

**Untersuchungen zur Funktion von SHIP1 in der  
Leukämogenese der  
Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL)**

Dissertation

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

vorgelegt von

Patrick A. H. Ehm

aus Elmshorn, Schleswig-Holstein

Hamburg 2019

Mitglieder der Prüfungskommission:

1. Gutachter/einfaches Mitglied: Prof. Dr. Manfred Jücker  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Institut für Biochemie und Signaltransduktion  
N45 Rothe-Geussenhainer-Haus  
Martinistrasse 52  
20246 Hamburg
  
2. Gutachter/einfaches Mitglied: Prof. Dr. Julia Kehr  
Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie  
Molekulare Pflanzengenetik  
Ohnhorststr. 18  
22609 Hamburg
  
3. Gutachter/einfaches Mitglied: Prof. Dr. Arp Schnittger  
Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie  
Entwicklungsbiologie  
Ohnhorststr. 18  
22609 Hamburg
  
4. Vorsitz: PD Dr. Hartwig Lüthen  
Universität Hamburg  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich Biologie  
Institut für Pflanzenwissenschaften und Mikrobiologie  
Molekulare Pflanzenphysiologie  
Ohnhorststr. 18  
22609 Hamburg

Datum der Disputation: 12.06.2020 (13 Uhr)

Ort der Disputation: Institut für Pflanzenwissenschaften, Carl-von Linné Hörsaal

*Für dich, Papa*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Die Hämatopoese .....	3
2.2 Leukämie .....	4
2.2.1 Akute lymphatische Leukämie des Kindesalters .....	5
2.2.2 Pathogenese akuter Leukämien .....	7
2.2.3 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie .....	8
2.3 Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen .....	11
2.4 Der PI3K/AKT-Signalweg .....	14
2.4.1 Proteinkinase B / AKT .....	16
2.4.2 Die humane Inositol-5-Phosphatase (SHIP1) und ihre Struktur .....	17
2.5 B-Zell-Aktivierung .....	22
2.6 Ph-positive ALL .....	24
2.6.1 BCR-ABL .....	24
2.6.2 Ikaros .....	26
2.7 Der Einfluss von Phosphatasen (SHIP1) und Transkriptionsfaktoren (Ikaros) auf die B-Zell-Toleranz .....	29
2.7.1 Die B-Zell-Selektion durch klonale Eliminierung .....	29
2.7.2 Der Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Selektion von B-Zellen .....	32
2.8 Zielsetzung .....	34
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
3.1 Material .....	36
3.1.1 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur .....	36
3.1.2 Bakterienstämme .....	36
3.1.3 Puffer für die Herstellung von kompetenten Zellen .....	37
3.1.4 Oligonukleotide .....	37
3.1.5 Vektoren .....	39
3.1.6 Zelllinien .....	40
3.1.7 Patientenmaterial .....	41
3.1.8 Reagenzien, Puffer und Lösungen für die eukaryotische Zellkultur .....	41
3.1.9 Inhibitoren .....	42
3.1.10 Antikörper .....	42

3.2 Methoden .....	44
3.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	44
3.2.1.1 Anzucht von Bakterien .....	44
3.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen .....	44
3.2.1.3 Transformation von chemisch-kompetenten Zellen .....	44
3.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	45
3.2.2.1 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) .....	45
3.2.2.2 Zirkuläre Mutagenese .....	45
3.2.2.3 Analytische und präparative Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendo- nukleasen.....	47
3.2.2.4 Dephosphorylierung von Restriktionsfragmenten durch alkalische Phosphatase.....	47
3.2.2.5 Analytische Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	48
3.2.2.7 Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten .....	49
3.2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation) .....	49
3.2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) .....	49
3.2.2.10 RNA-Isolation.....	49
3.2.2.11 cDNA-Synthese .....	49
3.2.2.12 Real-Time-PCR .....	50
3.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	51
3.2.2.14 DNA-Sequenzierung.....	51
3.2.3 Zellbiologische Methoden .....	52
3.2.3.1 Kultivieren und Passagieren von adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien .....	52
3.2.3.2 Kultivieren und Passagieren von hämatopoetischen Suspensionszellen .....	52
3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	53
3.2.3.4 Zellzahlbestimmung – Neubauer-Hämozytometer.....	53
3.2.3.5 Alamar Blue – Zellviabilitäts-Assay.....	54
3.2.3.6 Proliferation – IncuCyte ZOOM.....	54
3.2.3.7 Transiente Transfektion .....	54
3.2.3.8 Lentivirale Transduktion.....	55
3.2.3.9 Mikroskopie .....	56
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	56
3.2.4.1 TCE-Lyse.....	56
3.2.4.2 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen unter Verwendung von M-Per-Puffer .....	57

3.2.4.3 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen unter Verwendung von NP40 .....	57
3.2.4.4 Quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Lowry .....	57
3.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	58
3.2.4.6 Western Blot .....	58
3.2.4.7 Immunpräzipitation und Phosphatase-Assay .....	59
3.2.4.8 PamStation – Protein-Kinase-Array .....	60
3.2.4.9 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren .....	61
3.2.4.10 Membran- und Zytosol-Fraktionierung .....	61
3.2.4.11 Kern- und Zytoplasma-Fraktionierung .....	62
3.2.4.12 Fixierung, Permeabilisierung und Immunfluoreszenz von Zellen.....	62
3.2.5 Immunzytochemische Methoden .....	63
3.2.5.1 Durchflusszytometrie .....	63
3.2.5.2 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus menschlichem Blut ....	63
3.2.6 Tierversuche.....	64
3.2.6.1 Transplantation .....	64
3.2.6.2 <i>In vivo</i> Imaging .....	64
3.2.6.3 Präparation von Knochenmark, Milz und Leber .....	64
3.2.7 Statistische Auswertung.....	65

## **4 Ergebnisse .....** **66**

4.1 Untersuchung der Expression von SHIP1 in ALL-Zellen.....	66
4.1.1 Untersuchung der mRNA-Expression von SHIP1 in primären ALL-Patientenproben .....	66
4.1.2 Untersuchung der mRNA-Expression von SHIP1 in ALL-Zelllinien.....	68
4.1.3 Untersuchung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in primären ALL-Patientenproben.....	68
4.1.4 Untersuchung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in ALL-Zelllinien.....	70
4.2 Untersuchung der reduzierten SHIP1-Expression in der T-ALL-Zelllinie Jurkat.....	71
4.3 Einfluss von aberrant aktivierten Tyrosinkinase auf die Expression von SHIP1 .....	73
4.3.1 Einfluss der Inhibierung von BCR-ABL auf die Expression von SHIP1 .....	74
4.3.2 Einfluss der Inhibierung der Src-Kinase-Familie auf die Expression von SHIP1 ...	76
4.3.3 Einfluss der Inhibierung des Flt3-Rezeptors auf die Expression von SHIP1 .....	77
4.3.4 Untersuchung des Src-Kinase-Familie-vermittelten Protein-Abbaus von SHIP1 ...	79
4.3.5 Analyse der funktionellen Bedeutung von SHIP1-Phosphorylierungsstellen auf den proteasomalen Abbau.....	84

4.4 Untersuchung der Auswirkungen einer verminderten SHIP1-Expression auf das Zellverhalten von B-Zellen .....	89
4.4.1 Der Transkriptionsfaktor Ikaros reguliert die SHIP1-Expression und die Aktivierung der Src-Kinase-Familie in der ALL.....	97
4.4.2 Untersuchung des Einflusses der Mutation Y864A auf die Phosphataseaktivität von SHIP1 .....	103
4.5 Analyse des FLVR-Motivs von SHIP1 und seiner Bedeutung für die Protein-Stabilität .....	106
4.6 Untersuchung der Auswirkungen einer gesteigerten SHIP1-Expression auf das Zellverhalten von B-Zellen .....	110
4.7 Ektopre Expression von hämatopoetischen Tumorsuppressor-Proteinen in Karzinomzellen – SHIP1 und Ikaros .....	113
4.8 Untersuchung der differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen in ALL-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischen Knockdown .....	116
4.9 Untersuchung einer kombinierten Therapie der ALL mit Hemmstoffen gegen den AKT-mTOR-Signalweg und BCR-ABL.....	122
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>127</b>
5.1 SHIP1 wird in der T-ALL auf transkriptioneller und translationaler Ebene verstärkt negativ reguliert .....	128
5.2 Heterogene Expression von SHIP1 in den unterschiedlichen Subtypen der B-ALL – Transkriptionelle Hochregulation von SHIP1 in Tel/AML1- und BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen .....	131
5.2.1 BCR-ABL-positive B-ALL- und CML-Zellen exprimieren unterschiedliche Niveaus an SHIP1 .....	133
5.2.2 Die Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 durch BCR-ABL und die Src-Kinase-Familie leitet den Ubiquitin-vermittelten Abbau ein.....	134
5.3 SHIP1 und seine divergente Rolle in der Leukämogenese – Einordnung von SHIP1 als Phosphatase in das Modell der B-Zell-Selektion.....	136
5.4 Der Transkriptionsfaktor Ikaros reguliert die Expression von SHIP1 und beeinflusst darüber den Schwellenwert für die AIC-Aktivierung von B-Zellen .....	147
5.5 Identifikation der Expression von SHIP1 und Ikaros in Karzinomzellen – Fördert SHIP1 das Überleben von Karzinomzellen als Suppressor der hyperaktivierten PI3K/AKT-Signalgebung?.....	150
5.6 Rekonstitution der Ikaros-Wildtyp-Aktivität und Beschränkung der Energiezufuhr als Behandlungsansatz der B-ALL.....	153
5.7 AKT und die Rolle der drei Isoformen in der ALL.....	155
5.8 Kombinatorische Therapie der ALL mit Hemmstoffen gegen den AKT-mTOR-Signalweg und gegen aberrant aktivierte Tyrosinkinase .....	160
5.9 Perspektive: SHIP1, Ikaros und AKT.....	164

<b>6 Supplement .....</b>	<b>165</b>
6.1 Daten.....	165
6.2 Abkürzungen.....	194
6.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	195
6.4 Abstract.....	200
6.5 Veröffentlichungen .....	202
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>203</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>235</b>
<b>Eidesstaatliche Versicherung .....</b>	<b>236</b>



## 1 Zusammenfassung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Krebserkrankung und zugleich die häufigste krebsbedingte Todesursache im Kindesalter. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg liegt bei der ALL häufig konstitutiv aktiviert vor und führt in der Konsequenz zur ungehemmten Zellproliferation. Jüngste Studien zeigen, dass eine gezielte Hyperaktivierung der nachgeschalteten B-Zell-Rezeptor-Signalgebung über einen maximalen Schwellenwert einen Deletionspunkt für die selektive Eliminierung von malignen B-Zellen darstellen kann. Dabei führen besonders hohe Expressionsniveaus von inhibitorischen Phosphatasen in B-Zell-Rezeptor-gesteuerten ALL-Zellen dazu, dass der Schwellenwert für die Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung angehoben wird und ermöglichen es Zellen mit einer starken onkogenen Signalgebung durch Abschwächung der Signalstärke einer negativen Selektion zu entkommen. Von den B-Zell-Rezeptor-abhängigen Signalkaskaden nimmt der PI3K/AKT-Signalweg eine hervorgehobene Rolle ein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der SH2-Domäne-beinhaltenen Inositol-5-Phosphatase SHIP1, einem negativen Regulator des AKT-Signalwegs, für die ALL näher untersucht sowie der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als therapeutisches Ziel zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) des Kindesalters beleuchtet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein molekularer Mechanismus identifiziert, bei dem SHIP1 nach Rekrutierung an die Zellmembran durch Kinasen der Src-Familie am Tyrosin-Rest 1021 des NPXY-Motivs phosphoryliert und im Folgenden nach Ubiquitynylierung proteasomal degradiert wird. Dies könnte eine Erklärung für die verminderte Expression von SHIP1 in T-ALL-Zellen und in einem Teil der primären B-ALL-Zellen darstellen. Eine weitere Ursache, die zu einer verminderten Menge an SHIP1-Protein in malignen Zellen führt, wurde bei der Charakterisierung von Patienten-abgeleiteten SHIP1-Mutationen identifiziert. So führen Mutationen in dem FLVR-Motiv (F28L) der SH2-Domäne und in der katalytischen Phosphatase-Domäne (R673Q) zu einer verminderten Stabilität und Expression des SHIP1-Proteins. Einhergehend mit der verminderten Expression dieser SHIP1-Mutanten steigt die Proliferation der SHIP1-Mutanten-exprimierenden Zellen im Vergleich zu SHIP1-Wildtyp-exprimierenden Zellen signifikant an. Weiterhin wurde die Herunterregulation von SHIP1 durch einen gezielten shRNA-vermittelten Knockdown in ALL-Zellen untersucht. Nach Knockdown von SHIP1 wird eine verstärkte Phosphorylierung von AKT und ein damit verbundenes gesteigertes Wachstum und eine erhöhte Zellviabilität der ALL-Zellen *in vitro* im Vergleich zu SHIP1-exprimierenden Zellen beobachtet. Diese Daten können das zuvor erhobene Modell der klonalen B-Zell-Selektion in dieser Form nicht bestätigen, unterstreichen jedoch die Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 in ALL-Zellen.

Aufbauend auf diesen Daten wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Regulation von SHIP1 durch den B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor Ikaros untersucht. In dieser Arbeit kann erstmals gezeigt werden, dass die gezielte Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression, in Philadelphia-Chromosom-positiven SupB-15-Zellen mit dominant-negativer Ikaros-Isoform, zu einer partiellen SHIP1-vermittelten Hemmung des Zellwachstums führt. Insbesondere wird die Tumorsuppressorfunktion von Ikaros dabei durch einen SHIP1-

abhängigen, additiven Effekt verstärkt. So zeigen SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-exprimierende SupB-15-Zellen eine signifikant langsamere Proliferation als SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>- und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-exprimierende Zellen. Diese Daten belegen, dass die Kollaboration von SHIP1 mit Ikaros einen substanziellen negativ-regulatorischen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Philadelphia-Chromosom-positiven B-ALL-Zellen ausübt, was die Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 und Ikaros in ALL-Zellen hervorhebt.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse primärer B-ALL-Zellen zeigt zudem eine konstitutive Aktivierung von AKT bei ca. 83 % (10/12) der Patienten. Die pharmakologische Intervention des konstitutiv aktivierten PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs mittels eines kombinierten Therapieansatzes mit Hemmstoffen, die gegen AKT, mTOR und die aberrant aktivierte Tyrosinkinase BCR-ABL gerichtet sind, zeigt *in vitro* in SupB-15 B-ALL-Zellen, insbesondere im Vergleich zu den Monotherapien, eine hochsignifikante Hemmung des Wachstums dieser Zellen. Die genauere Analyse des Wachstumsverhalten nach isoformspezifischen Knockdown der drei AKT-Isoformen zeigt darüber hinaus, dass vor allem die Isoformen AKT1 und AKT2 für das Wachstum der ALL-Zellen verantwortlich sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten weisen zusammenfassend auf eine Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 in der Leukämogenese der ALL des Kindesalters hin. Weiterhin gibt diese Arbeit erste Hinweise für eine neue Kombinationstherapie der Philadelphia-Chromosom-positiven B-ALL mit AKT, mTOR- und BCR-ABL-Inhibitoren, die nun in einer präklinischen Studie auf ihre Wirksamkeit getestet werden sollte.

## 2 Einleitung

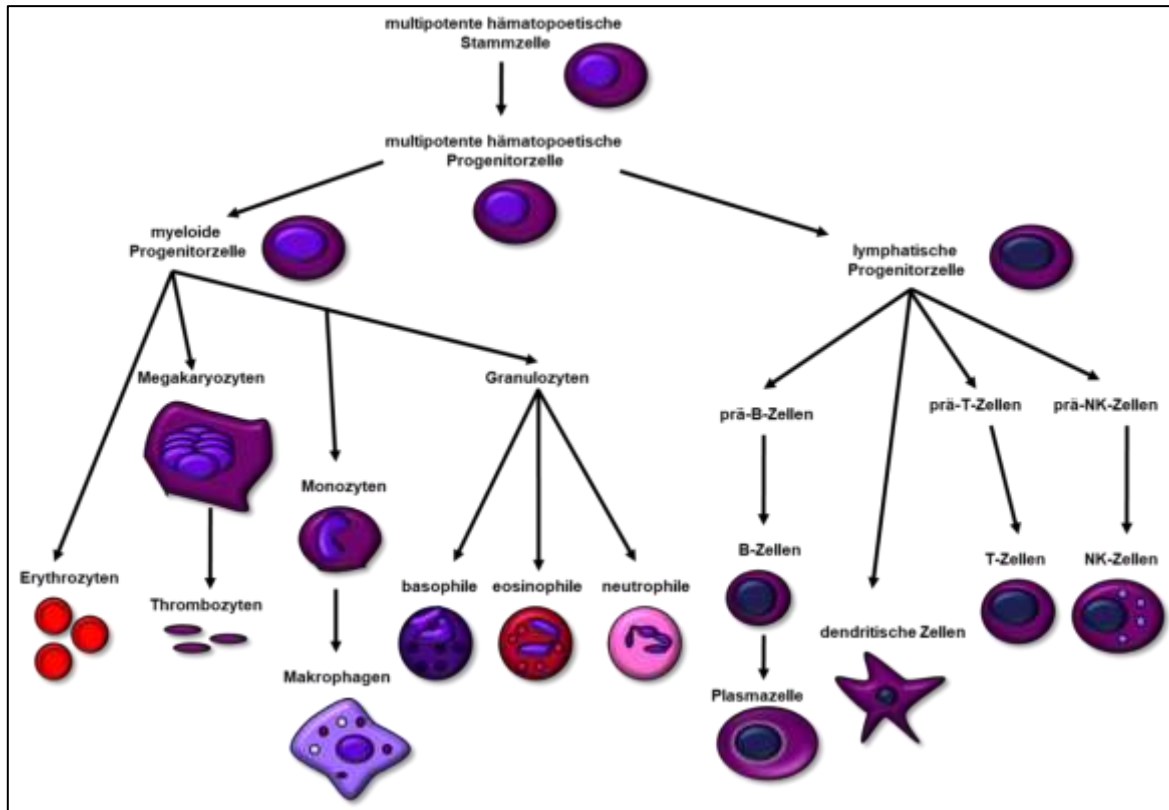
### 2.1 Die Hämatopoese

Die Hämatopoese ist ein elementarer Prozess im menschlichen Körper. Zur Aufrechterhaltung der konstanten Anzahl an Zellen im Blut werden bei einem erwachsenen Menschen täglich ca.  $2 \times 10^{11}$  Erythrozyten und  $10^{10}$  Leukozyten neu gebildet [Rieger und Schröder, 2007]. Die Hämatopoese lässt sich in die Phasen Proliferation, Differenzierung und Reifung einteilen. Dabei werden die Blutzellen im Knochenmark aus einer gemeinsamen hämatopoetischen Stammzelle gebildet [Reya et al., 2001]. Auf diese Weise werden jede Minute Millionen von Zellen im Knochenmark produziert. Somit ist Blut eines der stärksten regenerativen Organe im erwachsenen, menschlichen Organismus [Rieger und Schröder, 2007].

Terminal differenzierte Blutzellen sind oftmals nur wenige Tage lebensfähig [Rieger und Schröder, 2007]. Diese spezialisierten Zellen können damit nicht für die enorme Anzahl an neuen Zellen sorgen. Hämatopoetische Stammzellen hingegen besitzen die Fähigkeit sich sowohl selbst zu erneuern als auch in alle hämatopoetischen Zelltypen auszudifferenzieren [Reya et al., 2001]. Diese Zelltypen unterscheiden sich im späteren Verlauf in ihrem Phänotyp, ihrer Morphologie und ihrer biologischen Funktion [Rieger und Schröder, 2007].

Im ersten Schritt differenzieren sich multipotente Stammzellen zu multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen, die wiederum in die gemeinsamen lymphoiden und die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen differenzieren (Abbildung 1). Während dieser Differenzierung werden die verschiedenen Vorläuferstufen über die Expression von spezifischen Oberflächen-Rezeptoren gekennzeichnet [MClanahan et al., 1993]. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Erythrozyten, die in den Blutgefäßen  $O_2$  und  $CO_2$  transportieren, Thrombozyten produzierende Megakaryozyten, die für die Blutgerinnung wichtig sind, Monozyten, die Vorläufer der Makrophagen sind sowie die Granulozyten. Diese lassen sich in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten unterteilen. Aus der lymphoiden Vorläuferzelle gehen die B-Zellen, die T-Zellen, die dendritischen Zellen und die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) hervor. Die B-Zellen reifen im Knochenmark heran und sind nach Aktivierung für die Antikörperproduktion verantwortlich [Dilosa et al., 1991]. T-Zellen reifen im Thymus heran und sind gemeinsam mit den B-Zellen Teil des adaptiven Immunsystems [O'Garra et al., 2004]. Dabei aktivieren sie die B-Zellen. Die NK-Zellen können virusinfizierte Zellen erkennen und abtöten. Bei dieser schrittweisen Differenzierung der Zellen sowie bei ihrer Proliferation spielen intrazelluläre und interzelluläre Signalmechanismen eine wichtige Rolle [Kim et al., 2014]. So wird die Differenzierung durch verschiedene Zytokine reguliert [Robb, 2007]. Verschiedene Zelltypen wie Makrophagen und Lymphozyten produzieren dabei diese Glykoproteine. Darüber hinaus wird über ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von zellspezifischen Genen reguliert, die für eine Differenzierung, ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen, verantwortlich sind [Orkin, 1995]. Im Gegensatz zu Vorläuferzellen ist die Zahl der Zellteilungen der hämatopoetischen Stammzelle reduziert. Dadurch wird das Risiko gesenkt, im Laufe des Lebens eine Stammzell-Mutation zu erwerben [Rieger und Schröder, 2007]. Diese Mutation könnte einen Einfluss auf alle daraus entstehenden Blutzellen haben und zu einer malignen Erkrankung des blutbildenden Systems führen. Fehlregulationen in der Hämatopoese durch Mutationen in zentralen

Schaltstellen von Signalwegen, beispielsweise durch die Aktivierung von Onkogen-Proteinen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressor-Proteinen, können der Ursprung einer Leukämie-Erkrankung sein.

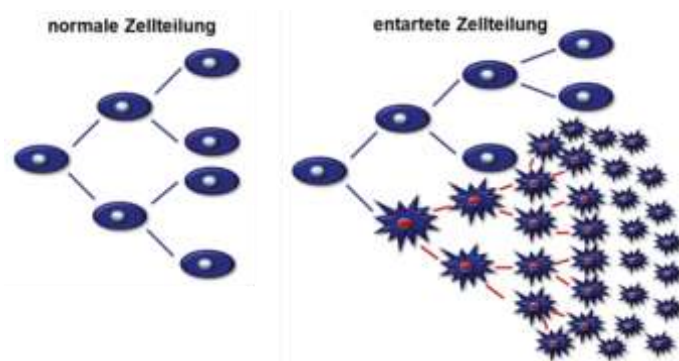


**Abbildung 1: Schema der Hämatopoese.** Aus der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle gehen durch Teilungsvorgänge im Knochenmark die Vorläuferzellen für die lymphoide und die myeloide Linie hervor. Unter dem Einfluss von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren können sich die Zellen weiter teilen und differenzieren. Aus der lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren sich die Zellen zu B-Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen. Aus der myeloiden Vorläuferzelle entstehen im weiteren Verlauf Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten.

## 2.2 Leukämie

Die maligne Erkrankung der Zellen des hämatopoetischen Systems wird als Leukämie beschrieben. Leukämien zeichnen sich durch die unkontrollierte Proliferation von unreifen Leukozyten im myeloischen oder lymphatischen System aus. Aufgrund der Fehlregulation bestimmter Kontroll-Gene wird häufig der normale Reifungsprozess der Leukozyten im Knochenmark oder im Lymphsystem in einem frühen Differenzierungsstadium abgebrochen [Alberich-Jorda et al., 2012]. In der Folge entstehen anstelle von vollständig differenzierten und damit auch funktionsfähigen Leukozyten, nicht vollausgereifte Zellen. Diese sind häufig nicht vollständig funktionsfähig und proliferieren meist unkontrolliert und schnell (Abbildung 2). Dies führt im weiteren Verlauf jedoch dazu, dass diese Zellen zunehmend die normale Hämatopoese im Knochenmark behindern und schließlich verdrängen [Terwilliger und Abdul-Hay, 2017]. Bei der Leukämie handelt es sich um eine Systemerkrankung, so dass es im weiteren Verlauf zu einer starken Vermehrung der leukämischen Zellen im peripheren Blut kommt. Auf diese Weise verteilen sich die Zellen sehr rasch auch in weitere Organe des Organismus. In der Folge sammeln sich die Zellen vorwiegend in den lymphatischen Organen

wie Milz, Thymus und Lymphknoten an und beeinträchtigen die Funktion dieser Organe stark. Anämien, Infektionen und erhöhte Blutungsneigung können die unmittelbare Folge sein [Terwilliger und Abdul-Hay, 2017]. Im weiteren Verlauf kann es auch zum Angriff auf das Zentralnervensystem kommen.



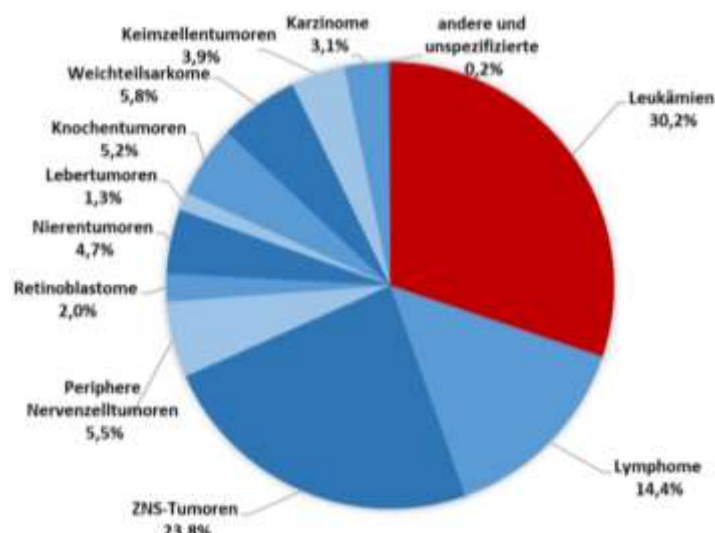
**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entartung von Leukozyten im Knochenmark.** Aufgrund der Fehlregulation bestimmter Kontroll-Gene wird häufig der normale Reifungsprozess der Leukozyten im Knochenmark oder im Lymphsystem in einem frühen Differenzierungsstadium abgebrochen. Diese unreifen Leukozyten proliferieren in der Folge meist unkontrolliert und schnell. Die normale Hämatopoese wird im weiteren Verlauf behindert und schließlich verdrängt.

Für die Entstehung einer Leukämie sind einige Risikofaktoren bekannt. Hierzu gehören chemische Substanzen wie Benzol oder Chemotherapeutika sowie höhere Dosen ionisierender Strahlung [Belson et al., 2007]. Die Einteilung der Leukämien erfolgt zunächst nach dem Zelltyp, von dem sie ausgehen (myeloisch und lymphatisch). Zudem wird nach der Schnelligkeit des Krankheitsverlaufs (akut und chronisch) unterschieden. Die akute Form der Leukämie entwickelt sich sehr schnell und ist für die Patienten mit schweren Krankheitssymptomen verbunden. Unbehandelt führt sie innerhalb von wenigen Monaten zum Tod [Khwaja et al., 2016]. Die chronische Form der Erkrankung kommt hingegen deutlich langsamer zur Ausprägung. Sie bleibt oft über einen längeren Zeitraum unbemerkt und kann so relativ langsam fortschreiten [Blankart et al., 2013]. Die vier häufigsten Formen von Leukämien sind die akute myeloische Leukämie (AML), die chronische myeloische Leukämie (CML), die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die chronische lymphatische Leukämie (CLL). Leukämien machen in Deutschland etwa 2,88 % aller Tumorerkrankungen aus. Es erkranken dabei pro Jahr über 13.000 Menschen an Leukämien [Barnes et al., 2016]. Ungefähr 27,5 Prozent dieser Menschen erkranken an den akuten Formen ALL und AML, etwa 7,5 Prozent an einer CML und etwa 40 Prozent an einer CLL [Robert Koch Institut vom 06.12.2017]. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) betrifft besonders häufig Kinder und junge Erwachsene.

### 2.2.1 Akute lymphatische Leukämie des Kindesalters

Die Leukämie ist mit etwa 30 % die häufigste Krebserkrankung des Kindesalters in Deutschland (Abbildung 3) [Kaatsch et al., 2019]. Die akute lymphatische Leukämie (ALL) macht dabei mit 77 % den größten Anteil der Leukämie-Fälle im Kindes- und Jugendalter aus [Kaatsch et al., 2019]. Zugleich stellt es die häufigste krebsbedingte Todesursache im Kindesalter dar. In den letzten Jahrzehnten konnte die Heilungsrate jedoch durch neue Therapiemöglichkeiten auf über 80 % angehoben werden [Pui et al., 2008]. Insbesondere die Altersgruppe zwischen 1-9 Jahre zeigt die höchste Wahrscheinlichkeit für ein Ansprechen auf die Behandlung. Demgegenüber besitzen Kleinkinder unter einem Jahr nur eine krankheitsfreie 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50 % [Pui et al., 2008].

Bei der ALL wird, in Abhängigkeit des Stadiums des Reifungsarrestes, zwischen zwei Subtypen unterschieden. Dabei handelt es sich zum einen um die T-ALL (15 % der ALL des Kindesalters) und zum anderen um die B-ALL (85 % der ALL des Kindesalters) [Raetz und Teachey, 2016; Mi et al., 2007]. Die B-ALL kann wiederum in pro-B-ALL, *common* B-ALL, prä-B-ALL und reife B-ALL unterteilt werden. Die T-ALL wird in pro- und prä-T-ALL, kortikale/thymische T-ALL und reife T-ALL klassifiziert [Lang et al., 2015; You et al., 2015]. Mithilfe des Oberflächen-Antigenmusters kann auf das Differenzierungsstadium der ALL geschlossen werden. In den leukämischen Zellen sind, wie bei anderen Krebsarten, wesentliche Schlüsselregulationsprozesse beeinträchtigt, so dass die Zelle weitestgehend unabhängig von externen Wachstumssignalen und unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Signalen ist [Hanahan und Weinberg, 2000]. Damit verbunden können die Zellen die Apoptose-Mechanismen umgehen, sich unbegrenzt selbsterneuern und nahezu ungehemmt in andere Organe proliferieren [Hanahan und Weinberg, 2000].



**Abbildung 3: Darstellung der prozentualen Häufigkeiten der unterschiedlichen Krebserkrankungen im Kindesalter.** Leukämien stellen mit über 30 % den größten Anteil der Krebserkrankungen im Kindesalter dar [gemäß Kaatsch et al., 2019].

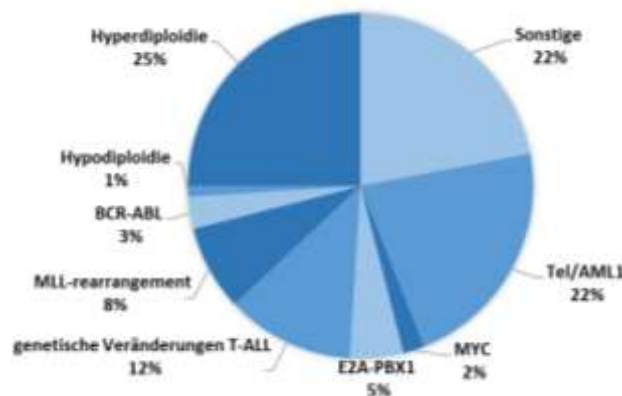
Die akute lymphatische Leukämie (ALL) des Kindesalters kann häufig auf einen präleukämischen Klon mit einer pränatalen genetischen Läsion zurückgeführt werden [Wiemels et al., 1999; Greaves und Wiemels, 2003]. Jedoch entwickeln weniger als 1 % der Neugeborenen, die eine solche genetische Läsion tragen, eine ALL [Mori et al., 2002]. Postnatal können präleukämische Klone zusätzlich sekundäre Mutationen erwerben und sich dann zu einer offenen Leukämie entwickeln [Bateman et al., 2010]. Insbesondere wiederkehrende, chronische Infektionen im Kindesalter können zu langwierigen und übermäßigen Immunantworten mit erheblichen Begleitschäden führen und das Risiko für den Erwerb einer postnatalen genetischen Läsion erhöhen [Greaves, 2006]. Vor allem veränderte Zytokin-Umgebungen im Zusammenhang mit abnormalen Immunantworten, aufgrund einer Infektion, können vermehrt normale prä-B-Zellklone aus dem Repertoire eliminieren und das selektive Auswachsen von prä-B-Zellklonen begünstigen, die bereits eine präleukämische genetische Läsion aufweisen. So zeigen Tel/AML1 induzierbare B-Vorläuferzellen eine langsamere Proliferation als ihre nicht-induzierten Gegenstücke, sind darüber hinaus jedoch resistenter

gegen eine Hemmung der Proliferation durch TGF $\beta$  [Ford et al., 2009]. Somit wird die kompetitive Expansion von Tel/AML1-exprimierenden Zellen in Gegenwart von TGF-beta erleichtert. Weiterhin kann gezeigt werden, dass Impfprogramme in der frühen Kindheit die Inzidenz einer ALL verringern kann [Auvinen et al., 2000; Groves et al., 2001; Ma et al., 2005]. Außerdem erhöht eine verringerte Exposition gegenüber Infektionen in den ersten Lebensmonaten das Risiko für die Entwicklung einer akuten lymphoblastischen Leukämie [Gilham et al., 2005].

Die Grundlage für diese aberranten Veränderungen bilden zyto- und molekular-genetische Mechanismen wie chromosomale Translokationen, numerische Chromosomenaberrationen und eine aberrante Expression von Onkogen- und Tumorsuppressor-Proteinen.

### 2.2.2 Pathogenese akuter Leukämien

Zu den wichtigsten genetischen Aberrationen, die ursächlich an der Entstehung einer B-ALL beteiligt sind, gehören unter anderem chromosomale Translokationen. Für die ALL sind mehr als 30 verschiedene, nicht zufällig auftretende, Translokationen bekannt [Faderl et al., 1998]. Bei diesen Translokationen können chimäre Fusionsproteine entstehen, die häufig eine Kinase oder einen Transkriptionsfaktor einschließen [Mullighan, 2012]. In der Folge führen diese Fusionsproteine zu einer aberranten Signalweiterleitung (aktivierte Kinase) respektive einer fehlregulierten Transkription. Zu den bekannten Translokationen der ALL werden die Tel/AML1-Translokation t(12;21), die BCR-ABL-Translokation t(9;22), die E2A-PBX1-Translokation t(1;19) und verschiedene Translokationen des MLL-Gens gezählt (Abbildung 4) [Mullighan, 2012].

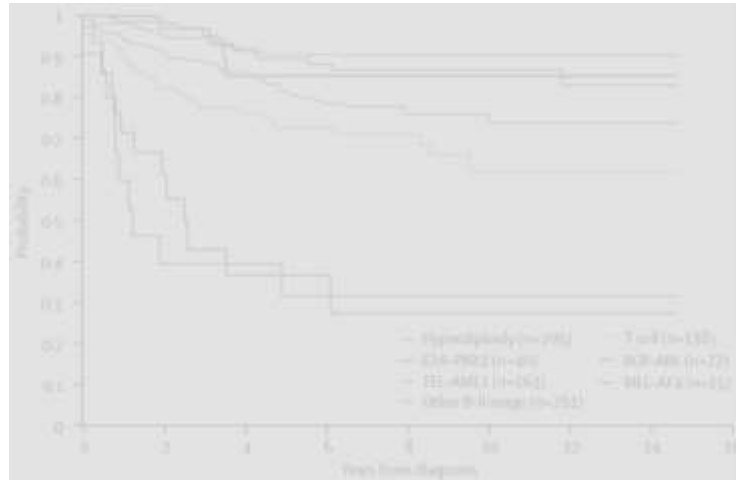


**Abbildung 4:** Darstellung der prozentualen Häufigkeiten von genetischen Veränderungen in der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters [gemäß Pui et al., 2004].

Des Weiteren spielen numerische Chromosomenaberrationen wie Hyperdiploidie (>50 Chromosomen) und Hypodiploidie (<46 Chromosomen) eine wichtige Rolle [Pui et al., 2004]. Im Gesamtbild dieser chromosomalen Veränderungen werden die Gruppen der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph<sup>+</sup>) B-ALL und der MLL-AF4-positiven B-ALL mit der schlechtesten Prognose aller Typen der ALL eingestuft (Abbildung 5) [Pui et al., 2008].

Für die Entstehung einer Leukämieerkrankung bildet, neben einer chromosomalen Aberration, zudem häufig der Erwerb von weiteren Mutationen die Grundlage [Mullighan, 2012]. So ist mit einer MLL-Translokation häufig (10-20 %) eine Mutation im FLT3- (*fms-like tyrosine*

*kinase 3*) Gen verbunden [Armstrong et al., 2003]. Zudem wird Flt3 verstärkt in Zellen mit MLL-Translokationen exprimiert [Stam et al., 2005].



**Abbildung 5: Kaplan-Meier-Analyse des ereignisfreien Überlebens nach biologischem Subtyp der Leukämie.** Die Translokationen BCR-ABL und MLL-AF4 stellen Hochrisikogruppen mit schlechter Prognose innerhalb der B-ALL dar [entnommen aus Pui et al., 2008].

Für eine zielgerichtete Therapie der ALL kommen aufgrund von nachgewiesenen Mutationen, welche auf einige zentrale Vertreter beschränkt bleiben, einige Proteine als potentielle Zielstrukturen in Frage. Hierbei sind u.a. Mutationen der Rezeptor-Tyrosinkinasen Flt3, EGFR, FGFR (2 und 3) und PDGFR $\beta$  zu nennen [Fransecky et al., 2015]. Außerdem sind vielfach Mutationen in RAS (NRAS und KRAS) als auch in der MAPK identifiziert worden [Zhang et al., 2011a; Roberts et al., 2012]. Darüber hinaus sind auch Mutationen in Komponenten der Zytokin-Signaltransduktion, wie des IL7 Rezeptors in B- und T-Vorläufer-Leukämien identifiziert worden [Shochat et al., 2011]. Außerdem kommt es zur Translokation und Überexpression des Zytokin-Rezeptors CRLF2 in der B-Vorläufer ALL [Shochat et al., 2011; Zhang et al., 2011a, Roberts et al., 2012]. Des Weiteren sind auch Mutationen für die Janus Kinasen (JAK1, 2 und 3) beschrieben, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zytokin-Signaltransduktion spielen [Mullighan et al., 2009b].

In Bezug auf den PI3K/AKT-Signalweg können für die T-ALL sowohl Mutationen von AKT (Isoform 1) als auch von PTEN identifiziert werden [Fransecky et al., 2015]. Notch1 ist eines der häufigsten mutierten Gene in der pädiatrischen T-ALL mit einer Häufigkeit von 50 % [Girardi et al., 2017]. Es ist zudem bekannt, dass der Rezeptor Notch1 auch an der Herunterregulierung von PTEN beteiligt ist [Palomero et al., 2007]. Daneben sind eine Reihe von Mutationen in Genen wie PAX5 (~50 % Ph<sup>+</sup> B-ALL), IKZF1 (~83 % Ph<sup>+</sup> B-ALL) und EBF-1 (~14 % Ph<sup>+</sup> B-ALL) bekannt, die an der Regulation der Genexpression während der Lymphopoese beteiligt sind [Zhang et al., 2011a; Jarquin et al., 2013; Bernt und Hunger, 2014].

### 2.2.3 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Die Behandlung der ALL erfolgt mittels Chemotherapie. Diese besteht aus mehreren Phasen, die wiederum in Zyklen unterteilt werden. Vor dem Beginn einer Chemotherapie erfolgt eine



ausführliche Diagnostik. Dabei findet eine tiefergehende genetische und immunzytologische Charakterisierung der ALL statt. Aufgrund der großen genetischen und immunzytologischen Heterogenität der ALL gibt es inzwischen eine Subgruppen-spezifische Therapie. Insbesondere die Identifizierung von Risikofaktoren führt zur Einteilung in Hochrisiko-Patientengruppen mit einer risikoadaptierten Behandlung. Diese Gruppen weisen vor allem ein höheres Rückfallrisiko auf. Bei den etablierten Risikofaktoren handelt es sich um den Nachweis des BCR-ABL-Fusionsgens, eine hohe Leukozytenzahl bei Diagnosestellung, ein verzögertes Ansprechen auf die Therapie, den Nachweis eines MLL-Fusionsgens, das Patientenalter, den Befall des Zentralnervensystems und den Immunphänotyp der T-ALL [Pui et al., 2008; Gökbuget et al., 2012; Gökbuget, 2017]. Verschiedene prospektive, multizentrische Therapiestudien (CoALL und ALL-BFM) tragen in Deutschland zur Verbesserung der Behandlungsprotokolle und somit der Prognose der ALL des Kindesalters bei. Derzeit liegt die ereignisfreie 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei ALL-Patienten des Kindesalters bei über 80 % [Pui et al., 2008]. Die Chemotherapie erfolgt durch Gabe von verschiedenen Zytostatika in unterschiedlichen Kombinationen, um die antileukämische Wirkung zu verstärken und eine Resistenzentwicklung zu vermeiden. Die Behandlung umfasst in der Regel mindesten 12 bis 24 Monate. Die Behandlung beginnt mit einer zytoreduktiven Vorphase. Nach einer Induktionstherapie folgt eine Konsolidierungstherapie, eine Re-Induktionstherapie und eine Erhaltungstherapie. Die Stratifizierung in Niedrig- oder Hochrisiko-Gruppe, gemäß prognostischen Risikofaktoren, erfolgt zeitlich nach der Diagnosestellung und nach der Induktionstherapie (Abbildung 6) [Escherich et al., 2013].

In der Vortherapie sollen die Leukämiezellen stufenweise und schonend reduziert werden. Hierzu wird der Patient eine Woche mit einem Zytostatikum und einem Steroid behandelt. Bei der Induktionstherapie wird an genau festgelegten Zeitpunkten des Behandlungsablaufes dem Patienten definierte Dosierungen der Zytostatika (Vincristin, Prednison/Kortikosteroid, Doxorubicin, Asparaginase, Cyclophosphamid) appliziert.

Die Induktionstherapie besteht aus zwei Phasen und dauert ca. 7 Wochen [Gökbuget et al., 2016]. Dabei soll innerhalb kurzer Zeit eine komplette Remission erzielt werden und sich die normale Blutbildung erholen [Terwilliger und Abdul-Hay, 2017]. Dies entspricht einem Anteil an Leukämiezellen im Knochenmark von unter 5 %. Die Behandlung ist zudem intensiv, da eine Resistenzentwicklung der Leukämiezellen vermieden werden soll. Nach jeder der beiden Phasen erfolgt entsprechend eine Knochenmarkuntersuchung. Diese Therapiephase geht mit einem erhöhten Risiko für Nebenwirkungen und Komplikationen einher. Es besteht eine erhöhte Gefahr von Infektionen.

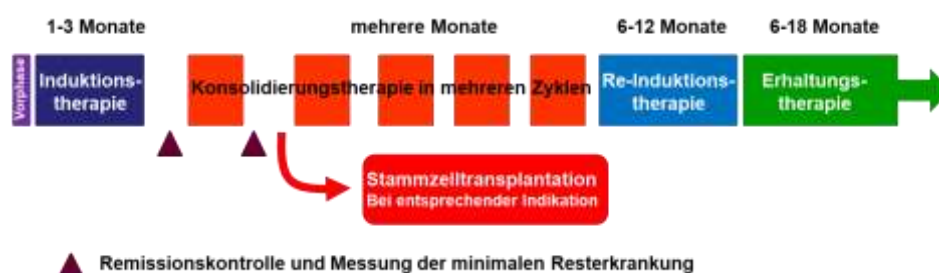
Die Konsolidierungstherapie hat das Ziel die verbleibenden Leukämiezellen, die Ausgangspunkt für einen Rückfall sein könnten, zu vernichten und dadurch das Risiko eines Rezidivs zu reduzieren [Cooper und Brown, 2015]. Es ist eine Intensivierungsphase mit einer höheren Zytostatika-Dosierung sowie einer anderen Medikamentenkombination (Methotrexat, Cyclophosphamid, Cytarabin, Asparaginase, 6-Mercaptopurin). Die Therapie besteht aus mehreren kürzeren Blöcken, zwischen denen Erholungsphasen von ca. drei Wochen liegen. Sollte nach der Konsolidierungstherapie noch eine minimale Resterkrankung nachweisbar sein, muss über eine Änderung und Intensivierung der Therapie und einer anschließenden Stammzelltransplantation nachgedacht werden. Das Rückfallrisiko ist andernfalls ausgesprochen hoch [Gökbuget et al., 2012, Gökbuget, 2017].

An die Konsolidierungstherapie schließt sich die Re-Induktionstherapie an. Die Behandlung wird vergleichbar mit der Induktionstherapie erneut intensiviert (s. Induktion, Adriamycin, Daunorubicin). Zusammen mit der Induktions- und Konsolidierungstherapie bildet die Re-Induktionstherapie die Intensivphase der Behandlung. Die Gesamtdauer der Intensivphase ist abhängig von den Risikofaktoren und dem Verlauf der Behandlung des Patienten [Gökbuget, 2017]. Die Erhaltungstherapie beläuft sich auf ca. 6-18 Monate [Gökbuget et al., 2016]. Die Chemotherapie (Methotrexat, 6-Mercaptopurin) erfolgt täglich über die orale Aufnahme einer Tablette als auch wöchentlich über ein intravenöses Medikament. Zudem wird regelmäßig das Blutbild und das Knochenmark analysiert.

Hochrisiko-Patienten erhalten, wenn möglich, nach der ersten Phase der Konsolidierungstherapie eine Stammzelltransplantation [Gökbuget et al., 2016]. Die Therapie wird beendet und das Knochenmark in regelmäßigen Abständen untersucht. Hochrisiko-Patienten mit Ph-positiver ALL werden zudem von Beginn der Therapie an, zusätzlich mit dem Medikament Glivec (Imatinib) behandelt. Der Kinase-Inhibitor wird dabei in Kombination mit den herkömmlichen Zytostatika verabreicht. Nach der Transplantation wird zudem geprüft, ob Glivec erneut appliziert werden muss.

Obwohl die Therapie der ALL in den letzten Jahrzehnten insbesondere durch Optimierung der Kombinationstherapie verbessert werden konnte und die Heilungschancen heute bei über 80 % liegen, ist die Prognose für einen signifikanten Anteil der Patienten immer noch ausgesprochen negativ [Pui et al., 2011]. Vor allem Therapie-begleitende Nebenwirkungen sowie das Auftreten von sekundären Tumoren, die auf die intensive Gabe von Chemotherapeutika zurückzuführen sind, führen zu erheblichen Einschränkungen in der Qualität und der Dauer des Lebens des Patienten. Unter den überlebenden Patienten liegt die kumulative Inzidenz chronischer Erkrankungen 30 Jahre nach der Diagnosestellung bei 73,4 % [Oeffinger et al., 2006]. Die möglichen Spätfolgen betreffen meist Lungenschäden, Nierenschäden, Herzerkrankungen, hormonelle und kognitive Störungen [Langer et al., 2002].

Zytostatika sind besonders sensitiv gegenüber sich schnell vermehrenden Zellen. Sie wirken daher besonders gegen Leukämiezellen, jedoch auch Epithelzellen. Umso wichtiger sind somit molekular gezielte Therapiestrategien gegen fehlregulierte Signalproteine.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Therapie der ALL.** Die Behandlung der ALL erfolgt mittels Chemotherapie und besteht aus mehreren Phasen und Zyklen. Die Stratifizierung der Therapie erfolgt in Abhängigkeit von prognostischen Risikofaktoren. Die Therapie beinhaltet die Vorphase, die Induktionstherapie, die Konsolidierungstherapie, die Re-Induktionstherapie sowie die Erhaltungstherapie. Nach der Induktionstherapie und nach dem ersten Zyklus der Konsolidierungstherapie erfolgt die Remissionskontrolle und die Messung der minimalen Resterkrankung. Im weiteren Verlauf wird diese wiederholt kontrolliert. Zusätzlich kann bei entsprechender Indikation eine Bestrahlung des Zentralnervensystems erfolgen. In bestimmten Fällen kann eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation notwendig sein [modifiziert nach Gökbuget et al., 2016].

## 2.3 Signaltransduktion in hämatopoetischen Zellen

Die Zelle unterliegt dem Einfluss ihrer Umwelt, die einen ständigen Wandel erfährt. Um ihr Überleben zu sichern muss sich die Zelle an diese Bedingungen anpassen. Dabei wird die zelleigene Regulation des Metabolismus direkt durch Umweltfaktoren, wie dem Nahrungsangebot, der Temperatur und dem pH-Wert beeinflusst. Auf Veränderungen reagiert die Zelle mit der Aktivierung spezifischer Rezeptoren und Signalwege [Uings und Farrow, 2000]. Der Anteil von Proteinen dieser Signalnetzwerke macht im menschlichen Genom mehr als 20 % aus [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Dazu zählen unter anderem Rezeptoren, Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren. In hämatopoetischen Zellen wird die Signaltransduktion vor allem durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren beeinflusst.

Diese Zytokine werden für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Zellen benötigt [Schölmerich, 2003]. Insbesondere die Steuerung der Differenzierung ausgehend von der Stammzelle in die unterschiedlichen Reifestadien der hämatopoetischen Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Hämatopoese. Dementsprechend werden die Zytokin-Rezeptoren zelllinienspezifisch und reifegradabhängig exprimiert. Eine extrazelluläre Information wird so über die Zellmembran in das Zellinnere vermittelt und über eine interne Signalweiterleitung in eine zelluläre Antwort umgesetzt. Diese zelluläre Antwort kann auf unterschiedlich Art und Weise ausfallen. Es kann zur Aktivierung eines Transkriptionsfaktors führen, der die Transkription eines spezifischen Gens reguliert oder die Aktivierung eines zytosolischen Enzyms steuern [Grafone et al., 2012]. Die Interaktion aller dieser Proteine stellt ein hoch komplexes Netzwerk dar, welches bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig charakterisiert ist. Defekte wie Mutationen oder Translokationen, die zu einem Ausfall einer reprimierenden Komponente oder zu einer dauerhaften Aktivierung einer Komponente in diesem Netzwerk führt, können ein Grund für eine onkogene Transformation dieser Zellen darstellen.

### Signaltransduktion durch Tyrosinkinasen

Eine häufig auftretende Art der Signaltransduktion ist das Resultat von Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsvorgängen an Molekülen [Graves und Krebs, 1999].

Nach Aktivierung des Rezeptors werden die Signalproteine durch Proteinkinasen phosphoryliert. Sowohl der aktivierte Rezeptor als auch zytoplasmatische Proteinkinasen sind dann in der Lage Phosphatgruppen von ATP an die Hydroxy-Gruppen von Aminosäuren der Ziel-Proteine zu übertragen [Dyguda et al., 2004]. Die Gene, die für Proteinkinasen codieren, machen etwa 2 % des gesamten menschlichen Genoms aus [Manning et al., 2002]. Damit liegt die Zahl der verschiedenen Proteinkinasen bei über 500 Kinasen [Blume-Jensen und Hunter, 2001]. Je nach Spezifität werden die Proteinkinasen in Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen eingeteilt. Die Tyrosinkinasen werden wiederum in Rezeptor-Tyrosinkinasen und nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen unterteilt. Durch die Phosphorylierung von anderen Proteinen kann sowohl die Enzymaktivität dieses Proteins, seine subzelluläre Lokalisation als auch seine Bindung an andere regulatorische Elemente anderer Proteine oder auch der proteasomale Abbau reguliert werden [Zhang et al., 2010; Elong Edimo et al., 2011; Sattler et al., 2001;

Ruschmann et al., 2010]. Somit stellt der Phosphorylierungsvorgang einen wichtigen post-translationalen Kontrollmechanismus in der Signaltransduktion der Zelle dar. Ein Großteil dieser Proteinkinasen spielt aufgrund einer Fehlregulation eine Rolle als Onkogen bei humanen Tumorerkrankungen [Blume-Jensen und Hunter, 2001].

Die konstitutive Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen aufgrund von Mutationen oder Translokationen kann folglich zu einer dauerhaften Aktivierung von verschiedenen zellulären Signalkaskaden führen [Cheng et al., 2018]. Die wichtigsten Signalwege, die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden, sind der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg, der PI3K/AKT-Signalweg und der MAPK/JNK-Signalweg [Grafone et al., 2012]. Bei Leukämien ist in der Regel mindestens einer dieser Signaltransduktionswege konstitutiv aktiviert [Krauss, 2008].

Da den RTK-initiierten Signalwegen wichtige Funktionen bei der Proliferation und Differenzierung zukommen, wird die Regulation dieser Signalwege durch verschiedene Rückkopplungs-Mechanismen sorgsam gesteuert [Fransecky et al., 2015]. Die Deaktivierung dieser Signalwege ist daher von großer Bedeutung. Am Ende der Signalweiterleitung wird daher in der Regel der Abbau von zentralen Proteinen eingeleitet oder über Transkriptionsfaktoren die Genexpression reguliert [Listovsky et al., 2004; Fan und Lu, 2016]. Zudem kann über die Aktivierung von Phosphatasen die Proteinphosphorylierung von Kinasen durch Dephosphorylierung beendet und die Signalweiterleitung damit terminiert werden [Frank et al., 2004]. Ein Beispiel für eine typische Kinase ist die Src-Kinase. Die Phosphorylierung und Aktivierung dieser Kinase durch den Rezeptor führt in der Folge dazu, dass Src weitere Proteine phosphorylieren kann und somit verschiedene Signalwege aktivieren kann [Song et al., 2010; Moon et al., 2002].

### **Src-Kinase-Familie**

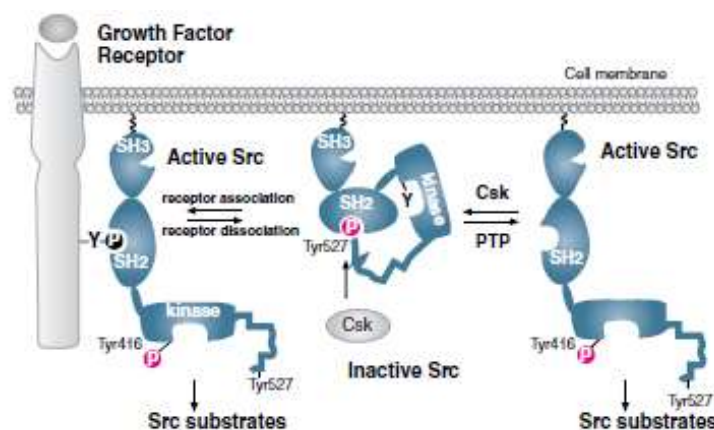
Die Src-Kinase-Familie gehört zu den nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Zu der Src-Kinase-Familie gehören neben Src auch Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk und Yes [Oneyama et al., 2009]. c-Src stellt dabei eines der bestuntersuchteten Protoonkogene dar. Alle Mitglieder weisen eine hochkonservierte Domänenstruktur auf und werden durch vergleichbare Mechanismen aktiviert und reguliert [Boggon und Eck, 2004; Bolen, 1993; Fajer et al., 2017].

Hierzu besitzen die Mitglieder vier SH-Domänen und einen C-terminalen Schwanz. N-Terminal befindet sich die SH4-Domäne. Sie stellt die divergenteste Domäne innerhalb der Src-Kinase-Familie dar. Die SH4-Domäne beinhaltet eine Myristoylierungsstelle und eine Palmitoylierungsstelle [Resh, 1999; Koegl et al., 1994]. Erstere findet sich bei allen Mitgliedern, wohingegen die Palmitoylierungsstelle nicht bei Src und Blk zu finden ist. Diese Stellen dienen der Bindung an die Plasmamembran und die Cholesterol-angereicherten mikro-Domänen der Membran (Lipid-Raft) [Resh, 1999]. Für die Interaktion mit anderen Proteinen dienen die SH2- und SH3-Domänen. Durch die Interaktion mit anderen Proteinen kann die Src-Kinase entweder direkt aktiviert werden oder zum Ort der Aktivierung transportiert werden [Shvartsman et al., 2007; Chong et al., 2005]. Die Aktivierung und Inaktivierung von Src kann durch die Kontrolle des Phosphorylierungsstatus reguliert werden (Abbildung 7). Innerhalb der Kinase-Domäne befindet sich das Phosphotyrosin Y419, welches für die vollständige Aktivierung notwendig ist [Xu et al., 1999]. Der C-terminale Schwanz beinhaltet

demgegenüber das Phosphotyrosin Y530, welches für die Inaktivierung verantwortlich ist [Roskoski, 2005].

Die Phosphorylierung der Src-Kinase am Tyrosin-Rest 530 führt zur Stabilisierung der Kinase in einer inaktiven, geschlossenen Konformation. Dabei bindet die SH2-Domäne der Kinase an das Phosphotyrosin Y530 [Meng und Roux, 2014]. Darüber hinaus wird die inaktive Konformation durch die intramolekulare Interaktion der SH3-Domäne mit dem SH2-Kinase-Linker gefestigt [Meng und Roux, 2014]. Das Y419 ist für eine Phosphorylierung damit unzugänglich. Die Phosphorylierung und Inaktivierung der Kinase am Tyrosin-Rest 530 erfolgt durch CSK [Howell und Cooper, 1994]. Die Rekrutierung von CSK vom Zytoplasma an die Plasmamembran erfolgt über Cbp/PAG1 [Okada, 2012]. Dies geschieht infolge der Phosphorylierung von Cbp durch die aktivierte Src-Kinase. Csk kann daraufhin mit seiner SH2-Domäne an das Phosphotyrosin Y314 von Cbp binden und aufgrund der räumlichen Nähe die Src-Kinase am Tyrosin-Rest 530 phosphorylieren [Okada, 2012].

Die Dephosphorylierung des Tyrosin-Restes 530 führt zu einer Konformationsänderung, wodurch alle inhibitorischen intramolekularen Interaktionen freigegeben werden und die Kinase aktiviert wird [Bjorge et al., 2000]. Die Dephosphorylierung der Kinase am Tyrosin-Rest 530 erfolgt durch die Proteinphosphatase- $\alpha$  (PTP- $\alpha$ ) [Pallen, 2003]. Die aktivierte Kinase katalysiert daraufhin die Autophosphorylierung am Tyrosin-Rest 419 [Roskoski, 2005]. Die Kinase kann ebenfalls durch verschiedene RTK aktiviert werden [Robinson et al., 2005]. Dabei bindet die Src-Kinase mit der SH2-Domäne an das Phosphotyrosin der RTK [Leischner et al., 2012]. Die Interaktion mit der RTK führt wiederum dazu, dass die intramolekulare Interaktion zwischen der SH2-Domäne und dem C-terminalen Schwanz freigegeben wird. In der Folge liegt die Kinase in einer offenen Konformation vor. Die Aktivierung der Src-Kinase wird somit durch RTKs gefördert. Unter normalen Bedingungen befindet sich die Src-Kinase in einem inaktiven Zustand. Erst durch besondere Einflüsse von außen wechselt sie in ihren aktiven Zustand. Die Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsereignisse müssen deshalb fein ausbalanciert sein, da es ansonsten durch den Anstieg der Kinaseaktivität zu drastischen Folgen kommen kann.



**Abbildung 7: Aktivierung und Inaktivierung der Src-Kinase-Familie.** Die vollständige Aktivierung der an der Membran- (SH3) und Rezeptor- (SH2) gebundenen Src-Kinase erfordert die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 416 (entspricht dem humanen Y419). Der Tyrosin-Rest 416 kann phosphoryliert werden, wenn die Src-Kinase in einer offenen Struktur vorliegt und damit hemmende intramolekulare Wechselwirkungen aufgehoben sind. In der Folge können die Substrate der Src-Kinase phosphoryliert werden. Die inaktive, geschlossene Konformation der Src-Kinase resultiert aus der Phosphorylierung des C-Terminal gelegenen Tyrosin-Restes 527 (entspricht dem humanen Y530) durch Csk. Der Tyrosin-Rest 527 bindet an die SH2-Domäne und die Src-Kinase dissoziiert von dem Rezeptor [entnommen von [www.cellsignal.de](http://www.cellsignal.de) am 18.06.16].

## 2.4 Der PI3K/AKT-Signalweg

Über Phosphatreste können wichtige biochemische Mechanismen reguliert werden. Neben Proteinen können jedoch auch Inositolphosphate und Phosphatidylinositolphosphate (Phosphoinositide) als Signalmoleküle dienen und entsprechend durch Phosphorylierung reguliert werden [De Luca et al., 2012]. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) nehmen eine besondere Rolle im Phosphoinositidstoffwechsel der Zelle ein. Sie katalysieren die Addition eines Phosphats spezifisch an die 3'-OH-Gruppe des Inositolrings [Huang et al., 2011]. Folglich entstehen D3-Phosphoinositide. Das heterodimere Enzym setzt sich prinzipiell aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit zusammen [Jean und Kiger, 2014].

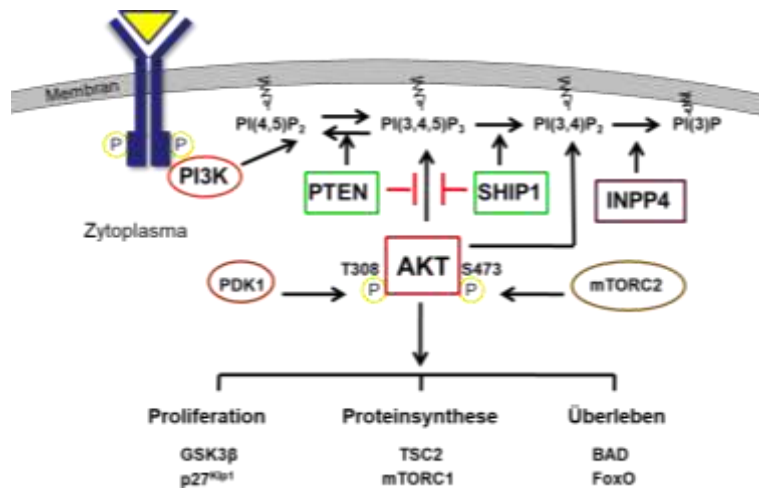
Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Differenzierung, das Überleben und die Apoptose der Zelle [Yu und Cui, 2016]. Infolge der Bindung von Liganden an die RTK findet die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) nach Rekrutierung an die Plasmamembran statt. Die Interaktion mit den Phosphotyrosinresten der Rezeptoren erfolgt über die SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase [Wagener und Müller, 2010]. An der Plasmamembran ist ebenfalls das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) lokalisiert, welches ein wichtiges Substrat der PI3-Kinase ist.  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  ist über zwei Fettsäuren in der Lipidschicht der Membran verankert. Aufgrund der Bindung der PI3-Kinase an das Phosphotyrosin des Rezeptors kommt es zur Konformationsänderung und zur Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit der PI3K [Thorpe et al., 2017]. Die p110-Untereinheit setzt im Folgenden das  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  um. Das  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  ist ein sehr wichtiger Botenstoff im PI3K/AKT-Signalweg. Die Rekrutierung und Bindung von Signalproteinen mit Lipid-bindenden PH- (*pleckstrin homology*) Domänen erfolgt daraufhin an das gebildete  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  (Abbildung 8) [Krauss, 2008].

Ein Protein, welches mit seiner N-terminalen PH-Domäne am  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  binden kann, ist die Serin/Threonin-Kinase AKT. Infolge der Bindung von AKT an die Membran kommt es zur Konformationsänderung, wodurch AKT durch PDK-1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) am Threonin-Rest 308 und mTORC2 am Serin-Rest 473 phosphoryliert und somit aktiviert wird [Memmott und Dennis, 2009]. Durch die Aktivierung ist AKT in der Lage, zahlreiche weitere Substrate zu phosphorylieren und aktivieren. AKT werden dabei mehrere Eigenschaften zugeschrieben, die für die Entstehung von malignen Krankheiten von Bedeutung sind. So fördert AKT durch Phosphorylierung und Inhibierung von Bad das Zellüberleben [Datta et al., 1997]. Zum anderen fördert AKT die Proliferation, indem es die Glykogen-Synthase-Kinase  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert und damit inaktiviert [Cross et al., 1995]. Des Weiteren fördert AKT die Proteinsynthese über die Aktivierung von mTORC1 (*mammalian target of rapamycin, complex 1*) [Inoki et al., 2002]. Die Aktivierung von AKT kann jedoch durch die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) unterbunden werden. Dabei hydrolysiert PTEN die Rückreaktion von  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  [Chalhoub und Baker, 2009]. Negativ reguliert wird dieser Signalweg ebenfalls durch SHIP1 und SHIP2. Beide hydrolysieren die Reaktion von  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  [Edimo et al., 2012].

Über  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  wird es Proteinen mit PH-Domäne wie PDK1, AKT und Tec-Kinasen ermöglicht, an die Membran zu rekrutieren. Adapterproteine mit PH-Domäne (GABs, SKAPs, Bam32 und TAPP) können ebenfalls an die Phosphoinositide binden [Zhang et al., 2009]. Die

neuesten Erkenntnisse weisen darauf hin, dass in einigen Zellen AKT effizienter an das  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ , als an das  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  rekrutiert werden kann [Franke et al., 1997; Ma et al., 2008]. Insbesondere in Abwesenheit von Adapterproteinen wie TAPP ist das  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  verfügbar, um die AKT-Rekrutierung zu fördern [Wullschleger et al., 2011].  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  wird durch INPP4B zum  $\text{PI}(3)\text{P}$  dephosphoryliert [Ivetac et al., 2009]. Möglicherweise könnten sowohl  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  als auch  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  für die vollständige Aktivierung von AKT von Bedeutung sein [Ma et al., 2008].  $\text{PLC}\gamma$  wandelt im weiteren Verlauf  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zu DAG und  $\text{I}(1,4,5)\text{P}_3$  um.

Eine Veränderung der Zusammensetzung oder eine Mutation der Komponenten des Signalweges können folglich bei der Entstehung einer malignen Erkrankung eine Rolle spielen. Die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalweges und seiner Regulation durch Phosphatasen wird dadurch hervorgehoben, dass PTEN eines der häufigsten mutierten Gene in Tumoren ist [Cantley und Neel, 1999].



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des PI3K/AKT-Signalwegs.** Nach Stimulation von Rezeptoren mit intrinsischer oder assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität (RTK) kommt es zur Rekrutierung der PI3-Kinase (PI3K) an die Plasmamembran. PI3K phosphoryliert sein Substrat  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ , woraufhin die Serin/Threonin-Kinase AKT mit ihrer PH-Domäne an die Membran bindet. Die Phosphatasen PTEN und SHIP1 fungieren als negative Regulatoren des Signalwegs. PTEN dephosphoryliert  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  und SHIP1 dephosphoryliert  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ . Die Rekrutierung von AKT kann sowohl an das  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  als auch an das  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  erfolgen.  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  wird durch INPP4B zum  $\text{PI}(3)\text{P}$  dephosphoryliert. AKT wird am Threonin-Rest 308 durch PDK-1 und am Serin-Rest 473 durch mTORC2 phosphoryliert und dadurch aktiviert. AKT phosphoryliert mehr als hundert Substrate und reguliert in der Folge zahlreiche Funktionen der Zelle wie die Proliferation, die Proteinsynthese und das Überleben [modifiziert nach Brauer, 2011].

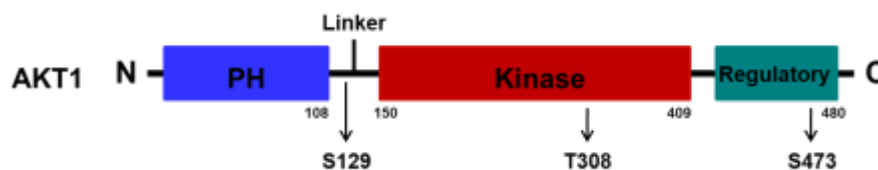
Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist für eine zielgerichtete Therapie der ALL von besonderem Interesse. So kann eine konstitutive Aktivierung von AKT bei 87 % (21/24) von Patienten mit einer T-ALL sowie bei 100 % (21/21) von Patienten mit einer B-ALL nachgewiesen werden [Silva et al., 2008, Gomes et al., 2014]. Die konstitutive Aktivierung des AKT-Signalwegs beeinflusst das Ansprechen auf therapeutische Behandlungen negativ, korreliert mit einer Arzneimittelresistenz und geht mit einer schlechten Prognose für die ALL-Patienten einher [Morishita et al., 2012; Martelli et al., 2012]. Mutationen in der PI3K besitzen ein leukämisches Potential [Horn et al., 2008]. Darüber hinaus spielt der AKT/mTOR-Signalweg funktionell eine wichtige Rolle bei der Progression und für das Überleben von T-ALL-Klonen [Blackburn et al., 2014].

### 2.4.1 Proteinkinase B / AKT

Die Proteinkinase B (AKT) gehört zu der Superfamilie der AGC-Kinasen (*cAMP dependent protein kinase A/G/C*), zu denen unter anderem auch die Proteinkinase A und C gezählt werden. AKT wurde als virales Onkogen des transformierenden Retrovirus AKT8 [Bellacosa et al., 1991; Staal, 1987] und als Homolog der PKA und PKC [Jones et al., 1991] identifiziert. In Säugetierzellen wurden drei AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 identifiziert, die von drei unterschiedlichen Genen codiert werden [Gonzalez und McGraw, 2009].

Die AKT-Isoformen weisen eine starke Sequenzhomologie auf (~ 85 %) und besitzen eine konservierte Domänenstruktur (Abbildung 9) [Barnett et al., 2005]. Sie besitzen eine N-terminale PH-Domäne, eine zentrale Kinase-Domäne und eine C-terminale hydrophobe Domäne mit regulatorischer Funktion. Innerhalb der Kinase-Domäne befindet sich ein konservierter Threonin-Rest, der für die Aktivierung wichtig ist. Für die vollständige Aktivierung bedarf es der Phosphorylierung des konservierten Serin-Restes in der regulatorischen Domäne [Alessi et al., 1996]. Die Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 korreliert mit der AKT Kinaseaktivität [Chen et al., 2001b]. Sowohl AKT1 als auch AKT2 werden ubiquitär exprimiert [Okano et al., 2000], wohingegen AKT3 vorwiegend im Gehirn, im Herzen und in den Nieren vorkommt [Masure et al., 1999]. Die Isoformen 1 und 2 werden meist stärker exprimiert als die Isoform 3 [Santi und Lee, 2010]. Im aktivierten Zustand reguliert AKT zahlreiche Substrate mit ganz unterschiedlichen zellulären Funktionen. AKT erkennt dabei das Konsensus-Motiv R-x-R-x-x-S/T-B, wobei X für eine beliebige und B für eine große hydrophobe Aminosäure steht [Alessi et al., 1996].

In der AKT Isoform 1 wurde eine wiederkehrende Mutation in der PH-Domäne identifiziert. Es handelt sich um eine Punktmutation (G49A), die zum Austausch der Aminosäure Glutaminsäure zu Lysin an Position 17 führt [Carpten et al., 2007]. Die Mutation führt zu einer Konformationsänderung der PH-Domäne, wodurch AKT auch an die Membran binden kann, wenn dort kein PIP<sub>3</sub> vorhanden ist [Carpten et al., 2007]. Dies führt in der Folge zu einer konstitutiven Aktivierung. In einem Tiermodell führt die AKT1 (E17K) Mutation mit einer 60 %igen Wahrscheinlichkeit zu einer Leukämieentwicklung [Carpten et al., 2007].



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von AKT1.** Die AKT-Isoformen besitzen N-Terminus eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, die durch eine Linker-Sequenz mit der zentral gelegen Kinase-Domäne verbunden ist. Die Kinase-Domäne enthält das Threonin 308. C-Terminus befindet sich die regulatorische Domäne mit dem Serin-Rest 473. Die Casein Kinase 2 phosphoryliert den Serin-Rest 129 in der Linker-Sequenz von AKT1 [gemäß Girardi et al., 2014].

### Spezifität der AKT-Isoformen

Die drei AKT-Isoformen weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und besitzen eine konservierte Domänenstruktur [Barnett et al., 2005]. Dennoch gibt es durch verschiedene Arbeiten Hinweise, dass eine Spezifität der AKT-Isoformen vorliegen könnte. So zeigen



isoformspezifische AKT-Knockout-Mäuse unterschiedliche Phänotypen auf. Der AKT1-Knockout führt zur Kleinwüchsigkeit, einer gesteigerten Apoptoserate in verschiedenen Gewebetypen sowie zu einer gesteigerten postnatalen Mortalität [Cho et al., 2001a]. AKT2-Knockout-Mäuse zeigen Diabetes Typ2-ähnliche Erkrankungsmuster auf, insbesondere gekennzeichnet durch eine Glukoseintoleranz [Cho et al., 2001b]. Demgegenüber besitzen AKT3-Knockout-Mäuse ein verkleinertes Gehirn, verbunden mit kleineren neuronalen Zellen [Tschopp et al., 2005]. Darüber hinaus sind die Doppel-Knockout-Mäuse, mit Ausnahme des Doppel-Knockouts AKT2/AKT3, nicht lebensfähig [Dummler et al., 2006].

In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation in den unterschiedlichen Kompartimenten, scheinen die einzelnen Isoformen die Substrate unterschiedlich stark zu regulieren [Santi und Lee, 2010]. So bindet das Protein JIP1 bevorzugt an AKT1 [Kim et al., 2002]. Demgegenüber bindet das Protein PHB2 vorzugsweise an AKT2 [Heron-Milhavet et al., 2008]. Zudem binden Tcl-1b und MTCP1 an AKT1 und AKT2, jedoch nicht an AKT3 [Noguchi et al., 2007].

Darüber hinaus wird die Dephosphorylierung der einzelnen AKT-Isoformen spezifisch durch Phosphatasen reguliert. So kann gezeigt werden, dass die *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase* (PHLPP) AKT am Serin-Rest 473 dephosphoryliert und inaktiviert [Gao et al., 2005]. Es zeigt sich zudem, dass PHLPP1 spezifisch die Dephosphorylierung der AKT Isoform 2 und 3 übernimmt. Demgegenüber beeinflusst PHLPP2 den Dephosphorylierungsvorgang von AKT1 und 3 [Brognard et al., 2007]. Im Gegensatz dazu wird die Dephosphorylierung am Threonin-Rest bei allen AKT-Isoformen von der Phosphatase PP2A vermittelt [Dillon und Muller, 2010].

Trotz der starken Homologie der Isoformen untereinander und gleicher Aktivierungsmechanismen werden isoformspezifische Rollen und Substrate der drei Isoformen beschrieben [Toker, 2012]. Die Differenzierung der AKT-Isoformen 1 und 2 zeigt Unterschiede in der Linker-Region zwischen PH- und katalytischer Domäne. Dabei kann gezeigt werden, dass AKT1 (S129), jedoch nicht AKT2 (S131), in verschiedenen Zelllinien durch die Casein-Kinase 2 (CK2) phosphoryliert wird [Girardi et al., 2014]. Die genauere Analyse zeigt, dass eine sterische Hinderung AKT2 vor der Phosphorylierung durch die CK2 *in vivo* bewahrt [Girardi et al., 2014]. Die Phosphorylierung von AKT1 am Serin-Rest 129 ist für die Erkennung des AKT1-spezifischen-Substrates Palladin von Bedeutung [Chin und Toker, 2010a; Girardi et al., 2014]. Die Phosphorylierung von AKT1 am Serin-Rest 129 durch die CK2 führt darüber hinaus zu einer Hyperaktivierung von AKT [Di Maira et al., 2005].

#### **2.4.2 Die humane Inositol-5-Phosphatase (SHIP1) und ihre Struktur**

Die humane SH2-Domäne beinhaltende Inositol-5-Phosphatase (SHIP1) gehört zur Familie der Inositol-5-Phosphatasen, welche das Phosphat an Position 5 des Inositolrings von Phosphatidylinositolphosphaten und Inositolphosphaten hydrolysieren [Whisstock et al., 2002]. SHIP1 wird überwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert und hat dort eine wichtige Funktion als negativer Regulator der Signaltransduktion [Rohrschneider, 2000].

Identifiziert wurde das humane SHIP1 als Protein von 1188 Aminosäuren [Drayer et al., 1996] und 1189 Aminosäuren [Geier et al., 1997]. Bei der letzteren Form wird ein zusätzliches Valin an Position 117 beschrieben, welches jedoch mit keinem Phänotyp assoziiert ist. SHIP1 wird durch das INPP5D-Gen codiert [Ware et al., 1996]. Das humane SHIP1 wurde 1996 erstmals

kloniert [Drayer et al., 1996] und besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 145 kDa. Zudem werden weitere Molekulargewichte von SHIP1 beschrieben, die durch alternatives Spleißen (135 kDa) oder Proteindegredation entstehen können [Rohrschneider et al., 2000]. Eine trunkierte p102-Form kann durch proteolytische Spaltung am C-Terminus durch eine PMSF-inhibierbare Serin-Protease während der Zellyse *in vitro* entstehen [Horn et al., 2001].

SHIP1 besitzt eine N-terminale SH2-Domäne (AS 5-102), welche die Interaktion mit anderen Proteinen, die eine Aminosäureabfolge der Form pY(Y/D)X(L/I/V) [Osborne et al., 1996] aufweisen, unterstützt. Zudem besitzt SHIP1 eine zentrale 5'-Phosphatase-Domäne (ca. AS 397-863) [Aman et al., 2000], welche für seine katalytische Aktivität verantwortlich ist (Abbildung 10). Diese Domäne beinhaltet zwei hochkonservierte Inositol-5-Phosphatase-Motive (ca. AS 582-593 und AS 663-679) [Drayer et al., 1996; Jefferson und Majerus, 1995]. Innerhalb der Phosphatase-Domäne konnte zudem eine C2-Domäne (AS 725-863) identifiziert werden. Die C2-Domäne von SHIP1 bindet an PI(3,4)P<sub>2</sub> und aktiviert SHIP1 allosterisch [Ong et al., 2007]. Die PH-like-Domäne (oder auch PH-related-Domäne) mit den Aminosäure-Resten K370 und K397 kann die Bindung von SHIP1 an das membranständige PIP<sub>3</sub> vermitteln [Ming-Lum et al., 2012]. Am C-Terminus sind zwei NPXY-Motive lokalisiert. Zum einen liegt dort ein NPNY-Motiv (AS 911-914) und zum anderen ein NPLY-Motiv (AS 1018-1021) vor [Ware et al., 1996]. Nach Tyrosinphosphorylierung dieser Motive ist eine Interaktion mit Phosphotyrosin-Bindungs-Domänen (PTB-Domänen) anderer Proteine möglich. Abhängig von den drei Resten, die sich C-Terminal vom Tyrosin-Rest im NPXY-Motiv befinden, können diese aber auch Bindungsstellen für andere SH2-Domänen darstellen [Mukherjee et al., 2012]. Über die SH2-Domäne und die NPXY-Motive ist es SHIP1 möglich mit Adapterproteinen wie Shc (*src homologous and collagen*), Grb2 (*growth factor receptor-bound 2*), verschiedenen Doks (*downstream of kinase*), der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2, CD150 (SLAMF1), c-CBL, Lyn und den ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based-inhibitory motif*) zu interagieren [Baran et al., 2003; Pesesse et al., 2006; Lawrence und Hagemann, 2012]. Außerdem ist der C-terminus von SHIP1 sehr prolinreich und weist mehrere P-x-x-P-Motive auf, die als Bindestellen für SH3-Domänen fungieren können [Rohrschneider et al., 2000]. Es kann eine Bindung mit Grb2 [Kavanaugh et al., 1996], Src [Senis et al., 2014], PLC-γ1 [Song et al., 2005] und CIN85 [Kowanetz et al., 2004] gezeigt werden.

Darüber hinaus werden zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) und fünf Kernexportsignale (NES) beschrieben [Nalaskowski et al., 2012; Nalaskowski und Ehm et al., 2018]. Der nukleäre Import wird durch das N-Terminal gelegene K<sup>327</sup>KSK und das sich in der Phosphatase-Domäne befindliche K<sup>547</sup>KLR vermittelt. Beide Signale entsprechen dem Konsensus-Motiv für kanonische monopartite-Kernlokalisierungssignale [Nalaskowski et al., 2012].

Die Kernexportsignale gehorchen der Konsensus-Sequenz nach la Cour [la Cour et al., 2004]. Vier der fünf Kernexportsignale sind in der Phosphatase-Domäne lokalisiert (I<sup>481</sup>HTLWNIRI, I<sup>574</sup>THRFTLFWF, F<sup>584</sup>GDLNYRVDL und L<sup>842</sup>TGHFQGEIKL). Das fünfte NES ist C-Terminal von der Phosphatase-Domäne gelegen (V<sup>917</sup>GPFGPPMPL) [Nalaskowski und Ehm et al., 2018].

SHIP1 und SHIP2 weisen eine 38 % Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz auf und dephosphorylieren PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> [Fuhler et al., 2012]. Beide haben unterschiedliche zelluläre Funktionen [Rohrschneider et al., 2000]. SHIP2 wird ubiquitär exprimiert und besitzt nur ein NPXY-Motiv.



Nach der Rekrutierung an die Membran erfolgt die Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 durch Membran-assoziierte Tyrosinkinase aus der Familie der Src-Kinasen [Tridandapani et al., 1997; Liu et al., 1997]. Die Tyrosin-phosphorylierten NPXY-Motive können in der Folge als Andockstelle für Proteine mit PTB-Domäne wie Shc und Dok1 [Liu et al., 1997; Sattler et al., 2001] dienen. Nach IL-3-Stimulierung phosphoryliert JAK2 den zytoplasmatischen Teil der beta-Untereinheit des IL-3-Rezeptors, wodurch Shc mit seiner PTB-Domäne an den Rezeptor binden kann [Bone und Welham, 2000]. Daraufhin kann Shc durch Lyn oder JAK2 tyrosinphosphoryliert werden, wodurch wiederum SHIP1 mit seiner SH2-Domäne eine Möglichkeit bekommt an Shc zu binden und somit an die Membran zu gelangen [Rauh et al., 2004]. SHIP1 kann in der Folge ebenfalls durch Lyn oder JAK2 Tyrosin-phosphoryliert werden [Rauh et al., 2004].

In einem weiteren Mechanismus kann Grb2 mit seiner N-terminalen SH3-Domäne an Sos im Zytoplasma binden [Simon und Schreiber, 1995]. Die C-terminale SH3-Domäne kann sowohl an Sos als auch an Gab-Proteine binden [Yu et al., 2006]. Nach Aktivierung des Rezeptors kann Grb2 mit seiner SH2-Domäne an den Tyrosin-phosphorylierten Rezeptor oder an Shc, welches durch Lyn und Syk Tyrosin-phosphoryliert wird, binden [Nagai et al., 1995]. Sos, welches mit Grb2 an die Membran gelangt ist, kann das in der Membran verankerte kleine G-Protein Ras von der inaktiven GDP-gebundenen in die aktive GTP-gebundene Form umwandeln [Margolis und Skolnik, 1994]. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des Raf-Mek1/2-Erk1/2-Signalwegs. Über die Phosphorylierung der Gab Proteine können Proteine mit SH2-Domäne, wie die PI3-Kinase gebunden werden [Yu et al., 2006]. SHIP1 kann ebenfalls an die beiden SH3-Domänen von Grb2 binden und dadurch ebenfalls an die Membran rekrutiert werden [Jücker et al., 1997; Liu et al., 2013]. In hämatopoetischen Zellen ist die Rekrutierung von SHIP1 an die Membran insbesondere zur Regulation der Immunantwort von B- und T-Zellen von Bedeutung (Kapitel 2.5 B-Zell-Aktivierung).

### **Die Bedeutung von SHIP1 für die Leukämogenese**

Eine Vielzahl von experimentellen Ergebnissen deutet sehr stark darauf hin, dass SHIP1 ein Tumorsuppressor ist, der infolge einer reduzierten Expression und/oder reduzierten enzymatischen Aktivität an der Leukämogenese beteiligt ist [Hamilton et al., 2011]. So kann in Tierexperimenten gezeigt werden, dass SHIP1-Knockout-Mäuse ein myeloproliferatives Syndrom entwickeln [Helgason et al., 1998, Liu et al., 1999].

Eine direkte Beteiligung von SHIP1 an der malignen Entartung von B-Lymphozyten kann in einem Mausmodell gezeigt werden, in dem die gleichzeitige Deletion von SHIP1 und PTEN in B-Lymphozyten zur Entstehung von letalen B-Zell-Lymphomen führt [Miletic et al., 2010]. Die Relevanz dieser Studie wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass die Inositolphosphatase PTEN, die ein bedeutender Tumorsuppressor ist, in einem Drittel der T-ALL-Zelllinien und in zwei Drittel der untersuchten primären T-ALL-Proben herunterreguliert ist [Lo et al., 2009]. In PTEN-positiven T-ALL-Zelllinien und primären T-ALL-Zellen ist PTEN in fast allen Fällen in phosphorylierter und damit inaktiver Form vorhanden [Lo et al., 2009].

In einem Xenograft-Transplantationsmodell für die Erkrankung der akuten myeloischen Leukämie (AML) führt die Transplantation von SHIP1-wt-überexprimierenden UKE-1 Zellen,

die von einer sekundären AML abgeleitet sind, zu einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse im Vergleich zu der Kontrollkohorte [Täger et al., 2017].

Die T-ALL-Zelllinie Jurkat exprimiert laut Literatur kein PTEN und kein SHIP1 [Lo et al., 2009]. PTEN besitzt zwei defekte Allele, die jeweils in Exon 7 mutiert sind und zur Bildung eines Stopcodons führen [Sakai et al., 1998]. Die beiden SHIP1-Allele sollen ebenfalls mutiert sein. Ein Allel weist eine Nonsense-Mutation in Codon 345 auf und das zweite Allel zeigt eine Deletion der ersten 47 bp von Exon 12, sodass es zur Leserasterverschiebung und zum vorzeitigen Stopp kommt [Lo et al., 2009]. Als Folge hieraus zeigen Jurkat Zellen ein sehr hohes Niveau an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und damit verbunden eine sehr starke AKT-Aktivierung [Freeburn et al., 2002]. Die gezielte Wiederherstellung der Expression von SHIP1 in Jurkat-Zellen führt zu einer starken Verminderung der konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und zu einer reduzierten Proliferation der Jurkat-Zellen *in vitro* [Horn et al., 2004]. Hierbei beruht die proliferationshemmende Wirkung auf einer Verlängerung des Verbleibens in der G1-Phase um 3,5 Stunden durch Regulation der Zellzyklusregulatoren p27Kip1 (gesteigerte Stabilität) und Rb (Retinoblastom Protein; reduzierte Phosphorylierung). Mittels MDD-HPLC Analysen kann zudem gezeigt werden, dass die Konzentration des SHIP1-Substrates PI(3,4,5)P<sub>3</sub> von 42 pmol auf 13 pmol pro 1 × 10<sup>8</sup> Zellen, also um 69 % reduziert wird [Horn et al., 2004]. Dies führt zu einer Hemmung der Phosphorylierung von AKT und einer Reduktion der enzymatischen Aktivität von AKT um 65 % [Horn et al., 2004].

Transkriptom-Studien mittels Microarray-Analysen (Affymetrix) zeigen zudem, dass in 65 von 79 untersuchten T-ALL-Patientenzellen (82 %) keine SHIP1-mRNA nachgewiesen werden kann (*absent call*) [Jücker und Horstmann; unveröffentlicht]. Darüber hinaus kann auch auf Proteinebene bei 4 von 6 (~ 66 %) untersuchten T-ALL-Patienten keine oder nur eine sehr geringe SHIP1-Expression nachgewiesen werden [Jücker und Horstmann; unveröffentlicht]. Zudem konnten mittels Microarray-Analyse SHIP1-regulierte Gene in Jurkat-Zellen nach induzierter SHIP1-Expression identifiziert werden. Eines dieser SHIP1-regulierten Gene ist LKLF, ein Transkriptionsfaktor, der T-Zellen im Ruhezustand hält und in aktivierten T-Zellen unterdrückt wird [Garcia-Palma et al., 2005]. SHIP1 steigert die Expression von LKLF und führt so zu einer Hemmung der Proliferation von Jurkat-Zellen [Garcia-Palma et al., 2005]. Insgesamt sind 11 Gene identifiziert worden, deren Expression durch SHIP1 in Jurkat-Zellen reguliert wird, wobei die Expression bei 3 Genen gesteigert und bei 8 Genen vermindert ist [Garcia-Palma; unveröffentlicht].

In bisherigen Untersuchungen konnten einige Regulationsmechanismen identifiziert werden, welche die SHIP1-Expression beeinflussen. So wird gezeigt, dass Fli-1, ein Transkriptionsfaktor aus der Ets-Familie, die INPP5D-Transkription unterdrücken kann [Lakhanpal et al., 2010]. Der Transkriptionsfaktor PU.1 hemmt ebenfalls die Transkription von SHIP1 [Oda et al., 2018]. Die Transkriptionsfaktoren aus der Ikaros-Familie, Helios und Ikaros, beeinflussen die Expression von SHIP1 ebenfalls [Alinikula et al., 2010]. Ikaros bindet an dem Promotor des INPP5D-Gens und besitzt in DT40 B-Zellen eine reprimierende Wirkung auf SHIP1, wohingegen Helios eine aktivierende Funktion zukommt [Alinikula et al., 2010; Fan und Lu, 2016]. Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeitsgruppe um Song, dass Ikaros die Transkription von Genen des PI3K-Signalwegs in Nalm-6 B-ALL-Zellen reprimieren kann, jedoch die Transkription von SHIP1 fördert [Song et al., 2015]. Die molekulare und pharmakologische Inhibierung der Casein Kinase 2 (CK2) steigert dabei die Aktivität von Ikaros als transkriptioneller Regulator [Song et al., 2015].

Eine Repression von SHIP1 kann auch durch Onkogene mikro-RNAs, wie die miR-155 bewirkt werden, die an den 3'-UTR von SHIP1 bindet und die Translation hemmt [O'Connell et al., 2009]. Mikro-RNAs sind kurze (etwa 20 Nukleotide), einzelsträngige RNA-Moleküle, die die Genexpression regulieren [Bartel, 2004]. Eine Hochregulation von miR-155 und eine Repression von SHIP1 wird bei Patienten mit B-Zell-Lymphom beobachtet, wobei eine niedrige SHIP1-Expression mit einem schlechten Überleben der Patienten korreliert [Pedersen et al., 2009]. MiR-155 wird über den NFκB-Signalweg oder durch *Interferon regulatory factor 4* (IRF4) reguliert [Gerloff et al., 2015; Wang et al., 2011]. Die spezifische Herunterregulation von IRF4 führt zu einer gesteigerten SHIP1-Expression [Wang et al., 2011]. Zudem wird in AML-Zellen mit einer internen Tandem-Duplikation in der RTK Flt3 (Flt3-ITD) eine 8-fache Hochregulation von miR-155 beschrieben [Cammarata et al., 2010].

Weiterhin ist SHIP1 in BCR-ABL-positiven Leukämiezellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie kaum nachweisbar, da die Expression von SHIP1 durch BCR-ABL unterdrückt wird [Sattler et al., 1999].

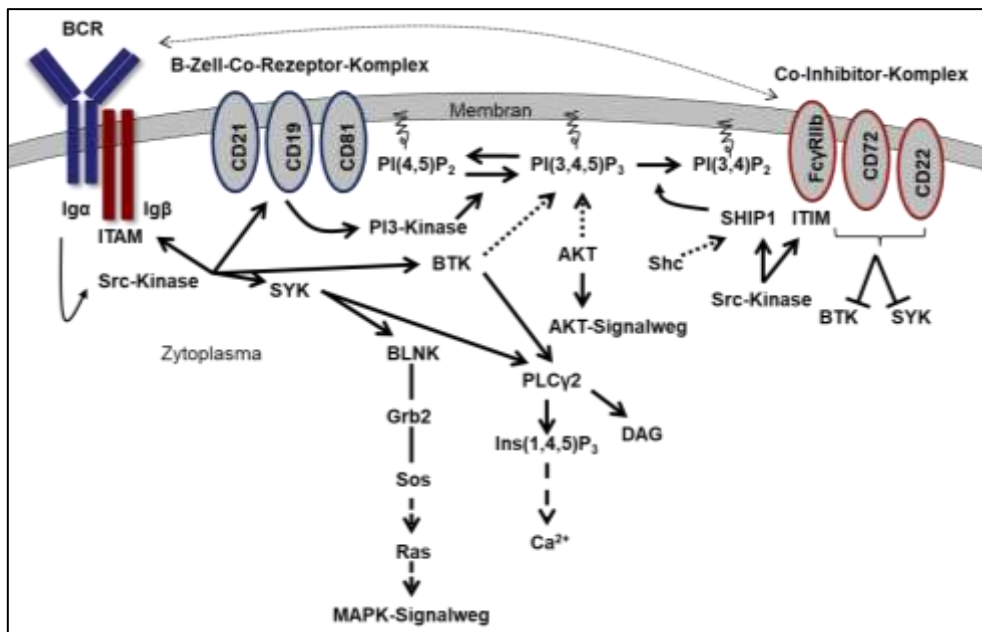
## 2.5 B-Zell-Aktivierung

In B-Zellen induziert die Bindung eines Antigens die Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Komplexes (Abbildung 11). Der B-Zell-Rezeptor-Komplex (BZR-Komplex) setzt sich zusammen aus einem Membrangebundenen-Immunglobulin (IgD und IgM in reifen naiven B-Zellen, IgA, IgG oder IgE in aktivierten B-Zellen) und einem Heterodimer aus Igα (CD79α) und Igβ (CD79β). Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Familie wie Lyn oder Fyn sind an dem zytoplasmatischen Anteil des Rezeptor-Komplexes assoziiert und werden nach Ligandenbindung aktiviert [Nagai et al., 1995]. Sie phosphorylieren die ITAMs von Igα und Igβ. Die Phosphotyrosine dienen in der Folge als Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen oder Phosphotyrosin-Bindungsdomänen (PTB). Eine Vielzahl von Proteinen besitzen solche Domänen, darunter befinden sich Kinasen, Phosphatasen, Adapterproteine und Transkriptionsfaktoren [Lemmon und Schlessinger, 2010; Liu et al., 2011]. Lyn phosphoryliert und aktiviert zudem Syk und die Tec-Kinase Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) [Yu et al., 2006]. Daraufhin kann Syk mit seinen zwei SH2-Domänen an die phosphorylierten ITAMs binden und das an der Membran lokalisierte Adapterprotein BLNK (*B cell linker protein*) phosphorylieren [Fu et al., 1998]. An das phosphorylierte BLNK bindet in der Folge Grb2 mit dem gebundenen Sos. Sos aktiviert Ras und damit den MAPK-Signalweg [Fu et al., 1998]. Über Syk und BTK wird zudem PLCγ2 aktiviert [Fu et al., 1998]. PLCγ2 spaltet PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu Diacylglycerin (DAG) und Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Dies bewirkt in letzter Konsequenz den Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom aus intrazellulären Speichern [Fu et al., 1998].

Das sogenannte Komplementsystem ist ebenfalls Teil der B-Zell-Aktivierung. Dabei wird das Antigen von dem Komplementfragment C3d gebunden. Das Fragment kann an den Typ2 Komplement-Rezeptor (CR2, CD21) auf den B-Zellen binden. Zusammen mit CD19 und CD81 bildet er den Bestandteil des B-Zell-Co-Rezeptor-Komplexes [Mongini et al., 2003]. Ausgehend von den ITAMs von Igα und Igβ phosphoryliert Lyn ein ITAM im zytoplasmatischen Teil von CD19 [Fujimoto et al., 1999]. Dies führt zur Bindung und

Aktivierung der PI3-Kinase, die an der Membran  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  zu  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  umsetzt und damit den AKT-Signalweg initiiert [Xu et al., 2014].

Demgegenüber wird ein Antikörper-Rückkopplungsprozess zur Regulation der Immunantwort initiiert. Dabei wird die Antikörperproduktion einer aktivierten B-Zelle durch sezerniertes IgG gehemmt. Die sezernierten IgG-Antikörper bilden mit dem Antigen Komplexe aus und binden mit ihrem Fc-Anteil an den inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptor IIb (CD32) [Jessup et al., 2001]. Über die Antigen-vermittelte-Zusammenkunft zwischen den BZR und dem inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptor IIb kommt es zur Tyrosinphosphorylierung des ITIM im zytoplasmatischen Anteil des Fc $\gamma$ -Rezeptor IIb, durch die mit dem BZR assoziierte Src-Kinase Lyn [Pritchard und Smith, 2003]. Dies führt zur Bindung von SHIP1 über seine SH2-Domäne [Pritchard und Smith, 2003]. SHIP1 dephosphoryliert  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  zu  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ , wodurch BTK und AKT nicht mehr aktiv an die Membran rekrutiert werden können und gehemmt werden. Die B-Zellantwort wird damit abgeschaltet. Anschließend wird SHIP1 durch Lyn phosphoryliert, wodurch Shc mit seiner PTB-Domäne binden kann [Malbec et al., 1998]. Shc kann wiederum durch Lyn Tyrosinphosphoryliert werden und mit dem Rezeptor um die Bindung an der SH2-Domäne konkurrieren. Nach der Bindung von Shc an SHIP1 wird SHIP1 von der Membran entfernt [Rauh et al., 2004].



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der B-Zell-Aktivierung und Rekrutierung von SHIP1 an die Membran.** Die Bindung eines Antigens induziert die Aktivierung des B-Zell-Rezeptor-Komplexes. Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Familie sind an dem zytoplasmatischen Anteil des Rezeptor-Komplexes assoziiert und werden nach Ligandenbindung aktiviert. Die Src-Kinase aktiviert wiederum SYK, BTK und die PI3K über CD19. SYK aktiviert anschließend den MAPK-Signalweg und fördert zusammen mit BTK den Kalzium-Ausstrom. Die PI3K generiert  $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$  und aktiviert somit den AKT-Signalweg. Die B-Zellantwort kann demgegenüber durch die Phosphorylierung des ITIM-Motivs des inhibitorischen Fc $\gamma$ -Rezeptor IIb und der damit verbundenen Rekrutierung von SHIP1 gehemmt werden [gemäß Pritchard und Smith, 2003].

## 2.6 Ph-positive ALL

B-lymphoide und myeloische Leukämien werden zwar häufig von denselben Onkogenen wie RAS, MLL oder BCR-ABL angetrieben, unterscheiden sich jedoch in den klinischen Merkmalen deutlich [Druker et al., 2001; Druker et al., 2006].

Das Philadelphia-Chromosom (Ph), t(9; 22), wird bei etwa 20 % bis 30 % der ALL des Erwachsenenalters und bei etwa 3 bis 5 % der ALL des Kindesalters identifiziert [Liu-Dumlao et al., 2012; Faderl et al., 1998; Leoni und Biondi, 2015]. Charakteristisch für die Ph-positive ALL ist entsprechend die Expression des BCR-ABL-Fusionsproteins. Im Vergleich zu Patienten mit Ph-negativer ALL besitzen Patienten mit Ph-positiver ALL eine deutlich schlechtere Prognose [Pui et al., 2008]. Im Gegensatz zu CML-Patienten, die zu 95 % das Philadelphia-Chromosom tragen und sehr gut auf eine Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ansprechen, zeigen Ph-positive ALL-Patienten häufig eine Resistenzentwicklung und ein Rezidiv [Bernt und Hunger, 2014; Kantarjian et al., 2004; Hochhaus et al., 2017; Ottmann et al., 2002; Mishra et al., 2006]. Insbesondere Rezidive treten in der Folge, trotz intensiver Behandlungsansätze und mehreren Monaten der Remission, immer noch in hoher Rate auf [Leoni und Biondi, 2015; Jones et al., 2008].

Aktuelle und zuvor entwickelte Tyrosinkinase-Inhibitoren selektionieren dabei stark nach resistenten BCR-ABL-Mutanten [Zabriskie et al., 2014]. Ein wichtiges Gen das ebenfalls als ursächlich für Rezidive betrachtet wird, ist das IKZF1-Gen, das für den Transkriptionsfaktor Ikaros codiert [Mullighan et al., 2009a; Martinelli et al., 2009]. In ca. 83 % der Ph-positiven ALL, jedoch nicht in der CML, liegt Ikaros mit einer Punktmutation (10 %) oder deletiert (90 %) vor [Mullighan et al., 2008a; Bernt und Hunger, 2014]. Zudem werden Ikaros-Mutationen bei Rezidiv-Patienten angereichert identifiziert [Kuiper et al., 2010]. Dies umfasst sowohl den *De-novo* Erwerb einer Ikaros-Mutation als auch die Selektion eines Subklons mit schwerwiegender Mutation, der vor dem Rezidiv mit einem geringen Prozentsatz vorlag [Mullighan et al., 2008b; Dupuis et al., 2013].

### 2.6.1 BCR-ABL

Das BCR-ABL Fusionsprotein hat seinen Ursprung in einer reziproken Chromosomentranslokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22 t(9; 22)(q34;q11) [Nowell und Hungerford, 1960]. Insbesondere bei Patienten mit CML kann das Philadelphia-Chromosom nachgewiesen werden (95 %) [Mauro und Druker, 2001]. Jedoch tritt die Translokation auch bei einem Teil der Patienten mit B-ALL auf (4 % bei Kindern; 25 % bei Erwachsenen) [Bernt und Hunger, 2014]. Die Ph-positive T-ALL ist sehr selten und nur wenige Fälle sind in der Literatur beschrieben [Arican et al., 1999; Ablat et al., 2006; Lim et al., 1999; Tchirkov et al., 1998; Coad et al., 1994; Verrma et al., 2014].

Die Bruchstellen liegen dabei zum einen auf dem ABL1-Gen (Chromosom 9) und zum anderen auf dem BCR-Gen (Chromosom 22). ABL1 codiert normalerweise für eine Tyrosinkinase, die im Zellkern lokalisiert ist [Bernt und Hunger, 2014]. Die Bezeichnung BCR-Gen (*Breakpoint Cluster Region*) hat seinen Ursprung aufgrund der häufigen Brüche, die in diesem Gen vorkommen. Es handelt sich um eine Kinase, die bisher wenig charakterisiert ist. Neuere



Untersuchungen deuten jedoch auf wichtige Funktionen bei der Zytoskelett Organisation sowie bei Wachstums- und Proliferations-Prozessen hin [Bernt und Hunger, 2014]. Durch die Translokation wird der 5'-Anteil des BCR-Gens mit dem 3'-Teil des ABL-Gens verknüpft [Nowell und Hungerford, 1960]. Dadurch wird ein verkürztes BCR-ABL-Gen auf Chromosom 22 und ein verlängertes ABL-BCR-Gen auf Chromosom 9 gebildet. Es können verschiedene mögliche Bruchpunkte im BCR-Gen festgestellt werden, die als m-BCR (minor), M-BCR (Major) und  $\mu$ -BCR (mikro) bezeichnet werden [Bernt und Hunger, 2014]. Demgegenüber liegt der Bruchpunkt des ABL-Gens immer im gleichen Intron im Chromosom 9 vor. In der Konsequenz können verschieden große Fusionsproteine entstehen. Diese Fusionsproteine weisen eine Größe von 190 kDa, 210 kDa beziehungsweise 230 kDa auf [Bernt und Hunger, 2014]. *In vitro*-Studien zeigen, dass p190<sup>BCR-ABL</sup> eine aktivere Tyrosinkinase als p210<sup>BCR-ABL</sup> ist und Patienten tendenziell eine längere Remissionsdauer besitzen [McLaughlin et al., 1989; Kantarjian et al., 1991]. Bei der ALL des Kindesalters wird in 90 % der Fälle das 190 kDa Fusionsprotein und in 10 % der Fälle das 210 kDa Protein exprimiert [Suryanarayan et al., 1991]. In fast allen Fällen der CML und in etwa der Hälfte der adulten Ph-positiven ALL kann ein 210 kDa Fusionsprotein identifiziert werden [De Klein et al., 1986]. Im Gegensatz zum ABL-Protein liegt das BCR-ABL-Fusionsprotein im Zytoplasma vor. Es besitzt zudem eine erhöhte Aktivität. Dies liegt zum einen daran, dass der N-terminale Bereich von ABL fehlt, der normalerweise die katalytische Domäne der Tyrosinkinase blockiert und zum anderen daran, dass es durch Dimerisierung der BCR Coiled-Coil-Domäne an ABL zu einer Auto-phosphorylierung der Tyrosinkinase kommt [Franz et al., 1989; McWhirter et al., 1993]. In der Folge werden zahlreiche Proteine durch die konstitutive Kinaseaktivität beeinflusst. So wird über den Grb2/Sos-Komplex, der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg aktiviert [Bernt und Hunger, 2014]. Zudem wird der JAK/STAT-Signalweg und über die PI3-Kinase, der AKT-Signalweg aktiviert [Bernt und Hunger, 2014]. Zudem betrifft die konstitutive Aktivierung auch Proteine wie Cbl, CRKL oder die Src-Kinase-Familie [Salesse und Verfaillie, 2002]. Weiterhin korreliert die Doxycyclin-abhängige Induktion der BCR-ABL-Expression direkt mit der verringerten SHIP1-Expression in einem Ba/F3-Zellsystem [Sattler et al., 1999]. Dieser Effekt ist SHIP1-spezifisch, da die Expression von PTEN oder SHIP2 nicht beeinflusst wird [Ruschmann et al., 2010]. Die SHIP1-Halblebenszeit wird durch die Induktion der BCR-ABL-Expression in Ba/F3-Zellen von mehr als 18 Stunden auf unter 3 Stunden reduziert [Sattler et al., 1999]. Darüber hinaus konnte vor kurzem in der B-ALL, die Hochrisiko-Gruppe der Ph-like ALL identifiziert werden [Mullighan et al., 2009a]. Dabei ähnelt sich das Genexpressionsprofil von Ph-like ALL-Leukämiezellen dem von Ph-positiven ALL-Zellen [Tran und Loh, 2016]. Die Patienten weisen jedoch keine BCR-ABL-Translokation auf. Die genetischen Veränderungen sind demgegenüber sehr vielfältig und führen ebenso zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Signalgebung [Tran und Loh, 2016]. Mehr als die Hälfte der Fälle der Ph-like ALL zeigen eine Überexpression von CRLF2, wobei hierbei wiederum fast die Hälfte der Fälle eine JAK-STAT-Mutation (häufig JAK2-R683G) und eine damit einhergehende Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs aufweist [Jain et al., 2017]. JAK-Mutationen sind signifikant mit Veränderungen des Ikaros-Gens und Deletionen von CDKN2A/B assoziiert [Mullighan et al., 2009b]. In der Ph-like ALL-Gruppe ohne CRLF2-Überexpression sind Fusionsproteine mit JAK, ABL und weiteren Tyrosinkinasen häufig zu finden [Jain et al., 2017]. Die Ph-like ALL macht ca. 15 % der B-ALL des Kindesalters aus [Tran und Loh, 2016].

