, PB 30	Mettler
Wallac Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer

## Verbrauchsmaterial

**Tabelle 12:** Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
10 µl Loop Needle	Elkay
6 well cell culture plate	Greiner bio-one
8-Tube stripes	Bio-Rad

## Anhang

Aluminiumfolie	Universitätszentrallager
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare
Becherglas 100, 250, 500, 1000 ml	VWR / Schott
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
Cryovial	Simport
Electrode Wicks	Biorad
Eppendorf Tube 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf
Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen	Jena Glass
Falcon® Conical Centrifuge Tubes 15, 50 ml	BD
Falcon® Polystyrene Round-Bottom-Tube	BD
Faltenfilter Whatman Ø 185/240	Schleicher / Schuell
Flat cap strips PCR tube strips	Bio-Rad
Fotopapier	Mitsubishi
Frottee	Biorad
Gene pulser cuvette	Bio-Rad
Glasflaschen mit Deckel in unterschiedlichen Größen	Schott
Handschuhe nitrax S Nitril	Ansell
Handschuhe Peha soft S Latex	Hartmann
Immobiline TM Dry Strip pH 4-7, 7 cm	GE Healthcare
Imobilon Transfer Membran	Millipore
Küvette Protein, RNA	Sarstedt
MACS-Pre Separation Filters	Miltenyi Biotec
Messbecher verschiedene Größen	VWR
Messzylinder 2000 ml	Vitlab
Mini Transblot Filters	Bio-Rad
Parafilm	Dechney
Pasteurpipette Glas 150 mm	Roth
Pasteurpipette Glas 230 mm und Plastik, Einweg 3 ml	Roth
Petri Seal	Diversified Biotech
Pipetten 0,1-2,5 / 0,5-10 / 10-1000 / 100-10000	Eppendorf
Pipettenspitzen weiß, gelb und blau	Sarstedt
Plastik Pipette 2 / 5 / 10 / 25 ml	Falkon
Plastikschalen	Sarstedt

## Anhang

---

Protean XL Size Extra Thick Blot Paper	Bio-Rad
Shandon Cryoträger (Objektträger für Cytospins)	Thermo
Shandon Filter Cards	Thermo
Sicherheitspipettierball	VWR
Skalpell	Universitätszentrallager
Strip cap for PCR tubes	VWR
Tissue culture dish 100x20 mm und 60x15 mm	Sarstedt
Tissue culture plate 96well flat und round bottom	Sarstedt
Ultra clear centrifuge tubes	Beckmann
UV-Brille	Uvex
X-Ray Cassette 18x24	Rego
Zählkammer 0,0025 mm <sup>2</sup> und 0,100 mm Tiefe	Neubauer Optik Labor
Zellkulturflaschen 25 / 75 / 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt

## PCR Programme

### 1. Ebp1-, ErbB- und RPLP0-Primer

Schritte [Name]	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen- Anzahl
Initiale Denaturierung	95	4	1x
Denaturierung	95	0,5 (30 Sek.)	30x
Annealing	Primerabhängig	1	30x
Elongation	72	1	30x
Finale Elongation	72	10	1x
Hold	4	∞	

### 2. RNA-Kontrolle auf Kontamination mit RPLP0-Primern

Schritte [Name]	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Zyklen- Anzahl
Initiale Denaturierung	94	4	1x
Denaturierung	94	1	35x
Annealing	55	1	35x
Elongation	72	1	35x
Finale Elongation	72	10	1x
Hold	4	∞	

### **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Tim Brümmendorf, der mich immer unterstützt und motiviert hat. Ich habe selten einen Chef erlebt, der sich so für das Wohl seiner Mitarbeiter einsetzt und mit so viel Herzblut seiner Arbeit nachgeht. Dafür vielen vielen Dank. Zudem bedanke ich mich für das interessante Thema und die Teilhabe am Laborleben der AG Brümmendorf.

Prof. Carsten Bokemeyer danke ich herzlich für die Unterstützung meiner Labor-Tätigkeit, spannende fachliche Diskussionen und die Teilhabe am onkologischen Arbeitsleben.

Stefan Balabanov möchte ich ebenfalls für die Einführung in mein Dissertationsthema, seine Korrekturen, seine Kritik, die Hilfsbereitschaft sowie die fachliche Unterstützung, gepaart mit viel Humor und Enthusiasmus, danken.

Ein dreifaches Hoch auf Melanie Balabanov und tausend Dank dafür, dass du für meine Fragen und Probleme immer ein offenes Ohr hattest.

Des Weiteren bedanke ich mich auf diesem Wege bei Dr. Patrick Ziegler für die Durchsicht meiner Dissertation, den mit mir verbundenen Zeitaufwand, die Korrekturen und die konstruktive Kritik.

Besonders hervorheben möchte ich Tine Baretz und Artur Gotarewicz aus unserer Labortruppe für ihre enorme Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Auch dem Rest der ehemaligen Labor-Rasselbande danke ich herzlich für fachliche und nicht-fachliche Gespräche und Hilfestellungen. Dazu zählen insbesondere Ute, Thomas, Joana, Vera, Viola, Tuhama und Christian. Das Arbeiten mit Euch und auch die privaten Freizeitaktivitäten haben mir immer sehr viel Spaß gemacht.

Dem Nachbarlabor Honecker danke ich zum einen für die Herzlichkeit, die mir an jedem Tag entgegen gebracht wurde und zum anderen für die stets offenen Ohren. Friedemann im Besonderen gilt mein Dank für die unvergessliche „Dienstreise“ nach Rotterdam. Tina und Steffi möchte ich für die vielen netten Gespräche und den gegenseitigen Austausch danken.

Außerdem ganz lieben Dank an Tobias Meyer für die Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie und das Fotografieren meiner stabil transfizierten Konstrukte sowie Heike Junker für ihre Hilfe bei den Northern Blot Analysen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mein Leben und mein berufliches Vorankommen stets mit großem Interesse verfolgt und mich stets in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützt haben. Ihr seid die allerbeste Familie, die man sich nur wünschen kann und ich liebe euch.