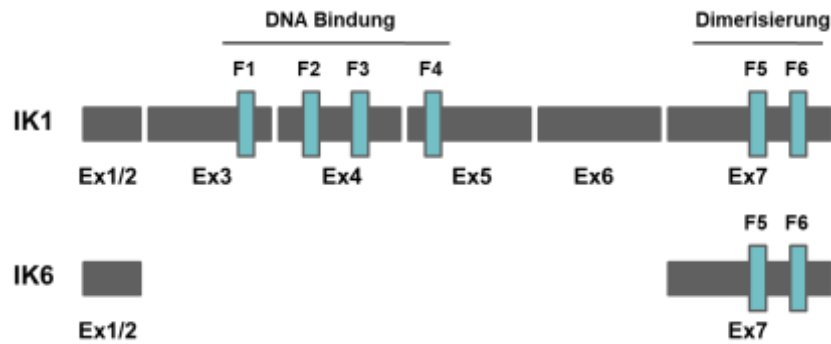
## 2.6.2 Ikaros

Die Ikaros Zinkfinger-Protein-Familie besteht aus fünf Mitgliedern (Ikaros, Aiolos, Helios, Eos und Pegasus) und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung der Lymphozyten im hämatopoetischen System [Fan und Lu, 2016]. Darüber hinaus besitzen die Mitglieder noch weitere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen [Fan und Lu, 2016]. Allein für Ikaros (IKZF1) werden in der Literatur mindestens 8 Isoformen beschrieben [Rebollo und Schmitt, 2003]. Die Funktion der Transkriptionsfaktoren ist sehr vielfältig und ist zudem abhängig von der Verteilung der einzelnen Familienmitglieder im Zellsystem, in denen sie beteiligt sind [Fan und Lu, 2016]. Insbesondere durch die Protein-Protein Interaktion zwischen den einzelnen Isoformen der verschiedenen Mitglieder der Ikaros-Familie kann ein sehr kompliziertes regulatorisches Netzwerk entstehen.

Die Zinkfinger-Proteine gehören zu der Gruppe der Krüppel-Transkriptionsfaktoren und besitzen zwei wichtige C2H2-Zinkfinger-Domänen [Sun et al., 1996]. Bei Zinkfingerdomänen wird ein Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) koordinativ durch je zwei Histidin- und zwei Cystein-Reste gebunden und dient der Stabilisierung der Faltung. Die Polypeptidkette nimmt dadurch eine Schleifenförmige Struktur (Zinkfinger) an. Die Schleife des Proteins bindet spezifisch an die DNA.

Die Protein-Protein-Interaktion der Familienmitglieder (Homo und Hetero) erfolgt durch Dimerisierung der zwei C2H2-Zinkfinger am C-terminus (Exon 7) [Sun et al., 1996]. Demgegenüber ist die N-terminale Zinkfinger-Domäne, die sich aus maximal vier Zinkfinger-Motiven zusammensetzt (Exon 3-5) für die Erkennung der DNA-Zielsequenz verantwortlich [Sun et al., 1996]. Die Anzahl dieser N-terminalen Finger kann aufgrund des alternativen Spleißens variieren. Die Isoformen 1-3 besitzen mindesten drei funktionsfähige Zinkfinger und können effizient an die DNA binden. Die kürzeren Isoformen (Isoform 4-8) können selbst nicht mehr effizient an die DNA binden und wirken nach Heterodimerisierung häufig als dominant-negative Isoformen (Abbildung 12) [Winandy et al., 1995]. Dabei werden die kürzeren Isoformen unter normalen Umständen in sehr geringen Mengen exprimiert und wirken in ihrer potenziellen inhibitorischen Rolle den prädominanten Isoformen 1 bis 3 entgegen [Sun et al., 1996]. Hierbei bilden sich zwischen den Ikaros-Isoformen 1-3 und den dominant-negativen Isoformen Komplexe, die die DNA nicht binden können und somit die Ikaros-Aktivität reduzieren [Sun et al., 1996]. Der regulatorischen Maschinerie des alternativen Spleißens bedarf es dabei einer strengen Kontrolle. Zudem sind die dominant-negativen Isoformen, im Gegensatz zu den Isoformen 1-3, vermehrt im Zytoplasma zu finden [Molnar und Georopoulos, 1994].

Klinische Studien zeigen, dass genetische Veränderungen von Ikaros sehr stark mit einer schlechten Prognose für ALL-Hochrisiko-Patienten korrelieren [Mullighan et al., 2009a; Iacobucci et al., 2012a]. Patienten mit einer IKZF1-Deletion werden deshalb als Hochrisikogruppe eingestuft [Meyer et al., 2013]. Es zeigt sich, dass Ikaros bei ca. 29% der pädiatrischen BCR-ABL-negativen B-ALL-Hochrisiko-Patienten und in über 80 % der BCR-ABL-positiven B-ALL-Fälle verändert ist [Mullighan et al., 2008a; Mullighan et al., 2009a]. Dabei kommt es zum Verlust der Ikaros-Expression als auch in hohem Maße zur Bildung von dominant-negativen Isoformen [Mullighan et al., 2008a]. Insgesamt gesehen finden sich bei der B-ALL des Kindesalters in ungefähr 20 % der Fälle IKZF-1-Deletionen [Dupuis et al., 2013; Vitanza et al., 2014].



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der cDNA von Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6.** In der Vollständigform besitzt Ikaros (IK1) N-Terminal vier Zinkfinger (F1-4), die für DNA-Bindung verantwortlich sind. N-Terminal weist Ikaros zwei Zinkfinger auf, die die Dimerisierung des Proteins vermitteln. Durch alternatives Spleißen kann die dominant-negative Isoform 6 (IK6) entstehen [gemäß Winandy et al., 1995; Sun et al., 1996].

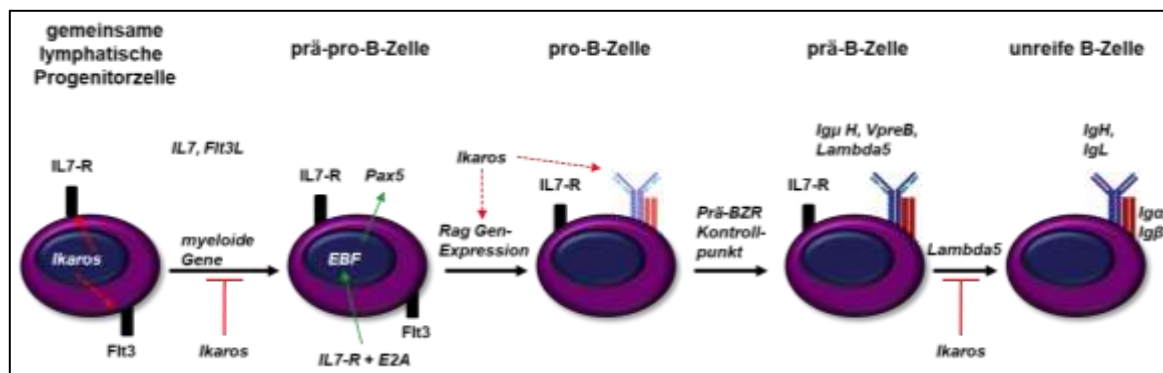
Eine genauere Untersuchung der Bruchstellen der Ikaros-Deletionsmutanten lässt darauf schließen, dass es durch BCR-ABL zu einer aberranten RAG-vermittelten Rekombination und damit verbunden zu einer signifikant höheren H3K4me3-Chromatin-Modifikation kommt und es infolge dessen zu einer Deletion der Exons 3-6 führt [Mullighan et al., 2008a; Dong et al., 2016]. Die Sequenzierungsdaten zeigen, dass direkt an den Deletionsbruchpunkten von Ikaros kryptische Rekombinationssignalsequenzen (cRSSs) enthalten sind [Dong et al., 2016]. Die Zugänglichkeit der Rekombinationssignalsequenzen wird durch die erhöhte Histon-H3-Methylierung sichergestellt. [Dong et al., 2016]. Zudem wird beschrieben, dass über den PI3K/AKT/FoxO1-Signalweg sowohl die Expression als auch das Spleißen von Ikaros reguliert werden kann. Demnach führt die Herunterregulierung von FoxO1 durch die PI3K zur Aktivierung eines veränderten Spleißens von Ikaros, wodurch die normale Transkription sowie die Proteinexpression von Ikaros beeinträchtigt wird [Alkhatib et al., 2012].

Als Transkriptionsfaktor kontrolliert Ikaros die Genexpression zahlreicher Gene. Eine genomweite Analyse identifizierte Tausende von DNA-Bindungsstellen von Ikaros [Schjerven et al., 2013]. So ist beispielsweise bekannt, dass Ikaros die Expression des IgLL1-Gens, einer Komponente des prä-BZR, reprimiert [Schmitt et al., 2002]. Zudem inhibiert Ikaros die Aktivität der Src-Kinase Lyn [Nera et al., 2006a]. Posttranslational wird Ikaros durch die Casein Kinase 2 gehemmt. CK2 phosphoryliert Ikaros an verschiedenen Stellen und kann dadurch die DNA-Bindungsfähigkeit von Ikaros verringern [Dovat et al., 2011]. Die Protein-Phosphatase PP1 wirkt durch Dephosphorylierung als Gegenspieler der CK2 [Dovat et al., 2011].

Ikaros kann sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als Repressor wirken. Dies hängt zu einem großen Teil von den Kofaktoren ab, mit denen es interagiert. Auf chromosomaler Ebene liegt Ikaros zusammen mit Helios in definierten Heterochromatin-beinhaltenen Sammelpunkten im Nukleolus von B-Zellen vor [Hahm et al., 1998; Brown et al., 1997]. Helios scheint dabei der limitierende Faktor für die zentromerische Lokalisation von Ikaros in T-Zellen zu sein [Hahm et al., 1998]. Darüber hinaus ist Ikaros zusammen mit Aiolos mit dem NuRD- (*nucleosome-remodelling and histone deacetylase*) Komplex assoziiert, der reprimierend wirkt [Zhang et al., 2011b]. In dem SWI/SNF-remodelling-Komplex, der aktivierend wirkt, liegt Ikaros ebenfalls assoziiert vor [Fan und Lu, 2016].

## Ikaros und sein Einfluss auf die Entwicklung von B-Zellen

Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark erfolgt in genau festgeschriebenen und aufeinanderfolgenden Schritten, die durch Genexpressionsprogramme und Entwicklungskontrollpunkte gekennzeichnet sind [Nutt und Kee, 2007; Mandel und Grosschedl, 2010]. Gesteuert wird dieser Reifungsprozess durch Transkriptionsfaktoren und Signalproteinen im Umfeld dieser Transkriptionsfaktoren. Der Transkriptionsfaktor Ikaros spielt eine entscheidende Rolle bei der Spezifikation der B-Zelllinie (Abbildung 13), indem er die Expression des IL7- und des Flt3-Rezeptors in gemeinsamen lymphoiden Vorläufern fördert [Nichogiannopoulou et al., 1999; Sellars et al., 2011]. Die Expression des IL7-Rezeptors fördert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor E2A die Expression des B-Zelllinien-spezifischen Transkriptionsfaktors EBF in prä-pro-B-Zellen [Kikuchi et al., 2005; Bain et al., 1994]. Ikaros-defizienten Mäusen fehlen dementsprechend prä-pro-B-Zellen und sie zeigen einen vollständigen Block in der B-Lymphopoese [Wang et al., 1996]. EBF fördert wiederum die Expression von Pax5 und führt die Zelle dadurch auf die pro-B-Stufe [O’Riordan und Grosschedl, 1999]. Pax5 ist ein elementarer B-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, der zusammen mit Ikaros die Transkription von myeloiden Genen unterdrückt und dadurch die Zelle in ein B-Zelllinien-spezifisches Schicksal führt [Souabni et al., 2002; Reynaud et al., 2008]. In der Folge reguliert Ikaros die IgH-Rekombination, indem es die Rag-Genexpression auf Ebene der pro-B-Zelle aktiviert [Kirstetter et al., 2002; Reynaud et al., 2008]. Dabei durchlaufen die Zellen Umlagerungsprozesse, wobei die schweren Ketten (IgH) der Immunglobuline neu an die Ersatzproteine der leichten Ketten Lambda5 und VpreB angeordnet werden. Diese Umlagerung liefert der Zelle ein spezifisches Reifungssignal [Kitamura et al., 1992; Mundt et al., 2001]. Ausgehend von der Signalgebung des prä-B-Zell-Rezeptors und des IL7-Rezeptors wird die Differenzierung zu prä-B-Zellen induziert.



**Abbildung 13: Schema des Einflusses von Ikaros auf die B-Zellentwicklung.** Die Entwicklung von B-Zellen im Knochenmark erfolgt in aufeinanderfolgenden Schritten, die durch Genexpressionsprogramme und Entwicklungskontrollpunkte gekennzeichnet sind. Ikaros spielt eine entscheidende Rolle bei der Spezifikation der B-Zelllinie, indem es die Expression des IL7- und des Flt3-Rezeptors in lymphoiden Vorläufern fördert. Die Expression des IL7-Rezeptors fördert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor E2A die Expression des Transkriptionsfaktors EBF in prä-pro-B-Zellen. EBF fördert wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors Pax5. Zudem unterdrückt Ikaros die Transkription myeloider Gene. Anschließend reguliert Ikaros die IgH-Rekombination, indem es die Rag-Genexpression aktiviert. Nachdem der prä-BZR-Kontrollpunkt erreicht wird, reguliert Ikaros die Expression der prä-BZR-Komponente Lambda5 herunter [modifiziert nach Sellars et al., 2011].

Nachdem der prä-BZR-Kontrollpunkt erreicht wird, reguliert Ikaros die Expression der prä-BZR-Komponente Lambda5 herunter [Sabbattini et al., 2001]. In mehreren Zellteilungsrunden findet die Umlagerung der leichten Ig-Kette statt [Hess et al., 2001]. Später reguliert Ikaros die Proliferation aktivierter B-Zellen, indem es die B-Zell-Aktivierungsschwelle setzt [Kirstetter et al., 2002]. Folgerichtig exprimieren B-Zellen mit dominant-negativer Ikaros-Isoform höhere Spiegel an Autoantikörpern als Ikaros-wt-exprimierende B-Zellen [Wojcik et al., 2007]. Zudem kontrolliert Ikaros die Expression des Antikörper-Isotypen [Sellars et al., 2009]. Weitere Umlagerungsschritte werden bei denjenigen Zellen unterdrückt, die einen funktionellen BZR mit schwerer und leichter Ig-Kette exprimieren [Sellars et al., 2011].

## **2.7 Der Einfluss von Phosphatasen (SHIP1) und Transkriptionsfaktoren (Ikaros) auf die B-Zell-Toleranz**

### **2.7.1 Die B-Zell-Selektion durch klonale Eliminierung**

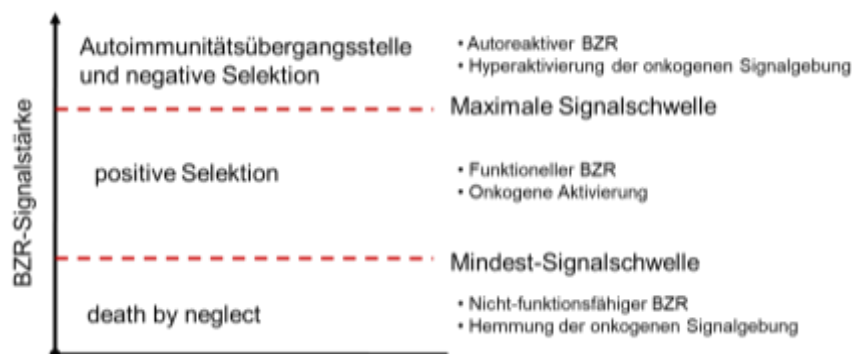
Bis zu 70 % der neu gebildeten B-Zellen exprimieren autoreaktive B-Zell-Rezeptoren (BZR) [Wardemann et al., 2003]. Zellen mit diesen Rezeptoren erkennen Bestandteile normaler körpereigener Gewebe und können dem Organismus in der Folge angreifen. Um eine Autoimmunität zu vermeiden, müssen diese B-Zellen stumm geschaltet werden. Drei Haupttoleranzmechanismen sind vorhanden, um eine Stummschaltung zu erreichen: klonale Deletion, Rezeptorbearbeitung und Anergie [Goodnow et al., 1988; Nemazee und Bürki, 1989; Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993].

Der funktionelle BZR ist ein wesentlicher Bestandteil der B-Zelle [Lam et al., 1997]. Die Bindung des Zelloberflächen-Immunglobulins an das spezifische Antigen erzeugt für die Zelle wesentliche Überlebens- und Proliferationssignale. Aufgrund dessen, dass nur wenige B-Zellklone effektiv an ein spezifisches Antigen binden können, kommt es in der Folge zu einer positiven Selektion und zu einem spezifischen BZR-vermittelten Überlebens- und Proliferationssignal der Zelle [Rajewsky et al., 1996; Kraus et al., 2004; Young et al., 2015]. In Abwesenheit eines funktionellen BZR fallen die kritischen Überlebenssignale unter eine Mindestschwelle und die B-Zellen sterben aufgrund der fehlenden positiven Selektion (*death by neglect*; Tod durch Vernachlässigung) [Lam et al., 1997; Kraus et al., 2004; Srinivasan et al., 2009; Nemazee und Bürki, 1989].

B-Zellen unterliegen zudem auch einem aktiven negativen Selektionsprozess [Rajewsky et al., 1996; Burnet, 1959]. Das adaptive Immunsystem ermöglicht es B-Zellen zwischen Fremdanigenen und Selbstanigenen zu unterscheiden. Basierend auf der relativen geringen Zahl von Fremdanigenen im Vergleich zu der großen Menge an Selbstanigenen muss die B-Zelle kritisch unterscheiden können. Dieser Prozess führt zu einer positiven oder negativen klonalen Selektion [Rajewsky et al., 1996; Pelanda und Torres, 2012]. B-Zellen, die autoreaktive Immunglobuline entweder als Transmembran-BZR auf der Zelloberfläche oder als sekretierte Antikörpermoleküle exprimieren, können Autoimmunerkrankungen verursachen [Rajewsky et al., 1996; Pelanda und Torres, 2012]. Als Schutz vor Autoimmunerkrankungen wurden bei der Entwicklung von B-Zellen Autoimmunitätskontrollpunkte (*autoimmunity checkpoints*; AIC) entwickelt, um autoreaktive Klone zu eliminieren. B-Zellen werden positiv für die Bindung an

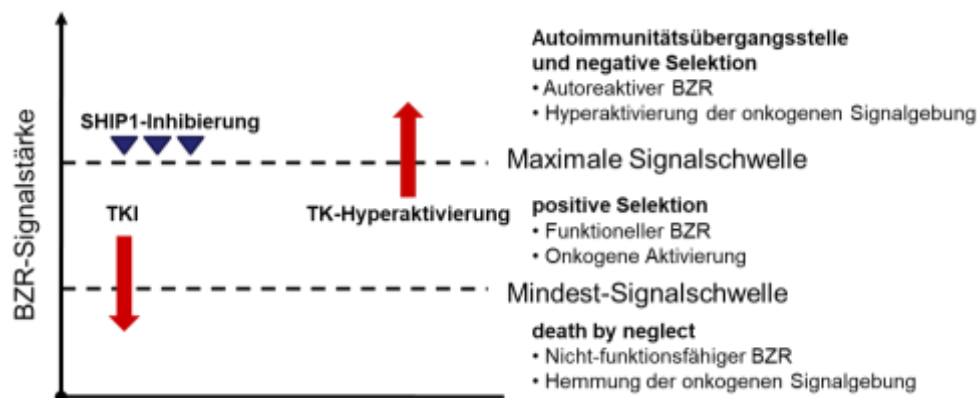
seltene Fremdantigene ausgewählt, was zu einem mittleren Niveau der BZR-Signalstärke führt. Auf der anderen Seite führen Wechselwirkungen eines autoreaktiven BZR mit dem in hoher Menge vorkommenden Selbstantigen zu einer überwiegend starken BZR-Signalübertragung. Diese starke Signalgebung führt zu einer negativen Selektion und löst den Zelltod durch Autoimmunitätskontrollpunkte aus. Die AIC-Aktivierung eliminiert autoreaktive B-Zell-Klone somit in frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung [Pelanda und Torres, 2012]. Daher führt bei der B-Zell-Selektion sowohl eine Abschwächung der BZR-Signalstärke unter einen minimalen Schwellenwert (nicht funktioneller BZR) als auch eine Hyperaktivierung über einen maximalen Schwellenwert (autoreaktive BZR) zum Zelltod (Abbildung 14) [Lam et al., 1997; Kraus et al., 2004; Srinivasan et al., 2009; Nemazee und Bürki, 1989; Rajewsky et al., 1996].

Während prä-B-ALL-Klone häufig keinen funktionelle prä-BZR exprimieren, können onkogene Tyrosinkinase und Mutationen von Komponenten des RAS-Signalwegs ebenfalls Überlebens- und Proliferationssignale eines konstitutiv aktiven prä-BZR imitieren [Feldhahn et al., 2005; Roberts et al., 2014; Zhang et al., 2011a; Irving et al., 2014]. Beispielsweise aktiviert BCR-ABL die BZR-Signalkaskade und ahmt die konstitutive Aktivierung des BZR nach [Feldhahn et al., 2005]. Die onkogene Aktivierung der BZR-Signalgebung bei B-Zell-Erkrankungen ist das funktionelle Äquivalent der positiven Selektion während der normalen B-Zell-Entwicklung. Die Hemmung der onkogenen Tyrosinkinase durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) entspricht dem inaktiven Zustand des BZR und führt entsprechend zu einer Abschwächung der BZR-Signalstärke unter den minimalen Schwellenwert für die Überlebenssignalisierung [Roberts et al., 2014; Irving et al., 2014; Geng et al., 2015; Tiacci et al., 2015]. Wie normale B-Zellen sind auch maligne B-Zellen von den Überlebenssignalen eines funktionellen B-Zell-Rezeptors oder seiner onkogenen Nachahmung abhängig. Trotz maligner Transformation sind die B-Zell-Autoimmunitätskontrollpunkte zur negativen Selektion und Eliminierung autoreaktiver B-Zell-Klone weiterhin funktionsfähig. So verursacht die Rekonstitution der BZR-Signalgebung in prä-B-ALL-Zellen mit onkogener BZR-Nachahmung (beispielsweise durch BCR-ABL) einen schnellen Zelltod [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015].



**Abbildung 14: Der Einfluss der B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und seiner onkogenen Nachahmung auf die klonale Selektion von normalen und malignen B-Zellen.** Basierend auf der Rekrutierung von BZR-assoziierten Tyrosinkinase (z.B. Syk) an die ITAMs der BZR-Immunglobuline  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$  wird das BZR-Signal in der Folge durch den PI3K/AKT- und ERK-Signalweg verstärkt. Auf der anderen Seite werden Phosphatasen (wie SHIP1) an die ITIMs der inhibitorischen Rezeptoren zur Abschwächung der BZR-Signalgebung rekrutiert. Bei B-Zellen, die keinen funktionellen BZR exprimieren und eine geringe Signalstärke von Syk, des PI3K/AKT- oder des ERK-Signalwegs aufweisen (beispielsweise durch TKI-Behandlung), fallen die kritischen Überlebenssignale unter eine Mindestschwelle und die Zellen sterben aufgrund der fehlenden positiven Selektion (*death by neglect*; Tod durch Vernachlässigung). Demgegenüber führt eine starke Signalgebung durch einen autoreaktiven BZR oder aufgrund der Hyperaktivierung von Syk, des PI3K/AKT- oder des ERK-Signalwegs über einen maximalen Schwellenwert zum Zelltod an Autoimmunitätskontrollpunkten [gemäß Chen et al., 2015].

Als Gegenspieler der BZR-Signalgebung und der Signalgebung von aktivierten Kinasen dienen vielfach Phosphatasen. Nach der Rekrutierung an ITIM-tragenden inhibitorischen Rezeptoren wirken Phosphatasen der aktivierten BZR-Signalgebung oder dessen onkogener Nachahmung entgegen und versuchen diese abzuschwächen [D'Ambrosio et al., 1996; Franks und Cambier, 2018]. In autoreaktiven B-Zellen übertrifft die Hyperaktivierung von bestimmten und zentralen Signalproteinen jedoch die Fähigkeit der inhibitorischen Phosphatasen die Signalstärke auszugleichen und löst eine negative Selektion und den Zelltod an Autoimmunitätskontrollpunkten aus [Trageser et al., 2009]. So ist Syk beispielsweise essentiell für BZR-abhängige Überlebenssignale und die positive Selektion von B-Zellen [Turner et al., 1997]. Die Inhibierung der inhibitorischen Signalgebung, die durch die gezielte Hemmung von bestimmten Phosphatasen (wie SHIP1, PTEN und DUSP6) erzielt werden kann, führt in der Folge zu einer Hyperaktivierung der onkogenen Signalgebung (Syk, PI3K, ERK) vergleichbar mit einem autoreaktiven BZR [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Die resultierende Signalgebung führt dementsprechend zu einer Hyperaktivierung über den maximalen Schwellenwert und zum selektiven Zelltod (Abbildung 15). Als zentraler Effektor bei der BZR-vermittelten Apoptose und der negativen Selektion autoreaktiver B-Zellen dient BIM [Enders et al., 2003]. So führt der Verlust von DUSP6, einem negativen Regulator der ERK-Signalgebung, zu einer ERK-abhängigen Phosphorylierung von BIM und einer damit verbundenen pro-apoptotischen-Signalgebung [Shojaee et al., 2015; Stang et al., 2009].



**Abbildung 15: Der Einfluss von Phosphatasen auf die B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und die klonale Selektion von B-Zellen.** Inhibitorische Phosphatasen können die Signalstärke von aktivierten Signalproteinen und Signalwegen abschwächen und die negative Selektion und den Zelltod an den Autoimmunitätskontrollpunkten verhindern. Die verstärkte Expression der inhibitorischen Phosphatasen könnte in der Folge somit den Schwellenwert für die Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung anheben und autoreaktiven B-Zellen helfen der negativen Selektion zu entgehen. Die Inhibierung dieser Phosphatasen (wie SHIP1) könnte somit die Signalschwelle senken. Die Hemmung der onkogenen Tyrosinkinasen durch Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) führt konsequenterweise zu einer Abschwächung der BZR-Signalstärke unter den minimalen Schwellenwert für die Überlebenssignalisierung. Die gezielte Hyperaktivierung von Signalproteinen und Signalwegen über eine maximale Signalschwelle löst eine Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung wie bei autoreaktiven B-Zellen aus und führt zur negativen Selektion dieser Zellen [gemäß Chen et al., 2015].

Für die autonome Überlebenssignalisierung, ausgehend von einem funktionellen prä-BZR, ist die Zelle auf eine produktive V (D) J-Rekombination zur Expression einer Immunglobulin- $\mu$ -Schwerkette ( $\mu$ HC) als auch auf eine erfolgreiche Paarung von Surrogat-Leichtketten (SLC) mit  $\mu$ -Schwerketten, zur Vernetzung benachbarter Rezeptormoleküle, angewiesen [Karasuyama et al., 1990; Ohnishi und Melchers, 2003; Young et al., 2015]. Die Surrogat-

Leichtketten setzen sich wiederum aus VpreB- und  $\lambda 5$ -Untereinheiten zusammen [Sakaguchi und Melchers, 1986; Kudo und Melchers, 1987]. Eine fehlerhafte prä-BZR-Expression in prä-B-ALL-Zellen ist häufig das Ergebnis nicht produktiver Umlagerungen und einer Herunterregulierung der Ig $\alpha$ - und Ig $\beta$ -Signalketten [Lam et al., 1997; Kraus et al., 2004; Trageser et al., 2009]. Die Bedeutung der Autoimmunitätskontrollpunkte zeigt sich insbesondere in den frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung [Minegishi und Conley, 2001; Pelanda und Torres, 2012]. Hier stehen prä-B-Zellen unter starkem selektivem Druck und erleiden während der verschiedenen Runden der Rekombination häufig eine DNA-Schädigung [Schuler et al., 2017]. In der Folge exprimieren bis zu 75 % der frühen humanen B-Zell-Vorläufer selbstreaktive B-Zell-Rezeptoren [Wardemann et al., 2003]. Autoreaktive  $\mu$ -Schwerketten führen zu starken prä-BZR-Signalen aufgrund der Wechselwirkung mit dem ubiquitären Selbstantigen [Shojaee et al., 2016]. Die autoreaktiven prä-B-Zellklone werden jedoch erst durch die Surrogat-Leichtketten zensiert und in der Folge notwendigerweise an den Autoimmunitätskontrollpunkten negativ selektiert [Keenan et al., 2008; Ren et al., 2015; Grimsholm et al., 2015]. Diese zentralen B-Zell-Toleranz-Kontrollpunkte sind bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen defekt. Die onkogene Aktivierung von BZR-abhängigen Überlebenssignalen kann auch durch Mutationen erfolgen. Diese können zu einer erhöhten Expression und Aktivität des BZR und seiner Signalkomponenten führen [Young und Staudt, 2013; Kersseboom et al., 2010].

Weiterführend ist sowohl die konstante Aktivierung des BZR durch Selbstantigene als auch SHIP1 für die Aufrechterhaltung der Anergie erforderlich [Goodnow et al., 1991; Gauld et al., 2005; Getahun et al., 2016]. Phosphorylierte ITIM-Motive vermitteln die Rekrutierung und Aktivierung von SHIP1. SHIP1 wirkt durch die negative Rückkopplungsschleife auf die Stärke und Dauer der anfänglichen Reaktion, ausgehend von dem Antigen, entgegen [Ono et al., 1997]. Lyn spielt dabei nicht nur eine Rolle bei der Aktivierung der B-Zelle, sondern fördert zudem auch die Aktivität von regulatorischen Signalwegen, beispielsweise durch Tyrosinphosphorylierung von Rezeptoren mit ITIM-tragenden inhibitorischen Motiven [Smith et al., 1998; Nishizumi et al., 1998; Gross et al., 2009]. Anergische B-Zellen besitzen eine viel kürzere Halbwertszeit (~ 5 Tage) als ihre naiven Gegenstücke (~ 40 Tage). In der normalen Peripherie sind ungefähr 5–7 % der B-Zellen anerg [Merrell et al., 2006; Duty et al., 2009; Quách et al., 2011]. Basierend darauf wird geschätzt, dass bis zu 50 % der neu gebildeten autoreaktiven B-Zellen ein anergisches Verhalten zeigen [Merrell et al., 2006]. Der Verlust von SHIP1 wandelt die Reaktion auf ein Selbstantigen von Anergie in eine B-Zell-Aktivierung um und kann zu einer Autoimmunität führen [Merrell et al., 2006; Maxwell et al., 2011; O'Neill et al., 2011].

### 2.7.2 Der Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Selektion von B-Zellen

Prä-B-ALL-Klone tragen häufig genetische Läsionen der Transkriptionsfaktoren PAX5, IKZF1 und EBF [Chan und Müschen, 2017; Mullighan et al., 2008a]. Diese Transkriptionsfaktoren steuern die Expression von prä-BZR-Komponenten [Sabbattini et al., 2001; Reynaud et al., 2008; Chan et al., 2017]. Zudem sind sie für die transkriptionelle Repression von Glukose- und den Energiestoffwechsel verantwortlich [Chan et al., 2017].

Die Energieversorgung in B-Zellen ist konstitutiv niedrig [Waters et al., 2018; Chan et al., 2017]. Dieser chronische Energieentzug wird jedoch während der Aktivierung der B-Zellen



über den BZR oder nach Wechselwirkung mit T-Zellen vorübergehend aufgehoben [Waters et al., 2018; Chan et al., 2017; Xiao et al., 2018]. Die Aktivierung von B-Zellen und die Produktion von Antikörpern erfordert einen erhöhten Energiebedarf der B-Zelle [Caro-Maldonado et al., 2014; Akkaya et al., 2018]. Hierzu bedarf es einer dynamischen Umprogrammierung des Stoffwechsels der Zelle [Waters et al., 2018]. Eine starke Erhöhung der Energieversorgung ermöglicht die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion der B-Zelle während normaler Immunantworten. Es birgt jedoch auch das Risiko einer permanenten Hyperaktivierung der Signalübertragung, ausgehend von einem autoreaktiven BZR oder eines transformierenden Onkogens, was dann die Autoimmunität oder die maligne Transformation der Zelle fördern könnte [Wang et al., 2019; Chan und Müschen, 2017].

Sowohl autoreaktive B-Zell-Rezeptoren als auch onkogene Kinasen verbrauchen ATP und erhöhen den Energiebedarf von prä-malignen B-Zellen. Sofern die Transkriptionsfaktoren den Energiebedarf streng regulieren können, werden autoreaktive oder prä-maligne B-Zellen negativ selektiert und sterben an der Energiekrise [Liu et al., 2014; Chan et al., 2017; Shojaee et al., 2016; Martin-Lorenzo et al., 2018; Xiao et al., 2018]. Die intrinsische Beschränkung von ATP dient somit als Sicherung zur Eliminierung von autoreaktiven oder prä-malignen B-Zellen. Sowohl das autoreaktive BZR-Signal als auch die pharmakologische AIC-Aktivierung führen zur gleichzeitigen Hyperaktivierung mehrerer Kinasen stromabwärts des BZR, was den ATP-Verbrauch akut erhöht und zu Energiestress führt [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Sowohl bei der Autoimmunität als auch bei der malignen Transformation legt die den B-Zellen zugeführte Energiemenge den Schwellenwert für die negative Selektion fest und hat damit einen Einfluss auf die Eliminierung von autoreaktiven und prä-malignen B-Zellen.

PAX5, EBF1 und IKZF1 begrenzen die Glukose- und Energieversorgung in B-Zellen auf Werte, die für die maligne Transformation nicht ausreichen [Chan et al., 2017; Martin-Lorenzo et al., 2018]. Hierbei werden die Glukosetransporter GLUT1, GLUT3, GLUT6 und der Insulinrezeptor INSR transkriptionell unterdrückt. Dagegen werden Faktoren, die den Glukosetransport negativ regulieren (NR3C1, CNR2 und TXNIP), transkriptionell aktiviert [Chan et al., 2017; Marke et al., 2016]. Dies führt in der Folge zu konstitutiv niedrigen Energieniveaus und hohen AMP/ATP-Verhältnissen. Dominant-negative Mutanten von PAX5 und IKZF1 lindern die Glukose- und Energierestriktion hingegen [Chan et al., 2017].

Diese dynamischen Änderungen der AMP/ATP-Verhältnisse werden von der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), einem Energiestresssensor, erfasst [Zhang et al., 2017; Wu et al., 2013]. Als Reaktion auf hohe AMP/ATP-Verhältnisse stimuliert die AMPK die Glukoseversorgung, um die Energieversorgung aufrechtzuerhalten. Ein erhöhter Energieaufwand kann das Ergebnis einer übermäßigen Aktivierung von Kinasen sein, die entweder einem autoreaktiven BZR oder genetischen Läsionen nachgeschaltet sind, die zu einer onkogenen Aktivierung der Kinase-Signalübertragung führen.

Normale B-Zellen erwerben bzw. entwickeln im frühen Kindesalter und später im Leben häufig potenziell onkogene Läsionen. So werden prä-leukämische B-Zellklone mit onkogenen Läsionen (BCR-ABL, MLL-AF4 und ETV6-RUNX1) häufig in Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen gefunden [Gale et al., 1997; Wiemels et al., 1999; Cazzaniga et al., 2011; Martin-Lorenzo et al., 2018]. Darüber hinaus sind stille Onkogene, wie BCR-ABL und KRAS häufig in kleinen Fraktionen normaler B-Zellen bei gesunden Erwachsenen und Kindern zu finden [Biernaux et al., 1995; Bose et al., 1998; Takagi et al., 2011]. In malignen

Erkrankungen benötigen diese Läsionen für ihre vollständige Aktivierung einen dramatischen Anspruch an Energiezufuhr und zellulären ATP. Daher ist die Einschränkung des Glukosetransports und der Energieversorgung durch B-Zell-Transkriptionsfaktoren entscheidend, um die onkogene Signalübertragung und die maligne Transformation von B-Zellen zu verhindern und stille prä-leukämische Klone, die potenziell onkogene Läsionen (BCR-ABL) tragen, in einem latenten Zustand zu halten.

Neben den Transkriptionsfaktoren, welche die Glukose- und Energieversorgung der Zelle transkriptionell kontrollieren, versuchen Phosphatasen den Energieverbrauch der Kinasen auszugleichen [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Aufgrund der negativen Regulation des ATP-Verbrauchs durch inhibitorische Phosphatasen stabilisieren diese jedoch auch die Energiereserve der Zelle und verhindern somit eventuell eine negative Selektion der Zelle auf der Grundlage hyperaktiver BZR-Signale.

Eine permanente Hyperaktivierung der BZR-Signalgebung, beispielsweise durch Onkogene wie BCR-ABL und RAS, führt zu zusätzlichen metabolischen Anforderungen an die Glukose- und Energieversorgung. Eine gezielte Hemmung von Phosphatasen, die für die Beschränkung des ATP-Verbrauchs von Bedeutung sind, kann das ATP-Defizit verschlimmern und die Zelle in die Energiekrise und in letzter Konsequenz zum Zelltod führen [Shojaee et al., 2016]. Folglich müssen robuste Mechanismen vorhanden sein, die entweder die vollständige Aktivierung onkogener Kinasen verhindern oder die Energieversorgung der prä-malignen Zellen auf Werte beschränken, die zu niedrig sind, um eine offensichtliche maligne B-Zell-Transformation zu bewirken.

## 2.8 Zielsetzung

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Krebserkrankung und zugleich die häufigste krebsbedingte Todesursache im Kindesalter und stellt heute trotz erheblich gesteigerter Heilungschancen vor allem bei Patienten einer Hochrisikogruppe immer noch eine schlechte Prognose dar. Zudem kommt es durch die Auswirkungen der aggressiven Chemotherapie vielfach zum Auftreten von sekundären Tumoren und damit zu erheblichen Einschränkungen in der Qualität und der Dauer des Lebens der Patienten. Die umfassende Charakterisierung von Signalnetzwerken und die Identifikation wichtiger Proteine, die als Regulatoren für die Hemmung des Wachstums und des Überlebens der Tumorzelle entscheidende Impulse geben, ist daher von außerordentlicher Notwendigkeit für unser Verständnis der Tumorerkrankung. In dem Krankheitsbild der ALL kann der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als eine häufig konstitutiv aktivierte Schaltstelle identifiziert werden. Trotz des Wissens über die therapeutische Bedeutsamkeit des Signalwegs fallen die Ergebnisse klinisch wirksamer Behandlungsstrategien für die ALL bisher außerordentlich ernüchternd aus. Die humane Inositol-5-Phosphatase SHIP1 dient als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs. Wenig ist bisher jedoch über die Rolle von SHIP1 bei der Erkrankung der ALL des Kindesalters bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb die Funktion von SHIP1 für die Leukämogenese der ALL des Kindesalters untersucht werden. Hierzu sollen primäre ALL-Patientenproben auf mRNA-

und Protein-Ebene hinsichtlich der Expression von SHIP1 analysiert werden. Hierbei sind vor allem Patientenproben mit einem Verlust oder einer Reduktion der SHIP1-Expression von großem Interesse, da der Verlust von SHIP1 mit einem vermehrten Wachstum der erkrankten Zellen korrelieren könnte. Außerdem sollen die Ursachen eines möglichen Verlustes der SHIP1-Expression untersucht werden. Dazu sollen Mutationen und putative Modifikationsstellen von SHIP1 tiefergehend charakterisiert werden. Möglicherweise könnte auch die Hochregulation von SHIP1 in einem Teil der B-ALL-Gruppen von Interesse sein.

Gemäß dem Modell der B-Zell-Selektion durch klonale Eliminierung könnte die Hyperaktivierung der B-Zell-Rezeptor-Signalgebung oder seiner onkogenen Nachahmung über einen maximalen Schwellenwert zum selektiven Zelltod führen. Entsprechend könnten hohe Expressionsniveaus von SHIP1 in B-ALL-Zellen dazu führen, dass der Schwellenwert für die Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung angehoben wird und Zellen mit onkogener Signalgebung einer negativen Selektion entkommen. Insbesondere soll untersucht werden, ob die dominant-negative Isoform 6 des Transkriptionsfaktors Ikaros, die in einem erheblichen Anteil der Patienten mit einer BCR-ABL-positiven B-ALL identifiziert werden konnte, einen regulativen Einfluss auf die SHIP1-Expression und damit auf das Überleben von B-ALL-Zellen hat. Weiterhin sollen die zellbiologischen Effekte nach Herunterregulation der SHIP1-Expression in ALL-Zellen untersucht werden. Hierzu soll mittels lentiviraler Transduktion durch gezielte und stabile Herunterregulation der SHIP1-Expression der Einfluss auf die Signaltransduktion und die damit verbundene Veränderung des Zellwachstums in B-ALL-Zellen untersucht werden.

Außerdem sind drei AKT-Isoformen bekannt mit unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen, Wirkungen auf das Wachstum von Tumorzellen. Deshalb soll ein AKT-Isoform-spezifischer Knockdown zur Untersuchung der differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen in ALL Zellen durchgeführt werden. Diese Untersuchung ist in Hinsicht auf die möglicherweise differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen und dem damit verbundenen Verständnis zur Etablierung einer neuen Behandlungsstrategie mit AKT-isoformspezifischen Inhibitoren der ALL von Bedeutung.

Darüber hinaus soll eine kombinierte Therapie der ALL mit Hemmstoffen gegen den AKT-mTOR-Signalweg und gegen bereits bekannte aberrant aktivierte Tyrosinkinase-Targets etabliert werden. Hierbei sollen die Effekte einer kombinierten Therapie im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien auf das Wachstum von ALL-Zellen analysiert werden.

Zusammenfassend soll mit dieser Arbeit ein besseres Verständnis für die Rolle von SHIP1 und den AKT-Isoformen bei der ALL gewonnen werden, die zukünftig eine Grundlage für eine neue gezielte Therapie der ALL bilden soll.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

##### Bakterienmedien:

Alle Medien werden, wenn nicht anders beschrieben, bei 121°C und 2,1 bar für 20 Minuten autoklaviert. Temperatursensible Medienzusätze wie Antibiotika oder andere Substanzen werden separat sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugesetzt.

LB-Medium	10 g/l 10 g/l 5 g/l	Bacto-Trypton NaCl Hefeextrakt pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren
Agar-Platten	10 g/l 10 g/l 5 g/l 15 g/l	Bacto-Trypton NaCl Hefeextrakt pH 7,2 mit NaOH einstellen, autoklavieren und ausplattieren

##### Medienzusätze:

Kanamycin-Stocklösung	50 mg/ml	Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O lösen sterilfiltrieren und bei – 20 °C lagern
Tetracyclin-Stocklösung	5 mg/ml	Tetracyclin in ddH <sub>2</sub> O lösen sterilfiltrieren und bei – 20 °C lagern
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml	Kanamycin in ddH <sub>2</sub> O lösen sterilfiltrieren und bei – 20 °C lagern

#### 3.1.2 Bakterienstämme

XL1-Blue (*E. coli*):

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZDM15 Tn10* (Tetr)] [Bullock *et al.*, 1987]. Der Stamm dient für die Transformation im Zusammenhang mit EGFP-Vektoren.

DH10B (*E. coli*):

*F<sup>-</sup> endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL ΔlacX74 ΦF80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrrhsdRMS-mcrBC) λ* [Grant *et al.*, 1990]. Der Stamm dient für die Transformation im Zusammenhang mit LeGO-Vektoren.

### 3.1.3 Puffer für die Herstellung von kompetenten Zellen

RF I	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	15 % (w/v)	Glycerol
		pH 5,8 mit Acetat einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern
RF II	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	15 % (v/v)	Glycerol
		pH 6,8 mit Acetat einstellen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern

### 3.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) erworben.

#### *Sequenzierungsoligonukleotide:*

Sequenzierungs-Oligonukleotide für die cDNA von SHIP1:

SHIP-FP 82-105 5'-TTCCTCGTGCGTGCCAGCGAGTCC-3'  
 SHIP-RP 215-239 5'-TCCAGCTTGGTGAAGAACCTCATGG-3'  
 SHIP-FP 693-717 5'-GTCTCTGCAGAGGTTATTTGACCAG-3'  
 SHIP-FP 1070-1093 5'-TGATCTTGGTGGAAACAGAGAAGG-3'  
 SHIP-FP 1394-1418 5'-AACACTCCCTGCAAGAAATCACCAG-3'  
 SHIP-FP 2186-2210 5'-AGATTGAGTTTCTCAGGTGCTATGC-3'  
 SHIP-FP 3012-3022 5'-TCAGGAGGACCTGCCGCTGACG-3'

Sequenzierungs-Oligonukleotide zur Untersuchung der MCS:

LeGO-IG2-Puro-Vektor

LeGO\_MCS-FP 5'- AGCTCTATAAAAGAGCTCACAACC-3'  
 LeGO\_MCS-RP 5'- TTCCAAGCGGCTTCGGCCAGTAAC-3'

pGEM-TEasy-Klonierungsvektor

TEasy\_MCS-FP 5'- CGAATTGGGCCCGACGTCGCATGC-3'  
 TEasy\_MCS-RP 5'- TGGGAGCTCTCCCATATGGTCGAC-3'

pDNR-Dual-Vektor

pDNR-Dual\_MCS-FP 5'- AGCATACATTATACGAAGTTATCA-3'  
 pDNR-Dual\_MCS-RP 5'- TGGGCCCGCGCGCCAAACGAATGG-3'

**qPCR-Oligonukleotide:****GAPDH**

GAPDH-FP 5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'  
GAPDH-RP 5'- TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'

**SHIP1 3'-Region, downstream des ORF:**

SHIP1 C2-FP 5'- GGAAATCAGCTCCTATTCTCCA-3'  
SHIP1 C2-RP 5'- CACACACCACTGGATTAGCTC-3'

**SHIP1 SH2-Domäne:**

SHIP N2-FP 5'- TGCCTGCTGTATCGGAATTG-3'  
SHIP N2-RP 5'- GCACAGGGTATTGCAGATGG-3'

**SHIP1-HA-Tag:**

SHIP1 HA1-FP 5'- CCTATGACGTGCCCCGACTATGC-3'  
SHIP1 N1-RP 5'- AGCGGCACAGGGTATTGCAGATGGGTC-3'

**Mutagenese-Oligonukleotide:****SHIP1-Mutationen:****R673Q**

R673Q-FP: 5'- ACTTGCCTTCCTGGTGTGACCAAGTCCTCTGGAAGTCTTATCC-3'  
R673Q-RP: 5'- GGATAAGACTTCCAGAGGACTTGGTCACACCAGGAAGGCAAGT-3'

**Y864A**

Y864A-FP: 5'- ACGAGGGAGAAGCTCGCTGACTTTGTGAAGACG -3'  
Y864A-RP: 5'- CGTCTTCACAAAGTCAGCGAGCTTCTCCCTCGT -3'

**Y914A**

Y914A-FP: 5'- ATCATCAACCCCAACGCCATGGGAGTGGGGCCC -3'  
Y914A-RP: 5'- GGGCCCCACTCCCATGGCGTTGGGGTTGATGAT -3'

**Y1021A**

Y1021A-FP: 5'- TTTGAGAACCCCTGGCTGGGTCCCTGAGTTCC-3'  
Y1021A-RP: 5'- GGAACTCAGGGACCCAGCCAGGGGGTTCTCAA-3'

Alle Primer zur Untersuchung des FLVR-Motivs finden sich in der Publikation Ehm et al., 2019.

**Ikaros-Mutation:****IK6-Isoform**

IK6-FP: 5'- TCCAAGAGTGACAGAGTCGTGGGGGACAAGGGCCTGTCCGAC-3'  
IK6-RP: 5'- GTCGGACAGGCCCTTGTCCCCACGACTCTGTCACTCTTGGA-3'

**Ikaros Amplifikations-Oligonukleotide:**

IKZF1-FP : 5'-  
ATGCGGCCGCGCCACCATGGCGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGATGCTGA  
TGAGGGTCAAGAC-3'  
IKZF1-RP : 5'- TAGCGGCCGCTCAGCTCATGTGGAAGCGGTGCTC -3'

### 3.1.5 Vektoren

Konstrukt	Klonnummer	Quelle/Hersteller
pCDNA3.1(+) Leer-Vektor	V79020	Invitrogen
pCDNA3.1(+) Fyn		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) HCK		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) LCK		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) BLK		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) FGR		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) YES		A.Pernudi Ubau, 2013
pCDNA3.1(+) LYN		A.Pernudi Ubau, 2013
pCMV6-AC-IHRES-GFP Leer-Vektor	PS100027	Origene
pCMV6-AC-IRES-GFP BCR-ABL		S. Buhs/KIKZ
pCMV6-AC-IRES-GFP Src		S. Buhs/KIKZ
pCMV6-AC-IRES-GFP Src 529*		S. Buhs/KIKZ
pCMV-VSV-G	8454	Adgene
pMDLg/pRRE (GAG/Pol)	12251	Adgene
pRSV-Rev	12253	Adgene
pLKO.1 Vektor	Sigma SHC001	Sigma-Aldrich
pLKO.1 scr-GFP		A.Pernudi Ubau, 2013
pLKO.1 shLyn-GFP		A.Pernudi Ubau, 2013
pLKO.1-puro scr	Sigma SHC002	Sigma-Aldrich
pLKO.1-puro shSHIP1 (shRNA1)	Sigma TRC 10362	Sigma-Aldrich/P.Ehm
pLKO.1-puro shAKT1	Sigma TRC 39797	A. Grottke, UKE
pLKO.1-puro shAKT2	Sigma TRC 39970	A. Grottke, UKE
pLKO.1-puro shAKT3	Sigma TRC 39890	A. Grottke, UKE
pLKO.1-neo scr	Sigma SHC002	A. Grottke, UKE
pLKO.1-neo shAKT1	Sigma TRC 39797	A. Grottke, UKE
pLKO.1-neo shAKT2	Sigma TRC 39970	A. Grottke, UKE
pLKO.1-neo shAKT3	Sigma TRC 39890	A. Grottke, UKE
LeGO-iV2-Puro+ Luc2		K. Riecken, UKE
LeGO-Neo Luc2		K. Riecken, UKE
LeGO-iG2-Puro+ Leer-Vektor	Weber et al., 2008	K. Riecken, UKE
LeGO-iG2-Puro+ Ikaros	PlasmID ID: HSCD00002517	P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ Ikaros 6		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1wt	Ehm et al., 2015	P. Ehm/Masterarbeit
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 K24R		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S27A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S27D		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28L		P. Ehm/Masterarbeit
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28I		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28V		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28Y		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 F28W		P. Ehm

LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 L29F		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 R31Q		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 delta FLVR		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S33A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S33D		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S35A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 S35D		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y40A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y46A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y643H		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 D672A		P. Ehm/Masterarbeit
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 R673Q		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y864A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y914A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y1021A		P. Ehm
LeGO-iG2-Puro+ SHIP1 Y914A+Y1021A		P. Ehm

### 3.1.6 Zelllinien

Alle Angaben zu den verwendeten Zelllinien wurden aus der Datenbank des Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) oder der *American Type Culture Collection* (ATCC) entnommen.

Zelllinie	Quelle	Anmerkung
697	DSMZ; ACC 42	humane B-Zellvorläuferleukämie ( <i>common</i> (c)-ALL). 1979 etabliert aus dem Knochenmark eines 12-jährigen Jungen. Translokation t(1;19) E2A-PBX
MHH-CALL-3	DSMZ; ACC 339	humane B-Zellvorläuferleukämie (prä-B-ALL). 1993 etabliert aus dem Knochenmark eines 11-jährigen Mädchens. Translokation t(1;19) E2A-PBX
Nalm-6	DSMZ; ACC 128	humane B-Zellvorläuferleukämie. 1976 etabliert aus dem peripheren Blut eines 19-jährigen Mannes. Translokation t(5;12) TEL-PDGFR $\beta$
REH	DSMZ; ACC 22	humane B-Zellvorläuferleukämie. 1973 etabliert aus dem peripheren Blut eines 15-jährigen Mädchens. Translokation t(12;21) ETV6-RUNX1
SEM	DSMZ; ACC 546	humane B-Zellvorläuferleukämie. 1990 etabliert aus dem peripheren Blut eines 5-jährigen Mädchens. Translokation t(4;11) MLL-AF4
SupB-15	DSMZ; ACC 389	humane B-Zellvorläuferleukämie. 1984 etabliert aus dem Knochenmark eines 9-jährigen Jungen. Translokation t(9;22) m-bcr BCR-ABL1 (e1-a2)



CCRF-CEM	DSMZ; ACC 240	humane T-ALL. 1964 etabliert aus dem peripheren Blut eines 3-jährigen Mädchens. Exprimiert NKX2-5.
Jurkat	DSMZ; ACC 282	humane T-ALL-Zelllinie. 1976 etabliert aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit ALL.
K-562	DSMZ; ACC 10	1970 etabliert aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau mit CML in der Blastenkrise. Translokation t(9;22) BCR-ABL1 (e14-a2)
MOLM-13	DSMZ; ACC 554	1995 etabliert aus dem peripheren Blut eine 20-jährigen Jungen mit AML. Exprimiert Flt3-ITD. Besitzt die Cbl delta Exon 8 Mutation.
MV4-11	DSMZ; ACC 102	humane akute myeloische Leukämie. Translokation t(4;11) MLL-AF4. Exprimiert Flt3-ITD
TF-1	DSMZ; ACC 334	humane Erythroleukämie-Zelllinie. 1987 etabliert aus dem Knochenmark eines 35-jährigen Mannes mit Erythroleukämie (AML M6). Zellen proliferieren GM-CSF- abhängig.
NCI-H1299	ATCC No. CRL-5803	humane, epitheliale Lungenkarzinomzellen. Die Zellen besitzen eine homozygote Teil-Deletion des p53 Gens und exprimieren kein p53 Protein
Sk-ChA1	Dr. Knuth, Zürich	Humane Cholangiokarzinom-Zelllinie. Abgeleitet von den Metastasen einer 47-jährigen Frau.
HEK-293T	DSMZ; ACC 635	humane embryonale Nierenzellen. Diese Zellen tragen ein Plasmid mit dem großen SV-40 T-Antigen.

### 3.1.7 Patientenmaterial

Die cDNA und Proteinlysate von primären B-ALL Patientenzellen wurden von Herrn Prof. Dr. Horstmann, Herrn Dr. K. Dierk, Frau Dr. Ann-Christin Puller und Frau R. Rietow (alle AG Horstmann; KIKZ Hamburg) zur Verfügung gestellt.

### 3.1.8 Reagenzien, Puffer und Lösungen für die eukaryotische Zellkultur

DMEM, RPMI, IMDM, FCS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, 0,05 % Trypsin-EDTA, Lipofectamin 3000, OptiMEM und HEPES wurden von Gibco/Invitrogen bezogen. Natriumpyruvat, Puromycin dihydrochloride, G418 Disulfatsalz, Trypanblau-Lösung und Polybren wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

1 x PBS	137 mM 2,7 mM 6,46 mM 1,47 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 einstellen und autoklavieren
DMEM Vollmedium	10 % (v/v) 1 % (v/v)	DMEM Medium FCS Penicillin/Streptomycin
RPMI Vollmedium	10-20 % (v/v) 1 % (v/v)	RPMI Medium+GlutaMaxI FCS Penicillin/Streptomycin
IMDM Vollmedium	20 % (v/v) 1 % (v/v)	IMDM Medium+GlutaMaxI FCS Penicillin/Streptomycin
HEK293T-DMEM Vollmedium	10 % (v/v) 1 % (v/v) 2 mM 1 mM 20 mM	DMEM Medium FCS Penicillin/Streptomycin L-Glutamin Natriumpyruvat HEPES

### 3.1.9 Inhibitoren

Inhibitor	Stamm-Konzentration	Finale-Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller	Art	Gegen
MG-132	10 mM	10-20 µM	6h	Calbiochem	proteasomale Komponenten	proteasomaler Abbau
PP2	10 mM	0,1-10 µM	24h	Calbiochem	ATP-kompetitiv	Src-Kinasen
Imatinib	10 mM	0,25-5 µM	48h	LC Laboratories	ATP-kompetitiv	BCR-ABL
Flt3 III	10 mM	0,05-2,8 µM	48h	Calbiochem	ATP-kompetitiv	Flt3
MK2206	5 mM	100-250 nM	48h	Merck	allosterisch	pan AKT
RAD001	1 mM	0,2-1,6 nM	48h	Sellekchem	allosterisch	mTOR
CX4945	10 mM	0,5-10 µM	24h	Abcam	ATP-kompetitiv	CK2, AKT-S129

Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst.

### 3.1.10 Antikörper

Antigen	Klon	Firma	Bestell-Nr.	Spezies
AKT1	C73H10	Cell Signaling	2938	Kaninchen
AKT2	5B5	Cell Signaling	2964	Kaninchen
AKT3/PKBy	GMA104	Millipore	05-780	Maus
Btk	C82B8	Cell Signaling	3533	Kaninchen
Cbl	C-15	Santa Cruz	sc-170	Kaninchen
CK2 alpha	-	Cell Signaling	2656	Kaninchen
c-myc	9E10	Santa Cruz	sc-40	Maus
Fibrillarin	-	Abcam	ab5821	Kaninchen
FLAG	M2	Sigma	F1804	Maus

Flt-3/Flk-2	C-20	Santa Cruz	sc-479	Kaninchen
GAPDH	6C5	Santa Cruz	sc-32233	Maus
GFP	7.1/13.1	Roche	11814460001	Maus
GSK-3beta	27C10	Cell Signaling	9315	Kaninchen
HA-Tag	3F10	Roche	11867431001	Ratte
HSC70	B-6	Santa Cruz	sc-7298	Maus
Ikaros	H100	Santa Cruz	sc-13039	Kaninchen
IRF4	H-140	Santa Cruz	sc-28696	Kaninchen
Lyn	H-6	Santa Cruz	sc-7274	Maus
Lyn	C13F9	Cell Signaling	2796	Kaninchen
mTOR	7C10	Cell Signaling	2983	Kaninchen
p38 MAPK	-	Cell Signaling	9212	Kaninchen
pan-AKT	11E7	Cell Signaling	4685	Kaninchen
PARP	-	Cell Signaling	9542	Kaninchen
Phospho BTK Y223	-	Cell Signaling	5082	Kaninchen
Phospho CK2 Substrat [(pS/pT)DXE]	-	Cell Signaling	8738	Kaninchen
Phospho c-kit Y719	-	Cell Signaling	3391	Kaninchen
Phospho FES Y713	-	Kinexus	PK632	Kaninchen
Phospho AKT S473	D9E	Cell Signaling	4060	Kaninchen
Phospho AKT T308	D25E6	Cell Signaling	13038	Kaninchen
Phospho AKT1 S473	D7F10	Cell Signaling	9018	Kaninchen
Phospho AKT2 S474	D3H2	Cell Signaling	8599	Kaninchen
Phospho EGF Receptor Y1068	D7A5	Cell Signaling	3777	Kaninchen
Phospho GSK-3beta S9	-	Cell Signaling	9336	Kaninchen
Phospho NF-kappaB p65 S536	93H1	Cell Signaling	3033	Kaninchen
Phospho p38 MAPK Y180/Y182	-	Cell Signaling	9211	Kaninchen
Phospho S6 Ribosomal Protein S240/244	-	Cell Signaling	2215	Kaninchen
Phospho Src Family Y416	D4964	Cell Signaling	6943	Kaninchen
Phospho Tyr	PY-99	Santa Cruz	sc-7020	Maus
Phospho mTOR S2448	D9C2	Cell Signaling	5536	Kaninchen
Phospho SHIP1 Y1021	-	Cell Signaling	3931	Kaninchen
Phospho Syk Y525/526	C87C1	Cell Signaling	2710	Kaninchen
Pol I/II/III RPB6	B6	Santa Cruz	sc-21751	Maus
PTEN	A2B1	Santa Cruz	sc-7974	Maus
RAG1	K20	Santa Cruz	Sc363	Kaninchen
S6 Ribosomal Protein	5G10	Cell Signaling	2217	Kaninchen
SHIP1	V-19	Santa Cruz	sc-1963	Ziege
SHIP1	P1C1	Santa Cruz	sc-8425	Maus
SHIP2	G-20	Santa Cruz	sc-14504	Ziege
Src	SRC2	Santa Cruz	sc-18	Kaninchen
UBF	F-9	Santa Cruz	sc-13125	Maus
Ubiquitin	P4D1	Cell Signaling	3936	Maus
SHIP1-AF647	P1C1-A5	BioLegend	656608	Maus
CD45-AF488	2D1	BioLegend	368536	Maus
CD45-APC	2D1	BioLegend	368512	Maus
HRP rabbit IgG	-	Cell Signaling	7074	-
HRP mouse IgG	-	Cell Signaling	7076	-
HRP rat	-	Santa Cruz	sc-2006	Ziege
HRP goat	-	Santa Cruz	sc-2056	Esel
Maus IgG-AF 568	-	Invitrogen	A-11004	Ziege
Kaninchen IgG-AF 488	-	Invitrogen	R37118	Esel

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme werden sowohl auf LB-Agar-Nährböden bei 37°C als auch in flüssigem LB-Medium bei 220 rpm und 37°C über Nacht kultiviert. Bakterienkulturen werden dabei stets aus einem einzigen Klon gezüchtet. Hierzu werden die Zellen einer Flüssigkultur entsprechend auf einer Agar-Nährbodenplatte ausgestrichen und vereinzelt. Die Selektion der Bakterien erfolgt mit dem Versetzen von Medium oder Nährboden mit einem entsprechenden selektiven Antibiotikum. Für die Herstellung der Agar-Nährböden und des Mediums werden die Angaben des Herstellers befolgt (Difco LB Broth, Miller). Alle Medien werden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Temperatursensible Medienzusätze wie Antibiotika oder andere Substanzen werden separat sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugesetzt.

#### 3.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Bakterienzellen werden mithilfe von Kalziumchlorid zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt, indem die Kalzium-Ionen zu einer veränderten Durchlässigkeit der Zellmembran führen. Zur Herstellung von chemisch-kompetenten Zellen werden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Bakterienstamm angeimpft. Das Medium wird zudem bei jedem Schritt mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion der transformierten Bakterien versetzt. Die Kultivierung erfolgt im Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C und 220 rpm. Anschließend werden 50 ml LB Medium mit 200 µl der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wird bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,6$ ) bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach beendeter Kultivierung werden die Zellen für 15 min auf Eis gekühlt. Die Bakterien werden anschließend durch Zentrifugation bei 4°C, 1000 x g für 15 min pelletiert. Das Pellet wird daraufhin mit 16,7 ml kaltem RFI-Medium resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Folgenden werden die Zellen wiederholt bei 4°C, 1000 x g für 15 min pelletiert. Der Überstand wird daraufhin verworfen. Das Pellet wird vorsichtig mit 4 ml kaltem RF II-Medium resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.3 Transformation von chemisch-kompetenten Zellen

Bei dem Verfahren der Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli* nach Hanahan [Hanahan, 1983] wird gereinigte, freie DNA zu kompetenten Zellen hinzugegeben. Durch einen induzierten Hitzeschock wird die Membran leicht permeabilisiert, so dass das Bakterium zur Aufnahme der DNA befähigt wird. Weiterhin dient die Methode der Vervielfältigung des durch die zirkuläre Mutagenese modifizierten Plasmids oder des klonierten Plasmids. Nach der

erfolgreichen Aufnahme der DNA werden die bei der zirkulären Mutagenese entstandenen *Nicks* durch das zelleigene Reparatursystem geschlossen, das Plasmid methyliert und repliziert. Ein Aliquot mit 100 µl chemisch kompetenter Zellen wird hierzu für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend werden 2-10 µl von einem Mutagenese Ansatz bzw. 100 ng einer Plasmid DNA zur Retransformation oder der vollständige Ligationsansatz (20 µl) zu den kompetenten Bakterien hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wird gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird anschließend für 60 s bei 42°C im Heizblock inkubiert. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis werden 900 µl LB Medium zur Anzucht der transformierten Zellen hinzugefügt. Die Zellen werden daraufhin für 60 Minuten bei 37 °C und 500 rpm im Tisch-Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend werden unter sterilen Bedingungen 100 µl des Retransformations-Ansatzes, 500 µl des Ligationsansatzes bzw. der gesamte Mutagenese-Ansatz auf LB-Agar-Nährböden-Platten ausgestrichen. Die Nährböden-Platten, die mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum versehen sind, werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase Kettenreaktion nach Mullis [Mullis et al., 1994] dient der gezielten *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente zwischen zwei bekannten, flankierenden Sequenzen. Die Denaturierung der Template-DNA, die normalerweise doppelsträngig vorliegt, erfolgt bei 95°C und gewährleistet die Trennung zu Einzelsträngen. Beim Annealing werden am Anfang und am Ende des spezifischen Abschnitts Oligonukleotide (Primer) hybridisiert. Die Temperatur ist dabei abhängig von den verwendeten Primern und ihrer Sequenz. Die Primer binden komplementär an die entsprechende DNA-Zielsequenz und sind Ausgangspunkt der Bildung eines stabilen DNA-Doppelstranges. Die Primer, die das Template auf je einem Strang flankieren, begrenzen zudem den zu amplifizierenden Bereich. Dieser DNA-Abschnitt wird bei der Elongation unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase, jeweils komplementär, als neuer DNA-Strang synthetisiert. Dabei heftet die DNA-Polymerase Nukleotide an die freien 3'-OH-Enden des Primers. Die Temperatur ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase (ca. 72°C). Die Trennung des neu synthetisierten Doppelstranges, bestehend aus dem Template und dem Syntheseprodukt, erfolgt durch die erneute Erhöhung der Temperatur. Die Bindungsstellen für die nächsten Primer sind somit frei und der Zyklus kann nach dem Absinken der Temperatur von Neuem beginnen. Die Vermehrung der DNA geschieht folglich exponentiell. Als Thermocycler dient der *Mastercycler Gradient/Personal* (Eppendorf).

#### 3.2.2.2 Zirkuläre Mutagenese

Die zirkuläre Mutagenese nach Wang [Wang et al., 1999] ist ein modifiziertes, auf dem *QuikChange*-Mutagenese (QCM) Protokoll (Stratagene) beruhendes, Mutagenese-Verfahren. Die Mutagenese erlaubt die gezielte Veränderung von Plasmid-DNA an beliebig gewünschten Stellen der Sequenz unter Verwendung von Primern, welche die spezifische Mutation tragen.

Für Punktmutationen wird die Basenabfolge des Primers so gewählt, dass der Primer zentral das gewünschte, zur Ausgangssequenz nicht komplementäre, Nukleotid für die Mutation aufweist. Die zu mutierende Stelle ist komplementär flankiert und weist sowohl in 3'-Richtung als auch in 5'-Richtung jeweils circa 15 Basen auf. Für eine Deletion wird der Primer so gewählt, dass die Sequenz wiederum komplementär zu der Ausgangssequenz ist, jedoch zentral ein oder mehrere Nukleotide (deletierende Sequenz) weniger aufweist. Hierbei wird die umrahmte Sequenz während des PCR-Vorganges durch eine entstehende Schlaufe aus der ursprünglichen Template-DNA-Sequenz verdrängt. Im Gegensatz dazu weist die Primersequenz bei einer Insertion zentral ein oder mehrere Nukleotide (insetierte Sequenz) mehr auf. Als Template für die Mutagenese dient zirkuläre, dam-methylierte Doppelstrang-DNA. Dabei lagern sich die zwei zueinander revers-komplementären Primer jeweils an die entsprechenden Sequenzbereiche der Template-DNA an. Die Mutagenese wird zunächst in zwei voneinander getrennten Ansätzen mit je einem Primer durchgeführt damit eine Primerdimerisierung des *forward*- und des *reverse*-Primers verhindert wird. Nach der Vereinigung der beiden Ansätze durchläuft der gemeinsame Ansatz dann weitere Amplifikationszyklen. Die DNA-Polymerase (*Phusion Hot-Start II High-Fidelity DNA-Polymerase*; Thermo Scientific) verlängert die Mutagenese-Primer anhand der Matrix zu einem vollständigen, mutierten DNA-Strang.

Nach der PCR wird dem Ansatz die Restriktionsendonuklease *DpnI* zugesetzt, die spezifisch die methylierte Matrizen-DNA verdaut. *DpnI* hydrolysiert methylierte- und hemimethylierte-DNA an der Zielsequenz 5'-Gm6ATC-3' am Adenin. Durch die anschließende Transformation der neu erhaltenen mutierten und unmethylierten Plasmid-DNA in kompetenten Bakterienzellen werden die Strangbrüche durch das endogene Reparatursystem geschlossen, die DNA methyliert und repliziert. Die mutierte Plasmid-DNA kann im Folgenden durch eine Minipräparation gewonnen werden.

Die zirkuläre Mutagenese erfolgt in zwei getrennten dünnwandigen 0,2 ml PCR-Tube-Ansätzen mit flachem Deckel mit entweder dem *forward*- oder dem *reverse*-Mutagenese-Primer. Das Gesamtvolumen eines PCR-Tube-Ansatzes entspricht 25 µl.

Komponente	Einsatzmenge
ddH <sub>2</sub> O	13 µl
5 x HF Polymerase-Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer F/R (10 µM)	1 µl
Template (10 ng/µl)	5 µl
Phusion-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl

Im Thermocycler werden zunächst zehn prä-PCR Amplifikationszyklen mit folgendem Temperatur-Programm durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	15 s	} 12
Annealing	55°C	60 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	

Nachfolgend werden beide Ansätze in ein PCR-Tube vereinigt, so dass der vereinigte PCR Ansatz anschließend weitere 15 Amplifikationszyklen desselben Programms durchläuft.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	15 s	} 15
Annealing	55°C	60 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	

5 µl des unverdauten Ansatzes werden anschließend als Negativkontrolle für die spätere Agarosegelanalyse entnommen. Die restlichen 45 µl des PCR-Reaktionsansatzes werden mit dem Restriktionsenzym *DpnI* behandelt. Hierzu wird 1 µl *DpnI* (10 U/µl) zu dem Ansatz hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Der Ansatz kann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

### 3.2.2.3 Analytische und präparative Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die sequenzspezifische Hydrolyse von Doppelstrang-DNA werden Restriktionsendonukleasen verwendet, die spezifisch kurze DNA-Sequenzen erkennen und die DNA innerhalb bzw. außerhalb dieser Erkennungssequenz spalten. Abhängig von der verwendeten Restriktionsendonuklease entstehen überhängende Enden oder glatte Enden. Im Falle einer anschließenden Ligation werden überhängende Enden bevorzugt, da die Enden später leichter miteinander hybridisieren können. Die Hydrolysereaktion erfolgt jeweils nach Anweisung des Herstellers mit den empfohlenen Pufferbedingungen und Temperaturen. Die Inkubation erfolgt über 1-3 h bei entsprechender Temperatur im Tischinkubator. Die Hydrolyse wird mit 1 µg DNA durchgeführt.

### 3.2.2.4 Dephosphorylierung von Restriktionsfragmenten durch alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase *CIAP* (*Calf intestinal alkaline phosphatase*; Invitrogen) ist eine Phosphomonoesterase, welche die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA und Nukleotiden katalysiert. Die Dephosphorylierung der linearen Vektor-DNA durch *CIAP* erfolgt vor der Ligation um eine mögliche Rezirkulation und Religation des linearisierten DNA-Fragments (Klonierungsvektor) zu verhindern. Hierzu wird dem Ansatz ein Unit der Phosphatase (*CIAP*) direkt nach der Hydrolyse der DNA hinzugefügt. Der Ansatz wird entsprechend zur Dephosphorylierung der DNA mit 5'-Überhängen für 15 min bei 37°C inkubiert. Eine Hitze-Inaktivierung wird zur Inaktivierung der Phosphatase durchgeführt. Dazu werden zunächst die vorhandenen Magnesium-Ionen mit EDTA komplexiert, bevor der Ansatz für 15 min bei 65 °C inkubiert wird. Die erhaltene DNA kann direkt für die Ligation eingesetzt werden.

### 3.2.2.5 Analytische Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Verwendung von Agarosegelen können Nukleinsäurestränge ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Größe der Poren, die abhängig von der zu trennenden Größe der DNA-Fragmente gewählt wird, wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Poren in Richtung des positiven Pols. Die Geschwindigkeit der DNA-Fragmente verhält sich dabei umgekehrt proportional zu ihrer Größe, so dass kleine Fragmente in der Gelmatrix besser durch die Poren gelangen als große Fragmente. Im UV-Licht werden die getrennten Fragmente sichtbar gemacht. Hierzu werden die Agarose-Gele mit dem Farbstoff Ethidiumbromid versetzt. Die Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA und verändern somit das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid. Im Folgenden wird bei Anregung mit UV-Licht die Intensität der Fluoreszenz-Emission der Substanz stark erhöht. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente wird der prozentuale Anteil von Agarose im Gel gewählt. Für die Auftrennung von niedermolekularen DNA-Fragmenten zwischen 0,5 und 2,0 kb werden hochprozentige Gele mit 2 % Agarose gegossen. Hochmolekulare DNA-Fragmenten zwischen 0,8 und 12 kb werden durch niederprozentige Gele mit 0,5 % - 1 % Agarose aufgetrennt.

Die entsprechende Menge Agarose wird hierfür in 50 ml TAE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf unter 50°C wird die Agaroselösung mit 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. In diesem Zustand wird die Lösung in eine Flachbett-Apparatur mit Kamm (MWG Biotec) ausgegossen. Das Gel wird nach dem Abkühlen und Gelieren der Agarose in die Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (*GeneRuler 1 kb oder 100 bp Plus Ladder*; Thermo Fisher) werden mit 4 µl 6x DNA-Probenpuffer (Thermo Fisher) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 24 µl aufgefüllt. Der DNA-Probenpuffer führt zu einer erhöhten Dichte der Probenlösung, so dass der Ansatz in die Proben tasche sinken kann. Die Auftrennung erfolgt bei circa 85 V. Anschließend werden die getrennten DNA-Fragmente als Banden auf dem UV-Tisch mithilfe des mitgelaufenen Markers analysiert, fotografiert und gegebenenfalls extrahiert und aufgereinigt.

### 3.2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von Doppelstrang-DNA aus Agarosegelen erfolgt mit dem „*NucleoSpin Extract II Kit*“ von Macherey-Nagel und wird gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Hierbei wird die DNA an einer Silikat-Membran selektiv in Gegenwart von chaotropen Salzen (Hochsalzbedingungen) gebunden. Die Agarose mit der gewünschten DNA wird zudem mit den chaotropen Salzen solubilisiert. Durch anschließende Waschschr itte werden Agarose und Salzreste entfernt. Unter Niedrigsalzbedingungen wird die reine DNA mit leicht alkalischem Puffer eluiert. Zur Elution der DNA werden 20 µl 5 mM Tris-Cl mit pH 8,5 verwendet.



### 3.2.2.7 Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten

Die Ligation von Doppelstrang-DNA-Fragmenten erfolgt unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Die Ligase erlaubt DNA-Fragmente mit glatten oder kompatiblen überhängenden Enden zu verbinden. Unter Verbrauch von ATP katalysiert sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe. Der Zielvektor und das zu vereinende DNA-Fragment werden vor der Ligation mit denselben Restriktionsendonukleasen in voneinander getrennten Reaktionen behandelt. Die Produkte werden aus den Agarosegelen extrahiert und aufgereinigt. Die in dieser Arbeit verdauten Fragmente mit überhängenden Enden werden in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor: Insert) eingesetzt und über Nacht mit der T4-Ligase bei 15°C inkubiert.

### 3.2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Die Plasmid-DNA-Isolierungen aus Übernachtskulturen erfolgt entsprechend der Anleitung des *NucleoSpin Plasmid-Kits* der Firma Macherey-Nagel. Die DNA wird mithilfe einer Silikat-Matrix sowohl isoliert als auch aufgereinigt. Unter Verwendung einer NaOH/SDS-Lösung werden die Zellen lysiert. Der empfohlene Waschschrift mit dem AW-Puffer wird stets durchgeführt. Die Elution der an die Matrix gebundenen DNA erfolgt mit 50 µl TE-Puffer.

### 3.2.2.9 Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Präparation)

Die Plasmid-DNA Maxi-Präparation erfolgt entsprechend der Anleitung des *NucleoBond Xtra Midi/Maxi-Kits* für *High-Copy* Plasmide der Firma Macherey-Nagel. Die DNA wird mithilfe einer Silikat-Matrix isoliert und aufgereinigt. Das DNA-Pellet wird in ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 3.2.2.10 RNA-Isolation

Die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen erfolgt entsprechend der Anleitung des *Direct-Zol RNA-MiniPrep-Kits* der Firma ZYMO Research. Hierzu werden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen in 750 µL TRIzol lysiert. Die Lyse wird durch die Zugabe von 750 µL Ethanol gestoppt. Die RNA wird mithilfe der Säulen-Matrix sowohl isoliert als auch aufgereinigt. Der empfohlene *DNaseI*-Verdau wird stets gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Elution der an die Matrix gebundenen RNA erfolgt mit 35 µl ddH<sub>2</sub>O. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

### 3.2.2.11 cDNA-Synthese

Für das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA werden 3 µg der isolierten Gesamt-RNA in 35 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Es werden 1 µg *Random-Primer* (Promega) und 5 µL peqGOLD dNTP-Mix (Peqlab; enthält jeweils 10 mM der vier Nukleotide) zu der RNA gegeben. Der Ansatz wird für 5 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf 4°C gekühlt. Damit werden die

Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren aufgebrochen und der Zugang für die an der reversen Transkription beteiligten Moleküle erleichtert. Im nächsten Schritt werden 10 µl des 5x M-MLV Reversen-Transkriptase-Puffers, 1 µl der M-MLV Reversen-Transkriptase (200 u/µl) und 1 µl des *RNasin* Plus RNase-Inhibitors (40 u/µl) entsprechend den Angaben des Herstellers (Promega) hinzugegeben. Der Ansatz wird zur Synthese der cDNA für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch einen Hitzeschritt für 5 min bei 95°C beendet. Die cDNA-Probe wird 1:1 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 3.2.2.12 Real-Time-PCR

Die qRT-PCR (*quantitative Real-Time-PCR*) ermöglicht die quantitative Bestimmung der mRNA- (*messenger RNA*) Menge nach Amplifikation von DNA und basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Quantifizierung wird mithilfe von DNA-Fluoreszenzfarbstoffen während der PCR durchgeführt. In dieser Arbeit wird *SYBR-Green* als ein solcher Farbstoff verwendet. Er interkaliert in die DNA, wobei die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt. Dabei wird das *LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR-Green I Kit* von Roche unter Verwendung des Roche LightCycler-Systems (V 3.5) genutzt. Während der Messung nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu.

Hierfür werden die Reaktionsansätze in Glass-Kapillaren angesetzt. Dazu werden 2 µL cDNA beziehungsweise die ddH<sub>2</sub>O-Kontrolle, 2 µL *LightCycler-FastStart DNA Master SYBR-Green/DNA-Polymerase-Mix* (1a/b), 0,5 µM *sense* und *antisense* Primer und 3 mM MgCl<sub>2</sub> auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gegeben.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	1 s	} 40
Annealing	57°C	5 s	
Elongation	72°C	45 s	

Zudem wird das Schmelzkurven-Programm ausgeführt. Dazu wird ein Denaturierungsschritt von 65°C bis 95°C für die Bestimmung der Produktspezifität durchgeführt. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen und anschließend die Temperatur langsam verringert. Bei einer für jede Sequenz spezifischen Temperatur erfolgt aus den Einzelsträngen wieder die Bildung eines Doppelstranges. Anschließend werden die Kapillaren für 30s auf 40°C heruntergekühlt. Die Fluoreszenzkurven werden mit der dazugehörigen LC-Software analysiert. Da der zu erwartende exponentielle Anstieg an PCR-Produkt in der Praxis, aufgrund von Verbrauch und Abnutzung der verwendeten Materialien, eine Grenze hat, stellt sich nach vielen Zyklen eine Plateauphase ein. Für die Auswertung kann somit nur die exponentielle Phase genutzt werden. Für die Quantifizierung wird deshalb die Schwellenwert-Methode angewandt. Dazu wird in die Mitte der exponentiellen Phase ein Schwellenwert (CT-Wert) gesetzt. Der Wert beschreibt dabei die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um diese Schwelle zu erreichen. Liegt zu Beginn der Messung mehr Ziel-cDNA in der Probe vor, umso weniger Zyklen werden zum Erreichen des Schwellenwertes benötigt. Damit gibt er Aufschluss über die Menge des PCR-Produkts.

Die Primer-Spezifität wird stets anhand der PCR-Effizienz, der Schmelzkurve und des PCR-Produkts in einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die relative Expression des jeweiligen Gens wird auf die endogene Expression eines Referenzgens, hier GAPDH, normalisiert.

### 3.2.2.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Unter Verwendung des Spektralphotometers NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) wird die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA und RNA bestimmt. Der NanoDrop ermöglicht Absorptionsmessungen mit einem geringen Probenvolumen von 2  $\mu$ l im Wellenlängenbereich von 220-750 nm. Das Spektralphotometer bestimmt hierzu das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum für DNA) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine). Aus diesem Verhältnis kann eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäurelösung getroffen werden. Die Optische Dichte einer Doppelstrang DNA bei 260 nm von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml. Die Optische Dichte einer RNA bei 260nm von 1 entspricht demgegenüber einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ml. Eine reine DNA-Lösung hat einen OD<sub>260/280</sub>-Wert von 1,8 und eine reine RNA-Lösung hat einen Wert von 2,0. Bei einer Kontamination der Nukleinsäurelösung mit Proteinen oder Phenol stellt sich ein deutlich geringerer Wert ein. Die Toleranzgrenze ist vor allem abhängig vom weiteren Verwendungszweck.

### 3.2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung beruht auf der Grundlage der Didesoxy-Methode nach Sanger [Sanger et al., 1977] und verfolgt den grundlegenden Mechanismus der DNA-Synthese. Dabei entstehen beim Kettenabbruchverfahren nach Sanger Syntheseprodukte, mit um jeweils einer Base zunehmender Länge, die in der Gelelektrophorese eine „Leiter“ von Banden darstellen. Somit kann die Reihenfolge der Nukleotide bestimmt werden. Für das Verfahren benötigt die DNA-Polymerase einen Primer, an dem Nukleotide angeknüpft werden und einen Matrizenstrang, der die Reihenfolge der neuen Nukleotide bestimmt. Dafür werden neben Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) bei der DNA-Amplifizierung eingesetzt. Normalerweise reagiert die 3'-Hydroxylgruppe des Primers mit einem neu hinzukommenden dNTP unter Bildung einer Phosphodiesterbindung. Hier führt der Einbau von Didesoxynukleotiden jedoch zum Kettenabbruch, da freie 3'-Hydroxylgruppen zur weiteren Kettenverlängerung fehlen. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass das Mischungsverhältnis der vier verschiedenen dNTPs zu den vier ddNTPs einem Verhältnis von ungefähr 200:1 entspricht. Mit der erhöhten Konzentration an dNTPs wird sichergestellt, dass es nicht vermehrt zu vorzeitigen DNA-Synthese-Abbrüchen kommt. Jedoch müssen genügend ddNTPs vorhanden sein, um zu gewährleisten, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit in jedem neuen Strang ein ddNTP an einer Stelle vorhanden ist. Zudem sind die ddNTPs an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Die Farbstoffe markieren sämtliche Fragmente, die mit diesem Nukleotid enden und verleihen ihm so eine bestimmte, basenabhängige Farbe. Der Sequenzieransatz durchläuft

mehrere Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation. In einem Elektrophoresegel erhält man DNA-Fragmente, die der Größe nach aufgetrennt werden. Alle Fragmente einer bestimmten Länge wandern zusammen durch das Gel und bilden aufgrund der Fluoreszenzmarkierung einen farbigen Peak. Durch die Detektion der farbigen Peaks kann somit ein Rückschluss auf die Sequenzabfolge der Template-DNA geschlossen werden. Die Probe wird vor der eigentlichen Durchführung der Sequenzierung zunächst vorbereitet. Hierzu werden 700 ng DNA (EGFP-Vektoren) oder 1500 ng DNA (LeGO-Vektoren) mit 3  $\mu$ l Sequenzierprimer (10 pmol/ $\mu$ l) versetzt. Der Ansatz wird mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 12  $\mu$ l in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefüllt. Die entsprechend gekennzeichneten Proben werden anschließend im Sequenzierlabor von SEQLAB (Göttingen) sequenziert.

### **3.2.3 Zellbiologische Methoden**

Alle zellbiologischen Arbeiten werden keimfrei an der Sicherheitswerkbank durchgeführt. Verwendete Arbeitsmaterialien wie Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen werden entweder steril vom Hersteller bezogen oder (sofern nicht thermolabil) bei 121°C für 35 min autoklaviert. Arbeitsflächen, Geräte und andere Arbeitsmaterialien werden zuvor durch Besprühen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert.

#### **3.2.3.1 Kultivieren und Passagieren von adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien**

Alle Zellen werden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> entsprechend den Angaben der DSMZ in Gewebekulturflaschen kultiviert. Das jeweilige Medium wird dabei entsprechend mit FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt (Vollmedium). Nach Erreichen einer 80 %igen Konfluenz werden die Zellen passagiert. Hierzu wird unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgenommen und der an der Kulturflasche anhaftende Zellrasen zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wird der Zellrasen mit 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden in der Folge durch leichtes Klopfen der Flasche von dessen Boden gelöst und die Trypsinierung der Zellen wird anschließend durch Zugabe von 10 ml Vollmedium beendet. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren werden die Zellen vereinzelt. Zur Reduktion der Zellzahl werden 10 ml der Zellsuspension aus der Gewebekulturflasche entnommen und die verbleibenden 2 ml mit 10 ml frischem Vollmedium aufgefüllt und weiter kultiviert. Die entnommene Zellsuspension kann für weitere Untersuchungen verwendet oder verworfen werden.

#### **3.2.3.2 Kultivieren und Passagieren von hämatopoetischen Suspensionszellen**

Alle Zellen werden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> entsprechend den Angaben der DSMZ in Gewebekulturflaschen kultiviert. Das jeweilige Medium wird dabei entsprechend mit FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt (Vollmedium). Die Suspensionszelllinien werden dreimal pro Woche passagiert und in einer Konzentration von 1 x 10<sup>6</sup> bis 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/mL ausgesät. Hierzu wird die entsprechende Zellzahl in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt und bei 400 x g

für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 20 ml frischem Vollmedium resuspendiert und in die Kulturflasche überführt.

### 3.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Alle Zelllinien werden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu werden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt, welches in einer auf 4°C vorgekühlten Isopropanolbox (*Nalgene Cryo 1°C Freezing Container*) bei -80°C langsam eingefroren wird.

Das Auftauen der Zellen erfolgt demgegenüber zügig im Wasserbad bei 37°C. Die Zellen werden anschließend in ein Röhrchen mit Medium überführt und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem Medium resuspendiert und in Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium überführt und entsprechend kultiviert.

### 3.2.3.4 Zellzahlbestimmung - Neubauer-Hämozytometer

Für die lichtmikroskopische Quantifizierung der Zellzahl in einer Suspension wird das Neubauer-Hämozytometer, bestehend aus Grundplatte und Deckglas, verwendet. Hierzu werden die Zellen aus der Kulturflasche in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Zellviabilität wird eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Dabei wird der Farbstoff von lebenden Zellen mit intakter Membran nicht oder nur nach längerer Inkubationszeit aufgenommen. Zellen, die abgestorben sind oder deren Membran beschädigt ist, nehmen das Trypanblau nach kurzer Zeit auf und erscheinen lichtmikroskopisch dunkelblau. Zur Färbung werden 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl der Trypanblau-Lösung gemischt. Nach dem Einbringen der Zellsuspension in die Probenkammer, die ein definiertes Volumen aufweist, erfolgt eine einminütige Inkubation. Anschließend wird die Anzahl der Zellen in den vier Großquadranten ausgezählt und die Zellviabilität bestimmt. Dazu wird der Mittelwert aus den vier Quadranten gebildet und mit dem Trypanblau-Verdünnungsfaktor von zwei multipliziert. Die Multiplikation mit dem Kammerfaktor von  $10^4$  ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

Alternativ zur manuellen Messung am Lichtmikroskop wird die Zählkammer, die wie zuvor beschrieben vorbereitet wird, automatisiert in dem Countess II Zellzählgerät (Thermo Fisher) vermessen. Ausgehend von der Anzahl der Zellen in der Kammer bestimmt die Bild-Analyse-Software des Geräts standardisiert die Konzentration der Zellen pro Milliliter.

Für die Proliferationsbestimmung werden die entsprechenden Zellen jeweils in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch einer 6-Loch-Schale mit 2 ml Medium ausgesät und über maximal eine Woche untersucht. Dazu wird die Zellzahl mindestens am zweiten und am dritten Tag nach dem Aussäen der Zellen bestimmt.

### 3.2.3.5 Alamar Blue - Zellviabilitäts-Assay

Die metabolische Aktivität von Zellen kann mithilfe von Resazurin in einem Alamar Blue Zellviabilitäts-Assay bestimmt werden. Resazurin ist ein nicht-toxischer Farbstoff, der Redoxreaktionen und pH-Wert-Änderungen anzeigen kann und zellpermeabel ist. Die Reduktion des blauen Resazurin zum rosafarbenen Resorufin ist irreversibel und erfolgt in Abhängigkeit der metabolischen Aktivität der jeweiligen Zelle. Viable Zellen wandeln dabei  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  um. Im Gegensatz zum Resazurin ist Resorufin fluoreszierend, so dass sowohl die Absorption (570-600 nm) als auch die Fluoreszenz (Anregung: 530-560 nm; Emission: 590 nm) vermessen werden kann. Dieser Assay erlaubt somit die quantitative Messung des metabolischen Umsatzes der Zelle als auch indirekt die Messung der Viabilität und Proliferation der Zelle.

Hierzu werden die Zellen in eine 96-Loch-Schale in Triplikaten in 100  $\mu\text{L}$  Medium ausgesät und entsprechend der Anwendung bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend werden 100  $\mu\text{L}$  einer 2-fach konzentrierten Resazurin-Lösung in jedes Loch hinzugegeben und für weitere 1-6 Stunden bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Der Ansatz kann mehrfach vermessen werden.

### 3.2.3.6 Proliferation – IncuCyte ZOOM

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens der zu untersuchenden Zellen wird das IncuCyte ZOOM-System (Sartorius) genutzt. Das System stellt eine *Live-Cell-Imaging*- und Analyse-Plattform in einem Inkubator dar. Es ermöglicht eine automatisierte Quantifizierung des Zellverhaltens, insbesondere des Zellwachstums, über die Zeit durch automatisches Sammeln und Analysieren von Bildern zu beliebigen Zeitpunkten. Hierzu wird die entsprechende Anzahl an Zellen der jeweiligen Zelllinie in einer 96-Loch-Schale in 200  $\mu\text{L}$  Medium ausgesät und in das IncuCyte ZOOM-System im Inkubator bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers werden die notwendigen Einstellungen am Rechner für den *Scan* der Schale im System eingestellt. Das System ist mit einem Phasenkontrast-Objektiv als auch mit einem grünen und einem roten Fluoreszenzkanal ausgestattet. Nach Beendigung der Messung nach spätestens einer Woche werden die Daten mithilfe der dazugehörigen Software ausgewertet.

### 3.2.3.7 Transiente Transfektion

Bei der Methode der Transfektion wird Fremd-DNA in das Innere von eukaryotischen Zellen eingebracht. Das Prinzip der Lipofektion beruht darauf, dass die negativ geladenen Phosphodiestergruppen der DNA ionisch an die positiv geladene Oberfläche der Liposomen binden. In der Folge bilden sich DNA-Liposom-Komplexe aus, welche anschließend an die negativ geladenen Sialinsäuren auf der Zelloberfläche binden können. Durch Endozytose wird die DNA daraufhin von der Zelle aufgenommen und im Zytoplasma wieder freigesetzt. Die DNA gelangt nach der Freisetzung im Zytoplasma in den Zellkern. Bei der transienten Transfektion verbleibt die Plasmid-DNA aufgrund von wirtseigenen Abbauprozessen nur

zeitweilig in der Zelle und wird nicht dauerhaft in das Genom der Wirtszelle, wie bei der viralen Transduktion eingebaut.

Einen Tag vor der Transfektion werden  $3 \times 10^5$  adhären wachsende Zellen pro Loch einer 6-Loch-Schale in 2 ml Vollmedium ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h kann die Plasmid-DNA unter Verwendung des liposomalen Transfektions-Reagenzes Lipofectamin 3000 in die Zelle eingebracht werden.

Es wird ein Mastermix für das jeweilige Loch angesetzt. Hierzu werden jeweils 250 µl serumfreies OptiMEM Medium mit 5 µl P3000-Reagenz und 2000 ng DNA zusammen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 6 µl des liposomalen Transfektions-Reagenzes Lipofectamin 3000 hinzugegeben. Der Ansatz wird für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich ein Komplex zwischen Plasmid-DNA und der Oberfläche kationischer Lipidvesikel bilden kann. Der Transfektionsansatz wird danach vorsichtig in die Lochplatte pipettiert und für 24-48 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.3.8 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion erfolgt durch das Virus-vermittelte Einbringen der DNA in die Zelle. Die Methode ist hoch effizient und erlaubt zudem die Ziel-DNA stabil in das Genom der Wirtszelle zu integrieren. Insbesondere eignet sich diese Methode gut bei Zellen, die durch andere Transfektionsmethoden nicht ausreichend oder gar nicht transfiziert werden können. Beispielsweise können auch primäre Zellen lentiviral transduziert werden. Dabei wird auf die Eigenschaften der Gene von Retroviren, genauer gesagt des *human immunodeficiency virus* (HIV), zurückgegriffen. Für das Transduktionssystem werden die Gene *gag*, *pol*, *env* und *rev* benötigt. *Gag* codiert hierbei drei Proteine, die für die Synthese des Capsids wichtig sind. *Pol* codiert unter anderem ein Protein, welches als Protease andere Proteine während des Zusammenbaus des Viruspartikels prozessiert. Zudem codiert *Pol* eine Reverse-Transkriptase und eine Integrase. Das Gen *env* codiert zwei Strukturproteine. Das Gen *rev* reguliert die Expression der anderen viralen Gene.

Zur Produktion von lentiviralen Partikeln wird die Zelllinie HEK 293T benutzt. Hierfür werden pro Konstrukt am Abend vor der Transfektion eine 10 cm Platte mit  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 mL Medium ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wird der Platte der Transfektionsansatz tropfenweise zugesetzt. Hierzu wird die DNA in 750 µl OptiMEM mit 25 µl P3000 aufgenommen und vorsichtig gemischt. Es wird folgende DNA für das Virus-vermittelte-Transduktionssystem verwendet: 10 µg Gag-Pol (HIV-1 GAG/POL), 5 µg Rev (HIV1gp6), 2 µg VSV-G env (Vesiculäre Stomatitis Virus G). Zudem werden 10 µg zu verpackende Vektor-DNA verwendet. Des Weiteren werden 30 µl Lipofectamin 3000 in 750 µl OptiMEM zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden beide Ansätze vereinigt, gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der gesamte DNA-Lipofectamin-Ansatz zu den Zellen hinzu pipettiert und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Der Überstand mit den Viruspartikeln wird im Folgenden 24h und 48h nach der Transfektion abgenommen. Hierzu wird der Überstand aus der Schale in eine 10 ml Spritze überführt und durch einen 0,45 µm-Acrodisc-Spritzenfilter mit HT-Tuffryn-

Polysulfonmembran filtriert. Das Filtrat wird in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Anschließend werden vorsichtig 10 ml frisches Medium auf die Verpackungszelllinie gegeben. Weiterhin werden  $5 \times 10^5$  bis  $6 \times 10^6$  Ziel-Zellen in einem Volumen von 2 ml Medium mit 8  $\mu\text{g/ml}$  des Transduktionshelfers Polybren in einem Loch einer 6-Loch-Schale ausgesät und mit 2 ml des virushaltigen Überstandes aufgefüllt. Der restliche Überstand wird in Aliquots für weitere Experimente bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Um eine effektive Transduktionsrate zu erzielen wird der Virusüberstand zusätzlich auf die Ziel-Zellen zentrifugiert. Dazu wird die Schale bei  $1000 \times g$  für 45 min zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Der Vorgang wird mit dem 48h-Überstand, wie zuvor beschrieben, wiederholt. 48 h nach der letzten Transduktion werden die transduzierten Zellen routinemäßig passagiert und gegebenenfalls selektioniert. Die Effizienz der Transduktion wird im Falle von Zellen mit fluoreszierenden Markern mittels FACS bestimmt.

### 3.2.3.9 Mikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen werden unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops (Leica TCS SP5 System; *UKE Microscopy Imaging Facility*) untersucht. Die Bilddokumentation und die Analyse erfolgen mit der dazugehörigen Leica LAS-Software. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen wird die Verteilung der Proteine anhand der spezifischen Fluorophore in einer Zelle analysiert. Die Aufnahmen erfolgen mit einem 63x HCX PL APO Öl-Objektiv (NA: 1.40-0.60, Distanz 0.1 mm) und einem Prism-E Differentialinterferenzkontrast-Objektiv. Das System beinhaltet vier Laser (Diode: 405 nm; Multi-Ar 458 nm/ 476 nm/ 488 nm/ 496 nm/ 514 nm; DPSS 561 nm; HeNe 633 nm).

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.4.1 TCE-Lyse

Die Lyse von eukaryotischen Zellen erfolgt mithilfe von Trichloressigsäure. Hierzu werden die Zellen zweimal bei  $400 \times g$  für 5 min mit einer kalten 0,15M NaCl-Lösung gewaschen. Das Zellpellet wird in 500  $\mu\text{l}$  0,15 M NaCl resuspendiert und mit 50  $\mu\text{l}$  einer 99 %igen TCE-Lösung versetzt. Das Reaktionsgefäß wird anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 8 min bei  $8000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  wird der Überstand verworfen und das Pellet in einem angemessenen Volumen 1x Ladepuffer aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  Tris versetzt. Das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet wird anschließend viermal 30s bei  $4^\circ\text{C}$  sonifiziert. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und  $13.000 \times g$  für 5 min als Pellet abgetrennt. Der Überstand wird in frische Röhrchen überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei  $-80^\circ\text{C}$ .



### 3.2.4.2 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen unter Verwendung von M-Per-Puffer

Die Zellextraktion von eukaryotischen Zellen unter Verwendung des „*M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent*“ erfolgt gemäß den Anweisungen der Firma Thermo Scientific. Hierzu wird auf Eis der M-Per-Puffer mit dem 100x Halt Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (Thermo Fisher) versetzt. Die Zellen werden zweimal bei 400 x g für 5 min mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 800 µl MPER/5 x 10<sup>7</sup> Zellen durch mehrmaliges Auf- und Ab-pipettieren resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 x g für 5 min als Pellet abgetrennt. Der Überstand wird in frische Röhrchen überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei -80°C. MPER-Lysate werden stets in Verbindung mit Messungen an der PAM-Station hergestellt.

### 3.2.4.3 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen unter Verwendung von NP40

Die Zellextraktion von eukaryotischen Zellen erfolgt unter Verwendung von NP40-Puffer. Hierzu wird auf Eis der NP40-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren hergestellt. Die Zellen werden zweimal bei 400 x g für 5 min mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 800 µl NP40/5 x 10<sup>7</sup> Zellen durch mehrmaliges Auf- und Ab-pipettieren resuspendiert und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 x g für 5 min als Pellet abgetrennt. Der Überstand wird in frische Röhrchen überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei -80°C. NP40-Lysate werden stets in Verbindung mit Immunpräzipitationen hergestellt.

### 3.2.4.4 Quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Lowry

Gesamtproteinmengen in Zelllysaten werden quantitativ mithilfe des DC Protein-Assay (BioRad) bestimmt. Dabei handelt es sich um einen kolorimetrischen Assay, welcher auf dem Lowry-Assay [Lowry et al., 1951] beruht und mit Detergenzien kompatibel ist. Dabei bilden Kupferkationen unter alkalischen Bedingungen Komplexe mit dem Peptidrückgrad der Proteine aus. Hieraus resultiert eine blau-violette Färbung (Biuret-Reaktion).

Hierzu werden 5 µL der unverdünnten oder verdünnten Probe oder des Standards in Mikrotiterplatten mit 25 µL Reagenz AS (Mix aus 1:50 Reagenz S zu Reagenz A) versetzt und mit 200 µL Reagenz B ergänzt. Nach 15 min Inkubation bei RT wird im Photometer die Absorption bei 750 nm vermessen. Als Standard dient eine Verdünnungsreihe von BSA im jeweiligen Lysat-Puffer (0 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1 mg/mL, 1,25 mg/mL, 1,5 mg/mL). Die Messwerte des BSA-Standards dienen als Eichgerade, so dass damit über den vermessenen Absorptionswert der Probe auf die enthaltene Proteinmenge geschlossen werden kann.

### 3.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher Gelelektrophorese [Laemmli, 1970] durchgeführt. Die zu analysierenden Proben sind mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und werden vor dem Beladen des Gels für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Bei dem SDS handelt es sich um ein anionisches Detergens durch die Proteine denaturiert werden, ihre räumliche Struktur verlieren und zudem eine negative Ladung erhalten. In der Folge können die Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandern und werden durch die Poren im Gel aufgetrennt. Dabei unterscheidet man zwischen einem grobporigen Sammelgel und einem feinporigen Trenngel. Die Porengröße des jeweiligen Gels wird über die Acrylamidkonzentration eingestellt. Die Fokussierung der Proteine im Gel erfolgt aufgrund des pH-Gradienten zwischen Sammel- und Trenngel. Das Trenngel dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe und die Herstellung erfolgt in einer Gießkammer (Hoefer) zwischen zwei Glasplatten. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Sammelgel gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Die Taschen werden nach dem Entfernen des Probenkamms des fertig auspolymerisierten Gels mit Laufpuffer gespült. Anschließend werden die Taschen mit den Proben und dem Molekulargewichtsstandard (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*; Thermo Fisher) beladen. Das Gel-Gestell wird daraufhin in die Laufkammer mit Laufpuffer überführt. Bis die Proteinfront das Trenngel erreicht hat, wird die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Anschließend wird die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wird mit dem Herauslaufen der Lauffront aus dem Gel beendet.

Zusammensetzung für zwei Gele:	10 % Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	8,5 ml	6,9 ml
Puffer (1M TRIS; pH 8,8)	11,25 ml	1,9 ml
Acylamid	10 ml	1,34 ml
10 % SDS	300 µL	100 µL
TEMED	40 µL	7,5 µL
10 % APS	200 µL	100 µL

### 3.2.4.6 Western Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgt durch Übertragung der aufgetrennten Proteine von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran. Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern können die Proteine anschließend auf der Membran detektiert werden. Hierzu werden zwei Schwammtücher, zwei zurechtgeschnittene Whatman-Papiere und die Membran in Transferpuffer getränkt. Anschließend wird auf der Kathodenseite der Blotkassette in folgender Reihenfolge der Blot vorbereitet: Schwammtuch, Whatman-Papier, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, Whatman-Papier, Schwammtuch. Alle Luftblasen werden entfernt und die Blotkassette wird verschlossen. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes in der mit Transferpuffer gefüllten Blotkammer (BioRad). Durch das elektrische Feld wandern die mit SDS-beladenen und negativ geladenen Proteine von der Kathode in Richtung der Anode. Der

Transfer auf die Membran erfolgt bei einer Spannung von 65 V für 2 h bei 4°C. Anschließend wird stets eine Ponceau-Färbung über 5 min bei RT durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine bindet. Der Farbstoff, der zur Überprüfung der Proteinmenge verwendet wird, wird mit Blockierlösung in der Folge entfernt. Der Blockiervorgang erfolgt für 1 Stunde bei RT unter Schwenken und dient dazu unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wird in Waschlösung verdünnt und über Nacht bei 4°C unter Schwenken mit der Membran inkubiert. Die Membran wird anschließend für 30 min bei RT unter Schwenken mit der Waschlösung inkubiert. Der Sekundärantikörper wird danach in Waschlösung verdünnt und über 1 h bei RT unter Schwenken mit der Membran inkubiert. Daraufhin erfolgt ein Waschschriff der Membran mit 1x TBS/0,01 % Tween über 30 min bei RT, ein Waschschriff mit 1x TBS für 15 min und ein weiterer Waschschriff mit 1x TBS für 15 min. Die Detektion des Zielproteins erfolgt unter Verwendung des *Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate Kits* der Firma Thermo Scientific gemäß Herstellerangaben. Der Sekundärantikörper ist dabei mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, die Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert und somit eine charakteristische Chemilumineszenz hervorruft. Diese Chemilumineszenz wird mit einem Imager (LAS-3000; FujiFilm/LAS-4000; GE Healthcare) detektiert.

#### 3.2.4.7 Immunpräzipitation und Phosphatase-Assay

Zur Isolation und Anreicherung einzelner Proteine aus einem Gesamtzelllysat wird eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei werden Antikörper mit ihrem Fc-Teil an Sepharose-Kügelchen, sogenannte Beads, über das Protein G gekoppelt (*4 Fast Flow Protein-G-Sepharose*; GE Healthcare). Dieser Komplex wirkt als Angel um mithilfe des eingesetzten Antikörpers spezifisch das gesuchte Antigen aus dem Gesamtproteinansatz zu isolieren. Über die G-Sepharose-Kügelchen ist es möglich den Antigen-Antikörper-Beads-Komplex von dem restlichen Proteinansatz zu trennen, da die Kügelchen im Gegensatz zum „freien“ Protein leicht sedimentieren.

Hierzu werden 200 µL Beads dreimal mit 500 µL NP40-Lyse-Puffer gewaschen. Dazu werden die Reaktionsgefäße stets dreimal invertiert und für 30 s bei 11000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und anschließend mit 200 µL NP40-Lyse Puffer (50:50 Suspension) versetzt. Pro Immunpräzipitation werden jeweils 40 µL der Suspension verwendet. Diese wird mit NP-40 Puffer auf ein Gesamtvolumen von 250 µL aufgefüllt. Das Koppeln des Antikörpers an die G-Sepharose erfolgt durch Zugabe von jeweils 2 µg des SHIP1-Antikörpers (P1C1; 200 µg/mL) zu der Suspension. Weiterhin erfolgt eine Inkubation durch Überkopf-Rotation bei 4°C über Nacht. Die Antikörper-gekoppelte Protein-G-Sepharose wird dreimal mit NP40-Puffer gewaschen. Der Überstand wird entfernt und die Protein-G-Sepharose mit 1000 µg Proteinlysat versehen. Der Ansatz wird mit NP40-Lyse-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 800 µL aufgefüllt und über Nacht durch Überkopf-Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz zweimal mit PBS und dreimal mit NP40-Puffer gewaschen. Um die Proteine von der G-Sepharose zu lösen, müssen die Ansätze mit 3x Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100°C aufgekocht werden.

Im Fall des Phosphatase-Assays wird der Ansatz (Triplikat) nach dem Waschen jedoch auf die Pufferbedingungen des Assays eingestellt. Hierzu wird das Präzipitat zusätzlich dreimal mit

300  $\mu\text{L}$  Phosphatase-Assay-Puffer gewaschen. Kurz vor der weiteren Verwendung werden die Beads pelletiert. Zum einzelnen Ansatz werden jeweils 180  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O und 200  $\mu\text{L}$  2x Phosphatase-Assay-Puffer hinzugegeben. Die Salzkonzentrationen in dem Phosphatase Assay-Puffer entsprechen weitestgehend den physiologischen intrazellulären Konzentrationen. Die Ansätze werden nacheinander bei 37°C für 5 min im Heizblock vorinkubiert. Nach der Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  des Substrates wird sofort durch mehrmaliges auf- und abpipettieren der Ansatz bei 37°C gemischt. Bei dem Substrat handelt es sich um 50  $\mu\text{M}$  des verkürzten Substrats PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>-diC8. Da langkettige Fettsäuren wie die Arachidonsäure (C20) bzw. die Stearinsäure (C18) in wässriger Lösung schlecht löslich sind, wird eine weniger lange Fettsäurekette gewählt, die besser löslich ist. Im Folgenden werden 100  $\mu\text{l}$  Probe nach 15 s, 1 min, 2 min und 5 min nach Substratzugabe entnommen und jeweils in ein auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß mit vorgelegten 35  $\mu\text{L}$  0,1 M EDTA pipettiert und gemischt. Da die EDTA-Konzentration wesentlich höher ist als die vorhandenen Magnesiumionen, kann die Reaktion durch einen Chelat-Komplex gestoppt werden. Dadurch stehen dem Magnesiumion-abhängigen katalytischen Zentrum der SHIP1-Phosphatasedomäne die Magnesiumionen nicht mehr zur Verfügung. Zwischen den einzelnen Probenentnahmen wird der Ansatz stets durch mehrmaliges Pipettieren vermischt, da die Beads sedimentieren und nicht mehr ausreichend für das lösliche Substrat zur Verfügung stehen könnten. Im Folgenden wird das abgespaltene Phosphat kolorimetrisch mit Malachitgrün nachgewiesen. Hierzu werden die Proben für 2 min bei 11000 x g bei 4°C zentrifugiert. Es werden 80  $\mu\text{L}$  des Überstandes entnommen und in ein Loch einer Mikrotiterplatte pipettiert. Parallel wird der Phosphatstandard (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Stammlösung von 500  $\mu\text{M}$  in ddH<sub>2</sub>O) entsprechend vermessen (0; 0,5; 1; 3; 5; 10 und 30  $\mu\text{M}$ ). In jede Vertiefung der Lochplatte werden 20  $\mu\text{l}$  des „*working reagent*“ gegeben und für 30 min inkubiert. Die Vermessung der Absorption erfolgt am Photometer bei einer Wellenlänge von 620 nm. Die verbleibenden Protein-G-Sepharose-Pellets werden auf ein SDS-Polyacrylamidgel zur Bestimmung der spezifischen SHIP1-5'-Phosphataseaktivität (eingesetzte SHIP1-Menge in den Immunpräzipitationen) aufgetragen.

### 3.2.4.8 PamStation – Protein-Kinase-Array

Für das Screening von Veränderungen der Kinase-Aktivität von Proteinen in Gesamtzelllysaten wird die Protein-Kinase-Array-Technologie PamStation12 der Firma PamGene verwendet. Hierbei wird die Veränderung der Tyrosin- oder Serin/Threonin-Phosphorylierung von einer Vielzahl von Proteinen analysiert. Die PamStation ist eine Mikrofluid-Arbeitseinheit, die einen Inkubator, bis zu drei Fluoreszenzkanäle, einen Imager und eine Digitalkamera beinhaltet. Die Messung wird gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Für die Messung kann das Proteinlysate auf bis zu drei PamChip 4-Microarrays gleichzeitig aufgetragen werden, wobei ein Biochip jeweils vier Vertiefungen enthält. Die Oberfläche der Vertiefungen besteht aus einem Aluminiumoxid-Substrat, welches ca. 60  $\mu\text{m}$  dick ist und eine poröse Struktur mit langen verzweigten Kapillaren aufweist. Jede Vertiefung ist zudem, abhängig ob es sich dabei um einen Tyrosin- oder Serin/Threonin-Biochip handelt, mit bis zu 400 Peptidmolekülen immobilisiert. Die Proteine aus dem Lysat reagieren in der Folge mit den Peptiden des Chips. Anschließend wird ein Fluorochrom-gekoppelter-Antikörper für die Detektion der phosphorylierten Peptide des Chips zu dem Ansatz gegeben. Die Probe wird im Gerät sowohl

inkubiert als auch durch das Substrat hin und her gepumpt. Dies erhöht die Reaktionskinetik und minimiert die Analysezeit. Der Ansatz wird automatisiert durch das System gewaschen. Die Messung wird in Kooperation mit der *UCCH-Core-Facility Kinomics* durchgeführt.

### 3.2.4.9 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Zur Inhibierung von spezifischen Proteinen und Signalwegen werden die verwendeten Zellen mit Inhibitoren behandelt. Hierzu wird eine Zellzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml nicht überschritten. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium mit dem entsprechenden Inhibitor in der angegebenen Konzentration versetzt. Nach einer definierten Zeit werden die Zellen entsprechend aufgearbeitet. Die entsprechende Kontrolle für jeden Versuch wird mit dem entsprechenden Lösungsmittel des Inhibitors versetzt.

### 3.2.4.10 Membran- und Zytosol-Fraktionierung

Bei der Fraktionierung von Membran (P200) und Zytosol (S200) werden Proteine aus beiden Kompartimenten mithilfe einer differentiellen Zentrifugation isoliert. Hierzu werden die Zellen aus zwei T175-Flaschen bei  $400 \times g$  für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellpellets in 2 ml eiskaltem Aufschlusspuffer resuspendiert und auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen werden bis zur vollständigen Zelllyse mehrmals für 30 s im vorgekühlten Ultraschall-Wasserbad ( $4^\circ\text{C}$ ) sonifiziert. Die P16-Fraktion wird jeweils durch Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und  $16.000 \times g$  für 8 min als Pellet abgetrennt. Der Überstand (S16) wird jeweils in ein vorgekühltes Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt. Zu jedem Pellet werden 500  $\mu\text{l}$  Aufschlusspuffer gegeben und durch Invertieren wird der Ansatz gemischt. Anschließend wird der Ansatz mit dem Pellet für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $16.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand (S16) wird ebenfalls in das jeweilige Ultrazentrifugen-Röhrchen mit der vorgelegten S16-Fraktion überführt. Die gesammelten S16-Fraktionen werden im 80Ti-Rotor in der L60-Ultrazentrifuge bei  $4^\circ\text{C}$  für 45 min und  $200.000 \times g$  zentrifugiert. Hierdurch erfolgt die Trennung von Membranvesikel (P200) von der zytosolischen Fraktion (S200). Der Überstand (S200) wird durch Dekantieren vom Pellet getrennt. Auf das Pellet (P200) werden 2 ml Aufschlusspuffer gegeben. Anschließend wird das Pellet durch Vortexen resuspendiert und für 45 min bei  $200.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet (P200) in 150  $\mu\text{l}$  1x Ladepuffer (ohne Bromphenolblau und ohne DTT) aufgenommen. Das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet wird anschließend zweimal 30 s bei  $4^\circ\text{C}$  sonifiziert. Der S200 Überstand (je 1 ml) wird auf vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils durch eine TCE-Lyse lysiert. Die Pellets werden in der Folge in je 100  $\mu\text{l}$  1x Ladepuffer aufgenommen und mit 1 M Tris pH 8,8 versetzt. Nach dem Sonifizieren werden die Ansätze gesammelt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4.11 Kern- und Zytoplasma-Fraktionierung

Die Fraktionierung von Kern- und Zytoplasma-Proteinen erfolgt mithilfe eines Saccharose-Dichtegradienten gemäß dem Protokoll des Lamond-Labors [Lam und Lamond, 2006]. Jeder Schritt der Isolierung und Reinigung der Fraktionen wird unter Verwendung eines Mikroskops mit einem 20-fachen Objektiv kontrolliert. Hierzu werden die Zellen aus zwei T175-Flaschen bei 400 x g für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wird das Zellpellet in 10 ml hypotonischen Puffer resuspendiert (10 mM HEPES, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM DTT und 1x Protease-Inhibitor). Die Zellen werden für 10 bis 20 Minuten auf Eis inkubiert und zum Schwellen gebracht. Dann werden die Zellen in einem vorgekühlten Glas-Dounce-Homogenisator geschert, bis die Zellen platzen und ihre Kerne freigesetzt werden. Nach der Zentrifugation der Zellen bei 218 x g für 5 Minuten und 4°C wird das Pellet in 3 ml S1-Puffer (0,25 M Saccharose, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 1x Protease-Inhibitor) durch pipettieren resuspendiert. Der Überstand enthält die Zytoplasma-Fraktion und wird gemäß TCE-Fällung lysiert. Die Kern-Fraktion im S1-Puffer wird vorsichtig auf 3 ml S2-Puffer (0,35 M Sucrose, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1x Protease-Inhibitor) geschichtet und bei 1430 x g für 5 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend gemäß TCE-Fällung lysiert und stellt die gereinigte und isolierte Kern-Fraktion dar. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgt bei -80°C.

### 3.2.4.12 Fixierung, Permeabilisierung und Immunfluoreszenz von Zellen

Die zu untersuchenden adhärent wachsenden Zellen werden in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Kammer in *Chamber Slides* (Nalgen Nunc) ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Im Folgenden wird der Überstand vorsichtig aus den Kammern mit den Zellen abgesaugt, bevor die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen werden. Die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd stoppt die Lebensvorgänge der Zelle und führt zur Quervernetzung benachbarter Proteine, wobei das Paraformaldehyd kovalent an die freien Aminogruppen bindet. Dabei werden größere strukturelle Veränderungen der Zelle verhindert. Hierzu werden die Zellen mit 300 µl, 3 %igem (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Paraformaldehyd wird durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Damit die Antikörper im Folgenden intrazellulär binden können, wird die Zellmembran permeabilisiert. Hierzu werden die Zellen für 3 min bei 37°C mit 300 µl 0,3 %igem Triton X-100 in PBS behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird mit 300 µl 1 %igem (w/v) BSA in PBS für 30 min bei RT blockiert. Der Primärantikörper wird entsprechend der Angaben des Herstellers in einer 0,7 %igen BSA in PBS-Lösung verdünnt und in einem Volumen von 250 µl zu den Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4°C. Anschließend wird der nicht gebundene Primärantikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Sekundärantikörper wird in einer entsprechenden Verdünnung in einer 0,7 %igen BSA in PBS Lösung hinzugegeben und für eine Stunde bei RT und im Dunkeln inkubiert. Der nicht gebundene Sekundärantikörper wird durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Damit die Zellen nicht austrocknen, werden sie abschließend mit 300 µl PBS überschichtet und dunkel bei 4°C gelagert. Zu untersuchende Suspensionszellen werden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Alle Schritte der Immunfärbung und der damit verbundenen Vorbereitung werden in 15 ml-Probenröhrchen durchgeführt. Alle Waschschritte

erfolgen im Probenröhrchen bei 400 x g für 5 min. Weiterhin wird genauso verfahren wie bei adhärent wachsenden Zellen. Die Zellen können anschließend in *Chamber Slides* überführt werden oder am Durchflusszytometer vermessen werden.

### 3.2.5 Immunzytochemische Methoden

#### 3.2.5.1 Durchflusszytometrie

Um Zellen genauer zu charakterisieren, werden diese mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Durchflusszytometrie erlaubt die quantitative Ermittlung und die molekulare Analyse der Eigenschaften von Zellen. Die Grundlage der Analyse beruht auf den hydrodynamischen Transport der Einzelzelle durch eine optische Einheit, die spezifische Fluoreszenzen erkennt. Dabei verdünnt ein Hüllstrom eine Suspension von Zellen. Die Zellen werden daraufhin in einer Reihung von Einzelzellen fokussiert und dabei im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Eine Kapillare saugt dann die Zellen einzeln in die Durchflusszelle, in welcher sie durch ein Laserlicht spezifisch angeregt werden. Die Zellen senden daraufhin Photonen aus, die das Licht streuen. Der Messpunkt wird hierbei durch den gemeinsamen Fokus von Probenstrom und Laser dargestellt. Am Messpunkt spielen die Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zelle eine Rolle. Die simultane Analyse der Parameter, die separat detektiert werden, gewährleistet die Analyse der Eigenschaften der Zellen. Die Zellgröße wird durch das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) charakterisiert und die Zellgranularität wird durch das Seitwärtsstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) beschrieben. Darüber hinaus können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb und außerhalb der Zelle detektiert werden. Mithilfe von fluoreszierenden Markern können die Zellen zudem sortiert werden. Unter Verwendung der Gerätesoftware werden die Ergebnisse grafisch dargestellt. Die zu untersuchende Zellpopulation kann dabei unter Verwendung von „*Gates*“ markiert werden und die zu untersuchenden Eigenschaften selektiv ausgewertet werden.

Für die Analyse von Zell-Rezeptoren werden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen in 400  $\mu$ L PBS mit 2 % FCS und 2 mM EDTA aufgenommen und gemäß Herstellerangaben mit dem entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten-Antikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal gewaschen, in 400  $\mu$ L frischem PBS mit 2 % FCS und 2 mM EDTA aufgenommen und in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen überführt. Als Durchflusszytometer dient das FACS Canto (BD Bioscience) und das CytoFlex (Beckman Coulter). Die Sortierung von spezifischen Zellen wird an dem FACS Aria- (BD Bioscience) Durchflusszytometer der *Core-Facility* des Heinrich-Pette Instituts (HPI, Hamburg) durchgeführt.

#### 3.2.5.2 Isolierung von humanen mononukleären Zellen aus menschlichem Blut

Die Isolierung von mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) aus peripherem Blut oder Knochenmark erfolgt unter Ausnutzung von Unterschieden in der Zelldichte der unterschiedlichen Bestandteile des Blutes. So haben Granulozyten und Erythrozyten eine höhere Dichte als mononukleäre Zellen. Unter Verwendung eines Dichtegradienten können mononukleäre Zellen somit von anderen Zellen getrennt werden. Für den Dichtegradienten

wird das isoosmotische Lymphoprep-Medium gemäß Herstellerangaben verwendet. Das frische Blut wird vor der vorsichtigen Beschichtung auf das Lymphoprep-Medium im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Das periphere Blut wird von dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Anschließend können die isolierten mononukleären Blutzellen weiter selektioniert werden. Hierzu werden CD19-positive B-Zellen und CD3-positive T-Zellen mit Hilfe des *Easy Sep human CD19* bzw. *CD3 positive Selection Kit* (StemCell Technologies) und des *Easy Sep* Magneten gemäß Herstellerangaben aus mononukleären Zellen gewonnen. Dabei bindet ein Antikörper-Komplex spezifisch an den gewünschten Rezeptor auf den zu selektionierenden Zellen. Dieser Komplex enthält Dextran beschichtete magnetische Partikel, die mithilfe des Magneten über mehrere Waschschrte isoliert werden. Die Reinheit (>90 % positiv) wird stets am Durchflusszytometer gemäß Herstellerangaben kontrolliert.

### 3.2.6 Tierversuche

#### 3.2.6.1 Transplantation

Immundefizienten NOD-scid-gamma-Mäusen (NOD.CG-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wji</sup>/SzJ; NSG-Mäusen) werden intravenös jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in PBS injiziert. Hierzu wird das Tier in einer Röhre fixiert und die Schwanzvene durch warmes Wasser erwärmt.

#### 3.2.6.2 *In vivo* Imaging

Das *in vivo* Imaging wird in Kooperation mit der *Core-Facility „In vivo Optical Imaging“* des Universitären Cancer Centers Hamburg (UCCH) an einem IVIS Spectrum *in vivo* Imaging-System (PerkinElmer) durchgeführt. Für das Vermessen von Zellen *in vitro* wird eine Verdünnungsreihe der Luciferase-exprimierenden Zellen in Triplikaten in einer schwarzen 96-Loch-Schale angesetzt. Es wird mit 10000 Zellen pro Loch gestartet. Die Zellzahl pro Loch wird in jeder weiteren Vertiefung halbiert.

Das Substrat wird direkt vor der Vermessung der Zellen im Imager zu den Zellen hinzugegeben. Für das Imaging der NSG Mäuse werden die Tiere zunächst mit Isofluran narkotisiert. 10  $\mu$ L des Substrats Coelenterazine werden subkutan injiziert. Die Bildaufnahme erfolgt nach 15 min nach Zugabe des Substrates. Die Auswertung der Bilder erfolgt an der Living Image-Software (Version 4.3.1). Ausgewertet werden die gemessenen Photonen pro Sekunde pro Tier.

#### 3.2.6.3 Präparation von Knochenmark, Milz und Leber

Für die Beendigung eines Tierexperimentes werden Mäuse durch das Einleiten eines CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Gemischs mit ansteigender CO<sub>2</sub> Konzentration getötet. Zudem wird eine zervikale Dislokation durchgeführt. Um die leukämischen Zellen aus den Mäusen zu isolieren, werden sowohl die Hinterbeine mit dem Knochenmark als auch die Milz und die Leber präpariert. Dafür werden Femur und Tibia an den Enden aufgeschnitten und das Knochenmark durch Zentrifugation



(8000 rpm, 30 s) isoliert. Die Zellen aus der Milz und der Leber werden durch ein Sieb (70  $\mu$ M, BD Falcon) vereinzelt und in PBS aufgenommen. Die Zellen können anschließend am Durchflusszytometer vermessen werden.

### **3.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen wird durch den Students t-Test ermittelt. Als statistisch signifikant wird ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  (\*) angenommen. Mithilfe des p-Wertes wird das Überschreiten einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit bei einer Stichprobenuntersuchung abgeschätzt. Des Weiteren wird die Signifikanz der p-Werte noch zwischen sehr signifikant ( $p \leq 0,01$ ; \*\*) und hoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ; \*\*\*) unterteilt. Die statistische Analyse wird hierbei mithilfe von GraphPad Prism 4.0 durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist die häufigste Krebserkrankung und zugleich die häufigste krebsbedingte Todesursache im Kindesalter und stellt heute trotz erheblich gesteigerter Heilungschancen vor allem bei Patienten einer Hochrisikogruppe immer noch eine schlechte Prognose dar. Hinzu kommen gravierende Therapie-begleitende Nebenwirkungen sowie das Auftreten von sekundären Tumoren, die auf die Gabe von mutagenen Substanzen im Rahmen der Chemotherapie zurückzuführen sind. Umso wichtiger erscheinen molekular gezielte Therapiestrategien. Fehlregulierte Proteine in zentralen Schaltstellen von Signalwegen der Zelle stellen dabei einen wichtigen Ansatzpunkt für die Etablierung von Therapie-Ansätzen dar. Die umfassende Charakterisierung dieser Signalnetzwerke und die Identifikation wichtiger Proteine, die als Regulatoren für die Hemmung des Wachstums und des Überlebens der Tumorzelle entscheidende Impulse geben, sind daher von außerordentlicher Notwendigkeit für unser Verständnis der Tumorerkrankung.

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt aufgrund seiner häufigen Überaktivierung bei den meisten Krebsarten eine wichtige Rolle für die Therapie [Kandoth et al., 2013]. Auch in dem Krankheitsbild der ALL kann der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als eine häufig konstitutiv aktivierte Schaltstelle identifiziert werden. Dabei kann eine konstitutive Aktivierung von AKT bei 87 % (21/24) von Patienten mit einer T-ALL sowie bei 100 % (21/21) von Patienten mit einer B-ALL nachgewiesen werden [Silva et.al, 2008, Gomes et al., 2014].

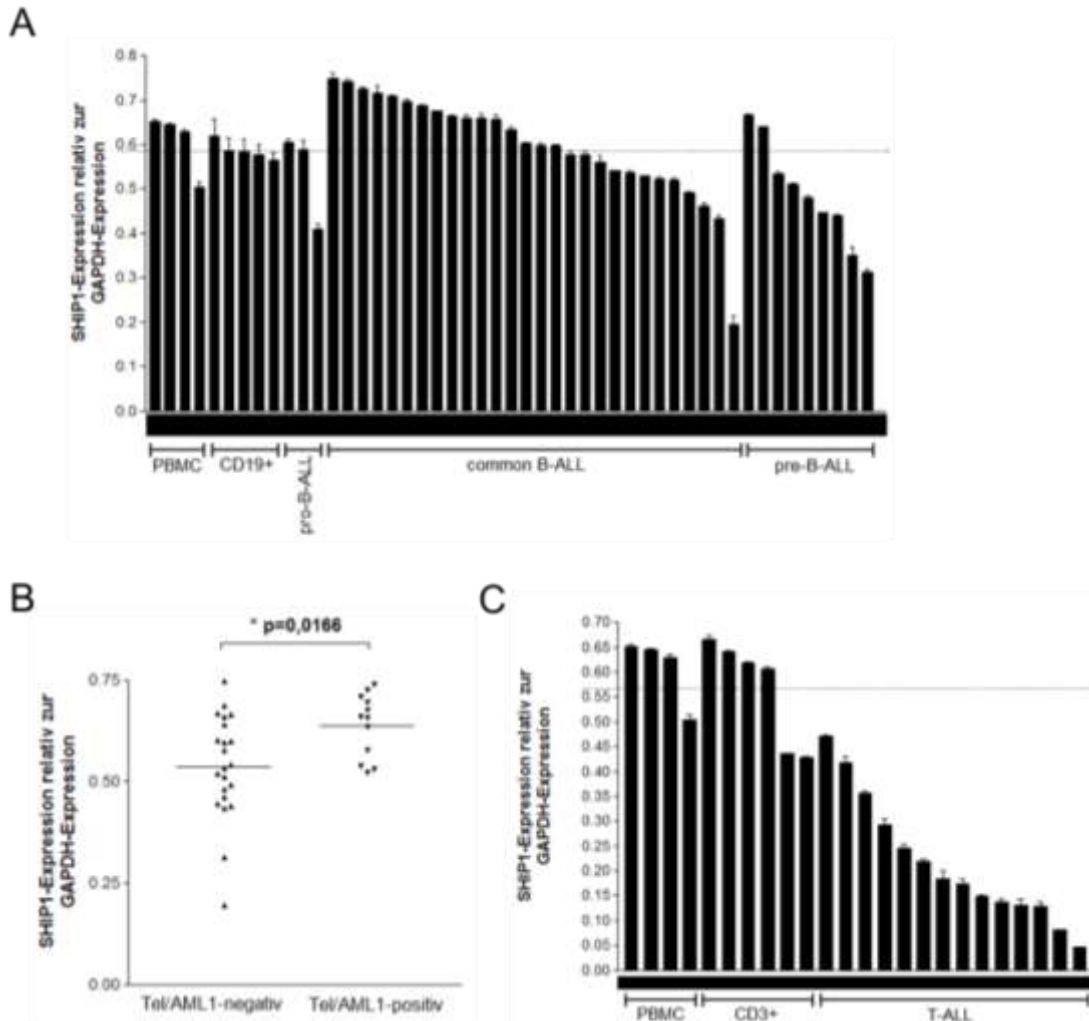
Die Inositolphosphatase SHIP1 (*SH2-containing Inositol 5-Phosphatase*) dient als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs. Die Bedeutung von SHIP1 für die ALL ist bisher weitestgehend unverstanden. Mutationen des INPP5D-Gens (SHIP1) in hämatopoetischen Zellen (11 Mutationen bei 4269 untersuchten Proben; 0,26 % der Fälle) sind relativ selten [Forbes et al., 2008, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; Stand: 27.08.19] und in den meisten Fällen bei der primären Entstehung des allgemeinen Krankheitsbildes der ALL von untergeordneter klinischer Relevanz.

### 4.1 Untersuchung der Expression von SHIP1 in ALL-Zellen

#### 4.1.1 Untersuchung der mRNA-Expression von SHIP1 in primären ALL-Patientenproben

Im Folgenden wurde zunächst die Expression von SHIP1 auf RNA- und Proteinebene analysiert. Für die Analyse der SHIP1-Expression auf RNA-Ebene wurden T-ALL (n = 14) und B-ALL (n = 40) Patientenproben aus der CoALL-Studie von Prof. Horstmann (Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) verwendet. Die B-ALL-Proben standen als cDNA zur Verfügung und wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR) vermessen. Demgegenüber wurde aus primären T-ALL-Patientenproben die RNA isoliert und anschließend jeweils eine cDNA Synthese durchgeführt. Die cDNA wurde ebenfalls mittels RT-qPCR vermessen. Als Kontrollen wurden B- und T-Zellen aus gesunden Probanden verwendet. Hierzu wurde frisches Blut aus der Transfusionsmedizin des UKE von gesunden Probanden erhalten und jeweils die B- (CD19+) als auch die T-Zellen (CD3+) aus dem Blut selektioniert. Aus den gesunden CD19-

(n = 5) und CD3-positiven Zellen (n = 6) sowie aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; n = 4) wurde jeweils die RNA isoliert, die cDNA Synthese durchgeführt und die SHIP1-mRNA-Expression, parallel zu den vermessenden ALL-Patientenproben, mittels RT-qPCR vermessen.



**Abbildung 16: mRNA-Expression von SHIP1 in primären B- und T-ALL-Patientenproben.** Die Expression von SHIP1 wurde auf mRNA-Ebene in primären B- und T-ALL-Patientenproben im Vergleich zu gesunden Zellen untersucht. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe. Bild (A) zeigt die Expression von SHIP1 in B-ALL-Zellen, gesunden CD19-positiven Zellen sowie gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die B-ALL-Zellen sind unterteilt in pro-B-ALL, common B-ALL und prä-B-ALL. Der Mittelwert der gesunden CD19-positiven Zellen ist als gestrichelte Linie dargestellt. Bild (B) zeigt die Expression von SHIP1 in Tel/AML1-negativen und Tel/AML1-positiven B-ALL-Zellen. Der Mittelwert beider Gruppen ist jeweils als waagerechte Linie dargestellt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Bild (C) zeigt die Expression von SHIP1 in T-ALL-Zellen, gesunden CD3-positiven Zellen sowie gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Der Mittelwert der gesunden CD3-positiven Zellen ist als gestrichelte Linie dargestellt.

Abbildung 16A zeigt die SHIP1-Expression relativ zur GAPDH-Expression der zu untersuchenden B-ALL-Proben. Abbildung 16C zeigt die SHIP1-Expression relativ zur GAPDH-Expression der zu untersuchenden T-ALL-Proben. Der Mittelwert der gesunden CD3-positiven Zellen liegt bei 0,56 und wird als gestrichelte Linie erkenntlich gemacht. Die T-ALL-Proben zeigen im Vergleich dazu eine reduzierte SHIP1-Expression. Der Mittelwert der

gesunden CD19-positiven Zellen liegt bei 0,59 und wird ebenfalls als gestrichelte Linie kenntlich gemacht. Die B-ALL Proben sind in pro-, common- und prä-B-ALL unterteilt.

### **Heterogene Expression von SHIP1 in der B-ALL**

Die Verteilung der SHIP1-Expression bei den primären B-ALL-Zellen ist im Vergleich zu den gesunden CD19-positiven Zellen heterogen. Hier finden sich sowohl Zellen, die eine höhere SHIP1-Expression zeigen als auch Zellen, in denen die SHIP1-Expression reduziert ist.

Die untersuchten B-ALL-Patientenproben weisen verschiedene genetische Aberrationen auf. Dabei besitzt eine B-ALL-Probe die BCR-ABL-Translokation (Ph<sup>+</sup>-ALL). Zwei Proben weisen eine Translokation des MLL-Gens auf und 12 Proben zeigen eine Tel/AML1-Fusion. Hierbei kann ein signifikanter Unterschied in der SHIP1-Expression in der Gruppe der Tel/AML1-positiven B-ALL (n = 12) im Vergleich zu der SHIP1-Expression in der Gruppe der Tel/AML1-negativen (n = 22) B-ALL beobachtet werden (Abbildung 16B). Demnach könnte die SHIP1-Expression durch die genetische Aberration des Tel/AML1-Fusionsproteins gefördert werden.

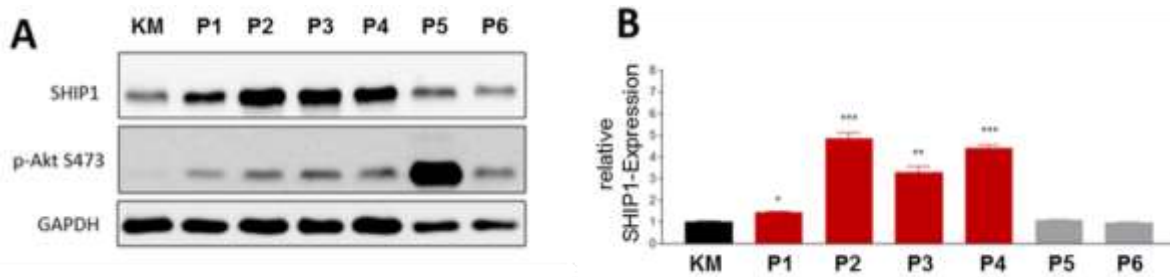
#### **4.1.2 Untersuchung der mRNA-Expression von SHIP1 in ALL-Zelllinien**

Des Weiteren wurde die RNA-Expression von SHIP1 auch in B-ALL-, T-ALL-, AML- und CML-Zelllinien untersucht. Hierzu wurde die RNA jeweils aus den Zellen isoliert, die cDNA Synthese durchgeführt und die SHIP1-mRNA-Menge mittels RT-qPCR vermessen. Abbildung S1 zeigt die SHIP1-Expression relativ zur GAPDH-Expression. In allen Zelllinien ist SHIP1 detektierbar. Die geringste SHIP1-Expression ist in der BCR-ABL-positiven CML-Zelllinie K562 zu beobachten. Die stärkste SHIP1-Expression in den ALL-Zelllinien ist in der Tel/AML1-positiven B-ALL-Zelllinie Reh als auch in der BCR-ABL-positiven B-ALL-Zelllinie SupB-15 zu beobachten. Bei den beiden untersuchten T-ALL-Zelllinien CEM und Jurkat ist kein Verlust der SHIP1-Expression auf transkriptioneller Ebene zu erkennen.

#### **4.1.3 Untersuchung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in primären ALL-Patientenproben**

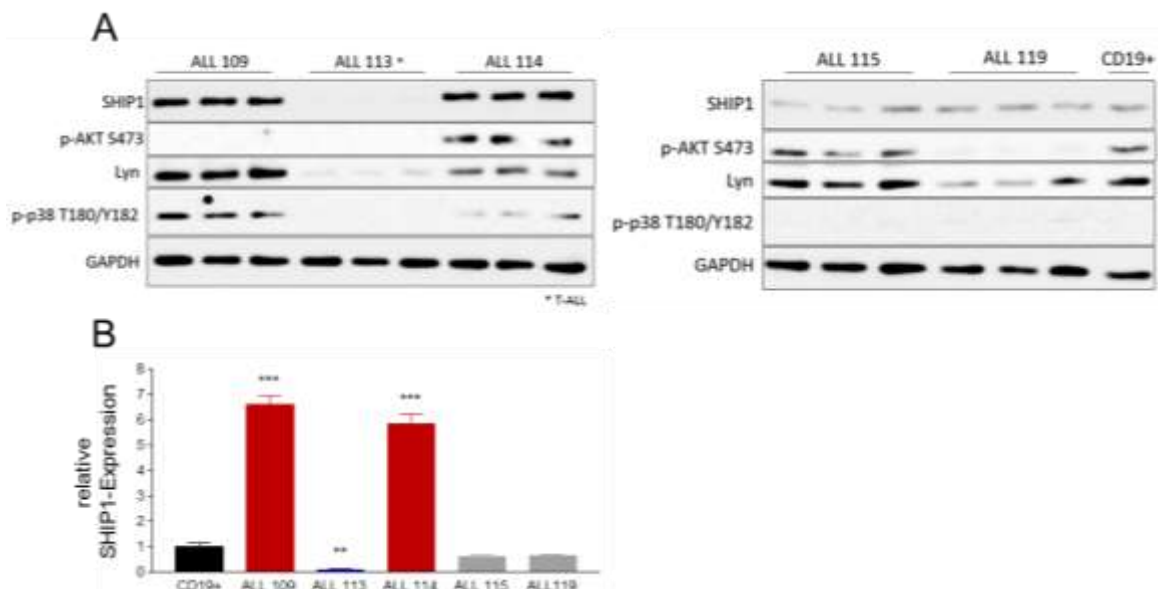
Neben der Untersuchung der SHIP1-Expression auf mRNA-Ebene wurde zudem auch die SHIP1-Expression auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden primäre B-ALL Patientenproben aus der CoALL-Studie von Prof. Horstmann (Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) verwendet. Die Proben wurden von Herrn Dr. Dierk (Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Zelllysate wurden durch eine TCE-Fällung hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Im Rahmen von Vorversuchen konnte unter Verwendung der TCE-Zelllyse mit anschließender Sonifizierung gezeigt werden, dass diese Methode die Zelle und ihre intrazellulären Strukturen am effektivsten auflöst und gleichzeitig effizient die Inaktivierung von Proteasen gewährleistet. Mit anderen Methoden sind insbesondere bestimmte Transkriptionsfaktoren im Western Blot nicht darstellbar [Wellbrock et al., 2015]. Der

Nachweis der Proteine im Western Blot wurde mithilfe von spezifischen primären und sekundären Antikörpern realisiert.



**Abbildung 17: Proteinexpression von SHIP1 in primären B-ALL-Patientenproben.** Die Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in primären B-ALL-Patientenproben im Vergleich zu gesunden Knochenmarkszellen (BM) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Die Bestimmung der relativen Expression von SHIP1 erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH (B). Bei den Proben P1, P3 und P6 handelt es sich um Tel/AML1-positive Patientenzellen. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die gesunden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der SHIP1-Expression auf Proteinebene. Dabei zeigen vier von sechs Proben eine signifikant stärkere Expression von SHIP1 als das gesunde Knochenmark (zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Dierk; Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) eines Probanden. Zudem weisen zwei (P1 und P3) dieser vier B-ALL-Patientenproben mit verstärkter SHIP1-Expression ein Tel/AML1-Fusionsprotein auf. Darüber hinaus ist bei allen sechs Patientenproben im Vergleich zu der gesunden Knochenmarkprobe eine deutliche Phosphorylierung von AKT (S473) zu erkennen.

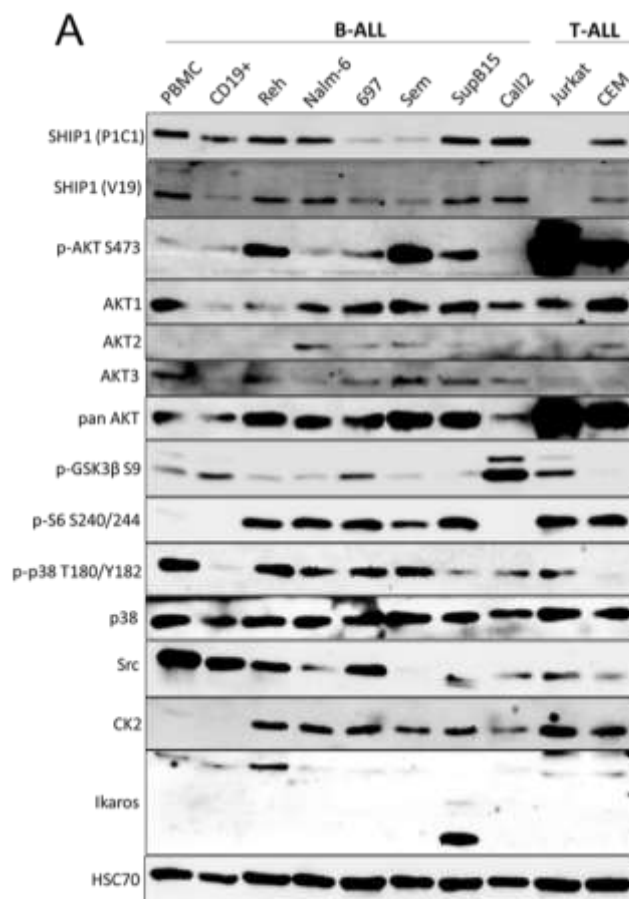


**Abbildung 18: Proteinexpression von SHIP1 in primären ALL-Xenotransplantationszellen.** Die Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in primären ALL-Xenotransplantationszellen (XT) im Vergleich zu gesunden CD19-positiven Zellen untersucht. Es wurden vier B-ALL-XT (ALL 109, ALL 114, ALL 115 und ALL 119) und eine T-ALL-XT (ALL 113) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Die Bestimmung der relativen Expression von SHIP1 erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die gesunden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Darüber hinaus wurde die SHIP1-Proteinexpression in primären Patientenzellen, welche zuvor für die Xenotransplantation in der Maus etabliert wurden, untersucht (Abbildung 18). Dabei handelt es sich um eine T-ALL-Probe (ALL 113) sowie vier B-ALL-Proben (ALL 109, ALL 114, ALL 115 und ALL 119). Die Ergebnisse zeigen eine schwach detektierbare SHIP1-Expression in der ALL 113. Demgegenüber ist die SHIP1-Expression in der ALL 109 und ALL 114 im Vergleich zu der SHIP1-Expression in gesunden CD19-positiven B-Zellen eines Probanden signifikant erhöht. Die ALL 115 und die ALL 119 zeigen vergleichbare SHIP1-Proteinmengen wie die gesunden CD19-positiven B-Zellen.

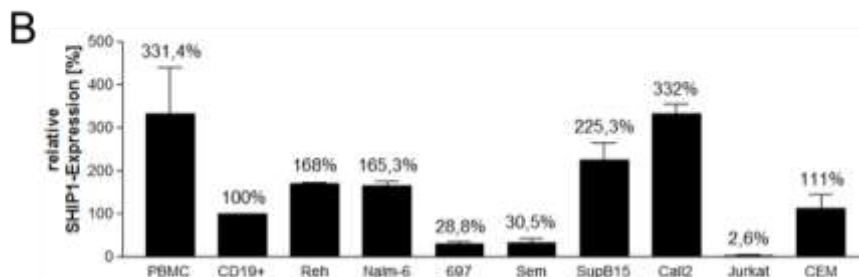
#### 4.1.4 Untersuchung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in ALL-Zelllinien

Weiterhin wurde die SHIP1-Proteinexpression in B-ALL- und T-ALL-Zelllinien untersucht (Abbildung 19).



#### Abbildung 19: Untersuchung der Proteinexpression von SHIP1 in ALL-Zelllinien.

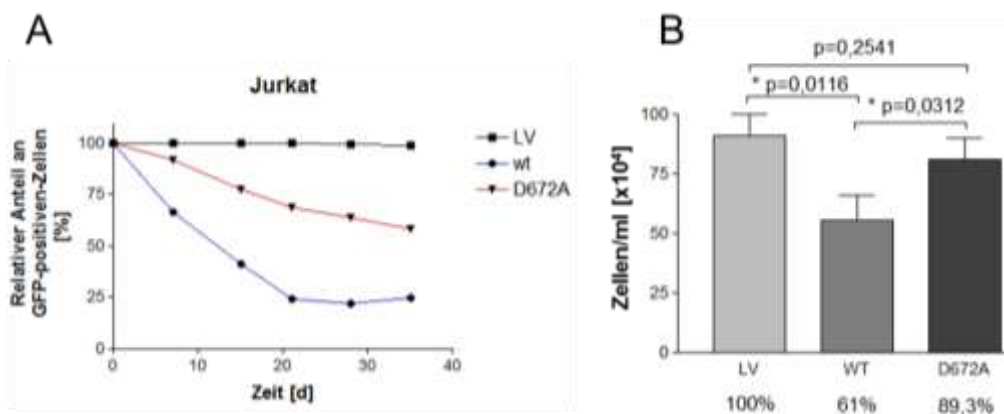
Die Expression von SHIP1 und weiterer Proteine des AKT-Signalwegs wurde auf Proteinebene in ALL-Zelllinien im Vergleich zu gesunden CD19-positiven Zellen sowie gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht. Es wurden sechs B-ALL-Zelllinien (Reh, Nalm-6, 697, Sem, SupB-15 und Call2) und zwei T-ALL-Zelllinien (Jurkat und CEM) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Die Bestimmung der relativen Expression von SHIP1 erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen HSC70 (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die gesunden CD19-positiven Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



Im Vergleich zu gesunden CD19-positiven B-Zellen (100 %) zeigen die Linien Reh (168 %), Nalm-6 (165 %), SupB-15 (225 %) und Call2 (332 %) eine verstärkte SHIP1-Expression. Demgegenüber zeigen die Linien 697 (29 %), Sem (30 %) und Jurkat (3 %) eine reduzierte SHIP1-Expression. Die T-ALL-Zelllinie CEM zeigt eine zu den CD19-positiven B-Zellen vergleichbare SHIP1-Expression (111 %). Mit Ausnahme der B-ALL-Linie Call2 ist in allen ALL-Linien, im Vergleich zu den gesunden CD19-positiven B-Zellen, eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT (S473) zu beobachten. Die stärkste Phosphorylierung von AKT kann bei der T-ALL-Linie Jurkat, welche auf Proteinebene kaum SHIP1-Protein zeigt, nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass SHIP1 in der B-ALL, im Gegensatz zur reduzierten Expression in der T-ALL, heterogen exprimiert wird.

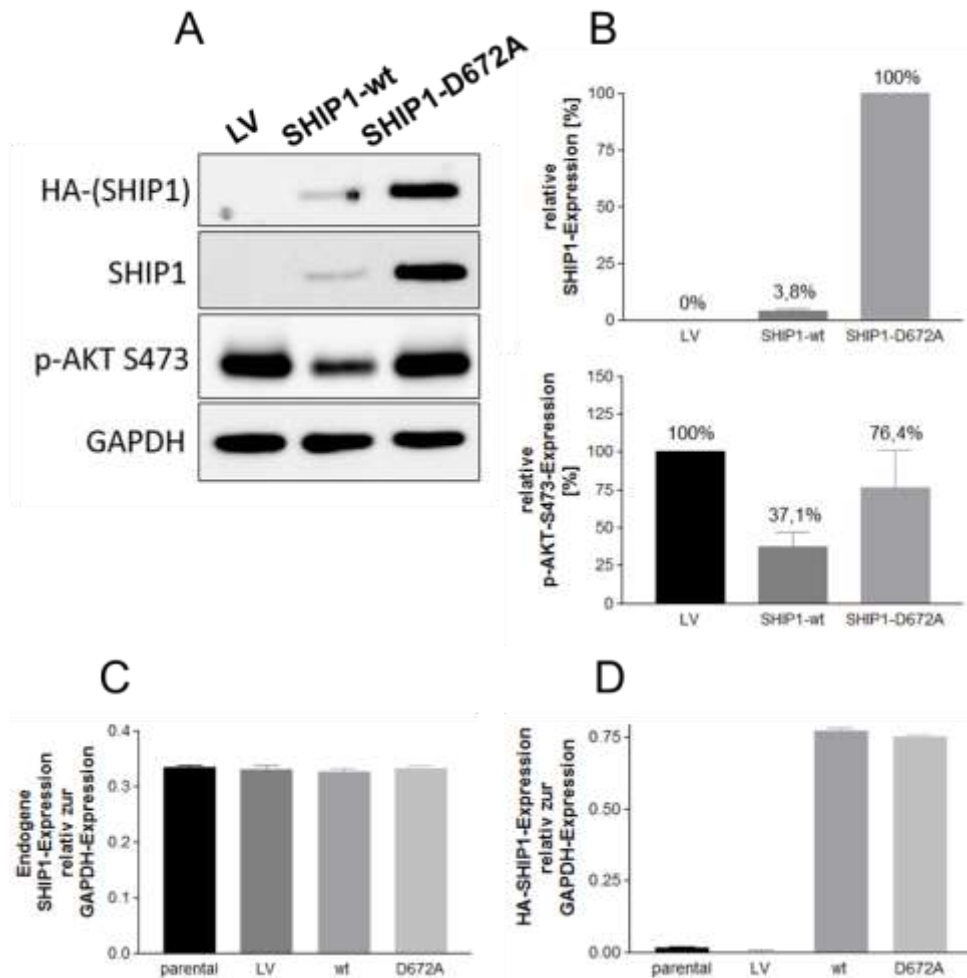
## 4.2 Untersuchung der reduzierten SHIP1-Expression in der T-ALL-Zelllinie Jurkat

Da SHIP1 sowohl in den primären T-ALL Patientenproben auf mRNA-Ebene herunterreguliert ist als auch auf Proteinebene bei den primären T-ALL 113 Zellen und in der Zelllinie Jurkat nur sehr schwach detektierbar ist, wurde unter Verwendung von lentiviralen Vektoren eine stabile SHIP1-Expression in der Zelllinie Jurkat rekonstituiert und die Effekte auf das Zellwachstum hin untersucht. Hierzu wurden Jurkat-Zellen mit lentiviralen Vektoren, welche für den SHIP1-wt als auch für eine enzymatisch reduzierte SHIP1-Mutante D672A codieren, transduziert. Zudem wurde der Leervektor als Kontrolle verwendet. Der Erfolg der Transduktion wurde mithilfe des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP), welches ebenfalls durch den lentiviralen Vektor in das Genom der Zelle eingebracht wird, gemessen. Der Vektor für die lentivirale Transduktion enthält zudem eine Puromycin-Kassette, welche zusätzlich die Selektion der transduzierten Zellen von den nicht-transduzierten Zellen unter Verwendung des Antibiotikums Puromycin erlaubt. Die Vermessung der transduzierten Jurkat-Zellen erfolgte über 35 Tage (Abbildung 20A).



**Abbildung 20: Untersuchung des Wachstumsverhalten von Jurkat-Zellen nach Rekonstitution der SHIP1-Expression.** Jurkat-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für SHIP1-wt, SHIP1-D672A und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. (A) Drei Tage nach der Transduktion wurden die GFP-positiven Zellen über die Zeit durchflusszytometrisch verfolgt. Dargestellt ist der relative Anteil an GFP-exprimierenden Zellen in Prozent. Normalisiert wurde hierzu auf den ersten Messpunkt. (B) Die stabil SHIP1-wt- und SHIP1-D672A-exprimierenden Jurkat-Zellen wurden zusammen mit den Kontrollvektor-exprimierenden Jurkat-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch in einer 6-Loch-Schale mit 2 ml Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mithilfe eines Hämocytometers gezählt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Zwei Wochen nach der Transduktion wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung von den Jurkat-Zellen mit dem Kontrollvektor (LV), dem SHIP1-wt (wt) und der SHIP1-D672A-Mutante erstellt und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 21A und B). Zudem wurde das Wachstum der transduzierten Zellen bestimmt. Hierzu wurde unter Verwendung eines Hämocytopeters jeweils das Zellwachstum 48 Stunden nach dem Aussäen der Zellen bestimmt (Abbildung 20B).



**Abbildung 21: Untersuchung des Verlustes von SHIP1 in Jurkat-Zellen nach Rekonstitution der SHIP1-Expression.** Jurkat-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für SHIP1-wt, SHIP1-D672A und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen erfolgte nach der Transduktion mit Puromycin. Zwei Wochen nach der Transduktion wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung von den Jurkat-Zellen mit dem Kontrollvektor (LV), dem SHIP1-wt (wt) und der SHIP1-D672A-Mutante (D672A) erstellt. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Die Bestimmung der relativen Expression von SHIP1 und p-AKT-S473 erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH (B). Drei Wochen nach der Transduktion wurde zudem jeweils die RNA der transduzierten Zellen isoliert. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Es wurden sowohl spezifische Oligonukleotide für das endogene SHIP1 (C) als auch für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) (D) verwendet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe.

Drei Wochen nach der Transduktion wurde zudem jeweils die RNA der transduzierten Zellen isoliert, die cDNA Synthese durchgeführt und die SHIP1-Expression mittels RT-qPCR vermessen. Es wurden sowohl spezifische Oligonukleotide für das endogene SHIP1 (Abbildung 21C) als auch für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) verwendet (Abbildung 21D).



In Abbildung 20A ist ersichtlich, dass der relative Anteil der GFP-positiven Zellen am schnellsten beim SHIP1-wt abnimmt. Nach drei Wochen liegt der relative Anteil der GFP-positiven Zellen nur noch bei knapp über 25 % der Zellen. Der Anteil der GFP-positiven Zellen bei der SHIP1-D672A-Mutante liegt nach 35 Tagen bei über 50 % der Zellen. Demgegenüber zeigt der relative Anteil der GFP-positiven Zellen beim Kontrollvektor nahezu keine Abnahme über die Zeit und bleibt weitestgehend konstant bei über 95 % der Zellen.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse (Abbildung 21A und B) zeigen, dass nach zwei Wochen die relative SHIP1-wt-Expression nur noch bei gut 4 % der SHIP1-Expression der D672A-Mutante liegt. Ausgehend von dem AKT-Phosphorylierungsstatus des Kontrollvektors sind die verbleibenden vier Prozent SHIP1-wt-Expression dennoch in der Lage die Phosphorylierung von AKT (S473) signifikant auf 37 % zu reduzieren. Die enzymatisch beeinträchtigte Mutante D672A reduziert die Phosphorylierung von AKT nicht signifikant auf lediglich 76 %. Drei Wochen nach der Transduktion zeigt die SHIP1-mRNA-Analyse (Abbildung 21D) interessanterweise vergleichbare Expressionsniveaus des SHIP1-Wildtyps als auch der SHIP1-D672A-Mutante. Die parentalen Zellen als auch die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen zeigen keine zusätzliche SHIP1-Expression. Folglich wird die SHIP1-wt-Expression auf Proteinebene herunterreguliert, wohingegen die SHIP1-Expression auf mRNA-Ebene konstant bleibt. Zudem besitzt der SHIP1-Wildtyp aufgrund der verminderten Phosphorylierung von AKT (S473) und der damit verbundenen geringeren Proliferationsrate im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen einen Wachstumsnachteil. Aufgrund des Wachstumsnachteils werden die SHIP1-positiven Zellen von den SHIP1-negativen Zellen überwachsen, weshalb der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen relativ schnell sinkt. Der Wachstumsnachteil der SHIP1-wt-exprimierenden Jurkat-Zellen ist in Abbildung 20B ersichtlich. Im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %) ist der SHIP1-wt zwei Tage nach dem Aussäen nur um 61 % gewachsen. Die enzymatisch beeinträchtigte SHIP1-Mutante D672A wächst im Vergleich zur Leervektorkontrolle um ca. 89 %. Der Wachstumsnachteil von SHIP1-exprimierenden Jurkat-Zellen deutet somit zusammenfassend auf eine Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 für die T-ALL hin.

### **4.3 Einfluss von aberrant aktivierten Tyrosinkinasen auf die Expression von SHIP1**

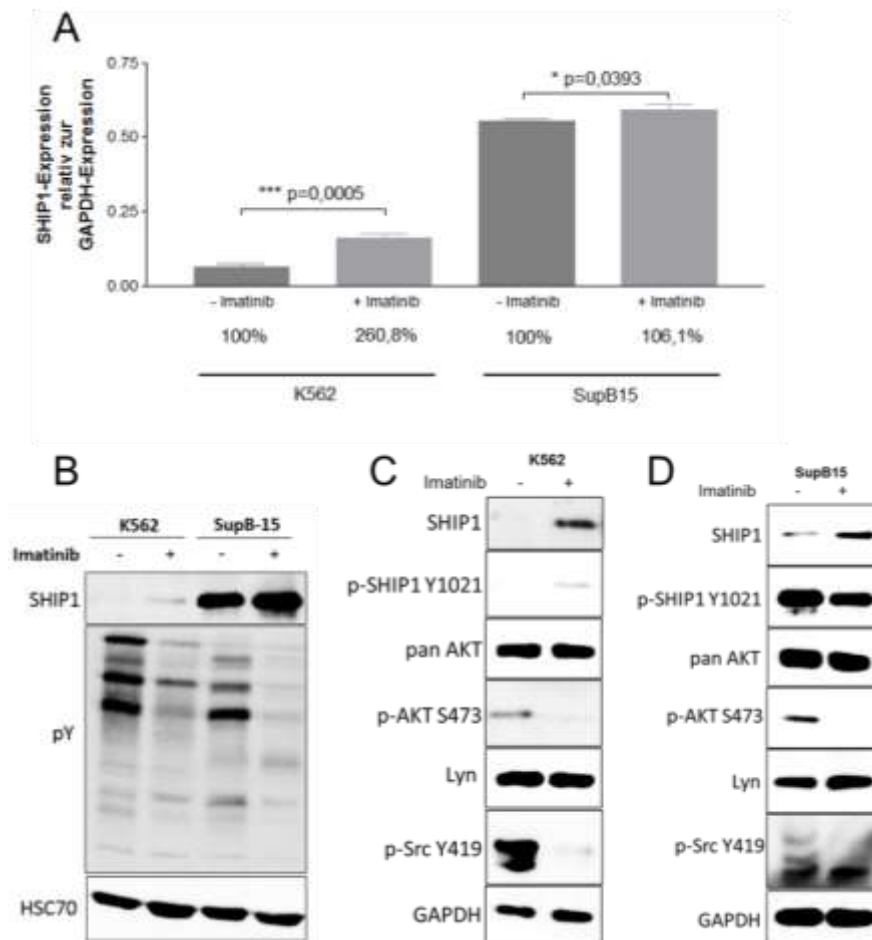
Aufgrund der drastischen Reduktion der SHIP1-Wildtyp-Expression auf Proteinebene in den Jurkat-Zellen (Kapitel 4.2) sollte sich im Folgenden genauer mit dem Vorgang des Proteinabbaus und der Stabilität von SHIP1 befasst werden. Bekanntermaßen wird SHIP1 in der CML durch das dominierende Onkogen BCR-ABL phosphoryliert und im Folgenden abgebaut [Sattler et al., 1999]. Es ist jedoch relativ wenig bekannt über die genauen intrazellulären Mechanismen, die diesem Abbauprozess zu Grunde liegen.

Zunächst einmal wurde deshalb sowohl die BCR-ABL-positive B-ALL-Linie SupB-15 als auch die BCR-ABL-positive CML-Linie K562 hinsichtlich des Protein-Abbaus von SHIP1 untersucht. Innerhalb der verschiedenen Subtypen der ALL besitzen vor allem Patienten mit einem BCR-ABL-positiven Hintergrund als auch mit einer genetischen Veränderung des MLL-Gens die weitaus schlechtesten Überlebenswahrscheinlichkeiten. Interessanterweise sind beide

Subtypen gekennzeichnet durch stark aktivierte Tyrosinkinasen. Zum einen das BCR-ABL-Fusionsprotein und zum anderen den Flt3-Rezeptor in der Gruppe der MLL-Fusionsproteine.

#### 4.3.1 Einfluss der Inhibierung von BCR-ABL auf die Expression von SHIP1

Zunächst wurden SupB-15- und K562-Zellen für 48 Stunden mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib bzw. mit DMSO behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt als auch die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die SHIP1-Proteinexpression in den Proteinlysaten wurde mittels Western Blot analysiert und die SHIP1-mRNA-Menge wurde durch RT-qPCR analysiert. Abbildung 22A zeigt das Ergebnis der Quantifizierung der SHIP1-mRNA-Menge. In beiden Zelllinien führt die Behandlung mit Imatinib auf mRNA-Ebene zu einer Erhöhung der SHIP1-mRNA-Menge im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen.

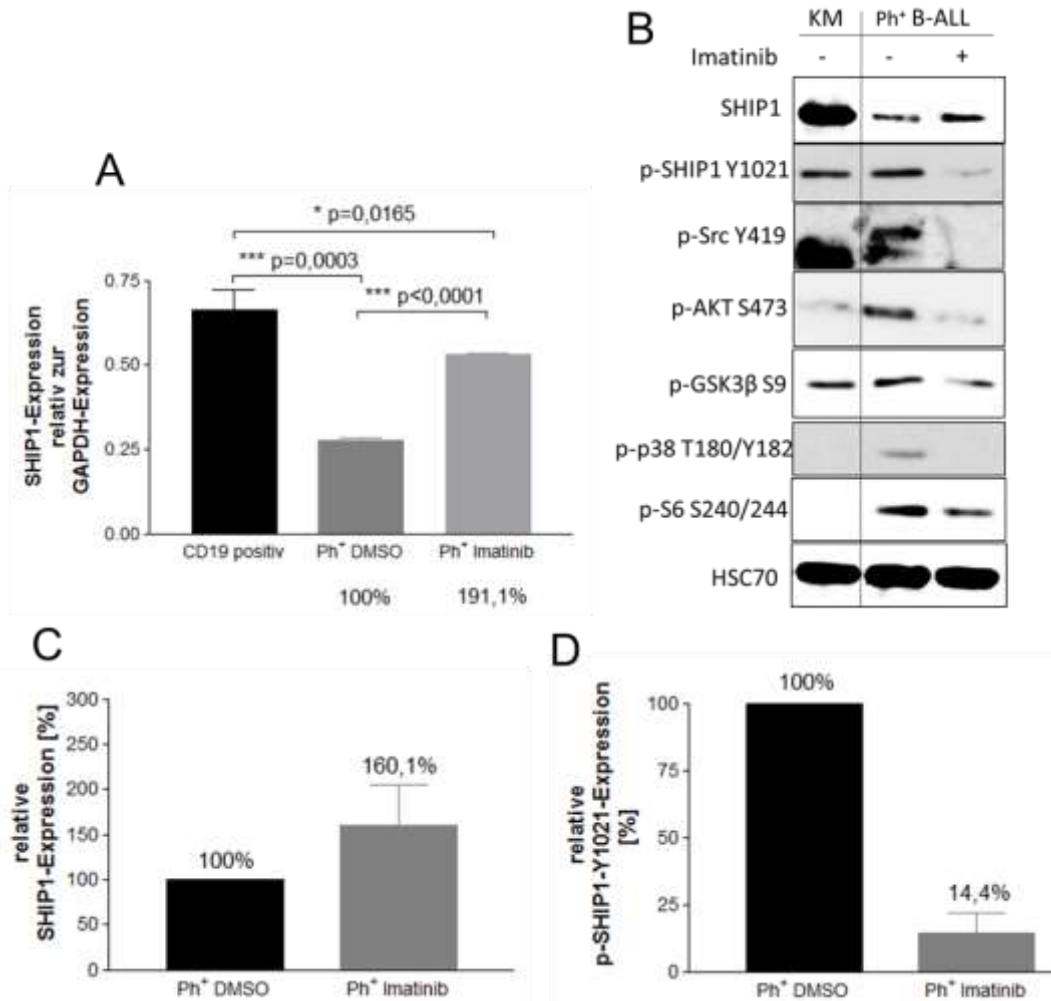


**Abbildung 22: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in BCR-ABL-positiven Leukämiezelllinien.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 wurde auf mRNA- und Protein-Ebene in den BCR-ABL-positiven Zelllinien SupB-15 und K562 vor und nach Behandlung mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 48h mit 1  $\mu$ M Imatinib oder DMSO behandelt. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde durch die jeweilige cDNA mittels RT-qPCR bestimmt (A). Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Für die Bestimmung der Proteinexpression (B) erfolgte die Lyse der Zellen durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zudem wurde der Einfluss der Imatinib-Behandlung auf die Signaltransduktion von K562 CML-Zellen (C) und SupB-15 B-ALL-Zellen (D) untersucht.

Auffälligerweise unterscheiden sich beide BCR-ABL-positiven Zelllinien sehr stark in ihrem endogenen Expressionsstatus. Die B-ALL Zelllinie SupB-15 weist eine relativ starke SHIP1-Expression auf, wohingegen die CML Zelllinie K562 relativ wenig SHIP1-mRNA exprimiert. Bei den K562-Zellen ist der Effekt der Imatinib-Behandlung im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen 2,6-fach stärker. Die Steigerung der SHIP1-mRNA-Menge durch die Behandlung mit Imatinib ist im Vergleich zu den DMSO-behandelten SupB-15-Zellen zwar auch statistisch signifikant, jedoch macht sie nur 6 % aus. Auf Proteinebene kann die SHIP1-Expression in beiden Zelllinien ebenfalls gesteigert werden (Abbildung 22B). Auch hier ist die Expression von SHIP1 in den K562-Zellen kaum detektierbar. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen ist die SHIP1-Expression nach Behandlung mit Imatinib 58,46-fach stärker (Abbildung 22C). Die damit verbundene relative Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 steigt im Vergleich zur Kontrolle um 90 % an. Demgegenüber ist die endogene SHIP1-Expression in den DMSO-behandelten SupB-15-Zellen relativ stark. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen steigt die relative SHIP1-Expression nach Behandlung mit Imatinib um den Faktor von 2,32 an (Abbildung 22D). Die damit verbundene relative Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 sinkt im Vergleich zur Kontrolle um 38 %.

Um die Effekte einer Wiederherstellung von SHIP1 durch die Inhibierung der Kinase BCR-ABL genauer zu untersuchen wurde zudem eine primäre BCR-ABL-positive B-ALL-Patientenprobe untersucht. Die Zellen wurden hierfür 5 Stunden mit Imatinib oder DMSO behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate erstellt und die RNA aufgearbeitet. Abbildung 23A zeigt das Ergebnis der Quantifizierung der SHIP1-mRNA-Menge. Es ist zu erkennen, dass die SHIP1-Expression in den primären BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen nicht so stark ist wie die SHIP1-Expression in der B-ALL Zelllinie SupB-15. Die SHIP1-mRNA-Menge lässt sich im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen nach Behandlung mit Imatinib signifikant um 91 % steigern. Dennoch kann nicht die SHIP1-mRNA-Menge, wie in den gesunden CD19-positiven B-Zellen erreicht werden. Die Ergebnisse des Western Blots in Abbildung 23B spiegeln die Ergebnisse der RT-qPCR wider. Auch auf Proteinebene kann die relativ schwache SHIP1-Proteinexpression in den DMSO-behandelten Zellen durch Intervention mit Imatinib um 60 % gesteigert werden (Abbildung 23C). Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen ist damit eine Reduzierung der Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 auf 14 % verbunden (Abbildung 23D). Auch hier kann trotz Steigerung der Proteinexpression von SHIP1 nicht das Expressions-Niveau der gesunden B-Zellen erreicht werden. Die Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 kann nach Behandlung der Zellen mit Imatinib auf das Niveau der gesunden B-Zellen gesenkt werden kann.

Da in allen Fällen die SHIP1-Expression durch Inhibierung von BCR-ABL gesteigert werden kann, wurde im Folgenden untersucht, ob auch weitere Kinasen, welche durch BCR-ABL aktiviert werden, zum Protein-Abbau von SHIP1 beitragen. Hierzu wurden zunächst verschiedene nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase in H1299-Zellen, welche stabil den SHIP1-wt exprimieren, transfiziert. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse (nicht dargestellt) zeigen insbesondere bei der Src-Kinase-Familie eine verstärkte Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 von SHIP1 nach Transfektion. In der Folge wurde diese Tyrosinkinase-Familie genauer auf ihre Auswirkungen auf die SHIP1-Expression hin untersucht.

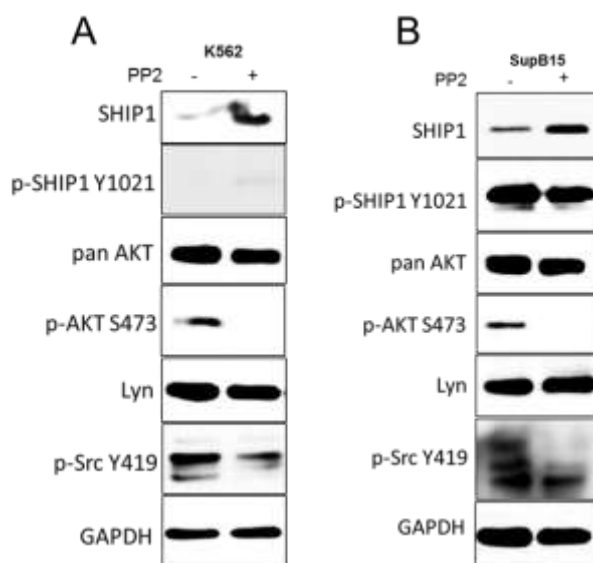


**Abbildung 23: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in primären BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 wurde auf mRNA- und Protein-Ebene in primären BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen vor und nach Behandlung mit dem BCR-ABL-Inhibitor Imatinib untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 5 h mit 5  $\mu$ M Imatinib oder DMSO behandelt. Die SHIP1-mRNA-Menge von gesunden CD19-positiven Zellen, DMSO- und Imatinib-behandelten primären Zellen wurde durch die jeweilige cDNA mittels RT-qPCR bestimmt (A). Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Für die Bestimmung der Proteinexpression von SHIP1 und weiterer Proteine des AKT-Signalwegs (B) erfolgte die Lyse von gesunden Knochenmarkszellen (KM), DMSO- und Imatinib-behandelten primären Zellen durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Bestimmung der relativen Expression von SHIP1 (C) und p-SHIP1 (D) erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen HSC70.

#### 4.3.2 Einfluss der Inhibierung der Src-Kinase-Familie auf die Expression von SHIP1

Hierzu wurde die BCR-ABL-positive B-ALL-Linie SupB-15 als auch die BCR-ABL-positive CML-Linie K562 für 24 Stunden mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 oder DMSO behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und die SHIP1-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt. In beiden Fällen kann die relative SHIP1-Expression durch Behandlung mit PP2 im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen auf das 2,78-fache (K562) bzw. 2,82-fache (SupB-15) gesteigert werden. Die damit verbundene relative Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-

Rest 1021 beträgt im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen 397 % (K562) bzw. 89,5 % (SupB-15).



**Abbildung 24: Untersuchung der Wiederherstellung von endogenem SHIP1 in BCR-ABL-positiven Leukämiezelllinien nach Intervention mit einem Src-Kinase-Hemmstoff.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene für die BCR-ABL-positiven Zelllinien SupB-15 und K562 vor und nach Behandlung mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 24 h mit 10  $\mu$ M PP2 oder DMSO behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Bild (A) zeigt den Einfluss der PP2-Behandlung auf die SHIP1-Expression und Signaltransduktion von K562-CML-Zellen. Bild (B) zeigt den Einfluss der PP2-Behandlung auf die SHIP1-Expression und Signaltransduktion von SupB-15 B-ALL-Zellen.

### 4.3.3 Einfluss der Inhibierung des Flt3-Rezeptors auf die Expression von SHIP1

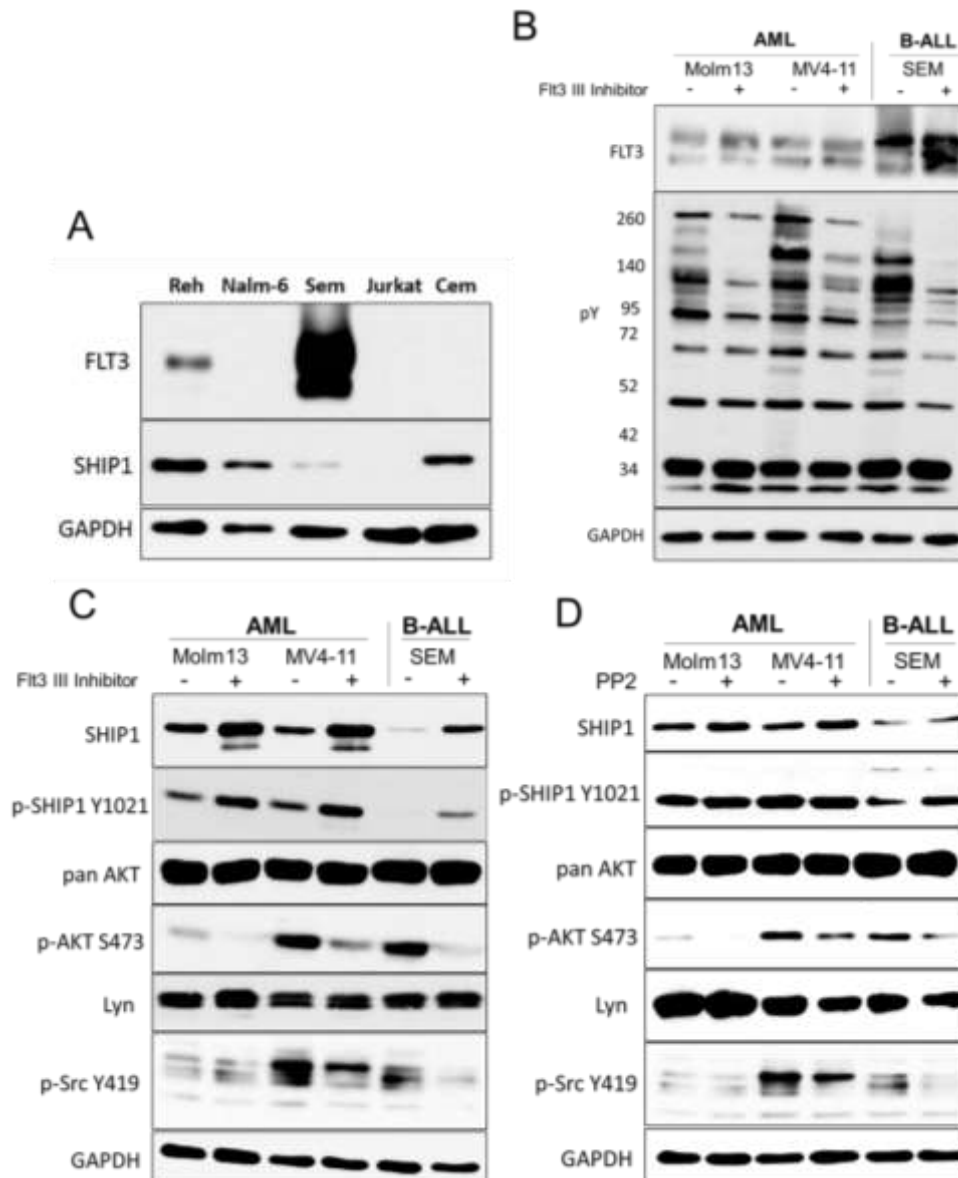
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es noch weitere genetische Aberrationen gibt, die dafür verantwortlich sind, dass das SHIP1-Protein gesteigert abgebaut wird. Interessanterweise weist die t(4;11)-positive ALL-Linie Sem eine geringe SHIP1-Proteinexpression auf. Von der t(4;11)-Aberration ist bekannt, dass dort eine gesteigerte Flt3-Aktivität zu finden ist. Diese Aktivität führt, ähnlich der konstitutiven Aktivierung ausgehend von der Flt3-ITD, zu einer veränderten Aktivierung von verschiedenen Signalwegen [Cheng et al., 2018].

Zunächst wurde analysiert, wie stark die Flt3-Expression in den vorhandenen ALL-Zelllinien ist. In Abbildung 25A ist zu erkennen, dass lediglich die B-ALL-Zelllinien Reh und Sem Flt3 exprimieren. Vor allem die t(4;11)-positive Linie Sem zeichnet sich durch eine sehr starke Flt3-Expression aus.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Flt3-Aktivität auf den Abbau des SHIP1-Proteins unter Verwendung eines Flt3-Inhibitors (Flt3 III) untersucht. Zusätzlich zu der B-ALL-Zelllinie Sem wurden noch zwei Flt3-ITD-positive AML-Zelllinien untersucht (MV-4,11 und Molm13). In einem Vorexperiment konnte gezeigt werden, dass die AML-Zelllinien MV-4,11 und Molm13 im Vergleich zu anderen AML-Zelllinien ebenfalls nur sehr schwach detektierbare SHIP1-Proteinmengen besitzen (nicht dargestellt). Die Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Flt3-Inhibitor oder DMSO inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte durch einen Western Blot.

In Abbildung 25B und C sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse dargestellt. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %) führt die Behandlung mit dem Flt3-Inhibitor in allen drei Fällen zu einer verstärkten SHIP1-Expression (Molm13: 181 %; MV4-11: 272 %; Sem: 984 %) und Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 (Molm13: 183 %; MV4-11: 181 %; Sem: 2628 %). Damit verbunden ist eine Reduzierung der relativen

Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 (Molm13: auf 19,4 %; MV4-11: auf 30,5 %; Sem: auf 12,8 %) zu beobachten.



**Abbildung 25: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in Flt3 konstitutiv aktivierten Leukämiezellen.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in den Flt3 konstitutiv aktivierten Leukämiezellen Molm-13, MV4-11 und Sem vor und nach Behandlung mit dem Flt3-Kinase Inhibitor Flt3 III untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 48 h mit 2,5  $\mu$ M Flt3 oder DMSO behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Bild (A) zeigt die Flt3-Expression in ausgewählten ALL-Zelllinien. Bild (B) zeigt den Einfluss der Flt3-Hemmung auf die Expression Tyrosin-phosphorylierter Proteine. Bild (C) zeigt den Einfluss der Flt3-Behandlung auf die SHIP1-Expression und Signaltransduktion von Flt3 konstitutiv-aktivierten Leukämiezellen. Bild (D) zeigt den Einfluss der PP2-Behandlung auf die SHIP1-Expression und Signaltransduktion von Flt3 konstitutiv-aktivierten Leukämiezellen.

Anschließend wurde untersucht, ob der Flt3-Rezeptor direkt oder indirekt über die Aktivierung einer nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, wie einer Kinase aus der Src-Familie, den Proteinabbau einleitet. Hierzu wurden die verwendeten Zelllinien mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 oder DMSO für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und die SHIP1-Expression mittels Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 25D dargestellt. In den drei verwendeten Zelllinien führt die Inhibierung der Src-Kinasen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %) jeweils zu einem Anstieg der relativen SHIP1-Expression (Molm13: 122 %; MV4-11: 110 %; Sem: 121 %). Damit verbunden ist eine Zunahme der relativen SHIP1-Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 in der Zelllinie Molm-13 und Sem (Molm13, 118 %; Sem, 158 %). Demgegenüber zeigt die Zelllinie MV4-11 eine Abnahme der relativen SHIP1-Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 auf 80 %. Zudem führt die Inhibierung der Src-Kinasen im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %) zu einer Reduzierung der Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 (Molm13: 8 %; MV4-11: 43 %; Sem: 31 %).

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass insbesondere durch die konstitutiv aktivierten Tyrosinkinasen BCR-ABL und Flt3, aus den Hochrisikogruppen mit Philadelphia-Chromosom respektive MLL-Translokation, der Abbau von SHIP1 initiiert wird.

#### **4.3.4 Untersuchung des Src-Kinase-Familie-vermittelten Protein-Abbaus von SHIP1**

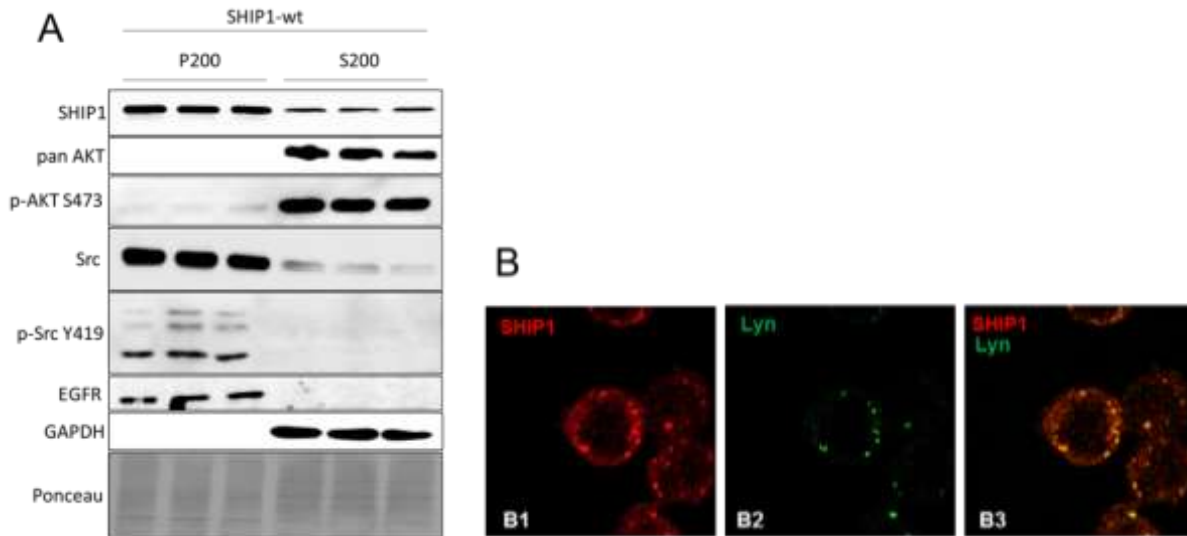
Die zuvor dargestellten Ergebnisse deuten auf einen Tyrosinkinase-vermittelten-Abbau des SHIP1-Proteins hin. Allen voran kann die Src-Kinase-Familie als eine Schaltstelle für den Abbau von SHIP1 identifiziert werden. Im Folgenden sollte ein genauerer Einblick in den Src-vermittelten-Abbau von SHIP1 gewonnen werden. Zunächst einmal wurde die Lokalisation von SHIP1 und der Src-Kinase-Familie tiefergehend untersucht. Hierzu wurde zum einen eine Membran/Zytoplasma-Fraktionierung durchgeführt und zum anderen die Lokalisation von SHIP1 und Lyn in B-ALL-Zellen mittels eines konfokalen Mikroskops analysiert.

Die Ergebnisse der Membran/Zytoplasma-Fraktionierung sind in Abbildung 26A dargestellt. Sie zeigen, dass SHIP1 und Src prädominant in der Membran-Fraktion (P200) lokalisiert sind. Beide sind jedoch auch in geringerem Maße in der Zytoplasma-Fraktion (S200) zu finden. Die phosphorylierte (Y419) und aktive Konformation von Src ist dabei fast ausschließlich in der Membran-Fraktion zu finden. AKT kann demgegenüber nur in der Zytoplasma-Fraktion identifiziert werden. Die phosphorylierte (S473) und aktivierte Form von AKT kann in diesem Fall fast ausschließlich in der Zytoplasma-Fraktion detektiert werden. Als Kontrolle für die Reinheit der Membran-Fraktion wurde der EGF-Rezeptor analysiert. Als Kontrolle für die Reinheit der Zytoplasma-Fraktion wurde GAPDH analysiert. Sowohl die Membran- als auch die Zytoplasma-Fraktion sind rein.

Die Ergebnisse der konfokalen Untersuchung von SHIP1 und Lyn sind in Abbildung 26B dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass SHIP1 und Lyn in Call3-Zellen partiell in punktförmigen Strukturen in der Zelle kolokalisieren.

Im darauffolgenden Schritt wurde die Protein-Expression der Src-Kinase Lyn, welche ubiquitär in B-Zellen exprimiert wird, mithilfe eines lentiviralen shRNA Knockdown-Vektors in Sem- und SupB-15-Zellen herunterreguliert. Abbildung 27A zeigt, dass durch die Herunterregulation von Lyn in Sem-Zellen, im Vergleich zu der scr-Kontrolle, die SHIP1-Expression um das 2,05-fache ansteigt. Damit verbunden ist eine Abnahme der relativen Phosphorylierung der Src-Kinase am Tyrosin-Rest 419 um 44 %. Zudem führt die Herunterregulation von Lyn in SupB-15-Zellen, im Vergleich zu der scr-Kontrolle, zu einer 1,62-fach gesteigerten SHIP1-

Expression (Abbildung 27B). Damit verbunden kommt es in den SupB-15-Zellen ebenfalls zu einer Abnahme der relativen Phosphorylierung der Src-Kinase am Tyrosin-Rest 419 um 27 %.



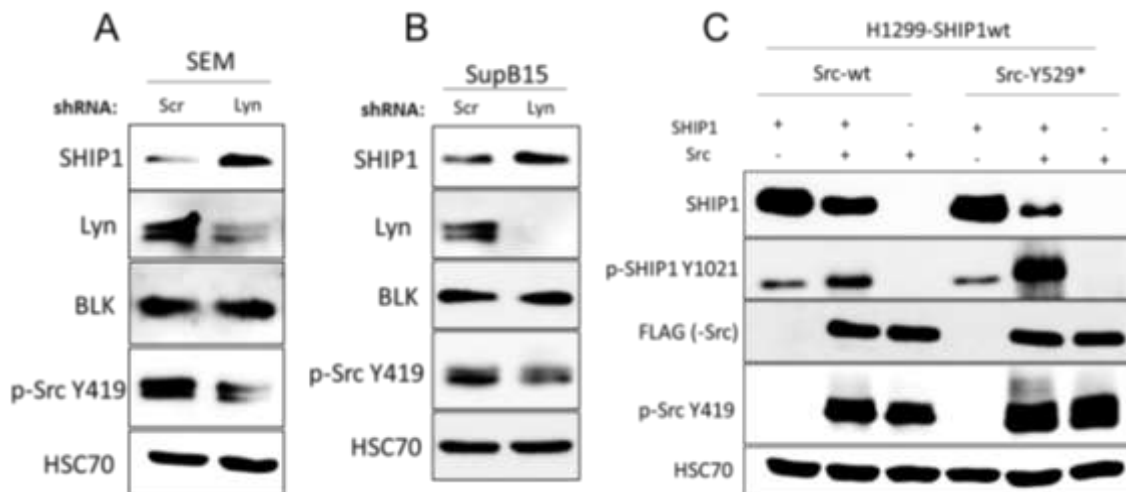
**Abbildung 26: Darstellung der Membran- und Zytoplasma-Lokalisation von SHIP1 und Src-Kinasen.** Zur Untersuchung der Kolokalisation von SHIP1 und der Src-Kinase-Familie wurde die subzelluläre Lokalisation beider Proteine untersucht. Bild (A) zeigt die Fraktionierung von Membran und Zytoplasma von stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrollen für eine reine Fraktionierung von Membran (P200) und Zytoplasma (S200) wurde sowohl gegen den EGF-Rezeptor als auch gegen GAPDH gerichtete Antikörper verwendet. SHIP1 und die Src-Kinase zeigen ein ähnliches Lokalisationsmuster. Es wurde zudem eine Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran zur Kontrolle des Gesamtproteingehaltes durchgeführt. Bild (B) zeigt die Immunfärbung von SHIP1 (rot) und Lyn (grün) in Call3 B-ALL-Zellen. SHIP1 und Lyn kolokalisieren vor allem in punktförmigen Strukturen in der Zelle. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Zellen unter Verwendung eines konfokalen Mikroskops untersucht. Als Primärantikörper wurde ein anti-SHIP1 (B1) und ein anti-Lyn (B2) Antikörper verwendet. B3 zeigt ein Overlay-Bild der SHIP1- und Lyn-Färbung.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der überexprimierten Src-Kinase auf den Abbau von SHIP1 untersucht. Hierzu wurden H1299-Lungenkarzinom-Zellen gewählt. Diese Zellen eignen sich als Modellzellsystem sehr gut, da sie leicht zu transfizieren sind, eine starke Phosphorylierung von AKT (S473) aufweisen und eine vergleichsweise geringe Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Y419) zeigen. Diese Zellen wurden zuvor stabil mit dem SHIP1-Wildtyp transduziert. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss eine konstitutiv-aktivierte Src-Kinase (Y529\*) im Vergleich zu einer nicht-konstitutiv-aktivierten Src-Kinase (wt) auf die Expression von SHIP1 hat. Hierzu wurden stabil SHIP1-wt-exprimierende H1299-Zellen mit dem Kontrollvektor oder dem entsprechenden Src-Kinase-Konstrukt transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion der Zellen wurde jeweils ein Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt. Die Proteinlysate wurden im Western Blot analysiert.

Abbildung 27C zeigt die Ergebnisse des Western Blots. Es ist ersichtlich, dass die Abnahme der SHIP1-Proteinmenge durch die aktivierte Src-Kinase (um 69 %), im Vergleich zu dem Src-Kinase-Wildtyp (um 33 %), wesentlich stärker ausfällt. Zudem wird SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 wesentlich stärker durch die aktivierte Src-Kinase (4,95-fach) phosphoryliert als durch



den Src-Kinase-Wildtyp (2,12-fach). Dies könnte auf einen Src-Kinase-vermittelten-Abbau von SHIP1 durch Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 hindeuten.



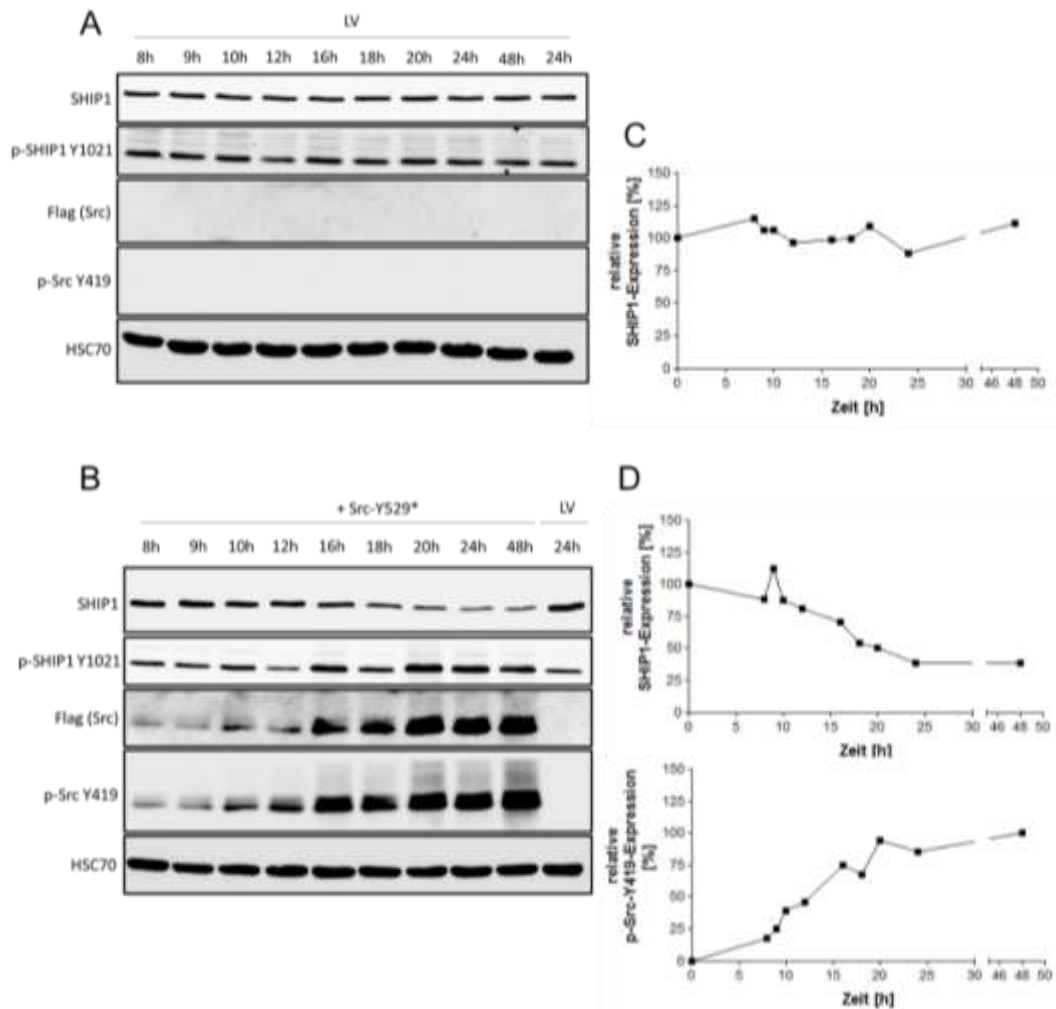
**Abbildung 27: Untersuchung des Einflusses der Expression der Src-Kinasen Lyn und Src auf die Expression von SHIP1.** Die Veränderung der Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in Lyn Knockdown B-ALL-Zellen untersucht. Sem- (A) und SupB-15- (B) Zellen wurden hierzu mit shRNA-scr und shRNA-Lyn transduziert. GFP-positive Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer sortiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Veränderung der Expression von SHIP1 wurde zudem in stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen nach transienter Expression von Src-wt und Src-Y529\* untersucht (C). Hierzu wurden stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen mit dem Kontrollvektor oder dem entsprechenden Src-Kinase-Konstrukt transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion der Zellen wurde jeweils ein Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Im Folgenden wurde die Kinetik des Protein-Abbaus von SHIP1 durch Induktion der Src-Kinase-Expression untersucht. Hierzu wurde zunächst die Entwicklung der Src-Expression in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen über ein Markerprotein (GFP) über die Zeit in einer *Live-Cell-Imaging*-Plattform (IncuCyte Zoom) untersucht. Abbildung S2 zeigt, dass acht Stunden nach der Transfektion die ersten Zellen das GFP exprimieren. Die GFP-Expression steigt bis zum 20 Stunden-Wert exponentiell an. Ab ca. 20 Stunden nach der Transfektion steigt die GFP-Expression in den Zellen linear an. Ab ca. 48 Stunden nach Transfektion erreicht die GFP-Expression ihr Maximum.

Im nächsten Schritt wurden stabil SHIP1-exprimierende Zellen mit der aktivierten Src-Kinase oder dem Kontrollvektor transfiziert und für definierte Zeiten exprimiert. Anschließend (8,9,10,12,16,18,20, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion) wurden die Zellen zu den definierten Zeitpunkten aufgearbeitet. Hierzu wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Phosphorylierung der aktivierten Src-Kinase mit zunehmender Zeit ansteigt. Demgegenüber kann keine Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie bei den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen detektiert werden.

Mit steigender Expression der aktivierten Src-Y529\*-Kinase steigt auch die Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 419 an. Damit verbunden nimmt mit zunehmender Zeit die SHIP1-Protein-Expression ab. 24 Stunden nach der Transfektion der Src-Kinase ist eine maximale Abnahme

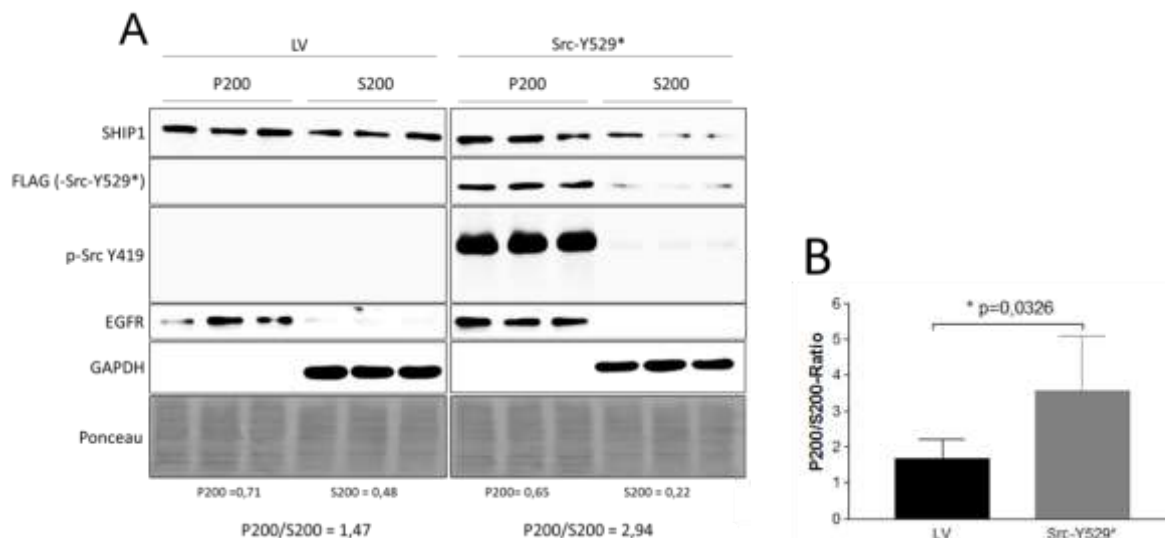
der relativen SHIP1-Expression auf einen Wert von 38 % zu beobachten. Die relative Halblebenszeit des SHIP1-Proteins nach Induktion der Src-Y529\*-Expression beträgt 16,13 Stunden. Bei den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen ist demgegenüber keine Abnahme der SHIP1-Expression zu beobachten.



**Abbildung 28: Untersuchung der Abbau-Kinetik von SHIP1 in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen durch Expression von Src-Y529\*.** Die Veränderung der Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen vor und nach transienter Transfektion mit Src-Y529\* zeitlich untersucht. Hierzu wurden stabil SHIP1-exprimierende Zellen jeweils mit der DNA für die Src-Y529\*-Mutante oder der Vektorkontrolle transfiziert. Anschließend wurden Lysate nach 8, 9, 10, 12, 16, 18, 20, 24 und 48 Stunden von den jeweiligen transient transfizierten Zellen gewonnen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. (A) zeigt die transiente Transfektion der Zellen mit dem Kontrollvektor. (B) zeigt die transiente Transfektion der Zellen mit der Src-Y529\*-Mutante. (C) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression für die Kontrollvektor-transfizierten Zellen. (D) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression mit der entsprechenden Quantifizierung der relativen p-Src-Y419-Expression für die Src-Y529\* transfizierten Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisationsänderung von SHIP1 nach Induktion der Expression der aktivierten Src-Kinase (Y529\*) untersucht. Hierzu wurden stabil SHIP1-exprimierende H1299-Zellen entsprechend mit Src-Y529\* oder der Leervektorkontrolle transfiziert. Anschließend wurde jeweils eine Membran/Zytoplasma-Fraktionierung von diesen

Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Membran/Zytoplasma-Fraktionierung sind in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Untersuchung der Lokalisation des Proteinabbaus von SHIP1 nach Induktion der Src-Kinase-Expression.** Zur Untersuchung der Lokalisation des Proteinabbaus von SHIP1 wurde eine Fraktionierung von Membran und Zytoplasma durchgeführt. Die verwendeten stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen wurden entweder mit der DNA für die Src-Y529\*-Mutante oder dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert. Bild (A) zeigt die Fraktionierung von Membran und Zytoplasma von stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen mit und ohne Src-Y529\*-Expression. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrollen für eine reine Fraktionierung von Membran (P200) und Zytoplasma (S200) wurden sowohl gegen den EGF-Rezeptor- als auch gegen GAPDH-gerichtete Antikörper verwendet. SHIP1 und die Src-Kinase (FLAG-Tag) zeigen ein ähnliches Lokalisationsmuster. Es wurde zudem eine Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran zur Kontrolle des Gesamtprotein Gehaltes durchgeführt. Bild (B) zeigt die Quantifizierung der SHIP1-Expression in der P200- (Membran) und der S200- (Zytoplasma) Fraktion. Dargestellt ist die jeweilige P200 zu S200 Ratio. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe ( $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Es zeigt sich, dass die Expressionsstärke zwischen Src-Y529\* und der Leervektorkontrolle in der Membran-Fraktion vergleichbar ist (Src-Y529\*: 0,71; Leervektorkontrolle: 0,65). Demgegenüber ist die Expressionsstärke von SHIP1 durch Src-Y529\* (0,22) in der Zytoplasma-Fraktion, im Vergleich zu der Leervektorkontrolle (0,48), vermindert. In der Folge verschiebt sich die P200/S200-Ratio der Src-Y529\*-exprimierenden Zellen, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen, signifikant in Richtung P200-Fraktion. Die phosphorylierte (Y419) und aktive Konformation von Src ist dabei fast ausschließlich in der Membran-Fraktion zu finden. Als Kontrolle für die Reinheit der Membran-Fraktion wurde der EGF-Rezeptor analysiert. Als Kontrolle für die Reinheit der Zytoplasma-Fraktion wurde GAPDH analysiert. Sowohl die Membran- als auch die Zytoplasma-Fraktion sind rein.

Weiterhin kann gezeigt werden, dass neben Src weitere Src-Kinase-Familien Mitglieder in der Lage sind die SHIP1-Expression zu reduzieren (Abbildung S3). Dabei ist zu beobachten, dass die relative Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 durch die einzelnen Src-Kinase-Familie-Mitglieder im Vergleich zu der Leervektorkontrolle in allen Fällen ansteigt (Tabelle S1). Dies weist auf eine Src-Kinase-vermittelte Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 hin. Damit verbunden sinkt die relative SHIP1-Expression durch die

einzelnen Src-Kinase-Familie-Mitglieder im Vergleich zu der Leervektorkontrolle in allen Fällen. Im Vergleich zu der Leervektorkontrolle (100 %) wird die stärkste Reduktion der SHIP1-Expression dabei durch die Kombination von Lyn, Hck und Fgr erreicht (25 %). Diese drei Mitglieder der Src-Kinase-Familie werden vor allem durch die Anwesenheit von BCR-ABL in BCR-ABL-positiven Zellen aktiviert [Hu et al., 2004].

#### **4.3.5 Analyse der funktionellen Bedeutung von SHIP1-Phosphorylierungsstellen auf den proteasomalen Abbau**

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welches die Phosphorylierungsstellen von SHIP1 sind, die, durch die Tyrosinkinasen der Src-Kinase-Familie und BCR-ABL, zum Abbau von SHIP1 führen. Hierzu wurden die Phosphorylierungsstellen von SHIP1 in der Phosphosite-Datenbank analysiert [Hornbeck et al., 2004; <https://www.phosphosite.org/homeAction.action>].

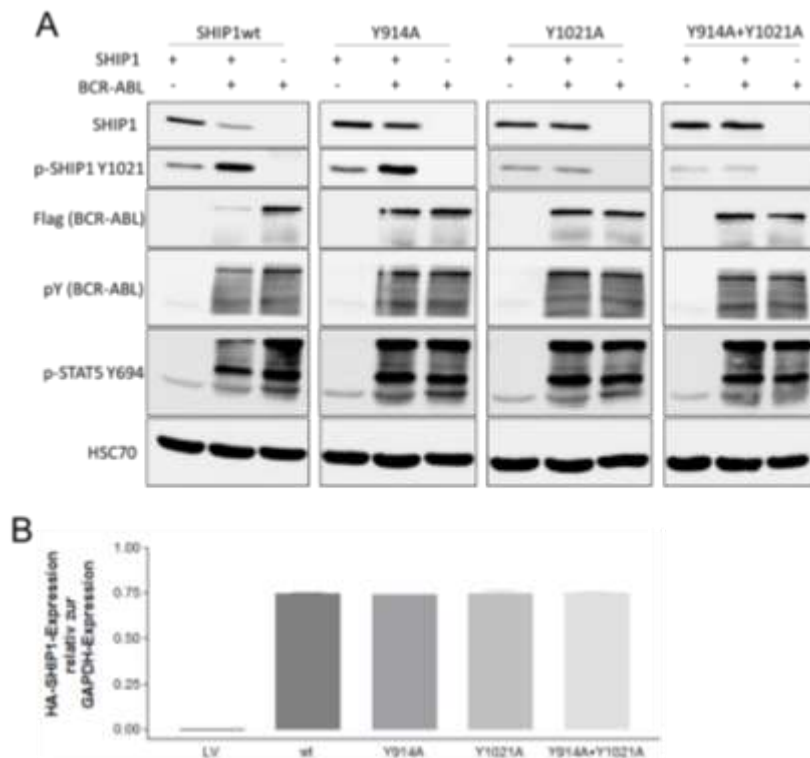
Insbesondere drei mögliche SHIP1-Phosphorylierungsstellen sind von besonderem Interesse. Auffällig ist zum einen der Tyrosin-Rest 864, der unmittelbar hinter der C2-Domäne der Phosphatase-Domäne lokalisiert ist. Der Tyrosin-Rest 864 ist die putative Phosphorylierungsstelle von SHIP1 mit den meisten „hits“ in der Phosphosite-Datenbank. Aufgrund seiner Lage in unmittelbarer Nähe zur Phosphatase-Domäne wurde entschieden, diesen Tyrosin-Rest in einem Phosphatase-Assay genauer zu untersuchen (Kapitel 4.4.2).

Bei den anderen beiden SHIP1-Phosphorylierungsstellen handelt es sich ebenfalls um Tyrosin-Reste, die ebenfalls eine hohe Anzahl an „hits“ in der Phosphosite-Datenbank aufweisen. Zudem handelt es sich bei diesen beiden Tyrosin-Resten um die Tyrosin-Reste der beiden NPXY-Motive.

Für die genauere Untersuchung dieser Tyrosin-Reste und ihrer Funktion wurde entschieden, Tyrosin-zu-Alanin-Dephosphorylierungsmutanten zu generieren. Neben der Y864A-, Y914A- und Y1021A-Mutante wurde zudem eine Y914A+Y1021A-Doppelmutante erstellt. Die entsprechenden Mutanten, der SHIP1-Wildtyp und der Kontrollvektor wurden jeweils mithilfe von Lentiviren stabil in das Genom von H1299-Lungenkarzinomzellen eingebaut. Die Zellen wurden danach unter Verwendung von Puromycin selektioniert. Zwei Wochen nach der Selektion der Zellen wurde jeweils die RNA der Zellen isoliert, die cDNA Synthese durchgeführt und die SHIP1-HA-mRNA-Menge mittels RT-qPCR gemessen. Abbildung 30B zeigt die Ergebnisse der Messung. Die Darstellung zeigt, dass sowohl SHIP1-wt als auch alle Mutanten erfolgreich transduziert wurden. Zunächst wurde der Einfluss von BCR-ABL auf den Abbau von SHIP1 und seiner Dephosphorylierungsmutanten untersucht. Hierzu wurden sowohl SHIP1-wt-Zellen als auch die Zellen mit den Dephosphorylierungsmutanten jeweils mit dem BCR-ABL-Onkogen transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Es wurden anschließend Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt. Danach wurden die Lysate mittels Western Blot analysiert. Abbildung 30A zeigt die Ergebnisse des Western Blots.

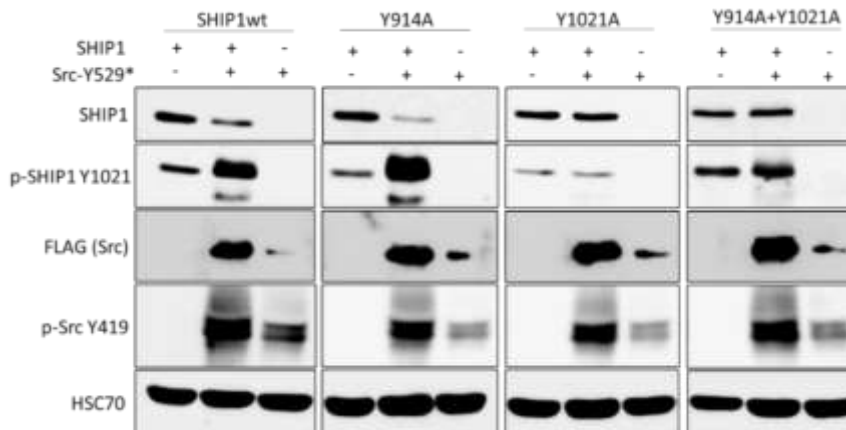
Die Ergebnisse zeigen, dass im Falle des SHIP1-Wildtyps (40 %) als auch der Y914A-Mutante (70,5 %) eine Reduktion der relativen SHIP1-Expression, im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen (100 %), zu beobachten ist. Damit verbunden kann eine erhöhte Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 durch die Expression von BCR-ABL, im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen (100 %), identifiziert werden (wt: 308 %; Y914A: 232 %). Demgegenüber zeigen die SHIP1-Y1021A- (95 %) und SHIP1-

Y914A+Y1021A-Dephosphorylierungsmutanten (107 %) keine deutlichen Verminderungen in ihrer Expression im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen. Zudem ist in diesen Fällen durch BCR-ABL auch keine Veränderung in der Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 1021 von SHIP1 zu erkennen (Y1021A: 107 %; Y914A+Y1021A: 91 %). Jedoch muss angefügt werden, dass eine schwache, möglicherweise auch unspezifische, Phosphorylierung durch den SHIP1 phospho-Tyrosin-1021-Antikörper bei beiden Mutanten detektiert wird. Darüber hinaus ist ersichtlich, dass in allen Ansätzen die Transfektion und Expression von BCR-ABL erfolgreich war.



**Abbildung 30: Untersuchung der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 durch BCR-ABL-Induktion.** Zur Identifikation der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 wurde die Veränderung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in stabil SHIP1wt-, SHIP1-Y914A-, SHIP1-Y1021A- und SHIP1-Y914A+Y1021A-exprimierenden H1299-Zellen vor und nach transients Transfektion mit BCR-ABL untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen stabil SHIP1-exprimierenden Zellen und die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen jeweils mit BCR-ABL oder dem Kontrollvektor transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Zur Kontrolle einer vergleichbaren SHIP1-Expression nach Transduktion wurde die Expression von SHIP1 auf mRNA-Ebene in den verschiedenen stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen untersucht. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der HA-SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH (B). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe.

Im Folgenden wurde ebenfalls der Einfluss der aktivierten Src-Y529\*-Kinase auf den Abbau von SHIP1 und seiner Dephosphorylierungsmutanten untersucht. Hierzu wurden ebenfalls SHIP1-wt-exprimierende Zellen als auch die Dephosphorylierungsmutanten-exprimierenden Zellen mit der aktivierten Src-Y529\*-Mutante transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Es wurden anschließend Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt. Danach wurden die Lysate mittels Western Blot analysiert. Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse des Western Blots.



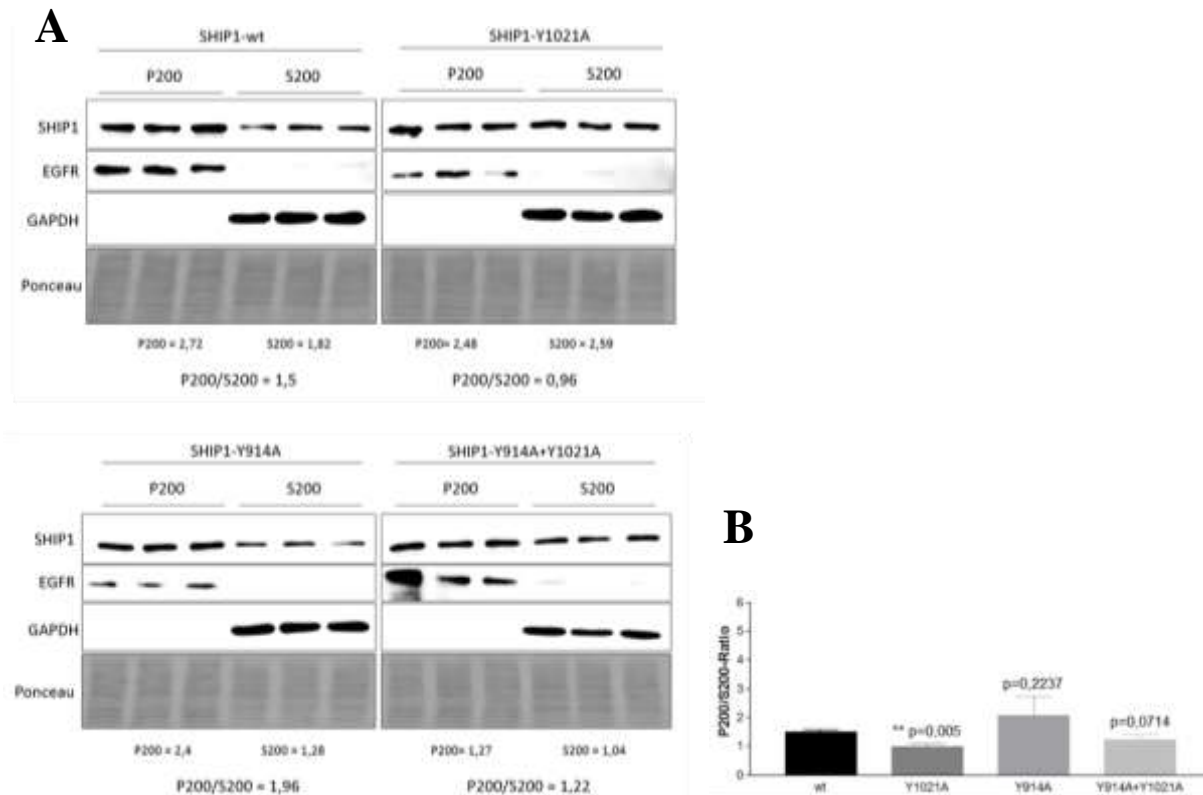
**Abbildung 31: Untersuchung der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 durch Src-Y529\*-Induktion.** Zur Identifikation der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 wurde die Veränderung der Expression von SHIP1 auf Proteinebene in stabil SHIP1wt-, SHIP1-Y914A-, SHIP1-Y1021A- und SHIP1-Y914A+Y1021A-exprimierenden H1299-Zellen vor und nach transients Transfektion mit Src-Y529\* untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen stabil SHIP1-exprimierenden Zellen und die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen jeweils mit Src-Y529\* oder dem Kontrollvektor transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Falle des SHIP1-Wildtyps (42 %) als auch der Y914A-Mutante (18 %) eine Reduktion der relativen SHIP1-Expression, im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen (100 %), zu beobachten ist. Damit verbunden kann eine erhöhte Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021, im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen (100 %), identifiziert werden (wt: 240 %; Y914A: 420 %).

Demgegenüber zeigen die SHIP1-Y1021A- (90 %) und SHIP1-Y914A+Y1021A-Dephosphorylierungsmutanten (96 %), im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen, nur geringe Verminderungen in ihrer Expression. Zudem ist auch kein starker Anstieg in der Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021, im Vergleich zu den Kontrollvektor transfizierten Zellen, zu erkennen (Y1021A: 94 %; Y914A+Y1021A: 120 %). Jedoch muss angefügt werden, dass auch hier eine schwache, möglicherweise auch unspezifische, Phosphorylierung durch den phospho-Tyrosin-1021-Antikörper bei beiden Mutanten detektiert werden konnte. Darüber hinaus ist ersichtlich, dass in allen Ansätzen die Transfektion und Expression der Src-Y529\*-Mutante erfolgreich verlief.

Im nächsten Schritt wurde die Lokalisationsänderung von SHIP1-NPXY-Motiv-Mutanten bestimmt. Für die genauere Untersuchung wurden stabil SHIP1-wt-, SHIP1-Y914A-, SHIP1-Y1021A- und SHIP1-Y914A+Y1021A-exprimierende H1299-Zellen untersucht. Hierzu wurde jeweils eine Membran/Zytoplasma-Fraktionierung von diesen Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Membran/Zytoplasma-Fraktionierung sind in Abbildung 32 dargestellt. Sie zeigen, dass der SHIP1-Wildtyp vorwiegend Membran-assoziiert vorliegt ( $P200/S200 = 1,5$ ). Demgegenüber verschiebt sich die  $P200/S200$ -Ratio der SHIP1-Y1021A- ( $P200/S200 = 0,96$ ) und SHIP1-Y914A+Y1021A-Mutanten ( $P200/S200 = 1,22$ ) im Vergleich zum SHIP1-Wildtyp in Richtung S200-Fraktion. Die Verschiebung der  $P200/S200$ -Ratio zwischen Wildtyp und Y1021A-Mutante ist signifikant. Jedoch muss angemerkt werden, dass die Expressionsstärke der SHIP1-Y1021A-Mutante in der Zytoplasma-Fraktion im Vergleich zum SHIP1-wt deutlich

ansteigt (Wt: 1,82; Y1021A: 2,59). Der Unterschied in der Expressionsstärke zwischen dem Wildtyp und der Y1021A-Mutante in der Membran-Fraktion ist gering (Wt: 2,72; Y1021A: 2,48).



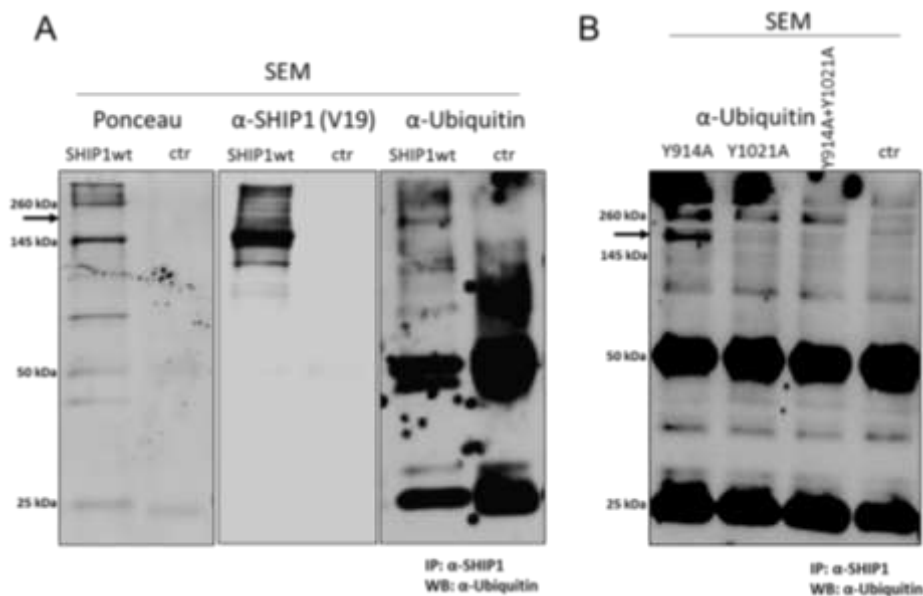
**Abbildung 32: Untersuchung der Lokalisationsänderungen von SHIP1 nach Mutation der NPXY-Motive.** Zur Untersuchung der Lokalisationsänderung von SHIP1 nach Mutation der Tyrosin-Reste 914 und 1021 der NPXY-Motive wurde eine Fraktionierung von Membran und Zytoplasma durchgeführt. Bild (A) zeigt die Fraktionierung von Membran und Zytoplasma von stabil SHIP1-wt-, SHIP1-Y1021A-, SHIP1-Y914A- und SHIP1-Y914A+Y1021A-exprimierenden H1299-Zellen. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrollen für eine reine Fraktionierung von Membran (P200) und Zytoplasma (S200) wurden sowohl gegen den EGF-Rezeptor- als auch gegen GAPDH-gerichtete Antikörper verwendet. Es wurde zudem eine Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran zur Kontrolle des Gesamtproteingehaltes durchgeführt. Bild (B) zeigt die Quantifizierung der SHIP1-Expression in der P200- (Membran) und der S200- (Zytoplasma) Fraktion. Dargestellt ist die jeweilige P200 zu S200 Ratio. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe ( $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Die SHIP1-Y914A-Mutante zeigt ebenfalls eine vorwiegende Membran-Assoziation auf ( $P200/S200 = 1,96$ ). In diesem Fall verschiebt sich die  $P200/S200$ -Ratio im Vergleich zum SHIP1-Wildtyp in Richtung P200-Fraktion. Bei genauerer Betrachtung muss angemerkt werden, dass die Expressionsstärke der SHIP1-Y914A-Mutante in der Zytoplasma-Fraktion im Vergleich zum SHIP1-wt vermindert ist (Wt: 1,82; Y914A: 1,28). Der Unterschied in der Expressionsstärke zwischen dem Wildtyp und der Y914A-Mutante in der Membran-Fraktion ist gering (Wt: 2,72; Y1021A: 2,40). Als Kontrolle für die Reinheit der Membran-Fraktion wurde jeweils der EGF-Rezeptor analysiert. Als Kontrolle für die Reinheit der Zytoplasma-Fraktion wurde jeweils GAPDH analysiert. Sowohl die Membran- als auch die Zytoplasma-Fractionen können als rein betrachtet werden.

## Untersuchung der Ubiquitylierung von SHIP1

Der Abbau des SHIP1-Wildtyps kann vermutlich durch die Phosphorylierung von SHIP1 durch BCR-ABL bzw. durch Kinasen aus der Familie der Src-Kinasen, die auf Proteinebene den proteasomalen Abbau von SHIP1 einleiten, erklärt werden. Der proteasomale Abbau wird in der Regel zunächst durch die Phosphorylierung des Zielproteins eingeleitet, so dass dies in der Folge als Startsignal für eine Ubiquitylierung des Proteins zu verstehen ist. Die Ubiquitylierung des Zielproteins führt als Abbau-Signal zur Degradation des Proteins.

In der Folge sollte daher geklärt werden, ob SHIP1 und seine Dephosphorylierungsmutanten ubiquityliert werden können. Hierzu wurden stabil SHIP1-wt-, SHIP1-Y914A-, SHIP1-Y1021A- und SHIP1 Y914A+Y1021A-exprimierende Sem-Zellen untersucht. Es wurden jeweils NP-40-Proteinlysate angefertigt und eine Immunpräzipitation von SHIP1 (P1C1) durchgeführt. Als Kontrolle wurde parallel normales Maus-IgG-Serum verwendet. Die Präzipitate wurden anschließend mittels Western Blot analysiert (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Untersuchung der Ubiquitylierung von SHIP1 und SHIP1-NPXY-Mutanten.** Zur Untersuchung der Abbau-vermittelten-Ubiquitylierung von SHIP1 wurde die Veränderung der Ubiquitylierung von SHIP1 auf Proteinebene in stabil SHIP1wt-, SHIP1-Y914A-, SHIP1-Y1021A- und SHIP1-Y914A+Y1021A-exprimierenden Sem-Zellen untersucht. Hierzu wurden die verschiedenen SHIP1-exprimierenden Zellen mittels NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde SHIP1 spezifisch aus dem Lysat immunpräzipitiert (SHIP1-P1C1). Als Kontrolle wurde parallel normales Maus-IgG-Serum verwendet (ctr). Es wurden jeweils 1 mg Proteinlysate für die Immunpräzipitation verwendet. Die gewaschenen Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit einem anti-Ubiquitin Antikörper inkubiert. Nach der Entwicklung mit dem anti-Ubiquitin Antikörper wurde die Membran mit einem Anti-SHIP1 Antikörper inkubiert (A). Zudem wurde eine Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran durchgeführt. Eine Ubiquitin-Bande kann bei ca. 160 kDa detektiert werden. SHIP1 kann bei ca. 145 kDa detektiert werden. Für die SHIP1-NPXY-Mutanten wurde entsprechend vorgegangen. Es kann eine Ubiquitin-Bande bei ca. 160 kDa für die Y914A-Mutante, nicht aber für die Y1021A- und Y914A+Y1021A-Mutante, identifiziert werden (B).

Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper inkubiert. Nach der Entwicklung mit dem anti-Ubiquitin-Antikörper wurde die Membran mit einem anti-SHIP1 Antikörper (V19) inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl beim SHIP1-wt als auch bei der SHIP1-Y914A-Mutante eine deutliche Bande bei ca. 160 kDa mit



dem Ubiquitin-Antikörper zu beobachten ist. Diese Bande verschwindet jedoch bei der SHIP1-Y1021A- und der SHIP1-Y914A+Y1021A-Mutante. SHIP1 kann bei 145 kDa identifiziert werden. Zusammenfassend wurde somit ein molekularer Mechanismus identifiziert, bei dem SHIP1 nach Rekrutierung an die Zellmembran durch Kinasen der Src-Familie am Tyrosin-Rest 1021 des NPXY-Motivs phosphoryliert und im Folgenden nach Ubiquitylierung proteasomal degradiert wird.

#### **4.4 Untersuchung der Auswirkungen einer verminderten SHIP1-Expression auf das Zellverhalten von B-Zellen**

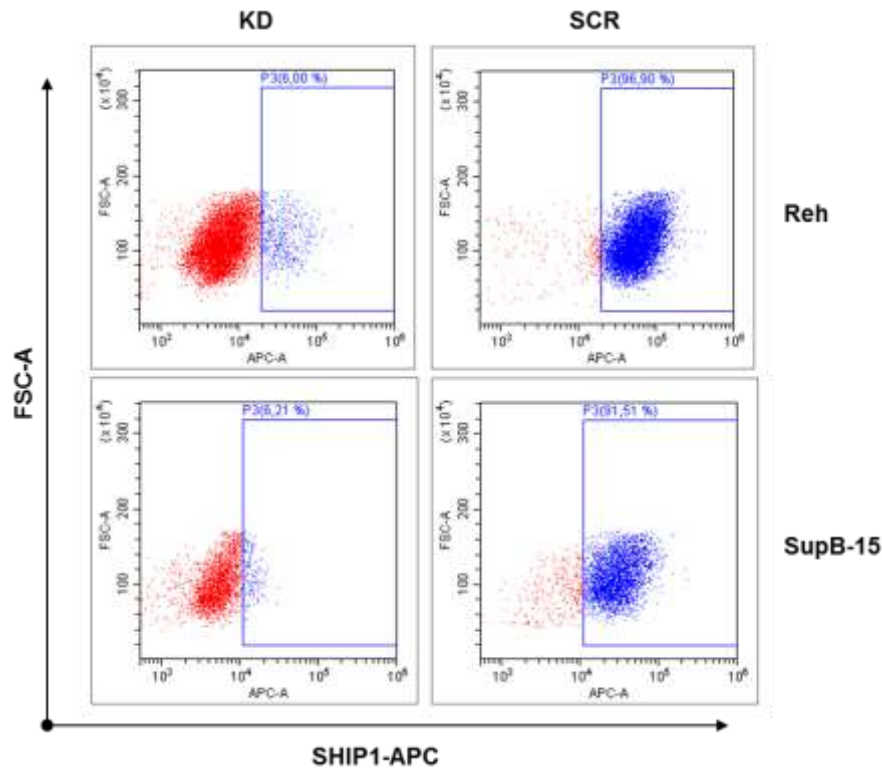
Im Folgenden Abschnitt dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer verminderten SHIP1-Expression auf das Zellverhalten untersucht. Die Herunterregulierung der SHIP1-Expression wurde durch spezifische SHIP1-shRNA-Vektoren erzielt. In diesem Zusammenhang sollten zudem die Auswirkungen einer verminderten SHIP1-Expression auf die Signaltransduktion hin geklärt werden.

Hierzu wurden Reh- und SupB-15-Zellen, welche eine überdurchschnittlich hohe SHIP1-Expression aufweisen, jeweils mit zwei spezifischen SHIP1-shRNA-Vektoren transduziert. Die Zellen wurden daraufhin mit Puromycin selektioniert. Der Erfolg der shRNA-vermittelten Herunterregulation der SHIP1-Expression wurde mittels Western Blot analysiert. Abbildung S4 zeigt das Ergebnis des Western Blots. Beide shRNAs führen zu einer Verminderung der SHIP1-Expression, wobei die Herunterregulation mittels shRNA1 zu einer deutlicheren Abnahme der SHIP1-Expression in beiden Zelllinien führt. In der Konsequenz führt der Knockdown von SHIP1 in beiden Zelllinien und mit beiden shRNAs zu einer verstärkten Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 im Vergleich zu der scr-Kontrolle. Unerwarteterweise führt der schwächere Knockdown von SHIP1 in der SupB-15-Zelllinie mittels shRNA2 zu einer stärkeren Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 im Vergleich zu der scr-Kontrolle. In der Zelllinie Reh führt der schwächere Knockdown von SHIP1 mittels shRNA2 zu keiner deutlichen Veränderung der Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 im Vergleich zu der scr-Kontrolle. Die Verwendung beider SHIP1-shRNA-Vektoren hat keinen Einfluss auf die Expression von SHIP2, pan AKT und BTK. Aufgrund der starken SHIP1-Knockdown-Effizienz mit der SHIP1-spezifischen-shRNA1 wurde entschieden hiermit in der Folge weiter zu arbeiten.

Weiterhin wurde die SHIP1-Expression in den Knockdown-Zellen unter Verwendung eines Durchflusszytometers untersucht. Hierzu wurden Reh- und SupB-15-scr- und -Knockdown-Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA blockiert und mit einem anti-SHIP1-spezifischen und direkt-APC-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Ergebnisse in Abbildung 34 bestätigen, dass der Knockdown in beiden Fällen erfolgreich ist. In SupB-15-Zellen entspricht der Anteil an SHIP1-positiven Zellen beim Knockdown 6,21 % und bei der scr-Kontrolle 91,51 %. In Reh-Zellen entspricht der Anteil an SHIP1-positiven Zellen beim Knockdown 6 % und bei der scr-Kontrolle 96,9 %.

Um einen Eindruck über die veränderte Signaltransduktion infolge des SHIP1-spezifischen-Knockdowns zu erhalten, wurde die Veränderung der Phosphorylierung von Tyrosin- und

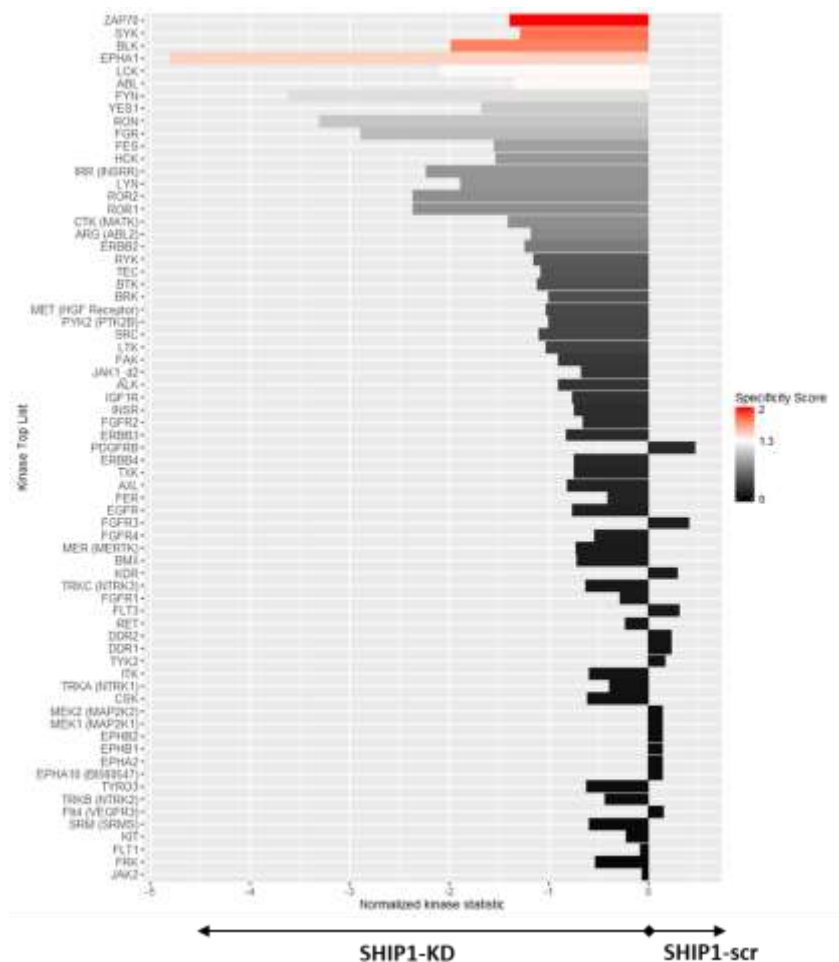
Serin/Threonin-abhängigen Kinasen in Reh- und SupB-15-Zelllysaten mittels eines Protein-Kinase-Arrays (PamStation) gemessen. Hierzu wurden aus Reh- und SupB-15-Zellen jeweils MPER-Proteinlysate für die scr-Kontrolle und den SHIP1-Knockdown hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen hin vermessen.



**Abbildung 34: Analyse der Effizienz des SHIP1-Knockdowns in B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung der Effizienz des SHIP1-Knockdowns wurden Reh-scr- und Reh-SHIP1-KD-Zellen sowie SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-KD-Zellen nach SHIP1-APC-Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach der Antikörperfärbung mit einem direkt APC-gekoppelten SHIP1-Antikörper wurden die Zellen unter Verwendung eines Durchflusszytometers untersucht. Die Gates wurden jeweils entsprechend der Kontrollen gesetzt.

Es zeigt sich, dass die Herunterregulierung der SHIP1-Expression sowohl in der SupB-15- als auch in der Reh-Zelllinie dazu führt, dass die Phosphorylierung von Serin/Threonin-abhängigen Kinasen, insbesondere des AKT-Signalwegs, ansteigt (AKT, p70S6, MAPKAPK3, MSK, DCAMKL2) (Abbildung S5 und S6). Demgegenüber ist der Einfluss von SHIP1 auf die Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine für die beiden untersuchten Zelllinien unterschiedlich. In der Tel/AML1-positiven Reh-Zelllinie führt die Herunterregulierung von SHIP1 zu einer verstärkten Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Proteinen (ZAP70, Syk, Src-Kinasen, EPHA1) (Abbildung 35). In der BCR-ABL-positiven SupB-15-Zelllinie führt der Knockdown von SHIP1 demgegenüber zu einer Herunterregulierung der Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Proteinen (TEC-Kinasen, Fes, Src-Kinasen), so dass die endogene Expression von SHIP1 die Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Proteinen begünstigt (Abbildung S7). Der PamStation-Assay zeigt eine Veränderung der Phosphorylierung von einer Vielzahl von Tyrosin- und Serin/Threonin-abhängigen Kinasen. Um dieses Ergebnis für ausgewählte Proteine von Interesse zu bestätigen, wurden jeweils von den Kontroll- und

SHIP1-Knockdown-exprimierenden Zellen Proteinlysate durch TCE-Fällung generiert und mittels Western Blot analysiert.

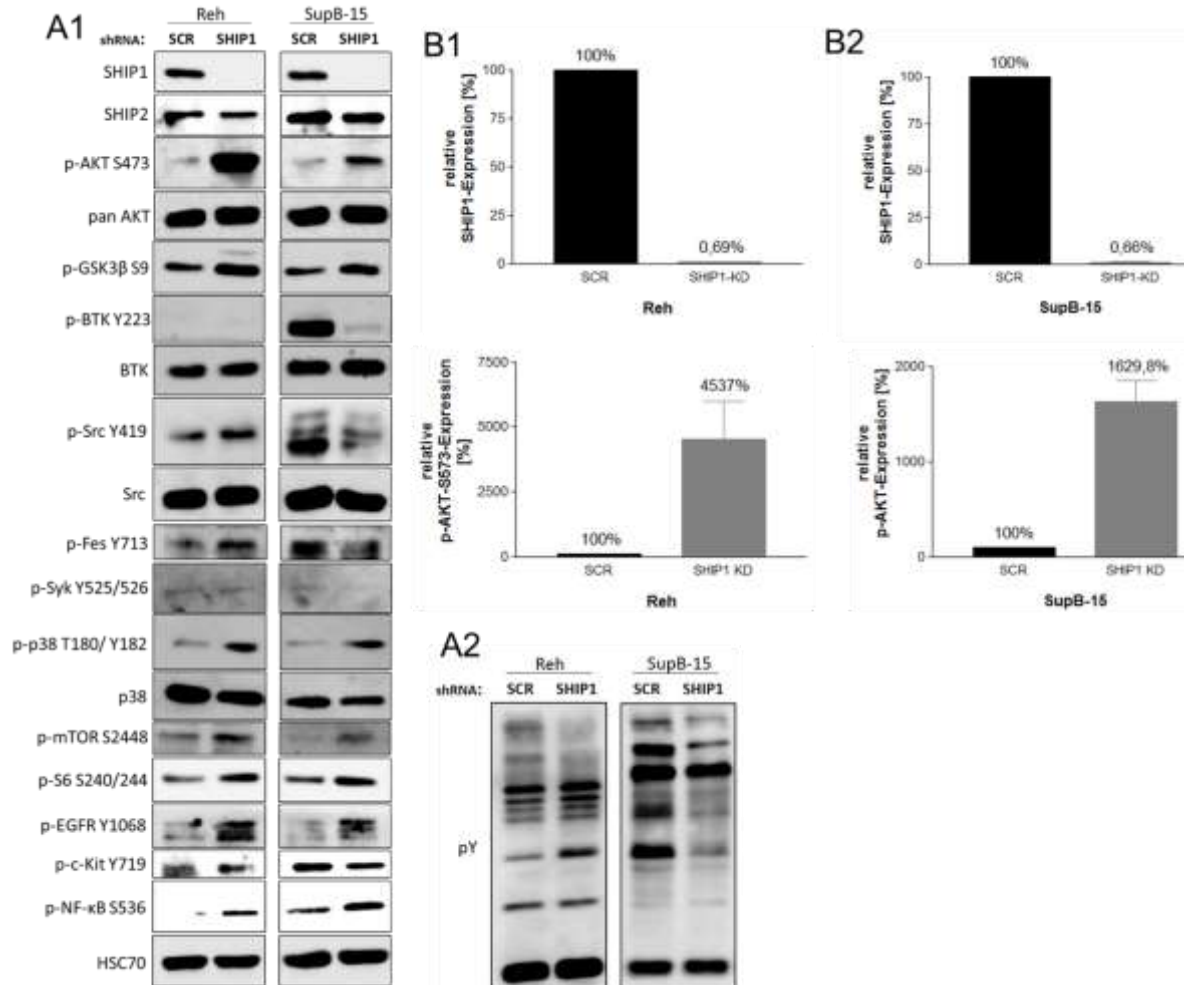


**Abbildung 35: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in Reh-Zellen.** Repräsentative Darstellung der Ergebnisse des Protein-Kinase-Arrays der PamStation. Endogen SHIP1-exprimierende Reh-Zellen wurden mit lentiviralen SHIP1-shRNA-Vektoren transduziert. Infolge des SHIP1-spezifischen Knockdowns in Reh-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus scr- (Kontrolle) und SHIP1-Knockdown-exprimierenden Reh-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Tyrosinphosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.

Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 36 dargestellt und bestätigen, dass in den beiden Linien Reh und SupB-15 die Serin/Threonin-Phosphorylierung von AKT (S473), S6 (S240/244), GSK3 $\beta$  (S9), mTOR (S2448), p38 (T180/Y182) und NF-KB (S536) durch Herunterregulation der SHIP1-Expression im Vergleich zur scr-Kontrolle deutlich ansteigt. In der Reh-Zelllinie steigt die Tyrosinphosphorylierung der Src-Familienmitglieder (Y419), Fes (Y713) und c-Kit (Y719) durch Herunterregulation der SHIP1-Expression im Vergleich zur scr-Kontrolle deutlich an.

Demgegenüber sinkt die Tyrosinphosphorylierung der Src-Familienmitglieder (Y419), dem EGF-Rezeptor (Y1068), Fes (Y713), BTK (Y223) und c-Kit (Y719) in der SupB-15 Zelllinie

durch Herunterregulation der SHIP1-Expression im Vergleich zur scr-Kontrolle deutlich ab. Dieses Ergebnis wird zudem durch einen anti-p-Tyrosin-Blot bestätigt. Hier zeigt sich ebenfalls, dass bei der Zelllinie Reh die Gesamt-Tyrosinphosphorylierung in der Gruppe des SHIP1-Knockdowns im Vergleich zu der scr-Kontrolle ansteigt, wohingegen die Gesamt-Tyrosinphosphorylierung in der Gruppe des Knockdowns im Vergleich zur scr-Kontrolle in der SupB-15-Zelllinie abnimmt. Diese Daten zeigen zusammenfassend, dass SHIP1 sowohl einen regulatorischen Einfluss auf die Serin/Threonin-Phosphorylierung als auch auf die Tyrosin-Phosphorylierung von Kinasen in ALL-Zellen ausüben kann.

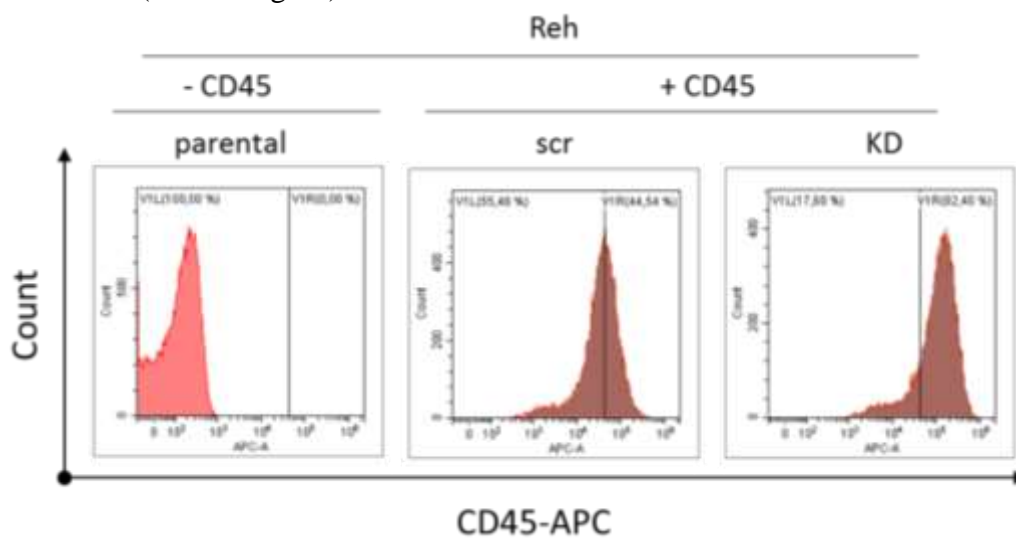


**Abbildung 36: Untersuchung des Einflusses der Herunterregulation von SHIP1 auf die Signaltransduktion in B-ALL-Zellen.** Die spezifische Herunterregulation von SHIP1 und der damit verbundene Einfluss auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen wurde auf Proteinebene in Zellen mit und ohne BCR-ABL-Hintergrund analysiert. Reh- und SupB-15-Zellen wurden hierzu mit lentiviralen Partikeln, welche jeweils Vektoren mit shRNA-scr und shRNA-SHIP1 enthielten, transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mit Puromycin selektioniert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression mit der entsprechenden Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression in Reh- (B1) und SupB-15-Zellen (B2).

In der Western Blot Analyse führt der SHIP1-Knockdown in der Reh-Zelllinie insgesamt zu einer relativen SHIP1-Expression von 0,69 % im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %). Die damit verbundene Steigerung der Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 beträgt im

Vergleich zur scr-Kontrolle das 45,37-fache. Der SHIP1-Knockdown in der SupB-15-Zelllinie führt zu einer relativen SHIP1-Expression von 0,66 % im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %). Die damit verbundene Steigerung der relativen Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 beträgt im Vergleich zur scr-Kontrolle das 16,29-fache.

Darüber hinaus wurde der Einfluss des SHIP1-Knockdowns auf die Expression des CD45-Rezeptors analysiert (Abbildung 37). CD45 spielt als Rezeptor unter anderem eine Rolle beim Anwachsen von transplantierten leukämischen Zellen in das Knochenmark von immundefizienten Mäusen [Shivtiel et al., 2011]. Hierzu wurden Reh-Zellen mit SHIP1-Knockdown und Reh-Kontrollzellen mit einem spezifischen CD45-Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. Im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle zeigen die SHIP1-Knockdown-Zellen interessanterweise eine signifikant gesteigerte Expression des CD45-Antigens (51,6 %; \*\*\*  $p < 0,0001$ ). SupB-15-Zellen exprimieren demgegenüber kein endogenes CD45 (Abbildung S8).



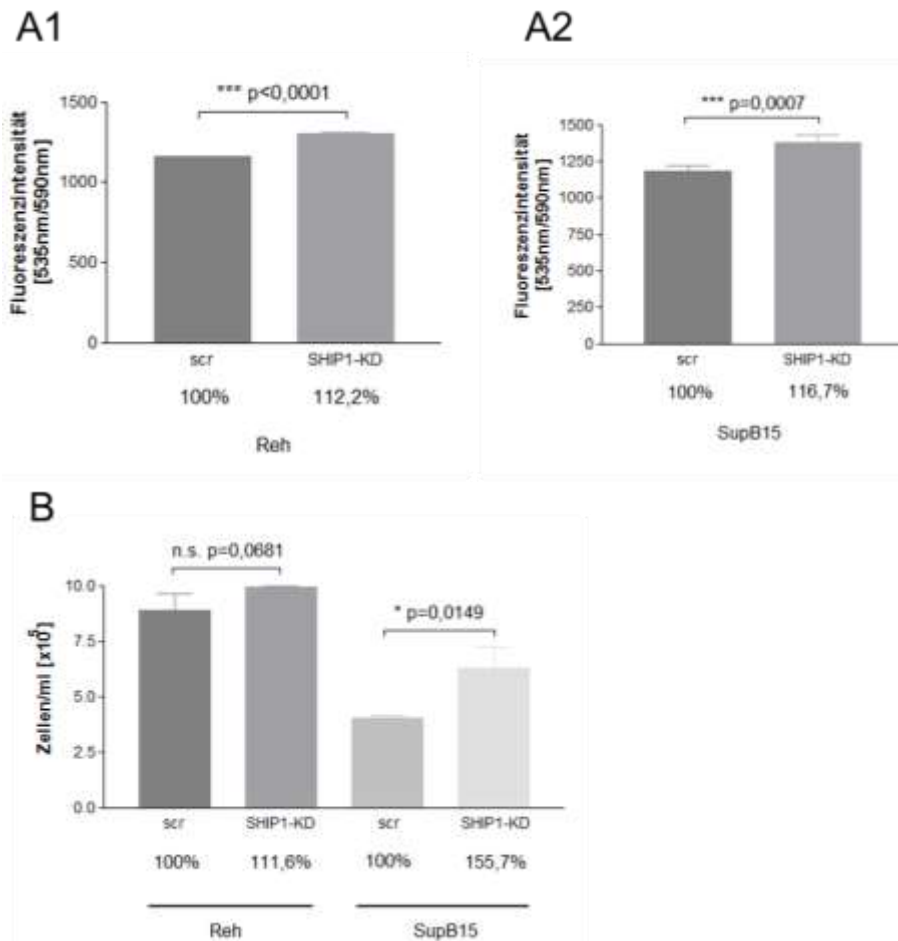
**Abbildung 37: Analyse der Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown in Reh B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung der veränderten Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown wurden Reh-scr- und Reh-SHIP1-KD-Zellen nach CD45-APC-Färbung durchflusszytometrisch analysiert.

Im nächsten Schritt wurde das Wachstumsverhalten von SHIP1-scr und SHIP1-Knockdown-Zellen untersucht. Hierfür wurden Reh- und SupB-15-Zellen mittels Alamar Blue-Zellviabilitäts-Assay, Hämozytometer und *Live-Cell-Imaging* untersucht.

Zunächst wurde ein Alamar Blue-Zellviabilitäts-Assay der Reh-scr und Reh-SHIP1-Knockdown sowie SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen jeweils ausgesät und für 48h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Resazurin versetzt und die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 38A1 zeigen, dass es bei den Reh-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (112,2 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100%) kommt. Bei den SupB-15-Zellen kann ein signifikanter Anstieg der Zellviabilität bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (116,7 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100 %) beobachtet werden (Abbildung 38A2).

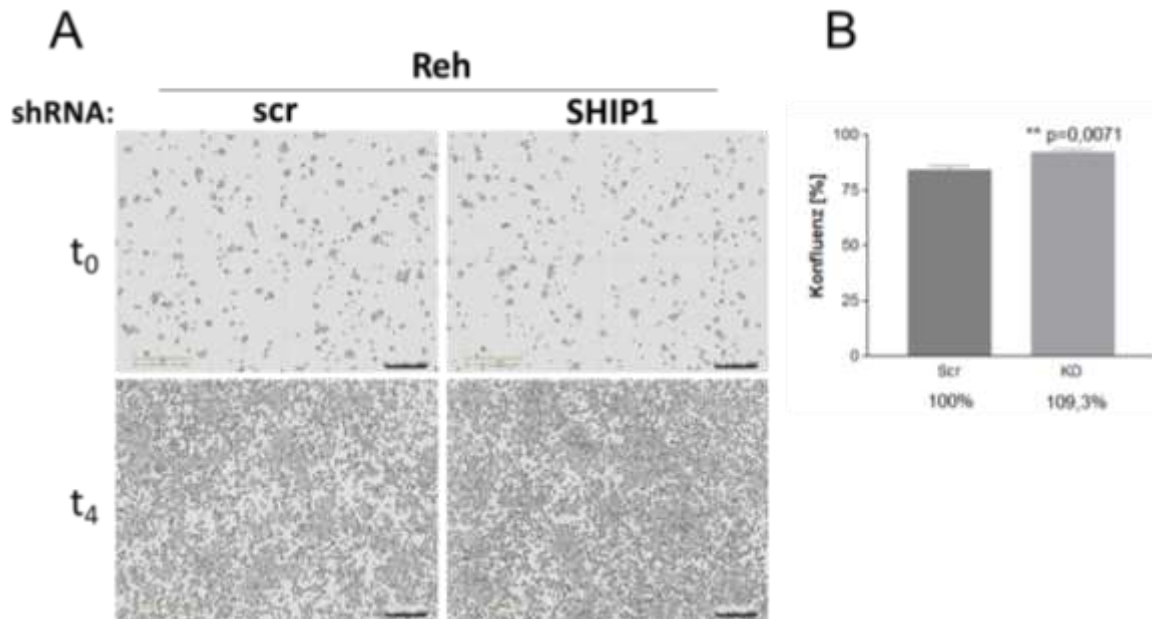
Für die Bestimmung des Wachstumsverhalten wurden die Zellen jeweils ausgesät und nach 48 Stunden mittels Hämozytometer gezählt. Abbildung 38B zeigt das Wachstumsverhalten von

Reh-scr- und Reh-SHIP1-Knockdown- sowie SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen. Für die Reh-Zellen kann ein tendenzieller Anstieg der Zellzahl bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (111,6 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100 %) beobachtet werden. Dieser Anstieg ist jedoch statistisch nicht signifikant. Für die SupB-15-Zellen kann ein statistisch signifikanter Anstieg der Zellzahl bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (155,7 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100 %) beobachtet werden.



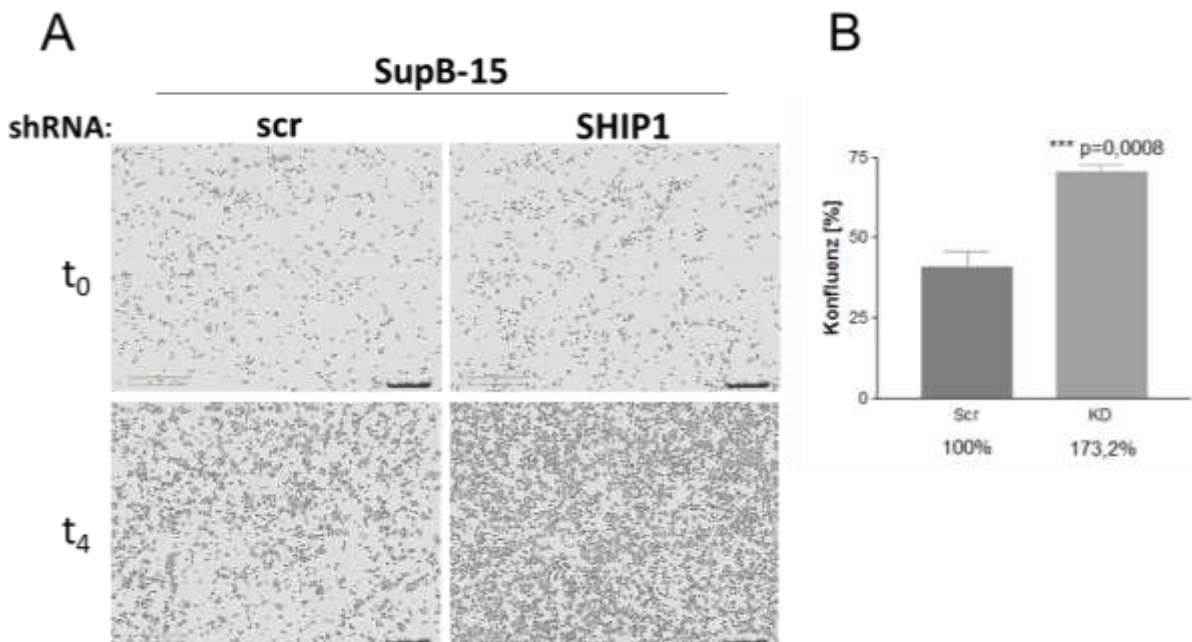
**Abbildung 38: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität und das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 wurden Reh-scr- und Reh-SHIP1-KD-Zellen (A1) sowie SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-KD-Zellen (A2) in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). (B) Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 wurden Reh-scr- und Reh-SHIP1-KD-Zellen sowie SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch in einer 6-Loch-Schale mit 2 ml Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mithilfe eines Hämocytometers gezählt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Das Wachstumsverhalten von Reh-scr und Reh-SHIP1-Knockdown sowie SupB-15-scr und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen wurde zudem mittels *Live-Cell-Imaging* (IncuCyte Zoom) über vier Tage verfolgt. Hierzu wurden die Zellen in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 39 und 40 dargestellt. Für die Reh-Zellen kann ein signifikanter Anstieg der Zellkonfluenz bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (109,3 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100 %) beobachtet werden.



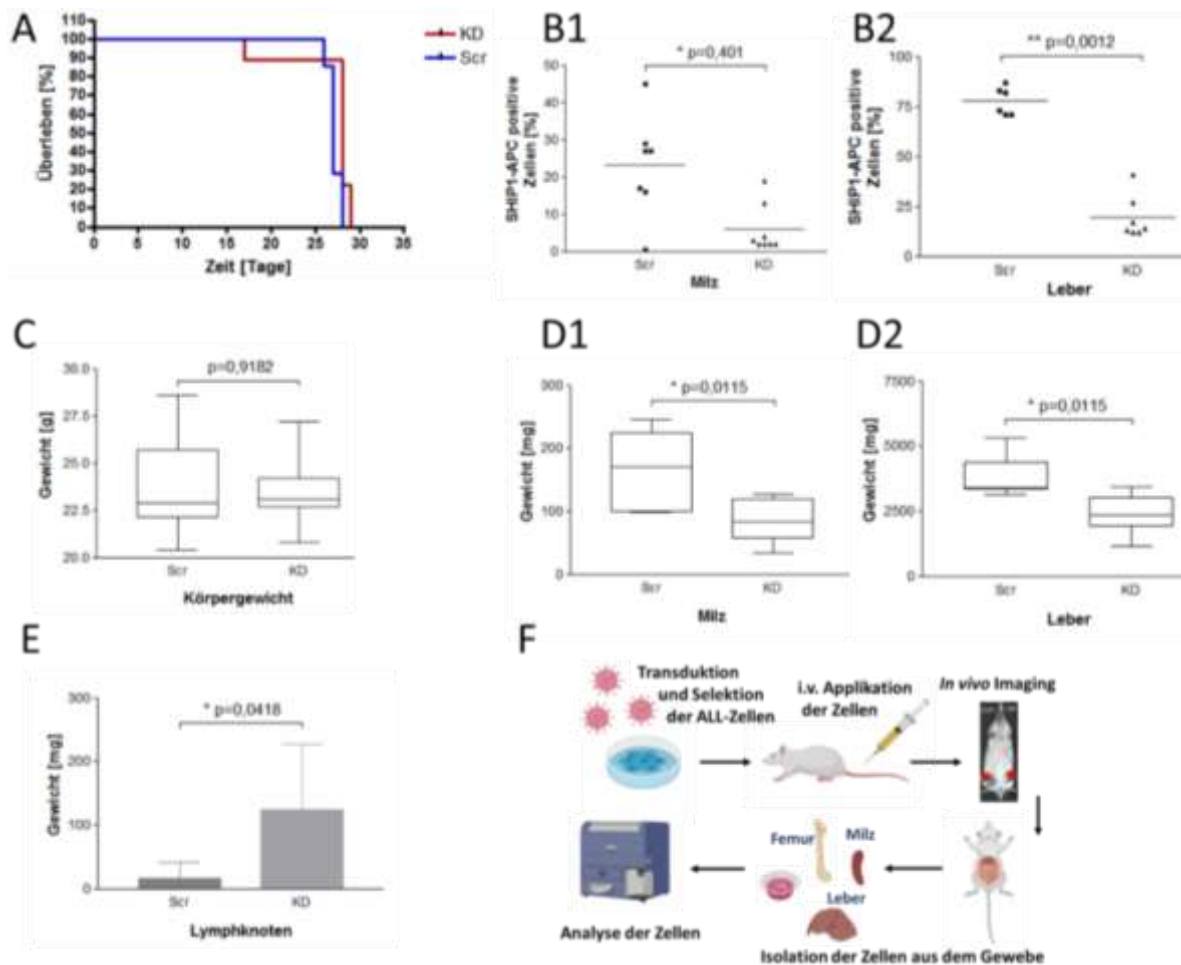
**Abbildung 39: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von Reh-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 wurden Reh-scr- und Reh-SHIP1-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über vier Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am vierten Tag der Messung (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Für die SupB-15-Zellen kann ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Zellkonfluenz bei den SHIP1-Knockdown-Zellen (173,2 %) im Vergleich zu den Zellen mit der scr-Kontrolle (100 %) beobachtet werden.



**Abbildung 40: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von SupB-15-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 wurden SupB-15-scr- und SupB-15-SHIP1-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über vier Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am vierten Tag der Messung (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

In einem Tierexperiment zur Untersuchung der Auswirkung einer reduzierten SHIP1-Expression in der B-ALL des Kindesalters wurden  $1 \times 10^6$  SHIP1-Knockdown-Reh-Zellen beziehungsweise  $1 \times 10^6$  SHIP1-exprimierende Reh-Zellen jeweils intravenös in NOD-scid-gamma-Mäuse (NSG) appliziert. Das Anwachsen der Luciferase-exprimierenden Zellen innerhalb der jeweiligen Maus wurde durch *in vivo* Imaging verfolgt (durchgeführt von Herrn Horn-Glander, Universitäres Cancer Center Hamburg). Bei allen Tieren konnte ein Anwachsen der Zellen nach Applikation festgestellt werden (nicht dargestellt). Entsprechend der Abbruchkriterien des Tierexperiments wurde die Untersuchung individuell beendet und Femur, Milz und Leber aus der Maus entnommen (durchgeführt von Herrn Dr. Horn, Zell- und Gentherapie, UKE). Die leukämischen Zellen wurden in der Folge aus dem jeweiligen Gewebe und Knochen isoliert, aufgearbeitet und analysiert.



**Abbildung 41: Tierexperiment zur Untersuchung der Auswirkung einer reduzierten SHIP1-Expression in Tel/AML1-positiven B-ALL-Zellen.** SHIP1-Knockdown- und SHIP1-scr-exprimierende Reh-Zellen wurden in NOD-scid-gamma-Mäuse (NSG) appliziert. Das Überleben der Mäuse in beiden Kohorten wurde in einer Kaplan-Meier-Kurve festgehalten (A). Der relative Anteil an SHIP1-APC-positiven Reh-Zellen wurde für beide Kohorten in der Milz (B1) und in der Leber (B2) durchflusszytometrisch nach Aufarbeitung der Gewebe quantifiziert. Weiterhin wurde das Körpergewicht der Tiere bei Beendigung des Experiments bestimmt (C). Zudem wurde das Gewicht von Milz (D1) und Leber (D2) nach Beendigung des Experiments bestimmt. Zudem wurden die vorhandenen Lymphknoten auf ihr Gewicht hin vermessen (E). (F) Schematische Darstellung des Ablaufs des Tierexperimentes (erstellt unter Verwendung von BioRender).

Es kann in diesem Modell kein signifikanter Unterschied beim Überleben der Mäuse zwischen beiden Kohorten festgestellt werden (Abbildung 41A). Interessanterweise kann jedoch für die



Kohorte mit den SHIP1-Knockdown-Zellen in 7 von 9 Fällen (77,8 %) ausgeprägte Lymphknoten beobachtet werden, wohingegen für die Kohorte mit den SHIP1-exprimierenden Zellen nur in 3 von 7 Fällen (42,9 %) ausgeprägte Lymphknoten identifiziert wurden. Zudem kann für die vorhandenen Lymphknoten ein signifikant höheres Gewicht (7,5-fache) für die Kohorte mit dem SHIP1-Knockdown im Vergleich zu der Kohorte mit den SHIP1-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abbildung 41E). Demgegenüber kann ein signifikant höheres Gewicht der Leber (1,5-fache) und der Milz (2-fache) für die Kohorte mit den SHIP1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der Kohorte mit dem SHIP1-Knockdown beobachtet werden (Abbildung 41D). Beide Kohorten zeigen ein vergleichbares Körpergewicht auf (Abbildung 41C). Die Zahl der Zellen im Femur war zum Zeitpunkt der Aufarbeitung zu gering, so dass im Folgenden diese nicht weiter analysiert werden konnten. Zur Kontrolle der Stabilität des SHIP1-Knockdowns *in vivo* wurden die Zellen aus der Milz und aus der Leber auf den Anteil ihrer SHIP1-exprimierenden Zellen hin untersucht. Dazu wurden die Zellen jeweils mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen mit BSA blockiert und sowohl mit einem anti-CD45-FITC-gekoppelten Antikörper als auch mit einem anti-SHIP1-APC-gekoppelten Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die humanen CD45-positiven Zellen unter Verwendung eines Durchflusszytometers auf ihre SHIP1-Positivität hin untersucht. Sowohl in der Milz als auch in der Leber kann eine signifikant stärkere SHIP1-Expression in der Kohorte der *sc*-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der Kohorte der SHIP1-Knockdown-Zellen festgestellt werden (Milz: 3,9-fache; Leber: 4-fache) (Abbildung 41B).

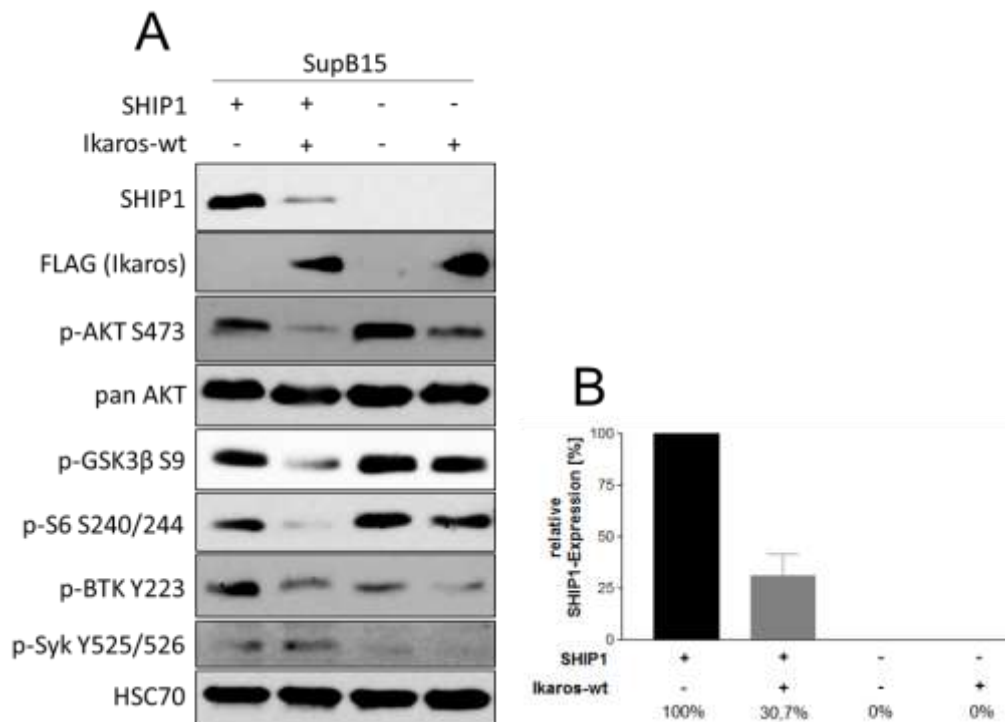
#### **4.4.1 Der Transkriptionsfaktor Ikaros reguliert die SHIP1-Expression und die Aktivierung der Src-Kinase-Familie in der ALL**

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Ikaros (IKZF1) die Aktivität der Src-Kinase Lyn negativ reguliert [Nera et al., 2006a]. Ikaros ist zudem in ca. 29 % der BCR-ABL-negativen B-ALL-Hochrisikogruppe und in über 80 % der BCR-ABL-positiven B-ALL verändert. Dies führt in der Folge in hohem Maße zu dominant-negativen Isoformen [Mullighan et al., 2008a]. Patienten mit einer IKZF1-Deletion werden dabei als Hochrisikogruppe eingestuft [Meyer et al., 2013]. Die SupB-15-Zelllinie, in der zuvor der Einfluss der SHIP1-Expression auf das Wachstum dieser Zellen untersucht wurde, exprimiert ebenfalls in starkem Maße die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 (IK6) [Mullighan et al., 2008a].

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die gezielte Überexpression des Ikaros-Wildtyps und seiner dominant-negativen Isoform 6 einen Einfluss auf die Expression von SHIP1 in B-ALL-Zellen und damit auch auf das Wachstum dieser Zellen hat. Hierzu wurde zunächst die Expression von SHIP1 in Ph-positiven ALL-Zelllinien (TOM-1 und SupB-15) und Ph-positiven Zelllinien in der Blastenkrise (Nalm-1 und BV-173) analysiert (Abbildung S9). Nalm-1- und TOM-1-Zellen exprimieren die Ikaros-Isoform 1, während BV-173- und SupB-15-Zellen die Ikaros-Isoform 6 exprimieren. In den Zelllinien BV-173, TOM-1 und SupB-15 ist eine stärkere SHIP1-Expression erkennbar. Ikaros-wt-exprimierende Nalm-1-Zellen exprimieren demgegenüber eine geringere Menge SHIP1-Protein. Zudem weisen Ikaros-wt-exprimierende Nalm-1- und TOM-1-Zellen eine geringere Phosphorylierung von AKT-S473 auf als Ikaros-Isoform 6-exprimierende BV-173- und SupB-15-Zellen.

Im nächsten Schritt wurde die cDNA (erhalten von der Harvard Medical School, Boston) von Ikaros N-Terminal mit einem FLAG-Tag versehen und über eine *NotI*-Schnittstelle in den lentiviralen LeGO-IG2-Puro-Vektor kloniert (Ikaros-wt; Ik-wt). Anschließend wurde der LeGO-IG2-Puro-Ik-wt-Vektor als Template für eine *QuikChange*-Mutagenese genutzt. Dabei wurde innerhalb der Ikaros-Wildtyp-Sequenz die komplette Sequenz von Exon 3 bis einschließlich Exon 6 deletiert. Dies entspricht der dominant-negativen Ikaros-Isoform 6.

Anschließend wurden SupB-15-Kontroll- und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen jeweils mit dem LeGO-Leervektor und dem LeGO-Ikaros-wt-Vektor transduziert. Die Zellen (SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) wurden nach der Transduktion mithilfe eines Durchflusszytometers über das Markerprotein GFP, welches ausschließlich über den LeGO-Vektor eingebracht wurde, sortiert. Für eine erfolgreiche Selektion wurde zwei Wochen nach dem Sortiervorgang ein GFP-positiver Anteil von >90 % zugrunde gelegt. Daraufhin wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert.

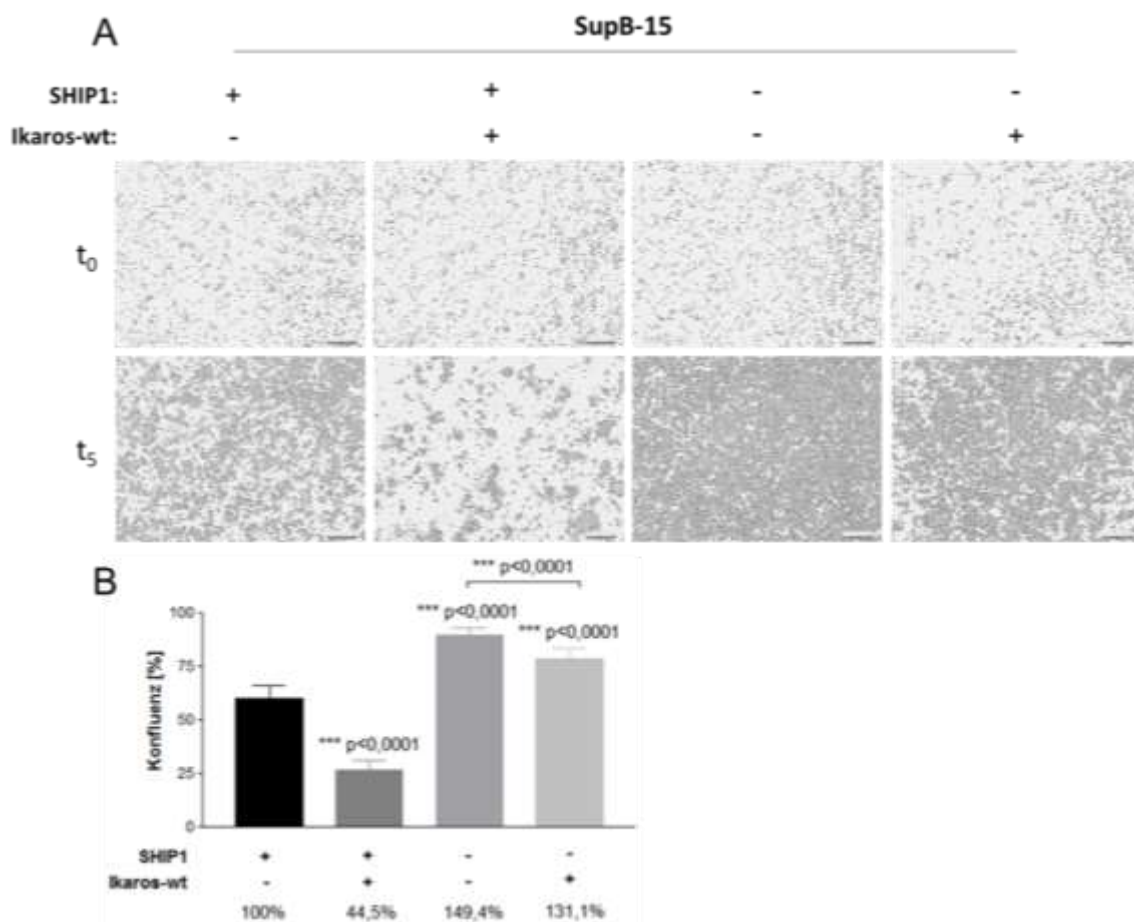


**Abbildung 42: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Signaltransduktion von Ph-positiven B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Signaltransduktion von Ph-positiven B-ALL-Zellen wurden SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen auf Proteinebene analysiert. SupB-15-Kontroll- und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen wurden hierzu mit lentiviralen Partikeln, welche jeweils den LeGO-Leervektor und den LeGO-Ikaros-wt-Vektor enthielten, transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mithilfe eines Durchflusszytometers über das Markerprotein GFP, welches ausschließlich über den LeGO-Vektor eingebracht wurde, sortiert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression.

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass die Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression in den SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen zu einer Reduzierung der endogenen SHIP1-Expression, im Vergleich zu den SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-exprimierenden SupB-15-Zellen, auf ca. 30 % führt. Demgegenüber zeigen

die SHIP1-Knockdown-Zellen (SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) in beiden Fällen keine darstellbare SHIP1-Expression.

Interessanterweise reduziert Ikaros sowohl in den SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen als auch in den SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen die Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473. SHIP1-Knockdown-Zellen (SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) weisen im Vergleich zu ihren SHIP1-positiven-Gegenstücken (SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) eine erhöhte Expression von phosphorylierten AKT-S473 auf. Die Reduzierung der Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 ist mit einer Reduzierung der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9) und S6 (S240/244) verbunden. Die Phosphorylierung von SYK am Tyrosin-Rest 525/526 ist in den SHIP1-exprimierenden SupB-15-Zellen (SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>), im Vergleich zu den SHIP1-Knockdown-Zellen (SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>), leicht erhöht.

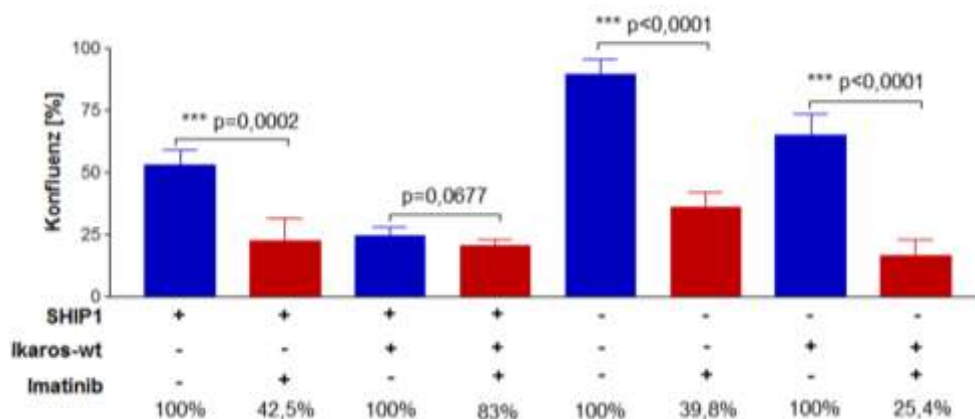


**Abbildung 43: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven B-ALL-Zellen wurden SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer Live-Cell-Imaging-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über fünf Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am fünften Tag der Messung. Die statistische Signifikanz bezieht sich, wenn nicht anderes angegeben, stets auf die SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Zudem wurde das Wachstumsverhalten von SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen mittels Live-Cell-Imaging (IncuCyte Zoom) über fünf Tage verfolgt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 43 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die gleichzeitige Expression von SHIP1 und Ikaros-wt zu einer signifikanten

Reduzierung des Wachstumsverhalten der Ph-positiven SupB-15-Zellen, im Vergleich zu den SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-Zellen, auf ca. 44,5 % führt ( $t_0 = 12\% \rightarrow t_5 = 25\%$ ). In den SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-SupB-15-Zellen führt die Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums, im Vergleich zu den SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-SupB-15-Zellen. SHIP1-Knockdown-Zellen (SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) zeigen jeweils ein signifikant schnelleres Wachstumsverhalten als die SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-exprimierenden SupB-15-Zellen (SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>: auf 149,4 %; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>: auf 131,1 %). Diese Daten belegen, dass die Kollaboration von SHIP1 mit Ikaros einen substanziellen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von SupB-15 B-ALL-Zellen ausübt. Insbesondere wird die Tumorsuppressorfunktion von Ikaros dabei partiell durch einen SHIP1-abhängigen, additiven Effekt verstärkt. Zusammenfassend unterstreicht dies die Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 und Ikaros in ALL-Zellen.

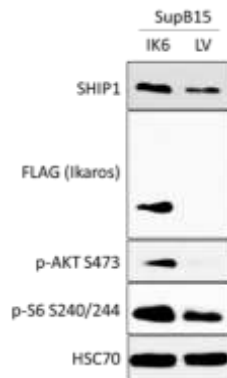
Zusätzlich wurden die vier Gruppen (SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>; SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>) jeweils auf ihr Ansprechen auf Imatinib hin untersucht. Hierzu wurden SupB-15-Zellen mit 500 nM Imatinib oder DMSO versetzt und die Zellkonfluenz mittels *Live-Cell-Imaging* (IncuCyte Zoom) verfolgt. Das Wachstum der Zellen nach 7 Tagen ist in Abbildung 44 und S10C dargestellt. Hierbei ist erkenntlich, dass sowohl bei den SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-Zellen (auf 42,5 %), den SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>-Zellen (auf 39,8 %) und den SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen (auf 25,4 %) ein signifikanter Unterschied im Wachstum nach Behandlung mit Imatinib vorliegt. Demgegenüber kann kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden (auf 83 %).



**Abbildung 44: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt in Kombination mit einer Imatinib-Behandlung auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt in Kombination mit einer Imatinib-Behandlung auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven B-ALL-Zellen wurden SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät und entsprechend mit DMSO oder 500 nM Imatinib behandelt. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sieben Tage verfolgt. Die Abbildung zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am siebten Tag der Messung (\* p $\leq$ 0,05; \*\* p $\leq$ 0,01; \*\*\* p $\leq$ 0,001).

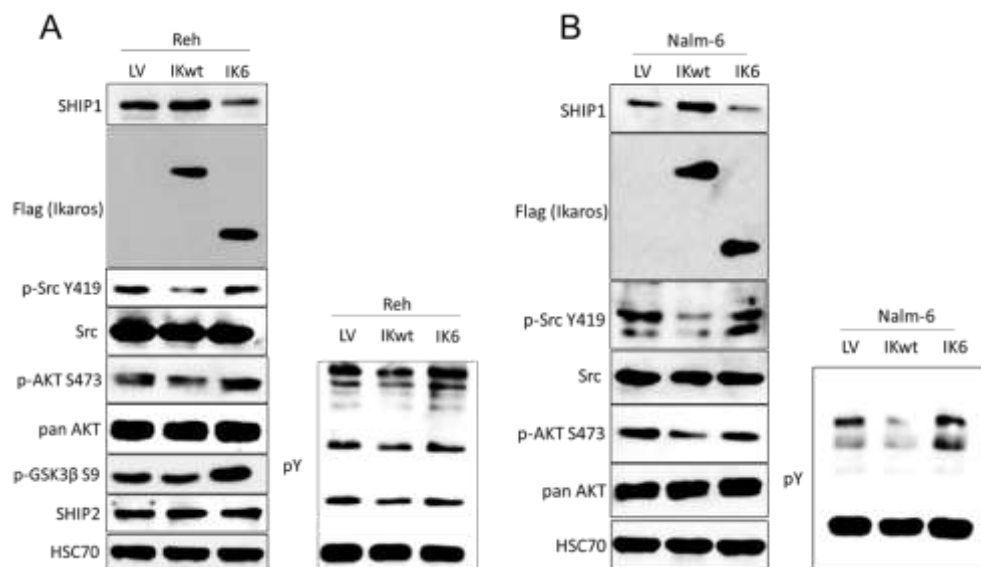
SupB-15-Zellen wurden zudem mit dem LeGO-Ikaros-Isoform-6-Vektor transduziert und mithilfe von Puromycin selektioniert. Es wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und mittels Western Blot analysiert. In Abbildung 45 sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse abgebildet. SupB-15-Zellen, welche die Ikaros-Isoform 6 exprimieren, weisen eine stärkere

SHIP1-Expression und eine stärkere Phosphorylierung von AKT-S473 im Vergleich zu den Kontrollvektor transduzierten Zellen auf.



**Abbildung 45: Regulation der SHIP1-Expression durch die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 in SupB-15-Zellen.** Der Einfluss der dominant-negativen Ikaros-Isoform 6 auf die Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in SupB-15-Zellen untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Anschließend wurden die ALL-Zelllinien Reh und Nalm-6 jeweils mit den generierten Ikaros-Konstrukten und der Leervektorkontrolle transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mithilfe von Puromycin für zwei Wochen selektiert. Der Erfolg der Transduktion wurde anschließend am Durchflusszytometer über das Markerprotein GFP kontrolliert. Für eine erfolgreiche Selektion wurde eine Transduktionsrate von >90 % angenommen. Daraufhin wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert. In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der Western Blot Analyse abgebildet.



**Abbildung 46: Regulation von SHIP1 durch Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6 in ALL-Zelllinien.** Der Einfluss durch Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6 auf die Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in den ALL-Zelllinien Reh (A) und Nalm-6 (B) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

In den Zelllinien Nalm-6 und Reh ist zu erkennen, dass SHIP1 durch die Expression des Ikaros-Wildtyps, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), verstärkt exprimiert wird (Nalm-6: 320 %; Reh: 143 %). Demgegenüber führt die Expression der Isoform 6 von Ikaros, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), zu einer verminderten SHIP1-Expression (Nalm-6: 50,5 %; Reh: 47 %). Zudem ist in beiden Zelllinien

die Ikaros-wt- und Isoform 6-Expression bei 57 bzw. 37 kDa zu erkennen. Des Weiteren führt die Expression des Ikaros-Wildtyps in beiden Fällen, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen, zu einer Reduktion der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie am Tyrosin-Rest 419.

Dieses Ergebnis kann in einem Protein-Kinase-Assay (PamStation) in dem, infolge der Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression in SupB-15-Zellen, die Veränderung der Phosphorylierung von Tyrosin- und Serin/Threonin-abhängigen Kinasen untersucht wurde, bestätigt werden. Hierzu wurden aus Kontrollvektor und Ikaros-wt-exprimierenden SupB-15-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen hin vermessen. Entsprechend kann in den endogenen Ikaros-Isoform 6-exprimierenden SupB-15-Zellen (Kontrollvektor) in der Gruppe der Tyrosin-abhängigen-Kinasen vor allem ein Anstieg der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Fgr, Lck, Blk, Fyn, Lyn, Yes und Src) beobachten werden (Abbildung S11). Im Gegensatz dazu ist durch die Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression ein Anstieg der Phosphorylierung der Kinasen CSK und JAK2 zu erkennen. Demgegenüber steigt, infolge der Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression, in der Gruppe der Serin/Threonin-regulierten-Kinasen vor allem die Phosphorylierung von PKC, AMPK $\alpha$ 1 und CHK1 an (Abbildung S12).

### Untersuchung des Einflusses der Casein Kinase 2 auf die Expression von SHIP1

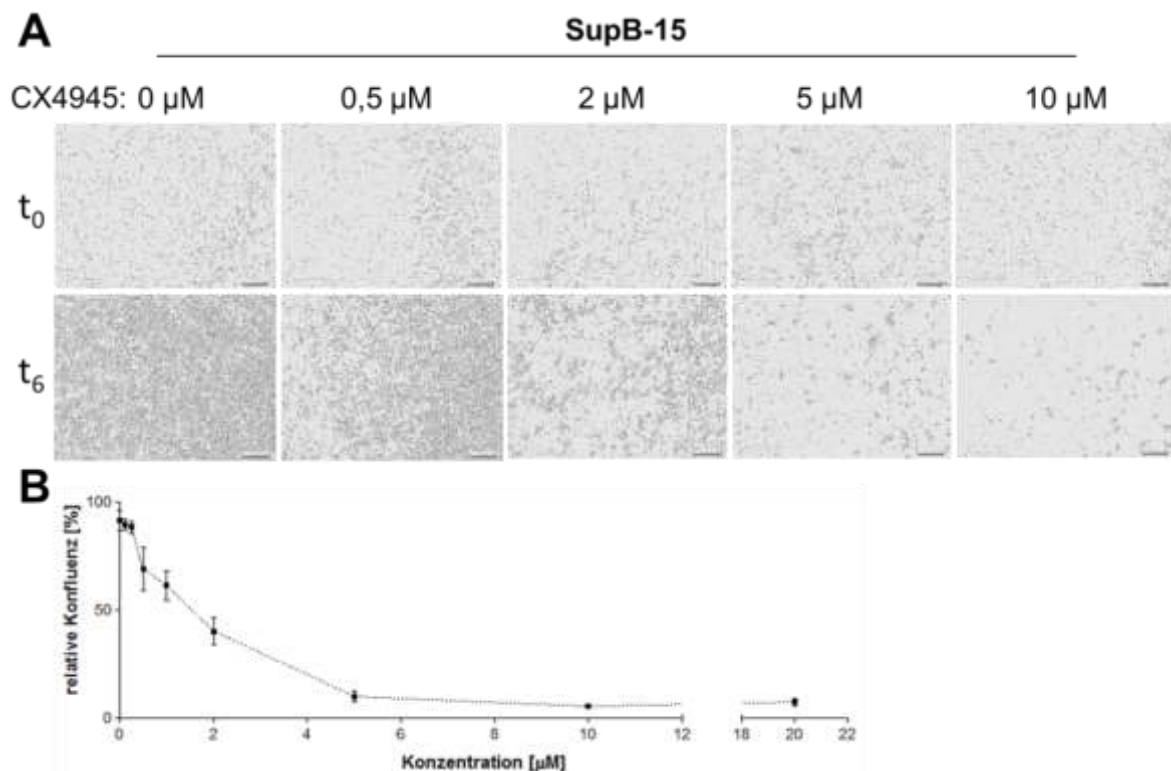
Die Casein Kinase 2 ist ein Gegenspieler von Ikaros. In der Literatur wird gezeigt, dass eine erhöhte CK2-Aktivität in der Folge zur Phosphorylierung von Ikaros führt. Diese Phosphorylierung verhindert die Bindung von Ikaros an die DNA [Song et al., 2011]. Somit kann Ikaros nicht mehr seine Ziel-Gene, wie beispielsweise Gene des PI3K-Signalwegs regulieren. Zudem liegt die Casein Kinase 2 in Tumoren und akuten Leukämien häufig konstitutiv aktiviert vor [Buontempo et al., 2018]. Durch die Verwendung des CK2-Inhibitors CX4945 wurde im nächsten Schritt die Auswirkung auf die SHIP1-Expression untersucht. Hierzu wurden schwach SHIP1-exprimierende Jurkat-Zellen, stark SHIP1-exprimierende Reh-Zellen (Abbildung S13) sowie stark SHIP1 und Ikaros-Isoform 6-exprimierende SupB-15-Zellen für 24h mit dem CK2-Inhibitor CX4945 inkubiert. Anschließend wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Die Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 dargestellt.



**Abbildung 47: Untersuchung des Einflusses der Hemmung der Casein Kinase 2 auf den AKT-Signalweg.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 und p-AKT-S473 wurde auf Proteinebene in SupB-15-Zellen vor und nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX4945 untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 24 h mit 10  $\mu$ M CX4945 oder DMSO behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

In allen drei Fällen führt die Behandlung der Zellen mit dem CK2-Inhibitor CX4945 interessanterweise zu einer Reduzierung der SHIP1-Expression (>90 %) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen. Damit verbunden ist ebenfalls die Reduktion der Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021. Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen vermindert die Inhibierung der CK2 ebenso die Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473.

Die Proteine pan AKT, SHIP2, HSC70 und Cbl sind von einer veränderten Expression nicht betroffen. Die Behandlung der Zellen mit dem Casein Kinase 2-Inhibitor führt somit zu einem vergleichbaren Genexpressionsprofil, wie es in den SupB-15-Zellen nach der Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression zu beobachten ist (Abbildung 42). Zudem wurde der relative IC<sub>50</sub>-Wert von CX4945 in SupB-15-Zellen bestimmt. Er beträgt 1,53  $\mu\text{M}$  (Abbildung 48). Die Zellen zeigen bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  des Hemmstoffs einen signifikanten Effekt auf das Wachstum.



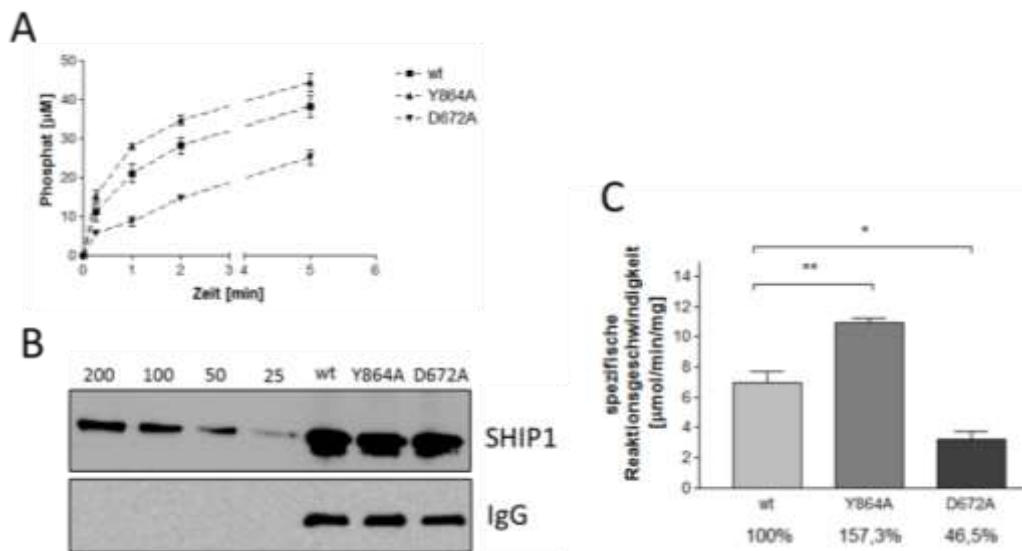
**Abbildung 48: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Ph-positiven SupB-15-Zellen nach Behandlung mit CX4945.** Zur genaueren Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Ph-positiven SupB-15-Zellen nach Behandlung mit DMSO, 0,12  $\mu\text{M}$  CX4945 ( $p=0,4097$ ), 0,25  $\mu\text{M}$  CX4945 ( $p=0,2710$ ), 0,5  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p=0,0045$ ), 1  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p<0,0001$ ), 2  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p<0,0001$ ), 5  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p<0,0001$ ), 10  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p<0,0001$ ) und 20  $\mu\text{M}$  CX4945 (\*\* $p<0,0001$ ) wurden die Zellen jeweils mindestens in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sechs Tage verfolgt (A; dargestellt ist eine repräsentative Auswahl der verwendeten Konzentrationen) und eine Hemmkinetik erstellt (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die DMSO-behandelten Zellen (\*  $p\leq 0,05$ ; \*\*  $p\leq 0,01$ ; \*\*\*  $p\leq 0,001$ ).

#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses der Mutationen Y864A auf die Phosphataseaktivität von SHIP1

Die in Kapitel 4.3.5 angesprochene putative SHIP1-Phosphorylierungsstelle am Tyrosin-Rest 864 wurde im Folgenden aufgrund seiner unmittelbaren Lokalisation C-Terminal der C2-

Domäne der Phosphatase-Domäne in einem Phosphatase-Assay tiefgehend untersucht. Im Rahmen der klonalen B-Zell-Selektion könnte der Tyrosin-Rest 864, eine bisher uncharakterisierte Modifikationsstelle von SHIP1, wohlmöglich das Überleben von malignen B-Zellen über eine veränderte Phosphataseaktivität beeinflussen.

Hierzu wurde eine Tyrosin-zu-Alanin-Dephosphorylierungsmutante generiert. Neben der SHIP1-Y864A-Mutante und dem SHIP1-wt wurde zudem die enzymatisch beeinträchtigte D672A-Mutante als Kontrolle vermessen. Zunächst wurden NP-40 Proteinlysate aus den jeweiligen Zellen gewonnen. Unter Verwendung eines spezifischen anti-SHIP1-Antikörpers (P1C1), der an eine Protein-G-Sepharose gekoppelt wurde, wurde das SHIP1-Protein aus den Lysaten für den SHIP1-5-Phosphatase-Assay immunpräzipitiert. Durch Zugabe von 200  $\mu$ M PtdIns(3,4,5) $P_3$ -diC8 und anschließender Vermessung des entstandenen anorganischen Phosphats als Maß für den Substratumsatz unter Verwendung von Malachitgrün wurde die enzymatische Aktivität der verschiedenen Ansätze bestimmt. Der Substratumsatz wurde jeweils nach 15s, 1, 2 und 5 Minuten gemessen.

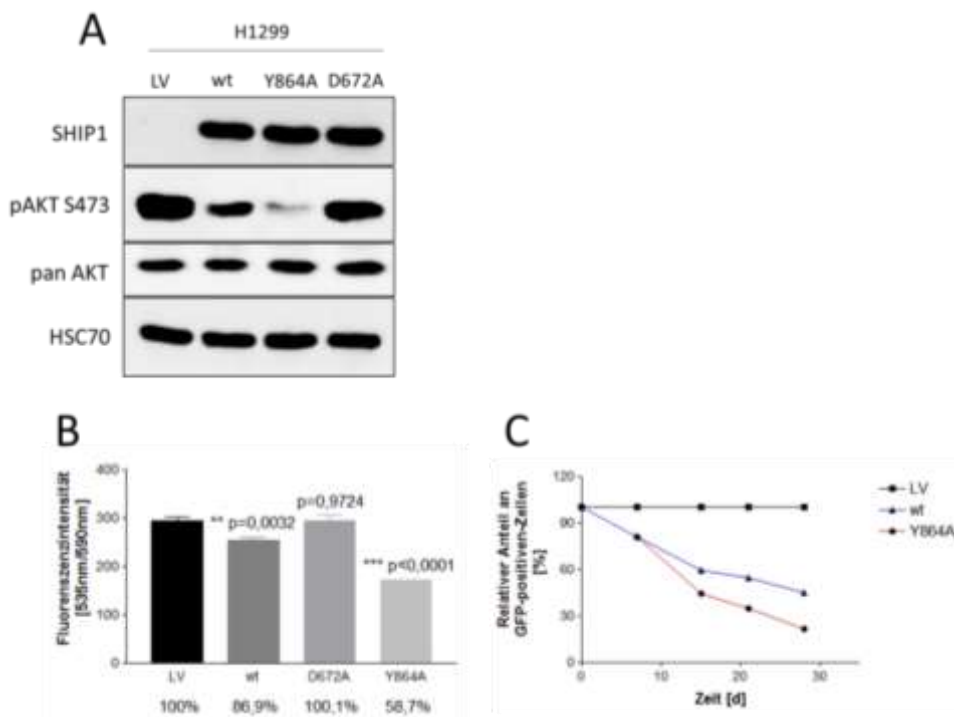


**Abbildung 49: Untersuchung der Phosphataseaktivität von SHIP1-Y864A.** Die Phosphataseaktivität von SHIP1-wt, SHIP1-Y864A und SHIP1-D672A wurde jeweils in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen gemessen. Hierzu wurden die verschiedenen SHIP1-exprimierenden Zellen mittels NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde SHIP1 spezifisch mittels Protein-G-Sepharose gekoppelter SHIP1-Antikörper aus dem Lysat immunpräzipitiert (SHIP1-P1C1). Es wurden jeweils 1 mg Proteinlysate für die Immunpräzipitation verwendet. Durch Zugabe von 200  $\mu$ M PtdIns(3,4,5) $P_3$ -diC8 und anschließender Vermessung des entstandenen anorganischen Phosphats als Maß für den Substratumsatz unter Verwendung von Malachitgrün wurde die enzymatische Aktivität der verschiedenen Ansätze bestimmt. Der Substratumsatz wurde jeweils nach 15s, 1, 2 und 5 Minuten gemessen (A). Zur Bestimmung der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit wurde jeweils die eingesetzte SHIP1-Proteinmenge über die vorhandene SHIP1-Menge in den Protein-G-Sepharose-Pellets analysiert. Hierzu wurden die gewaschenen Immunpräzipitate parallel mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (B). Zur Quantifizierung der SHIP1-Menge wurde zudem ein rekombinanter SHIP1-Standard (25, 50, 100 und 200 ng) auf das Gel aufgetragen. Unter Verwendung eines anti-SHIP1-Antikörpers konnte die SHIP1-Menge bestimmt werden und so die spezifische Aktivität berechnet werden (C). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die SHIP1-wt-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Zudem wurden zur Bestimmung der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit die jeweils eingesetzte SHIP1-Proteinmenge über die vorhandene SHIP1-Menge in den Protein-G-Sepharose-Pellets auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur genauen Quantifizierung der



SHIP1-Menge wurde zudem ein rekombinanter SHIP1-Standard (25, 50, 100 und 200 ng) auf das Gel aufgetragen. Unter Verwendung eines anti-SHIP1-Antikörpers konnte die SHIP1-Menge bestimmt werden und so die spezifische Aktivität berechnet werden. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 49 zusammengefasst. Dabei zeigt sich, dass die SHIP1-Y864A-Mutante (spez. Reaktionsgeschwindigkeit: 10,94  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) im Vergleich zum SHIP1-wt (spez. Reaktionsgeschwindigkeit: 6,96  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) eine um ca. 57 % erhöhte spezifische Aktivität aufweist. Demgegenüber zeigt die SHIP1-D672A-Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine Restaktivität von ca. 46,5 % (spez. Reaktionsgeschwindigkeit: 3,23  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ). Neben der Untersuchung dieser Mutante im Phosphatase-Assay wurde zudem auch ein Western Blot zur Analyse der Signaltransduktion durchgeführt. Hierfür wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung von Kontrollvektor-, SHIP1-wt-, Y864A- und D672A-exprimierende Zellen angefertigt und mittels Western Blot analysiert.



**Abbildung 50: Untersuchung des Einflusses der SHIP1-Y864A-Mutante auf die Phosphorylierung von AKT-S473 und das Zellwachstum.** Die Veränderung der Phosphorylierung von AKT-S473 durch Expression von SHIP1-wt, SHIP1-Y864A, SHIP1-D672A und des Kontrollvektors wurde auf Proteinebene in H1299-Zellen untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30  $\mu\text{g}$  Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Stabile SHIP1-wt-, SHIP1-Y864A- und SHIP1-D672A-exprimierende H1299-Zellen wurden zusammen mit Kontrollvektor-exprimierenden Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Jurkat-Zellen wurden zudem mit lentiviralen Vektoren, die für SHIP1-wt, SHIP1-Y864A und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. Drei Tage nach der Transduktion wurden die GFP-positiven Zellen über die Zeit durchflusszytometrisch verfolgt. Dargestellt ist der relative Anteil an GFP-exprimierenden Zellen in Prozent. Normalisiert wurde hierzu auf den ersten Messpunkt (C).

Die Ergebnisse in Abbildung 50A zeigen, dass die relative SHIP1-Expression beim Wildtyp (100 %), der Y864A-Mutante (103 %) und der D672A-Mutante (109 %) vergleichbar ist. Im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %) reduziert sich jedoch in der

Folge die relative Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 auf 45 % beim Wildtyp, auf 13 % bei der Y864A-Mutante und auf 77 % bei der D672A-Mutante.

Darüber hinaus wurde jeweils die Zellviabilität von Kontrollvektor-, SHIP1-wt-, Y864A- und D672A-exprimierenden H1299-Zellen unter Verwendung eines Alamar Blue-Assays bestimmt. Hierzu wurden die Zellen jeweils ausgesät und für 48h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Resazurin versetzt und die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse in Abbildung 50B zeigen, dass die Zellen, welche den SHIP1-Wildtyp (86,9 %) und die SHIP1-Y864A-Mutante (58,7 %) exprimieren, einen signifikanten Nachteil in der Zellviabilität, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), aufweisen. Die Zellen mit der SHIP1-D672A-Mutante (100,1 %) besitzen eine vergleichbare Zellviabilität wie die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen.

Darüber hinaus wurden Jurkat-Zellen mit dem Kontrollvektor, dem SHIP1-wt und der SHIP1-Y864A-Mutante transduziert. Anschließend wurden die Zellen für zwei Wochen mit Puromycin selektioniert. Danach wurde das Wachstum der Zellen am Durchflusszytometer über das Markerprotein GFP für 29 Tage verfolgt. Die Ergebnisse in Abbildung 50C zeigen, dass 29 Tage nach der Selektion die SHIP1-Y864A-exprimierenden Jurkat-Zellen einen relativen GFP-Anteil von unter 30 % zeigen. Der relative Anteil an GFP-exprimierenden Zellen ist beim SHIP1-wt nach 29 Tagen auf einen Wert von ca. 40 % gesunken. Demgegenüber zeigen die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen einen nahezu konstanten Anteil an GFP-positiven Zellen, der nicht unter 90 % absinkt.

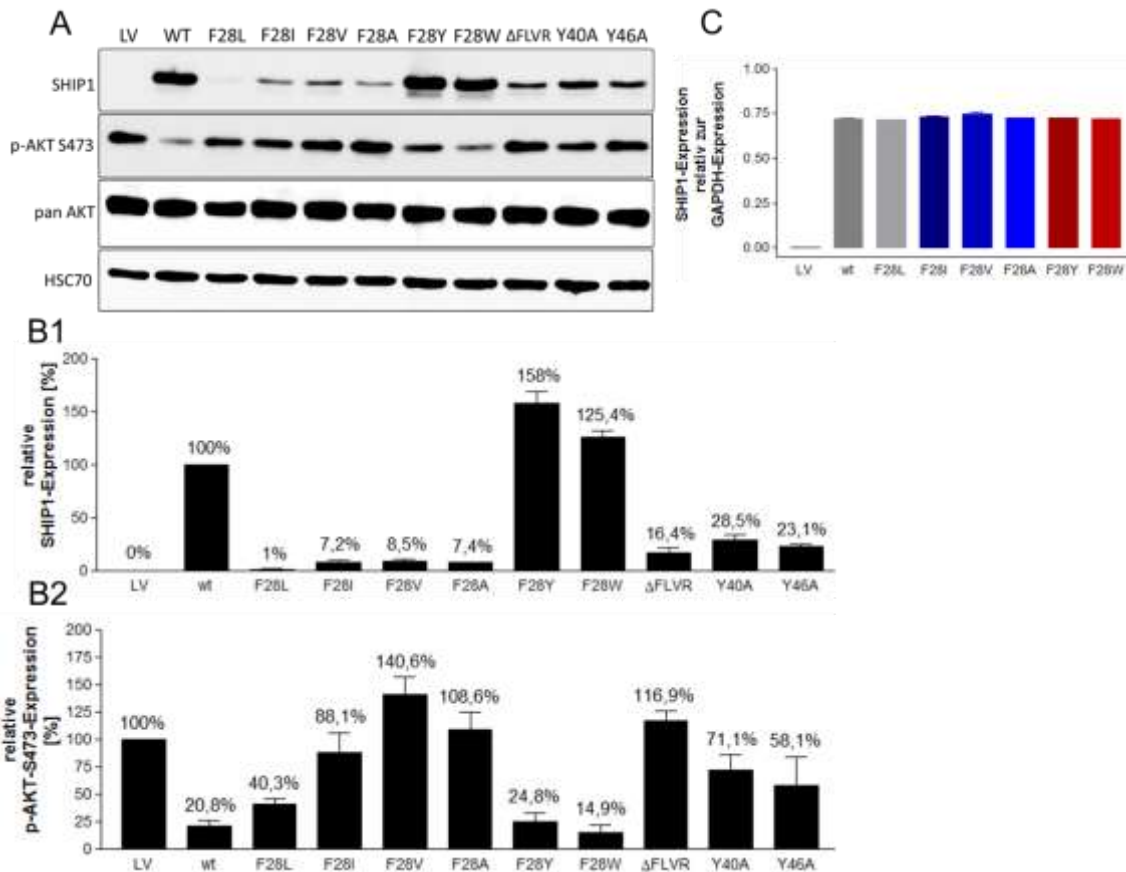
Der Tyrosin-Rest 864, eine bisher uncharakterisierte Modifikationsstelle von SHIP1, führt somit in seiner inaktiven Form zu einer gesteigerten Phosphataseaktivität in Verbindung mit einer verminderten Phosphorylierung von AKT-S473 im Vergleich zum Wildtyp.

#### **4.5 Analyse des FLVR-Motivs von SHIP1 und seiner Bedeutung für die Protein-Stabilität**

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob Mutationen innerhalb wichtiger Domänen und Motive von SHIP1 zu einer Beeinträchtigung der Proteinstabilität führen können, die den Abbau und somit den Verlust von SHIP1 begünstigen. Die Effekte einer verminderten SHIP1-Expression wurden zuvor in Kapitel 4.4 beschrieben. Zur Untersuchung dieser Frage wurde zunächst einmal die Mutation F28L, welche in der SH2-Domäne von SHIP1 lokalisiert ist, tiefergehend untersucht. In der Arbeit von Helena Brauer wird für die F28L-Mutation eine verminderte Bindung an Tyrosin-phosphorylierte Proteine beschrieben [Brauer et al., 2012].

Zunächst wurden TF-1-Zellen mit dem Kontrollvektor, dem SHIP1-wt, der SHIP1-F28L-Mutante und einer Mutante mit reduzierter SHIP1-Phosphataseaktivität (Y643H) transduziert. Die Zellen wurden danach für zwei Wochen mit Puromycin selektioniert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt und diese mittels Western Blot analysiert (Abbildung S14). Die Ergebnisse in Abbildung S14A bestätigen, dass die F28L-Mutante im Gegensatz zum SHIP1-Wildtyp und der SHIP1-Y643H-Mutante eine geringere SHIP1-Expression aufweist. Erst nach sehr langer Exposition an der Entwicklereinheit kann das SHIP1-F28L-Protein dargestellt werden. Die Analyse der mRNA-Menge von SHIP1 mittels RT-qPCR zeigt, dass die Menge in den SHIP1-wt-, SHIP1-F28L- und SHIP1-Y643H-

exprimierenden Zellen vergleichbar ist (Abbildung S14B). Weiterhin wurde untersucht, ob die SHIP1-F28L-Mutante aktiv abgebaut wird. Hierzu wurden SHIP1-F28L-exprimierende Zellen mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 und den Inhibitor für den proteasomalen-Abbau MG-132 inhibiert. Die Ergebnisse in Abbildung S14C zeigen, dass im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen der Abbau der SHIP1-F28L-Mutante durch Inhibierung von PP2 und MG-132 reduziert werden kann.



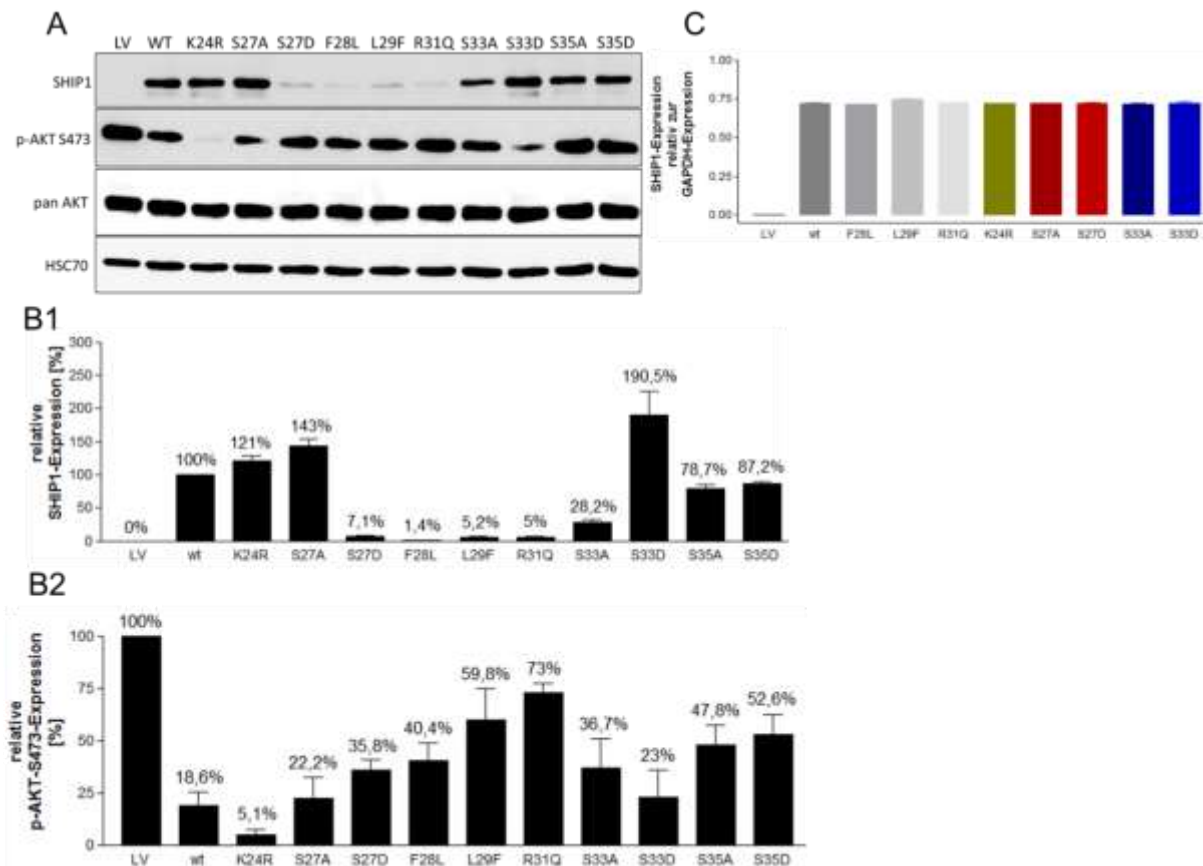
**Abbildung 51: Untersuchung der Stabilität von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten.** Zur Untersuchung der Stabilität von SHIP1-Mutanten des FLVR-Motivs und putativer Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe des FLVR-Motivs wurden H1299-Zellen mit lentiviralen Partikeln, welche jeweils Vektoren mit Kontrollvektor-, SHIP1-wt-, SHIP1-F28L-, SHIP1-F28I-, SHIP1-F28V-, SHIP1-F28A-, SHIP1-F28Y-, SHIP1-F28W-, SHIP1-ΔFLVR-, SHIP1-Y40A- und SHIP1-Y46A-Sequenz enthielten, transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mit Puromycin selektioniert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression (B1) mit der entsprechenden Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression (B2) der H1299-Zellen. Drei Wochen nach der Transduktion wurde zudem jeweils die RNA der transduzierten Zellen isoliert. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Es wurden spezifische Oligonukleotide für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) (C) verwendet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardfehler aus drei Messungen der jeweiligen Probe [publiziert in Ehm et al., 2019].

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss Aromatische-Aminosäuren an Position 28 der SHIP1-Sequenz auf die Stabilität des SHIP1-Proteins haben. Zur Nachahmung des Phenylalanins wurden daher die strukturell ähnlichen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan ausgewählt. Zudem wurden zur Nachahmung des Leucins SHIP1-Mutanten mit den Aminosäuren Alanin, Valin und Isoleucin angefertigt. Zudem wurde eine Mutante generiert, welcher das komplette FLVR-Motiv fehlt (ΔFLVR). Zusammen mit dem Kontrollvektor und



kann zudem der Wildtyp (18,6 %), die S27A (22,2 %), S27D (35,8 %), F28L (40,4 %), L29F (59,8 %), R31Q (73 %), S33A (36,7 %), S33D (23 %), S35A (47,8 %), S35D (52,6 %), Y40A (71,1 %) und die Y46A-Mutante (58,1 %) die Phosphorylierung von AKT (S473) reduzieren. Eine vergleichbare Reduzierung der Phosphorylierung von AKT (S473), wie sie durch den SHIP1-wt erreicht werden kann, zeigt somit nur die S27A- und S33D-Mutante.

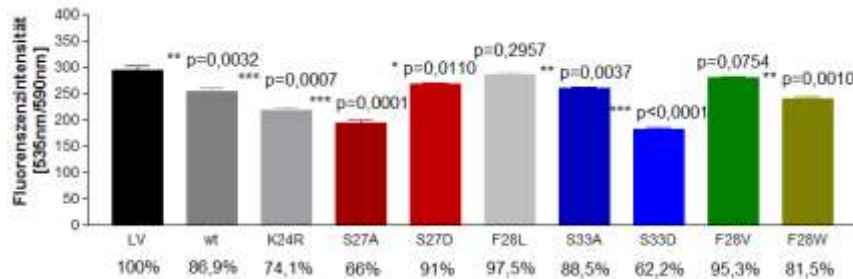
Die Analyse der mRNA-Menge von SHIP1 mittels RT-qPCR zeigt, dass die SHIP1-mRNA-Menge des Wildtyps und der untersuchten SHIP1-Mutanten vergleichbar ist (Abbildung 53C). Die Mutanten  $\Delta$ FLVR, Y40A, Y46A, S35A und S35D wurden dabei nicht näher charakterisiert.



**Abbildung 53: Untersuchung der Stabilität von putativen Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe des FLVR-Motivs von SHIP1.** Zur Untersuchung der Stabilität von SHIP1-Mutanten des FLVR-Motivs und putativer Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe des FLVR-Motivs wurden H1299-Zellen mit lentiviralen Partikeln, welche jeweils Vektoren mit Kontrollvektor-, SHIP1-wt-, SHIP1-K24R-, SHIP1-S27A-, SHIP1-S27D-, SHIP1-F28L-, SHIP1-L29F-, SHIP1-R31Q-, SHIP1-S33A-, SHIP1-S33D-, SHIP1-S35A- und SHIP1-S35D-Sequenz enthielten, transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mit Puromycin selektioniert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression (B1) mit der entsprechenden Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression (B2) der H1299-Zellen. Drei Wochen nach der Transduktion wurde zudem jeweils die RNA der transduzierten Zellen isoliert. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt (C). Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Es wurden spezifische Oligonukleotide für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) verwendet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler aus drei Messungen der jeweiligen Probe [publiziert in Ehm et al., 2019].

Im nächsten Schritt wurde das Wachstumsverhalten von ausgewählten Mutanten untersucht. Dazu wurden Kontrollvektor, SHIP1-wt und SHIP1-Mutanten-exprimierende H1299-Zellen ausgesät und für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Resazurin versetzt und die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse

in Abbildung 54 zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), der SHIP1-wt (86,9 %), die K24R- (74,1 %), die S27A- (66 %), die S27D- (91 %), die S33A- (88,5 %), die S33D- (62,2 %) und die F28W-Mutante (81,5 %) eine signifikant geringere Zellviabilität aufweisen. Die Mutanten F28L (97,5 %) und F28V (95,3 %) zeigen im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität auf.



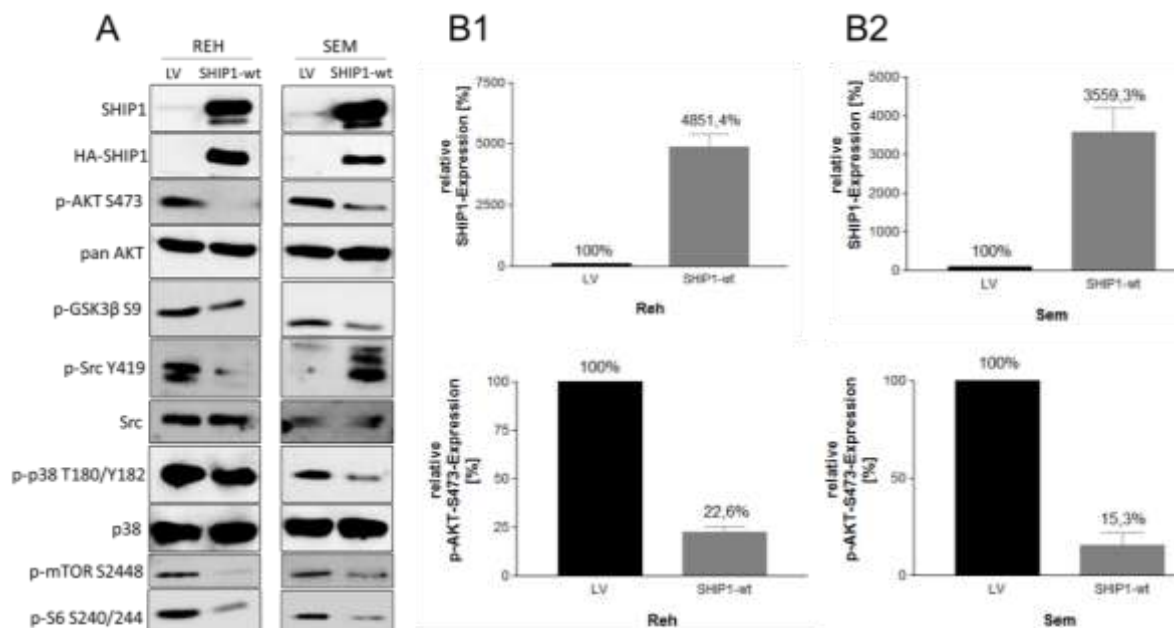
**Abbildung 54: Analyse des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf die Viabilität von H1299-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf die Viabilität von H1299-Zellen wurden SHIP1-wt-, SHIP1-K24R-, SHIP1-S27A-, SHIP1-S27D-, SHIP1-F28L-, SHIP1-S33A-, SHIP1-S33D-, SHIP1-F28V- und SHIP1-F28W-exprimierende H1299-Zellen zusammen mit den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) [publiziert in Ehm et al., 2019].

Zudem wurde das Wachstumsverhalten von Kontrollvektor-, SHIP-wt-, SHIP1-F28L-, SHIP1-F28W- und SHIP1-K24R-exprimierenden H1299-Zellen durch *Live-Cell-Imaging* gemessen. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen ausgesät und die Konfluenz der Zellen jeweils über 24 Stunden verfolgt. Die Ergebnisse in Abbildung S15 zeigen, dass im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), der Wildtyp (89,5 %), die F28W- (79,4 %) und die K24R-Mutante (81,2 %) eine signifikant geringere Zellkonfluenz aufwiesen. Die F28L-Mutante (100,4 %) zeigt eine vergleichbare Zellkonfluenz wie die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen. Diese Daten belegen, dass SHIP1-Mutationen im FLVR-Motiv der SH2-Domäne zu einer verminderten SHIP1-Expression führen können, die mit einer verstärkten Proliferation der Zelle korrelieren.

#### 4.6 Untersuchung der Auswirkungen einer gesteigerten SHIP1-Expression auf das Zellverhalten von B-Zellen

Da zuvor in den stark SHIP1-exprimierenden Zelllinien ein Knockdown von SHIP1 zur Untersuchung der SHIP1-abhängigen Zelleffekte nach Herunterregulation der SHIP1-Expression durchgeführt wurde (Kapitel 4.4), wurde im Folgenden in einer Zelllinie mit überdurchschnittlich geringer SHIP1-Expression eine starke SHIP1-Expression induziert. Die Effekte einer Wiederherstellung der SHIP1-Expression sollen Aufschluss über Zellwachstum und Signaltransduktion in Zellen mit schwacher SHIP1-Expression geben. Als Zelllinie mit schwacher SHIP1-Expression wurden Sem-Zellen gewählt. Zudem wurden Reh-Zellen verwendet. Beide Zelllinien wurden zum einen mit dem Kontrollvektor und zum anderen mit

dem SHIP1-wt transduziert und für zwei Wochen mit Puromycin selektiert. Von den selektierten Zellen wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt.



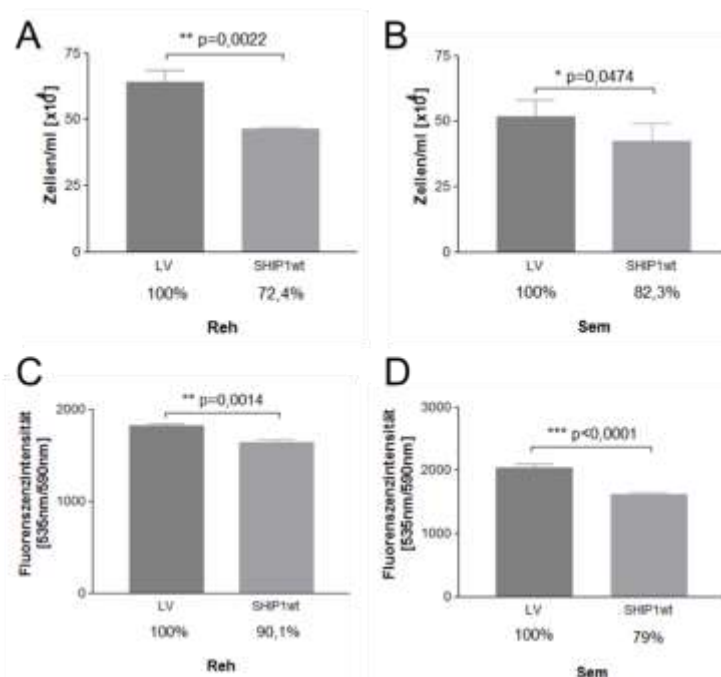
**Abbildung 55: Untersuchung des Einflusses der gesteigerten SHIP1-Expression auf die Signaltransduktion in B-ALL-Zellen.** Die Erhöhung der SHIP1-Expression und der damit verbundene Einfluss auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen wurde auf Proteinebene in B-ALL-Zellen analysiert. Reh- und Sem-Zellen wurden hierzu mit lentiviralen Partikeln, welche jeweils Vektoren mit der Vektorkontroll-Sequenz und der SHIP1-Wildtyp-Sequenz enthielten, transduziert. Die Zellen wurden nach der Transduktion mit Puromycin selektiert. Anschließend wurden

jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression mit der entsprechenden Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression von Reh- (B1) und Sem-Zellen (B2).

Insgesamt führt die SHIP1-wt-Überexpression in den Reh-Zellen zu einer Steigerung der SHIP1-Expression um das 48,51-fache im Vergleich zu der Leervektorkontrolle. Die damit verbundene Verminderung der relativen Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 beträgt im Vergleich zur Leervektorkontrolle 77,4 %. Die SHIP1-wt-Überexpression in den Sem-Zellen führt zu einer 35,59-fach gesteigerten SHIP1-Expression im Vergleich zu der Leervektorkontrolle. Die damit verbundene Senkung der relativen Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 beträgt im Vergleich zur Leervektorkontrolle 84,7 %. In beiden Zelllinien führt die gesteigerte SHIP1-Expression, neben der Reduzierung der Phosphorylierung von AKT, auch zur Reduzierung der Phosphorylierung von mTOR (S2448), S6 (S240/244), GSK3β (S9) und p38 (T180/Y182).

Des Weiteren führt die gesteigerte SHIP1-Expression in der Reh Zelllinie im Vergleich zu der Leervektorkontrolle zu einer Reduzierung der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Y419). Demgegenüber führt die erhöhte SHIP1-Expression in der Zelllinie Sem im Vergleich zu der Leervektorkontrolle zu einer Erhöhung der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Y419). Anschließend wurde das Wachstumsverhalten von Kontrollvektor- und SHIP1-wt-

exprimierenden Sem- und Reh-Zellen untersucht. Hierfür wurden sowohl Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Sem-Zellen als auch Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Reh-Zellen ausgesät. Zwei Tage nach dem Aussäen wurden die Zellen mittels Hämocytozometer gezählt. Abbildung 56A zeigt das Wachstumsverhalten von Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierenden Reh-Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Reh-Zellen (100 %) weisen die SHIP1-wt-exprimierenden Reh-Zellen einen Wachstumsnachteil auf (72,4 %). Abbildung 56B zeigt demgegenüber das Wachstumsverhalten von Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierenden Sem-Zellen. Die SHIP1-wt-exprimierenden Sem-Zellen weisen, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Sem-Zellen (100 %), ebenfalls einen Wachstumsnachteil auf (82,3 %). Des Weiteren wurde ein Alamar Blue-Zellviabilitäts-Assay der Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierenden Reh-Zellen sowie Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierenden Sem-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 56C und D zeigen, dass es zu einer signifikanten Verminderung der Zellviabilität bei den SHIP1-wt-exprimierenden Reh-Zellen (90,1 %) im Vergleich zu den Zellen mit der Leervektorkontrolle (100 %) kommt. Eine signifikante Reduzierung der Zellviabilität kann auch bei den SHIP1-wt-exprimierenden Sem-Zellen (79 %) im Vergleich zu den Zellen mit der Leervektorkontrolle (100 %) beobachtet werden. Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse aus den SHIP1-Knockdown- (Kapitel 4.4) und SHIP1-Überexpressions-Untersuchungen, dass SHIP1 grundsätzlich einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen ausübt, was die Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 in der Leukämogenese der ALL deutlich macht.

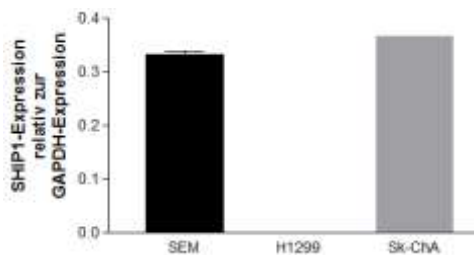


**Abbildung 56: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität und das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach gesteigerter Expression von SHIP1.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität von B-ALL-Zellen nach gesteigerter Expression von SHIP1 wurden Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Reh-Zellen (A) sowie Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Sem-Zellen (B) in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit  $100 \mu\text{l}$  Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ). Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach gesteigerter Expression von SHIP1 wurden Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Reh-Zellen (C) sowie Kontrollvektor- und SHIP1-wt-exprimierende Sem-Zellen (D) in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch in einer 6-Loch-Schale mit 2 ml Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mithilfe eines Hämocytozometers gezählt (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



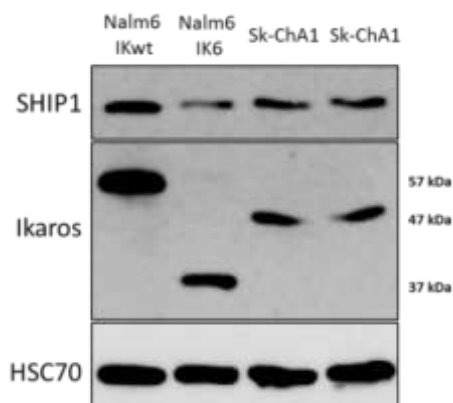
## 4.7 Ektote Expression von hämatopoetischen Tumorsuppressor-Proteinen in Karzinomzellen – SHIP1 und Ikaros

In der Literatur wird SHIP1 als 5<sup>-</sup>-Inositol-Phosphatase beschrieben, dessen Expression auf hämatopoetische Zellen beschränkt bleibt. Wenig ist jedoch bekannt über die Expression von SHIP1 in Karzinom-Zellen. Da es in den vorherigen Datenbank-Analysen, insbesondere in der COSMIC-Datenbank, starke Hinweise auf eine Expression von SHIP1 in nicht-hämatopoetischen Zellen gab, wurde im Folgenden untersucht, ob SHIP1 auch in anderen Tumor-Identitäten exprimiert wird und welchen Einfluss Ikaros in diesen Zellen auf die Expression haben könnte. Die vorherigen Ergebnisse zeigen, dass Ikaros ein wichtiger Regulator der SHIP1-Expression ist (Kapitel 4.4.1). Ikaros wird vor allem als hämatopoetischer Transkriptionsfaktor beschrieben. Seine Rolle in Karzinom-Zellen ist ebenfalls unbekannt. Im ersten Schritt wurde hierzu die RNA von Sem, H1299 und Sk-ChA1-Zellen isoliert, in die cDNA umgeschrieben und die SHIP1-mRNA-Menge mittels RT-qPCR bestimmt (Abbildung 57). Interessanterweise wird SHIP1 endogen nicht nur in Sem-, sondern auch in der Cholangio-Karzinom-Zelllinie Sk-ChA1 exprimiert. Die Lungenkarzinomzelllinie H1299 exprimiert demgegenüber kein endogenes SHIP1.



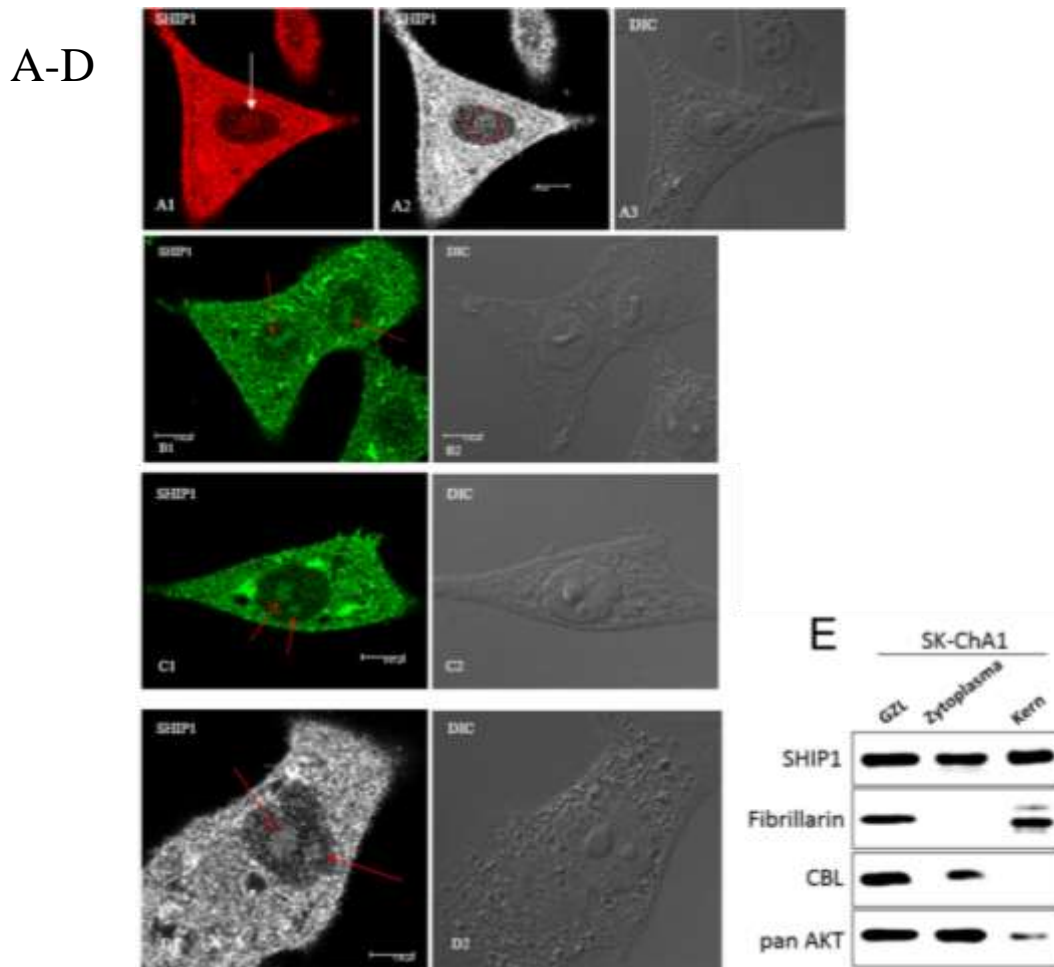
**Abbildung 57: mRNA-Expression von SHIP1 in humanen Karzinomzelllinien.** Die Expression von SHIP1 wurde auf mRNA-Ebene in Karzinomzelllinien untersucht. Hierzu wurde die RNA zunächst aus H1299- und Sk-ChA1-Zellen isoliert. Als positive Kontrolle für die SHIP1-Expression wurden Sem B-ALL-Zellen verwendet. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe.

Im nächsten Schritt wurde die endogene Expression von SHIP1 und Ikaros auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate von Ikaros-wt (57 kDa) und Ikaros-Isoform 6-exprimierenden Nalm-6-Zellen (37 kDa) sowie von parentalen Sk-ChA1-Zellen durch TCE-Fällung hergestellt und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 58). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl SHIP1 als auch Ikaros in den Sk-ChA1-Zellen exprimiert wird. SHIP1 wird bei 145 kDa und Ikaros bei ca. 47 kDa exprimiert.



**Abbildung 58: Identifikation der Protein-Expression von SHIP1 und Ikaros in Sk-ChA1-Zellen.** Die Expression von SHIP1 und dem Transkriptionsfaktor Ikaros wurde in der Cholangiokarzinomzelllinie Sk-ChA1 auf Proteinebene im Vergleich zu der Expression von SHIP1 und Ikaros in der B-ALL-Zelllinie Nalm-6 untersucht. Hierzu wurden stabil Ikaros-wt und Ikaros-Isoform 6-exprimierende Nalm-6-Zellen sowie Sk-ChA1-Zellen durch TCE-Fällung lysiert. Es wurden jeweils 50  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

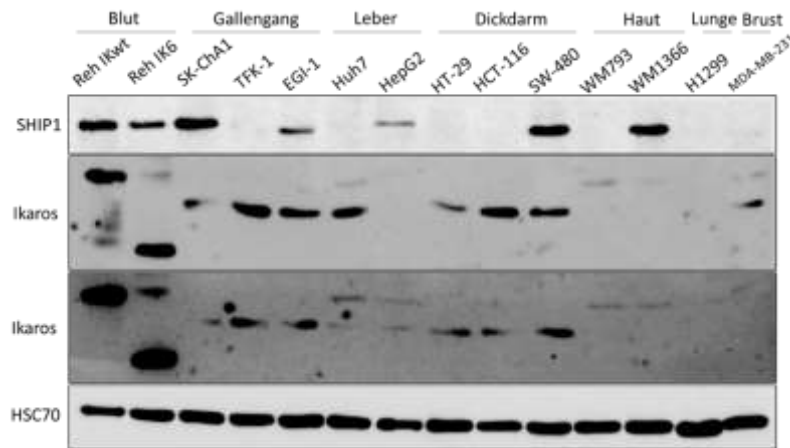
Darüber hinaus wurde die Lokalisation von SHIP1 in Sk-ChA1-Zellen mittels Membran/Zytoplasma-Fraktionierung sowie eines konfokalen Mikroskops analysiert. Abbildung 59 zeigt, dass SHIP1 sowohl im Zytoplasma als auch in den Nukleoli des Zellkerns identifiziert werden kann.



**Abbildung 59: Endogenes SHIP1 ist im Zellkern von Sk-ChA1-Zellen lokalisiert.** Die subzelluläre Lokalisation von endogenem SHIP1 wurde in der Cholangiokarzinomzelllinie Sk-ChA1 untersucht. Hierzu wurden Sk-ChA1-Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert, unspezifische Bindungsstellen mit BSA blockiert und mit einem anti-SHIP1-spezifischen Antikörper (P1C1) über Nacht inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS für mindestens eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit PBS an einem konfokalen Mikroskop untersucht. Bild (A-D) zeigt die Immunfärbung von SHIP1 in Sk-ChA1-Zellen. Die SHIP1-Lokalisation ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern zu erkennen. Die genauere Analyse im Durchlichtbild (DIC) zeigt, dass SHIP1 in den Nukleoli des Zellkerns lokalisiert ist. Es wird jeweils eine repräsentativ ausgewählte Zelle gezeigt. Bild (E) zeigt die Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern von endogenen SHIP1-exprimierenden Sk-ChA1-Zellen. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrollen für eine reine Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkern wurden sowohl gegen CBL- als auch gegen Fibrillarin-gerichtete Antikörper verwendet [publiziert in Nalaskowski et al., 2018].

Im Folgenden wurde untersucht, ob SHIP1 und Ikaros auch in anderen Tumorentitäten auf Proteinebene exprimiert werden. Hierzu wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung aus Sk-ChA1- (Cholangiokarzinom), TFK-1- (Cholangiokarzinom), EGI-1- (Cholangiokarzinom), Huh-7- (hepatozelluläres Karzinom), HepG2- (Heptatoblastom), HT-29- (rektosigmoidales Adenokarzinom), HCT-116- (Kolonkarzinom), SW-480- (Kolon-Adenokarzinom), WM793- (Melanom), WM1366- (Melanom), H1299- (großzelliges Lungenkarzinom) und MDA-MB-

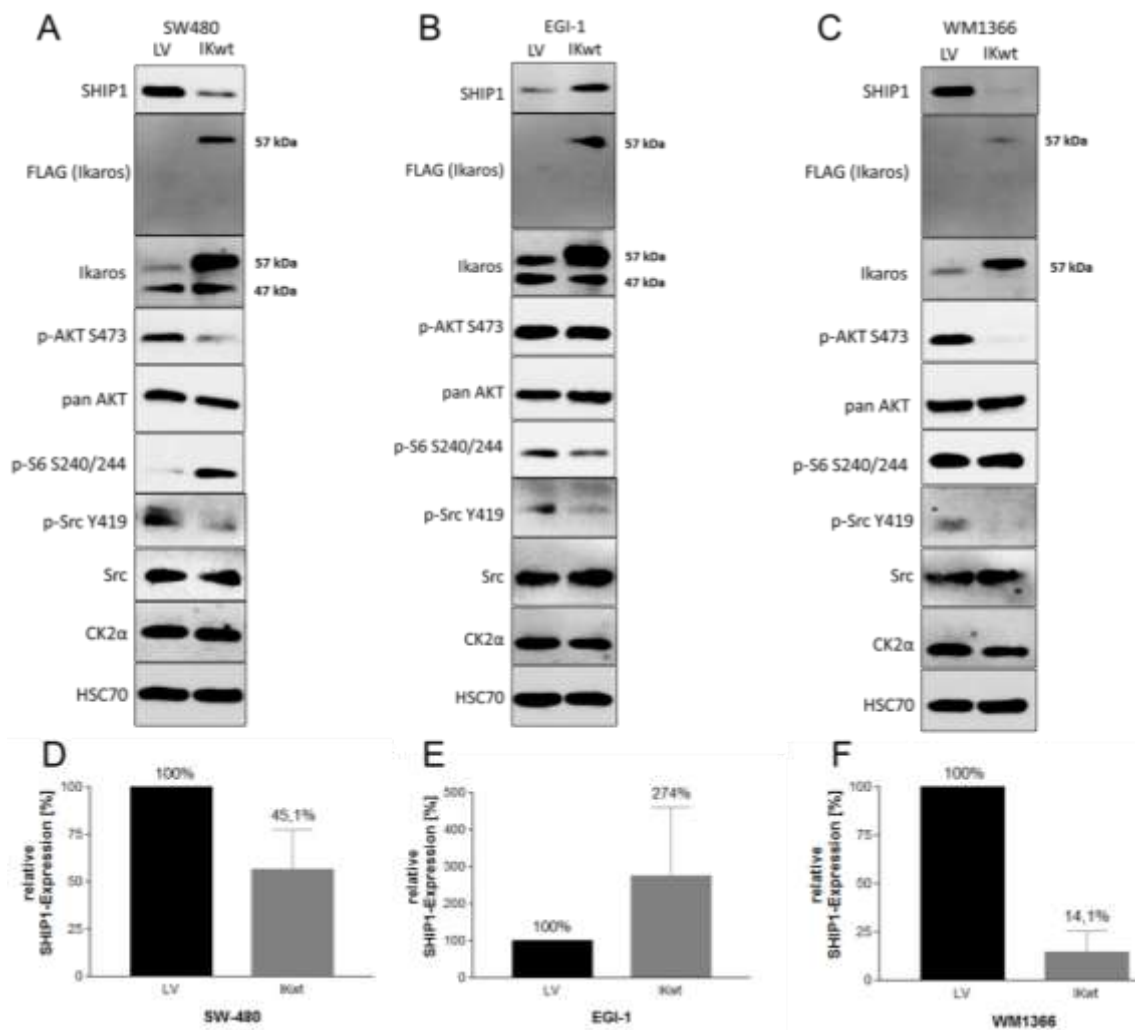
231-Zellen (Adenokarzinom der Brust) erstellt. Zudem wurden Lysate von Ikaros-wt- und Ikaros-Isoform 6-exprimierenden Reh-Zellen als Kontrollen angefertigt. Die Ergebnisse in Abbildung 60 und S16 zeigen erstaunlicherweise, dass Ikaros in allen Zelllinien bei 57 und/oder 47 kDa exprimiert wird. SHIP1 kann in 6 von 12 Fällen detektiert werden (Sk-ChA1-, EGI-1-, HepG2-, HT-29-, SW-480- und WM1366-Zellen).



**Abbildung 60: Identifikation der Protein-Expression von SHIP1 und Ikaros in Karzinomzelllinien.** Die Expression von SHIP1 und dem Transkriptionsfaktor Ikaros wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien auf Proteinebene im Vergleich zu der Expression von SHIP1 und Ikaros in der B-ALL-Zelllinie Reh untersucht. Hierzu wurden stabil Ikaros-wt und Ikaros-Isoform 6-exprimierende Reh-Zellen sowie Sk-ChA1-, TFK-1-, EGI-1-, Huh7-, HepG2-, HT29-, HCT-116-, SW-480-, WM793-, WM1366-, H1299- und MDA-MB-231-Zellen durch TCE-Fällung lysiert. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Um den Einfluss von Ikaros auf die SHIP1-Expression in nicht-hämatopoetischen Zellen zu klären, wurden SW-480-, EGI-1- und WM1366-Zellen mit dem Kontrollvektor und dem Ikaros-wt transduziert. Die Zellen wurden für zwei Wochen mit Puromycin selektioniert. Anschließend wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 61 zeigen, dass in den Zelllinien SW480 und WM1366 die SHIP1-Expression durch die Expression des Ikaros-Wildtyps im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %) deutlich abnimmt (SW-480: 45,1 %; WM1366: 14,1 %). Demgegenüber nimmt die SHIP1-Expression durch die Expression des Ikaros-Wildtyps, im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (100 %), in den EGI-1-Zellen deutlich zu (274 %). Im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen wird die Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Y419) durch die Ikaros-wt-Expression in allen drei Fällen reduziert.

Die Phosphorylierung von AKT (S473) wird durch die Ikaros-wt-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle in den Zelllinien SW-480 und WM1366 reduziert. In den EGI-1-Zellen ist keine Veränderung der Phosphorylierung von AKT (S473) im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen festzustellen. Die Phosphorylierung von S6 (S240/244) erhöht sich durch die Ikaros-wt-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle in den SW-480-Zellen. In den EGI-1-Zellen reduziert sich die Phosphorylierung von S6 (S240/244) durch die Ikaros-wt-Expression im Vergleich zur Leervektorkontrolle. In den WM1366-Zellen ist keine Veränderung der Phosphorylierung von S6 (S240/244) festzustellen. Diese Daten belegen, dass wichtige hämatopoetische Proteine ektop in Karzinomzellen exprimiert werden und deuten auf eine wichtige regulatorische Funktion dieser Proteine in diesen Zellen hin.



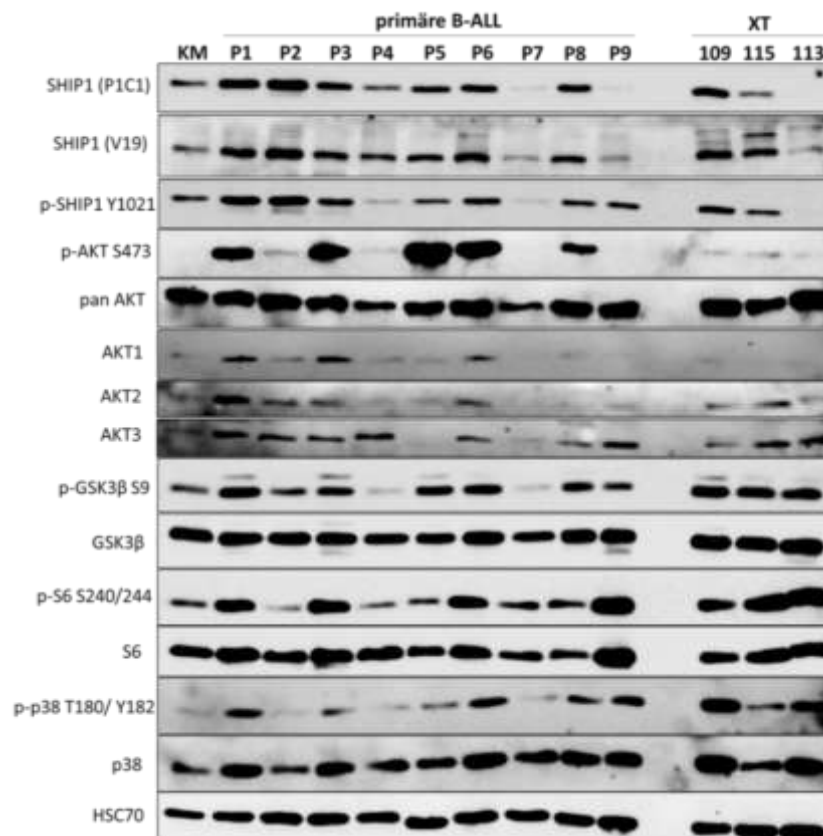
**Abbildung 61: Regulation von SHIP1 durch Ikaros in Karzinomzelllinien.** Der Einfluss der Überexpression von Ikaros auf die endogene Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in den Karzinomzelllinien SW480 (A), EGI-1 (B) und WM1366 (C) untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit lentiviralen Vektoren, die für den Ikaros-Wildtyp und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression erfolgte in den SW480- (D), EGI-1- (E) und WM1366-Zellen (F).

#### 4.8 Untersuchung der differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen in ALL-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischen Knockdown

In dem nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte sich tiefergehend mit der zentralen Schaltstelle des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, AKT, auseinandergesetzt werden. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wurde als eine häufig konstitutiv aktivierte Schaltstelle für die Erkrankung der ALL identifiziert. Trotz des Wissens über die therapeutische Bedeutsamkeit des Signalwegs fallen die Ergebnisse klinisch wirksamer Behandlungsstrategien bisher außerordentlich ernüchternd aus. Die Serin/Threonin-Kinase AKT stellt dabei eine wesentliche Schaltstelle dieses Signalwegs dar und fördert dadurch u.a. das Überleben, das Wachstum und die Proliferation der Tumorzelle. Drei Isoformen (AKT1, AKT2 und AKT3) wurden von AKT bei Säugern identifiziert, wobei den Isoformen zum Teil differentielle Funktionen zugesprochen werden.

Das Ziel der Untersuchung ist zum einen durch spezifische Knockdown-Experimente eine funktionelle Analyse der drei AKT-Isoformen auf die Leukämogenese der ALL des Kindesalters zu bestimmen, welche aufgrund der differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen für das Verständnis und Etablierung einer neuen Behandlungsstrategie mit AKT-isoformspezifischen Inhibitoren bei der ALL wichtig ist. Im zweiten Schritt wird durch Verwendung von spezifischen Hemmstoffen gegen AKT (MK2206) und mTOR (RAD001) in Kombination mit einem Tyrosinkinase-Hemmstoff (Imatinib), der gegen das in der ALL bereits etablierte Targetprotein BCR-ABL wirkt, die Funktion des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs als mögliches therapeutisches Ziel für die Therapie von ALL-Zellen untersucht. Hierbei werden die Effekte einer kombinierten Therapie im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien auf das Wachstum der ALL-Zellen *in vitro* analysiert.

Zunächst wurden primäre B-ALL Patientenproben aus der CoALL-Studie von Prof. Horstmann (Kinderkrebs-Zentrum Hamburg) mittels Western Blot auf die Expression der drei AKT-Isoformen hin untersucht. Die Zelllysate wurden mittels TCE-Fällung hergestellt. Der Nachweis der Proteine wurde mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen AKT1, AKT2 und AKT3 realisiert. Abbildung 62 zeigt die Ergebnisse des Western Blots.



**Abbildung 62: Untersuchung der Protein-Expression der drei AKT-Isoformen in primären B-ALL-Patientenproben.** Die Expression der drei AKT-Isoformen wurde auf Proteinebene in primären B-ALL-Patientenproben im Vergleich zu gesunden Knochenmarkszellen (KM) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

In 10 von 12 primären ALL-Proben ist eine Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 zu erkennen. In 5 von 10 Fällen ist dabei eine vielfach gesteigerte Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 im Vergleich zum gesunden Knochenmark zu erkennen. In allen untersuchten

Proben kann eine Expression von AKT1 und AKT3 identifiziert werden. Es ist jedoch anzumerken, dass die AKT3-Isoform bei Patient P5 verkürzt zu sein scheint. Die AKT-Isoform 2 kann in allen Fällen, mit Ausnahme der Patienten P7 und P8, detektiert werden.

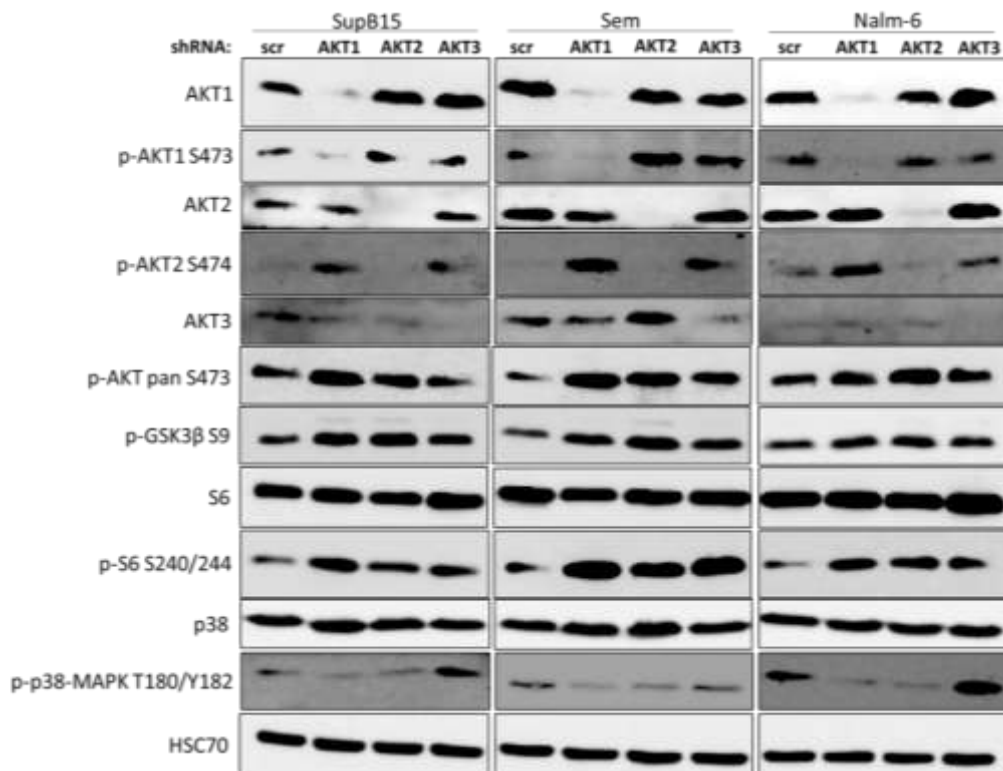
Die Phosphorylierung von pan AKT am Serin-Rest 473 scheint vor allem in den Fällen besonders stark zu sein, in denen die AKT1-Isoform ebenfalls besonders stark exprimiert wird (P1, P3 und P6). Demgegenüber scheint die Phosphorylierung von pan AKT am Serin-Rest 473 besonders in den Fällen am geringsten zu sein (P4 und P9), in denen die AKT3-Isoform prädominant exprimiert wird. Im Vergleich zum gesunden Knochenmark ist die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9) in 10 von 12 Proben erhöht. Die Phosphorylierung von S6 (S240/244) ist im Vergleich zum gesunden Knochenmark in 9 von 12 Fällen erhöht.

Zur Untersuchung der funktionellen Analyse der drei AKT-Isoformen auf die Leukämogenese der ALL des Kindesalters wurden im nächsten Schritt spezifische Knockdown-Experimente der drei AKT-Isoformen durchgeführt. Hierzu wurde die Expression der drei AKT-Isoformen in den verschiedenen ALL-Zelllinien mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen AKT1, 2 und 3 untersucht. Außerdem wurden die zuvor hergestellten TCE-Lysate genutzt. Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Expression der drei AKT-Isoformen in den ALL-Zelllinien. In allen untersuchten Proben kann eine Expression von AKT1, AKT2 und AKT3 identifiziert werden. Aufgrund der relativ starken Phosphorylierung von pan AKT am Serin-Rest 473 in den Linien Sem und SupB-15, im Vergleich zu den gesunden CD19-positiven B-Zellen, wurden diese beiden Zelllinien für die Knockdown-Experimente gewählt. Zudem wurden Nalm-6-Zellen aufgrund der relativ schwachen AKT3-Expression ausgewählt.

Im Folgenden wurden für den effizienten und stabilen Knockdown der einzelnen AKT-Isoformen in den ALL-Zellen ein lentivirales Transduktionssystem verwendet. Dazu wurden jeweils spezifische shRNAs verwendet, welche gegen eine der drei AKT-Isoformen gerichtet sind. Hierzu wurden Sem-, SupB-15- und Nalm-6-Zellen jeweils mit den shRNA-Vektoren für die drei AKT-Isoformen transduziert. Die Zellen wurden im Anschluss für zwei Wochen mit Puromycin selektioniert. Es wurden daraufhin Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 63 zeigen, dass der Einzel-Knockdown der AKT-Isoformen in allen drei Zelllinien erfolgreich durchgeführt wurde (SupB-15 AKT1: 22,1 %; AKT2: 6,1 %; AKT3: 4 %/ Sem AKT1: 11,1 %; AKT2: 6,3 %; AKT3: 21,4 %/ Nalm-6 AKT1: 30,4 %; AKT2: 23,1 %; AKT3: 39 %).

Ferner zeigt sich, dass die Phosphorylierung von AKT1 (S473) im AKT2- und AKT3-Knockdown von SupB-15- (AKT2: 170 %; AKT3:140 %) und Sem-Zellen (AKT2: 242 %; AKT3: 211 %) im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %) angestiegen ist. Im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %) ist die Phosphorylierung von AKT1 (S473) im AKT1-Knockdown von SupB-15- (23,7 %), Sem- (6,2 %) und Nalm-6-Zellen (8,5 %) drastisch gesunken.

Zudem ist die Phosphorylierung von AKT2 (S474) im AKT1- und AKT3-Knockdown von SupB-15- (AKT1: 314 %, AKT3: 236 %), Sem- (AKT1: 760 %, AKT3: 613 %) und Nalm-6-Zellen (AKT1: 205 %, AKT3: 177 %) im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %) ebenfalls angestiegen. Demgegenüber ist im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %) die Phosphorylierung von AKT2 (S474) im AKT2-Knockdown von SupB-15- (25,1 %), Sem- (16,3 %) und Nalm-6-Zellen (29 %) vermindert.



**Abbildung 63: Untersuchung des Einflusses des spezifischen Knockdowns der AKT-Isoformen auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen.** Die Veränderung der Signaltransduktion des AKT-Signalwegs wurde jeweils nach spezifischem Knockdown der AKT-Isoformen 1, 2 und 3 auf Proteinebene in den B-ALL-Zelllinien SupB-15, Sem und Nalm-6 untersucht. SupB-15-, Sem- und Nalm-6-Zellen wurden hierzu jeweils mit shRNA-scr, shRNA-AKT1, shRNA-AKT2 und shRNA-AKT3 Vektoren mit Puromycin-Kassette transduziert. Die Selektion der Zellen erfolgte mit Puromycin nach der Transduktion. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

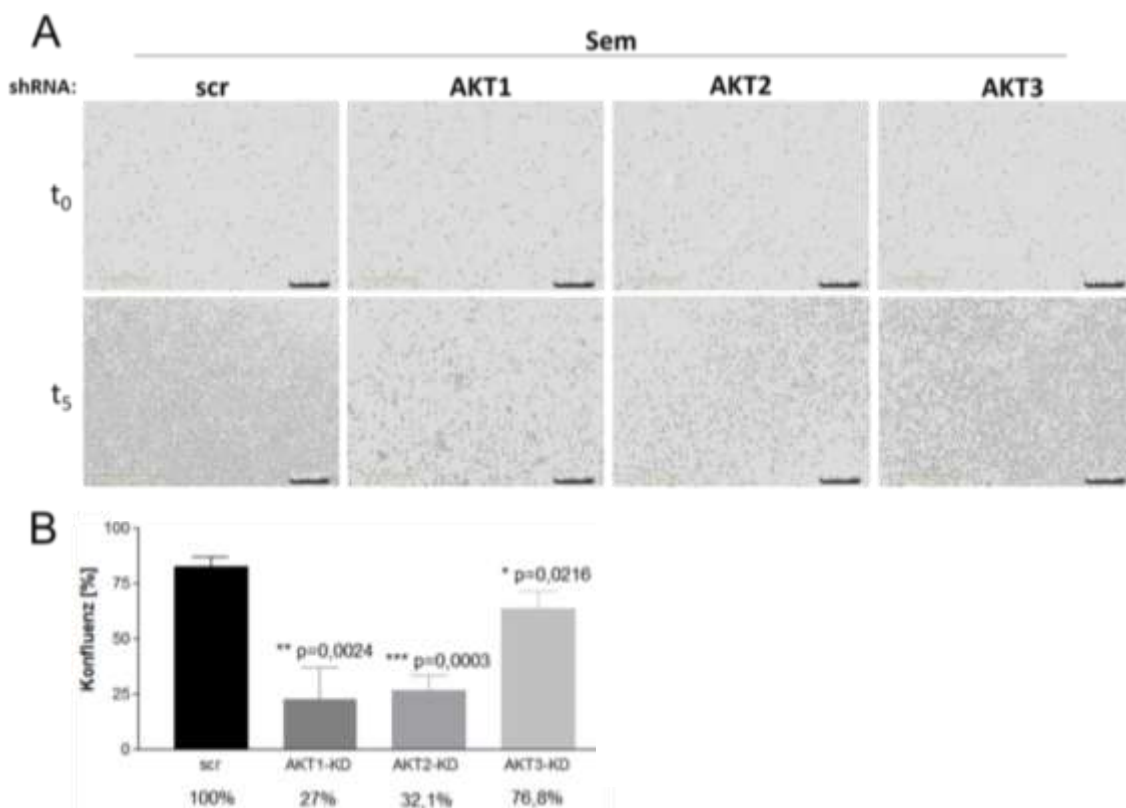
In den SupB-15-Zellen führt vor allem der AKT1-Knockdown (160 %), aber auch der AKT2-Knockdown (126 %), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von pan AKT (S473). In den Sem-Zellen führt insbesondere der AKT1- (359 %) und AKT2-Knockdown (311 %), aber auch der AKT3-Knockdown (237 %), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von pan AKT (S473). In den Nalm-6-Zellen führt vorwiegend der AKT2-Knockdown (190 %), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von pan AKT (S473) (AKT1: 130 %; AKT3: 113 %).

In allen drei Zelllinien kann durch den Knockdown der drei AKT-Isoformen ein Anstieg der Phosphorylierung von GSK3β (S9), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), beobachtet werden. Vor allem beim Knockdown der Isoform 2 ist die Phosphorylierung von GSK3β (S9) in den Zellen am stärksten (SupB-15 AKT1: 192 %; AKT2: 224 %; AKT3: 154 %/ Sem AKT1: 219 %; AKT2: 283 %; AKT3: 207 %/ Nalm-6 AKT1: 128 %; AKT2: 137 %; AKT3: 103 %).

In allen drei Zelllinien kann zudem durch den Knockdown der drei AKT-Isoformen ein Anstieg der Phosphorylierung von S6 (S240/244), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), beobachtet werden. In diesem Fall ist insbesondere beim Knockdown der Isoformen 1 und 3 die Phosphorylierung von S6 (S240/244) in den Zellen am stärksten (SupB-15 AKT1: 251 %; AKT2: 194 %; AKT3: 202 %/ Sem AKT1: 414 %; AKT2: 311 %; AKT3: 385 %/ Nalm-6

AKT1: 299 %; AKT2: 295 %; AKT3: 194 %). In allen drei Zelllinien kann durch den Knockdown der Isoformen 1 und 2 eine Abnahme der Phosphorylierung von p38 (T180/Y182), im Vergleich zu der scr-Kontrolle, beobachtet werden. Demgegenüber kommt es durch den Knockdown der Isoform 3 zu keiner Verminderung der Phosphorylierung von p38 (T180/Y182) im Vergleich zu der scr-Kontrolle.

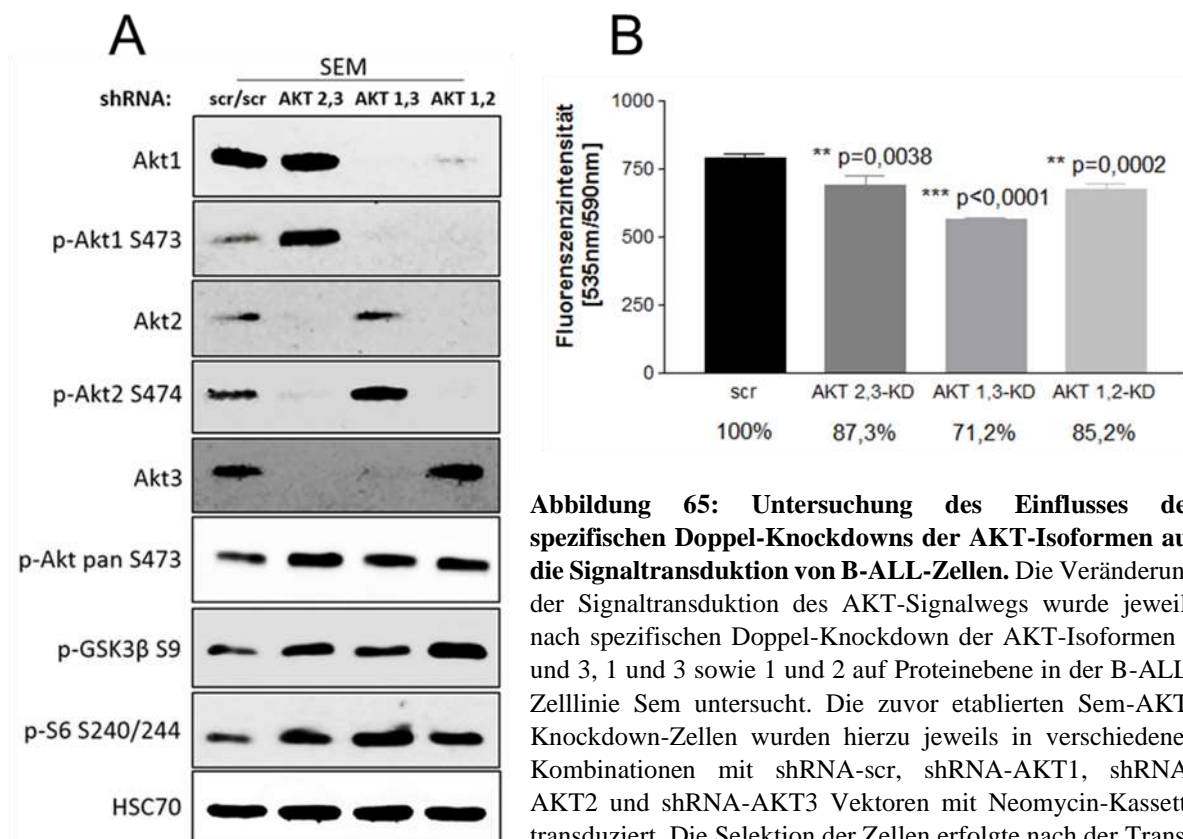
Zudem wurde das Wachstumsverhalten der Zellen nach dem jeweiligen Knockdown der drei AKT-Isoformen bestimmt. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen ausgesät und die Konfluenz der Zellen jeweils über 5 (Sem) bis 6 Tage (SupB-15 und Nalm-6) durch *Live-Cell-Imaging* (IncuCyte Zoom) verfolgt. Die Ergebnisse in der Abbildung 64 (Sem), S17 (SupB-15) und S18 (Nalm-6) zeigen, dass insbesondere die Zellkonfluenz der Zellen mit dem Knockdown für die AKT-Isoform 1 (Sem: 27 %; SupB-15: 30,3 %; Nalm-6: 16,4 %) und Isoform 2 (Sem: 32,1 %; SupB-15: 22,8 %; Nalm-6: 13,9 %), im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), vermindert ist. Dieses Bild zeigt sich für alle drei untersuchten Zelllinien. Der Knockdown der Isoform 2 scheint dabei den stärksten Effekt auf das Wachstum der Zellen auszuüben. Der Knockdown von AKT3 führt, im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %), in allen drei Zelllinien nur zu einer schwachen Reduzierung der Zellkonfluenz (Sem: 76,8 %; SupB-15: 76,9 %; Nalm-6: 88,4 %).



**Abbildung 64: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von Sem-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen wurden Sem-scr, Sem-AKT1-KD, Sem-AKT2-KD und Sem-AKT3-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über fünf Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am fünften Tag der Messung. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die shRNA-scr-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



Um die Effekte der AKT-Isoformen noch besser zu verstehen, wurde in den Sem-Zellen ein Doppel-Knockdown der AKT-Isoformen durchgeführt. Für den spezifischen Doppel-Knockdown wurden Vektoren mit denselben AKT-shRNA-Sequenzen, wie für den Einzel-Knockdown gewählt. Die Vektoren weisen jedoch eine Neomycin-Resistenz auf. Hierzu wurden die zuvor generierten Sem Knockdown-Zellen, welche über eine Puromycin-Resistenz verfügen, entsprechend mit den AKT-Isoform-spezifischen-shRNA-Vektoren mit Neomycin-Resistenz transduziert. Die Zellen wurden in der Folge mit G418 selektioniert. Von den selektionierten Zellen wurden Proteinlysate durch TCE-Fällung hergestellt und mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 65A dargestellt.



**Abbildung 65: Untersuchung des Einflusses des spezifischen Doppel-Knockdowns der AKT-Isoformen auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen.** Die Veränderung der Signaltransduktion des AKT-Signalwegs wurde jeweils nach spezifischen Doppel-Knockdown der AKT-Isoformen 2 und 3, 1 und 3 sowie 1 und 2 auf Proteinebene in der B-ALL-Zelllinie Sem untersucht. Die zuvor etablierten Sem-AKT-Knockdown-Zellen wurden hierzu jeweils in verschiedenen Kombinationen mit shRNA-scr, shRNA-AKT1, shRNA-AKT2 und shRNA-AKT3 Vektoren mit Neomycin-Kassette transduziert. Die Selektion der Zellen erfolgte nach der Trans-

duktion mit G418. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Die unterschiedlichen AKT-Doppel-Knockdown-Zellen wurden zusammen mit den scr-Kontrollzellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100 µl Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die shRNA-scr-exprimierenden Kontrollzellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Es zeigt sich, dass der Doppel-Knockdown erfolgreich durchgeführt wurde (AKT1 in AKT1,3: 2,3 %; AKT1,2: 7,5 % / AKT2 in AKT2,3: 16,9 %; AKT1,2: 0 % / AKT3 in AKT2,3: 4,1 %; AKT1,3: 17,1 %). Interessanterweise zeigt sich, dass die Phosphorylierung von AKT1 (S473) im AKT2,3 Doppel-Knockdown (419 %), im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %), angestiegen ist. Im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %) ist die Phosphorylierung von AKT1 (S473) demgegenüber im AKT1,3- (12,7 %) und AKT1,2-Doppel-Knockdown (26,1 %) drastisch gesunken.

Zudem ist die Phosphorylierung von AKT2 (S474) im AKT1,3 Doppel-Knockdown (167,4 %), im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %), ebenfalls angestiegen. Demgegenüber ist, im Vergleich zur scr-Kontrolle (100 %), die Phosphorylierung von AKT2 (S474) im AKT2,3- (4,7 %) und AKT1,2-Doppel-Knockdown (1,3 %) deutlich vermindert.

Die Phosphorylierung von pan-AKT (S473) zeigt bei allen drei Doppel-Knockdown-Zellen eine deutliche Zunahme im Vergleich zu der scr-Kontrolle (scr: 100 %; AKT2,3: 151 %; AKT1,3: 127,4 %; AKT1,2: 133,2 %). Im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %) ist die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9) ebenfalls deutlich bei allen drei Doppel-Knockdown-Zellen, besonders aber bei den AKT2,3- und AKT1,2-Zellen, gesteigert (AKT2,3: 151,3 %; AKT1,3: 133,5 %; AKT1,2: 263 %). Im Vergleich zu der scr-Kontrolle (100 %) ist die Phosphorylierung von S6 (S240/244) merklich bei allen drei Doppel-Knockdown-Zellen, vor allem aber bei den AKT1,3-Zellen, erhöht (AKT2,3: 177 %; AKT1,3: 270 %; AKT1,2: 195 %). Außerdem wurde ein Alamar Blue-Zellviabilitäts-Assays (Abbildung 65B) durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Sem-Zellen jeweils ausgesät und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Zellviabilität, im Vergleich zu den Kontrollzellen (100 %), in allen Fällen reduziert. Der AKT1,3-Knockdown zeigt mit 71,2 % die geringste Viabilität. Danach folgen der AKT1,2-Knockdown mit 85,2 % und der AKT2,3-Knockdown mit 87,3 %. Die genauere Analyse des Wachstumsverhalten nach isoformspezifischen Knockdown der drei AKT-Isoformen zeigt somit, dass insbesondere die Isoformen AKT1 und AKT2 für das Wachstum der ALL-Zellen verantwortlich zeichnen.

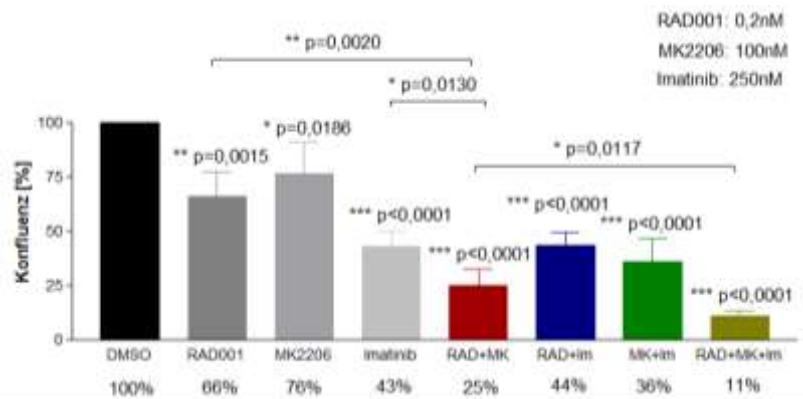
#### **4.9 Untersuchung einer kombinierten Therapie der ALL mit Hemmstoffen gegen den AKT-mTOR-Signalweg und BCR-ABL**

Obwohl die Therapie der ALL in den letzten Jahrzehnten vor allem durch Optimierung der Kombinationstherapie verbessert werden konnte und die Heilungschancen heute bei über 80 % liegen, ist die Prognose für einen signifikanten Anteil der Patienten immer noch ausgesprochen negativ. In der Vergangenheit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Hemmstoffen, welche gegen verschiedene Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs gerichtet waren, sich wenig effizient zeigte und stattdessen jedoch häufig zu einer Resistenz führte [Fransecky et al., 2015]. Aufgrund der erhöhten Phosphorylierung von AKT und S6 in der BCR-ABL-positiven B-ALL-Zelllinie SupB-15 wurden die spezifischen Hemmstoffe gegen die aktivierten Proteine AKT (MK2206) und mTOR (RAD001) in Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (BCR-ABL) verwendet, um einen vielversprechenden kombinatorischen Therapie-Ansatz zur Behandlung der ALL zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurde zunächst für die einzelnen Hemmstoffe die Konzentration bestimmt, welche einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der zu untersuchenden SupB-15-Zellen zeigt. Hierzu wurde zum einen die Konzentration bestimmt, bei welcher ein signifikanter Wachstumsnachteil erreicht wird und zum anderen, bei welcher eine maximale Hemmung zu beobachten ist. Es wurde hierfür ein Alamar Blue-Zellviabilitäts-Assays durchgeführt (nicht dargestellt). Die SupB-15-Zellen wurden jeweils mit steigender Konzentration der einzelnen

Hemmstoffe behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Für den Hemmstoff RAD001 wurden die Konzentrationen 0,4 nM, 1,6 nM, 6,3 nM, 25 nM und 100 nM gewählt. Für den Hemmstoff MK2206 wurden die Konzentrationen 3,9 nM, 15,6 nM, 62,5 nM, 250 nM und 1000 nM gewählt. Für den Hemmstoff Imatinib wurden die Konzentrationen 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM und 1000 nM gewählt. Anschließend wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass, im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen, bei 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib die Viabilität der Zellen jeweils signifikant verringert ist. Bei 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206 und 500 nM Imatinib wird eine maximale Hemmung der Zellviabilität beobachtet.

Die zuvor bestimmten Konzentrationen von 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib wurden für eine Kombinationstherapie verwendet. Die Zellen wurden entsprechend mit den einzelnen Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen behandelt. Das Wachstum der Zellen wurde drei Tage nach dem Aussäen der Zellen mittels *Live-Cell-Imaging* (IncuCyte Zoom) analysiert (Abbildung 66).



**Abbildung 66: *Live-Cell-Imaging*-Analyse des Wachstumsverhaltens von B-ALL-Zellen nach Behandlung mittels eines kombinatorischen Therapieansatzes.** Zur Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes für die Behandlung von ALL-Zellen wurden BCR-ABL-positive SupB-15-Zellen *in vitro* mit verschiedenen Kombinationen der Hemmstoffe RAD001, MK2206 und Imatinib behandelt. Hierzu wurden SupB-15-Zellen mit DMSO, 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206, 250 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelt und das Wachstumsverhalten dieser Zellen mittels *Live-Cell-Imaging* untersucht. Die Zellen wurden jeweils in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sieben Tage verfolgt. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die DMSO-behandelten Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

Das Ergebnis der Messung zeigt, dass die Zellkonfluenz nach 72 Stunden sowohl nach Behandlung der Zellen mit den einzelnen Hemmstoffen als auch nach Behandlung der Zellen mit den Hemmstoffkombinationen, im Vergleich zu der DMSO-Behandlung (100%), signifikant gesenkt wird (RAD001: 66 %; MK2206: 76 %; Imatinib: 43 %; RAD+MK: 25 %; RAD+Im: 44 %; MK+Im: 36 %; RAD+MK+Im: 11 %). Die Hemmstoffkombinationen zeigen dabei prinzipiell signifikant stärkere Effekte als die einzelnen Hemmstoffe allein. Der stärkste Effekt zeigt sich bei der Kombination von RAD001, MK2206 und Imatinib. Der schwächste Effekt zeigt sich hingegen bei der MK2206-Behandlung allein. Zudem ist der Hemmeffekt durch die Kombination mit drei Hemmstoffen signifikant stärker als mit einer Kombinationstherapie bestehend aus zwei Hemmstoffen. Zum Vergleich wurde parallel eine Behandlung der Zellen mit den einzelnen Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen mit den

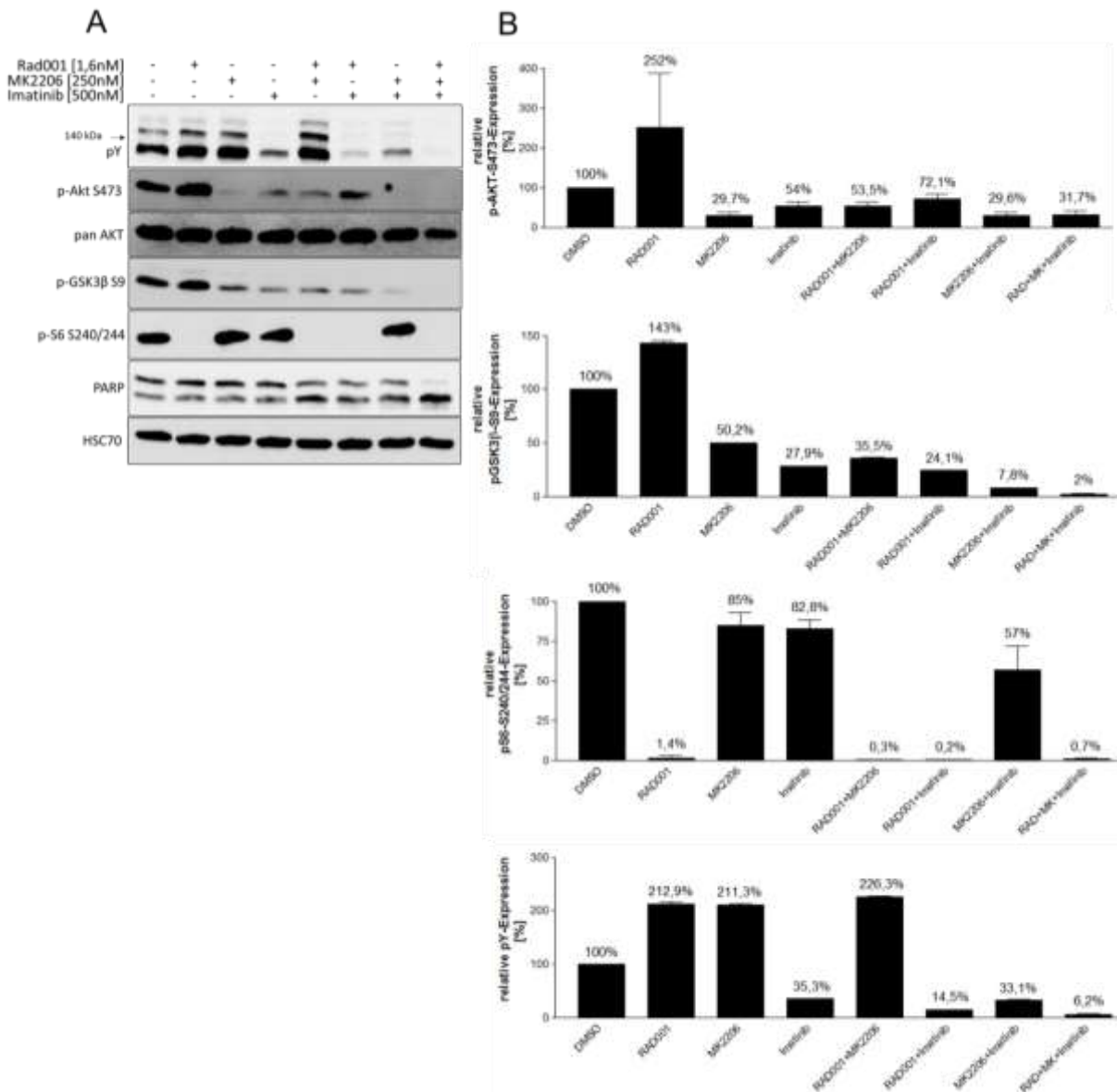
höheren Inhibitor-Konzentrationen von 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206 und 500 nM Imatinib durchgeführt. Das Wachstum der Zellen wurde über sieben Tage mittels *Live-Cell-Imaging* (IncuCyte Zoom) analysiert (Abbildung S19). Interessanterweise kann sieben Tage nach der Behandlung der Zellen mit den einzelnen Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen (DMSO: 100 %; RAD001: 37 %; MK2206: 38 %; Imatinib: 39 %; RAD+MK: 7 %; RAD+Im: 11 %; MK+Im: 16 %; RAD+MK+Im: 6 %), mit Ausnahme der Einzelbehandlung der Zellen mit RAD001, bei allen Ansätzen eine Abnahme der Zellkonfluenz, im Vergleich zu der Behandlung nach zwei Tagen (DMSO: 100 %; RAD001: 32 %; MK2206: 50 %; Imatinib: 71 %; RAD+MK: 28 %; RAD+Im: 36 %; MK+Im: 52 %; RAD+MK+Im: 27 %), beobachtet werden. Die RAD001-behandelten Zellen zeigen tendenziell einen Anstieg der Zellkonfluenz im Vergleich zu der Messung am Tag zwei. Die Behandlung der Zellen mit einer Kombinationstherapie bestehend aus zwei Hemmstoffen zeigt einen signifikant stärkeren Hemmeffekt als die einzelnen Hemmstoffe allein. Die stärksten Effekte können bei dieser Messreihe mit der Hemmstoffkombination bestehend aus RAD001 und MK2206 sowie RAD001, MK2206 und Imatinib erzielt werden. Der Hemmeffekt zwischen diesen beiden Gruppen ist bei höheren Konzentrationen der Hemmstoffe nicht mehr signifikant. Der Hemmeffekt durch die Kombination mit allen drei Hemmstoffen ist jedoch signifikant stärker als mit einer Kombinationstherapie bestehend aus MK2206+Imatinib und RAD001+Imatinib.

Die Analyse der unterschiedlichen Zeitpunkte und Wirkstoffkonzentrationen macht deutlich, dass MK2206 und insbesondere RAD001 allein nicht effizient wirken. Die Kombination, insbesondere von MK2206 mit RAD001 oder mit Imatinib, führt demgegenüber zu einer signifikanten Steigerung des Hemmeffekts. Des Weiteren kann die Kombination der Wirkstoffe bestehend aus RAD001, MK2206 und Imatinib zu einer weiteren signifikanten Steigerung des Hemmeffekts führen. Interessanterweise ist zu beobachten, dass mit steigender Konzentration, insbesondere des Wirkstoffs RAD001, aber auch MK2206, die Hemmeffekte zum Teil geringer ausfallen.

Um zu klären, ob diesen Effekten ein Feedback-Mechanismus des PI3K/AKT-Signalwegs zu Grunde liegt, wurde im anschließenden Schritt die Signaltransduktion der Zelle nach Hemmstoff-Behandlung untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit den einzelnen Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen für 48 Stunden behandelt. Die Zellen wurden sowohl mit den Inhibitor-Konzentrationen von 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206 und 500 nM Imatinib (Abbildung 67) als auch mit den mildereren Konzentrationen von 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib behandelt (Abbildung S20).

Anschließend wurden die Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt und mittels Western Blot analysiert. Die Studie zeigt, dass insbesondere die Kombination der Hemmstoffe RAD001, MK2206 und Imatinib die Apoptose der Zelle, durch Spaltung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) als Apoptose-Marker, effizient induziert (Abbildung 67). Die gesteigerte Apoptose wird dargestellt durch die Zunahme der 89 kDa großen C-terminalen katalytischen PARP-Domäne und der Abnahme der 116 kDa großen PARP-Volllängenform. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass durch die Behandlung der Zellen mit Imatinib (Imatinib: 35 %) oder in Kombination mit Imatinib (RAD001+Imatinib: 15 %; MK2206+Imatinib: 33 %; RAD+MK+Imatinib: 6 %) die relative Tyrosinphosphorylierung, im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %), vermindert wird. Im Vergleich zu der DMSO-Behandlung (100 %) führt die Behandlung der Zellen mit den Hemmstoffen RAD001 (RAD001: 213 %),

MK2206 (MK2206: 211 %) oder der Kombination aus beiden Hemmstoffen (RAD001+MK2206: 226 %) zu einer starken Zunahme der relativen Tyrosinphosphorylierung. Weiterhin bestätigen die Daten, welche mit den milderen Inhibitor-Konzentrationen von 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib erstellt wurden, dass die relative Zunahme der Tyrosinphosphorylierung durch RAD001 und MK2206 konzentrationsbedingt ist und sich entsprechend mit höherer Konzentration der Inhibitoren steigern lässt.



**Abbildung 67: Untersuchung des Einflusses einer kombinatorischen Therapie zur Behandlung der ALL auf die Signaltransduktion von ALL-Zellen.** Zur Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes für die Behandlung von ALL-Zellen *in vitro* wurde der AKT-Signaltransduktionsweg in BCR-ABL-positiven SupB-15-Zellen tiefgehend analysiert. Hierzu wurden SupB-15-Zellen mit verschiedenen Kombinationen der Hemmstoffe RAD001, MK2206 und Imatinib behandelt. Die Zellen wurden mit DMSO, 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206, 500 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelt (A). Die Zellen wurden jeweils für 48 Stunden mit den Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. (B) zeigt die Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression, der relativen p-GSK3β-S9-Expression, der relativen p-S6-S240/244-Expression und der relativen Phosphotyrosin-Expression (pY) für die mit DMSO, 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206, 500 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelten Zellen.

Im Vergleich zu der DMSO-Behandlung (100 %) zeigen MK2206- (MK2206: 30 %) und Imatinib- (Imatinib: 54 %) behandelte Zellen eine geringere Phosphorylierung von AKT (S473). Auch die Hemmstoff-Kombination von MK2206 und Imatinib (MK2206+Imatinib: 30 %) führt zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von AKT (S473) im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (100 %). Demgegenüber führt die Behandlung der Zellen mit RAD001 (RAD001: 252 %) zu einem starken Anstieg der Phosphorylierung von AKT (S473) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %). Weiterhin führt RAD001 auch in den Hemmstoff-Kombinationen zu einem (RAD001+MK2206: 54 %; RAD001+Imatinib: 72 %; RAD+MK+Imatinib: 32 %) Anstieg der Phosphorylierung von AKT (S473) im Vergleich zu den entsprechenden MK2206- oder Imatinib-behandelten Zellen. Darüber hinaus bestätigen die Daten, welche mit den milderen Inhibitor-Konzentrationen von 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib erstellt wurden, dass sich die Hemmeffekte, welche durch die Behandlung von MK2206 und Imatinib erfolgen, konzentrationsabhängig steuern lassen.

Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %) zeigen die MK2206- (MK2206: 50 %) und vor allem die Imatinib-behandelten Zellen (Imatinib: 28 %) eine geringere Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9). Demgegenüber führt die Behandlung der Zellen mit RAD001 (RAD001: 143 %) zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %). In Kombination mit den anderen Hemmstoffen führt die Behandlung der Zellen mit RAD001 (RAD001+MK2206: 36 %; RAD001+Imatinib: 24 %; RAD+MK+Imatinib: 2 %), im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100%), jedoch zu einer weiteren Verminderung der Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9). Im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %) zeigen die RAD001-behandelten Zellen (RAD001: 1,4 %) eine überaus starke Verminderung der Phosphorylierung von S6 (S240/244). Auch die Hemmstoffkombinationen mit RAD001 (RAD001+MK2206: 0,3 %; RAD001+Imatinib: 0,2 %; RAD+MK+Imatinib: 0,7 %) führen zu einer deutlich verminderten Phosphorylierung von S6 (S240/244) im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle (100 %).

Demgegenüber führt die Behandlung der Zellen mit MK2206 oder Imatinib (Imatinib: 83 %) lediglich zu einer geringen Verminderung der Phosphorylierung von S6 (S240/244) im Vergleich zu den DMSO-behandelten Zellen (100 %). Die Kombination aus MK2206 und Imatinib führt, im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle, zu einer relativen Phosphorylierung von S6 (S240/244) auf 57 %. Darüber hinaus bestätigen die Daten, welche mit den milderen Inhibitor-Konzentrationen von 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206 und 250 nM Imatinib generiert wurden, dass RAD001 der einzige verwendete Hemmstoff ist, der die Phosphorylierung von S6 effektiv reduzieren kann. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Jedoch zeigt sich auch, dass RAD001 in Kombination mit MK2206 oder Imatinib noch effektiver die Phosphorylierung von S6 hemmen kann.

Die pharmakologische Intervention des konstitutiv aktivierten PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs mittels eines kombinierten Therapieansatzes mit Hemmstoffen, die gegen AKT, mTOR und die aberrant aktivierte Tyrosinkinase BCR-ABL gerichtet sind, zeigt *in vitro* in SupB-15 B-ALL-Zellen, insbesondere im Vergleich zu den Monotherapien, zusammenfassend eine hochsignifikante Hemmung des Wachstums dieser Zellen.

## 5 Diskussion

Trotz der Erfolge, die in den letzten Jahren bei der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) des Kindesalters erzielt werden konnten, ist mit der ALL vor allem bei Patienten einer Hochrisikogruppe immer noch eine schlechte Prognose verbunden. So kommt es auch weiterhin zu Rückfällen und Todesfällen der Patienten. Zudem kommt es durch die Auswirkungen der aggressiven Chemotherapie bei den überlebenden Patienten, neben den gravierenden Therapie-begleitenden Nebenwirkungen, vielfach zum Auftreten von sekundären Tumoren und damit zu erheblichen Einschränkungen in der Qualität und der Dauer des Lebens. Unter den überlebenden Patienten liegt die kumulative Inzidenz chronischer Erkrankungen 30 Jahre nach der Diagnosestellung zudem bei 73,4 % [Oeffinger et al., 2006]. Molekular gezielte Therapiestrategien gegen fehlregulierte Proteine in zentralen Schaltstellen von Signalwegen der Zelle erscheinen daher als wichtige Ansatzpunkte für die Etablierung von neuen Therapie-Ansätzen.

AKT spielt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion und wird von PTEN und SHIP1 in hämatopoetischen Zellen negativ reguliert. Einschließlich der ALL wird AKT bei vielen Krebsarten, trotz verschiedener Regulationsstufen, aberrant aktiviert. So wird eine konstitutive Aktivierung von AKT bei 87 % (21/24) von Patienten mit einer T-ALL sowie bei 100 % (21/21) von Patienten mit einer B-ALL beobachtet [Silva et.al, 2008, Gomes et al., 2014]. Mutationen des INPP5D-Gens (SHIP1) in hämatopoetischen Zellen (11 Mutationen bei 4269 untersuchten Proben; 0,26 % der Fälle) sind relativ selten [Forbes et al., 2008, COSMIC Stand: 27.08.19]. In der COSMIC-Datenbank können darüber hinaus keine Mutationen des INPP5D-Gens bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie identifiziert werden. Es werden in der Literatur jedoch zwei ALL-Patienten mit einem SHIP1/ABL1-Fusionsprotein beschrieben [Kakadia et al., 2011; Poukka et al., 2018]. Durch die Translokation wird der 5'-Anteil des *INPP5D*-Gens (Exon 1-9; inklusive SH2-Domäne) mit dem 3'-Teil des *ABL1*-Gens (ab Exon2) verknüpft. Dadurch kann das Fusionsprotein sowohl als aktivierte Tyrosinkinase wirken als auch die normale SHIP1-Funktion in dominant-negativer Weise beeinflussen [Kakadia et al., 2011].

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und dem Krankheitsverlauf vieler Krebsarten. In den verschiedenen Tumorentitäten ist der PI3K/AKT-Signalweg häufiger durch genetische Veränderungen betroffen als jeder andere Signalweg der Zelle [Hennessy et al., 2005; Fransecky et al., 2015]. Dabei werden, neben dem Verlust von PTEN, Mutationen in der katalytischen p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K, bei AKT und bei Rezeptor-Tyrosinkinasen innerhalb dieses Signalwegs beschrieben [Liu et al., 2009]. Deshalb zielen zahlreiche klinische Studien auf die Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs ab. In der Konsequenz werden PI3K/AKT/mTOR-gerichtete Therapien bei vielen Krebsarten (z. B. Nierenzellkarzinom [Hudes et al., 2007]) gefördert. Bei der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters werden jedoch vergleichsweise wenige klinische Studien zur Hemmung dieses Signalwegs durchgeführt. So finden sich auch in der Datenbank ClinicalTrials.gov über hundert Einträge für klinische Studien mit PI3K/AKT/mTOR-Hemmstoffen beim Nierenzellkarzinom oder Brustkrebs. Jedoch finden sich gerade einmal 14 Einträge für die entsprechende Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters [<https://clinicaltrials.gov/>; Stand 30.09.19]. Der überwiegende Teil dieser

Arbeiten hat seinen Studienschwerpunkt dabei jedoch auf die Host-versus-Graft-Krankheit bei der Transplantation der ALL gelegt. Darüber hinaus wurden in der EU von 2000 bis 2016 insgesamt nur zwei Medikamente speziell für die Behandlung von Krebs bei Kindern zugelassen [Vassal et al., 2017]. Ein wichtiger Grund hierfür ist unter anderem, dass, im Gegensatz zu anderen Krebsarten, die Hauptkomponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs insbesondere bei der B-ALL eine geringere Häufigkeit von Mutationen zeigen [Fransecky et al., 2015]. Vielmehr stellen genetische Veränderungen in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und aberrant aktivierte Tyrosinkinasen eine der Hauptursachen einer konstitutiven Aktivierung von PI3K, AKT und mTOR dar [Fransecky et al., 2015]. Viele Medikamente, die gegen mutierte RTKs gerichtet sind, zeigen klinische Wirksamkeit. Oftmals ist die Verwendung dieser Arzneimittel jedoch durch Resistenzen begrenzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss und die Relevanz des AKT-Signalwegs, insbesondere des Tumorsuppressors SHIP1, auf die Leukämogenese der ALL des Kindesalters genauer analysiert. Abbildung 68 gibt einen Überblick über die wichtigsten Punkte, die im Rahmen dieser Arbeit herausgearbeitet wurden.



**Abbildung 68: Darstellung der Relevanz des AKT-Signalwegs und des Tumorsuppressors SHIP1 auf die Entstehung und die Progression der ALL des Kindesalters.** Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Untersuchungen durchgeführt, die sich mit dem Einfluss und der Relevanz des AKT-Signalwegs, insbesondere des Tumorsuppressors SHIP1, auf die Leukämogenese der ALL des Kindesalters auseinandergesetzt haben. Um einen Überblick über die folgenden Abschnitte (siehe Klammer) zu geben, wurden diese Punkte grafisch zusammengefasst.

## 5.1 SHIP1 wird in der T-ALL auf transkriptioneller und translationaler Ebene verstärkt negativ reguliert

In der vorliegenden Arbeit kann SHIP1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in B- und T-ALL-Zellen nachgewiesen werden. Generell kann in primären T-ALL-Patientenproben eine schwächere mRNA-Expression von SHIP1 im Vergleich zu gesunden CD3-positiven T-Zellen beobachtet werden (Kapitel 4.1). In Zusammenhang mit dem häufigen funktionellen Verlust von PTEN durch Mutationen [Girardi et al., 2017; Jotta et al., 2010] oder über post-transkriptionelle und post-translationale Mechanismen [Diccianni et al., 2009; Silva et al.,



2008; Correia et al., 2014] kann eine gesteigerte AKT-Aktivität beobachtet werden [Gomes et al., 2014]. So kann festgestellt werden, dass die Casein Kinase 2, deren Aktivität in der B-ALL häufig gesteigert vorliegt, PTEN durch Phosphorylierung inhibiert [Gomes et al., 2014; Arevalo und Rodriguez-Tebar, 2006]. Für die T-ALL kann gezeigt werden, dass die beiden Notch1-Ziel-Gene HES1 und MYC die PTEN-Expression negativ regulieren [Palomero et al., 2007]. Zudem ist PTEN eines der häufigsten mutierten Tumorsuppressor-Proteine in menschlichen Krebserkrankungen [Carracedo et al., 2011]. PTEN kann nur in einem Drittel der analysierten ALL-Zelllinien und in zwei Dritteln der analysierten primären T- und B-ALL-Zellen nachgewiesen werden [Diccianni et al., 2009]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die genetische Ablation von PTEN in B-ALL-Zellen einen schnellen Zelltod induziert, während die PTEN-Deletion in hämatopoetischen Stammzellen der Maus zu der Entwicklung einer T-ALL führt [Shojaee et al., 2016; Guo et al., 2008]. In Verbindung mit diesen Ergebnissen kann in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die gleichzeitige Deletion von SHIP1 und PTEN zur Entstehung von letalen B-Zell-Lymphomen führt [Miletic et al., 2010]. Demgegenüber führt die Deletion von PTEN oder SHIP1 allein im Tiermodell zu keiner Malignität [Miletic et al., 2010]. PTEN und SHIP1 wirken offensichtlich kooperativ, um ein B-Zell-Lymphom zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu kann gezeigt werden, dass SHIP1 allein in einem Xenograft-Transplantationsmodell der akuten myeloischen Leukämie zu einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse im Vergleich zu der Kontrollkohorte führt [Täger et al., 2017].

Die Jurkat T-ALL-Zelllinie exprimiert gemäß Literatur auf Proteinebene kein SHIP1 und kein PTEN [Lo et al., 2009]. SHIP1 weist in der Zelllinie Jurkat auf beiden Allelen inaktivierende Mutationen auf. So enthält ein Allel eine Nonsense-Mutation in Codon 345. Das andere Allel weist eine Deletion der ersten 47 Basenpaare von Exon 12 auf. Diese Deletion führt in der Folge zu einer Leserasterverschiebung und zu einem vorzeitigen Stopp [Lo et al., 2009]. Primäre T-ALL-Zellen weisen ebenfalls häufig SHIP1-inaktivierende Mutationen auf [Lo et al., 2009]. Ergänzend kann bei den untersuchten primären T-ALL-Proben kein Volllängen-SHIP1 nachgewiesen werden [Diccianni et al., 2009].

Interessanterweise kann in dieser Arbeit SHIP1 auf Proteinebene bei 145 kDa in der Jurkat-Zelllinie schwach-exprimierend detektiert werden (Abbildung S21A). Auch in der primären Xenotransplantationsprobe ALL 113 kann eine schwache SHIP1-Expression bei 145 kDa identifiziert werden (Abbildung 18). Des Weiteren kann Professor Dr. Jücker (nicht veröffentlicht) auf Proteinebene in 6 von 6 weiteren primären T-ALL Patientenproben eine SHIP1-Expression bei 145 kDa detektieren. Diese SHIP1-Expression ist in vier Fällen ebenfalls nur sehr schwach detektierbar. Allen diesen Ergebnissen gemeinsam ist, dass vielfach eine schwache SHIP1-Expression in T-ALL-Zellen identifiziert werden kann. Dazu passt zudem auch, dass die COSMIC-Datenbank lediglich eine stille Mutation K420K für SHIP1 in der Jurkat-Zelllinie führt [Forbes et al., 2008]. Jedoch ist bekannt, dass eine Reihe verschiedener Jurkat Derivate in der Literatur beschrieben werden (siehe *American Type Culture Collection*; ATCC). Die in dieser Arbeit verwendeten Jurkat-Zellen müssen somit mindestens ein SHIP1-Allel ohne eine Nonsense-Mutation besitzen, da eine endogene SHIP1-Expression des Volllängen-Proteins hier nachgewiesen werden kann. Interessant ist vor allem, dass SHIP1 in den Jurkat-Zellen dramatisch schwach-exprimiert wird. Vergleichbar ist die schwache Expression von SHIP1 in Jurkat-Zellen mit der Expression von SHIP1 in der CML-Zelllinie K562. Für die Zelllinie K562 kann keine SHIP1-Mutationen identifiziert werden [Lo et al.,

2009]. Vielmehr kann die schwache SHIP1-Expression auf die Anwesenheit des BCR-ABL Fusionsproteins in K562-Zellen zurückgeführt werden [Sattler et al., 1999]. Interessanterweise können auch in der T-ALL-Zelllinie Jurkat, mittels eines zweistufigen RT-PCR-Verfahrens, BCR-ABL-Fusions-Transkripte nachgewiesen werden [Bose et al., 1998].

Die Untersuchung der transkriptionellen und translationalen Regulation von SHIP1 nach Rekonstitution von SHIP1 mittels lentiviraler Transduktion in der Jurkat-Zelllinie zeigt, dass SHIP1 auf Proteinebene relativ schnell abgebaut wird (Kapitel 4.2). Demgegenüber ist die SHIP1-Expression auf mRNA-Ebene stabil. Ähnliche Effekte können von mir nach lentiviraler Transduktion von SHIP1 in der AML-Zelllinie UKE1, welche durch die Expression der konstitutiv aktivierten Tyrosinkinase JAK2-V617F gekennzeichnet ist [Quentmeier et al., 2006], beobachtet werden [Täger et al., 2017]. Demgegenüber kann in den Zelllinien H1299 und Reh sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene keine signifikante Reduktion der SHIP1-Expression festgestellt werden (nicht dargestellt).

Die Ergebnisse in der Jurkat-Zelllinie zeigen dennoch, dass eine schwache SHIP1-Expression ausreichend ist, um die Phosphorylierung von AKT (S473) im Vergleich zu der AKT-Phosphorylierung der Kontrollvektor-exprimierenden Zellen deutlich zu reduzieren (~ 60 %) (Abbildung 21). Die Reduzierung der Phosphorylierung von AKT ist zudem mit einem verringerten Wachstum der SHIP1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen verbunden. Aufgrund dieses Wachstumsnachteils werden die SHIP1-exprimierenden Zellen in der Folge von den SHIP1-negativen Zellen überwachsen (Abbildung 20). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Ergebnisse von Dr. Stefan Horn. Dieser kann zeigen, dass SHIP1 eine Rolle in der Proliferationshemmung von Jurkat-Zellen, über einen längeren Verbleib in der G1-Phase des Zellzyklus, zukommt [Horn et al., 2004]. Die Expression von SHIP1 führt dabei zu einer reduzierten Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins Rb und einer gesteigerten Stabilität des Zellzyklus-Inhibitors p27Kip1 [Horn et al., 2004].

Die Frequenz der T-ALL-Zellen mit schwach-exprimierten SHIP1-Protein ist sehr hoch. Somit könnte vermutlich eine generelle Ursache für diesen Effekt zu Grunde liegen. In der Literatur sind eine Reihe von deregulierten Genen mit aktivierenden Mutationen für die T-ALL beschrieben. Mit einer Frequenz von 50 % finden sich Notch1-Mutationen in der pädiatrischen T-ALL [Girardi et al., 2017]. Zudem zeigen 14 % der Fälle der T-ALL eine inaktivierende Mutation von FBXW7, 61 % der Fälle zeigen eine Mutation von CDKN2A und 58 % der Fälle zeigen eine Mutation von CDKN2B [Girardi et al., 2017]. Weiterhin zeigen 30 % der Fälle der T-ALL eine Veränderung (Translokation/Mutation) des TAL1-Gens [Girardi et al., 2017]. Zudem wird eine Assoziation von Notch1-Mutationen mit einer Fli-1-Überexpression beschrieben [Smeets et al., 2013]. Der Transkriptionsfaktor Fli-1 unterdrückt die Transkription von SHIP1 [Lakhanpal et al., 2010]. Die konstitutive Aktivierung der T-ALL-Onkogene Notch1 und TAL1 durch Mutation oder Translokation führt in vielen Fällen zu einer starken Fehlregulation der Expression von verschiedenen Mikro-RNAs [Li et al., 2011; Mansour et al., 2013]. Viele dieser onkogenen miRNAs führen zu einer Herunterregulation der Expression von wichtigen Tumorsuppressor-Genen. So kann gezeigt werden, dass die miRNAs miR-19b, miR-20a, miR-26a, miR-92 und miR-223 gemeinschaftlich die Expression von Ikaros, PTEN und FBXW7 herunterregulieren [Mavrakis et al., 2011]. Zudem wird durch Notch1 der NF-KB-Signalweg in der T-ALL aktiviert [Espinosa et al., 2010]. NF-KB kann in der Folge die Transkription von miR-155 steigern und damit die Expression der SHIP1-mRNA reprimieren [Gerloff et al., 2015; Rai et al., 2008].

Für die Jurkat-Zelllinie kann zudem gezeigt werden, dass aufgrund einer ITD-Insertionsmutation von 47 Basenpaaren in Exon 28, es entsprechend zu einer 17 Aminosäuren längeren extrazellulären Juxtamembran-Region des Notch1-Rezeptors kommt [Sulis et al., 2008]. Damit verbunden ist ein hohes Expressions-Niveau des ICN1-Proteins, eine Aktivierung der Src-Kinase-Familie und des AKT-Signalwegs [Boomer und Green, 2010; Sade et al., 2004]. Im Vergleich zu der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie in der Zelllinie K562 ist die Phosphorylierung in der Jurkat-Zelllinie wesentlich stärker (Abbildung S21B). Dies ist vor allem deshalb erstaunlich, da die Src-Kinase-Familie in der Zelllinie K562 unter dem Einfluss der konstitutiven Aktivierung des BCR-ABL-Fusionsproteins steht und deutlich erhöht vorliegt [Jia et al., 2009]. Die in dieser Arbeit durchgeführte pharmakologische Intervention durch Hemmung der Src-Kinase-Familie führt zu einer Erhöhung der SHIP1-Expression (Abbildung S21A). Dies lässt, zumindest in Teilen, auf einen aktiven Abbau des SHIP1-Proteins durch Tyrosinkinasen in der Jurkat-Zelllinie schließen. Für den Abbau von SHIP1 in der T-ALL können somit verschiedene Ursachen (Transkriptionsfaktoren, Mikro-RNAs, Kinasen) auf unterschiedlichen Regulationsebenen (transkriptionell oder translational) eine Rolle spielen. Zusätzlich könnte die Genexpression von SHIP1/INPP5D epigenetisch durch DNA-Methylierung oder Histon-Deacetylierung gehemmt sein. So könnte der Promotor einer DNA-Methylierung von CpG-Dinukleotiden unterliegen, wodurch die Affinität zu Transkriptionsfaktoren herabgesetzt wird und die Genexpression herunterreguliert werden könnte. Insbesondere bei der malignen Transformation von Zellen werden die CpG-Inseln von Genpromotoren häufig hypermethyliert und so Tumorsuppressorgene stummgeschaltet [Jones und Baylin, 2002; Mummery et al., 2011]. Somit könnte es sich auch um mehrere, sich addierende Effekte handeln, die die SHIP1-Expression betreffen (Abbildung S22). In der Zukunft könnte eine mögliche klinische Behandlung durch Aktivierung von SHIP1 und Inhibierung von AKT zu einer weiteren Verbesserung aktueller Behandlungsstrategien führen. Der SHIP1-Aktivator AQX-1125 könnte die katalytische Aktivität von SHIP1-exprimierenden Zellen zudem erhöhen [Stenton et al., 2013].

## **5.2 Heterogene Expression von SHIP1 in den unterschiedlichen Subtypen der B-ALL – Transkriptionelle Hochregulation von SHIP1 in Tel/AML1- und BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen**

Im Gegensatz zu der vorwiegend reduzierten Expression von SHIP1 auf mRNA-Ebene in den primären T-ALL-Zellen ist die Expression von SHIP1 auf mRNA-Ebene in den primären B-ALL-Zellen, im Vergleich zu den gesunden CD19-positiven Zellen, eher heterogen verteilt (Kapitel 4.1). Dieses Ergebnis kann durch den Datensatz von Coustan-Smith [Coustan-Smith et al., 2011] von der Krebs-Microarray-Datenbank „Oncomine“ [Rhodes et al., 2004; <https://www.oncomine.org/resource/login.html>] prinzipiell bestätigt werden (Abbildung S23). Die Expressionsanalyse des INPP5D-Gens (SHIP1) in primären B-ALL-Proben aus dem Datensatz von Haferlach [Haferlach et al., 2010], von der Krebs-Microarray-Datenbank „Oncomine“ [Rhodes et al., 2004], zeigt darüber hinaus, dass eine Hochregulation von SHIP1 auf mRNA-Ebene in der B-ALL des Kindesalters, im Vergleich zu gesunden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), zu beobachten ist (Abbildung S24A). Insbesondere lässt

sich feststellen, dass die Gruppe der B-ALL mit BCR-ABL-Fusionsprotein, im Vergleich zu der Gruppe der B-ALL ohne BCR-ABL-Fusionsprotein, eine Hochregulation von SHIP1 auf mRNA-Ebene aufweist (Abbildung S24B).

Die Beobachtungen einer gesteigerten Expression von SHIP1 in der B-ALL werden von weiteren Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bekräftigt. So ist die Expression von SHIP1 in primären B-ALL-Proben auf Proteinebene ebenfalls bei 8 von 12 (~ 67 %) untersuchten B-ALL-Patientenproben signifikant erhöht (Abbildung 17 und 62). Eine signifikant erhöhte Protein-Expression von SHIP1 kann auch bei 2 von 4 (50 %) der untersuchten B-ALL-Xenotransplantations-Zellen beobachtet werden (Abbildung 18). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Expression des Volllängen-SHIP1-Proteins in den untersuchten primären B-ALL Proben, zu einem großen Teil, erhöht ist und deuten möglicherweise auf eine funktionelle Rolle von SHIP1 für die Leukämogenese der B-ALL hin. In einer anderen Arbeitsgruppe kann demgegenüber nur in ca. 20 % der untersuchten primären B-ALL-Vorläuferzellen die Expression des Volllängen-SHIP1-Proteins beobachtet werden [Diccianni et al., 2009].

Eine Hochregulation der SHIP1-Expression kann sowohl in der Tel/AML1-positiven B-ALL-Zelllinie Reh als auch in der BCR-ABL-positiven B-ALL-Zelllinie SupB-15 beobachtet werden. In der Gruppe der B-ALL ist die Diversität der genetischen Abnormalitäten relativ groß. Zu den bekanntesten genetischen Abnormalitäten gehören unter anderem die BCR-ABL-Translokation (ca. 3 - 4 % der pädiatrischen B-ALL), verschiedene Translokationen des MLL-Gens (MLL-AF4, ca. 60 % der Säuglinge mit B-ALL; MLL-Umlagerungen insgesamt ca. 8 % des Kindesalters der B-ALL) sowie die Tel/AML1-Fusion (ca. 20 - 22 % des Kindesalters der B-ALL) [Thandla und Aplan, 1997; Pui et al., 2004; Bernt und Hunger, 2014].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen zudem, dass die Gruppe der Tel/AML1-positiven B-ALL im Vergleich zu der Gruppe der Tel/AML1-negativen B-ALL eine signifikant höhere SHIP1-mRNA-Menge aufweist (Abbildung 16B). Demnach könnte die SHIP1-Expression durch die Expression des Tel/AML1-Fusionsproteins gefördert werden. Dieses Ergebnis wird durch die Analyse der INPP5D-Expression von den Datenbanken Oncomine [Rhodes et al., 2004] und GEO [Barrett, 2013; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>] unterstützt. Die Analyse der INPP5D-Expression aus dem Datensatz von Haferlach [Haferlach et al., 2010] zeigt eine Zunahme der Expression in der Gruppe der Tel/AML1-positiven B-ALL im Vergleich zu der Gruppe der Tel/AML1-negativen B-ALL (Abbildung S25). Weiterhin zeigt die Analyse der relativen SHIP1-RNA-Expression nach Knockdown des Tel/AML1-Fusionsproteins aus dem Datensatz von Fuka [Fuka et al., 2011] eine signifikante Abnahme der INPP5D-Expression in der Gruppe der Tel/AML1-KD Reh-Zellen im Vergleich zu der Gruppe der Tel/AML1-scr Reh-Zellen (Abbildung S26).

Des Weiteren kann bei der Analyse der INPP5D-Expression aus dem Datensatz von Kohlmann [Kohlmann et al., 2008] von der Datenbank R2 [Koster et al., 2015; <https://r2.amc.nl>] beobachtet werden, dass die SHIP1-Expression auf mRNA-Ebene in der Gruppe der Tel/AML1-positiven B-ALL und in der Gruppe der BCR-ABL-positiven B-ALL, im Vergleich zu anderen Translokationen innerhalb der B-ALL und im Vergleich zu gesunden hämatopoetischen Zellen, gesteigert ist (Abbildung S27).

Eine systematische Analyse der SHIP1-Expression in den verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung (CD34+, HSC, CLP, pro-B, prä-B, CD19+) wäre zudem sinnvoll. In dem gesunden Knochenmark sind nicht nur lymphatische Vorläuferzellen, sondern auch myeloische

Vorläuferzellen zu finden. Ein genauer Vergleich zwischen den verschiedenen B-ALL-Vorläuferzellen und dem entsprechenden gesunden Gegenstück würde in der Zukunft eine genauere Analyse gewähren.

### **5.2.1 BCR-ABL-positive B-ALL- und CML-Zellen exprimieren unterschiedliche Niveaus an SHIP1**

Die zuvor analysierte gesteigerte mRNA-Expression von SHIP1 in der Gruppe der BCR-ABL-positiven B-ALL entsprach zunächst einmal nicht den Erwartungen. Für das Krankheitsbild der CML wird der Verlust des SHIP1-Proteins aufgrund der konstitutiven Aktivierung von BCR-ABL beschrieben [Sattler et al., 1999]. In der BCR-ABL-positiven CML-Zelllinie K562 kann im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nur eine sehr geringe SHIP1-Expression beobachtet werden. Die tiefergehende Untersuchung der BCR-ABL-positiven CML-Zelllinie K562 und der BCR-ABL-positiven B-ALL-Zelllinie SupB-15 zeigt interessanterweise signifikante Unterschiede in der Expression von SHIP1 zwischen beiden Zelllinien auf (Kapitel 4.3). Die in dieser Arbeit untersuchte SupB-15-Zelllinie besitzt sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene eine sehr starke SHIP1-Expression. Demgegenüber zeigt die primäre BCR-ABL-positive B-ALL-Patientenprobe auf mRNA- und auf Protein-Ebene eine geringe SHIP1-Expression im Vergleich zu gesunden Zellen (Abbildung 23). Sowohl SupB-15-Zellen als auch die Zellen der Patientenprobe exprimieren dabei jeweils das 190 kDa große BCR-ABL-Fusionsprotein. Aktuelle Untersuchungen zeigen ebenfalls eine Hochregulation von SHIP1 in der BCR-ABL-positiven B-ALL und eine kaum detektierbare Expression von SHIP1 in der BCR-ABL-positiven CML [Chen et al., 2015]. Somit können die unterschiedlichen Expressionsniveaus von SHIP1 zwischen B-ALL und CML nicht allein durch die Expression von BCR-ABL erklärt werden.

Während mehr als 95 % der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie nach der Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren ein langfristiges krankheitsfreies Überleben erreichen [Druker et al., 2006], rezidivieren Patienten mit Ph-positiver B-ALL in sehr hohem Maße innerhalb von kurzer Zeit nach der anfänglichen Remission [Druker et al., 2001].

Im Gegensatz zu der CML kann für die B-ALL gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Ikaros in ca. 80 % der BCR-ABL-positiven B-ALL-Fälle und bei ca. 29 % der BCR-ABL-negativen B-ALL-Hochrisiko-Patienten deletiert oder verändert ist und in hohem Maße in dominant-negativen Isoformen präsent ist [Mullighan et al., 2008a; Mullighan et al., 2009a]. Für die B-ALL-Zelllinie SupB-15 kann dementsprechend gezeigt werden, dass dort die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 (IK6) exprimiert wird [Mullighan et al., 2008a] und sich im Rahmen dieser Arbeit somit hervorragend als Modellsystem für dieses Krankheitsbild eignet.

Für die primäre BCR-ABL-positive Patientenprobe kann keine dominant-negative Isoform identifiziert werden (persönliche Mitteilung Dr. zur Stadt, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, UKE). Zuvor konnte gezeigt werden, dass die Transkription des SHIP1-Gens (INPP5D) durch den Transkriptionsfaktor Ikaros in DT40 B-Zellen stark reprimiert wird [Alinikula et al., 2010]. Demgegenüber zeigt die Arbeitsgruppe um Song [Song et al., 2015] jedoch, dass Ikaros die Transkription von SHIP1 in Nalm-6 B-ALL-Zellen hochreguliert.

### **5.2.2 Die Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 durch BCR-ABL und die Src-Kinase-Familie leitet den Ubiquitin-vermittelten Abbau ein**

Im Rahmen dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass SHIP1 ausgehend vom BCR-ABL-Fusionsprotein sowohl in der B-ALL als auch in der CML negativ reguliert wird. So führen Hemmstoffversuche mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Glivec) sowohl in der BCR-ABL positiven CML-Zelllinie K562 als auch in der BCR-ABL-positiven B-ALL-Zelllinie SupB-15 und primären BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen zu einer Hochregulation von SHIP1 auf mRNA- und Protein-Ebene (Kapitel 4.3). Diese Hochregulation von SHIP1 kann durch die Hemmung des BCR-ABL-vermittelten proteasomalen Abbaus von SHIP1 erklärt werden [Sattler et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit kann zudem ein Src-Kinase-Familie-vermittelter Abbau von SHIP1 identifiziert werden. So führt zum einen der Src-Kinase-Inhibitor PP2 zu einer Erhöhung der SHIP1-Protein-Expression in den Zelllinien K562 und SupB-15 (Abbildung 24). Darüber hinaus führt die shRNA-vermittelte Herunterregulation der Src-Kinase Lyn zu einer Erhöhung der SHIP1-Expression in Sem- und SupB-15-Zellen (Abbildung 27). Die spezifische Überexpression der verschiedenen Familienmitglieder der Src-Kinase-Familie führt ebenfalls zu einem Anstieg der Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 und damit verbunden zu einer Reduzierung der SHIP1-Expression (Abbildung 27 und S3). Der Tyrosin-Rest 1021 von SHIP1 wird als Phosphorylierungsstelle charakterisiert, welche eine Rolle für die Stabilität der Membranbindung über Interaktionspartner, die Initiation der proteasomalen Degradation und der Dimerisierung mit der SH2-Domäne von SHIP1 spielt [Pauls und Marshall, 2017; Ruschmann et al., 2010; Mukherjee et al., 2012].

Die Stärke der Reduzierung der SHIP1-Expression hängt dabei von der Kinase-Aktivität der Src-Kinase ab (Kapitel 3.4.3). So führt die Expression der konstitutiv aktivierten Src-Kinase Src-Y529\* zu einer stärkeren Phosphorylierung von SHIP1-Y1021 und einer stärkeren Minderung der SHIP1-Expression als der Src-Kinase-Wildtyp (Abbildung 27). Eine Kinetik des Src-Kinase-vermittelten Abbaus von SHIP1 zeigt, dass 20 Stunden nach Expression der konstitutiv aktivierten Src-Kinase Src-Y529\* die Phosphorylierung von SHIP1-Y1021 am stärksten ist und dass nach weiteren vier Stunden ein maximaler SHIP1-Abbau von ca. 60 % in diesem Modell erreicht wird (Abbildung 28). Insbesondere die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr werden nach BCR-ABL-Induktion in B-ALL-Zellen aktiviert [Hu et al., 2004]. Ebenso wird gezeigt, dass Mitglieder der Src-Kinase-Familie SHIP1 durch Phosphorylierung regulieren können und damit einen Einfluss auf den PI3K/AKT-Signalweg haben [Maxwell et al., 2004; Nunes de Miranda et al., 2016; Xiao et al., 2005; Pauls and Marshall, 2017]. Die Src-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von SHIP1 ist jedoch für die Rekrutierung an die Membran nicht erforderlich, sondern erfolgt erst nach Rekrutierung an die Membran [Giuriato et al., 2000]. Zudem ist es bekannt, dass die Aktivität von SHIP1 über die Stärke der Protein-Expression reguliert wird [Sly et al., 2003]. Neben den Mitgliedern der Src-Kinase-Familie wird SHIP1 zudem durch BCR-ABL und JAK2 phosphoryliert [Sattler et al., 1999; Ho et al., 2002].

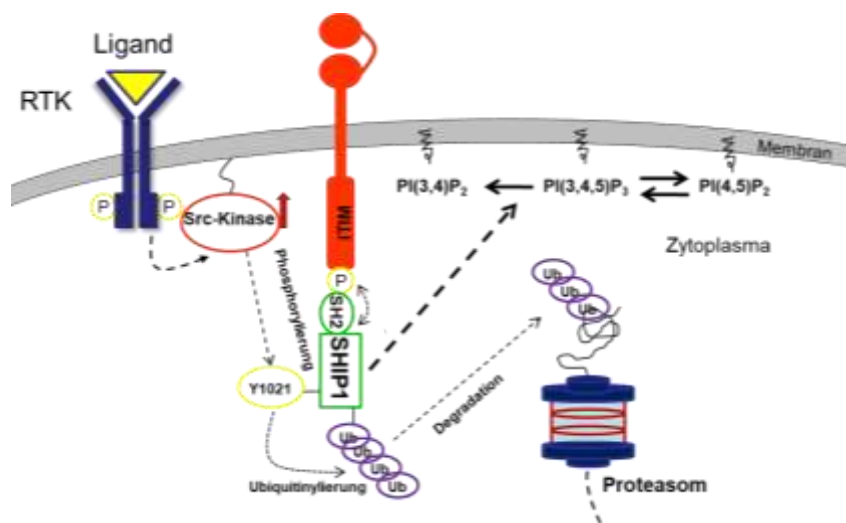
Zur Analyse des genauen Abbau-Mechanismus von SHIP1 wurde die Menge des SHIP1-Proteins in Membran- und Zytoplasma-Fraktion von SHIP1-Wildtyp und SHIP1-NPXY-Mutanten bestimmt (Abbildung 32). Im Gegensatz zum SHIP1-Wildtyp und der SHIP1-Y914A-Mutante zeigt die SHIP1-Y1021A-Mutante, bei nahezu unveränderter SHIP1-Menge in der Membran-Fraktion, eine signifikant höhere Expression in der Zytoplasma-Fraktion.

Entsprechend kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SHIP1-wt und SHIP1-Y914A, jedoch nicht SHIP1-Y1021A und SHIP1-Y914A+Y1021A, ubiquitinyliert werden. In einem ergänzenden Experiment führt die Induktion der Expression der aktivierten Src-Kinase Src-Y529\*, im Vergleich zu der Leervektorkontrolle, in stabil SHIP1-wt-exprimierenden H1299-Zellen zu einer entsprechenden Reduktion der SHIP1-Expression in der Zytoplasma-Fraktion (Abbildung 29).

Neben der Gruppe der Philadelphia-Chromosom-positiven (Ph+) ALL wird die Gruppe der MLL-AF4-positiven ALL mit der schlechtesten Prognose aller Typen der ALL eingestuft [Pui et al., 2008]. MLL-Translokationen sind dabei meist mit hohen Expressionsleveln des Flt3-Rezeptors verbunden [Stam et al., 2005]. Die verstärkte Expression des Flt3-Rezeptors induziert dabei häufig die konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors in der B-ALL [Grafone et al., 2012; Fedders et al., 2017]. Im Falle von MLL-AF4 geht vor allem von dem Flt3-Rezeptor eine konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase-Aktivität aus [Gu et al., 2011]. Sowohl bei der Flt3-ITD-positiven AML als auch bei der MLL-AF4-positiven B-ALL führt die konstitutive Aktivierung des Flt3-Rezeptors zu einer starken Überexpression der Mikro-RNA miR-155. So führt die Flt3-ITD-Mutation zu einer 8,35-fachen Hochregulation von miR-155 [Cammarata et al., 2010]. Die miR-155 bindet direkt an den 3'-UTR der SHIP1-mRNA, wodurch die Expression des SHIP1-Proteins unterdrückt wird [O'Connell et al., 2009]. Untersuchungen in transgenen Mäusen, in denen die Expression der miR-155 im späten Stadium der pro-B-Zellentwicklung induziert wird, zeigen anfangs eine präleukämische Proliferation von Prä-B-Zellen und entwickeln später eine lymphoblastische Leukämie/Lymphom [Costinean et al., 2006]. In diesen transgenen Mäusen bildet die höchste Expression von miR-155 den Ursprung der Leukämie und ist direkt mit der graduellen Herunterregulation von SHIP1 verknüpft [Costinean et al., 2009]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Hemmung des Flt3-Rezeptors der Flt3-ITD-positiven AML-Zelllinien Molm-14 und MV4-11 sowie der MLL-AF4-positiven B-ALL-Zelllinie Sem zu einer verstärkten Expression von SHIP1 führt (Kapitel 4.3.3). Aufgrund der konstitutiven Aktivierung des Flt3-Rezeptors wird infolge dessen auch die Familie der Src-Kinasen aktiviert [Robinson et al., 2005; Leischner et al., 2012]. Die Hemmung der Src-Kinase-Familie in den Zelllinien Molm-14, MV4-11 und Sem führt daher ebenfalls zur verstärkten Expression von SHIP1 (Abbildung 25). In dem hier vorgeschlagenen Modell könnte die konstitutive Aktivierung von Flt3 und Flt3-verwandten Rezeptoren die konstitutive Phosphorylierung und Aktivierung der Src-Kinase-Familie induzieren (Abbildung S28). Src-Kinasen könnten auf translationaler Ebene den SHIP1-vermittelten Abbau direkt regulieren oder über NF- $\kappa$ B oder STAT5 die Transkription von miR-155 steigern und somit die Steady-State-Konzentration der SHIP1-mRNA reduzieren [O'Connell et al., 2009; Gerloff et al., 2015].

Entsprechend den in dieser Arbeit generierten Forschungsergebnissen und den publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen kann ein Modell (Abbildung 69) postuliert werden, bei dem SHIP1 nach der Aktivierung des Rezeptors durch Bindung seiner SH2-Domäne an das zytoplasmatische Phospho-Tyrosin im ITIM-Motiv des Fc $\gamma$ -Rezeptors IIB gebunden wird [Tridandapani et al., 1997]. Nach der Rekrutierung an die Membran erfolgt die Tyrosinphosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 des NPXY-Motivs durch Membran-assoziierte Tyrosinkinasen aus der Familie der Src-Kinasen [Tridandapani et al., 1997; Liu et

al., 1997]. An der Membran gebunden hydrolysiert SHIP1 das membranständige Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat zum Phosphatidylinositol-(3,4)-bisphosphat [Carver et al., 2000]. Proteine mit PH-Domäne wie AKT und Tec-Kinasen werden nicht mehr oder nur noch vermindert an die Membran rekrutiert [Carver et al., 2000; Scharenberg et al., 1998]. Die Tyrosin-phosphorylierten NPXY-Motive können in der Folge als Andockstelle für Proteine mit PTB-Domäne, wie Shc und Dok1 [Liu et al., 1997; Sattler et al., 2001] dienen. Insbesondere für den Tyrosin-Rest 914 von SHIP1 kann eine Interaktion mit Shc nachgewiesen werden [Lioubin et al., 1996]. Die Dephosphorylierung von SHIP1 könnte durch Shp-2 erfolgen [Sattler et al., 1997; Rohrschneider et al., 2000]. Infolge der Bindung von Shc an SHIP1 wird Shc Tyrosin-phosphoryliert und konkurriert nun mit dem Rezeptor um die Bindung an die SH2-Domäne von SHIP1. Aufgrund der höheren Bindungsaffinität von SHIP1 an Shc wird SHIP1 von der Membran verdrängt. Infolge der Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 durch die Src-Kinase-Familie wird der proteasomale Abbau von SHIP1 im Zytoplasma durch Ubiquitylierung eingeleitet. Zuvor konnte gezeigt werden, dass nach Phosphorylierung von SHIP1 durch BCR-ABL, dies zu einer Polyubiquitylierung von SHIP1 und einem proteasomalen Abbau führt [Ruschmann et al., 2010]. SHIP1 blockt durch die Bindung zu Shc zudem die Interaktion von Shc und dem Grb2-Sos-Komplex, so dass die Ras-Aktivierung verhindert wird [Tridandapani et al., 1997, Liu et al., 1997].



**Abbildung 69: Modell zum Src-Kinase-vermittelten Abbau von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021.** Nach Aktivierung des Rezeptors wird SHIP1 durch Bindung seiner SH2-Domäne an das zytoplasmatische Phospho-Tyrosin im ITIM-Motiv des Rezeptors gebunden. Nach der Rekrutierung an die Membran hydrolysiert SHIP1 das membranständige PI(3,4,5)P<sub>3</sub> zum PI(3,4)P<sub>2</sub>. Zudem erfolgt die Tyrosinphosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 des NPXY-Motivs durch Membran-assoziierte Tyrosinkinasen aus der Familie der Src-Kinasen. Die Tyrosinphosphorylierten NPXY-Motive können als Andockstelle für Proteine mit PTB-Domäne dienen. Infolge der Phosphorylierung am Tyrosin-Rest 1021 wird der proteasomale Abbau von SHIP1 im Zytoplasma durch Ubiquitylierung eingeleitet.

### 5.3 SHIP1 und seine divergente Rolle in der Leukämogenese – Einordnung von SHIP1 als Phosphatase in das Modell der B-Zell-Selektion

Ein Grund für die starke SHIP1-Expression in einem Teil der B-ALL-Zellen (Kapitel 4.1/4.3/5.2) könnte darin liegen, dass maligne B-Zellen aufgrund einer starken Rückkopplung gegenüber der BZR-Signalgebung, ausgehend von einer aktiven, inhibitorischen Phosphatase,



einen Überlebensvorteil bei der B-Zell-Selektion besitzen (Kapitel 2.7). So ist es auffällig, dass inaktivierende PTEN-Mutationen bei mehr als 20 % der Patienten mit einer T-Zell-Leukämie auftreten (163 von 805 Patienten), jedoch in 925-untersuchten B-Zell-Leukämie-Proben keine Mutation oder Deletion gefunden wurde [Shojaee et al., 2016].

Diese Beobachtung trifft ebenfalls auf weitere Komponenten des PI3K/AKT-Signalwegs wie AKT1 und PI3KR1 zu. Hierzu wurden Daten aus der COSMIC-Datenbank [Forbes et al., 2008] analysiert und in Tabelle 1 zusammengefasst. Als Treiber der B-ALL können in B-ALL-Proben vor allem RAS- und Flt3-Mutationen in größerer Häufigkeit identifiziert werden. Im Zusammenspiel mit Mutationen der B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren Pax5 und IKZF1 werden diese Zellen schließlich klonal im Überleben begünstigt [Jerchel et al., 2018].

**Tabelle 1: Vergleich der Häufigkeit von Mutationen in den Hauptkomponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in T-ALL und B-ALL [entnommen von <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>].**

Gen	T-ALL SNP [%; (Fälle)]	B-ALL SNP [%; (Fälle)]
PIK3CA	1,37 (1092)	0 (170)
PIK3CB	0,26 (387)	0,91 (110)
PIK3CD	1,32 (387)	0,91 (110)
PIK3CG	0 (387)	0 (110)
PIK3R1	3,72 (780)	0,46 (216)
AKT1	1,3 (1002)	0 (234)
AKT2	0,43 (462)	0 (110)
AKT3	0 (379)	0 (110)
mTOR	1,12 (716)	0,6 (167)
PTEN	12,9 (1923)	0 (242)
INPP5D	0 (378)	0 (110)
INPP4B	0 (379)	0,91 (110)
NRAS	7,45 (1531)	10,15 (1517)
KRAS	2,15 (1486)	10,67 (1584)
FLT3	4,04 (1710)	4,73 (1585)
EBF1	0 (378)	0,91 (110)
PAX5	0,44 (688)	11,9 (1420)
IKZF1	0,31 (955)	21,85 (2050)

In dem Modell der B-Zell-Selektion durch klonale Eliminierung sind B-Zellen in starkem Maße von den Überlebens- und Proliferationssignalen abhängig, die von ihrem Antigenrezeptor (B-Zell-Rezeptor; BZR) ausgehen. Von den BZR-abhängigen Signalkaskaden nimmt der PI3K/AKT-Signalweg dabei eine hervorgehobene und zentrale Rolle ein. So zeigen BZR-defiziente B-Zellen in Kombination mit der spezifischen Aktivierung der PI3K/AKT-Signalgebung, stromabwärts des BZR, dass das Überleben der Zellen nur durch diesen einen Signalweg gerettet werden kann [Srinivasan et al., 2009].

Jüngste Studien haben die Hypothese überprüft, dass eine gezielte Hyperaktivierung der BZR-Signalgebung über einem maximalen Schwellenwert einen Deletionskontrollpunkt für die Entfernung von selbstreaktiven B-Zellen darstellt [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Dies eröffnet die Möglichkeit transformierte B-Zellen selektiv zu eliminieren. Im Falle von Autoimmunerkrankungen exprimieren B-Zellen autoreaktive BZR, welche in Kontakt mit einem Selbstantigen kommen. In der Konsequenz führt dies zu einem überaus starken und verlängerten BZR-Signal. Somit kann bei der B-Zell-Selektion nicht nur eine Abschwächung der BZR-Signalarstärke unter einen minimalen Schwellenwert (nicht

funktioneller BZR) sondern auch eine Hyperaktivierung über einen maximalen Schwellenwert (autoreaktive BZR) zur selektiven Entfernung dieser B-Zell-Klone führen [Lam et al., 1997; Kraus et al., 2004; Srinivasan et al., 2009; Nemazee und Bürki, 1989; Rajewsky et al., 1996]. Diese Beobachtungen führen zu dem Konzept, dass eine gezielte Hyperaktivierung einer oder mehrerer Komponenten des nachgeschalteten Signalwegs des B-Zell-Rezeptors das funktionelle Äquivalent der Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung (AIC-Aktivierung) eines selbstreaktiven BZR darstellt und somit eine negative Selektion dieser Zellen induziert [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015].

Für die Hyperaktivierung der Signalgebung können einige zentrale Vertreter identifiziert werden. Hierzu zählt die Hyperaktivierung von Syk, PI3K/AKT und ERK in B-ALL-Zellen mit autoreaktiven BZR oder onkogener Nachahmung [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Als inhibitorische Phosphatasen, welche als Gegenspieler der Kinasen fungieren und deren Signalgebung stromabwärts negativ regulieren, dienen PTPN6 (SHIP1), INPP5D (SHIP1), PTEN und DUSP6 [Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. Die inhibitorischen Phosphatasen spielen eine bedeutsame Rolle bei der Kalibrierung der BZR-Signalstärke und des Energieverbrauchs von Zellen mit autoreaktiven BZR oder seiner onkogenen Nachahmung. Die negative Regulation wird dabei durch inhibitorische Rezeptoren wie LAIR1, PECAM1 und CD300A initiiert, welche die inhibitorischen Phosphatasen rekrutieren [Chen et al., 2015]. Im Gegensatz zu normalen prä-B-Zellen exprimieren von B-ALL-Patienten stammende Zellen diese ITIM-tragenden Rezeptoren in hohen Konzentrationen [Chen et al., 2015].

Während das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung der BZR-Signalstärke bei normalen und transformierten B-Zellen ähnlich ist, fällt die Rückkopplung gegenüber der BZR-Signalgebung bei malignen B-Zellen, welche von einem stark transformierenden Onkogen angetrieben werden, umso stärker aus [Shojaee et al., 2015]. Als Resultat dessen könnte dieser Mechanismus eine Erklärung für die starke SHIP1-Expression in den Ph-positiven B-ALL Zellen, welche sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Untersuchungen identifiziert wurde, darstellen. Die hohen Expressionsniveaus von SHIP1 in B-ALL-Zellen führen dazu, dass der Schwellenwert für die AIC-Aktivierung angehoben wird und ermöglichen es somit Zellen mit einem autoreaktiven BZR oder seinen onkogenen Nachahmern durch Abschwächung der BZR-Signalstärke einer negativen Selektion zu entkommen [Chen et al., 2015].

Dabei führt die Inhibierung der SHIP1-Expression mit dem SHIP1-Inhibitor 3AC zu einer Hyperaktivierung der Tyrosinkinase Syk, verbunden mit einer signifikanten Reduzierung der Viabilität der ALL-Zellen und einer verlängerten Überlebenszeit behandelter NOD/SCID-Mäuse [Chen et al., 2015]. Der genaue Mechanismus der Syk-Aktivierung über SHIP1 bleibt unklar und wird über die Funktion von SHIP1 als negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalwegs vermutet [Chen et al., 2015]. Jedoch kann in der Arbeit von Matthias Schaks gezeigt werden, dass der Inhibitor 3AC auch die Zellviabilität von SHIP1-defizienten MDA-MB-231-Zellen mit einem IC50-Wert von 6  $\mu$ M inhibiert [Schaks; unveröffentlicht].

Durch die gezielte Manipulation von zentralen Kinasen innerhalb dieser onkogenen Signalweiterleitung kann das Überleben von selbstreaktiven B-ALL-Zellen somit selektiv beeinflusst werden. Insbesondere deregulierte inhibitorische Rezeptoren sind, als kritisch zu betrachten und beeinflussen diese Kinasen und die damit verbundene onkogene Signalstärke über Regulation von inhibitorischen Phosphatasen in B-ALL-, nicht jedoch in CML-, Zellen. Entsprechend scheint es sich hierbei um eine B-Zell-spezifische negative Selektion gegen eine

hyperaktive Tyrosinkinase-Signalgebung zu handeln, die nicht direkt auf die myeloide Reihe übertragen werden kann [Chen et al., 2015].

Insbesondere genetische Veränderungen von wichtigen Transkriptionsfaktoren, welche die B-Zell-spezifische Differenzierung vermitteln, könnten einen grundlegenden Einfluss auf dieses Modell haben. Im Kontrast zu den Ergebnissen von Chen et al. kann im Rahmen dieser Arbeit keine Aktivierung der Tyrosinkinase Syk nach Inhibierung der SHIP1-Expression durch einen shRNA-vermittelten Knockdown in der BCR-ABL-positiven Zelllinie SupB-15 festgestellt werden (Kapitel 4.4).

Generell kann durch den Knockdown von SHIP1 in der BCR-ABL-positiven Zelllinie SupB-15 eine Verminderung der Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Kinasen (TEC-Kinasen, Fes, Src-Kinasen) beobachtet werden (Abbildung 36 und S7), wohingegen durch den Knockdown von SHIP1 in der BCR-ABL-negativen Zelllinie Reh eine verstärkte Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Kinasen (ZAP70, Syk, Src-Kinasen, EPHA1) beobachtet wird (Abbildung 35 und 36). In beiden Zelllinien kann nach Knockdown von SHIP1 jedoch eine verstärkte Phosphorylierung von Serin/Threonin-abhängigen Kinasen (AKT, p70S6, MAPKAPK3 MSK, DCAMKL2) beobachtet werden (Abbildung 36, S5 und S6). Dies führt in der Folge zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von AKT und den AKT-abhängigen Signalproteinen GSK3 $\beta$  und S6. Entsprechend kann geschlussfolgert werden, dass SHIP1-wt als negativer Regulator des AKT-Signalwegs die Phosphorylierung und Aktivierung von AKT in ALL-Zellen negativ beeinflusst (Abbildung S29).

Eine mögliche Ursache für die konträren Verhaltensweisen zwischen den verschiedenen Zellen könnte die Expression der verschiedenen genetischen Translokationen sein, die zu ganz unterschiedlichen Genexpressionsprofilen führen können [Organista-Nava et al., 2016]. Bei dem BCR-ABL-Fusionsprotein handelt es sich um eine aberrant aktivierte Kinase. Bei dem Tel/AML1-Fusionsprotein handelt es sich demgegenüber um einen aberrant aktivierten Transkriptionsfaktor. Insbesondere der Status der Expression der Ikaros-Isoform könnte hierbei eine zusätzliche, mögliche Ursache darstellen. Die Expression der dominant-negativen Ikaros-Isoform könnte hierbei die Festlegung in die B-Zell-spezifische-Reihe möglicherweise unterwandern, den B-Zell-spezifischen Rahmen grundlegend ändern und zu einem veränderten Genexpressionsprofil führen [Iacobucci et al., 2012b]. So aktiviert Ikaros die Gene, die für die Expression des IL7-, Flt3 und B-Zell-Rezeptors verantwortlich sind [Kirstetter et al., 2002; Sellars et al., 2011]. Zudem induzieren aberrant aktivierte Tyrosinkinasen eine veränderte Differenzierung der Zelle [Hu et al., 2005; Grafone et al., 2012; Reynaud et al., 2008]. Die verstärkte onkogene Signalgebung, die vor allem von BCR-ABL induziert wird, hat in der Regel eine verstärkte RAG-Expression und eine hohe Häufigkeit von Ikaros-Deletionen zur Folge [Mullighan et al., 2008a; Dong et al., 2016]. Die verstärkte RAG-Expression führt dabei zu einer vermehrten Bildung von RAG-vermittelten Deletionsmutanten von Ikaros [Dong et al., 2016; Han et al., 2019]. Darüber hinaus aktiviert FoxO1 direkt die Transkription von RAG1/2 [Amin und Schlissel 2008]. So kann vermutet werden, dass eine hohe SHIP1-Expression eine reduzierte AKT-Aktivität zur Folge hat und damit die Transkription von RAG1/2 über FoxO1 steigert.

Im Rahmen dieser Arbeit kann zudem gezeigt werden, dass die Herunterregulation der SHIP1-Expression sowohl in der BCR-ABL-positiven SupB-15-Zelllinie als auch in der Tel/AML1-positiven Reh-Zelllinie zu einem verstärkten Wachstum und einer verstärkten Zellviabilität der B-ALL-Zellen *in vitro* führt (Kapitel 4.4). In der Reh-Zelllinie kann dabei eine relativ schwache

Zunahme des Wachstums nach SHIP1-Knockdown beobachtet werden (Abbildung 39). Das Tel/AML-Fusionsprotein aktiviert den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, so dass dieser Signalweg als therapeutisches Ziel für eine zielgerichtete Behandlung von Zellen mit dieser Translokation angesehen wird [Fuka et al., 2012]. In einem parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Tierexperiment zur Untersuchung der Auswirkung einer reduzierten SHIP1-Expression in der B-ALL des Kindesalters wurden SHIP1-Knockdown und SHIP1-exprimierende Reh-Zellen in NOD-scid-gamma-Mäuse (NSG-Mäuse) appliziert. In diesem Modell kann kein signifikanter Unterschied beim Überleben der Mäuse zwischen beiden Kohorten festgestellt werden (Abbildung 41). Interessanterweise kann jedoch für die Kohorte mit den SHIP1-Knockdown-Zellen in 7 von 9 Fällen (77,8 %) ausgeprägte Lymphknoten festgestellt werden, wohingegen für die Kohorte mit den SHIP1-exprimierenden Zellen nur in 3 von 7 Fällen (42,9 %) ausgeprägte Lymphknoten identifiziert wurden. Zudem kann für die vorhandenen Lymphknoten ein signifikant höheres Gewicht für die Kohorte mit dem SHIP1-Knockdown beobachtet werden. Demgegenüber kann ein signifikant höheres Gewicht der Leber und der Milz für die Kohorte mit den SHIP1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu der Kohorte mit dem SHIP1-Knockdown gezeigt werden. Möglicherweise könnte dieser Unterschied aus der unterschiedlichen CD45-Antigen-Dichte zwischen dem SHIP1-Knockdown- und den SHIP1-exprimierenden Zellen resultieren (Abbildung 37). So haben CD45 und auch SHIP1 einen Einfluss auf das Anwachsen von Zellen im Organismus [Shivtiel et al., 2011; Hazen et al., 2009].

Der Knockdown von SHIP1 in der SupB-15-Zelllinie führt demgegenüber zu einer verhältnismäßig starken Zunahme des Zellwachstums (Abbildung 40). Diese Ergebnisse können somit nicht die Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe um Chen bestätigen. Hier führt die Inhibierung von SHIP1 zu einer signifikanten Reduzierung der Viabilität der ALL-Zellen *in vitro* [Chen et al., 2015]. Eine mögliche Ursache hierfür könnte grundlegend die Expression der dominant-negativen Ikaros-Isoform 6 darstellen. Im vorliegenden Modell könnte die B-Zell-spezifische negative Selektion gegen Zellen mit einer hyperaktiven Tyrosinkinase-Signalgebung durch die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 untergraben werden und dazu führen, dass die Schwelle, die zur Induktion der zelleigenen Apoptose der B-Zellen befähigt, angehoben wird. So wird in der Literatur beschrieben, dass die dominant-negative Ikaros-Isoform ALL-Zellen über Manipulation des AKT/FoxO1-Signalwegs vor der Apoptose schützt [Han et al., 2017]. Reife B-Zellen mit dominant-negativen Ikaros-Isoformen exprimieren zudem höhere Mengen an Autoantikörper als Zellen mit dem Ikaros-wt [Wojcik et al., 2007]. Ikaros legt somit die Schwelle für die Aktivierung von B-Zellen über die Bildung von Antikörper fest und kann damit gegebenenfalls regulatorisch intervenieren und die Hyperproliferation von aktivierten B-Zellen so hemmen [Sellars et al., 2011].

Die Ergebnisse deuten somit zusammenfassend auf ein Regulationsfenster der Genexpression von SHIP1 hin, welches für seine Tumorsuppressorfunktion weder unterschritten (beispielsweise in der T-ALL) noch überschritten (häufig in der B-ALL) werden darf (Abbildung 70) und dessen Regulation in starkem Maße von dem Transkriptionsfaktor Ikaros beeinflusst werden könnte, welcher insbesondere in der BCR-ABL-positiven B-ALL in seiner regulatorischen Funktion verändert ist (Kapitel 4.4.1).

Angesichts der unterschiedlichen Entwicklungsursachen der B-Zell-Malignitäten und der unterschiedlichen Expression und Aktivität von prä-BZR oder BZR ist es zudem

wahrscheinlich, dass einzelne Subtypen von B-Zell-Malignitäten krankheitsspezifische Schwellenwerte für die AIC-Aktivierung aufweisen [Steeghs et al., 2019].

**Abbildung 70: Der Einfluss der SHIP1-Expressionsstärke auf die Entstehung von malignen Zell-Erkrankungen.** Abhängig von der Stärke der SHIP1-Expression in hämatopoetischen Vorläuferzellen und der damit verbundenen Abschwächung oder Erhöhung der Rezeptor-Signalgebung, besitzt SHIP1 einen Einfluss auf die Entstehung von malignen Zell-Erkrankungen. Die verminderte Expression von SHIP1 in der T-ALL und in einem Teil der B-ALL führt zu einer gesteigerten Aktivierung des AKT-Signalwegs und zur verstärkten Proliferation der Zellen. Die hohen Expressionsniveaus von SHIP1 in B-ALL-Zellen führen dazu, dass der Schwellenwert für die AIC-Aktivierung angehoben wird und ermöglichen es somit Zellen mit einem autoreaktiven BZR oder einer starken onkogenen Nachahmung durch Abschwächung der BZR-Signalstärke einer negativen Selektion zu entkommen [gemäß Lo et al., 2009; Chen et al., 2015].



In diesem Zusammenhang deuten viele Ergebnisse daraufhin, dass die Differenzierung in Plasmazellen möglicherweise einen potenziellen Mechanismus darstellt, um der AIC-Aktivierung zu entgehen [Hug et al., 2014; Getahun et al., 2016; Kersseboom et al., 2010]. Während der Differenzierung regulieren autoreaktive B-Zellen die Zelloberflächenexpression von autoreaktiven B-Zell-Rezeptoren herunter. Die terminal differenzierten Plasmazellen sekretieren Immunglobulin als Autoantikörper, anstelle der Expression eines membran-gebundenen BZR und der damit verbundenen Signalgebung von der Zelloberfläche. So unterwandert die Deletion von SHIP1 und PTEN in reifen B-Zellen die negative Selektion autoreaktiver, reifer B-Zellen und führt zu Autoimmunität [O'Neill et al., 2011; Suzuki et al., 2003]. Die terminale Differenzierung in Plasmazellen führt auch zum Verlust mehrerer Schlüsselfaktoren der Identität der B-Zelllinie. Hierzu gehören Transkriptionsfaktoren (PAX5 und EBF1), Oberflächenrezeptoren (CD19 und CD79A) sowie mehrere Komponenten der intrazellulären BZR-Signalkaskade (Syk, BLNK und Btk) [Shaffer et al., 2002; Minges Wols, 2006; Nera et al., 2006b]. Diese Beobachtungen lässt es plausibel erscheinen, dass die Schwellenwerte der AIC-Aktivierung streng mit den Determinanten der Identität der B-Zelllinie verknüpft sind.

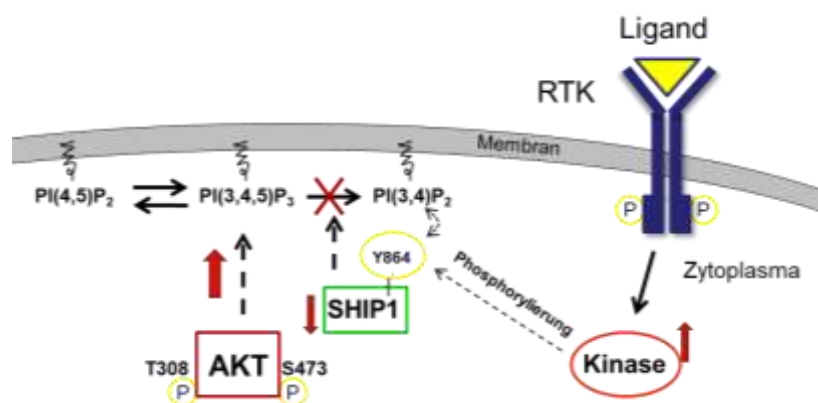
### **Mutationen und Modifikationsstellen beeinflussen die enzymatische Aktivität und die Stabilität von SHIP1**

Die Analyse von putativen Phosphorylierungsstellen von SHIP1 wurde mithilfe der Phosphosite-Datenbank durchgeführt [Hornbeck et al., 2004]. Von besonderem Interesse ist der Tyrosin-Rest 864 von SHIP1, der c-Terminal zur Phosphatase-Domäne (401-863) lokalisiert ist (Kapitel 4.4.2). Strukturanalysen weisen zudem auf eine C2-Domäne (725-863) hin (Abbildung S30). Die Phosphorylierungsstelle S440 (human: S437), die in der Phosphatase-

Domäne gelegen ist und durch PKA phosphoryliert wird, konnte dabei bereits als allosterische Aktivierungsstelle identifiziert werden [Zhang et al., 2010].

Der Tyrosin-Rest 864 ist die putative Phosphorylierungsstelle von SHIP1 mit den meisten „hits“ in der Phosphosite-Datenbank [Hornbeck et al., 2004; Cao et al., 2007]. Für diese Stelle ist derzeit keine funktionelle Information publiziert [Pauls und Marshall, 2017]. Aufgrund seiner Lage in unmittelbarer Nähe zur Phosphatase-Domäne wurde die Auswirkung dieser putativen Phosphorylierungsstelle in einem Phosphatase-Assay genauer untersucht. Zuvor konnte die Mutation D672A als enzymatisch beeinträchtigt identifiziert werden [Metzner et al., 2009]. Die Y864A-Dephosphorylierungsmutante zeigt in dem durchgeführten Phosphatase-Assay eine gesteigerte spezifische Reaktionsgeschwindigkeit (57,3 %) (Abbildung 49). Die gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit von SHIP1-Y864A äußert sich in einer wesentlich geringeren Phosphorylierung von AKT-S473 im Vergleich zu den SHIP1-wt-exprimierenden Zellen (Abbildung 50). In diesem Zusammenhang kann zudem ein Wachstumsnachteil und eine wesentlich geringere Zellviabilität der SHIP1-Y864A-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den SHIP1-wt-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Vermutlich könnte die Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 864 die Konformation des Proteins verändern und damit die Bindung des Substrats an das aktive Zentrum sterisch hindern.

Interessanterweise wurden bereits zwei allosterische Aktivatoren (AQX-MN100 und AQX-1125) entwickelt, die an der C2-Domäne binden. Die C2-Domäne von SHIP1 bindet normalerweise an das endogene PI(3,4)P<sub>2</sub> und aktiviert SHIP1 so allosterisch [Ong et al., 2007]. Ergänzend hierzu kann gezeigt werden, dass nicht die Phosphorylierung von SHIP1 an den NPXY-Motiven zu einer Steigerung der Phosphatase-Aktivität führt, sondern die Membran-Lokalisation von SHIP1 die gesteigerte Aktivität fördert [Phee et al., 2000]. Der Tyrosin-Rest 864 könnte hierbei auch als Phosphorylierungsstelle von SHIP1 eine wichtige Rolle bei dem Beenden dieser C2-abhängigen allosterischen Aktivierung an der Membran spielen. Dem Modell zufolge könnte SHIP1 nach Rekrutierung an die Membran durch eine Tyrosinkinase am Tyrosin-Rest 864 phosphoryliert werden (Abbildung 71). Aufgrund dieser Phosphorylierung wird die allosterische Aktivierung von SHIP1 negativ beeinträchtigt, so dass die Phosphatase-Aktivität von SHIP1 reduziert wird.



**Abbildung 71: Modell zur Funktion des Tyrosin-Restes 864 von SHIP1.** Nach Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen kommt es zur Aktivierung von nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Eine solche, bisher nicht weiter charakterisierte Tyrosinkinase, könnte SHIP1 am Tyrosin-Rest 864 phosphorylieren. Der Tyrosin-Rest 864, welcher direkt C-terminal zur C2-Domäne lokalisiert ist, könnte im unphosphorylierten Zustand allosterisch wirksam sein und die Phosphataseaktivität von SHIP1 verstärken. Nach Phosphorylierung von SHIP1 am Tyrosin-Rest 864 reduziert sich die Phosphataseaktivität von SHIP1 entsprechend, wodurch AKT gesteigert an die Membran rekrutiert werden kann.

Es ist jedoch auch vorstellbar, dass SHIP1 im Zytoplasma am Tyrosin-Rest 864 phosphoryliert wird und in der Folge an die Membran rekrutiert wird. An der Membran könnte eine Protein-Phosphatase zur Dephosphorylierung von SHIP1 führen und damit die allosterische Aktivierung von SHIP1 initiieren.

Eine SHIP1-Mutation, die eine konstitutiv gesteigerte Aktivität zeigt, könnte im Rahmen der klonalen B-Zell-Selektion womöglich das Überleben von malignen B-Zellen begünstigen. Ein Beispiel hierfür ist die Phosphatase PTPN22. PTPN22 stellt einen negativen Regulator von Syk dar [Negro et al., 2012]. Die Mutation R620W führt zu einer Funktionsverstärkung von PTPN22 [Vang et al., 2005]. Diese Verstärkung führt in der Folge zu einer Hemmung der BZR-Signalstärke, wodurch der Schwellenwert für die AIC-Aktivierung angehoben wird und autoreaktiven B-Zellen geholfen wird, der negativen Selektion zu entgehen. So liegt PTPN22 in CLL-Zellen mit autoreaktiven BZR zudem häufig auch sehr stark exprimiert vor [Negro et al., 2012]. SHIP1-Mutationen, die in unmittelbarer Nähe zum Tyrosin-Rest 864 liegen, konnten in der COSMIC-Datenbank identifiziert werden [Forbes et al., 2008]. Die Mutationen E861K, L863L und D865E wurden jedoch allesamt nicht bei ALL-Patienten identifiziert. Eine hyperaktive E41K-Mutante von BTK induziert ebenfalls den Zelltod in frühen Stadien der B-Zell-Entwicklung, ermöglicht es jedoch reifen autoreaktiven B-Zellen, der Deletion zu entgehen und sich in Plasmazellen zu differenzieren [Kersseboom et al., 2010].

Interessanterweise kann in der COSMIC-Datenbank eine SHIP1-Mutation an Position R673 (R673Q; c.G2021A) identifiziert werden [Forbes et al., 2008]. Diese Mutation wurde bei einem Patienten mit malignem Melanom entdeckt. Zudem wurde bei einem Patienten mit Darm-Karzinom eine Mutation identifiziert, die zu einem vorzeitigen Stopp an Position R673 (R673\*; c.C2020T) führt. Das Arginin an Position 673 ist direkt neben der Asparaginsäure an Position 672, welche in Form der D672A-Mutante als enzymatisch beeinträchtigt angesehen wird, lokalisiert. Für die R673Q-Mutation von SHIP1 kann lediglich eine kaum detektierbare Umsatzgeschwindigkeit ermittelt werden (Abbildung S31). Die Gründe für diese schwache Umsatzgeschwindigkeit könnten in der geringen Proteinstabilität des SHIP1-Proteins liegen. So kann gezeigt werden, dass die Expression von SHIP1-R673Q im Gegensatz zum SHIP1-wt in allen untersuchten Zelllinien auf Proteinebene, jedoch nicht mRNA-Ebene, deutlich verringert ist (Abbildung S33). Nur in der Reh-Zelllinie kann die SHIP1-R673Q-Mutante die Phosphorylierung von AKT-S473, im Vergleich zu der Leervektorkontrolle, deutlich reduzieren (28,7 %). In dieser Zelllinie ist die relative SHIP1-R673Q-Expression am stärksten (46,8 % von der Wildtyp-Expression). Interessanterweise zeigten die SHIP1-Mutationen E452K und G585E in Vorexperimenten vergleichbare Effekte wie die R673Q-Mutation. Beide Mutationen zeigten eine kaum detektierbare Umsatzgeschwindigkeit. Zudem konnte im Vergleich zum SHIP1-wt in beiden Fällen wesentlich geringere SHIP1-Mengen durch die Immunpräzipitation präzipitiert werden. Dies legt ebenfalls die Vermutung nahe, dass beide Mutationen eine geringere Protein-Stabilität aufweisen könnten. Das Glutamat an Position 452 gehört zum aktiven Zentrum der Phosphatasedomäne und ist vermutlich direkt an der Bindung von  $Mg^{2+}$  beteiligt (Abbildung S32). Das Metallkation ist zudem für die Bindung der Phosphatgruppe des Substrats verantwortlich und stabilisiert damit die enzymatische Reaktion [Whisstock et al., 2002]. Des Weiteren konnte in einem weiteren Vorexperiment möglicherweise eine SHIP1-Mutation mit einer, im Vergleich zum SHIP1-wt, gesteigerten

spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit identifiziert werden. Diese Mutation betrifft den Austausch einer Glutaminsäure (E) zu einem Lysin (K) an Aminosäureposition 625. In der Folge ist die SHIP1-Mutation R673Q, im Vergleich zum SHIP1-wt, nicht mehr in der Lage die Phosphorylierung von AKT-S473 in Sem- und H1299-Zellen zu reduzieren (Abbildung S33). Im Gegensatz dazu führt die SHIP1-Mutation R673Q in Reh-Zellen zu einer vergleichbaren Reduktion der Phosphorylierung von AKT-S473 wie der SHIP1-Wildtyp. An dieser Stelle muss jedoch beachtet werden, dass die Expression der SHIP1-Mutation R673Q in Reh-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien relativ stark ist. Dies könnte ferner darauf schließen lassen, dass die geringe Umsatzgeschwindigkeit seinen Ursprung in der geringen Stabilität des Proteins hat. Erstaunlicherweise ist die SHIP1-R673Q-Mutation jedoch in allen untersuchten Zelllinien in der Lage die Phosphorylierung von S6-S240/244 sehr deutlich zu reduzieren. In den Zelllinien Sem und Reh reduziert die R673Q-Mutation die Phosphorylierung von S6-S240/244 stärker als der SHIP1-Wildtyp. Dabei ist bekannt, dass SHIP1 durch die Bindung von Dok1 an der Membran in der Folge die Aktivierung von ERK inhibiert [Tamir et al., 2000]. Durch Inhibierung von ERK wird über die Hemmung von RSK auch das ribosomale Protein S6 inhibiert. Ferner zeigen SHIP1-R673Q-exprimierende Zellen ein vergleichbares Wachstum wie Leervektor-exprimierende Zellen (Abbildung S34). Eine genauere Strukturanalyse lässt die Vermutung zu, dass durch den Verlust des positiv geladenen Arginins zwei Salzbrücken zu den negativ geladenen Aminosäuren D617 und E634 wegfallen, so dass die Stabilität des Proteins beeinträchtigt sein könnte [persönliche Mitteilung Prof. Kirchmair, Bioinformatik, Universität-Hamburg].

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen zudem, dass SHIP1-Mutationen, welche das FLVR-Motiv betreffen (F28L, L29F und R31Q), ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität des SHIP1-Proteins haben (Kapitel 4.5). Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht [Ehm et al., 2019]. Die genauere Untersuchung der SHIP1-F28L-Mutation zeigt, dass Aminosäuren mit aromatischen Resten an Position 28 von SHIP1 die Stabilität des Proteins bewahren (F28Y und F28W), wohingegen der Austausch von einer Aminosäure mit aromatischem Rest zu einer Aminosäure ohne Aromaten die Stabilität des Proteins stark beeinträchtigt (F28L, F28I, F28V und F28A) (Abbildung 51). Eine detaillierte Strukturanalyse zeigt, dass F28 insbesondere mit W5, I83, L97 und P100 hydrophobe Oberflächenkontakte eingeht, die durch Tyrosin- und Tryptophan-Reste, jedoch nicht durch nicht-aromatische Reste an Position 28 aufrechterhalten werden können [Ehm et al., 2019]. Der Verlust dieser Oberflächenkontakte führt zur Destabilisierung der Konformation und beeinträchtigt in Folge dessen die Bindung Tyrosin-phosphorylierter Proteine an die SH2-Domäne. Die fehlerhafte Faltung wird durch Ubiquitin-Ligasen identifiziert. Die Ligase katalysiert in der Folge die Ubiquitylierung und damit den Abbau des fehlgefalteten Proteins [Jackson und Hewitt, 2016]. So zeigt die Analyse der Halblebenszeit von SHIP1 in Jurkat- und TF-1-Zellen eine deutlich verringerte Halblebenszeit des SHIP1-F28L-Proteins (Jurkat: 0,6h; TF-1: 0,89h) gegenüber der Halblebenszeit des SHIP1-wt-Proteins (Jurkat: 4,7h; TF-1: 23,2h) [Ehm et al., 2019]. Die Arbeitsgruppe um Sattler kann zudem zeigen, dass die Halblebenszeit von SHIP1 in Ba/F3-Zellen 17 Stunden beträgt und durch die Induktion von BCR-ABL auf unter 3 Stunden reduziert wird [Sattler et al., 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei der Analyse der COSMIC-Datenbank eine Reihe von Mutationen, die das FLVR-Motiv (AS 28-31) betreffen als auch in unmittelbarer Nähe zum FLVR-Motiv von SHIP1 lokalisiert sind, identifiziert werden [Forbes et al., 2008]. Hierzu



gehören die Mutationen F28L (AML), L29F (malignes Melanom), L29L (Lungenkarzinom), R31H (Mesotheliom), S33T (Ovarien-Karzinom), S33S (Brust-Karzinom), S37P (Gallengangskrebs), R38Q (Lungenkarzinom), A41T (Darmkarzinom), A41V (Prostatakarzinom) und R47W (malignes Melanom). Für die F28L-Mutation wird zudem eine verminderte Bindung an Tyrosin-phosphorylierte Proteine beschrieben [Brauer et al., 2012]. Das Arginin im FLVR-Motiv von SH2-Domänen ist jedoch die einzige Aminosäure des Motivs, die in die Phosphotyrosin-Bindung direkt involviert ist. Entsprechend kann gezeigt werden, dass eine Mutation des Arginins im FLVR-Motiv von SH2-Domänen die Bindung an Phosphotyrosinreste unterbinden kann [Mayer et al., 1992]. Ferner kann gezeigt werden, dass die Expression von SHIP1-F28L in K562 CML-Zellen, im Vergleich zur Expression von SHIP1-wt, nicht mehr die Phosphorylierung von AKT-S473 und AKT-T308 reduzieren kann [Yang et al., 2009].

Das FLVR-Motiv ist Bestandteil der SH2-Domäne. Neben Proteinen mit FLVR-Motiv (Src, SHIP1 und ABL1) besitzen einige Proteine auch ein verwandtes FLIR-/YLLR-Motiv (Lyn, Grb2, Syk und SH2D1A). Die SH2-Domäne ist für die zelluläre Lokalisierung, die Rekrutierung von Substraten und in einigen Fällen für die Regulierung der Kinaseaktivität verantwortlich [Filippakopoulos et al., 2009]. Als solche spielt die SH2-Domäne eine Rolle bei der Stabilisierung des inaktiven Zustands von Mitgliedern der Src-Kinase-Familie, sie stabilisiert jedoch auch die aktive Kinase-Konformation von Fes [Liu et al., 1993; Filippakopoulos et al., 2008]. Dem X-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom liegen Mutationen im SH2D1A-Gen zugrunde. Dabei können zwei Mutationen im SH2D1A-Gen identifiziert werden, welche das  $G^{27}$ SYLLRDS-Motiv betreffen (S28R und R32Q) und zu einer deutlichen Reduzierung der Halblebenszeit, im Vergleich zum Wildtyp, führen [Morra et al., 2001]. Darüber hinaus kann für die R32Q-Mutation gezeigt werden, dass die Bindung zwischen der SH2-Domäne von SH2D1A und dem Phosphotyrosin von CD150 gestört ist [Morra et al., 2001].

Die Untersuchung von Punktmutationen des  $F^{168}$ LVRES(ES)-Motivs der SH2-Domäne von ABL zeigt, dass durch die ABL-Mutationen R171K, S173C und S175C die Phosphotyrosinbindung gestört ist [Mayer et al., 1992]. Aufgrund der R171K-Mutation ist die Bindung von ABL zu Phosphoproteinen komplett beeinträchtigt [Mayer et al., 1992]. Demgegenüber kann sowohl die S173C-Mutation als auch die S175C-Mutation nur noch bei sehr hohen Konzentrationen an spezifische Tyrosin-phosphorylierte Proteine binden [Mayer et al., 1992]. Die Mutationen V170L, E172Q und E174Q zeigen keine Änderungen in der Phosphotyrosinbindung [Mayer et al., 1992]. Weiterhin können Mutationen in der SH2-Domäne zur Destabilisierung von Signalproteinen führen und damit verschiedene Krankheiten verursachen. Die Kinasen Fer (W460), ZAP-70 (P80Q), JAK3 (E481G), ITK (R335W) und BTK (verschiedene Mutationen) zeigen Mutationen, die ihre SH2-Domänen beeinflussen [Richardson et al., 2009; Matsuda et al., 1999; Candotti et al., 1997; Huck et al., 2009; Lappalainen et al., 2008]. Diese Mutationen sind größtenteils nicht an der Bindung des Phosphotyrosins beteiligt und führen zu Instabilität, verkürzter Halbwertszeit und folglich erhöhtem Proteinabbau [Filippakopoulos et al., 2009].

Dem konservierten FLVR-Motiv geht meist ein Glycin und ein Serin oder Threonin voraus. C-terminal des FLVR-Motivs ist häufig eine Glutaminsäure und ein Serin gelegen. Somit stellt das acht Aminosäurereste umfassende G(S/T)FLVR(E/D)S-Motiv die notwendige Sequenz dar,

um Tyrosin-phosphorylierte Proteine zu erkennen [Hidaka et al., 1991]. Die Analyse der Phosphosite-Datenbank zeigt, dass in unmittelbarer Nähe zum FLVR-Motiv von SHIP1 eine Reihe von putativen Phosphorylierungsstellen (S27, S33, S35, Y40 und Y46) lokalisiert sind [Hornbeck et al., 2004]. Zudem kann eine putative Ubiquitinylierungsstelle (K24) analysiert werden. Die putativen Phosphorylierungsstellen sind zum Teil zwischen den einzelnen Vertretern der SH2-beinhaltenen Proteine hochkonserviert. Insbesondere der Serin-Rest an Position 33 von SHIP1 kann, mit Ausnahme von Syk, bei nahezu allen Vertretern identifiziert werden (Abbildung S35). Interessanterweise kann im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere durch die Aminosäuren S27 und S33, welche das FLVR-Motiv von SHIP1 flankieren, die Expression von SHIP1 reguliert werden kann (Abbildung 53). Unerwarteterweise führt die Pseudophosphorylierung von S27 (S27D) zu einer verminderten SHIP1-Expression, wohingegen die Pseudophosphorylierung von S33 (S33D) zu einer verstärkten SHIP1-Expression führt. Es ist prinzipiell bekannt, dass die Phosphorylierung von Proteinen eine Proteindegradation einleiten kann. So führt die Phosphorylierung des Phosphodegrons, eines kurzen linearen Motivs, zur Generierung einer Oberflächenbindungsstelle an die Ubiquitin-Ligasen binden können [Holt et al., 2012]. Auf der anderen Seite kann die Phosphorylierung an einer spezifischen Position ein Degradationssignal maskieren [Holt et al., 2012]. Dieses Degradationssignal könnte durch die Dephosphorylierungsmutante S33A zu einem vermehrten Abbau von SHIP1 führen (Abbildung S36). Zudem ist es auch denkbar, dass die hinzugeführte Phosphatgruppe die Bindung von Phosphotyrosin-beinhaltenen Proteinen an das Arginin des FLVR-Motivs beeinträchtigt. Die Tyrosinkinase Syk besitzt zwei funktionell wichtige SH2-Domänen. Die N-terminale SH2-Domäne besitzt eine YLLR-Sequenz (FLIR-Motiv) und die C-terminale SH2-Domäne weist eine FLIR-Sequenz auf. In der N-terminalen SH2-Domäne von Syk befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum FLIR-Motiv der Serin-Rest 44 (YLLRQS). In der C-terminalen SH2-Domäne von Syk gibt es keinen unmittelbar angrenzenden Serin-Rest. Jedoch gelangt durch die Schleifenbildung der SH2-Domäne der Serin-Rest 202 in unmittelbarer Nähe zum FLIR-Motiv der SH2-Domäne [Bohnenberger, 2013]. Die Analyse der funktionellen Bedeutung dieser putativen Phosphorylierungsstellen von Syk zeigt, dass die Pseudophosphorylierungsmutante S202E den Kalziumionen-Einstrom nach B-Zell-Rezeptor Stimulation stark und die Pseudophosphorylierungsmutante S44E den Kalziumionen-Einstrom vollständig verhindert [Bohnenberger, 2013].

Interessanterweise zeigt die genauere Untersuchung der putativen SHIP1-Ubiquitinylierungsstelle K24 einen Einfluss auf die Stabilität von SHIP1 und einen damit verbundenen Effekt auf die Phosphorylierung von AKT. So führt die De-Ubiquitinylierungsmutante K24R im Vergleich zum SHIP1-Wildtyp zu einer Erhöhung der Expression von SHIP1 und einer starken Reduktion der Phosphorylierung von AKT-S473 (Abbildung 53). Für PTEN kann gezeigt werden, dass das Lysin an Aminosäureposition 66 ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation der Expression von PTEN ausübt. Dementsprechend führt die De-Ubiquitinylierungsstelle K66R zu einer verstärkten Expression von PTEN und einer damit verbundenen Reduktion der Phosphorylierung von AKT-S473 und T308 [Gupta und Leslie, 2016]. Aufgrund der fehlenden endogenen Expression von PTEN in H1299-Zellen zeigt die Expression von SHIP1 einen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT-S473 und darüber auf die Viabilität und das Wachstum der Zellen.

## 5.4 Der Transkriptionsfaktor Ikaros reguliert die Expression von SHIP1 und beeinflusst darüber den Schwellenwert für die AIC-Aktivierung von B-Zellen

Der konstitutive Energieentzug, der in B-Zellen vorliegt, hilft ebenfalls die Schwelle für die negative Selektion festzulegen. Niedrige Grundenergieniveaus machen B-Zellen empfindlicher für einen akuten Verbrauch von ATP als Ergebnis einer massiven Kinase-Hyperaktivierung. So induziert die Hyperaktivierung von Syk oder die Deletion von PTEN in Zellen mit autoreaktiven BZR oder BCR-ABL-Expression die ATP-Depletion, Energiestress und den schnellen Zelltod [Shojaee et al., 2016; Chen et al., 2015].

Eine weitere Sicherheitsmaßnahme der frühen B-Zell-Vorläufer betrifft in diesem Zusammenhang die Beschränkung der Glukoseaufnahme und Energieversorgung durch Transkriptionsfaktoren wie PAX5, IKZF1 und EBF1 [Chan et al., 2017]. Sie stellen somit eine metabolische Barriere gegen die maligne Transformation dar. Entsprechend sind Mutationen und Deletionen in einem oder mehreren dieser Gene in mehr als 80 % der prä-B-ALL zu finden [Chan und Müschen, 2017; Mullighan et al., 2008a]. In reifen B-Zell-Lymphomen sind diese Mutationen und Deletionen jedoch nur sehr selten zu finden [Chan et al., 2017]. So findet sich in der COSMIC-Datenbank beispielsweise keine IKZF1-Mutation in den 411 untersuchten DLBC-Lymphom-Proben, jedoch weisen 21,85 % der untersuchten B-ALL-Proben IKZF1-Mutationen auf [Forbes et al., 2008].

Die Glukoseaufnahme, Glykolyse und ATP-Spiegel wurden nach induzierbarer Aktivierung von BCR-ABL in prä-B-Zellen von Pax5-Wildtyp- und Pax5-Haploinsuffizienz-Mäusen untersucht [Martin-Lorenzo et al., 2018]. In Wildtyp-Mäusen kann die induzierbare Aktivierung von BCR-ABL die Glukoseaufnahme und die ATP-Spiegel nicht erhöhen. In Pax5-Haploinsuffizienz-Mäusen erhöht BCR-ABL jedoch die Glukoseaufnahme (mehr als 50-fach) und die zellulären ATP-Spiegel (mehr als 25-fach) deutlich [Chan et al., 2017; Martin-Lorenzo et al., 2018].

Die Auswirkungen von BCR-ABL in der frühen B-Zell-Entwicklung wurden in einem weiteren Experiment in Anwesenheit und Abwesenheit von lipophilen Glukosemetaboliten, die keinen aktiven Transport über die Zellmembran erfordern, untersucht [Chan et al., 2017]. BCR-ABL, welches in prä-B-Zellen von Mäusen exprimiert wird, bleibt biochemisch stumm und führt nicht zu einer offensichtlichen Leukämieerkrankung. Mäuse, die mit einem lipophilen Glukosemetaboliten behandelt werden, zeigen jedoch eine erhöhte BCR-ABL-Expression und eine stark erhöhte Kinaseaktivität in ihren prä-B-Zellen [Chan et al., 2017].

Die kritische Gatekeeper-Funktion von IKZF1 wird zudem in zwei Fällen von monozygoten Zwillingen veranschaulicht. Im ersten Fall trugen beide Zwillinge die onkogene BCR-ABL-Kinase in einem Teil ihrer neugeborenen B-Zellen. Während einer der Zwillinge gesund und frei von einer Leukämieerkrankung blieb, erwarb der andere zusätzlich zum Philadelphia-positiven-Chromosom eine IKZF1-Deletion und entwickelte nach Rezidiv schnell eine tödliche B-ALL [Cazzaniga et al., 2011]. Im zweiten Fall wiesen beide Zwillinge eine identische BCR-ABL-Sequenz auf und erkrankten beide an einer B-ALL. Das BCR-ABL-Fusionsprotein wurde dabei höchstwahrscheinlich pränatal erworben und stellt somit möglicherweise ein einleitendes genetisches Ereignis dar. Ein Zwilling erwarb zusätzlich postnatal eine IKZF1-Deletion und starb. Der andere Zwilling blieb ohne zusätzliche sekundäre IKZF1-Deletion, so dass die

Leukämieklone mit BCR-ABL-Fusionsprotein klinisch stumm blieben und der Patient acht Jahre nach der Behandlung noch in Remission ist [Cazzaniga et al., 2011].

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss die gezielte Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression auf die Proliferation von SHIP1-positiven SupB-15-Zellen und SupB-15-SHIP1-Knockdown-Zellen hat (Kapitel 4.4.1). Es zeigt sich, dass SupB-15-Zellen, welche die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 exprimieren und einen Knockdown von SHIP1 aufweisen, ein starkes Wachstumsverhalten zeigen. Demgegenüber führt die Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression in parentale SHIP1-exprimierende SupB-15-Zellen zu einer signifikanten Reduzierung des Wachstums und der Zellviabilität sowie einer gesteigerten Apoptose, im Vergleich zu den parental Ikaros-Isoform 6-exprimierenden SupB-15-Zellen (Abbildung 43 und S10A/B). Insbesondere zeigt sich auch erstmals, dass die Tumorsuppressorfunktion von Ikaros dabei durch einen SHIP1-abhängigen, additiven Effekt verstärkt wird. Diese Daten belegen, dass die Kollaboration von SHIP1 mit Ikaros einen wichtigen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Ph-positiven B-ALL-Zellen ausübt. Die genauere Analyse zeigt zudem, dass Ikaros die starke Expression von SHIP1 dabei auf ein möglicherweise angemessenes Niveau reduziert und somit versucht den Schwellenwert für die AIC-Aktivierung zu senken (Abbildung S37). Gleichzeitig führt die Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression zu einer Senkung der Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473. Dies könnte durch den negativ-regulatorischen Einfluss auf die Transkription der PI3K geschehen [Song et al., 2015]. Der PI3K/AKT-Signalweg besitzt einen hohen Energiebedarf [Robey und Hay, 2009]. So ist bekannt, dass maligne Zellen eine erhöhte Glukoseaufnahme und einen beschleunigten Glukosestoffwechsel aufweisen [Buentke et al., 2011]. Mit der Reduzierung der Aktivität des AKT-Signalwegs sinkt die Glukoseaufnahme der Zelle. Die Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) steigt an (Abbildung S12) [Chan et al., 2017]. Die Behandlung von BCR-ABL-positiven Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib führt ebenfalls zu einer verminderten Glukoseaufnahme und einer verringerten Energie-Produktion [Gottschalk et al., 2004; Damaraju et al., 2018]. Die gleichzeitige Expression von Ikaros und SHIP1 fährt, im Gegensatz zu anderen Kombinationen, in diesem Fall das Energieniveau von SupB-15 vermeintlich so stark herunter, dass durch die Behandlung der Zellen mit Imatinib keine signifikante Reduzierung der Proliferation mehr erreicht werden kann (Abbildung 44). Vermutlich versucht die AMPK in starkem Maße dem Energieentzug entgegenzuwirken.

Ein vorübergehender Anstieg des Energieverbrauchs während der normalen Aktivierung der B-Zellen kann durch den Energiestresssensor AMPK ausgeglichen werden [Zhang et al., 2017; Wu et al., 2013]. Eine permanente Hyperaktivierung von Syk und anderen Kinasen stromabwärts eines autoreaktiven BZR oder eines transformierenden Onkogens führt jedoch zu einem Energieverbrauch, der die Kapazität von AMPK zum Ausgleich vorübergehender Schwankungen der Energieversorgung übersteigt [Chan et al., 2017]. Vielmehr führt die Deletion der katalytischen  $\alpha 2$ -Untereinheit von AMPK in prä-B-Zellen und prä-B-ALL-Zellen, aufgrund der Beschränkung der Glukoseaufnahme und des ATP-Abbaus, zu einem raschen Zelltod [Chan et al., 2017].

Im Vergleich zu myeloiden Zellen sind die AMP/ATP-Verhältnisse in B-Zellen wesentlich höher [Chan et al., 2017; Chan und Müschen, 2017]. Dies stimmt mit der konstitutiven Aktivierung von AMPK und seiner stromaufwärts gelegenen Kinase LKB1 in B-Zellen überein [Chan et al., 2017]. Zusammen mit dem geringen zytoplasmatischen Volumen und der geringen

Anzahl an Mitochondrien lässt dies darauf schließen, dass die Energierestriktion ein bestimmendes Merkmal der B-Zelllinie darstellt [Chan und Müschen, 2017]. Außerdem zeigen durch CEBP $\alpha$  umprogrammierte B-Zellen verringerte Expressionsniveaus von AMPK und LKB1 und eine verringerte Phosphorylierung von AMPK [Chan et al., 2017]. Im Gegensatz zu prä-B-ALL-Zellen induziert die Deletion der katalytischen  $\alpha$ 2-Untereinheit von AMPK in myeloiden Zellen oder B-Zellen, welche zu myeloiden Zellen umprogrammiert wurden, nicht den Zelltod, sondern führt zu einer gesteigerten Proliferation [Chan et al., 2017]. Dementsprechend führt die pharmakologische Hemmung von AMPK zum akuten Zelltod bei B-ALL-Zellen, jedoch nicht bei myeloischen Leukämiezellen [Chan et al., 2017]. Im Gegensatz zu Zellen anderer Abstammungslinien scheinen energiebeschränkte B-ALL-Zellen daher auf die kontinuierliche Funktion des AMPK-Energiestressensors angewiesen zu sein, um Schwankungen der Energie- und Nährstoffversorgung auszugleichen.

Weiterhin wurde die gezielte Überexpression des Ikaros-Wildtyps und seiner dominant-negativen Isoform 6 auf die Expression von SHIP1 in weiteren ALL-Zellen untersucht. In den Zelllinien Nalm-6 und Reh führt die Ikaros-wt-Expression zu einer verstärkten SHIP1-Expression im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Zellen (Abbildung 46). Demgegenüber führt die Expression der Isoform 6 von Ikaros, im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Zellen, zu einer verminderten SHIP1-Expression. Die Tumorsuppressorfunktion von Ikaros-wt zeigt sich nach Überexpression in der T-ALL-Zelllinie Jurkat in Form eines verringerten Wachstums der Zellen (Abbildung S38). Die Ikaros Zinkfinger-Protein-Familie bildet durch Protein-Protein Interaktion zwischen den einzelnen Mitgliedern ein regulatorisches Netzwerk aus. Neben den einzelnen Mitgliedern dieser Familie können weitere Isoformen dieser einzelnen Familienmitglieder durch alternatives Spleißen entstehen [Fan und Lu, 2016]. Dieses regulatorische Netzwerk kann durch die Interaktion zwischen den einzelnen Isoformen dieser Mitglieder sehr komplizierte Ausmaße annehmen und in einer dominant-negativen Weise agieren [Nakase et al., 2000]. Die Homo- und Heterodimerisierung der Familienmitglieder kann zudem die DNA-Affinität und die transkriptionelle Aktivität steigern [Sun et al., 1996]. Insbesondere die Interaktion zwischen Ikaros und Aiolos scheint für die Entwicklung der Zelle von Bedeutung zu sein [Morgan et al., 1997]. Während Aiolos-Homomer-Komplexe starkwirkende Transkriptions-Aktivatoren darstellen, weisen Heteromere zwischen Aiolos und verschiedenen Ikaros-Isoformen eine schwächere bis nicht aktive transkriptionelle Aktivität auf [Morgan et al., 1997]. Sowohl Ikaros als auch Aiolos können nahezu an dieselben DNA-Sequenzen mit vergleichbaren Affinitäten binden [Morgan et al., 1997]. Die Unterschiede der Effekte von Ikaros auf die Expression von SHIP1 zwischen den einzelnen B-ALL-Zelllinien können möglicherweise aufgrund der unterschiedlichen Expression von dominant-negativen Isoformen der Ikaros-Familienmitglieder erklärt werden. Für die Reh-Zelllinie ist keine dominant-negative Isoform von Ikaros bekannt. Jedoch kann für die Reh-Zelllinie neben der Isoform 1 eine vergleichbar prädominante Expression der Aiolos-Isoform  $\Delta$ 4,5 identifiziert werden [Caballero et al., 2007]. Dieser Aiolos-Isoform fehlen damit drei der vier N-terminalen Zinkfinger, die für die Erkennung der DNA-Zielsequenz verantwortlich sind. Diese kürzere Isoform von Aiolos kann somit selbst nicht mehr effizient an die DNA binden und wirkt daher nach Heterodimerisierung als dominant-negative Isoform. Folgerichtig könnte die Regulation von SHIP1 durch einen veränderten Ikaros-Aiolos-Komplex in der Reh-Zelllinie beeinträchtigt sein.

Es kann zudem vermutet werden, dass die Regulation der SHIP1-Expression durch Ikaros und die Ikaros-Familienmitglieder dynamisch erfolgt. Abhängig von dem Niveau der SHIP1-Expression und der BZR-Signalstärke könnte Ikaros diese erfassen und dynamisch die Genexpression ändern, um sich der Situation anzupassen und als Tumorsuppressor zu wirken [Arenzana et al., 2015]. Dazu passt die Expression von verkürzten Isoformen, welche unter normalen Umständen in sehr geringen Mengen exprimiert werden und den prädominanten Isoformen inhibitorisch entgegenwirken sowie die Beteiligung von Ikaros an unterschiedlichen Regulations-Komplexen [Sun et al., 1996; Zhang et al., 2011b; Fan und Lu, 2016].

Weiterhin führt die Expression des Ikaros-Wildtyps in allen Fällen, im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Zellen, zu einer Reduktion der Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie am Tyrosin-Rest 419 (Abbildung 46). Entsprechend wird in der Literatur berichtet, dass Lyn durch Ikaros negativ reguliert wird [Nera et al., 2006a]. Im Rahmen dieser Arbeit kann darüber hinaus gezeigt werden, dass nicht nur die Hemmung von Lyn durch Ikaros reguliert wird, sondern möglicherweise auch die Hemmung der anderen Src-Kinase-Familie Mitgliedern durch Ikaros beeinflusst wird (Abbildung S11).

## **5.5 Identifikation der Expression von SHIP1 und Ikaros in Karzinomzellen – Fördert SHIP1 das Überleben von Karzinomzellen als Suppressor der hyperaktivierten PI3K/AKT-Signalgebung?**

Spielen hämatopoetische Zellen beziehungsweise Stammzellen eine Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Karzinomen? Diese interessante Fragestellung ist momentan Gegenstand aktueller Forschung und sollte die Grundlage zur Identifikation von (normalerweise) hämatopoetisch-beschränkter Proteine in Karzinomzellen bilden. Im weiteren Untersuchungsrahmen wurde die Expression von SHIP1 und Ikaros in verschiedenen Karzinomzelllinien identifiziert (Kapitel 4.7). Die Expression beider Proteine ist in gesunden Zellen vor allem auf hämatopoetische Zellen beschränkt. Wenig ist jedoch bekannt über die Expression beider Proteine in Karzinomzellen. Die Expression von SHIP1 kann im Rahmen dieser Arbeit in 6 von 12 untersuchten Karzinomzelllinien beobachtet werden (Abbildung 60 und S16). Interessanterweise kann Ikaros in allen untersuchten Karzinomzelllinien identifiziert werden. Ikaros kann dabei als 57 und 47 kDa großes Protein beobachtet werden. Dies entspricht von der Größe den Ikaros-Isoformen mit mindestens drei funktionsfähigen Zinkfingern, die effizient an die DNA binden können. Demgegenüber kann keine dominant-negative Ikaros-Isoform innerhalb der ausgewählten Karzinomzelllinien beobachtet werden. Unerwarteterweise kann zudem IRF4 in 6 von 12 und RAG1 in 2 von 12 Karzinomzelllinien identifiziert werden (Abbildung S16). Eine Expression in nicht-hämatopoetischen Zellen ist zwar unerwartet, jedoch kann eine IRF4-Expression in Lungenkrebszellen beobachtet werden [Qian et al., 2017]. Die Herunterregulierung von IRF4 führt in der Folge zu einer signifikanten Reduzierung der Zellproliferation und Koloniebildung [Qian et al., 2017].

In einem Multi-Tumorgewebe Microarray kann eine SHIP1-Expression in 49 von 72 Tumor-Entitäten identifiziert werden [Schaks; unveröffentlicht]. Insbesondere im erkrankten Darmgewebe scheint SHIP1 vor allem exprimiert zu werden. So kann eine SHIP1-Expression in einem Microarray mit kolorektalen Karzinomproben in 62 % der Fälle identifiziert werden

[Schaks; unveröffentlicht]. SHIP1-Punktmutationen finden sich mit 3,83 % (89/2321 Proben; Dickdarm) und 5,77 % (3/52 Proben; Dünndarm) beim Darmkrebs und mit 5,88 % (76/1293 Proben) beim Melanom [Forbes et al., 2008]. Beim Lungenkrebs sind es 1,34 % (33/2468 Proben) SHIP1-Mutationen [Forbes et al., 2008]. Darüber hinaus können SNPs im INPP5D-Gen in verschiedenen Studien mit der Alzheimer Krankheit [Lambert et al., 2013; Jing et al., 2016; Bodily et al., 2016; Efthymiou und Goate, 2017], einer Gliom-Erkrankung [Wu et al., 2014; Lehrer, 2018] und Lungenkrebs [Tan et al., 2015; Fu et al., 2019] im Zusammenhang gebracht werden. Lungenkarzinomzellen, die SHIP1 exprimieren, zeigen einen Wachstumsnachteil gegenüber Zellen ohne SHIP1-Expression [Ehm et al., 2019; Fu et al., 2019]. Zudem führt die Überexpression von SHIP1 in Lungenkarzinomzellen *in vivo* zu einem verminderten Wachstum, einer verminderten Migration und Invasion [Fu et al., 2019]. Die Expression von SHIP1 in Lungenkarzinomzellen kann auf das Fehlen von CpG-Inseln in der Promotor-Region des Gens zurückgeführt werden [Fu et al., 2019].

Die Funktion von Ikaros in Karzinomen ist bisher weitestgehend unverstanden. Eine Expression von Ikaros kann jedoch in einer Reihe von Geweben, wie Leber, Lymphknoten, Thymus, Darm, Lunge, Brustdrüse, Knochenmark, Gehirn, Herz, Plazenta und Prostata identifiziert werden [Yang et al., 2010]. Für Lungenkrebspatienten kann gezeigt werden, dass die Expression von Ikaros mit der Prognose für die Patienten positiv korreliert [Zhang et al., 2013]. In Lungenkrebszelllinien kann zudem gezeigt werden, dass die Ikaros-Expression vor allem durch Demethylierung des Promotors ektopisch aktiviert wird und dass Ikaros die Migration und Invasion von Lungenkrebszellen *in vitro* hemmt [Zhang et al., 2013]. Eine verringerte Expression von Ikaros im hepatozellulären Karzinom (HCC) ist signifikant mit einem schlechteren Überleben von HCC-Patienten assoziiert [Zhang et al., 2014]. Ikaros inhibiert hierbei insbesondere die Expression von CD133 über die direkte Bindung an den CD133 Promotor, so dass die Ausbreitung von CD133-positiven Krebsstammzellen im HCC unterdrückt wird [Zhang et al., 2014].

Ein weiterer interessanter Ansatz, der zurzeit intensiv diskutiert wird, beschreibt die Hypothese, dass Karzinomzellen, wie beispielsweise das Hepatozelluläre Karzinom (HCC), aus dem Differenzierungsblock von Stammzellen und insbesondere hämatopoetischen Stammzellen entstehen könnten [Wu und Chen, 2006]. So ist bekannt, dass die Leber insbesondere in der frühen Entwicklungsphase hämatopoetische Stammzellen beinhaltet [Heissig et al., 2005]. Diese hämatopoetische Stammzellen können entsprechend auch in der Leber eines Erwachsenen vorhanden sein [Kotton et al., 2005]. Es kann zudem gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen sich zu Hepatozyten differenzieren können [Lagasse et al., 2000]. Ein weiteres Modell könnte die Fusion von hämatopoetischen Stammzellen und verschiedenen Zelltypen darstellen [Bjerkvig et al., 2005].

Insbesondere Transkriptionsfaktoren wie Ikaros, die als Gene an der Regulierung der Selbsterneuerung von Stammzellen eine wichtige Rolle spielen, könnten somit von Bedeutung bei der Entstehung eines Karzinoms sein [Bjerkvig et al., 2005; Papanthasiou et al., 2009]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Ikaros in Karzinomzellen auf die SHIP1-Expression und den AKT-Signalweg nimmt, wurden verschiedene Karzinomzelllinien mit dem Ikaros-Wildtyp transduziert (Abbildung 61). Die Transduktion von EGI-1-Zellen mit dem Ikaros-wt führt zu einer Hochregulation der SHIP1-Expression. Demgegenüber führt die Transduktion von SW480- und WM1366-Zellen mit dem Ikaros-wt zu einer Reduktion der SHIP1-Expression. Die Phosphorylierung von AKT-S473 wird in den SW480- und WM1366-Zellen durch die

Expression des Ikaros-Wildtyps vermindert. Eine Korrelation zwischen der veränderten Phosphorylierung von AKT und S6 kann jedoch nicht beobachtet werden. Zuvor konnte gezeigt werden, dass Ikaros nicht nur einen Einfluss auf die Aktivierung von AKT (S473), sondern auch von ERK1/2 (T202/Y204), STAT5 (Y694) und Src (Y419) nehmen kann [Nahar et al., 2011]. Entsprechend könnte S6 auch über den MAPK-Signalweg reguliert werden.

Auf der anderen Seite kann gezeigt werden, dass Helios und Aiolos die Phosphorylierung von Erk und S6 modulieren können [Holmfeldt et al., 2013]. Die Unterschiedlichen Phosphorylierungsänderungen in den Zellen könnten somit über unterschiedliche Zusammensetzungen zwischen den Mitgliedern der Ikaros-Familie resultieren. Wenig ist jedoch bisher über die Expression von Helios und Aiolos in den verwendeten Zelllinien bekannt. Weiterhin kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von Ikaros-wt in drei Karzinomzelllinien zu einer verminderten Zellviabilität *in vitro* führt (Abbildung S39). Diese Ergebnisse werden unterstützt von den Ergebnissen aus der Datenbank R2. Hier deutet die verstärkte mRNA-Expression von Ikaros auf ein verlängertes Überleben der Patienten mit Kolon- und Lungenkarzinom hin [Bogunovic et al., 2009; Bild et al., 2006] (Abbildung S40). Die genauere Analyse der SHIP1-Lokalisation in der Karzinomzelllinie Sk-ChA1 zeigt, dass die SHIP1-Expression nicht nur auf das Zytoplasma beschränkt ist, sondern SHIP1 auch in den Nukleoli des Zellkerns identifiziert werden kann (Abbildung 59). SHIP1 kolokalisiert in den Nukleoli von Sk-ChA1-Zellen partiell mit RPB6, einer gemeinsamen Untereinheit der Polymerasen I, II und III (Abbildung S41). SHIP1 konnte zuvor im Zellkern verschiedener hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Zellen identifiziert werden [Ehm und Nalaskowski et al., 2015; Nalaskowski und Ehm et al., 2018]. Die Ergebnisse weisen auf eine Relevanz von deregulierten und Kern-akkumulierten SHIP1 auf das gesteigerte Wachstum dieser Zellen hin.

Die Datensätze aus der Datenbank R2 weisen vielfach auf eine Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 im Karzinom hin. So zeigen Lungen-Tumor-Patienten mit einer verstärkten mRNA-Expression von SHIP1 eine bessere Prognose der Gesamtüberlebenschance auf [Bild et al., 2006] (Abbildung S42). Klinische Daten zeigen, dass Lungenkrebs-Patienten mit reduzierter SHIP1-Expression, im Gegensatz zu Patienten mit hohem SHIP1-Proteinniveau, eine verringerte Überlebensrate aufweisen [Fu et al., 2019]. Zudem besitzen Kolonkarzinom-Patienten mit einer hohen SHIP1-mRNA-Expression eine geringere Rückfallrisikowahrscheinlichkeit als Patienten mit einer geringen SHIP1-Expression [Jorissen et al., 2009] (Abbildung S43). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass SHIP1 in einigen Tumorentitäten eine Tumor-verstärkende Rolle zukommt. Möglicherweise kann die SHIP1-Expression in Karzinomzellen, ähnlich wie die hohen Expressionsniveaus von SHIP1 in B-ALL-Zellen, dazu führen, dass durch die Abschwächung der onkogenen Signalstärke maligne Zellen einer negativen Selektion entkommen. So exprimieren primäre Lungenkarzinomzellen eher geringe SHIP1-Proteinmengen [Fu et al., 2019]. Interessant wäre in diesem Fall die Analyse der Korrelation der SHIP1-Expression auf die Proliferation, Viabilität und Apoptose der Karzinomzellen unter Verwendung eines abgestuften Vektor-Expressionssystems, welches in Nalaskowski und Ehm et al., 2012 beschrieben ist.

So kann eine akute Hyperaktivierung von Syk in nicht-B-lymphoiden Zellen eine zelluläre Seneszenz induzieren, wie dies für das maligne Melanom veranschaulicht wurde [Bailet et al., 2009]. Der Verlust von INPP4B und PTEN in dermalen Endothelzellen führt ebenfalls zu einer zellulären Seneszenz [Gewinner et al., 2009]. Eine akute Hyperaktivierung des Kinasesignals



kann auch eine durch Onkogene induzierte Seneszenz (OIS), einen starken tumorsuppressiven Mechanismus, der die maligne Transformation in Zellen verhindert, auslösen [Collado et al., 2005]. OIS ist typischerweise das Nebenprodukt einer übermäßigen Proliferation und ist gekennzeichnet durch Zellstress in Verbindung mit der Aktivierung einer DNA-Schadens-Antwort [Di Micco et al., 2006].

Die maligne Transformation von Zellen, durch beispielsweise Ras, erfordert entweder ein kooperierendes Onkogen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie p53 [Serrano et al., 1997]. Eine akute Hyperaktivierung von Ras allein zeigt demgegenüber einen permanenten Wachstumsarrest der Zellen [Serrano et al., 1997]. Der durch Ras induzierte Wachstumsarrest geht vielmehr mit einer Akkumulation von p53 überein. Die Inaktivierung von p53 verhindert demgegenüber den durch Ras-vermittelten Arrest. Darüber hinaus führt die Hyperaktivierung von AKT, als Ergebnis einer pharmakologischen Hemmung von PTEN in einem menschlichen Xenotransplantationsmodell für Prostatakrebs, zur Hemmung der Tumorentstehung [Alimonti et al., 2010]. Die Schwellenwerte für die Induktion des Zelltodes sind in nicht-hämatopoetischen Zellentitäten und myeloiden Zellen vermutlich jedoch viel höher als in B-Zellen (siehe Kapitel 5.4).

## **5.6 Rekonstitution der Ikaros-Wildtyp-Aktivität und Beschränkung der Energiezufuhr als Behandlungsansatz der B-ALL**

Posttranslational wird Ikaros durch die Casein Kinase 2 gehemmt (Abbildung S44). Eine erhöhte CK2-Aktivität führt zur Phosphorylierung von Ikaros, wodurch die DNA-Bindungsfähigkeit von Ikaros verringert wird [Dovat et al., 2011]. Die Protein-Phosphatase PP1 wirkt demgegenüber als Gegenspieler der CK2 und ist für die Dephosphorylierung von Ikaros verantwortlich [Dovat et al., 2011]. Ähnlich wie AKT ist auch CK2 in Tumoren und akuten Leukämien häufig konstitutiv aktiviert [Buontempo et al., 2018]. Zudem ist die Casein Kinase 2 bei fast allen hämatologischen Krebsarten ein Schlüsselregulator, der für die Proliferation und das Überleben der Zelle entscheidend ist [Buontempo et al., 2018]. Hohe CK2-Proteinkonzentrationen sind mit pathologischen CK2-Funktionen bei Krebserkrankungen verbunden [Buontempo et al., 2018]. So zeigt sich auch in dieser Arbeit, dass die CK2-Proteinmengen in den untersuchten ALL-Zelllinien im Vergleich zu den gesunden Zellen erhöht vorliegen (Abbildung 19). Der CK2-Inhibitor CX4945 wird bereits klinisch getestet [Siddiqui-Jain et al., 2010].

Die Behandlung der Zellen mit dem Casein Kinase 2-Inhibitor führt im Rahmen dieser Arbeit zu einem vergleichbaren Genexpressionsprofil, wie es in den SupB-15-Zellen nach der Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression zu beobachten ist (Kapitel 4.4.1). So führt der CK2-Inhibitor CX4945 zu einer starken Reduktion der SHIP1-Expression sowie zu einer drastischen verminderten Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 (Abbildung 47). Zuvor konnte gezeigt werden, dass AKT am Serin-Rest 129 durch die CK2 *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung korreliert mit einem weiteren Anstieg (Hyperaktivität) der katalytischen Aktivität von AKT und scheint für die vollständige Aktivierung von AKT notwendig zu sein [Di Maira et al., 2005]. Ferner könnte SHIP1 durch weitere CK2-abhängige Mechanismen reguliert werden. So kann eine CK2-vermittelte

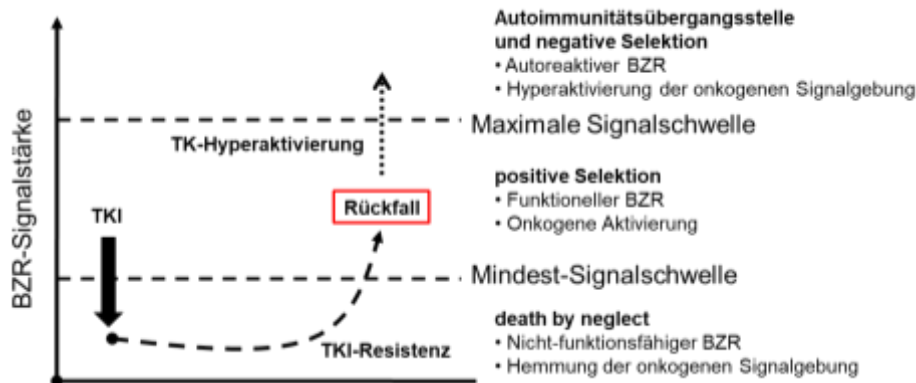
Reduktion der Src-Kinase-Familie-Aktivität gezeigt werden [Yokoyama et al., 2004]. Zudem kann ein 145 kDa großes Protein, als ein potentielles Substrat der CK2 in dieser Arbeit identifiziert werden (Abbildung S45). Entsprechend dem CK2-Substrat-Motiv, welches dem S/T DXE-Motiv gehorcht [Meggio und Pinna, 2003], könnte sich die Phosphorylierungsstelle von SHIP1 am Serin-Rest 791 (SDPEY) befinden. Die Inositol-Phosphat-Multi-Kinase (IPMK), die mit dem mTOR-Raptor-Komplex assoziiert ist, konnte zuvor ebenfalls, als ein Substrat der CK2 identifiziert werden [Meyer et al., 2012].

Der Transkriptionsfaktor Ikaros stellt einen wichtigen Faktor für die Beschränkung der Energieversorgung von B-Zellen dar. Entsprechend kann die Energieversorgung in B-Zellen den Schwellenwert für die negative Selektion von autoreaktiven und prä-malignen B-Zellen festlegen. Folgerichtig kann eine Überversorgung mit Nährstoffen über lange Zeiträume den metabolischen Kontrollpunkt gefährden, welcher autoreaktive und prä-maligne B-Zellen eliminiert. Aktuelle Studien zeigen, dass die Einschränkung der Nährstoffversorgung eine Beschränkung für die maligne Transformation von B-Zell-Vorläufern darstellt [Liu et al., 2014; Chan et al., 2017; Lu et al., 2017]. Im Vergleich zu Kindern mit normalem Glukose- und Insulinspiegel zeigen adipöse Kinder oder Kinder mit hohem Blutzuckerspiegel häufiger ein Rezidiv bei der B-ALL und weisen zudem signifikant schlechtere Ergebnisse auf [Butturini et al., 2007; Gelelete et al., 2011; Orgel et al., 2014]. Liegen bei erwachsenen Patienten mit B-ALL hohe Glukosespiegel zum Zeitpunkt der Induktions-Chemotherapie vor, so ist es für diese Patientengruppe signifikant unwahrscheinlicher, eine dauerhafte Remission der Krankheit zu erreichen [Weiser et al., 2004]. Um pharmakologisch die Glukoseaufnahme zu unterdrücken und Energiestress in B-Zellen zu induzieren, könnten Glukokortikoide verwendet werden [Chan et al., 2017]. Glukokortikoide wirken beispielsweise über den Kernhormonrezeptor NR3C1, unterdrücken die Glukoseaufnahme und hemmen Glukosetransporter wie GLUT1 [Buentke et al., 2011]. Somit wird der Transport von Glukose nach Stimulation durch Insulin über die Zellmembran unterbunden, was zur Hemmung der Glykolyse führt.

B-Zell-Transkriptionsfaktoren wie PAX5 und IKZF1 hemmen ebenfalls die Glukoseaufnahme durch Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors NR3C1 und legen damit den Schwellenwert für Reaktionen auf Glukokortikoide bei der B-ALL fest [Chan et al., 2017] (Abbildung S46). Zudem führt die Rekonstitution von PAX5 und IKZF1 in B-ALL-Patientenproben zu einer signifikanten Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven [Chan et al., 2017].

Die Phosphorylierung von NR3C1 durch AKT hemmt die nukleäre Translokation des Glukokortikoidrezeptors nach Behandlung mit Glukokortikoiden. Die pharmakologische Hemmung von AKT kann die Glukokortikoidresistenz in der ALL demgegenüber überwinden [Piovan et al., 2013]. Zusätzlich zur positiven Regulation der NR3C1-Expression verringert die induzierbare Rekonstitution von PAX5 oder IKZF1 in prä-B-ALL-Zellen die Phosphorylierung von AKT-S473 [Chan et al., 2017]. Somit kann die Empfindlichkeit gegenüber Glukokortikoiden auch durch Unterdrückung der AKT-Aktivität moduliert werden. Jüngste Studien legen nahe, dass Inhibitoren von GLUT1 und AMPK sowie pharmakologische Agonisten von CNR2 und TXNIP die Glukoseaufnahme wirksam unterdrücken und damit selektiv autoreaktive oder maligne B-Zellen abtöten, die einen höheren Energiebedarf haben als normale B-Zellen [Chan et al., 2017]. Ein generelles Problem bei der Behandlung der Patienten, insbesondere aus Hochrisiko-Gruppen, ist die Plastizität der Tumorerkrankung unter Therapie zu bewältigen. Die AIC-Aktivierung durch AIC-Agonisten und die TKI-Behandlung wenden selektive Drücke in entgegengesetzte Richtungen auf die Zelle an (Abbildung 72). Eine

Behandlung mit AIC-Agonisten könnte insbesondere für B-ALL-Zellklone von Bedeutung sein, die nach erster Remission und TKI-Behandlung eine Resistenz zeigen [Liu-Dumlao et al., 2012; Leoni und Biondi, 2015; Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2016; Shojaee et al., 2015]. So zeigen SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-exprimierende SupB-15-Zellen eine langsamere Proliferation als SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-exprimierende Zellen. Diese sind darüber hinaus jedoch resistenter gegen eine Hemmung der Proliferation durch Imatinib. Dabei können insbesondere TKI-Behandlungen auch versehentlich einen starken selektiven Druck für die Expansion resistenter Varianten ausüben [Jones et al., 2008].



**Abbildung 72: Modell der Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung zur Überwindung einer Arzneimittelresistenz bei malignen B-Zell-Erkrankungen.** Der kontinuierlich ausgeübte Druck in eine Richtung, wie er bei einer Monotherapie der ALL stattfindet, führt häufig zur Selektion auf arzneimittelresistente Zellklone. Demgegenüber könnten, unter Einbeziehung der Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung bei B-Zellen, selektive Drücke in entgegengesetzte Richtungen die gewonnenen resistenten Zellklone eliminieren. Patienten mit einem Rückfall der Erkrankung könnten durch eine kurze, intensive Stimulation der Tyrosinkinase-Signalgebung (Hyperaktivierung) behandelt werden [gemäß Chen et al., 2015; Shojaee et al., 2015].

Hier wäre vor allem ein kurzer, intensiver Impuls, der zu einer Kinase-Hyperaktivierung führt, von Vorteil. Insbesondere Agonisten mit kurzer Halblebenszeit könnten sinnvoll sein. Eine längere und wiederholte Behandlung mit AIC-Agonisten könnte hingegen möglicherweise die Gefahr bergen, ruhende prä-maligne Zellen durch eine verlängerte Kinase-Hyperaktivierung zu aktivieren. Dies könnte möglicherweise auch andere Organsysteme betreffen, bei denen der PI3K/AKT- und ERK-Signalweg als Treiber der onkogenen Signalgebung fungiert. Darüber hinaus muss erwähnt werden, dass insbesondere ALL-Patienten mit einer MLL-Translokation zu einem rezidiv neigen, bei dem es während der Behandlung und Vernichtung entarteter B-Zellen zu einem klonalen Selektionsvorteil und einer damit verbundenen enormen Expansion von parallel entarteten myeloiden Subklonen kommt (*lineage switch*) [Zoghbi et al., 2017]. Eine Hyperaktivierung von AKT, unter Verwendung des AKT-Agonisten SC79, zeigt eine ähnliche Wirkung, wie die Hemmung von PTEN auf humane prä-B-ALL-Zellen und führt zur AIC-Aktivierung [Jo et al., 2012; Shojaee et al., 2016].

## 5.7 AKT und die Rolle der drei Isoformen in der ALL

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg kann als ein konstitutiv aktivierter Signaltransduktionsweg in der Erkrankung der ALL identifiziert werden. Damit stellt er einen möglichen Ansatzpunkt für eine Therapie dar. Die Serin/Threonin-Kinase AKT ist dabei eine wesentliche Schaltstelle

dieses Signalwegs. AKT phosphoryliert viele Proteine und hemmt dadurch die Apoptose, steigert die Proliferation und über die Aktivierung von mTOR verstärkt es die Translation [Franke, 2008]. Drei Isoformen (AKT1, AKT2 und AKT3) wurden von AKT bei Säugern identifiziert [Chan et al., 1999], wobei den Isoformen zum Teil differentielle Funktionen mit gegensätzlichen Wirkungen zugesprochen werden. Diese differentiellen Funktionen der drei AKT-Isoformen könnten zukünftig einen Einfluss auf die Behandlungsstrategien mit isoformspezifischen AKT-Inhibitoren haben. Die Untersuchung von isoformspezifischen AKT-Knockout-Mäusen zeigt entsprechend, dass den Isoformen unterschiedliche Phänotypen zugewiesen werden können. AKT1-Null-Mäuse zeigen eine Wachstumsverzögerung und eine gesteigerte Letalität [Chen et al., 2001a]. AKT2-Null-Mäuse weisen demgegenüber einen veränderten Glukose-Metabolismus auf und zeigen eine Insulin-resistente Diabetes [Cho et al., 2001b]. Im Gegensatz dazu zeigen AKT3-Null-Mäuse eine reduzierte Gehirngröße [Tschopp et al., 2005]. Interessanterweise sind im Vergleich zu reifen B-Zellen die PI3K-Signal- und PIP<sub>3</sub>-Spiegel während der frühen B-Zell-Entwicklung normalerweise sehr niedrig und nahezu nicht nachweisbar, was darauf hindeutet, dass die Schwellenwerte für die PI3K/AKT-Signalübertragung teilweise von den Reifungsstadien der B-Zellen abhängen [Cheng et al., 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit kann bestätigt werden, dass AKT häufig in der ALL konstitutiv aktiviert ist (Kapitel 4.8). Dabei kann im Vergleich zu gesunden B-Zellen in 10 von 12 primären ALL-Proben eine Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 beobachtet werden (Abbildung 62). Dabei konnte zuvor gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 mit der AKT-Kinaseaktivität korreliert [Chan et al., 1999]. In 5 von 10 Fällen ist hierbei eine vielfach gesteigerte Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 im Vergleich zum gesunden Knochenmark zu erkennen. Häufig sind die Überexpression und die Aktivierung von AKT mit einer Resistenz gegen Chemotherapie oder Strahlentherapie verbunden [West et al., 2002]. Jedoch kann gezeigt werden, dass die Inhibierung von konstitutiv aktiviertem AKT dazu beiträgt, eine chemotherapeutische Resistenz in Lungenkarzinomzellen zu überwinden [Iida et al., 2013]. Darüber hinaus kann in allen untersuchten Proben eine Expression von AKT1 und AKT3 identifiziert werden. Die AKT-Isoform 2 kann in 10 von 12 Fällen detektiert werden. Interessanterweise korreliert die Stärke der Phosphorylierung von pan AKT am Serin-Rest 473 insbesondere mit der Stärke der Phosphorylierung der AKT-Isoform 1. Demgegenüber scheint, in den Fällen, in denen die AKT3-Isoform prädominant exprimiert wird, die Stärke der Phosphorylierung der AKT-Isoform 3 negativ mit der Stärke der Phosphorylierung von pan AKT am Serin-Rest 473 zu korrelieren. Im Vergleich zum gesunden Knochenmark ist die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (S9) in 10 von 12 Proben erhöht. Die Phosphorylierung von S6 (S240/244) ist im Vergleich zum gesunden Knochenmark in 9 von 12 Fällen erhöht.

In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die AKT-Isoformen nicht-überschneidende und manchmal gegensätzliche Funktionen bei der Tumorinitiation und -progression spielen können. Die spezifischen Funktionen der AKT-Isoformen scheinen nicht unbedingt auf unterschiedliche Expressionsmuster zurückzuführen zu sein, da alle drei Proteine in praktisch allen Zellen und Geweben exprimiert werden [Toker, 2012]. Nach Aktivierung der PI3K kann in den meisten untersuchten Zellen und Geweben die Hyperaktivierung aller drei AKT-Isoformen beobachtet werden [Toker, 2012; Grabinski et al., 2012].

In einem Mausmodell für Lungenkrebs zeigen AKT-Isoform-spezifische Knockout-Mäuse unterschiedliche Ergebnisse. Der Verlust von AKT1 verzögert die Einleitung des Lungen-

tumorstadiums dabei signifikant. Der Verlust von AKT2 beschleunigt hingegen die Tumorentwicklung dramatisch. Der Verlust von AKT3 führt zu einem kleinen, jedoch nicht statistisch signifikanten, stimulierenden Effekt auf die Tumorentwicklung [Linnerth-Petrik et al., 2014]. Bekräftigt werden diese Daten durch die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe [Franks et al., 2016]. Der Verlust von AKT1 hat vor allem Auswirkungen auf das Zellwachstum und das Überleben der Zellen, wohingegen der Verlust von AKT2 und AKT3 die Zellproliferation und eine verringerte Apoptose betrifft [Linnerth-Petrik et al., 2014]. Zudem zeigen aktuelle Ergebnisse, dass AKT3 in Mammakarzinom-Zellen eher eine Tumorsuppressor-Funktion zukommt. So führt der AKT-Isoform-spezifische Knockdown der AKT-Isoform 3, jedoch nicht der AKT-Isoformen 1 und 2, zu einer gesteigerten Migration der Tumorzellen *in vitro*. Darüber hinaus führt die kombinierte Herunterregulation der AKT-Isoformen 2 und 3 sowie AKT 1 und 3 zu einer signifikanten Steigerung der Metastasen *in vivo* [Grottke et al., 2016].

Weiterhin zeigt der AKT-Isoform-spezifische Knockdown eine differentielle Aktivierung und individuelle Funktionen der drei AKT-Isoformen in hepatozellulären Karzinomzellen und Cholangiokarzinomzellen auf. Es zeigt sich vor allem, dass die AKT1-Isoform die prädominante Isoform für die Proliferation innerhalb dieser Zellen ist [Grabinski et al, 2012; Ewald et al., 2013]. Zudem zeigen aktuelle Ergebnisse, dass die Hemmung von AKT1 die Proliferation von Eierstockkrebszellen signifikant reduziert und die Tumorentwicklung *in vivo* hemmt. Die Inhibierung von AKT2 führt zu einem gesteigerten Tumorstadium. Die Hemmung von AKT3 zeigt kein klares Bild, führt jedoch tendenziell zu einem erhöhten Wachstum der Zellen [Linnerth-Petrik et al., 2016].

Eine aktivierende Mutation (E17K) in der PH-Domäne von AKT1 kann in einigen Tumorentitäten identifiziert werden. Diese Mutation wird bei Mamma- (5,9 %), kolorektalen (1,6 %), Lungen- (0,6 %) und Ovarialkarzinomen (0,8 %) sowie bei Melanomen (0,5 %) beschrieben [Shoji et al., 2009]. Folglich könnte insbesondere die selektive Inhibierung von AKT1 in der Zukunft eine effektivere therapeutische Strategie für manche Krebserkrankungen darstellen als die gleichzeitige Hemmung aller drei Isoformen. Bisher ist jedoch relativ wenig bekannt über die Rolle der AKT-Isoformen in der ALL des Kindesalters.

Zur Untersuchung der funktionellen Analyse der drei AKT-Isoformen auf die Leukämogenese der ALL des Kindesalters wurden deshalb spezifische Knockdown-Experimente der drei AKT-Isoformen durchgeführt (Kapitel 4.8). Aufgrund der relativ starken Phosphorylierung von AKT am Serin-Rest 473 in den Linien Sem und SupB-15 wurden diese beiden Zelllinien für die Knockdown-Experimente gewählt. Zudem wurden Nalm-6-Zellen aufgrund der relativ schwachen AKT3-Expression ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen erstaunlicherweise, dass der isoformspezifische Knockdown der einzelnen AKT-Isoformen zu einer gesteigerten Phosphorylierung der anderen, verbleibenden, AKT-Isoformen führt (Abbildung 63). So zeigen beispielsweise Sem-Zellen mit Knockdown von AKT1 und AKT3 eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT2 im Vergleich zu der AKT2 Phosphorylierung in den Kontrollvektor-exprimierenden Sem-Zellen. Insbesondere durch den Verlust der AKT-Isoformen 1 und 2 steigt die Phosphorylierung von (pan) AKT in diesen Zellen deutlich an.

Interessanterweise hat die gesteigerte Phosphorylierung von AKT unterschiedliche Auswirkungen auf die Phosphorylierung der AKT-abhängigen Signalproteine GSK3 $\beta$  und S6. Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  wird dabei insbesondere durch den Knockdown der AKT-Isoform 2 gesteigert, wohingegen die Phosphorylierung von S6 vor allem durch den

Knockdown von AKT-Isoform 1 und 3 gefördert wird. Dementsprechend kann für ALL-Zellen vermutet werden, dass AKT2 vorwiegend für die Phosphorylierung von S6 benötigt wird und AKT 1 und 3 sich für die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  auszeichnen. Darüber hinaus sind AKT1 und AKT2, nicht jedoch AKT3, für die Phosphorylierung von p38 verantwortlich.

Trotz der starken Sequenzhomologie werden isoformspezifische Rollen und Substrate beschrieben, von denen angenommen wird, dass diese auf geringe Sequenzunterschiede und unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen beruhen. So haben AKT1 und AKT2 gegensätzliche Einflüsse auf die Zell-Migration in Brustkrebszellen. Die Ursache hierfür kann in der AKT1-spezifischen Phosphorylierung von Palladin identifiziert werden. Die Phosphorylierung von Palladin wird dabei für die AKT1-vermittelte Hemmung der Migration der Brustkrebszellen benötigt [Chin und Toker, 2010a]. Ergänzend hierzu kann gezeigt werden, dass AKT2 die Stabilität von Palladin über die Expression regulieren kann [Chin and Toker, 2010b]. Darüber hinaus kann ebenfalls gezeigt werden, dass p21 ein Substrat von AKT1 ist, welches jedoch spezifisch an AKT2 bindet [Heron-Milhavet et al., 2006]. Die Casein Kinase 2 phosphoryliert AKT1-S129, nicht jedoch AKT2-S131 [Girardi et al., 2014]. Da rekombinantes AKT2 ebenfalls durch die CK2 phosphoryliert werden kann, liegt die Vermutung nahe, dass *in vivo* eine sterische Hinderung auftritt, die den Zugang für die CK2 verhindert [Girardi et al., 2014]. Zwischen den drei AKT-Isoformen zeigen drei Regionen die größte Sequenzdiversität. Hierzu zählen, entsprechend der Nummerierung für AKT1, die Aminosäuren 43-50 (PH-Domäne), die Aminosäuren 111-145 (Linker-Region) und die Aminosäuren 453-465 (hydrophobes Motiv) [Girardi et al., 2014]. Insbesondere der Linker-Region wird eine besondere Rolle bei der Differenzierung von AKT1- und AKT2-Isoformen zugewiesen.

Weiterhin können von den über 100 bekannten AKT-Substraten mehrere Proteine als isoformspezifische oder präferierte Substrate identifiziert werden. So wird Skp2 [Gao et al., 2009] durch AKT1 phosphoryliert. HDM2 [Brognard et al., 2007], Ankrd2 [Cenni et al., 2011] und p27 [Cariaga-Martinez et al., 2013] werden vor allem von AKT2 phosphoryliert. Auf der anderen Seite ist die Dephosphorylierung von AKT-S473 durch PHLPP selektiv. So scheint PHLPP1 AKT2 und AKT3 zu dephosphorylieren, wohingegen PHLPP2 AKT1 und 3 dephosphoryliert [Brognard et al., 2007]. Darüber hinaus ist AKT1 hauptsächlich im Zytoplasma und teilweise im Zellkern lokalisiert, wohingegen AKT2 im Zytoplasma und in den Mitochondrien und AKT3 im Zytoplasma, im Zellkern und an der Kernmembran zu finden ist [Santi und Lee, 2010].

Die genaue Analyse des Wachstumsverhalten nach isoformspezifischen Knockdown der einzelnen AKT-Isoformen zeigt in diesem Fall, dass vor allem die AKT-Isoformen 1 und 2 für das Wachstum der Zellen verantwortlich sind (Kapitel 4.8). Die AKT-Isoform 3 hat lediglich einen schwachen Effekt auf das Zellwachstum. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen insbesondere die Zellen mit einem Knockdown von AKT2 den deutlichsten Wachstumsnachteil auf (Abbildung 64, S17 und S18). Entsprechend konnte zuvor gezeigt werden, dass die Überexpression von AKT2 mit der Aggressivität von Krebs und einer schlechten Überlebensrate korreliert [Rychahou et al., 2008; Altomare et al., 2002; Riggio et al., 2017]. Die Untersuchung von AKT-Doppel-Knockdown-Zellen kann die Untersuchung von AKT-Einzel-Knockdown-Zellen bestätigen. So führt der isoformspezifische Doppel-Knockdown der AKT-Isoformen zu einer gesteigerten Phosphorylierung der verbleibenden AKT-Isoform (Abbildung 65). So zeigen beispielsweise Sem-Zellen mit Knockdown von AKT2,3 eine

gesteigerte Phosphorylierung von AKT1, im Vergleich zu der AKT1-Phosphorylierung in den Kontrollvektor-exprimierenden Sem-Zellen. Es zeigt sich, dass AKT2 vor allem für die Phosphorylierung von S6 benötigt wird und AKT1 und 3 die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  verstärken. Die Kontroll-Inhibierung der AKT-Isoformen mit einem pan AKT-Inhibitor zeigt in der Zelllinie Sem, dass die Phosphorylierung von AKT-S473 und seines Substrats GSK3 $\beta$  konzentrationsabhängig reduziert werden kann. Verbunden mit der konzentrationsabhängigen Reduktion der Phosphorylierung von AKT sinkt zudem auch die Viabilität der Zellen (Abbildung S47).

Dem Modell zufolge könnte die Phosphorylierung und Aktivierung der AKT-Isoformen streng reglementiert sein. Diese Reglementierung gewährt ferner die koordinierte Zusammenarbeit der zellulären Funktionen durch die spezialisierten Aufgaben der einzelnen AKT-Isoformen. Durch den Verlust oder der Deregulation einer Isoform könnte sich die ausgewogene Aktivierung der Isoformen in eine Richtung hin verschieben, so dass die verbleibenden Isoformen über das normale Maß aktiviert werden und dadurch beispielsweise das Wachstum der Zelle stärker gefördert wird. Dies ist insbesondere in den Fällen kritisch zu sehen, in denen eine AKT-Isoform eher eine Tumorsuppressorfunktion zukommt. Bei den aus der COSMIC-Datenbank analysierten AKT-Mutationen (AKT1 und 2) handelt es sich hauptsächlich um die E17K- und die Q79K-Mutation, welche zu einer konstitutiven Aktivierung von AKT und zur onkogenen Transformation führen können [Forbes et al., 2008; Parikh et al., 2012].

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass nicht die Expression von AKT1 und AKT2, sondern die Phosphorylierung von AKT1 und AKT2 in den meisten Zellen koordiniert reguliert wird. Genetische Veränderungen beeinflussen dabei die AKT-Isoform-spezifische Aktivierung entscheidend. So zeigt die PIK3CA-Mutation H1047R in einigen Zelllinien eine selektive Aktivierung von AKT2, nicht jedoch von AKT1 [Wang et al., 2018]. Weitere Untersuchungen zu AKT-Isoform-spezifischen Effekten auf Brustkrebszellen zeigen, dass AKT1 die Zellproliferation durch Hochregulierung von S6- und Cyclin-D1 fördert, jedoch die Zellmigration und -invasion durch Herunterregulierung von  $\beta$ 1-Integrin und FAK inhibiert [Riggio et al., 2017]. AKT2 fördert demgegenüber die Zellmigration und -invasion durch Aktivierung von F-Aktin und Vimentin [Riggio et al., 2017]. Darüber hinaus fördert die Überexpression von AKT1 das lokale Tumorwachstum, wohingegen die Überexpression von AKT2 die Ferntumormetastasierung in die Lunge unterstützt [Riggio et al., 2017]. Das onkogene Potential beider Isoformen scheint sich demnach in verschiedenen Schritten der Tumorentwicklung zu ergänzen.

Die drei AKT-Isoformen weisen einen hohen Grad an Sequenzhomologie in ihren katalytischen Domänen auf (~ 90 % identisch), divergieren jedoch auf Ebene der regulatorischen Domäne (~ 70 %) und der PH-Domäne (~ 80 % identisch) [Kumar und Madison, 2005]. Insbesondere die Linker-Region, welche die PH-Domäne mit der katalytischen Domäne verbindet, ist unter den AKT-Isoformen (17-46 % identisch) schwach konserviert und weist keine signifikante Homologie zu anderen humanen Proteinen auf [Kumar und Madison, 2005]. Die Entwicklung von AKT-spezifischen und Isoform-selektiven Inhibitoren wird durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen den AKT-Isoformen, insbesondere der katalytischen Domäne, eingeschränkt. ATP-kompetitive Inhibitoren sind nicht selektiv gegen die einzelnen AKT-Isoformen und wenig selektiv gegen eng verwandte Kinasen, so dass die Entwicklung von allosterischen Inhibitoren von AKT in der näheren Vergangenheit zu einer verbesserten Spezifität, geringeren Nebenwirkungen und einer geringeren Toxizität der AKT-Inhibitoren

führte [Wu et al., 2010; Lu et al., 2014]. Aktuell zielen nahezu alle AKT-Inhibitoren auf alle drei AKT-Isoformen. Der putativ spezifische AKT1-Inhibitor A-674563 zeigt in ersten Arbeiten keine isoformspezifische Hemmung [Chorner und Moorehead, 2018]. Darüber hinaus wurde versucht, weitere AKT-Isoform-spezifische Inhibitoren zu entwickeln. Die Arbeitsgruppe um Barnett entwickelte sowohl einen AKT1-spezifischen Inhibitor sowie einen AKT1/2-spezifischen Inhibitor [Barnett et al., 2005]. Beide Inhibitoren zeigen eine gewisse Selektivität [Toker, 2012]. Diese Verbindungen zeigen jedoch eine schlechte Löslichkeit und pharmakokinetische Eigenschaften, die ihre Verwendung in Tiermodellen ausschließt [Kumar und Madison, 2005].

## **5.8 Kombinatorische Therapie der ALL mit Hemmstoffen gegen den AKT-mTOR-Signalweg und gegen aberrant aktivierte Tyrosinkinasen**

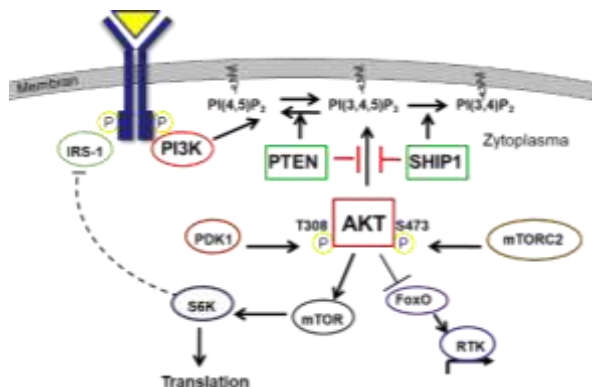
Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt aufgrund seiner häufigen Überaktivierung in den meisten Krebsarten eine wichtige Rolle bei der Therapie [Kandoth et al., 2013]. So wurde das PIK3CA-Gen als das zweit häufigste Gen identifiziert, welches in Krebs mutiert ist [Kandoth et al., 2013]. Eine Ausnahme dabei stellt bisher die Therapie des Krankheitsbildes der akuten Leukämien dar. Im Gegensatz zu anderen Krebsarten finden sich bei den akuten Leukämien (T-ALL und B-ALL) nur sehr wenige Mutationen bei den Hauptkomponenten des Signalwegs (PI3K, AKT und mTOR) [Kandoth et al., 2013]. Vielmehr stellen genetische Veränderungen in Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) (B-ALL: 4-10 %; T-ALL: 2-23 %) und aberrant aktivierte Tyrosinkinasen (BCR-ABL) eine der Hauptursachen einer konstitutiven Aktivierung von PI3K, AKT und mTOR dar [Fransecky et al., 2015; Forbes et al., 2008]. Neben Rezeptor-Tyrosinkinasen sind sehr häufig auch membrangebundene Proteine, wie GTPasen (KRAS und NRAS) von Mutationen betroffen [Fransecky et al., 2015; Forbes et al., 2008].

Viele Medikamente, die gegen mutierte Tyrosinkinasen gerichtet sind, zeigen klinische Wirksamkeit. Oftmals ist die Verwendung dieser Arzneimittel jedoch durch Resistenzen begrenzt oder sie führen häufig zu Rezidiven mit schlechten Überlebenschancen. Entsprechend kann eine vermehrte Unempfindlichkeit von Ph-positiven ALL-Zellen gegenüber einer Imatinib-Behandlung beobachtet werden [Chen et al., 2015]. Zudem kann für die Ph-positive B-ALL-Zelllinie SupB-15 gezeigt werden, dass die Imatinib-Behandlung zu einer signifikanten Hochregulation von miR-21 führt, welche die Expression von PTEN unterdrückt [Wang et al., 2014]. Darüber hinaus zeigt sich bei Patienten mit prä-B-ALL, dass die gesteigerte Aktivierung von AKT mit einem schlechten Ansprechen der Chemotherapie korreliert und des Weiteren mit einer schlechten Gesamtüberlebenszeit assoziiert ist [Morishita et al., 2012].

In der Vergangenheit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Hemmstoffen, welche gegen verschiedene Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs gerichtet waren, sich wenig effizient zeigte und stattdessen jedoch häufig zu einer Resistenz mit schlechter Prognose führte [Chapuis et al., 2010; Martelli et al., 2012; Fransecky et al., 2015]. So ist AKT für die Entstehung einer Therapie-Resistenz von T-ALL-Zellen gegen Glukokortikoide verantwortlich [Piovan et al. 2013]. Dabei verhindert AKT, durch Phosphorylierung von NR3C1, dessen Translokation in den Zellkern und die damit verbundene Glukokortikoid-induzierte Apoptose [Piovan et al. 2013].



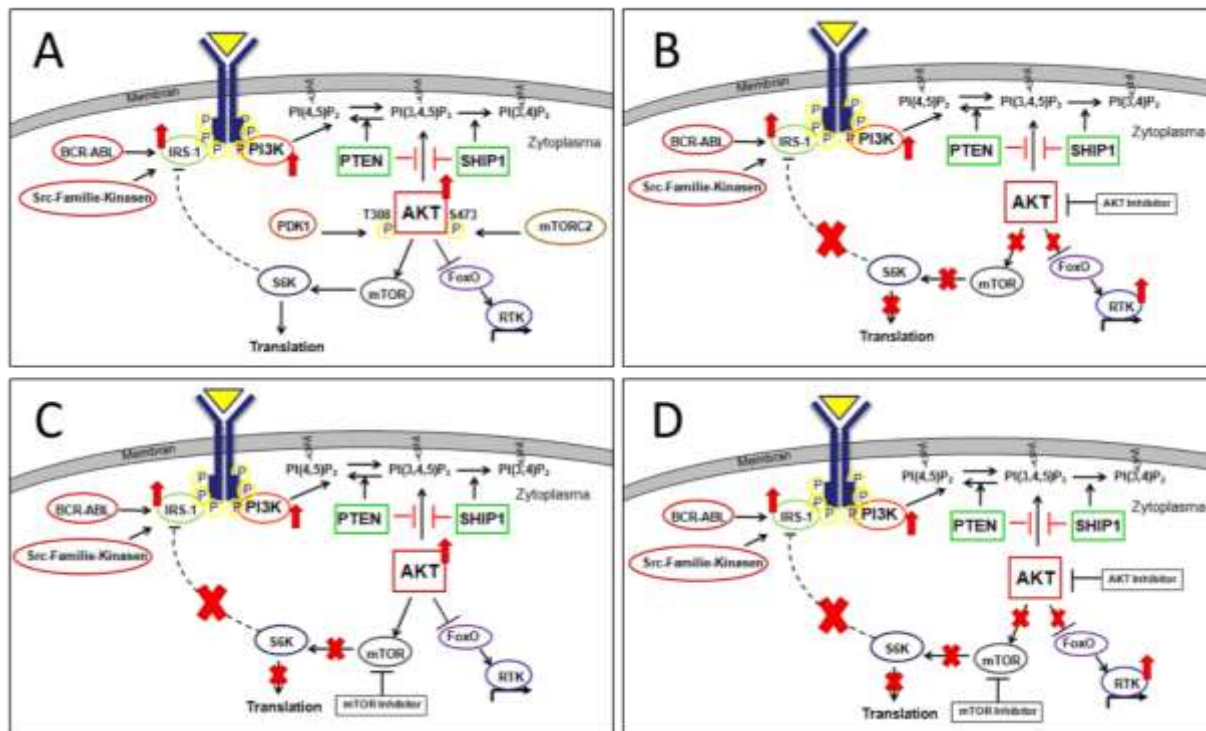
Insbesondere die Behandlung von Risikogruppen, die sich auf molekularer Ebene häufig durch aberrant veränderte Tyrosinkinase auszeichnen, zeigt ein schlechtes Ansprechen auf die Standard-Chemotherapie. Während im Allgemeinen nach Induktion einer Chemotherapie eine Remission in ca. 75 % der Fälle erreicht werden kann, sinkt das Gesamtüberleben in allen Risikogruppen bei der ALL auf 50 % ab [Gökbuget et al., 2012]. Durch die Identifizierung von genetische Subgruppen konnte so in den letzten Jahren eine höhere Wahrscheinlichkeit auf das Ansprechen einer zielgerichteten Therapie generiert werden. Die Ph-like B-ALL stellt eine solche Hochrisikogruppe dar. Diese B-ALL Untergruppe ist häufig verbunden mit Veränderungen in den Genen IKZF1, CRLF2 und JAK. Zudem weist die Ph-like B-ALL ein vergleichbar ausgeprägtes Genexpressionsprofil wie die Philadelphia-Chromosom-positive B-ALL auf [Roberts et al., 2012]. So kann in einer großen Anzahl von primären CRLF2-veränderten ALL-Proben eine gesteigerte Phosphorylierung von S6 und weiteren Substraten von mTORC1 beobachtet werden [Tasian et al., 2012]. Klinische Studien mit den AKT-Inhibitoren MK2206 und GDC-0068 unterstützen die Vermutung, dass AKT-Inhibitoren die stärksten Effekte in Tumorerkrankungen zeigen, in denen die Zellen eine PI3K-Mutation aufweisen oder einen Verlust von PTEN zeigen [Dienstmann et al., 2014].



**Abbildung 73: Signalgebung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.** AKT und mTOR sind zwei wichtige Proteine, die als Knotenpunkte bei der Regulation der PI3K/AKT/mTOR-Signalgebung von Bedeutung sind. mTOR reguliert über die S6-Kinase die Translation sowie Adapterproteine wie IRS-1. AKT reguliert die Expression von RTK durch Transkriptionsfaktoren wie FoxO [modifiziert nach Chandarlapaty, 2012].

Hemmstoffversuche bei der Behandlung der akuten Leukämie, welche gegen den PI3K/AKT-Signalweg gerichtet sind, zeigen vermehrt kontraintuitive Effekte (Abbildung 73 und 74). Beispielsweise führt die Inhibierung von mTORC1 zur Hemmung der p70S6K-vermittelten negativen IRS-abhängigen Rückkopplung, wodurch die Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinase und somit wiederum des PI3K/AKT-Weges gesteigert wird [Tamburini et al., 2008]. Ergänzend hierzu führt die Inhibierung von mTOR und AKT in ca. 70 % der Fälle von primären AML-Zellen zu einem Anstieg der Phosphorylierung von AKT. Damit verbunden kann eine Hochregulation von IRS-1 und FoxO beobachtet werden, die in der Folge zu einer gesteigerten Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinase führt [Bertacchini et al., 2015]. So fördert der AKT-Signalweg beispielsweise die Expression des IGF-1-Rezeptors [Tanno et al., 2001]. Die Analyse der Behandlung von B-ALL-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren und Inhibitor-Kombinationen, welche gegen den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg gerichtet sind (pan-PI3K, mTORC1, mTORC1/2 und PI3K/mTORC1/2), zeigt den größten anti-leukämischen Effekt durch die kombinierte Hemmung von PI3K und mTORC1/2 [Badura et al., 2013]. Der mTORC1-Inhibitor RAD001 zeigt *in vitro* eine starke Synergie mit dem AKT-Inhibitor MK2206 auf die Viabilität von B-ALL-Zellen [Neri et al., 2014]. Die Kombination aus intensiver Chemotherapie (Hyper-CVAD) und dem mTORC1-Inhibitor Everolimus zeigt in B-

ALL-Zellen bei 7 von 10 Patienten eine Reduzierung der Phosphorylierung von S6RP. Jedoch kann nur bei sechs von 24 Patienten (25 %) eine vollständige Remission erzielt werden [Daver et al., 2015].



**Abbildung 74: Hemmung und Rückkopplungsmechanismen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.** AKT und mTOR sind zwei wichtige Proteine, die als Knotenpunkte bei der Regulation der PI3K/AKT/mTOR-Signalgebung von Bedeutung sind. mTOR reguliert über die S6-Kinase die Translation sowie Adapterproteine wie IRS-1. AKT reguliert die Expression von RTK durch Transkriptionsfaktoren wie FoxO. Aberrant aktivierte Tyrosinkinasen wie BCR-ABL oder Src-Kinasen verstärken über IRS-1 die RTK-vermittelte Signalgebung (A). Die AKT-Inhibierung verursacht den Verlust der negativen Rückkopplung des Signalwegs, wodurch die RTK-Expression ansteigt. Zudem führt sie zur Inhibierung von mTOR (B). Die Hemmung von mTOR führt zur Stabilisierung von IRS-1 und damit zu einer erhöhten Aktivierung von RTK und PI3K (C). Die kombinierte Inhibierung von mTOR und AKT könnte ebenfalls eine gesteigerte Aktivierung der RTK-Expression zur Folge haben (D) [modifiziert nach Chandarlapaty, 2012].

Aufgrund der erhöhten Tyrosinkinase-Aktivität von fehlregulierten Proteinen bietet die Verwendung von spezifischen Hemmstoffen gegen AKT (MK2206) und mTOR (RAD001) in Kombination mit der Hemmung von bereits etablierten Tyrosinkinase-Targets (BCR-ABL und Flt3) einen vielversprechenden kombinatorischen Therapie-Ansatz zur Behandlung der ALL. Eine duale Hemmung von AKT und mTOR zeigte bereits einen starken synergistischen Effekt hinsichtlich der Inhibierung des Wachstums von humanen hepatozellulären Karzinomzellen und Cholangiokarzinomzellen im Xenotransplantationsmodell *in vivo* [Grabinski et al., 2012, Ewald et al., 2013]. Interessanterweise kann auch in mehreren Karzinomzelllinien, die gegenüber einer MEK-Inhibitor-Therapie resistent geworden sind, durch eine Kombination von AKT- und mTOR-Inhibitoren eine Überwindung der Resistenz und eine Hemmung des Wachstums der Karzinomzelllinien bei verschiedenen Entitäten erzielt werden [Ewald et al., 2014]. Die Inhibierung der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 wird in der klinischen Routine als prädiktiver Marker für die effiziente Hemmung des mTOR-Signalwegs gemessen [Perl et al., 2012]. In verschiedenen Studien kann zudem gezeigt werden, dass die

Inhibierung der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 mit einem Ansprechen der Behandlung korreliert [Amadori et al., 2012].

Interessanterweise hat die Arbeitsgruppe um Xing eine Imatinib-resistente SupB-15-Zelllinie etabliert. Die Imatinib-resistenten SupB-15-Zellen zeigen eine Hochregulation des PI3K/AKT/mTOR- und RAS/RAF-Signalwegs. Eine Behandlung der Zellen mit Imatinib in Kombination mit Rapamycin wirkt sich synergistisch auf die Überwindung der Resistenz aus [Xing et al., 2012]. Der IC50-Wert für Imatinib allein in SupB-15-Zellen liegt bei ca. 1  $\mu\text{M}$  [Yang et al., 2014; Guo et al., 2015].

Im Rahmen der Etablierung eines kombinatorischen Therapieansatzes in dieser Arbeit kann bestätigt werden, dass die Inhibitoren MK2206 und insbesondere RAD001 allein nicht effizient das Wachstum von SupB-15-Zellen hemmen können (Kapitel 4.9). Eine Kombination der Hemmstoffe, insbesondere von MK2206 mit RAD001 oder mit Imatinib, führt demgegenüber zu einer signifikanten Abnahme des Zellwachstums. Die Kombination der Wirkstoffe bestehend aus RAD001, MK2206 und Imatinib führt zu einer weiteren signifikanten Steigerung des Hemmeffekts (Abbildung 66).

Die Gründe für die beobachteten Effekte können durch die Analyse der Signaltransduktion dargelegt werden (Abbildung 67 und S20). Hierbei zeigt sich, dass RAD001 konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von AKT, GSK3 $\beta$  und Tyrosin-phosphorylierter Proteine (RTKs) führt. RAD001 führt konzentrationsabhängig auch zu einer Senkung der Phosphorylierung von S6. Es zeigt sich zudem, dass RAD001 in Kombination mit MK2206 oder Imatinib noch effektiver die Phosphorylierung von S6 hemmen kann. Des Weiteren zeigt sich, dass MK2206 konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der Phosphorylierung Tyrosin-phosphorylierter Proteine (RTKs) führt. Ebenso führt MK2206 konzentrationsabhängig auch zu einer Senkung der Phosphorylierung von AKT und GSK3 $\beta$ . Imatinib führt konzentrationsabhängig zu einer Senkung der Phosphorylierung Tyrosin-phosphorylierter Proteine (RTKs) und AKT.

Die Phosphorylierung von S6 kann nur geringfügig durch MK2206 und Imatinib gesenkt werden. Dementsprechend führt nur die Behandlung der Zellen mit RAD001 zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von S6 und damit der Proteinsynthese. Jedoch wird im Folgenden der zuvor angesprochene IRS1-abhängige Rückkopplungsmechanismus beeinträchtigt, so dass die Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinase und des PI3K/AKT-Signalweges gesteigert wird. Zuvor konnte für die CML gezeigt werden, dass BCR-ABL mit der p85-Untereinheit der PI3-Kinase interagiert und dabei die Aktivität der PI3-Kinase steigert [Harrison-Findik et al., 1995].

In aktuellen klinischen Phase 1-Versuchen wird die Kombinationstherapie bestehend aus RAD001 und Chemotherapie (Prednison, Vincristin, PEG-Asparaginase und Doxorubicin) für Patienten mit ALL hinsichtlich der Dosierung und der Nebenwirkungen untersucht [Silverman, 2018]. Die erfolgreichen *in vitro* Experimente geben Hoffnung, dass in der Zukunft spezifische Hemmstoffe gegen AKT und mTOR in Kombination mit Hemmstoffen gegen bereits etablierte Tyrosinkinase-Targets (BCR-ABL und Flt3) in einem präklinischen Tiermodell Verwendung finden könnten. Hierbei könnten die Effekte einer kombinierten Therapie im Vergleich zu den Monotherapien mit den genannten Inhibitoren auf das Wachstum von ALL-Zellen *in vivo* in NSG-Mäusen analysiert werden. Insbesondere wäre es interessant Zellpopulationen, die unter Behandlung der ALL-Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren und Inhibitorkombinationen entstehen könnten, über längere Zeit mithilfe der RGB-Farbcode-Markierung zu studieren

[Weber et al., 2011]. Dabei sind insbesondere die Zellklone von Interesse, die unter Hemmstoff-Behandlung klonale Effekte, wie eine Resistenz zeigen. Diese resistenten Zellen können sich ebenfalls mit der Zeit verändern. Insbesondere Hochrisiko-Verlaufsformen zeichnen sich durch eine Therapieresistenz aus. Beim Krebs handelt es sich um ein bewegliches Ziel, der unter Therapie häufig eine Mikroevolution durchwandelt [McGranahan und Swanton, 2017].

## 5.9 Perspektive: SHIP1, Ikaros und AKT

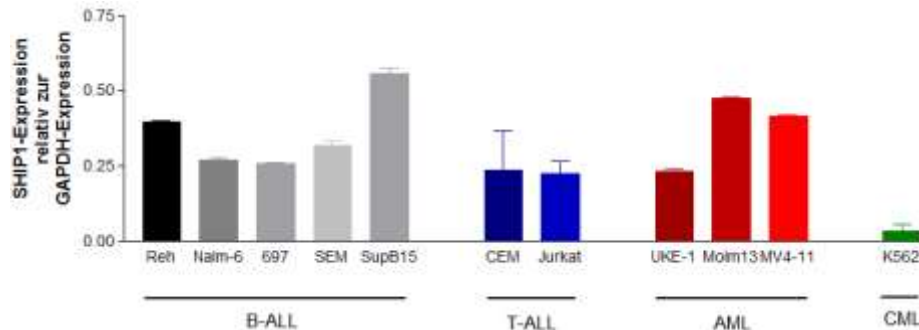
Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten weisen grundsätzlich auf eine Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 in der Leukämogenese der ALL hin. Die Tumorsuppressorfunktion von SHIP1 spielt vermutlich insbesondere bei den ALL-Zellen eine Rolle, bei denen die Tumorsuppressorfunktion des zweiten negativen Regulators des PI3K/AKT-Signalwegs PTEN verloren gegangen ist.

Eine pharmakologische Intervention, die allein auf die Regulation der SHIP1-Aktivität oder Expression zielt, scheint dabei jedoch wenig vielversprechend zu sein. Jedoch könnte eine Rekonstitution der SHIP1-Expression in ALL-Zellen mit verminderter SHIP1-Expression die Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit PI3K/AKT/mTOR-Hemmstoffen erhöhen. Insbesondere die Heterogenität der ALL-Subtypen erschwert eine generelle Therapiestrategie, die direkt auf SHIP1 abzielt. In Tel/AML1- und BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen scheint SHIP1 prinzipiell stark hochreguliert zu sein, während SHIP1 in B-ALL-Zellen mit MLL-Translokation und in der T-ALL stark herunterreguliert zu sein scheint. Ein Grund für die starke SHIP1-Expression in einem Teil der B-ALL-Zellen könnte darin liegen, dass maligne B-Zellen aufgrund einer starken Rückkopplung gegenüber der BZR-Signalgebung einen Überlebensvorteil bei der B-Zell-Selektion besitzen. Die genauere Analyse zeigt, dass die Wiederherstellung der Ikaros-Wildtyp-Expression die starke Expression von SHIP1 dabei auf ein angemessenes Niveau reduzieren kann und damit den Schwellenwert für eine mögliche AIC-Aktivierung senkt. Eine mögliche pharmakologische Intervention könnte somit auf die Rekonstitution der Ikaros-Aktivität in ALL-Zellen mit dominant-negativen Ikaros-Isoformen abzielen.

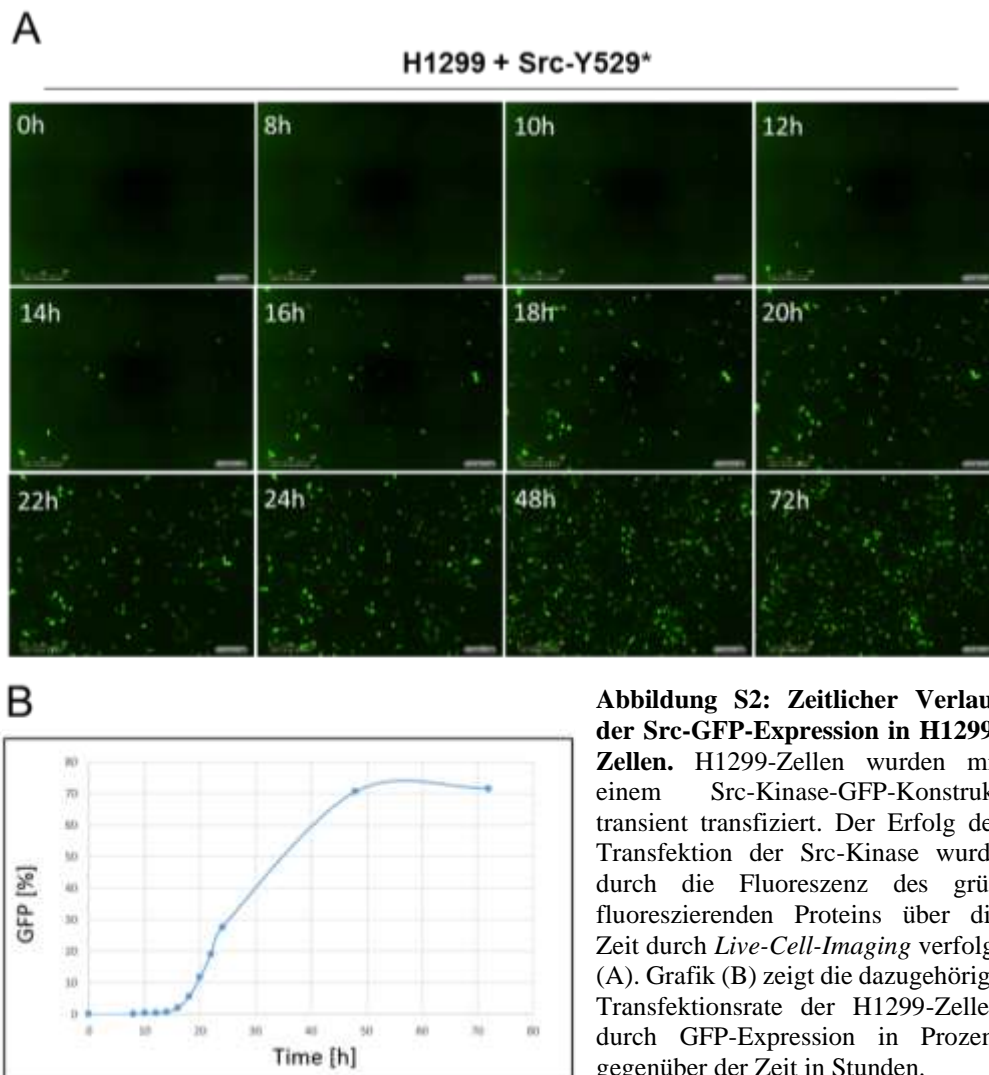
Grundsätzlich kann in allen untersuchten ALL-Zellen eine SHIP1-abhängige Reduzierung der AKT-S473 Phosphorylierung beobachtet werden. Interessanterweise führt der Verlust von SHIP1 in der BCR-ABL-positiven SupB-15-Zelllinie zu einer Reduzierung der Phosphorylierung von Phosphotyrosin-abhängigen Proteinen wie Fes-, Src- und Tec-Kinasen. Demgegenüber führt der Verlust von SHIP1 in der Tel/AML1-positiven Reh-Zelllinie zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Phosphotyrosin-abhängigen Proteinen wie EPHA1, Src- und Tec-Kinasen. Vielmehr kann gezeigt werden, dass die Expression und damit auch die Aktivität von SHIP1, insbesondere in den Hochrisikogruppen, über aberrant aktivierte Tyrosinkinase, wie BCR-ABL und Flt3 reguliert wird. Eine pharmakologische Intervention, die gegen die zentralen Schaltstellen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und gegen die ebenfalls in ALL-Zellen häufig fehlregulierten Tyrosinkinase BCR-ABL und Flt3 gerichtet ist, erscheint als neuer vielversprechender kombinatorischer Therapie-Ansatz. Diese Kombinations-Therapie sollte in weiterführenden Experimenten sowie in einem Tiermodell für die B-ALL tiefgehend auf ihre Wirksamkeit untersucht werden.

## 6 Supplement

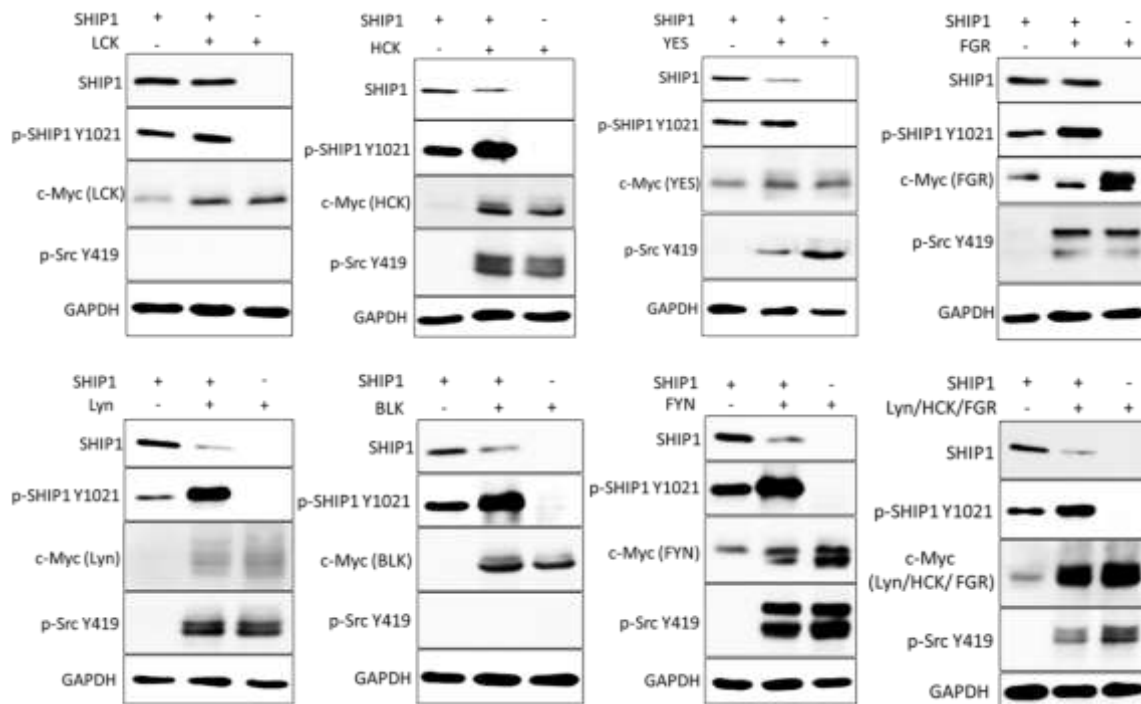
### 6.1 Daten



**Abbildung S1: mRNA-Expression von SHIP1 in ALL-, AML- und CML-Zelllinien.** Die Expression von SHIP1 wurde auf mRNA-Ebene in B- und T-ALL-, AML- und CML-Zelllinien untersucht. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe.



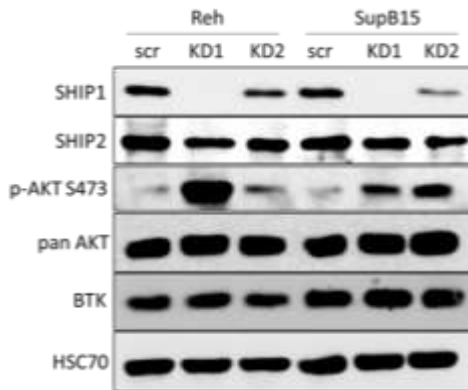
**Abbildung S2: Zeitlicher Verlauf der Src-GFP-Expression in H1299-Zellen.** H1299-Zellen wurden mit einem Src-Kinase-GFP-Konstrukt transient transfiziert. Der Erfolg der Transfektion der Src-Kinase wurde durch die Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins über die Zeit durch *Live-Cell-Imaging* verfolgt (A). Grafik (B) zeigt die dazugehörige Transfektionsrate der H1299-Zellen durch GFP-Expression in Prozent gegenüber der Zeit in Stunden.



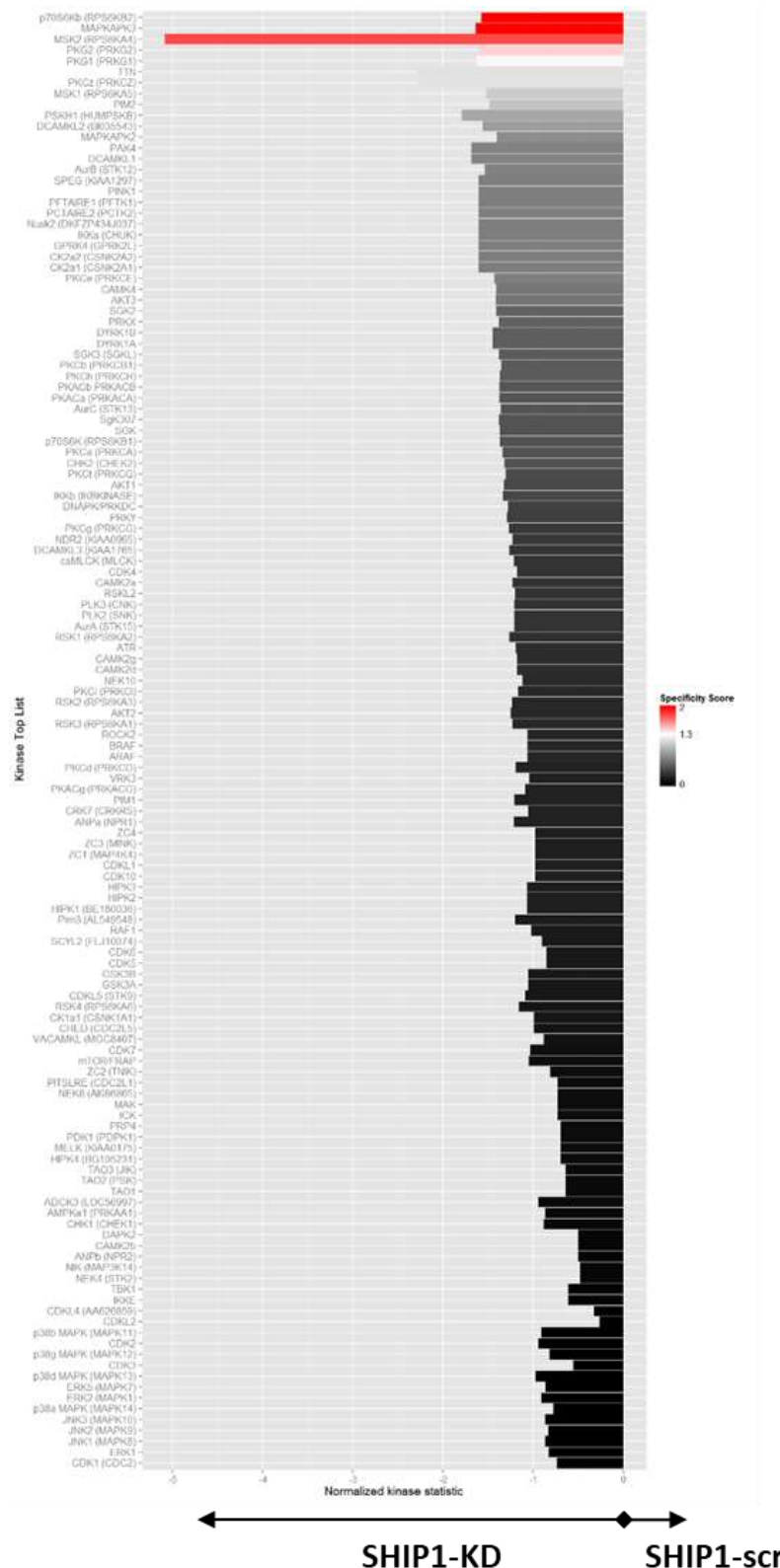
**Abbildung S3: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 durch die Src-Kinase-Familie.** Die Veränderung der Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen vor und nach transientser Transfektion mit den einzelnen Mitgliedern der Src-Kinase-Familie untersucht. Hierzu wurden stabil SHIP1-exprimierende Zellen und Kontrollvektor-exprimierende Zellen jeweils mit einem Mitglied der Src-Kinase-Familie (Lck, Hck, Yes, Fgr, Lyn, Blk und Fyn) oder der Kombination aus Lyn, Hck und Fgr sowie dem Kontrollvektor transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

**Tabelle S1: Einfluss der Src-Kinase-Familienmitglieder auf die relative SHIP1- und p-SHIP1-Y1021-Expression**

	Relative SHIP1-Expression ohne Src	Relative SHIP1-Expression mit Src	Relative p-SHIP1-Y1021-Expression ohne Src	Relative p-SHIP1-Y1021-Expression mit Src
Blk	100	47,5	100	200
Fgr	100	75	100	160
Fyn	100	40	100	184
Hck	100	60	100	176
Lck	100	87	100	124
Lyn	100	29	100	307
Yes	100	65,5	100	140
Lyn+Hck+Fgr	100	25	100	207
Src	100	67	100	212
Src-Y529*	100	31	100	495

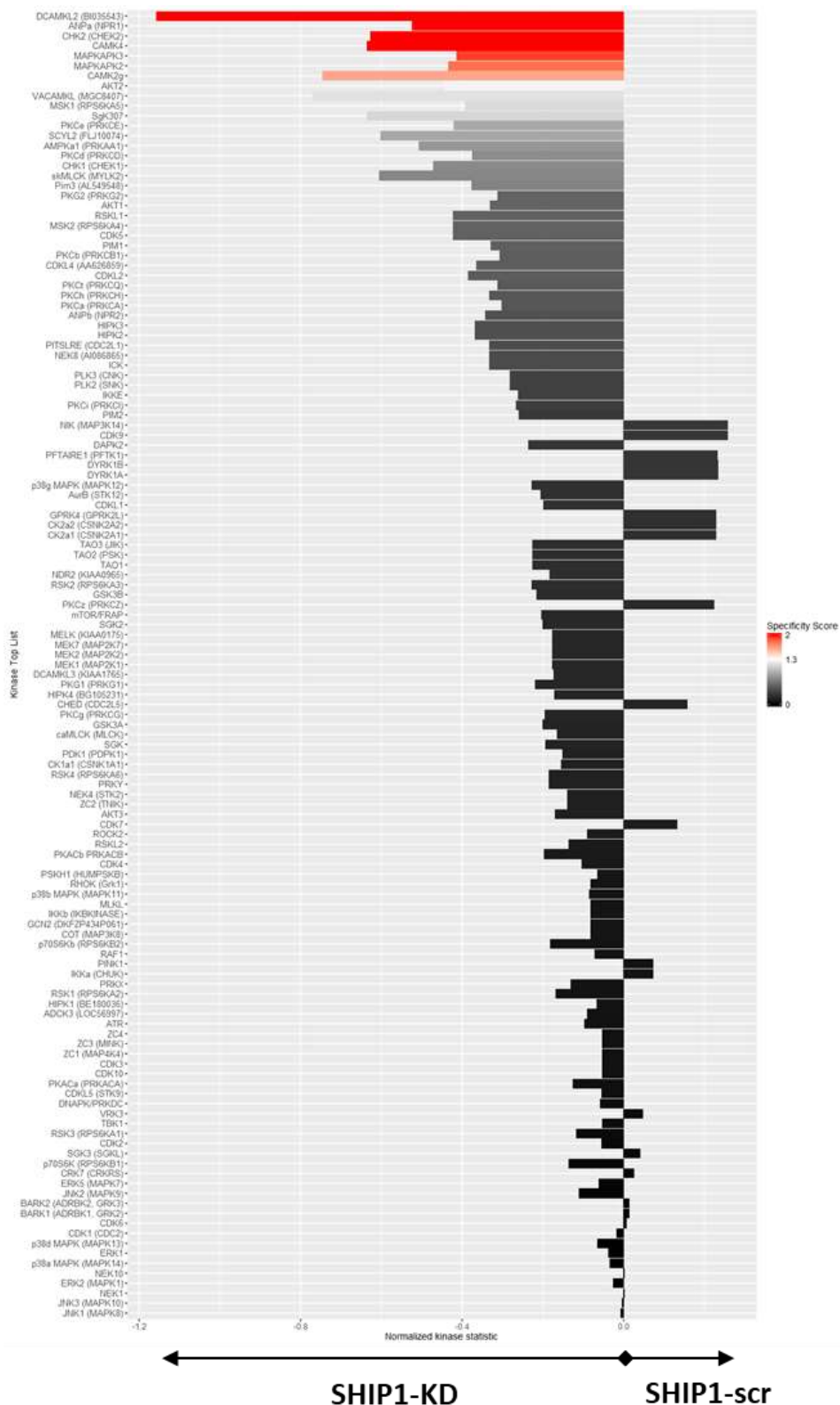


**Abbildung S4: Etablierung von SHIP1-Knockdown B-ALL-Zellen.** Zur Etablierung eines spezifischen SHIP1-Knockdowns in B-ALL-Zellen wurden zwei verschiedene SHIP1-shRNA Vektoren getestet. Hierzu wurden Reh- und SupB-15-Zellen mit lentiviralen Partikeln, die jeweils die Vektoren SHIP1-shRNA1 (KD1) und SHIP1-shRNA2 (KD2) enthielten, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. Die Veränderung der Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

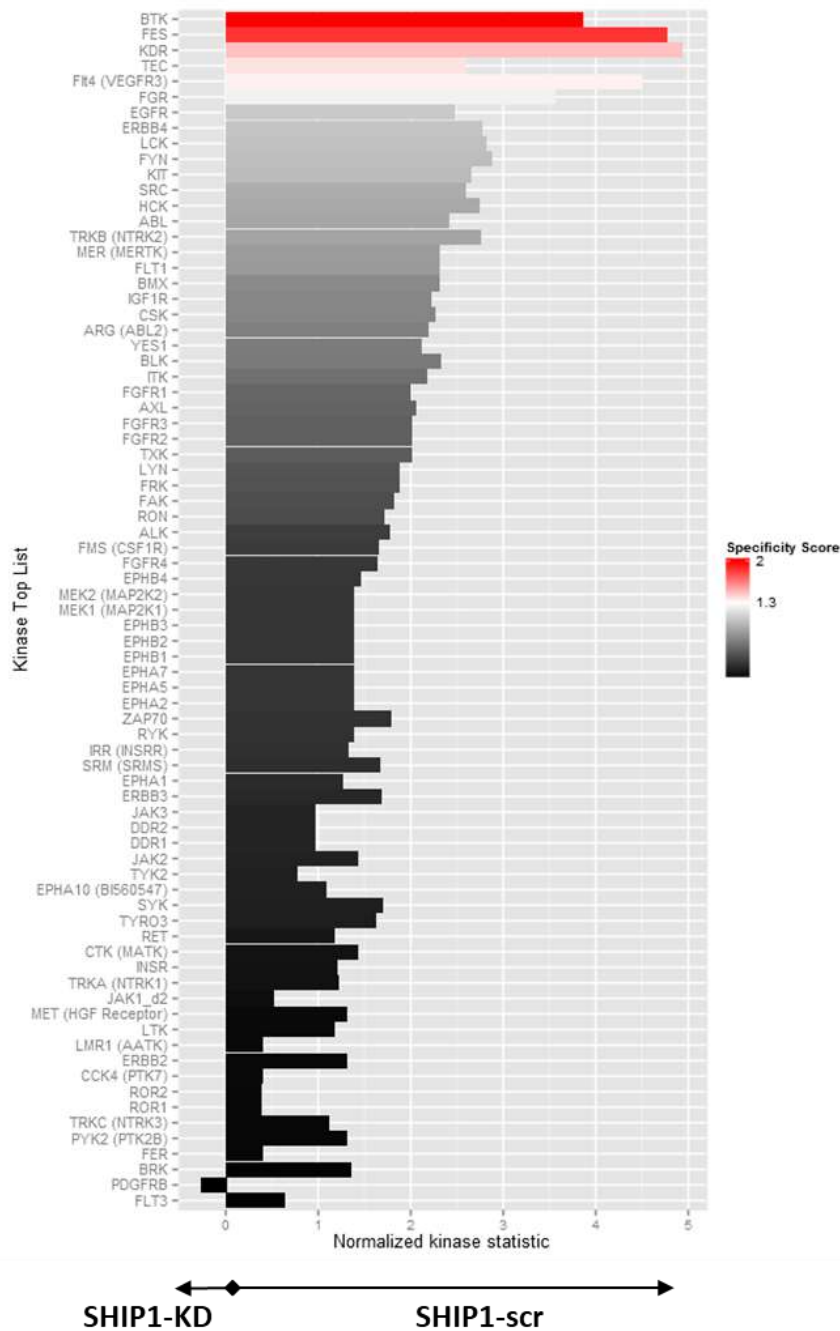


**Abbildung S5: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.** Endogen SHIP1-exprimierende SupB-15-Zellen wurden mit lentiviralen SHIP1-shRNA-Vektoren transduziert. Infolge des SHIP1-spezifischen Knockdowns in SupB-15-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Serin/Threonin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus scr- (Kontrolle) und SHIP1-Knockdown-exprimierenden SupB-15-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Serin/Threonin-Phosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.

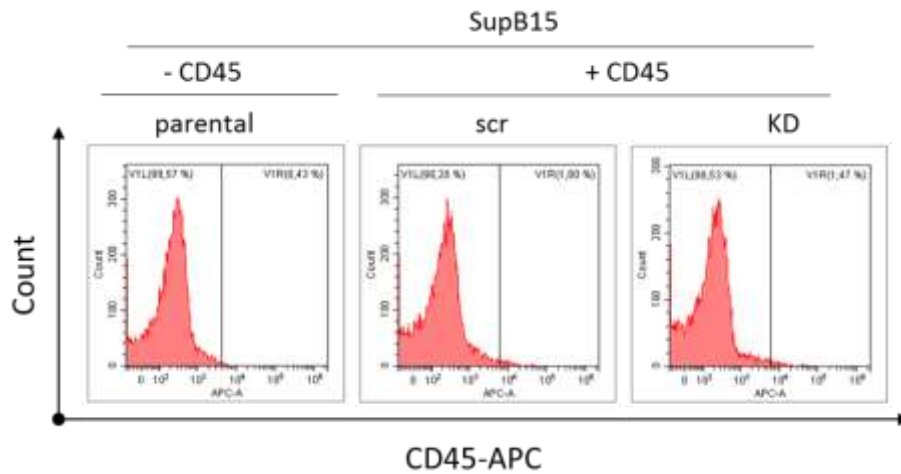




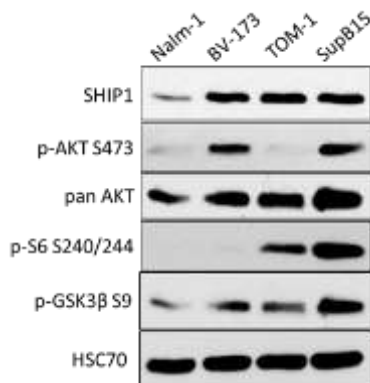
**Abbildung S6: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in Reh-Zellen.** Endogen SHIP1-exprimierende Reh-Zellen wurden mit lentiviralen SHIP1-shRNA-Vektoren transduziert. Infolge des SHIP1-spezifischen Knockdowns in Reh-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Serin/Threonin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus scr- (Kontrolle) und SHIP1-Knockdown-exprimierenden Reh-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Serin/Threonin-Phosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.



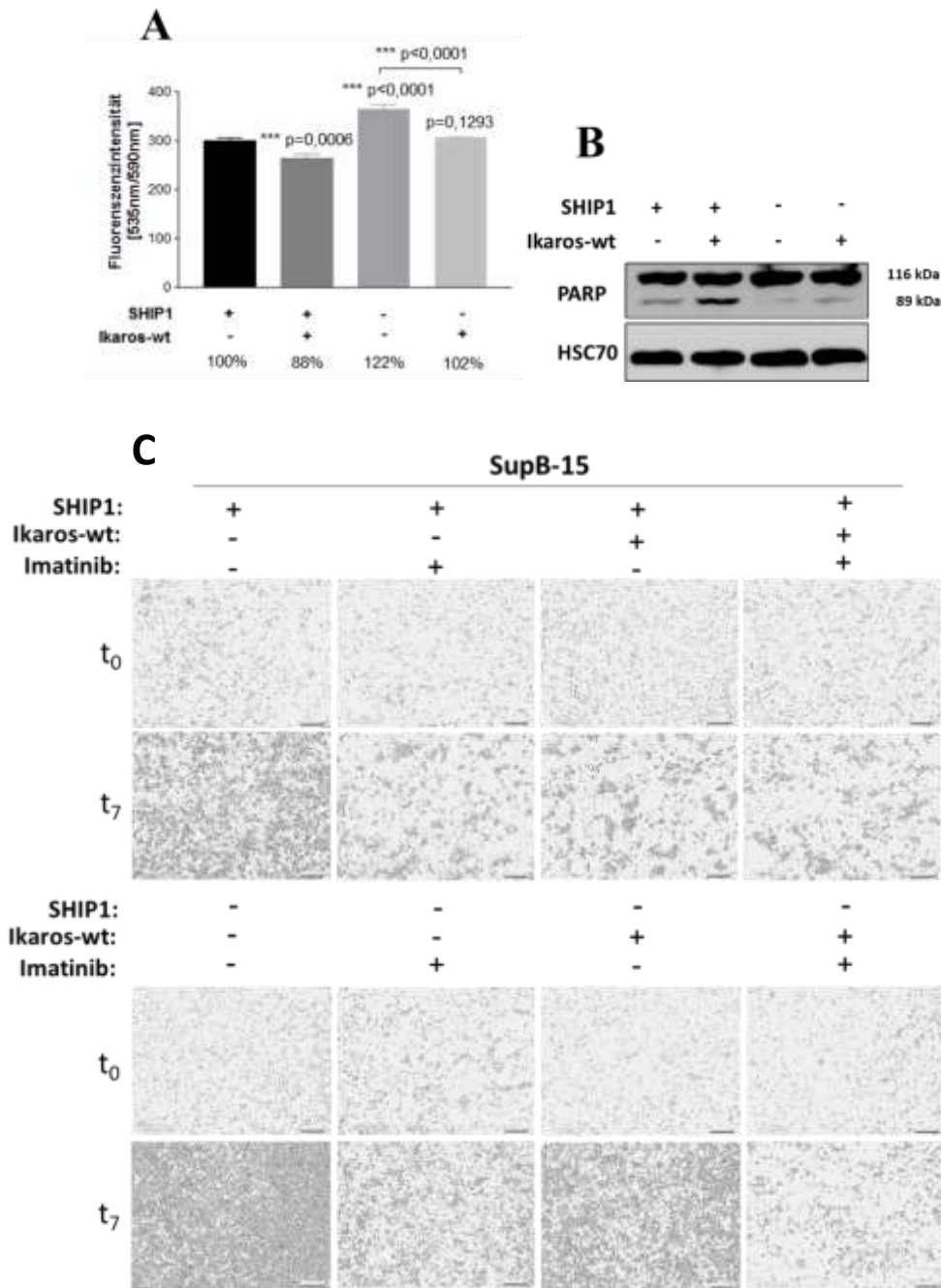
**Abbildung S7: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.** Endogen SHIP1-exprimierende SupB-15-Zellen wurden mit lentiviralen SHIP1-shRNA-Vektoren transduziert. Infolge des SHIP1-spezifischen Knockdowns in SupB-15-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus scr- (Kontrolle) und SHIP1-Knockdown-exprimierenden SupB-15-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Tyrosinphosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.



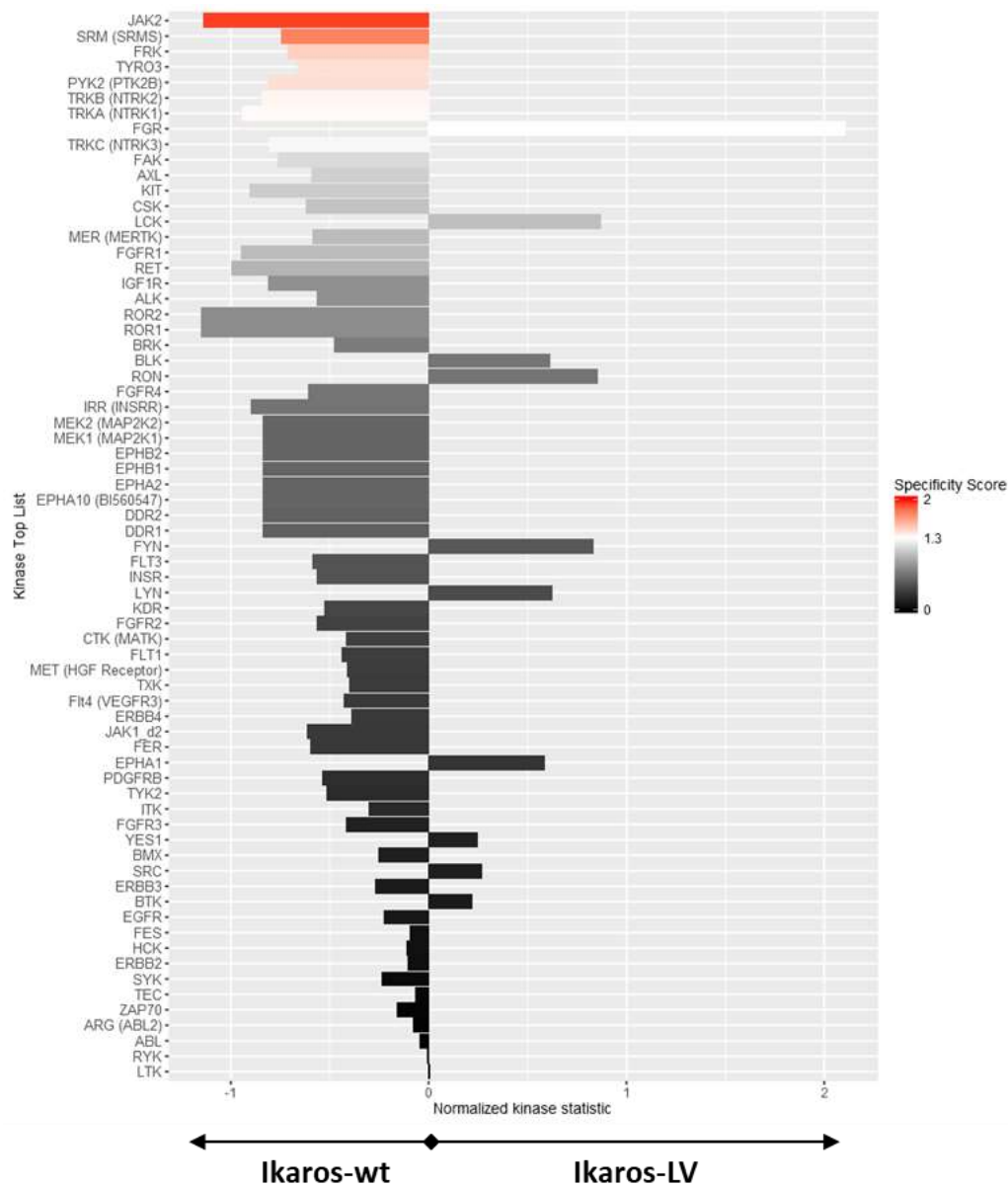
**Abbildung S8: Analyse der Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown in SupB-15 B-ALL-Zellen.** Zur Untersuchung der veränderten Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown wurden SupB-15-scr-Kontrollzellen und SupB-15-SHIP1-KD-Zellen nach CD45-APC-Färbung durchflusszytometrisch analysiert.



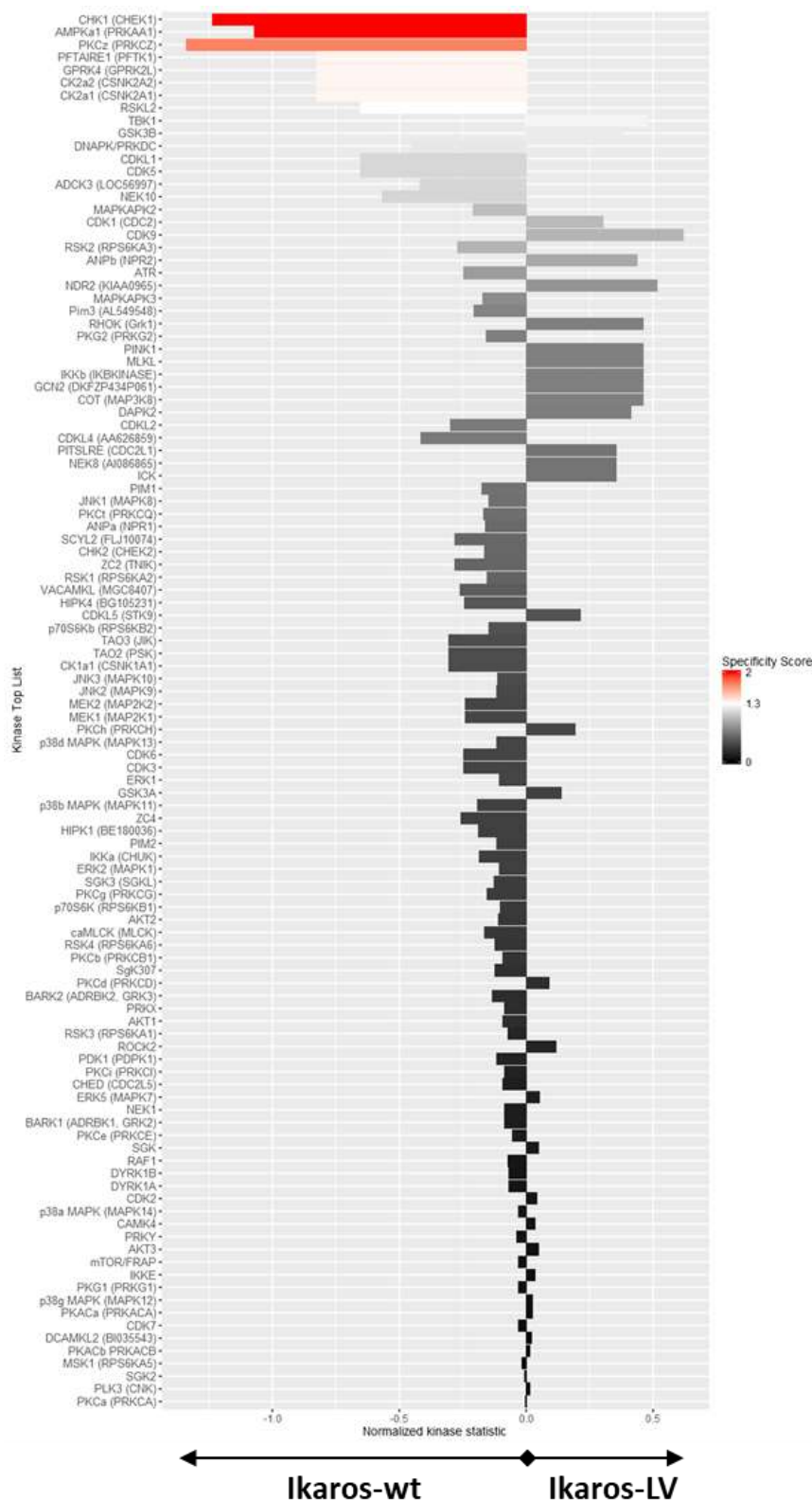
**Abbildung S9: Untersuchung der Protein-Expression von SHIP1 in Ph-positiven Zelllinien.** Die Expression von SHIP1 und weiterer Proteine des AKT-Signalwegs wurden auf Proteinebene in Ph-positiven Zelllinien untersucht. Es wurden zwei ALL-Zelllinien (TOM-1 und SupB-15) und zwei Zelllinien in der Blastenkrise (Nalm-1 und BV-173) analysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.



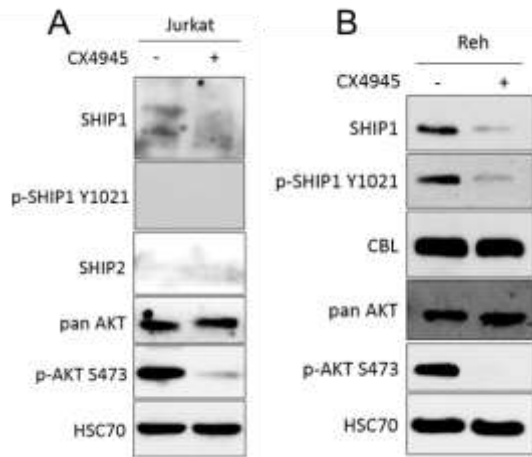
**Abbildung S10: Untersuchung des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Zellviabilität und die Zell-Apoptose sowie auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen nach Imatinib-Behandlung.** Zur Untersuchung des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Viabilität und Apoptose von Ph-positiven B-ALL-Zellen wurden stabil SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-exprimierende SupB15-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (A). Zudem wurden parallel Proteinlysate mittels Western Blot analysiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die gesteigerte Apoptose der Zelle wird durch die Spaltung der Vollformenform der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP; 116 kDa) dargestellt (B). Zur Untersuchung des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt in Kombination mit einer Imatinib-Behandlung auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven B-ALL-Zellen wurden SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> und SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>-Zellen in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät und entsprechend mit DMSO oder 500 nM Imatinib behandelt. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sieben Tage verfolgt. (C) Die Abbildung zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am siebten Tag der Messung (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



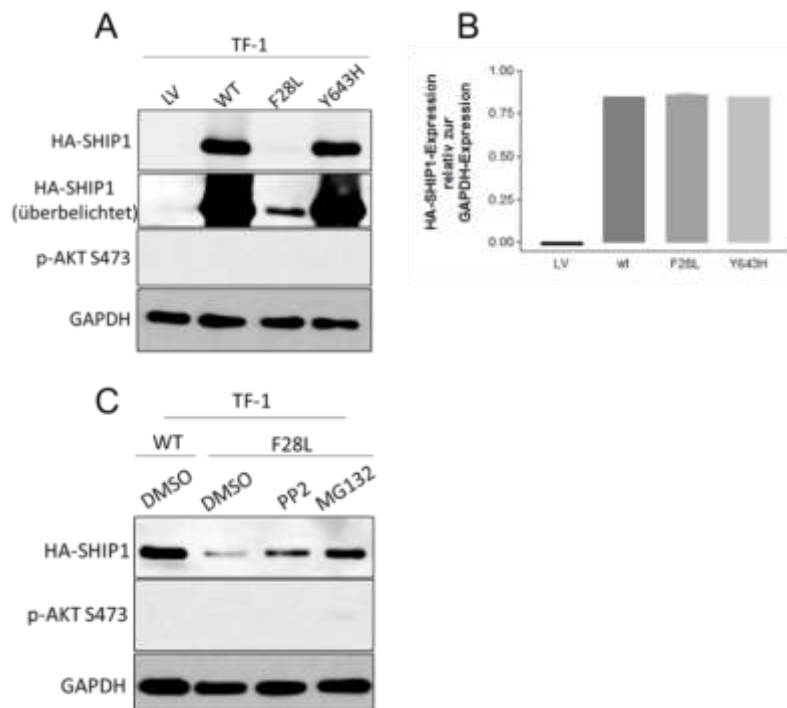
**Abbildung S11: Analyse des Einflusses von Ikaros auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.** Endogen Ikaros-Isoform 6-exprimierende SupB-15-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für Ikaros-wt und den Leervektor codieren, transduziert. Infolge der Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression in SupB-15-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Tyrosin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus Leervektor- und Ikaros-wt-exprimierenden SupB-15-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Tyrosinphosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.



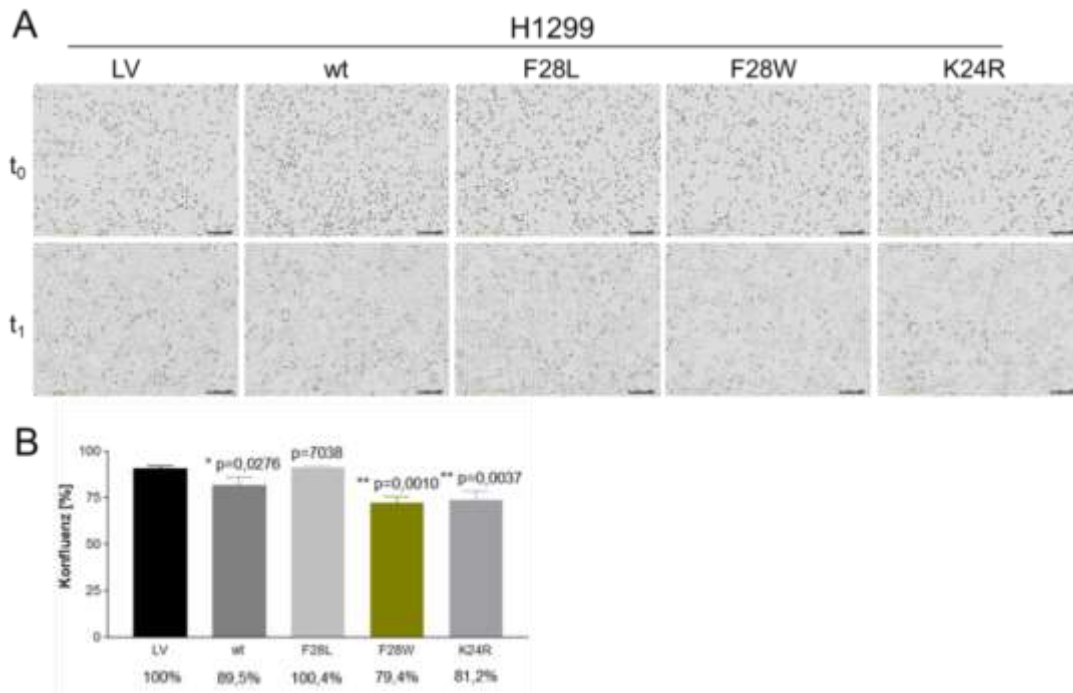
**Abbildung S12: Analyse des Einflusses von Ikaros auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.** Endogen Ikaros-Isoform 6-exprimierende SupB-15-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für Ikaros-wt und den Leervektor codieren, transduziert. Infolge der Wiederherstellung der Ikaros-wt-Expression in SupB-15-Zellen wurde die veränderte Phosphorylierung von Serin/Threonin-abhängigen Kinasen untersucht. Hierzu wurden aus Leervektor- und Ikaros-wt-exprimierenden SupB-15-Zellen MPER-Proteinlysate hergestellt. Diese Proteinlysate wurden als dreifach Bestimmung in die Vertiefungen des Biochips der PamStation aufgetragen und auf Serin/Threonin-Phosphorylierungsänderungen von unterschiedlichen Kinasen mit spezifischen Peptiden hin vermessen. Das Diagramm zeigt die Kinasen entsprechend der Spezifität gemäß der Farbskala von rot bis schwarz und somit von sehr spezifisch bis schwach spezifisch geordnet an. Die Länge der einzelnen Balken entspricht der Stärke der Änderung der Phosphorylierung.



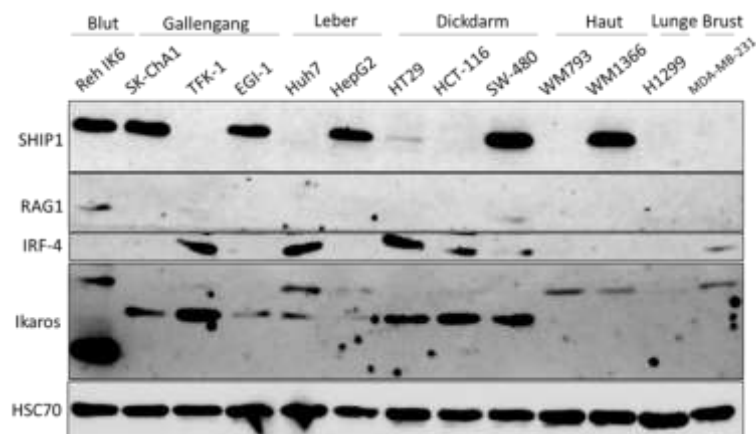
**Abbildung S13: Untersuchung des Einflusses der Hemmung der Casein Kinase 2 auf den AKT-Signalweg.** Die Veränderung der endogenen Expression von SHIP1 und p-AKT-S473 wurde auf Proteinebene für die ALL-Zelllinien Jurkat (A) und Reh (B) vor und nach Behandlung mit dem CK2-Inhibitor CX4945 untersucht. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 24 h mit 10  $\mu$ M CX4945 oder DMSO behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.



**Abbildung S14: Untersuchung der Stabilität der SHIP1-F28L-Mutante.** TF-1-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für SHIP1-wt, SHIP1-F28L, SHIP1-Y643H und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen erfolgte nach der Transduktion mit Puromycin. Zwei Wochen nach der Transduktion wurden jeweils Proteinlysate durch TCE-Fällung erstellt. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Drei Wochen nach der Transduktion wurde zudem jeweils die RNA der transduzierten Zellen isoliert. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde aus der jeweiligen cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Es wurden spezifische Oligonukleotide für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) (B) verwendet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen der jeweiligen Probe. Zur Untersuchung der Wiederherstellung von SHIP1-F28L auf Proteinebene wurden stabil SHIP1-F28L-exprimierende TF-1-Zellen mit dem Src-Kinase Inhibitor PP2 und dem proteasomalen Inhibitor MG132 behandelt. Hierzu wurden die TF-1-Zellen für 24 h mit 10  $\mu$ M PP2, MG132 oder DMSO behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (C) [publiziert in Ehm et al., 2019].

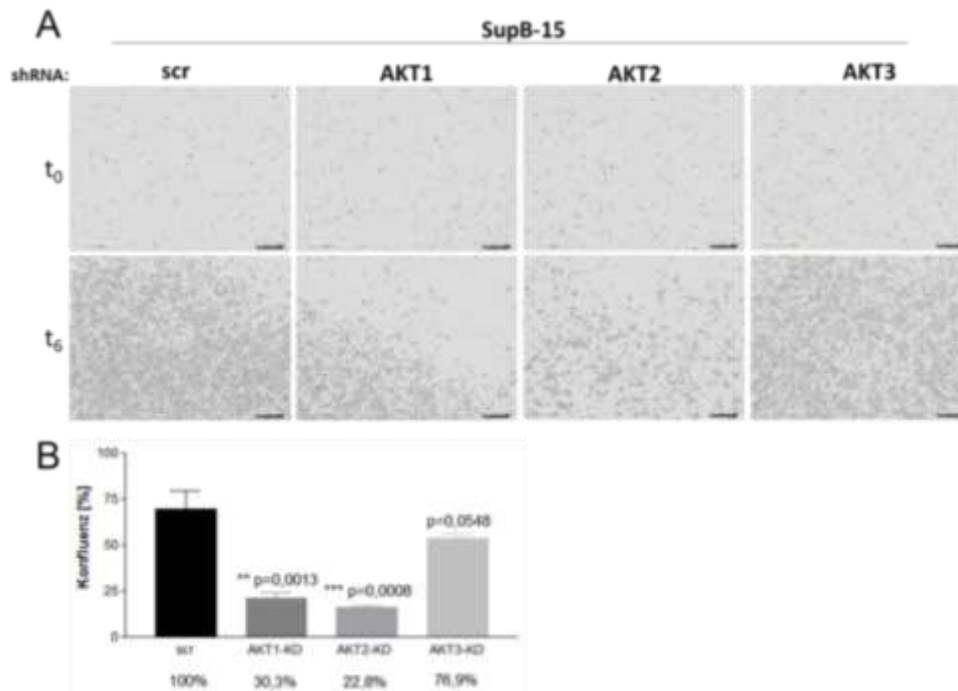


**Abbildung S15: Analyse des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf das Wachstumsverhalten von H1299-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf das Wachstumsverhalten von H1299-Zellen wurden Kontrollvektor-, SHIP1-wt-, SHIP1-F28L-, SHIP1-F28W- und K24R-exprimierende H1299-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über 24 Stunden verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen nach 24 Stunden. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) [publiziert in Ehm et al., 2019].

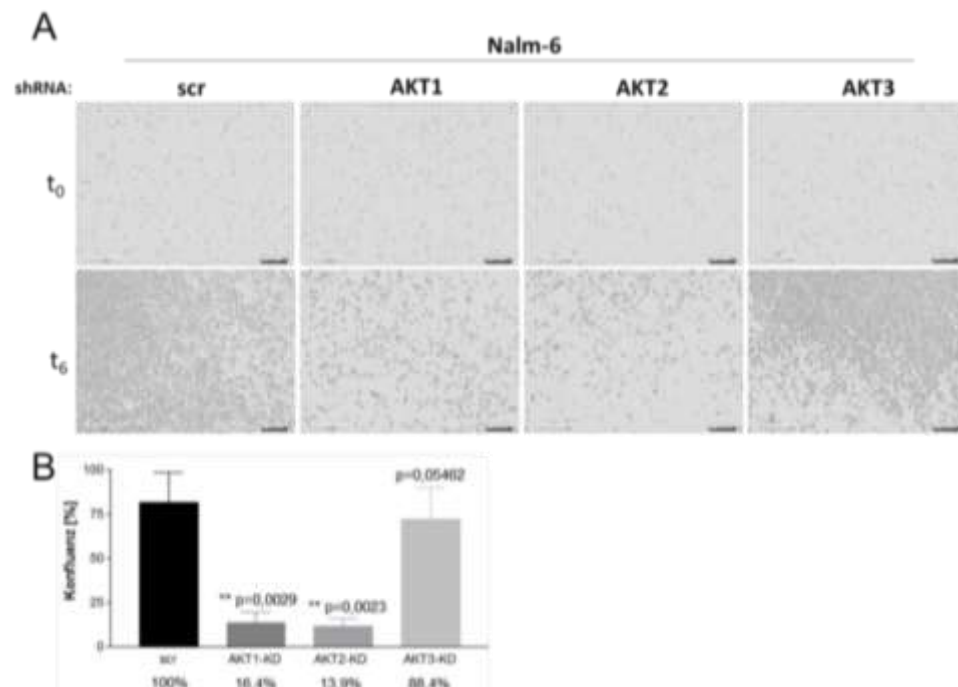


**Abbildung S16: Identifikation der Protein-Expression von RAG1 und IRF-4 in Karzinomzelllinien.** Die Expression von SHIP1, RAG1, IRF-4 und Ikaros wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien auf Proteinebene im Vergleich zu der Expression in der B-ALL-Zelllinie Reh untersucht. Hierzu wurden stabil Ikaros-Isoform 6-exprimierende Reh-Zellen sowie Sk-ChA1-, TFK-1-, EGI-1-, Huh7-, HepG2-, HT29-, HCT-116-, SW-480-, WM793-, WM1366-, H1299- und MDA-MB-231-Zellen durch TCE-Fällung lysiert. Es wurden jeweils 50  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimierten Proteine SHIP1, RAG1, IRF-4 und Ikaros werden in den untersuchten Karzinomzelllinien exprimiert. RAG wird schwach-exprimierend in TFK-1- und SW-480-Zellen detektiert. IRF-4 wird in 6 von 12 Fällen identifiziert (TFK-1, Huh7, HT-29, HCT-116, SW-480 und MDA-MB-231). Interessanterweise wird SHIP1 insbesondere in den Zelllinien mit starker IRF-4-Expression kaum bis gar nicht exprimiert.

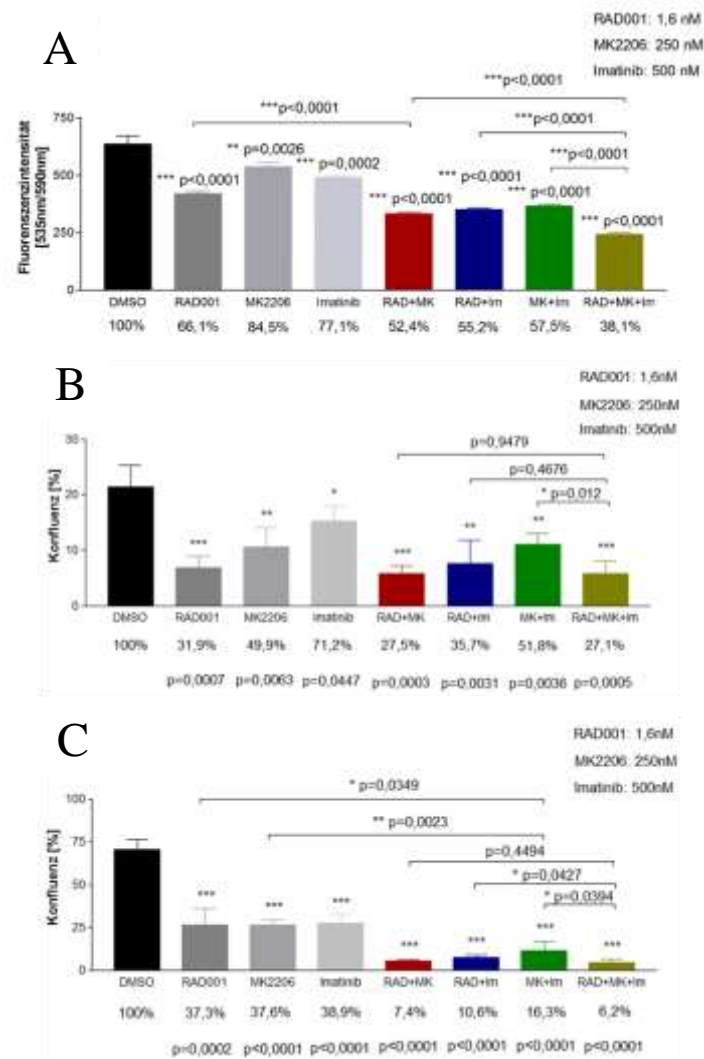




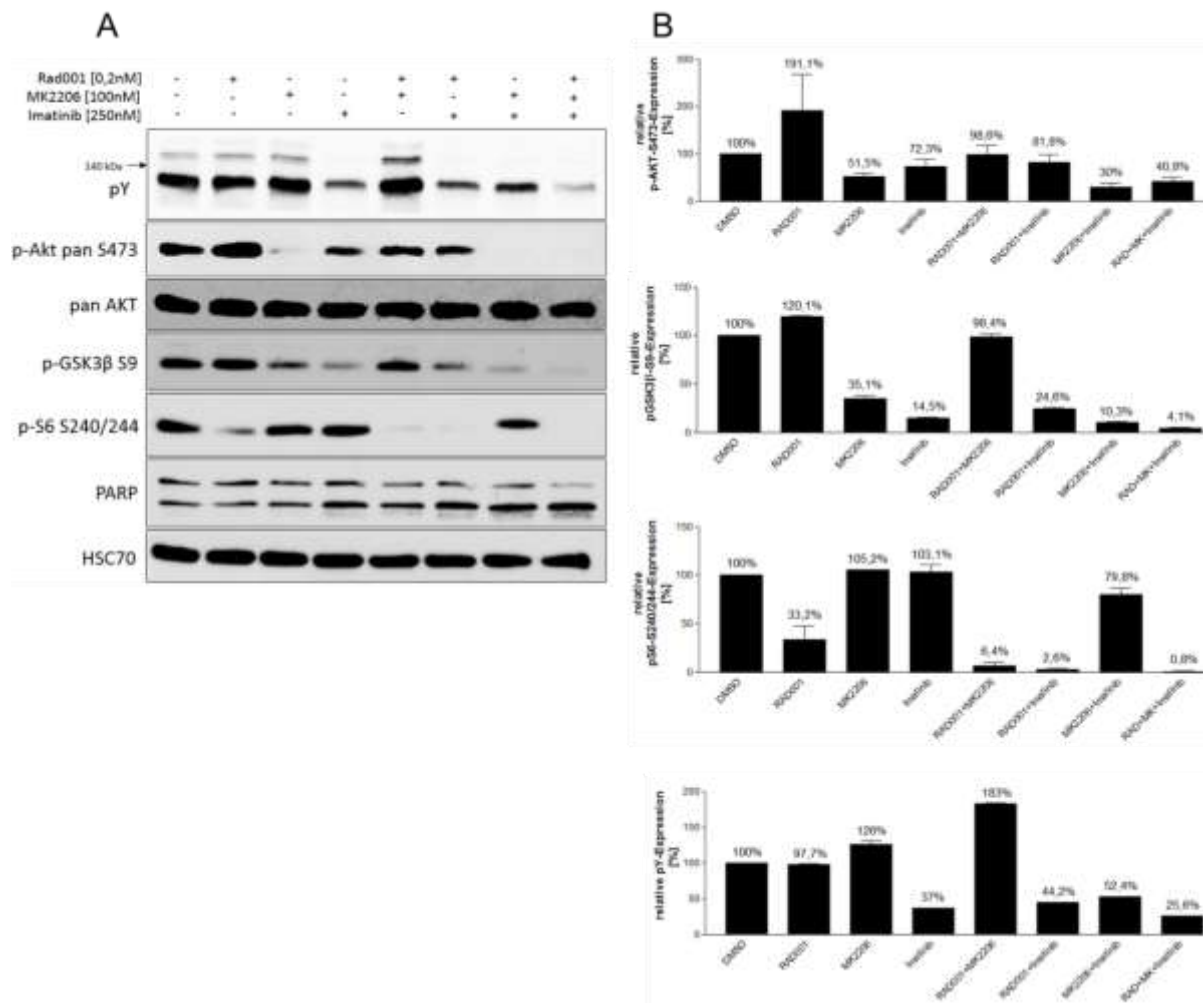
**Abbildung S17: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von SupB-15-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen wurden SupB-15-scr, SupB-15-AKT1-KD, SupB-15-AKT2-KD und SupB-15-AKT3-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sechs Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am sechsten Tag der Messung. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die shRNA-scr-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



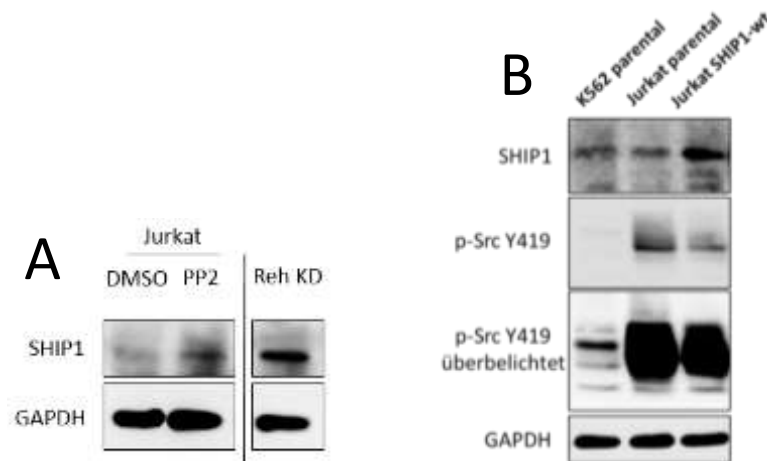
**Abbildung S18: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von Nalm-6-Zellen.** Zur Untersuchung des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen wurden Nalm-6-scr, Nalm-6-AKT1-KD, Nalm-6-AKT2-KD und Nalm-6-AKT3-KD-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sechs Tage verfolgt (A). (B) zeigt die Analyse der Konfluenz der Zellen am sechsten Tag der Messung. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die shRNA-scr-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



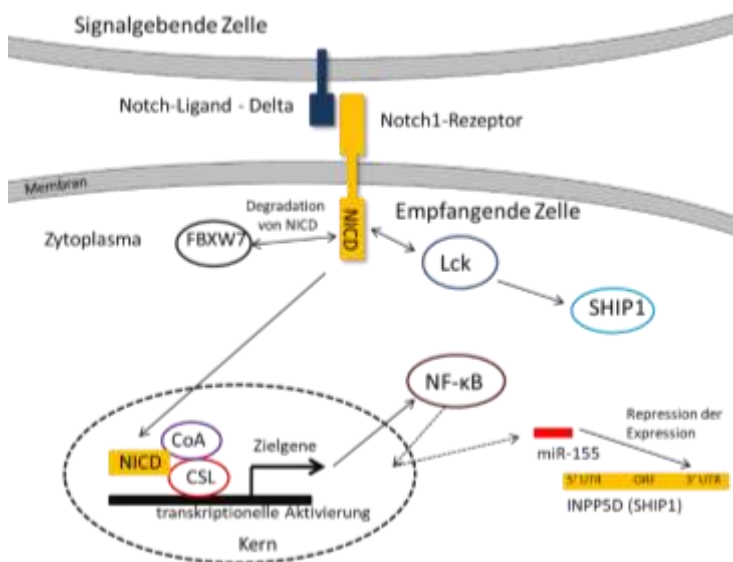
**Abbildung S19: Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes zur Behandlung der ALL.** Zur Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes für die Behandlung der ALL wurden SupB-15 B-ALL-Zellen mit DMSO, 1,6 nM RAD001, 250 nM MK2206, 500 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelt und die Zellviabilität sowie das Wachstumsverhalten dieser Zellen mittels *Live-Cell-Imaging* untersucht. Die behandelten Zellen wurden jeweils in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. Zwei Tage nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (A). Parallel wurden die behandelten Zellen jeweils in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 200  $\mu$ l Medium ausgesät. Unter Verwendung einer *Live-Cell-Imaging*-Analyse-Plattform wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sieben Tage verfolgt. (B) zeigt die Zellkonfluenz nach zwei Tagen und (C) nach sieben Tagen. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die DMSO-behandelten Zellen (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).



**Abbildung S20: Der Einfluss einer kombinatorischen Therapie zur Behandlung der ALL auf die Signaltransduktion von ALL-Zellen mit geringeren Konzentrationen.** Zur Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes für die Behandlung von ALL-Zellen *in vitro* wurde der AKT-Signaltransduktionsweg in BCR-ABL-positiven SupB-15-Zellen tiefgehend analysiert. Hierzu wurden SupB-15-Zellen mit verschiedenen Kombinationen der Hemmstoffe RAD001, MK2206 und Imatinib behandelt. Die Zellen wurden mit DMSO, 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206, 250 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelt (A). Die Zellen wurden jeweils für 48 Stunden mit den Hemmstoffen und Hemmstoffkombinationen behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. (B) zeigt die Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression, der relativen p-GSK3β-S9-Expression, der relativen p-S6-S240/244-Expression und der relativen Phosphotyrosin-Expression (pY) für die mit DMSO, 0,2 nM RAD001, 100 nM MK2206, 250 nM Imatinib und in verschiedenen Hemmstoff-Kombinationen dieser Konzentrationen behandelten Zellen.

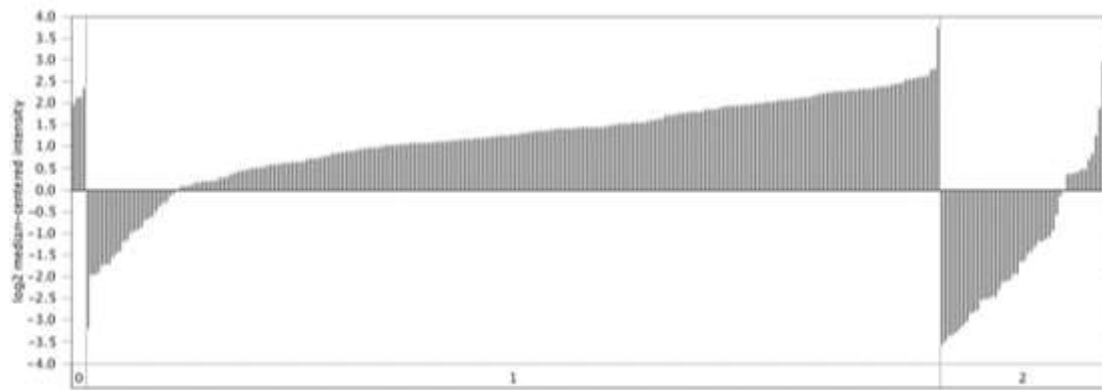


**Abbildung S21: Untersuchung der Wiederherstellung von endogenem SHIP1 in Jurkat-Zellen nach Intervention mit einem Src-Kinase-Hemmstoff.** (A) Die endogene Expression von SHIP1 wurde auf Proteinebene in Jurkat-Zellen vor und nach Behandlung mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 untersucht. Hierzu wurden parentale Jurkat-Zellen für 24 h mit 10  $\mu$ M PP2 oder DMSO behandelt. Zum Vergleich der Expressionsstärke von SHIP1 in Jurkat-Zellen wurden zudem Reh-Zellen mit spezifischem SHIP1-Knockdown (Expression <10 % von endogenem SHIP1) als Kontrolle verwendet. Es handelt sich um dieselbe Membran mit derselben Belichtungsstärke. Diese wurde jedoch entsprechend geschnitten. Die Inhibierung der Src-Kinase-Familie mittels des Src-Kinase-Inhibitors PP2 führt zu einer 3,12-fach stärkeren SHIP1-Expression im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen. (B) Bemerkenswerterweise zeigt die Jurkat-Zelllinie (parental als auch mit SHIP1-wt transduziert) eine relativ starke Aktivierung der Src-Kinase-Familie. Diese Phosphorylierung ist deutlich stärker als die Phosphorylierung der Src-Kinase-Familie (Y419) in der BCR-ABL positiven K562-Zelllinie. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 50  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

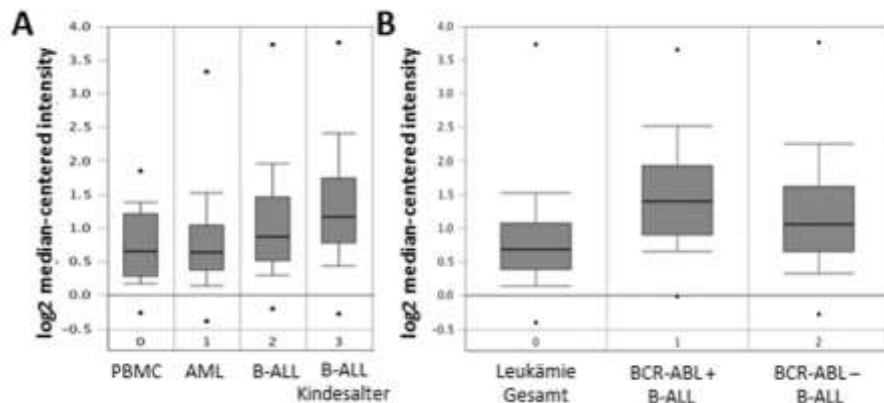


**Abbildung S22: Modell zum Einfluss des Notch-Rezeptors auf die Reduktion der SHIP1-Expression.**

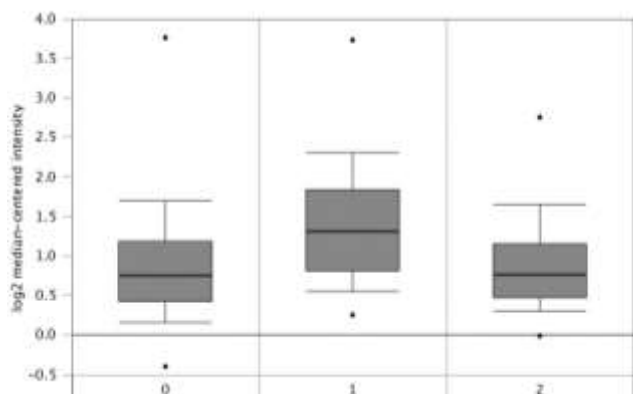
Nach Aktivierung des Notch-Rezeptors durch den Notch-Liganden Delta wird die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) proteolytisch abgespalten. Die NICD kann nun frei in den Kern gelangen und dort in einem Regulator-Komplex die Expression von Notch-Zielgenen regulieren [Espinosa et al., 2010]. Ein Zielgen ist NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B fördert die Transkription von miR-155 [Gerloff et al., 2015]. MiR-155 reprimiert die Expression von SHIP1 [O'Connell et al., 2009]. Darüber hinaus aktiviert Notch die Tyrosinkinase Lck, welche als Src-Kinase den proteasomalen Abbau von SHIP1 einleiten könnte [Sade et al., 2004]. Die Ubiquitin-Ligase FBXW7 ist an der Degradation von NICD beteiligt und in der T-ALL häufig mutiert [Girardi et al., 2017].



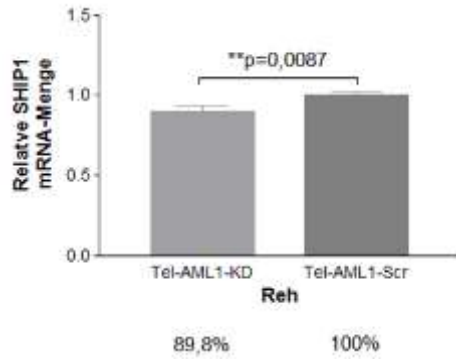
**Abbildung S23: SHIP1 mRNA-Expression in der B- und T-ALL des Kindesalters.** Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) zeigen einen erhöhten Verlust von SHIP1 auf mRNA-Ebene in primären T-ALL-Zellen. (0) CD10-Positive/CD19-Positive Hämatogone/normale B-Progenitoren (n = 4). (1) B-ALL des Kindesalters (n = 238). (2) T-ALL des Kindesalters (n = 46). Entnommen von der Krebs-Datenbank Oncomine aus dem Datensatz von Coustan-Smith et al., 2011.



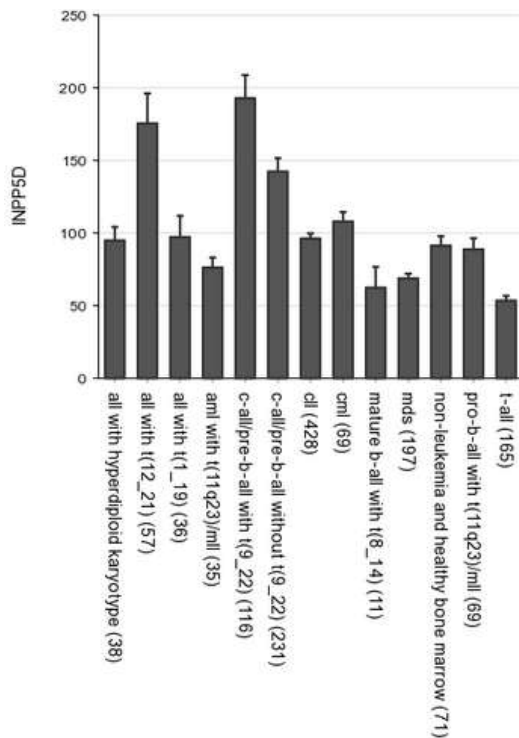
**Abbildung S24: SHIP1 mRNA-Expression in BCR-ABL-negativen und BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen.** Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) wurden aus der Krebs-Datenbank Oncomine entnommen. (A) Haferlach Leukemia (PBMC n = 74; AML n = 542; B-ALL n = 147; B-ALL des Kindesalters n = 359). (B) Haferlach Leukemia (Leukämien gesamt n = 1737; BCR-ABL positive B-ALL n = 122; BCR-ABL negative B-ALL n = 237). Entnommen von der Krebs-Datenbank Oncomine aus dem Datensatz von Haferlach et al., 2010.



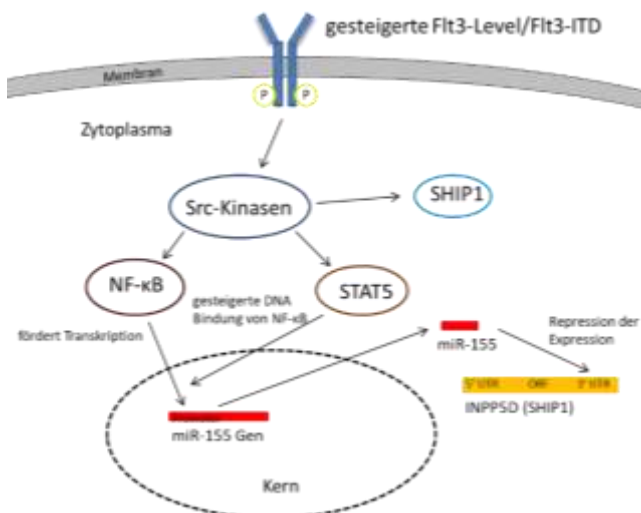
**Abbildung S25: SHIP1 mRNA-Expression in Tel/AML1-positiven und negativen B-ALL-Zellen.** Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) zeigen eine erhöhte SHIP1-Expression in Tel/AML1-positiven B-ALL-Zellen. (0) Leukämie Gesamt (n = 1962). (1) Tel/AML1-positive B-ALL (n = 58). (2) Tel/AML1-negative B-ALL (n = 76). Entnommen von der Krebs-Datenbank Oncomine aus dem Datensatz von Haferlach et al., 2010.



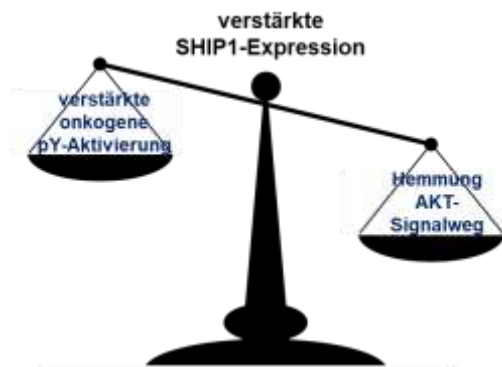
**Abbildung S26: SHIP1 mRNA-Expression vor und nach Herunterregulation von Tel/AML1 in Reh B-ALL-Zellen.** Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis (Geo: GSM734477 – GSM734482; Fuka et al., 2011) zeigen den Einfluss von Tel/AML1 auf die SHIP1-Expression nach Tel/AML1-Knockdown in Reh-Zellen (n = 8). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung (paired test; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



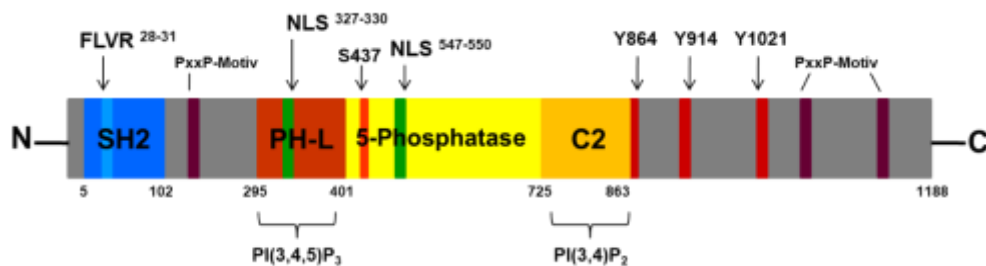
**Abbildung S27: SHIP1 mRNA-Expression in verschiedenen Subtypen der Leukämie.** Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) in verschiedenen Leukämie-Subtypen. Die Abbildung wurde unter Verwendung der Plattform für Genomanalyse und Visualisierung R2 aus dem Datensatz von Kohlmann et al., 2008 erstellt.



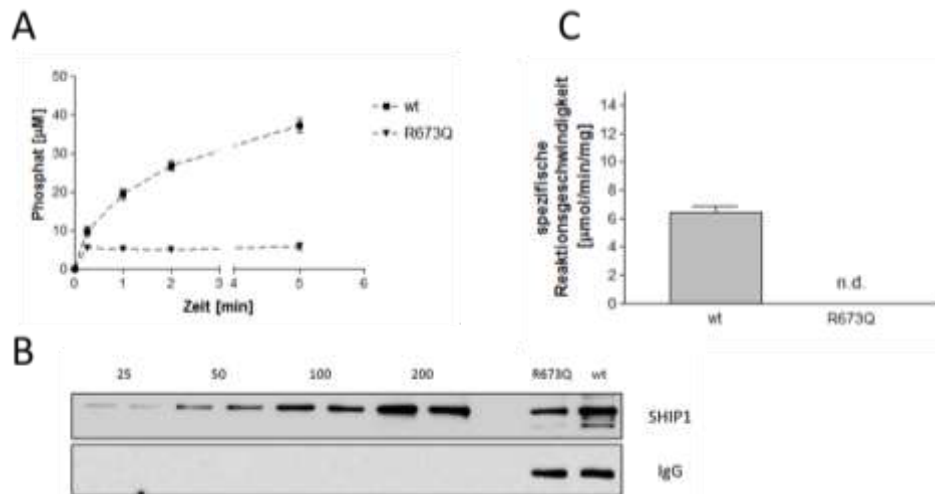
**Abbildung S28: Modell zum Einfluss des Flt3-Rezeptors auf die Reduktion der SHIP1-Expression.** Nach Aktivierung des Flt3-Rezeptors oder durch konstitutiv aktivierende Mutationen des Rezeptors werden Kinasen aus der Familie der Src-Kinasen aktiviert [Robinson et al., 2005]. Diese könnten SHIP1 direkt durch Phosphorylierung am NPXY-Motiv regulieren. Darüber hinaus aktivieren sie NF- $\kappa$ B und STAT5 [Gerloff et al., 2015]. NF- $\kappa$ B fördert die Transkription von miR-155. MiR-155 reprimiert die Expression von SHIP1 [O’Connell et al., 2009]. STAT5 unterstützt NF- $\kappa$ B, indem es die DNA-Bindung am Promotor der Ziel-Gene von NF- $\kappa$ B steigert [Gerloff et al., 2015].



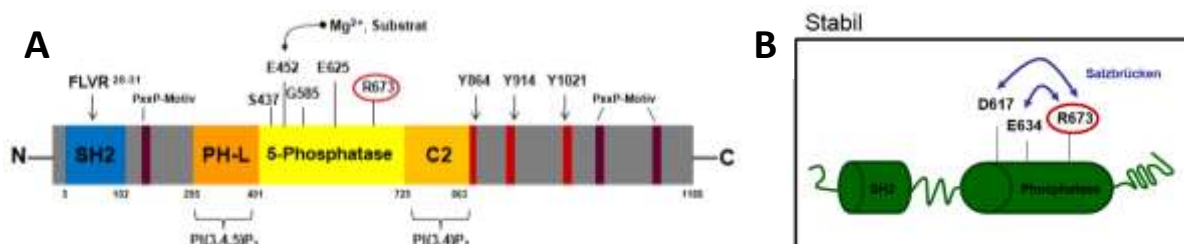
**Abbildung S29: Einfluss der verstärkten SHIP1-Expression in Ph-positiven B-ALL-Zellen auf den AKT-Signalweg gegenüber der Phosphotyrosin-Aktivierung von Signalproteinen.** Der Einfluss von SHIP1 auf die Viabilität der Zelle könnte vom Grad der Aktivierung des AKT-Signalwegs gegenüber der Aktivierung der Tyrosinkinase-Signalgebung, beispielsweise über Syk, abhängig sein. Als negativer Regulator des AKT-Signalwegs trägt SHIP1 zur Inhibierung des Zellwachstums bei. Demgegenüber könnte SHIP1, insbesondere in BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen, die Aktivität von Tyrosinkinasen steigern und damit zum Wachstum der Zellen beitragen.



**Abbildung S30: Schematische Darstellung von SHIP1 mit PH-L-, 5-Phosphatase- und C2-Domäne.** (A) Schematische Darstellung der SHIP1-Domänen mit der zentralen 5-Phosphatase-Domäne. Strukturanalysen weisen auf eine PH-L-Domäne (295-401) und eine C2-Domäne (725-863) hin. Die Phosphorylierungsstelle S437, welche in der Phosphatase-Domäne gelegen ist und durch PKA phosphoryliert wird, konnte bereits als allosterische Aktivierungsstelle identifiziert werden [gemäß Zhang et al., 2010; Ong et al., 2007; Ming-Lum et al., 2012].

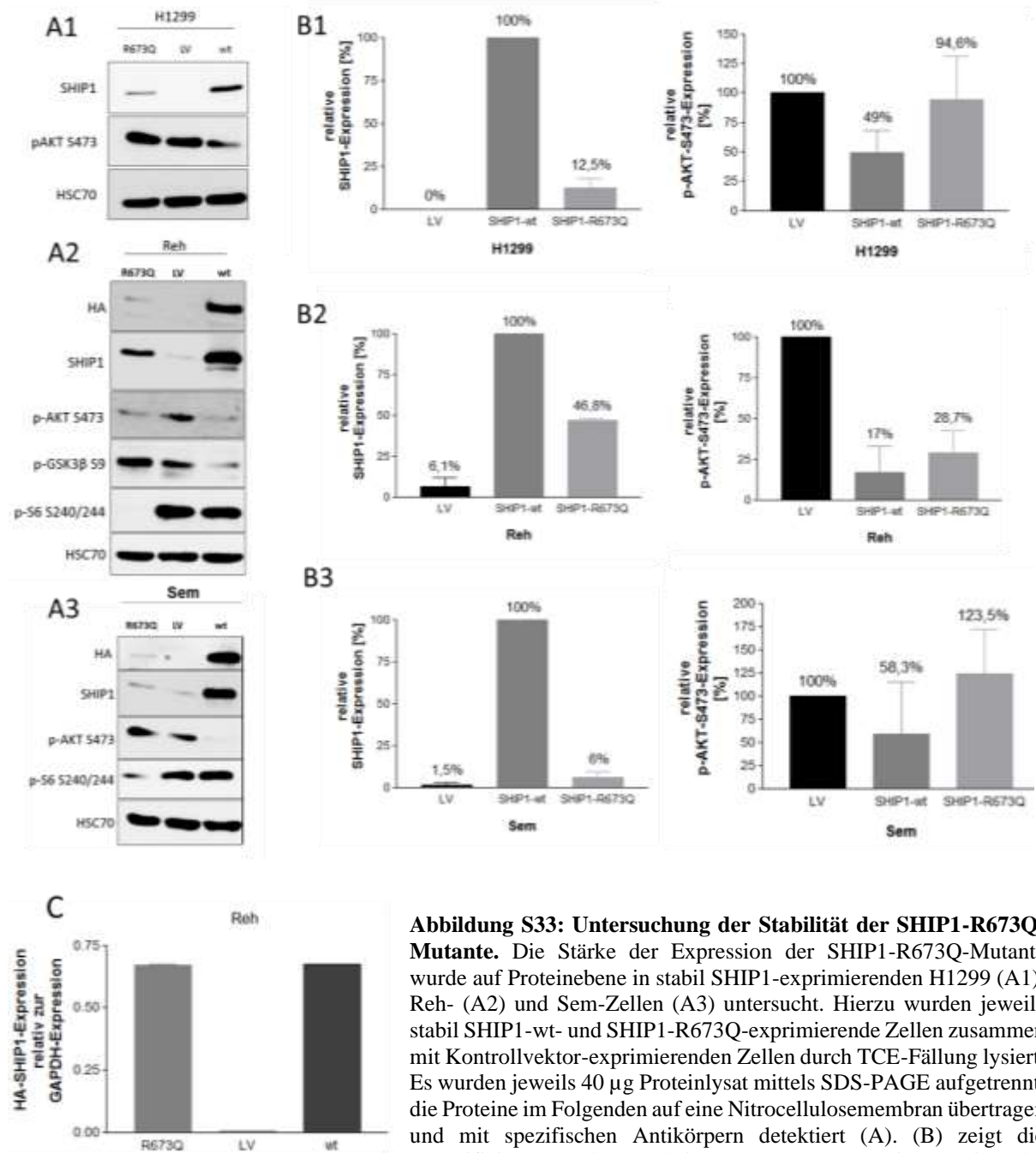


**Abbildung S31: Untersuchung der Phosphataseaktivität von SHIP1-R673Q.** Die Phosphataseaktivität von SHIP1-wt und SHIP1-R673Q wurde jeweils in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen gemessen. Hierzu wurden die verschiedenen SHIP1-exprimierenden Zellen mittels NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde SHIP1-spezifisch mittels Protein-G-Sepharose gekoppelter SHIP1-Antikörper aus dem Lysat immunpräzipitiert (SHIP1-P1C1). Es wurden jeweils 1 mg Proteinlysate für die Immunpräzipitation verwendet. Durch Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  PtdIns(3,4,5) $\text{P}_3$ -diC8 und anschließender Vermessung des entstandenen anorganischen Phosphats als Maß für den Substratumsatz unter Verwendung von Malachitgrün wurde die enzymatische Aktivität der verschiedenen Ansätze bestimmt. Der Substratumsatz wurde jeweils nach 15s, 1, 2 und 5 Minuten gemessen (A). (B) Zur Bestimmung der spezifischen Reaktionsgeschwindigkeit wurde jeweils die eingesetzte SHIP1-Proteinmenge über die vorhandene SHIP1-Menge in den Protein-G-Sepharose-Pellets analysiert. Hierzu wurden die gewaschenen Immunpräzipitate parallel mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Bei beiden Ansätzen wurde die gleiche Menge Proteinlysate für die Immunpräzipitation eingesetzt, jedoch wurde bei der Immunpräzipitation des Wildtyps eine wesentlich größere Menge SHIP1-Protein als bei der SHIP1-R673Q-Mutante immunpräzipitiert. (C) Zur Quantifizierung der SHIP1-Menge wurde zudem ein rekombinanter SHIP1-Standard (25, 50, 100 und 200 ng) auf das Gel aufgetragen. Unter Verwendung eines anti-SHIP1-Antikörpers konnte die SHIP1-Menge bestimmt werden und so die spezifische Aktivität berechnet werden (spez. Reaktionsgeschwindigkeit SHIP1-wt: 6,4  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ; spez. Reaktionsgeschwindigkeit SHIP-R673Q: nicht detektierbar (n.d.)). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die SHIP1-wt-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



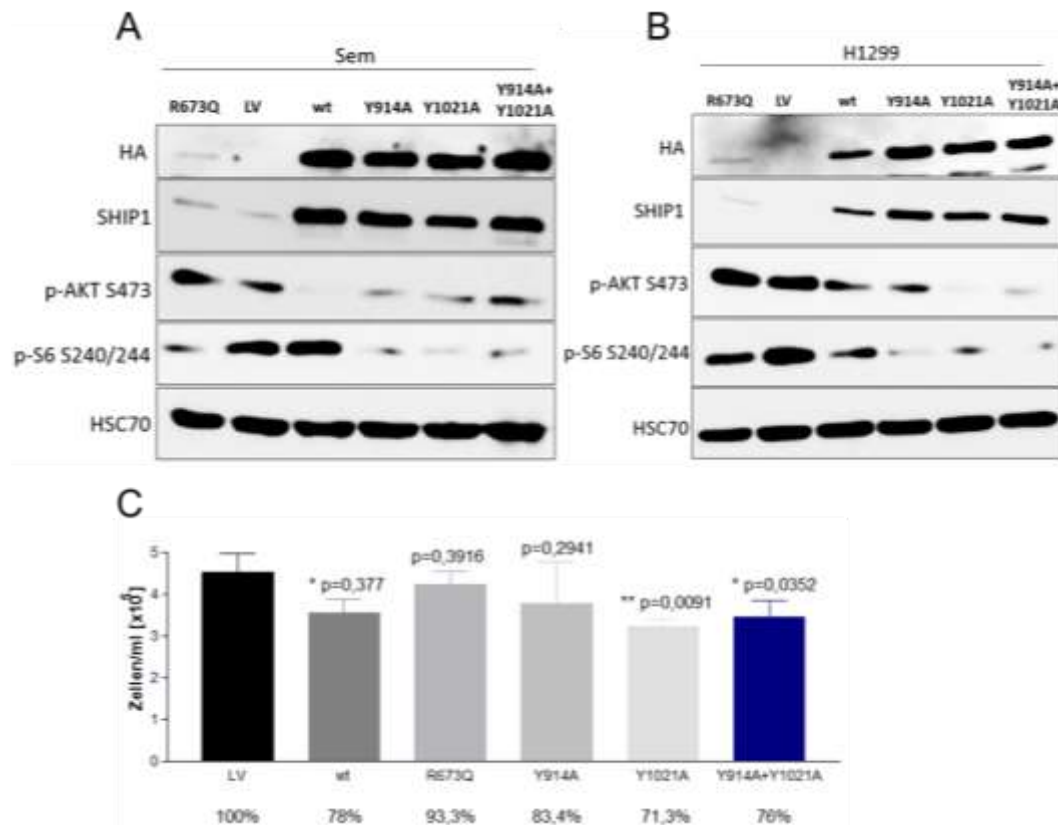
**Abbildung S32: Schematische Darstellung zur Instabilität von SHIP1 durch eine Mutation des Arginins 673 in der Phosphatase-Domäne von SHIP1.** (A) Schematische Darstellung der SHIP1-Domänen mit der zentralen 5-Phosphatase-Domäne. Das Glutamat an Position 452 gehört zum aktiven Zentrum der Phosphatasedomäne und ist vermutlich direkt an der Bindung von  $\text{Mg}^{2+}$  beteiligt, worüber die Phosphatgruppe des Substrats gebunden wird. Die Aminosäuren G585 und E625 scheinen ebenfalls die Phosphatase-Aktivität von SHIP1 zu beeinflussen. (B) Durch den Verlust des positiv geladenen Arginins fallen zwei Salzbrücken zu den negativ geladenen Aminosäuren D617 und E634 weg, so dass die Stabilität des Proteins beeinträchtigt ist.





**Abbildung S33: Untersuchung der Stabilität der SHIP1-R673Q-Mutante.** Die Stärke der Expression der SHIP1-R673Q-Mutante wurde auf Proteinebene in stabil SHIP1-exprimierenden H1299 (A1), Reh- (A2) und Sem-Zellen (A3) untersucht. Hierzu wurden jeweils stabil SHIP1-wt- und SHIP1-R673Q-exprimierende Zellen zusammen mit Kontrollvektor-exprimierenden Zellen durch TCE-Fällung lysiert. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). (B) zeigt die Quantifizierung der relativen SHIP1-Expression mit der

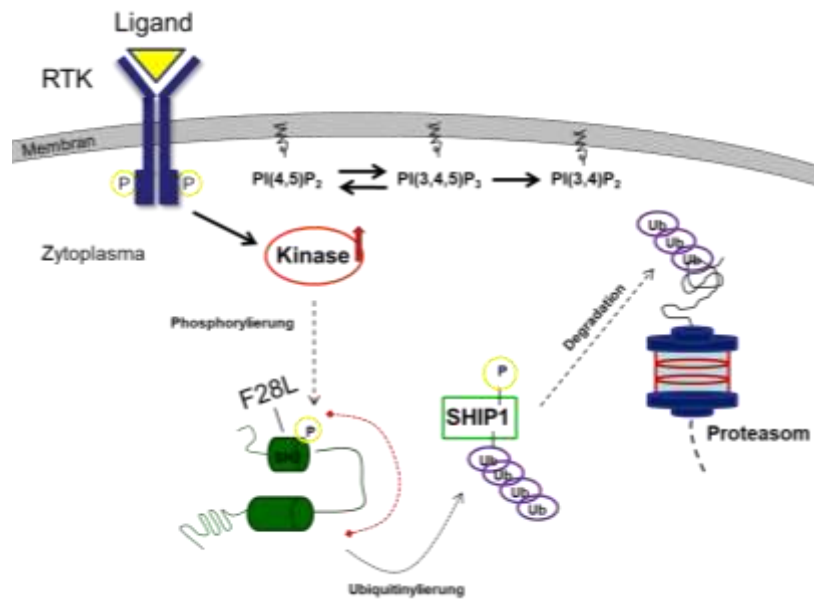
entsprechenden Quantifizierung der relativen p-AKT-S473-Expression für die Zelllinien H1299 (B1), Reh (B2) und Sem (B3). Zudem wurde die RNA der transduzierten Reh-Zellen isoliert. Die SHIP1-mRNA-Menge wurde ausgehend von der cDNA mittels RT-qPCR bestimmt. Die Bestimmung der relativen Expression der SHIP1-mRNA-Menge erfolgte durch Normalisierung auf das Referenzgen GAPDH. Es wurden spezifische Oligonukleotide für das transduzierte SHIP1 (HA-Tag) verwendet (C).



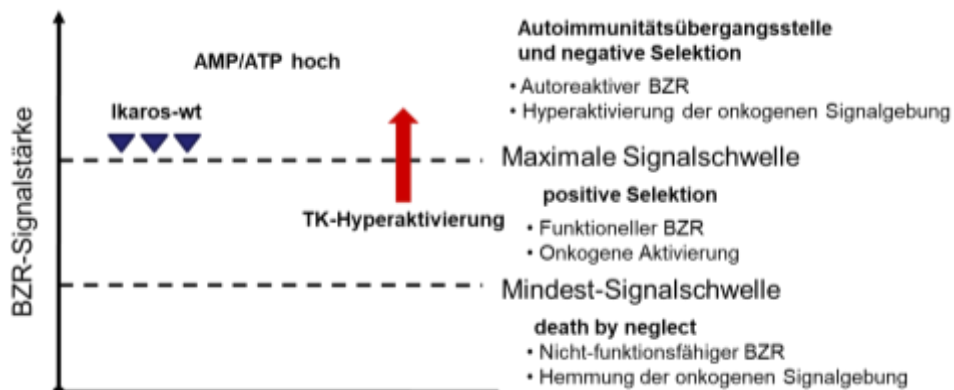
**Abbildung S34: Untersuchung des Einflusses der SHIP1-NPXY-Motive auf den AKT-Signalweg und das Zellwachstum.** Die Veränderung der Signaltransduktion des AKT-Signalwegs durch Expression von SHIP1-wt, SHIP1-R673Q, SHIP1-Y914A, SHIP1-Y1021A und SHIP1-Y914A+Y1021A wurde auf Proteinebene in Sem (A) und H1299-Zellen (B) untersucht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 40 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zudem wurden stabil SHIP1-exprimierende Sem-Zellen zusammen mit Kontrollvektor-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/Loch in einer 6-Loch-Schale mit 2 ml Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurden die Zellen mithilfe eines Hämozytometers gezählt (C). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollvektor-exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

SHIP1 AA	27	28	31	33	35
HsSrc	A	E	E	E	E
HsSHIP1	M	V	P	C	W
HsABL1	L	E	K	H	S
HsPTPN6	T	S	E	R	W
HsPTPN11	T	S	E	R	W
HsSHIP2	Q	A	P	S	W
HsCSK	S	L	M	P	
HsSHC1	E	Q	L	R	G
HsLyn	T	E	E	W	F
HsLck	P	E	P	W	F
HsGRB2	K	P	H	P	W
HsSYK	K	M	P	W	F
HsBLNK	L	C	K	P	W
HsSH2D1A	D	A	V	Y	H

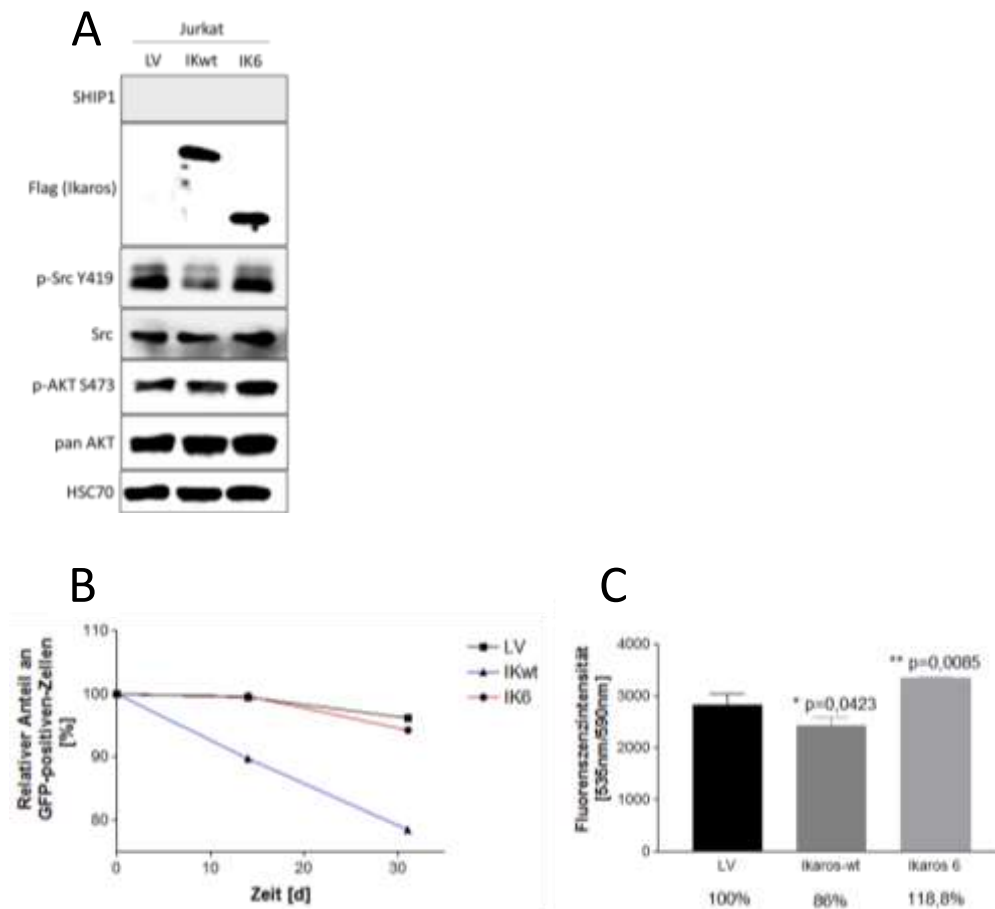
**Abbildung S35: Darstellung des konservierten FLVR-Motivs in SH2-Domänen beinhaltenden Proteinen.** Das FLVR-Motiv (AS 28-31; gemäß SHIP1-Sequenz) beziehungsweise das verwandte FLIR-/YLLR-Motiv wird flankiert von putativen Phosphorylierungsstellen. N-terminal des FLVR-Motivs sind oftmals Serin- oder Threonin-Reste lokalisiert (AS 27). C-terminal des FLVR-Motivs ist vielfach eine Glutaminsäure/Asparaginsäure (AS 32) gefolgt von einem Serin-Rest (AS 33) gelegen. An Aminosäureposition 35 ist in der Regel ebenfalls ein Serin- oder Threonin-Rest zu finden [publiziert in Ehm et al., 2019].



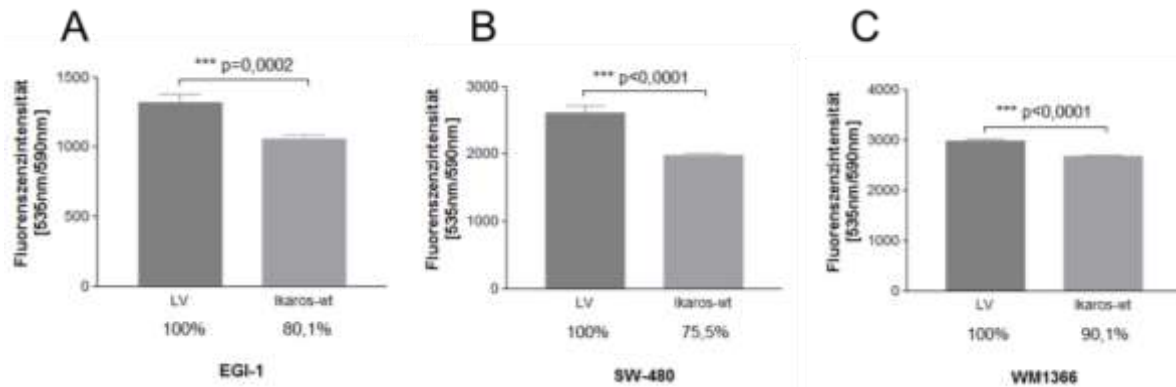
**Abbildung S36: Modell zur Regulation der SHIP1-Expression über putative Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe zum FLVR-Motiv.** Nach Aktivierung des Rezeptors könnten verschiedene Kinasen einen Einfluss auf die Regulation der SHIP1-Expression über die putativen Phosphorylierungsstellen S27 und S33 ausüben. Die Phosphorylierung des Serin-Restes 27 könnte den proteasomalen Abbau einleiten, wohingegen die Phosphorylierung des Serin-Restes 33 ein Degradationssignal maskieren und damit den Abbau verhindern könnte. Weiterhin könnte der Austausch eines aromatischen Restes an Position 28 von SHIP1 zu einer Aminosäure ohne Aromaten (L) zu einer Konformationsänderung führen, welche die Phosphorylierung und den Abbau von SHIP1, durch den Wegfall hydrophober Oberflächenkontakte, erleichtert [publiziert in Ehm et al., 2019].



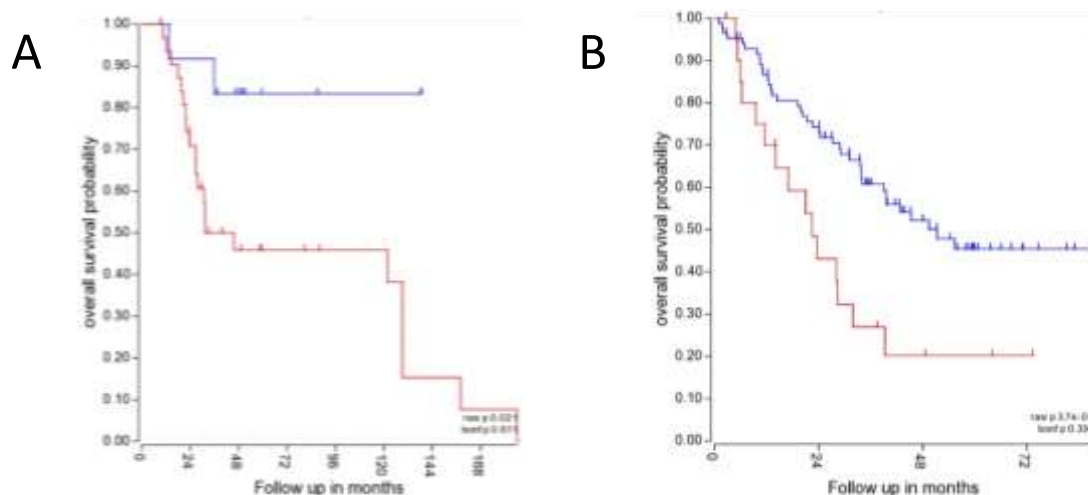
**Abbildung S37: Der Einfluss von Ikaros auf die B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und die klonale Selektion von B-Zellen.** Inhibitorische Phosphatasen können die Signalstärke von aktivierten Signalproteinen und Signalwegen abschwächen und die negative Selektion und den Zelltod an den Autoimmunitätskontrollpunkten verhindern. Die Verstärkte Expression der inhibitorischen Phosphatasen (wie SHIP1) hebt in der Folge somit den Schwellenwert für die Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung an und hilft autoreaktiven B-Zellen, der negativen Selektion zu entgehen [gemäß Chen et al., 2015]. Die Ikaros-vermittelte Reduzierung der SHIP1-Expression könnte somit die Signalschwelle senken. Die damit verbundene Tyrosinkinase-Hyperaktivierung könnte konsequenterweise zu einer Signalgebung über die maximale Signalschwelle, zur Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung und zur negativen Selektion dieser Zellen führen. Gleichzeitig führt die Ikaros-wt-Expression zu konstitutiv niedrigen Energieniveaus und hohen AMP/ATP-Verhältnissen der Zelle [Chan et al., 2017]. Niedrige Grundenergieniveaus machen B-Zellen empfindlicher für einen akuten Verbrauch von ATP als Ergebnis einer massiven Kinase-Hyperaktivierung.



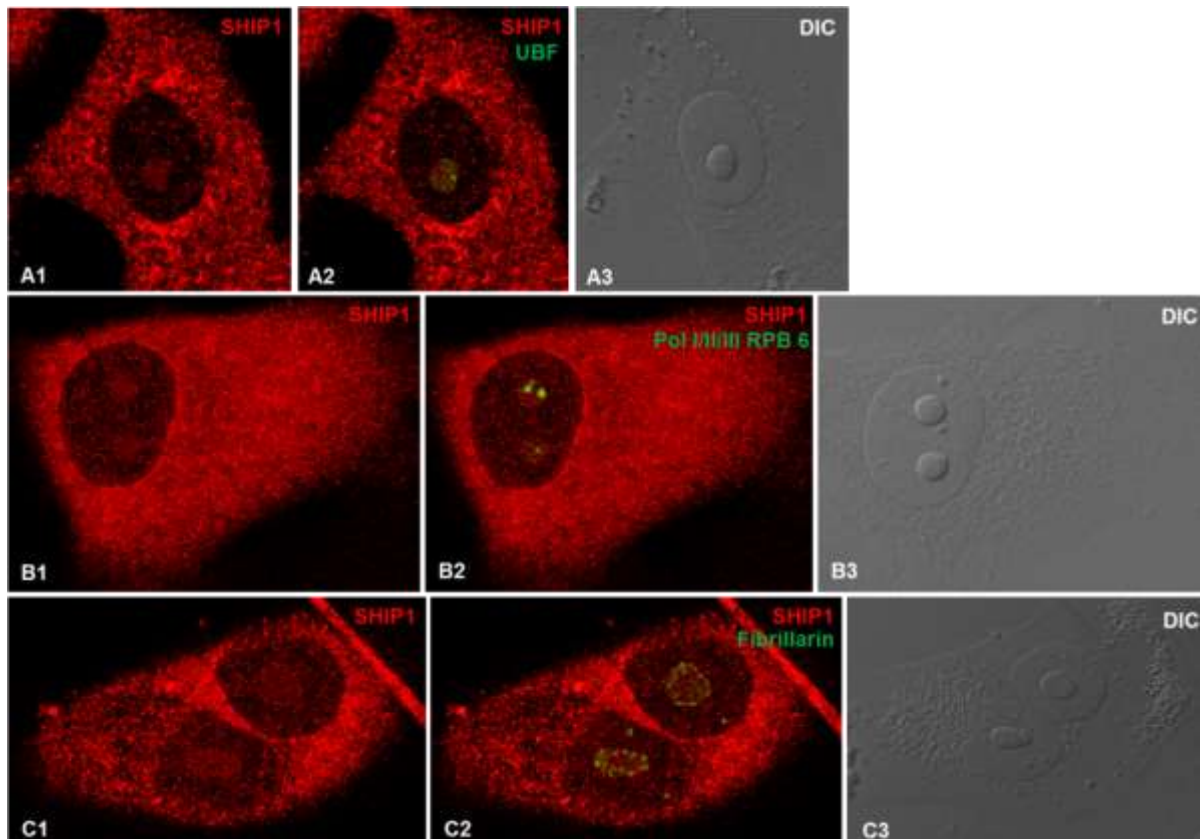
**Abbildung S38: Untersuchung des Wachstumsverhalten von Jurkat-Zellen nach Expression von Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6.** Ikaros-wt-exprimierenden Jurkat-Zellen zeigen einen Wachstumsnachteil und werden, im Gegensatz zu Ikaros-Isoform 6-exprimierenden Zellen und Zellen mit Kontrollvektor, von nicht GFP-positiven Zellen überwachsen. Jurkat-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren, die für Ikaros-wt, Ikaros-Isoform-6 und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A). Drei Tage nach der Transduktion wurden die GFP-positiven Zellen über die Zeit durchflusszytometrisch verfolgt (B). Dargestellt ist der relative Anteil an GFP-exprimierenden Zellen in Prozent. Normalisiert wurde hierzu auf den ersten Messpunkt. Die stabil Ikaros-wt und Ikaros-Isoform 6-exprimierenden Jurkat-Zellen wurden zusammen mit den Jurkat-Kontrollvektor-Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (C). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Kontrollvektor exprimierenden Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



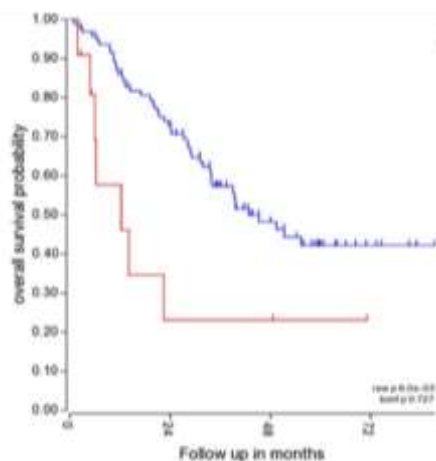
**Abbildung S39: Untersuchung der Zellviabilität von Karzinomzelllinien nach Überexpression von Ikaros.** Die Karzinomzelllinien EGI-1 (A), SW-480 (B) und WM1366 (C) wurden mit lentiviralen Vektoren, die für Ikaros-wt und den Kontrollvektor codieren, transduziert. Die Selektion der Zellen mit Puromycin erfolgte nach der Transduktion. Die stabil Ikaros-wt-exprimierenden Zellen wurden zusammen mit den Kontrollvektor-exprimierenden Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100  $\mu$ l Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).



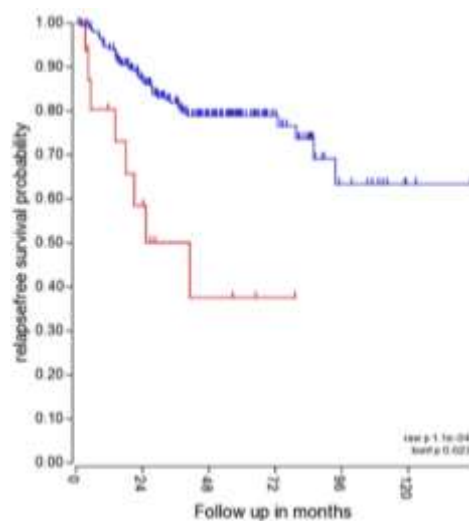
**Abbildung S40: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von Lungen-Tumor- und Melanom-Tumor- (Metastasen) Patienten mit IKZF1-mRNA-Expression.** Dargestellt sind Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von IKZF1 (Ikaros) bei (A) Melanom-Tumor- (Metastasen) und (B) Lungen-Tumor-Patienten mit geringer (Melanom:  $n = 31$ ; rot / Lunge:  $n = 21$ ; rot) und hoher (Melanom:  $n = 13$ ; blau / Lunge:  $n = 85$ ; blau) IKZF1-mRNA-Expression. Die Abbildungen wurden unter Verwendung der Plattform für Genomanalyse und Visualisierung R2 erstellt (Bogunovic et al., 2009; GEO: GSE19234 und Bild et al., 2006; GEO: GSE3141).



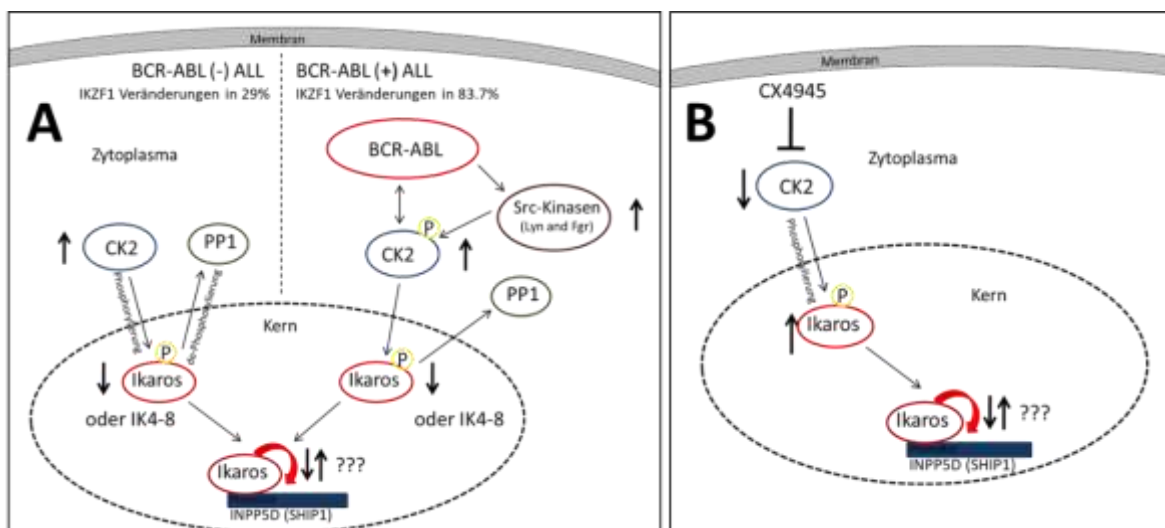
**Abbildung S41: SHIP1 kolokalisiert mit der Untereinheit RPB6 der Polymerase I/II/III in den Nukleoli von Sk-ChA1-Zellen.** Die Kolokalisation von endogenem SHIP1 mit Komponenten der Nukleoli wurde in der Cholangiokarzinomzelllinie Sk-ChA1 untersucht. Hierzu wurden Sk-ChA1-Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert, unspezifischen Bindungsstellen mit BSA blockiert und mit einem anti-SHIP1-spezifischen Antikörper (P1C1) inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS für mindestens eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit PBS mit normalen, ungekoppelten-Maus-Serum im Überschuss inkubiert um alle unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen jeweils mit einem Antikörper gegen UBF (A), RPB6 (B), einer gemeinsamen Untereinheit der Polymerasen I, II und III, oder Fibrillarin (C) inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS für eine Stunde auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach mehrmaligem Waschen mit PBS an einem konfokalen Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass SHIP1 nicht mit UBF und Fibrillarin, jedoch mit RPB6 (Pol I,II,III) in den Nukleoli kolokalisiert. A2, B2 und C2 zeigen jeweils ein Overlay-Bild der SHIP1-Färbung mit der Färbung der Komponenten der Nukleoli der Zelle. Es wird jeweils eine repräsentativ ausgewählte Zelle gezeigt.



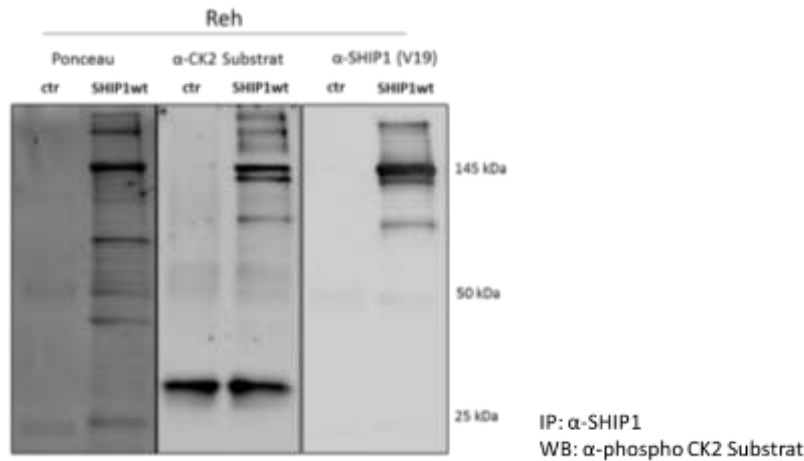
**Abbildung S42: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von Lungen-Tumor-Patienten mit SHIP1-mRNA-Expression.** Dargestellt sind Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) bei Lungen-Tumor Patienten mit geringer (n = 11; rot) und hoher (n = 96; blau) SHIP1-mRNA-Expression. Die Abbildung wurde unter Verwendung der Plattform für Genomanalyse und Visualisierung R2 erstellt (Bild et al., 2006; GEO: GSE3141).



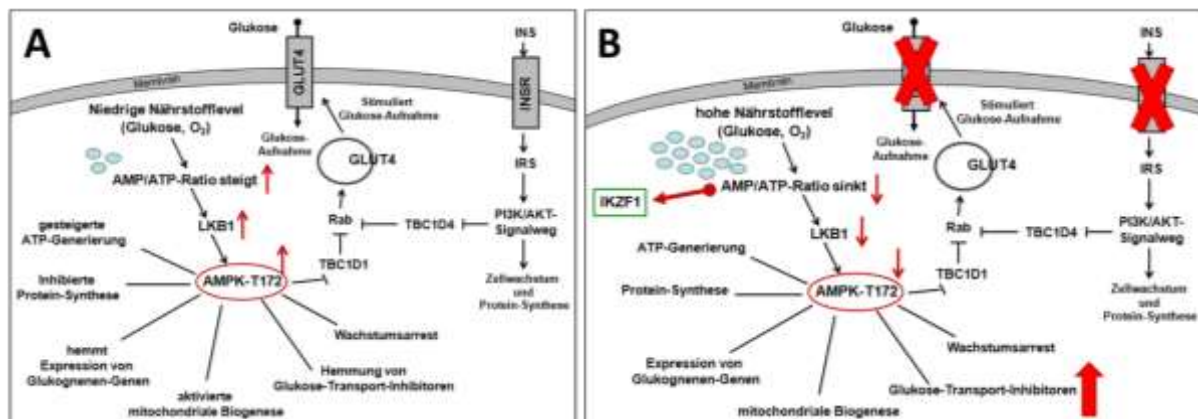
**Abbildung S43: Kaplan-Meier-Analyse der Rückfallrisiko-Wahrscheinlichkeit von Kolon-Tumor-Patienten mit SHIP1-mRNA-Expression.** Dargestellt sind Genexpressionsdaten auf Microarray-Basis zur mRNA-Expression von INPP5D (SHIP1) bei Kolon-Tumor-Patienten mit geringer ( $n = 16$ ; rot) und hoher ( $n = 210$ ; blau) SHIP1-mRNA-Expression. Die Abbildung wurde unter Verwendung der Plattform für Genomanalyse und Visualisierung R2 erstellt (Jorissen et al., 2009; GEO: GSE14333).



**Abbildung S44: Modell zum Einfluss von BCR-ABL auf die Regulation des Transkriptionsfaktors Ikaros in der B-ALL.** (A) Abhängig vom genetischen Hintergrund entstehen Veränderungen von Ikaros in ca. 29 % der Fälle der BCR-ABL-negativen B-ALL-Hochrisikogruppe und in 83,7 % der BCR-ABL-positiven B-ALL [Mullighan et al., 2008a; Mullighan et al., 2009a]. Neben dem Verlust des IKZF1-Gens kommt es zu Deletionen innerhalb des IKZF1-Gens. Auf Proteinebene kann Ikaros durch CK2 phosphoryliert und durch PP1 dephosphoryliert werden [Dovat et al., 2011]. Die Phosphorylierung von Ikaros hat einen Einfluss auf die DNA-Bindefähigkeit von Ikaros und damit auf die Regulation seiner Ziel-Gene. Die Src-Kinase-Familie verstärkt insbesondere in BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen die Aktivität der CK2. Der Einfluss von Ikaros auf SHIP1 war zu Beginn dieser Arbeit unklar. (B) Der Inhibitor CX4945 hemmt die Aktivität der CK2 und stellt somit die DNA-Bindefähigkeit von Ikaros wieder her [gemäß Song et al., 2015].

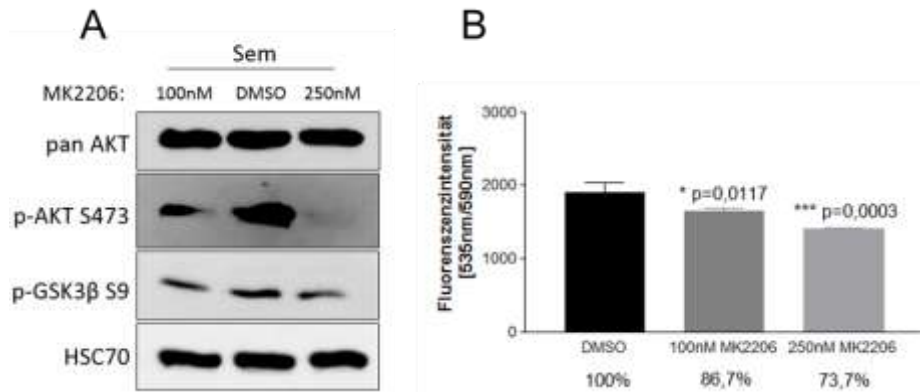


**Abbildung S45: Untersuchung der Interaktion von SHIP1 und CK2.** Mithilfe einer Immunpräzipitation wurde untersucht, ob SHIP1 ein Substrat der CK2 ist. Hierzu wurden stabil SHIP1-wt-exprimierende Reh-Zellen mittels NP-40-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde SHIP1-spezifisch aus dem Lysat immunpräzipitiert (SHIP1-P1C1). Als Kontrolle wurde parallel normales Maus-IgG-Serum verwendet (ctr). Es wurden jeweils 1 mg Proteinlysate für die Immunpräzipitation verwendet. Die gewaschenen Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst mit einem anti-p-CK2-Substrat-Antikörper inkubiert. Nach der Entwicklung mit dem anti-p-CK2-Substrat-Antikörper wurde die Membran mit einem anti-SHIP1-Antikörper inkubiert. Zudem wurde eine Ponceau-Färbung der Nitrocellulosemembran durchgeführt. Auf Höhe von 145 und 135 kDa werden Banden des anti-CK2-Substrat-Antikörpers detektiert. Dabei könnte es sich sowohl um SHIP1 als CK2-Substrat handeln als auch um ein SHIP1 interagierendes Protein mit 145 oder 135 kDa.



**Abbildung S46: Schematische Darstellung des Einflusses von AMPK und IKZF1 auf die Energieversorgung in B-Zellen.** Die Energieversorgung in B-Zellen ist konstitutiv niedrig. Eine starke Erhöhung der Energieversorgung ermöglicht die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion der B-Zelle während der Immunantwort. Es birgt jedoch auch die Gefahr einer permanenten Hyperaktivierung der Signalübertragung, so dass eine Autoimmunität oder maligne Transformation der Zelle gefördert werden könnte. Diese dynamischen Änderungen der AMP/ATP-Verhältnisse werden von der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), einem Energiestresssensor, erfasst. Als Reaktion auf hohe AMP/ATP-Verhältnisse stimuliert die AMPK die Glukoseversorgung, um die Energieversorgung aufrechtzuerhalten (A). Im Falle von hohen Nährstoffniveaus ist die Aktivität der AMPK gering (B). IKZF1 wird aktiv (dicke rote Pfeile und Kreuze) und begrenzt die Glukose- und Energieversorgung in B-Zellen auf Werte, die für die maligne Transformation nicht ausreichen. Dazu werden die Glukosetransporter, wie GLUT4 und der Insulinrezeptor (INSR), transkriptionell unterdrückt. Dagegen werden Glukose-Transport-Inhibitoren (NR3C1, CNR2 und TXNIP) transkriptionell aktiviert. Dies führt in der Folge wiederum zu konstitutiv niedrigen Energieniveaus und hohen AMP/ATP-Verhältnissen (A) [gemäß Chan et al., 2017].





**Abbildung S47: Untersuchung der konzentrationsabhängigen Hemmung von AKT mit dem pan AKT-Inhibitor MK2206.** Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Hemmung von AKT wurden SEM B-ALL-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des pan AKT-Inhibitors MK2206 behandelt. Hierzu wurden Sem-Zellen jeweils mit DMSO, 100 nM und 250 nM MK2206 für 48 h behandelt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch TCE-Fällung. Es wurden jeweils 30 µg Proteinlysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteine im Folgenden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert (A) (p-AKT S473 – DMSO: 100 % / 100nM MK2206: 28 % / 250nM MK2206: 13 %; pGSK3β S9 - DMSO: 100 % / 100nM MK2206: 59 % / 250nM MK2206: 48 %). Sem-Zellen wurden mit 100 nM und 250 nM MK2206 behandelt und zusammen mit DMSO-behandelten Zellen in Triplikaten in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch in einer 96-Loch-Schale mit 100 µl Medium ausgesät. 48 Stunden nach dem Aussäen wurde durch Zugabe von Resazurin die Verfärbung des Mediums als Indikator für die Zellviabilität gemessen (B). Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die DMSO-behandelten Zellen (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

## 6.2 Abkürzungen

AIC: autoimmunity checkpoints, Autoimmunitätskontrollpunkte; Akt: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; APC: Allophycocyanin; APS: Ammoniumperoxodisulfat; APC: Allophycocyanin; BZR: B-Zell-Rezeptor; BCR: breakpoint cluster region; BLNK: B cell linker; Bp: Basenpaare; BSA: Bovines Serumalbumin; cAMP: cyclisches Adenosin-Monophosphat; c-ALL: common-ALL; Cbl: casitas B-lineage lymphoma; CD: cluster of differentiation; CDK: cyclin-dependent kinase; cDNA: komplementäre DNA; cGMP: cyclisches Guanosin-Monophosphat; CO<sub>2</sub>: Kohlendioxid; c-Terminus: Carboxy-Terminus (COOH); ddH<sub>2</sub>O: doppelt deionisiertes Wasser; DMEM: Dulbecco's modified eagle medium; DMSO: Dimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; Dox: Doxycyclin; Dok: downstream of kinase; E. coli: Escherichia coli; EGFP: enhanced green fluorescent protein; EGFR: epidermal Growth factor receptor; Env: envelope; ERK: extracellular signal-regulated kinase; FACS: fluorescence-activated cell sorting; FCS: fötales Kälberserum (fetal calf serum); FITC: Fluoresceinisothiocyanat; Flt3: Fms-related tyrosine kinase; FoxO: forkhead box O; FP: Vorwärtsprimer (forward Primer); Gab: Grb2-associated binder; Gag: group-specific antigen; GAP: GTPase-aktivierendes Protein; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2; GSK3: Glykogen-Synthase-Kinase 3; HEK: human embryonic kidney; HRP: Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase); HSC70: heat shock cognate protein 70; Ig: Immunglobulin; IP: Immunpräzipitation; i.v.: intravenös; IL: Interleukin; IM: Imatinib; ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; Itk: IL-2-inducible T cell kinase; Jak: Janus-Kinase; kb: kiloBasen; KD: Knockdown; kD: kilo Dalton; KM: Knochenmark; LB: lysogeny broth, Luria Bertani; Luc: Liciferasegen; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MEK: MAPK/ERK-Kinase; MHC: major histocompatibility complex; miRNA, miR: microRNA; MK: MK2206; MLL: mixed lineage leukemia; mRNA: messenger Ribonukleinsäure; MS: Massenspektrometrie; mTOR: mammalian target of Rapamycin; MW: Molekulargewicht (molecular weight); NK: natural killer; N-Terminus: Amino-Terminus (NH<sub>2</sub>); OD: optische Dichte; P: p-Wert (Signifikanzwert); PAGE: Polyacrylamidgelelektrophorese; PBS: phosphate-buffered saline; PBMC: perinukleäre blood mononuclear cells; PCR: Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction); PDK: phosphoinositide-dependent protein kinase; PH-Domäne: Pleckstrin-Homologie-Domäne; PKB: Proteinkinase B; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C; PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid; Pol: Polymerase; PTB-Domäne: Phosphotyrosin-Bindungs-Domäne; PTEN: phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10; PI: Phosphatidylinositol; PTP: Proteintyrosinphosphatase; RAD: RAD001; RNA: Ribonukleinsäure; RP: Rückwärtsprimer (reverse primer); RT: Raumtemperatur; RTK: Rezeptortyrosinkinase; scr: scrambled; SD: Standardabweichung (standard deviation); SDS: Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate); SH: Sarcoma(Src)-Homologie; Shc: src homologous and collagen; shRNA: small hairpin ribonucleotide acid; SHIP: SH2-containing inositol 5-phosphatase; STAT: signal transducer and activator of transcription; TBS: Tris-gepufferte Salzlösung; TCE: Trichloressigsäure; TCL: Gesamtzelllysat (total cell lysate); TCR: T cell receptor; TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin; TSC: tuberous sclerosis complex; v: Volumen (volume); vsv: vesicular stomatitis virus; w: Gewicht (weight); WT: Wildtyp; ZAP-70: ζ chain-associated protein of 70 kD

## 6.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

1: Vergleich der Häufigkeit von Mutationen in den Hauptkomponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in T-ALL und B-ALL .....	137
S1: Einfluss der Src-Kinase-Familienmitglieder auf die relative SHIP1- und p-SHIP1-Y1021-Expression .....	166

### Abbildungsverzeichnis

1: Schema der Hämatopoese .....	4
2: Schematische Darstellung der Entartung von Leukozyten im Knochenmark .....	5
3: Darstellung der prozentualen Häufigkeiten der unterschiedlichen Krebserkrankungen im Kindesalter .....	6
4: Darstellung der prozentualen Häufigkeiten von genetischen Veränderungen in der akuten lymphatischen Leukämie des Kindesalters .....	7
5: Kaplan-Meier-Analyse des ereignisfreien Überlebens nach biologischem Subtyp der Leukämie .....	8
6: Schematische Darstellung der Therapie der ALL .....	10
7: Aktivierung und Inaktivierung der Src-Kinase-Familie .....	13
8: Schematische Darstellung des PI3K/AKT-Signalwegs .....	15
9: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von AKT1 .....	16
10: Schematische Darstellung der Struktur von SHIP1 .....	19
11: Schematische Darstellung der B-Zell-Aktivierung und Rekrutierung von SHIP1 an die Membran .....	23
12: Schematische Darstellung der cDNA von Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform .....	27
13: Schema des Einflusses von Ikaros auf die B-Zellentwicklung .....	28
14: Der Einfluss der B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und seiner onkogenen Nachahmung auf die klonale Selektion von normalen und malignen B-Zellen .....	30
15: Der Einfluss von Phosphatasen auf die B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und die klonale Selektion von B-Zellen .....	31
16: mRNA-Expression von SHIP1 in primären B- und T-ALL-Patientenproben .....	67
17: Proteinexpression von SHIP1 in primären B-ALL-Patientenproben .....	69
18: Proteinexpression von SHIP1 in primären ALL-Xenotransplantationszellen .....	69
19: Untersuchung der Proteinexpression von SHIP1 in ALL-Zelllinien .....	70
20: Untersuchung des Wachstumsverhalten von Jurkat-Zellen nach Rekonstitution der SHIP1-Expression .....	71
21: Untersuchung des Verlustes von SHIP1 in Jurkat-Zellen nach Rekonstitution der SHIP1-Expression .....	72
22: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in BCR-ABL-positiven Leukämiezelllinien .....	74

23: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in primären BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen .....	76
24: Untersuchung der Wiederherstellung von endogenem SHIP1 in BCR-ABL-positiven Leukämiezelllinien nach Intervention mit einem Src-Kinase-Hemmstoff .....	77
25: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 in Flt3 konstitutiv aktivierten Leukämiezellen .....	78
26: Darstellung der Membran- und Zytoplasma-Lokalisation von SHIP1 und Src-Kinasen .....	80
27: Untersuchung des Einflusses der Expression der Src-Kinasen Lyn und Src auf die Expression von SHIP1 .....	81
28: Untersuchung der Abbau-Kinetik von SHIP1 in stabil SHIP1-exprimierenden H1299-Zellen durch Expression von Src-Y529* .....	82
29: Untersuchung der Lokalisation des Proteinabbaus von SHIP1 nach Induktion der Src-Kinase-Expression .....	83
30: Untersuchung der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 durch BCR-ABL-Induktion .....	85
31: Untersuchung der Abbau-vermittelten-Phosphorylierungsstelle von SHIP1 durch Src-Y529*-Induktion .....	86
32: Untersuchung der Lokalisationsänderungen von SHIP1 nach Mutation der NPXY-Motive .....	87
33: Untersuchung der Ubiquitinylierung von SHIP1 und SHIP1-NPXY-Mutanten .....	88
34: Analyse der Effizienz des SHIP1-Knockdowns in B-ALL-Zellen .....	90
35: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in Reh-Zellen .....	91
36: Untersuchung des Einflusses der Herunterregulation von SHIP1 auf die Signaltransduktion in B-ALL-Zellen .....	92
37: Analyse der Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown in Reh B-ALL-Zellen .....	93
38: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität und das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 .....	94
39: <i>Live-Cell-Imaging</i> -Analyse des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von Reh-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 .....	95
40: <i>Live-Cell-Imaging</i> -Analyse des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstumsverhalten von SupB-15-Zellen nach Herunterregulation von SHIP1 .....	95
41: Tierexperiment zur Untersuchung der Auswirkung einer reduzierten SHIP1-Expression in Tel/AML1-positiven B-ALL-Zellen .....	96
42: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Signaltransduktion von Ph-positiven B-ALL-Zellen .....	98
43: <i>Live-Cell-Imaging</i> -Analyse des Einflusses von SHIP1 und Ikaros-wt auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen .....	99
44: <i>Live-Cell-Imaging</i> -Analyse des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt in Kombination mit einer Imatinib-Behandlung auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen .....	100
45: Regulation der SHIP1-Expression durch die dominant-negative Ikaros-Isoform 6 in SupB-15-Zellen .....	101

<b>46: Regulation von SHIP1 durch Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6 in ALL-Zelllinien.....</b>	<b>101</b>
<b>47: Untersuchung des Einflusses der Hemmung der Casein Kinase 2 auf den AKT-Signalweg</b>	<b>102</b>
<b>48: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Ph-positiven SupB-15-Zellen nach Behandlung mit CX4945.....</b>	<b>103</b>
<b>49: Untersuchung der Phosphataseaktivität von SHIP1-Y864A .....</b>	<b>104</b>
<b>50: Untersuchung des Einflusses der SHIP1-Y864A-Mutante auf die Phosphorylierung von AKT-S473 und das Zellwachstum.....</b>	<b>105</b>
<b>51: Untersuchung der Stabilität von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten.....</b>	<b>107</b>
<b>52: Schematische Darstellung von SHIP1 mit seiner SH2-Domäne .....</b>	<b>108</b>
<b>53: Untersuchung der Stabilität von putativen Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe des FLVR-Motivs von SHIP1 .....</b>	<b>109</b>
<b>54: Analyse des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf die Viabilität von H1299-Zellen .....</b>	<b>110</b>
<b>55: Untersuchung des Einflusses der gesteigerten SHIP1-Expression auf die Signaltransduktion in B-ALL-Zellen.....</b>	<b>111</b>
<b>56: Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf die Zellviabilität und das Wachstumsverhalten von B-ALL-Zellen nach gesteigerter Expression von SHIP1 .....</b>	<b>112</b>
<b>57: mRNA-Expression von SHIP1 in humanen Karzinomzelllinien .....</b>	<b>113</b>
<b>58: Identifikation der Protein-Expression von SHIP1 und Ikaros in Sk-ChA1-Zellen .....</b>	<b>113</b>
<b>59: Endogenes SHIP1 ist im Zellkern von Sk-ChA1-Zellen lokalisiert.....</b>	<b>114</b>
<b>60: Identifikation der Protein-Expression von SHIP1 und Ikaros in Karzinomzelllinien .....</b>	<b>115</b>
<b>61: Regulation von SHIP1 durch Ikaros in Karzinomzelllinien .....</b>	<b>116</b>
<b>62: Untersuchung der Protein-Expression der drei AKT-Isoformen in primären B-ALL-Patientenproben.....</b>	<b>117</b>
<b>63: Untersuchung des Einflusses des spezifischen Knockdowns der AKT-Isoformen auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen.....</b>	<b>119</b>
<b>64: <i>Live-Cell-Imaging</i>-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von Sem-Zellen .....</b>	<b>120</b>
<b>65: Untersuchung des Einflusses des spezifischen Doppel-Knockdowns der AKT-Isoformen auf die Signaltransduktion von B-ALL-Zellen.....</b>	<b>121</b>
<b>66: <i>Live-Cell-Imaging</i>-Analyse des Wachstumsverhaltens von B-ALL-Zellen nach Behandlung mittels eines kombinatorischen Therapieansatzes.....</b>	<b>123</b>
<b>67: Untersuchung des Einflusses einer kombinatorischen Therapie zur Behandlung der ALL auf die Signaltransduktion von ALL-Zellen.....</b>	<b>125</b>
<b>68: Darstellung der Relevanz des AKT-Signalwegs und des Tumorsuppressors SHIP1 auf die Entstehung und die Progression der ALL des Kindesalters.....</b>	<b>128</b>
<b>69: Modell zum Src-Kinase-vermittelten Abbau von SHIP1 am Tyrosin-Rest 1021 .....</b>	<b>136</b>
<b>70: Der Einfluss der SHIP1-Expressionsstärke auf die Entstehung von malignen Zell-Erkrankungen.....</b>	<b>141</b>
<b>71: Modell zur Funktion des Tyrosin-Restes 864 von SHIP1.....</b>	<b>142</b>

<b>72: Modell der Autoimmunitätskontrollpunkt-Aktivierung zur Überwindung einer Arzneimittelresistenz bei malignen B-Zell-Erkrankungen.....</b>	<b>155</b>
<b>73: Signalgebung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.....</b>	<b>161</b>
<b>74: Hemmung und Rückkopplungsmechanismen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs .....</b>	<b>162</b>
<b>S1: mRNA-Expression von SHIP1 in ALL-, AML- und CML-Zelllinien.....</b>	<b>165</b>
<b>S2: Zeitlicher Verlauf der Src-GFP-Expression in H1299-Zellen .....</b>	<b>165</b>
<b>S3: Untersuchung des Protein-Abbaus von SHIP1 durch die Src-Kinase-Familie.....</b>	<b>166</b>
<b>S4: Etablierung von SHIP1-Knockdown B-ALL-Zellen .....</b>	<b>167</b>
<b>S5: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.....</b>	<b>168</b>
<b>S6: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in Reh-Zellen.....</b>	<b>169</b>
<b>S7: Analyse des Einflusses eines SHIP1-Knockdowns auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen.....</b>	<b>170</b>
<b>S8: Analyse der Expression des CD45-Rezeptors nach SHIP1-Knockdown in SupB-15 B-ALL-Zellen .....</b>	<b>171</b>
<b>S9: Untersuchung der Protein-Expression von SHIP1 in Ph-positiven Zelllinien .....</b>	<b>171</b>
<b>S10: Untersuchung des Einflusses der Expression von SHIP1 und Ikaros-wt auf die Zellviabilität und die Zell-Apoptose sowie auf das Wachstumsverhalten von Ph-positiven SupB-15 B-ALL-Zellen nach Imatinib-Behandlung.....</b>	<b>172</b>
<b>S11: Analyse des Einflusses von Ikaros auf das Phosphorylierungsprofil von Tyrosin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen .....</b>	<b>173</b>
<b>S12: Analyse des Einflusses von Ikaros auf das Phosphorylierungsprofil von Serin/Threonin-regulierten Kinasen in SupB-15-Zellen .....</b>	<b>174</b>
<b>S13: Untersuchung des Einflusses der Hemmung der Casein Kinase 2 auf den AKT-Signalweg .....</b>	<b>175</b>
<b>S14: Untersuchung der Stabilität der SHIP1-F28L-Mutante .....</b>	<b>175</b>
<b>S15: Analyse des Einflusses von SHIP1-FLVR-Motiv-Mutanten auf das Wachstumsverhalten von H1299-Zellen.....</b>	<b>176</b>
<b>S16: Identifikation der Protein-Expression von RAG1 und IRF-4 in Karzinomzelllinien.....</b>	<b>176</b>
<b>S17: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von SupB-15-Zellen .....</b>	<b>177</b>
<b>S18: Live-Cell-Imaging-Analyse des Einflusses des isoformspezifischen AKT-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten von Nalm-6-Zellen .....</b>	<b>177</b>
<b>S19: Untersuchung eines kombinatorischen Therapieansatzes zur Behandlung der ALL.....</b>	<b>178</b>
<b>S20: Der Einfluss einer kombinatorischen Therapie zur Behandlung der ALL auf die Signaltransduktion von ALL-Zellen mit geringeren Konzentrationen.....</b>	<b>179</b>
<b>S21: Untersuchung der Wiederherstellung von endogenem SHIP1 in Jurkat-Zellen nach Intervention mit einem Src-Kinase-Hemmstoff.....</b>	<b>180</b>
<b>S22: Modell zum Einfluss des Notch-Rezeptors auf die Reduktion der SHIP1-Expression.....</b>	<b>180</b>
<b>S23: SHIP1 mRNA-Expression in der B- und T-ALL des Kindesalters .....</b>	<b>181</b>

<b>S24: SHIP1 mRNA-Expression in BCR-ABL-negativen und BCR-ABL-positiven B-ALL-Zellen</b>	<b>181</b>
<b>S25: SHIP1 mRNA-Expression in Tel/AML1-positiven und negativen B-ALL-Zellen</b>	<b>181</b>
<b>S26: SHIP1 mRNA-Expression vor und nach Herunterregulation von Tel/AML1 in Reh B-ALL-Zellen</b>	<b>182</b>
<b>S27: SHIP1 mRNA-Expression in verschiedenen Subtypen der Leukämie</b>	<b>182</b>
<b>S28: Modell zum Einfluss des Flt3-Rezeptors auf die Reduktion der SHIP1-Expression</b>	<b>182</b>
<b>S29: Einfluss der verstärkten SHIP1-Expression in Ph-positiven B-ALL-Zellen auf den AKT-Signalweg gegenüber der Phosphotyrosin-Aktivierung von Signalproteinen</b>	<b>183</b>
<b>S30: Schematische Darstellung von SHIP1 mit PH-L-, 5-Phosphatase- und C2-Domäne</b>	<b>183</b>
<b>S31: Untersuchung der Phosphataseaktivität von SHIP1-R673Q</b>	<b>184</b>
<b>S32: Schematische Darstellung zur Instabilität von SHIP1 durch eine Mutation des Arginins 673 in der Phosphatase-Domäne von SHIP1</b>	<b>184</b>
<b>S33: Untersuchung der Stabilität der SHIP1-R673Q-Mutante</b>	<b>185</b>
<b>S34: Untersuchung des Einflusses der SHIP1-NPXY-Motive auf den AKT-Signalweg und das Zellwachstum</b>	<b>186</b>
<b>S35: Darstellung des konservierten FLVR-Motivs in SH2-Domänen beinhaltenden Proteinen</b>	<b>186</b>
<b>S36: Modell zur Regulation der SHIP1-Expression über putative Phosphorylierungsstellen in unmittelbarer Nähe zum FLVR-Motiv</b>	<b>187</b>
<b>S37: Der Einfluss von Ikaros auf die B-Zell-Rezeptor-Signalstärke und die klonale Selektion von B-Zellen</b>	<b>187</b>
<b>S38: Untersuchung des Wachstumsverhalten von Jurkat-Zellen nach Expression von Ikaros und seiner dominant-negativen Isoform 6</b>	<b>188</b>
<b>S39: Untersuchung der Zellviabilität von Karzinomzelllinien nach Überexpression von Ikaros</b>	<b>189</b>
<b>S40: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von Lungen-Tumor- und Melanom-Tumor- (Metastasen) Patienten mit IKZF1-mRNA-Expression</b>	<b>189</b>
<b>S41: SHIP1 kolokalisiert mit der Untereinheit RPB6 der Polymerase I/II/III in den Nukleoli von Sk-ChA1-Zellen</b>	<b>190</b>
<b>S42: Kaplan-Meier-Analyse der Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von Lungen-Tumor-Patienten mit SHIP1-mRNA-Expression</b>	<b>190</b>
<b>S43: Kaplan-Meier-Analyse der Rückfallrisiko-Wahrscheinlichkeit von Kolon-Tumor-Patienten mit SHIP1-mRNA-Expression</b>	<b>191</b>
<b>S44: Modell zum Einfluss von BCR-ABL auf die Regulation des Transkriptionsfaktors Ikaros in der B-ALL</b>	<b>191</b>
<b>S45: Untersuchung der Interaktion von SHIP1 und CK2</b>	<b>192</b>
<b>S46: Schematische Darstellung des Einflusses von AMPK und IKZF1 auf die Energieversorgung in B-Zellen</b>	<b>192</b>
<b>S47: Untersuchung der konzentrationsabhängigen Hemmung von AKT mit dem pan AKT-Inhibitor MK2206</b>	<b>193</b>

## 6.4 Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer and the most common childhood cancer-related cause of death. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is frequently constitutively activated in ALL and consequently leads to unrestrained cell proliferation. Recent studies show that targeted hyperactivation of downstream B cell receptor signaling above a maximum threshold may be a deletion point for the selective elimination of malignant B cells. Particularly high expression levels of inhibitory phosphatases in B cell receptor-directed ALL cells raise the threshold for autoimmunity checkpoint activation and allow cells with strong oncogenic B cell receptor signaling to escape negative selection by attenuating signal strength. Of the B cell receptor-dependent signaling cascades, the PI3K/AKT signaling pathway takes on a prominent role. In this work, the role of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatase SHIP1, a negative regulator of the AKT signaling pathway, in ALL was investigated and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway was examined as a therapeutic target for the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).

In the first part of this work, a molecular mechanism was identified in which SHIP1 is phosphorylated after recruitment to the cell membrane by kinases of the Src family at the tyrosine residue 1021 of the NPXY motif and subsequently degraded proteasomally after ubiquitinylation. This may be an explanation for the decreased expression of SHIP1 in T-ALL cells and in a part of the primary B-ALL cells. Another cause that leads to decreased levels of SHIP1 protein in malignant cells has been identified in the process of characterization of patient-derived SHIP1 mutations. Thus, mutations in the FLVR motif (F28L) of the SH2 domain and in the catalytic phosphatase domain (R673Q) lead to reduced stability and expression of the SHIP1 protein. Along with the decreased expression of these SHIP1 mutants, the proliferation of SHIP1 mutant expressing cells increases significantly compared to SHIP1 wild-type expressing cells. Furthermore, down-regulation of SHIP1 was investigated by targeted shRNA-mediated knockdown in ALL cells. Upon knockdown of SHIP1, enhanced phosphorylation of AKT and an associated increase of growth and cell viability of ALL cells *in vitro* are observed in comparison to SHIP1 expressing cells. These data can not confirm the previous model of clonal B cell selection in this form, but underline the tumor suppressor function of SHIP1 in ALL cells.

Based on these data, the second part of this work investigated the regulation of SHIP1 by the B cell-specific transcription factor Ikaros. In this work it can be shown for the first time that the restoration of the Ikaros wild-type expression in Philadelphia chromosome-positive SupB-15 cells with dominant-negative Ikaros isoform leads to a partial SHIP1-mediated inhibition of cell growth. In particular, the tumor suppressor function of Ikaros is enhanced by a SHIP1-dependent additive effect. Thus SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup> expressing SupB-15 cells show a significantly slower proliferation than SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>+</sup>, SHIP1<sup>+</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> and SHIP1<sup>-</sup>/Ikaros-wt<sup>-</sup> expressing cells. These data demonstrate that the collaboration of SHIP1 with Ikaros exerts a substantial negative regulatory influence on the proliferation behavior of Philadelphia chromosome-positive B-ALL cells, highlighting the tumor suppressor function of SHIP1 and Ikaros in ALL cells.



In addition, the analysis of primary B-ALL cells shows a constitutive activation of AKT in approximately 83 % (10/12) of patients. The pharmacological intervention of the constitutively activated PI3K/AKT/mTOR signaling pathway using a combined therapeutic approach with inhibitors directed against AKT, mTOR and the aberrantly activated tyrosine kinase BCR-ABL shows *in vitro* in SupB-15 B-ALL cells, in particular compared to the monotherapies, a highly significant inhibition of the growth of these cells. In addition, a more detailed analysis of the growth behavior after isoform-specific knockdown of the three AKT isoforms shows that the isoforms AKT1 and AKT2 in particular are responsible for the growth of the ALL cells.

The results of this work point to a tumor suppressor function of SHIP1 in the leukemogenesis of childhood ALL. Furthermore, this work provides first indications for a new combination therapy of Philadelphia chromosome-positive B-ALL with AKT, mTOR and BCR-ABL inhibitors, which should now be tested in a preclinical study for their efficacy.

## 6.5 Veröffentlichungen:

- Ehm PAH**, Lange F, Hentschel C, Jepsen A, Glück M, Nelson N, Bettin B, de Bruyn Kops C, Kirchmair J, Nalaskowski M, Jücker M. (2019). Analysis of the FLVR motif of SHIP1 and its importance for the protein stability of SH2 containing signaling proteins. *Cell Signal*. 63:109380.
- Nalaskowski MM\*, **Ehm P\***, Rehbach C, Nelson N, Täger M, Modest K, Jücker M. (2018). Nuclear accumulation of SHIP1 mutants derived from AML patients leads to increased proliferation of leukemic cells. *Cell Signal*. 49:87-94.
- Täger M, Horn S, Latuske E, **Ehm P**, Schaks M, Nalaskowski M, Fehse B, Fiedler W, Stocking C, Wellbrock J, Jücker M. (2017). SHIP1, but not an AML-derived SHIP1 mutant, suppresses myeloid leukemia growth in a xenotransplantation mouse model. *Gene Ther*. 24(11):749-753.
- Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, Wagner K, Stamm H, Vettorazzi E, Vohwinkel G, Klokow M, Uibelesen R, **Ehm P**, Riecken K, Loges S, Thol F, Schubert C, Amling M, Jücker M, Bokemeyer C, Heuser M, Krauter J, Fiedler W. (2015). Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects. *Clin Cancer Res*. 21(10):2388-98.
- Ehm P\***, Nalaskowski MM\*, Wundenberg T, Jücker M. (2015). The tumor suppressor SHIP1 colocalizes in nucleolar cavities with p53 and components of PML nuclear bodies. *Nucleus*. 6(2):154-64.
- Kublun I, **Ehm P**, Brehm MA, Nalaskowski MM. (2014). Efficacious inhibition of Importin  $\alpha/\beta$ -mediated nuclear import of human inositol phosphate multikinase. *Biochimie*. 102:117-23.
- Nalaskowski MM\*, **Ehm P\***, Giehler S, Mayr GW. (2012). A toolkit for graded expression of green fluorescent protein fusion proteins in mammalian cells. *Anal Biochem*. 428(1):24-7.
- Meyer R, Nalaskowski MM, **Ehm P**, Schröder C, Naj X, Brehm MA, Mayr GW. (2012). Nucleocytoplasmic shuttling of human inositol phosphate multikinase is influenced by CK2 phosphorylation. *Biol Chem*. 393(3):149-60.

### Teile dieser Arbeit sind in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Erstautorenschaft: Ehm et al., 2015; Nalaskowski\* et al., 2018; Ehm et al., 2019

Mitautorenschaft: Wellbrock et al., 2015; Täger et al., 2017

### Finanzielle Unterstützung und Förderung erhalten durch:

- Forschungsinstitut Kinderkrebs-Zentrum Hamburg. 2016
- Erich und Gertrud Roggenbuck-Stiftung. Thema: Untersuchungen zur Funktion von SHIP1 und seines transkriptionellen Regulators Ikaros für die Leukämogenese der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) des Kindesalters. 2016
- Carsten Bender-Leukämie-Stiftung. Thema: Untersuchung zur Funktion des PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalwegs für die Leukämogenese und Therapie der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL) des Kindesalters. 2019

---

\* gleichberechtigte Erstautorenschaft

## 7 Literaturverzeichnis

- Abla O, Gassas A, Stevens R, Grant R, Abdelhaleem M. (2006). bcr-abl-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with parvovirus B19 infection. *J Pediatr Hematol Oncol.* 28(2):98-9.
- Akkaya M, Traba J, Roesler AS, Miozzo P, Akkaya B, Theall BP, Sohn H, Pena M, Smelkinson M, Kabat J, Dahlstrom E, Dorward DW, Skinner J, Sack MN, Pierce SK. (2018). Second signals rescue B cells from activation-induced mitochondrial dysfunction and death. *Nat Immunol.* 19(8):871-884.
- Alberich-Jorda M, Wouters B, Balastik M, Shapiro-Koss C, Zhang H, Di Ruscio A, Radomska HS, Ebralidze AK, Amabile G, Ye M, Zhang J, Lowers I, Avellino R, Melnick A, Figueroa ME, Valk PJ, Delwel R, Tenen DG. (2012). C/EBP $\gamma$  deregulation results in differentiation arrest in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest.* 122(12):4490-504.
- Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO. J.*, 15: 6541-6551
- Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, Cheng K, Varmeh S, Kozma SC, Thomas G, Rosivatz E, Woscholski R, Cognetti F, Scher HI, Pandolfi PP. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest.* 120(3):681-93.
- Alinikula J, Kohonen P, Nera KP, Lassila O. (2010). Concerted action of Helios and Ikaros controls the expression of the inositol 5-phosphatase SHIP. *Eur J Immunol.* 40(9):2599-607.
- Alkhatib A, Werner M, Hug E, Herzog S, Eschbach C, Faraidun H, Köhler F, Wossning T, Jumaa H. (2012). FoxO1 induces Ikaros splicing to promote immunoglobulin gene recombination. *J Exp Med.* 209(2):395-406.
- Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Tanno S, Skele KL, Hoffman JP, Testa JR. (2002). Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem.* 87(4):470-6.
- Amadori S, Stasi R, Martelli AM, Venditti A, Meloni G, Pane F, Martinelli G, Lunghi M, Pagano L, Cilloni D, Rossetti E, Di Raimondo F, Fozza C, Annino L, Chiarini F, Ricci F, Ammatuna E, La Sala E, Fazi P, Vignetti M. (2012). Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (AML-1107). *Br J Haematol.* 156(2):205-12.
- Aman MJ, Walk SF, March ME, Su HP, Carver DJ, Ravichandran KS. (2000). Essential role for the C-terminal noncatalytic region of SHIP in Fc $\gamma$ RIIB1-mediated inhibitory signaling. *Mol Cell Biol.* 20(10):3576-89.
- Amin RH, Schlissel MS. (2008). Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat Immunol.* 9(6):613-22.
- Arevalo MA, Rodríguez-Tebar A. (2006). Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and stimulate axonal growth. *Mol Biol Cell.* 17(8):3369-77.
- Arenzana TL, Schjerven H, Smale ST. (2015). Regulation of gene expression dynamics during developmental transitions by the Ikaros transcription factor. *Genes Dev.* 29(17):1801-16.
- Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, Pieters R, Kersey JH, Sallan SE, Fletcher JA, Golub TR, Griffin JD, Korsmeyer SJ. (2003). Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell.* 3(2):173-83.
- Arican A, Ozbek N, Baltaci V, Haberal M. (1999). Philadelphia chromosome (+) T-cell acute lymphoblastic leukemia after renal transplantation. *Transplant Proc.* 31(8):3242-3.
- Auvinen A, Hakulinen T, Groves F. (2000). Haemophilus influenzae type B vaccination and risk of childhood leukaemia in a vaccine trial in Finland. *Br J Cancer.* 83(7):956-8.

- Badura S, Tesanovic T, Pfeifer H, Wystub S, Nijmeijer BA, Liebermann M, Falkenburg JH, Ruthardt M, Ottmann OG. (2013). Differential effects of selective inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 8(11):e80070.
- Baillet O, Fenouille N, Abbe P, Robert G, Rocchi S, Gonthier N, Denoyelle C, Ticchioni M, Ortonne JP, Ballotti R, Deckert M, Tartare-Deckert S. (2009). Spleen tyrosine kinase functions as a tumor suppressor in melanoma cells by inducing senescence-like growth arrest. *Cancer Res*. 69(7):2748-56.
- Bain G, Maandag EC, Izon DJ, Amsen D, Kruisbeek AM, Weintraub BC, Krop I, Schlissel MS, Feeney AJ, van Roon M, et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*. 79(5):885-92.
- Baran CP, Tridandapani S, Helgason CD, Humphries RK, Krystal G, Marsh CB. (2003). The inositol 5'-phosphatase SHIP-1 and the Src kinase Lyn negatively regulate macrophage colony-stimulating factor-induced Akt activity. *J Biol Chem*. 278(40):38628-36.
- Barnes B., Kraywinkel K., Nowossadeck E., Schönfeld I., Starker A., Wienecke A., Wolf U. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg), Berlin
- Barnett SF, Defeo-Jones D, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Jones RE, Kahana JA, Kral AM, Leander K, Lee LL, Malinowski J, McAvoy EM, Nahas DD, Robinson RG, Huber HE. (2005). Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J*. 385(Pt 2):399-408.
- Barrett T. (2013). Gene Expression Omnibus (GEO). The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2):281-97.
- Bateman CM, Colman SM, Chaplin T, Young BD, Eden TO, Bhakta M, Gratias EJ, van Wering ER, Cazzaniga G, Harrison CJ, Hain R, Ancliff P, Ford AM, Kearney L, Greaves M. (2010). Acquisition of genome-wide copy number alterations in monozygotic twins with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 115(17):3553-8.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*. 254(5029):274-7.
- Belson M, Kingsley B, and Holmes A. (2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect*. 115(1): 138–145.
- Bernt KM and Hunger SP (2014). Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol*. 4: 54.
- Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, Saki N. (2015). Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*. 72(12):2337-47.
- Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. (1995). Detection of major bcr-abl gene expression at a very low level in blood cells of some healthy individuals. *Blood*. 86(8):3118-22.
- Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA Jr, Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR. (2006). Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature*. 439(7074):353-7.
- Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. (2005). Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*. 5(11):899-904.
- Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*. 19(49):5620-35.
- Blackburn JS, Sali Liu, Jayme L. Wilder, Kimberly P. Dobrinski, Riadh Lobbardi, Finola E. Moore, Sarah A. Martinez, Eleanor Y. Chen, Charles Lee, and David M. Langenau (2014). Clonal evolution enhances

- leukemia propagating cell frequency in T-cell acute lymphoblastic leukemia through Akt/mTORC1 pathway activation. *Cancer Cell*. 25(3): 366–378.
- Blankart CR, Koch T, Linder R, Verheyen F, Schreyögg J, Stargardt T. (2013). Cost of illness and economic burden of chronic lymphocytic leukemia. *Orphanet J Rare Dis*. 8:32.
- Blume-Jensen P, Hunter T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 411(6835):355-65.
- Bodily PM, M. Stanley Fujimoto, Justin T. Page, Mark J. Clement, Mark T. W. Ebbert, Perry G. Ridge, and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). A novel approach for multi-SNP GWAS and its application in Alzheimer's disease. *BMC Bioinformatics*. 17(Suppl 7): 268.
- Boggon TJ, Eck MJ. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 23(48):7918-27.
- Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, Vacic V, Yu YL, Adams S, Darvishian F, Berman R, Shapiro R, Pavlick AC, Lonardi S, Zavadil J, Osman I, Bhardwaj N. (2009). Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(48):20429-34.
- Bohnenberger H. (2013). Regulation of the "spleen tyrosine kinase" Syk in the B-cell antigen receptor signaling pathway [online]. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Bolen JB (1993). Nonreceptor tyrosine protein kinases. *Oncogene*. 8(8):2025-31.
- Bone H, Welham MJ. (2000). Shc associates with the IL-3 receptor beta subunit, SHIP and Gab2 following IL-3 stimulation. Contribution of Shc PTB and SH2 domains. *Cell Signal*. 12(3):183-94.
- Boomer JS, Green JM. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(8):a002436.
- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. (1998). The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*. 92(9):3362-7.
- Brauer H. (2011): Untersuchungen zur biologischen Funktion von Mutationen in der Inositol-5-Phosphatase SHIP1 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie [online]. Dissertation, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg.
- Brauer H, Strauss J, Wegner W, Müller-Tidow C, Horstmann M, Jücker M. (2012). Leukemia-associated mutations in SHIP1 inhibit its enzymatic activity, interaction with the GM-CSF receptor and Grb2, and its ability to inactivate PI3K/AKT signaling. *Cell Signal*. 24(11):2095-101.
- Brogna J, Sieracki E, Gao T, Newton AC. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*. 25(6):917-31.
- Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merckenslager M, Fisher AG. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell*. 91(6):845-54.
- Buentke E, Nordström A, Lin H, Björklund AC, Laane E, Harada M, Lu L, Tegnebratt T, Stone-Elander S, Heyman M, Söderhäll S, Porwit A, Ostenson CG, Shoshan M, Tamm KP, Grandér D. (2011). Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells. *Blood Cancer J*. 1(7):e31.
- Bullock, W., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987). XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with b-galactosidase section. *Biotechniques* 5, 376–9.
- Buontempo F, McCubrey JA, Orsini E, Ruzzene M, Cappellini A, Lonetti A, Evangelisti C, Chiarini F, Evangelisti C, Barata JT, Martelli AM. (2018). Therapeutic targeting of CK2 in acute and chronic leukemias. *Leukemia*. 32(1):1-10.
- Burnet, F. M. (1959). *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. Cambridge Univ. Press.

- Butturini AM, Dorey FJ, Lange BJ, Henry DW, Gaynon PS, Fu C, Franklin J, Siegel SE, Seibel NL, Rogers PC, Sather H, Trigg M, Bleyer WA, Carroll WL. (2007). Obesity and outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 25(15):2063-9.
- Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S, Megias D, Alaminos M, Sanchez-Tapia EM, Montoya MC, Esteller M, Gonzalez-Sarmiento R, Ballestar E. (2007). Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *J Cell Sci.* 120 (Pt 15):2619-30.
- Cammarata G, Augugliaro L, Salemi D, Agueli C, La Rosa M, Dagnino L, Civiletto G, Messana F, Marfia A, Bica MG, Cascio L, Florida PM, Mineo AM, Russo M, Fabbiano F, Santoro A. (2010). Differential expression of specific microRNA and their targets in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 85(5):331-9.
- Candotti F, Oakes SA, Johnston JA, Giliani S, Schumacher RF, Mella P, Fiorini M, Ugazio AG, Badolato R, Notarangelo LD, Bozzi F, Macchi P, Strina D, Vezzoni P, Blaese RM, O'Shea JJ, Villa A. (1997). Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood.* 90(10):3996-4003.
- Cantley LC, Neel BG (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(8):4240-5.
- Cao L, Yu K, Banh C, Nguyen V, Ritz A, Raphael BJ, Kawakami Y, Kawakami T, Salomon AR. (2007). Quantitative time-resolved phosphoproteomic analysis of mast cell signaling. *J Immunol.* 179(9):5864-76.
- Cariaga-Martinez AE, López-Ruiz P, Nombela-Blanco MP, Motiño O, González-Corpas A, Rodríguez-Ubreva J, Lobo MV, Cortés MA, Colás B. (2013). Distinct and specific roles of AKT1 and AKT2 in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells. *Cell Signal.* 25(7):1586-97.
- Caro-Maldonado A, Wang R, Nichols AG, Kuraoka M, Milasta S, Sun LD, Gavin AL, Abel ED, Kelsoe G, Green DR, Rathmell JC. (2014). Metabolic reprogramming is required for antibody production that is suppressed in anergic but exaggerated in chronically BAFF-exposed B cells. *J Immunol.* 192(8):3626-36.
- Carpén JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 448(7152):439-44.
- Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. (2011). PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* 71(3):629-33.
- Carver DJ, Aman MJ, Ravichandran KS. (2000). SHIP inhibits Akt activation in B cells through regulation of Akt membrane localization. *Blood.* 96(4):1449-56.
- Cazzaniga G, van Delft FW, Lo Nigro L, Ford AM, Score J, Iacobucci I, Mirabile E, Taj M, Colman SM, Biondi A, Greaves M. (2011). Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 118(20):5559-64.
- Cenni V, Bavelloni A, Beretti F, Tagliavini F, Manzoli L, Lattanzi G, Maraldi NM, Cocco L, Marmiroli S. (2011). Ankr2/ARPP is a novel Akt2 specific substrate and regulates myogenic differentiation upon cellular exposure to H(2)O(2). *Mol Biol Cell.* 22(16):2946-56.
- Chalhoub N and Baker SJ (2009). PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 4: 127–150.
- Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., and Tsichlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3-Phosphor-inositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 68:965\_1014.
- Chan LN, Chen Z, Braas D, Lee JW, Xiao G, Geng H, Cosgun KN, Hurtz C, Shojaee S, Cazzaniga V, Schjerven H, Ernst T, Hochhaus A, Kornblau SM, Konopleva M, Pufall MA, Cazzaniga G, Liu GJ, Milne TA, Koeffler HP, Ross TS, Sánchez-García I, Borkhardt A, Yamamoto KR, Dickins RA, Graeber TG, Müschen M. (2017). Metabolic gatekeeper function of B-lymphoid transcription factors. *Nature.* 542(7642):479-483.

- Chan LN, Müschen M. (2017). B-cell identity as a metabolic barrier against malignant transformation. *Exp Hematol.* 53:1-6.
- Chandarlapaty S. (2012). Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer. *Cancer Discov.* 2(4):311-9.
- Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Willems L, Bardet V, Park S, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D. (2010). Perspectives on inhibiting mTOR as a future treatment strategy for hematological malignancies. *Leukemia.* 24(10):1686-99.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. (2001a). Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev.* 15(17):2203-8.
- Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y. (2001b). Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 276(34):31858-62.
- Chen Z, Shojaee S, Buchner M, Geng H, Lee JW, Klemm L, Titz B, Graeber TG, Park E, Tan YX, Satterthwaite A, Paietta E, Hunger SP, Willman CL, Melnick A, Loh ML, Jung JU, Coligan JE, Bolland S, Mak TW, Limnander A, Jumaa H, Reth M, Weiss A, Lowell CA, Müschen M. (2015). Signalling thresholds and negative B-cell selection in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 521(7552):357-61.
- Cheng S, Hsia CY, Feng B, Liou ML, Fang X, Pandolfi PP, Liou HC. (2009). BCR-mediated apoptosis associated with negative selection of immature B cells is selectively dependent on Pten. *Cell Res.* 19(2):196-207.
- Cheng J, Qu L, Wang J, Cheng L, Wang Y. (2018). High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia. *Mol Med Rep.* 17(2):2885-2892.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. (2001b). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 292(5522):1728-31.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. (2001a). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 276(42):38349-52.
- Chorner PM, Moorehead RA. (2018). A-674563, a putative AKT1 inhibitor that also suppresses CDK2 activity, inhibits human NSCLC cell growth more effectively than the pan-AKT inhibitor, MK-2206. *PLoS One.* 13(2):e0193344.
- Chin YR, Toker A. (2010a). The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol Cell.* 38(3):333-44.
- Chin YR, Toker A. (2010b). Akt2 regulates expression of the actin-bundling protein palladin. *FEBS Lett.* 584(23):4769-74.
- Chong YP, Ia KK, Mulhern TD, Cheng HC (2005). Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1754(1-2):210-20.
- ClinicalTrials.gov (05.10.19). NIH – U.S. National Library of Medicine.  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>. Stichwort: Acute Lymphocytic Leukemia, Pediatric
- Coad JE, Arthur DC, Gajl-Peczalska KJ, Litz CE. (1994). Late-developing Philadelphia chromosomes in a case of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 8(5):889-94.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.* 436(7051):642.
- Cooper SL, Brown PA. (2015). Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 62(1):61-73.

- Correia NC, Gírio A, Antunes I, Martins LR, Barata JT. (2014). The multiple layers of non-genetic regulation of PTEN tumour suppressor activity. *Eur J Cancer*. 50(1):216-25.
- Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooaya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D. (2011). New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 117(23):6267-76.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378(6559):785-9.
- Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, Croce CM. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(18):7024-9.
- Costinean S, Sandhu SK, Pedersen IM, Tili E, Trotta R, Perrotti D, Ciarlariello D, Neviani P, Harb J, Kauffman LR, Shidham A, Croce CM. (2009). Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase and CCAAT enhancer-binding protein beta are targeted by miR-155 in B cells of Emicro-MiR-155 transgenic mice. *Blood*. 114(7):1374-82.
- Damaraju VL, Kuzma M, Cass CE, Putman CT, Sawyer MB. (2018). Multitargeted kinase inhibitors imatinib, sorafenib and sunitinib perturb energy metabolism and cause cytotoxicity to cultured C2C12 skeletal muscle derived myotubes. *Biochem Pharmacol*. 155:162-171.
- D'Ambrosio D, Fong DC, Cambier JC. (1996). The SHIP phosphatase becomes associated with Fc gammaRIIB1 and is tyrosine phosphorylated during 'negative' signaling. *Immunol Lett*. 54(2-3):77-82.
- Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, Krystal G. (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(4):1689-93.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 91(2):231-41.
- Daver N, Boumber Y, Kantarjian H, Ravandi F, Cortes J, Rytting ME, Kawedia JD, Basnett J, Culotta KS, Zeng Z, Lu H, Richie MA, Garris R, Xiao L, Liu W, Baggerly KA, Jabbour E, O'Brien S, Burger J, Bendall LJ, Thomas D, Konopleva M. (2015). A Phase I/II Study of the mTOR Inhibitor Everolimus in Combination with HyperCVAD Chemotherapy in Patients with Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 21(12):2704-14.
- De Klein A, Hagemeijer A, Bartram CR, Houwen R, Hoefsloot L, Carbonell F, Chan L, Barnett M, Greaves M, Kleihauer E, et al. (1986). bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 68(6):1369-75.
- De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. (2012). The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 16 Suppl 2: S17-27.
- Diccianni MB, Barnhill LM, Lo T and Yu AL (2009). SHIP1 and PTEN Co-Inactivation and Akt Pathway Targeting in ALL. *Blood*. 114:2386
- Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 13(5):1021-31.
- Dillon RL and Muller WJ (2010). Distinct biological roles for the Akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res*. 70(11): 4260-4264.
- Dilosa RM, K Maeda, A Masuda, A K Szakal and J G Tew (1991). Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol*. 146 (12) 4071-4077.
- Di Maira G, Salvi M, Arrighoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ*. 12(6):668-77.



- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 444(7119):638-42.
- Dong Y, Liu F, Wu C, Li S, Zhao X, Zhang P, Jiao J, Yu X, Ji Y, Zhang M. (2016). Illegitimate RAG-mediated recombination events are involved in IKZF1  $\Delta$ 3-6 deletion in BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia. *Clin Exp Immunol*. 185(3):320-31.
- Dovat S, Song C, Payne KJ, Li Z. (2011). Ikaros, CK2 kinase, and the road to leukemia. *Mol Cell Biochem*. 356(1-2):201-7.
- Drayer AL, Pesses X, De Smedt F, Woscholski R, Parker P, Erneux C. (1996). Cloning and expression of a human placenta inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 225(1):243-9.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. (2001). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 344(14):1038-42.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 355(23):2408-17.
- Dummler B, Tschopp O, Hynx D, Yang ZZ, Dirnhofer S, Hemmings BA. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol*. 26(21):8042-51.
- Dupuis A, Gaub MP, Legrain M, Drenou B, Mauvieux L, Lutz P, Herbrecht R, Chan S, Kastner P. (2013). Biclinal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations. *Leukemia*. 27(2):503-7.
- Duty JA, Szodoray P, Zheng NY, Koelsch KA, Zhang Q, Swiatkowski M, Mathias M, Garman L, Helms C, Nakken B, Smith K, Farris AD, Wilson PC. (2009). Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med*. 206(1):139-51.
- Dyguda E, Borys Szefczyk and W. Andrzej Sokalski (2004). The Mechanism of Phosphoryl Transfer Reaction and the Role of Active Site Residues on the Basis of Ribokinase-Like Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* 5(4), 141-153.
- Elong Edimo W, Derua R, Janssens V, Nakamura T, Vanderwinden JM, Waelkens E, Erneux C. (2011). Evidence of SHIP2 Ser132 phosphorylation, its nuclear localization and stability. *Biochem J*. 2011 Nov 1;439(3):391-401. doi: 10.1042/BJ20110173.
- Edimo WE, Janssens V, Waelkens E, Erneux C. (2012). Reversible Ser/Thr SHIP phosphorylation: a new paradigm in phosphoinositide signalling?: Targeting of SHIP1/2 phosphatases may be controlled by phosphorylation on Ser and Thr residues. *Bioessays*. 34(8):634-42.
- Efthymiou AG and Goate AM (2017). Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Mol Neurodegener*. 12: 43.
- Ehm P, Nalaskowski MM, Wundenberg T, Jücker M. (2015). The tumor suppressor SHIP1 colocalizes in nucleolar cavities with p53 and components of PML nuclear bodies. *Nucleus*. 6(2):154-64.
- Ehm PAH, Lange F, Hentschel C, Jepsen A, Glück M, Nelson N, Bettin B, de Bruyn Kops C, Kirchmair J, Nalaskowski M, Jücker M. (2019). Analysis of the FLVR motif of SHIP1 and its importance for the protein stability of SH2 containing signaling proteins. *Cell Signal*. 109380. [Epub ahead of print].
- Enders A, Bouillet P, Puthalakath H, Xu Y, Tarlinton DM, Strasser A. (2003). Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells. *J Exp Med*. 198(7):1119-26.

- Escherich G, Zur Stadt U, Zimmermann M, Horstmann MA; CoALL study group. (2013). Clofarabine in combination with pegylated asparaginase in the frontline treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a feasibility report from the CoALL 08-09 trial. *Br J Haematol.* 163(2):240-7.
- Espinosa L, Cathelin S, D'Altri T, Trimarchi T, Statnikov A, Guiu J, Rodilla V, Inglés-Esteve J, Nomdedeu J, Bellosillo B, Besses C, Abdel-Wahab O, Kucine N, Sun SC, Song G, Mullighan CC, Levine RL, Rajewsky K, Aifantis I, Bigas A. (2010). The Notch/Hes1 pathway sustains NF- $\kappa$ B activation through CYLD repression in T cell leukemia. *Cancer Cell.* 18(3):268-81.
- Ewald F, Grabinski N, Grottko A, Windhorst S, Nörz D, Carstensen L, Staufer K, Hofmann BT, Diehl F, David K, Schumacher U, Nashan B, Jücker M. (2013). Combined targeting of AKT and mTOR using MK-2206 and RAD001 is synergistic in the treatment of cholangiocarcinoma. *Int J Cancer.* 133(9):2065-76.
- Ewald F, Nörz D, Grottko A, Hofmann BT, Nashan B, Jücker M. (2014). Dual Inhibition of PI3K-AKT-mTOR- and RAF-MEK-ERK-signaling is synergistic in cholangiocarcinoma and reverses acquired resistance to MEK-inhibitors. *Invest New Drugs.* 32(6):1144-54.
- Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. (1998). Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 91(11):3995-4019.
- Fajer M, Meng Y and Roux B. (2017). The Activation of c-Src Tyrosine Kinase: Conformational Transition Pathway and Free Energy Landscape. *J Phys Chem B.* 121(15): 3352–3363.
- Fan Y and Lu D (2016). The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharm Sin B.* 6(6): 513–521.
- Fedders H, Alsadeq A, Schmah J, Vogiatzi F, Zimmermann M, Mörücke A, Lenk L, Stadt UZ, Horstmann MA, Pieters R, Schrappe M, Stanulla M, Cario G, Schewe DM. (2017). The role of constitutive activation of FMS-related tyrosine kinase-3 and *NRas/KRas* mutational status in infants with *KMT2A*-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 102(11):e438-e442.
- Feldhahn N, Klein F, Mooster JL, Hadweh P, Sprangers M, Wartenberg M, Bekhite MM, Hofmann WK, Herzog S, Jumaa H, Rowley JD, Müschen M. (2005). Mimicry of a constitutively active pre-B cell receptor in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med.* 201(11):1837-52.
- Filippakopoulos P, Kofler M, Hantschel O, Gish GD, Grebien F, Salah E, Neudecker P, Kay LE, Turk BE, Superti-Furga G, Pawson T, Knapp S. (2008). Structural coupling of SH2-kinase domains links Fes and Abl substrate recognition and kinase activation. *Cell.* 134(5):793-803.
- Filippakopoulos P, Müller S, Knapp S. (2009). SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol.* 19(6):643-9.
- Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, Menzies A, Teague JW, Futreal PA, Stratton MR. (2008). The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet.* Chapter 10: Unit 10.11.
- Ford AM, Palmi C, Bueno C, Hong D, Cardus P, Knight D, Cazzaniga G, Enver T, Greaves M. (2009). The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. *J Clin Invest.* 119(4):826-36.
- Frank C, Burkhardt C, Imhof D, Ringel J, Zschörnig O, Wieligmann K, Zacharias M, Böhmer FD. (2004). Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J Biol Chem.* 279(12):11375-83.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 275(5300):665-8.
- Franke, T. F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene,* 27(50):6473\_6488.
- Franks SE, Briah R, Jones RA, Moorehead RA. (2016). Unique roles of Akt1 and Akt2 in IGF-IR mediated lung tumorigenesis. *Oncotarget.* 7(3):3297-316.
- Franks SE, Cambier JC. (2018). Putting on the Brakes: Regulatory Kinases and Phosphatases Maintaining B Cell Anergy. *Front Immunol.* 9:665.

- Fransecky L, Mochmann LH, Baldus CD. (2015). Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Mol Cell Ther.* 3:2.
- Franz WM, Berger P, Wang JY. (1989). Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J.* 8(1):137-47.
- Freeburn RW, Wright KL, Burgess SJ, Astoul E, Cantrell DA, Ward SG. (2002). Evidence that SHIP-1 contributes to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate metabolism in T lymphocytes and can regulate novel phosphoinositide 3-kinase effectors. *J Immunol.* 169(10):5441-50.
- Fu C, Turck CW, Kurosaki T, Chan AC. (1998). BLNK: a central linker protein in B cell activation. *Immunity.* 9(1):93-103.
- Fu Q, Huang Y, Ge C, Li Z, Tian H, Li Q, Li H, Li R, Tao X, Xue Y, Wang Y, Yang G, Fang W, Song X. (2019). SHIP1 inhibits cell growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through the PI3K/AKT pathway. *Oncol Rep.* 41(4):2337-2350.
- Fuhler GM, Robert Brooks, Bonnie Toms, Sonia Iyer, Elizabeth A Gengo, Mi-Young Park, Matthew Gumbleton, Dennis R Viernes, John D Chisholm, and William G Kerr. (2012). Therapeutic Potential of SH2 Domain-Containing Inositol-5'-Phosphatase 1 (SHIP1) and SHIP2 Inhibition in Cancer *Mol Med.* 18(1): 65–75.
- Fujimoto M, Poe JC, Jansen PJ, Sato S, Tedder TF. (1999). CD19 amplifies B lymphocyte signal transduction by regulating Src-family protein tyrosine kinase activation. *J Immunol.* 162(12):7088-94.
- Fuka G, Kauer M, Kofler R, Haas OA, Panzer-Grümayer R. (2011). The leukemia-specific fusion gene ETV6/RUNX1 perturbs distinct key biological functions primarily by gene repression. *PLoS One.* 6(10):e26348.
- Fuka G, Kantner HP, Grausenburger R, Inthal A, Bauer E, Krapf G, Kaindl U, Kauer M, Dworzak MN, Stoiber D, Haas OA, Panzer-Grümayer R. (2012). Silencing of ETV6/RUNX1 abrogates PI3K/AKT/mTOR signaling and impairs reconstitution of leukemia in xenografts. *Leukemia.* 2012 May;26(5):927-33.
- Gale KB, Ford AM, Repp R, Borkhardt A, Keller C, Eden OB, Greaves MF. (1997). Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(25):13950-4.
- Gao T, Furnari F, Newton AC. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell.* 18(1):13-24.
- Gao D, Inuzuka H, Tseng A, Chin RY, Toker A, Wei W. (2009). Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APC<sup>Cdh1</sup>-mediated Skp2 destruction. *Nat Cell Biol.* 11(4):397-408.
- Gauld SB, Benschop RJ, Merrell KT, Cambier JC. (2005). Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat Immunol.* 6(11):1160-7.
- Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med.* 177(4):999-1008.
- Garcia-Palma L, Horn S, Haag F, Diessenbacher P, Streichert T, Mayr GW, Jücker M. (2005). Up-regulation of the T cell quiescence factor KLF2 in a leukaemic T-cell line after expression of the inositol 5'-phosphatase SHIP-1. *Br J Haematol.* 131(5):628-31.
- Geier SJ, Algate PA, Carlberg K, Flowers D, Friedman C, Trask B, Rohrschneider LR. (1997). The human SHIP gene is differentially expressed in cell lineages of the bone marrow and blood. *Blood.* 89(6):1876-85.
- Gelelete CB, Pereira SH, Azevedo AM, Thiago LS, Mundim M, Land MG, Costa ES. (2011). Overweight as a prognostic factor in children with acute lymphoblastic leukemia. *Obesity (Silver Spring).* 19(9):1908-11.
- Geng H, Hurtz C, Lenz KB, Chen Z, Baumjohann D, Thompson S, Goloviznina NA, Chen WY, Huan J, LaTocha D, Ballabio E, Xiao G, Lee JW, Deucher A, Qi Z, Park E, Huang C, Nahar R, Kweon SM, Shojae S, Chan LN, Yu J, Kornblau SM, Bijl JJ, Ye BH, Ansel KM, Paietta E, Melnick A, Hunger SP, Kurre P, Tyner JW, Loh ML, Roeder RG, Druker BJ, Burger JA, Milne TA, Chang BH, Müschen M. (2015). Self-

- enforcing feedback activation between BCL6 and pre-B cell receptor signaling defines a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 27(3):409-25.
- Gerloff D, Grundler R, Wurm AA, Bräuer-Hartmann D, Katzerke C, Hartmann JU, Madan V, Müller-Tidow C, Duyster J, Tenen DG, Niederwieser D, Behre G. (2015). NF- $\kappa$ B/STAT5/miR-155 network targets PU.1 in FLT3-ITD-driven acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 29(3):535-47.
- Getahun A, Beavers NA, Larson SR, Shlomchik MJ, Cambier JC. (2016). Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. *J Exp Med*. 213(5):751-69.
- Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, Barretina J, Lin WM, Rameh L, Salmena L, Pandolfi PP, Cantley LC. (2009). Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell*. 16(2):115-25.
- Gilham C, Peto J, Simpson J, Roman E, Eden TO, Greaves MF, Alexander FE; UKCCS Investigators. (2005). Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. *BMJ*. 330(7503):1294.
- Girardi C, James P, Zanin S, Pinna LA, Ruzzene M. (2014). Differential phosphorylation of Akt1 and Akt2 by protein kinase CK2 may account for isoform specific functions. *Biochim Biophys Acta*. 1843(9):1865-74.
- Girardi T, Vicente C, Cools J, De Keersmaecker K. (2017). The genetics and molecular biology of T-ALL. *Blood*. 129(9):1113-1123.
- Giuriato S, Bodin S, Erneux C, Woscholski R, Plantavid M, Chap H, Payrastra B. (2000). pp60c-src associates with the SH2-containing inositol-5-phosphatase SHIP1 and is involved in its tyrosine phosphorylation downstream of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin in human platelets. *Biochem J*. 348 Pt 1:107-12.
- Gökbuget N, Stanze D, Beck J, Diedrich H, Horst HA, Hüttmann A, Kobbe G, Kreuzer KA, Leimer L, Reichle A, Schaich M, Schwartz S, Serve H, Starck M, Stelljes M, Stuhlmann R, Viardot A, Wendelin K, Freund M, Hoelzer D; German Multicenter Study Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. (2012). Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood*. 120(10):2032-41.
- Gökbuget N., Hehn S., Wolf A. (2016). Die akute lymphatische Leukämie (ALL) des Erwachsenen
- Gökbuget N. (2017). Akute lymphatische Leukämie des Erwachsenen – Aktuelle Standardtherapie und neue Therapieansätze. *Arzneimitteltherapie* 35:371-82.
- Gomes AM, Soares MV, Ribeiro P, Caldas J, Póvoa V, Martins LR, Melão A, Serra-Caetano A, de Sousa AB, Lacerda JF, Barata JT. (2014). Adult B-cell acute lymphoblastic leukemia cells display decreased PTEN activity and constitutive hyperactivation of PI3K/Akt pathway despite high PTEN protein levels. *Haematologica*. 99(6):1062-8.
- Gonzalez E. and McGraw TE (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 8(16): 2502–2508.
- Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, Pritchard-Briscoe H, Wotherspoon JS, Loblay RH, Raphael K, et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*. 334(6184):676-82.
- Goodnow CC, Brink R, Adams E. (1991). Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes. *Nature*. 352(6335):532-6.
- Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ. (2004). Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res*. 10(19):6661-8.
- Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. (2012). An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev*. 6(1):e8.

- Graves JD, Krebs EG. (1999). Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther.* 82(2-3):111-21.
- Grabinski N, Ewald F, Hofmann BT, Staufer K, Schumacher U, Nashan B, Jücker M. (2012). Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer.* 11:85.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR & Hanahan D (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *P Natl Acad Sci USA* 87: 4645–4649.
- Greaves MF, Wiemels J. (2003). Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 3(9):639-49.
- Greaves M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 6(3):193-203.
- Grimsholm O, Ren W, Bernardi AI, Chen H, Park G, Camponeschi A, Chen D, Bergmann B, Höök N, Andersson S, Strömberg A, Gjertsson I, Cardell S, Yrlid U, De Riva A, Mårtensson IL. (2015). Absence of surrogate light chain results in spontaneous autoreactive germinal centres expanding V(H)81X-expressing B cells. *Nat Commun.* 6:7077.
- Gross AJ, Lyandres JR, Panigrahi AK, Prak ET, DeFranco AL. (2009). Developmental acquisition of the Lyn-CD22-SHP-1 inhibitory pathway promotes B cell tolerance. *J Immunol.* 182(9):5382-92.
- Grottke A, Ewald F, Lange T, Nörz D, Herzberger C, Bach J, Grabinski N, Gräser L, Höppner F, Nashan B, Schumacher U, Jücker M. (2016). Downregulation of AKT3 Increases Migration and Metastasis in Triple Negative Breast Cancer Cells by Upregulating S100A4. *PLoS One.* 11(1):e0146370.
- Groves FD, Sinha D, Kayhty H, Goedert JJ, Levine PH. (2001). Haemophilus influenzae type b serology in childhood leukaemia: a case-control study. *Br J Cancer.* 85(3):337-40.
- Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, Wang Y, Deng G, Zhu L, Tan Z, Hu Y, Wu C, Nardone J, MacNeill J, Ren J, Reeves C, Innocenti G, Norris B, Yuan J, Yu J, Haack H, Shen B, Peng C, Li H, Zhou X, Liu X, Rush J, Comb MJ. (2011). Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One.* 6(1):e15640.
- Guo W, Lasky JL, Chang CJ, Mosessian S, Lewis X, Xiao Y, Yeh JE, Chen JY, Iruela-Arispe ML, Varella-Garcia M, Wu H. (2008). Multi-genetic events collaboratively contribute to Pten-null leukaemia stem-cell formation. *Nature.* 453(7194):529-33.
- Guo Y, Li Y, Shan Q, He G, Lin J, Gong Y. (2015). Curcumin potentiates the anti-leukemia effects of imatinib by downregulation of the AKT/mTOR pathway and BCR/ABL gene expression in Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Int J Biochem Cell Biol.* 65:1-11.
- Gupta A, Leslie NR. (2016). Controlling PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Stability: A DOMINANT ROLE FOR LYSINE 66. *J Biol Chem.* 291(35):18465-73.
- Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, Basso G, Kronnie GT, Béné MC, De Vos J, Hernández JM, Hofmann WK, Mills KI, Gilkes A, Chiaretti S, Shurtleff SA, Kipps TJ, Rassenti LZ, Yeoh AE, Papenhausen PR, Liu WM, Williams PM, Foà R. (2010). Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol.* 28(15):2529-37.
- Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST. (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 12(6):782-96.
- Hamilton MJ, Ho VW, Kuroda E, Ruschmann J, Antignano F, Lam V, Krystal G. (2011). Role of SHIP in cancer. *Exp Hematol.* 39(1):2-13.
- Han J, Jin R, Zhang M, Guo Q, Zhou F. (2017). Ikaros 6 protects acute lymphoblastic leukemia cells against daunorubicin-induced apoptosis by activating the Akt-FoxO1 pathway. *J Leukoc Biol.* 101(3):675-681.

- Han Q, Ma J, Gu Y, Song H, Kapadia M, Kawasaki YI, Dovat S, Song C, Ge Z. (2019). *RAG1* high expression associated with *IKZF1* dysfunction in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer*. 10(16):3842-3850.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-8
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70.
- Harrison-Findik D, Susa M, Varticovski L. (1995). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene*. 10(7):1385-91.
- Hazen AL, Smith MJ, Despons C, Winter O, Moser K, Kerr WG. (2009). SHIP is required for a functional hematopoietic stem cell niche. *Blood*. 113(13):2924-33.
- Heissig B, Ohki Y, Sato Y, Rafii S, Werb Z, Hattori K. (2005). A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology*. 10(3):247-53.
- Helgason CD, Jacqueline E. Damen, Patty Rosten, Rewa Grewal, Poul Sorensen, Suzanne M. Chappel, Anita Borowski, Frank Jirik, Gerald Krystal, and R. Keith Humphries. (1998). Targeted disruption of *SHIP* leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span *Genes Dev*. 12(11): 1610–1620.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 4(12):988-1004.
- Heron-Milhavet L, Franckhauser C, Rana V, Berthenet C, Fisher D, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol Cell Biol*. 26(22):8267-80.
- Heron-Milhavet L, Mamaeva D, Rochat A, Lamb NJ, Fernandez A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *J Cell Physiol*. 214(1):158-65.
- Hess J, Werner A, Wirth T, Melchers F, Jäck HM, Winkler TH. (2001). Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(4):1745-50.
- Hidaka M, Homma Y, Takenawa T. (1991). Highly conserved eight amino acid sequence in SH2 is important for recognition of phosphotyrosine site. *Biochem Biophys Res Commun*. 180(3):1490-7.
- Ho JM, Nguyen MH, Dierov JK, Badger KM, Beattie BK, Tartaro P, Haq R, Zanke BW, Carroll MP, Barber DL. (2002). TEL-JAK2 constitutively activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK), stress-activated protein/Jun kinase (SAPK/JNK), and p38 signaling pathways. *Blood*. 100(4):1438-48.
- Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ; IRIS Investigators. (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 376(10):917-927.
- Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, Payne-Turner D, Churchman M, Andersson A, Chen SC, McCastlain K, Becksfort J, Ma J, Wu G, Patel SN, Heatley SL, Phillips LA, Song G, Easton J, Parker M, Chen X, Rusch M, Boggs K, Vadodaria B, Hedlund E, Drenberg C, Baker S, Pei D, Cheng C, Huether R, Lu C, Fulton RS, Fulton LL, Tabib Y, Dooling DJ, Ochoa K, Minden M, Lewis ID, To LB, Marlton P, Roberts AW, Raca G, Stock W, Neale G, Drexler HG, Dickins RA, Ellison DW, Shurtleff SA, Pui CH, Ribeiro RC, Devidas M, Carroll AJ, Heerema NA, Wood B, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, Raimondi SC, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Hunger SP, Loh ML, Mullighan CG. (2013). The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 45(3):242-52.
- Holt LJ. (2012). Regulatory modules: Coupling protein stability to phosphoregulation during cell division. *FEBS Lett*. 586(17):2773-7.
- Horn S, Meyer J, Heukeshoven J, Fehse B, Schulze C, Li S, Frey J, Poll S, Stocking C, Jucker M (2001) The inositol 5-phosphatase SHIP is expressed as 145 and 135 kDa proteins in blood and bone marrow cells in

- vivo, whereas carboxyl-truncated forms of SHIP are generated by proteolytic cleavage in vitro. *LEUKEMIA* 15(1): 112-120.
- Horn S, Endl E, Fehse B, Weck MM, Mayr GW, Jücker M. (2004). Restoration of SHIP activity in a human leukemia cell line downregulates constitutively activated phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3beta signaling and leads to an increased transit time through the G1 phase of the cell cycle. *Leukemia*. 18(11):1839-49.
- Horn S, Bergholz U, Jücker M, McCubrey JA, Trümper L, Stocking C, Bäsecke J. (2008). Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene*. 27(29):4096-106.
- Hornbeck PV, Chabra I, Kornhauser JM, Skrzypek E, Zhang B. (2004). PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics*. 4(6):1551-61.
- Howell BW and Cooper JA (1994). Csk Suppression of Src Involves Movement of Csk to Sites of Src Activity. *Molecular and Cellular Biology*, p. 5402-5411 Vol. 14, No. 8
- Hu Y, Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, Hallek M, Van Etten RA, Li S. (2004). Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 36(5):453-61.
- Hu Y, Kong L, Staples K, Mills K, Monroe JG and Li S (2005). A Critical Role of Blockade of Cell Differentiation in BCR-ABL-Induced B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL): Basis for Superb Therapeutic Effect on B-ALL in Mice by Promotion of Pro-B Leukemic Cell Differentiation and Treatment with Imatinib. *Blood* 106:844.
- Huang W., Dechen Jiang, Xiaoyang Wang, Kelong Wang, Christopher E. Sims, Nancy L. Allbritton, and Qisheng Zhang. (2011). Kinetic Analysis of PI3K Reactions with Fluorescent PIP<sub>2</sub> Derivatives. *Anal Bioanal Chem*. 401(6): 1881–1888.
- Huck K, Feyen O, Niehues T, Rüschemdorf F, Hübner N, Laws HJ, Teliëps T, Knapp S, Wacker HH, Meindl A, Jumaa H, Borkhardt A. (2009). Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest*. 119(5):1350-8.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 356(22):2271-81.
- Hug E, Hobeika E, Reth M, Jumaa H. (2014). Inducible expression of hyperactive Syk in B cells activates Blimp-1-dependent terminal differentiation. *Oncogene*. 33(28):3730-41.
- Iacobucci I, Cristina Papayannidis, Annalisa Lonetti, Anna Ferrari, Michele Bacarani, and Giovanni Martinelli. (2012a). Cytogenetic and Molecular Predictors of Outcome in Acute Lymphocytic Leukemia: Recent Developments. *Curr Hematol Malig Rep*. 7(2): 133–143.
- Iacobucci I, Iraci N, Messina M, Lonetti A, Chiaretti S, Valli E, Ferrari A, Papayannidis C, Paoloni F, Vitale A, Storlazzi CT, Ottaviani E, Guadagnuolo V, Durante S, Vignetti M, Soverini S, Pane F, Foà R, Bacarani M, Müschen M, Perini G, Martinelli G. (2012b). IKAROS deletions dictate a unique gene expression signature in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One*. 7(7):e40934.
- Iida M, Brand TM, Campbell DA, Starr MM, Luthar N, Traynor AM, Wheeler DL. (2013). Targeting AKT with the allosteric AKT inhibitor MK-2206 in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther*. 14(6):481-91.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 4(9):648-57.
- Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, Swidenbank I, Ponthan F, Kirschner-Schwabe R, Groeneveld-Krentz S, Hof J, Allan J, Harrison C, Vormoor J, von Stackelberg A, Eckert C. (2014). Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 124(23):3420-30.

- Ivetac I, Gurung R, Hakim S, Horan KA, Sheffield DA, Binge LC, Majerus PW, Tiganis T, Mitchell CA. (2009). Regulation of PI(3)K/Akt signalling and cellular transformation by inositol polyphosphate 4-phosphatase-1. *EMBO Rep.* 10(5):487-93.
- Jackson MP, Hewitt EW. (2016). Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem.* 60(2):173-180.
- Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, Zweidler-McKay P, Lu X, Fawcett G, Wang SA, Konoplev S, Harvey RC, Chen IM, Payne-Turner D, Valentine M, Thomas D, Garcia-Manero G, Ravandi F, Cortes J, Kornblau S, O'Brien S, Pierce S, Jorgensen J, Shaw KR, Willman CL, Mullighan CG, Kantarjian H, Konopleva M. (2017). Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood.* 129(5):572-581.
- Jarquín JCP, Rosa M. Ayala, Ana Belen Dueñas Perez, Daniel Rueda, María Luisa Martín Ramos, José Luis Vivanco, Pilar Martínez Sánchez, Rafael Alberto Alonso Fernández, Florinda Gilsanz Rodríguez and Joaquín Martínez-López (2013). Correlation Between Clinical Features, CRLF2 Expression and Copy Number Alterations In Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 122:4953.
- Jean S. and Kiger AA. (2014). Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci.* 127(5): 923–928.
- Jefferson AB, Majerus PW. (1995). Properties of type II inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem.* 270(16):9370-7.
- Jerchel IS, Hoogkamer AQ, Ariës IM, Steeghs EMP, Boer JM, Besselink NJM, Boeree A, van de Ven C, de Groot-Kruseman HA, de Haas V, Horstmann MA, Escherich G, Zwaan CM, Cuppen E, Koudijs MJ, Pieters R, den Boer ML. (2018). RAS pathway mutations as a predictive biomarker for treatment adaptation in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 32(4):931-940.
- Jessup CF, Ridings J, Ho A, Nobbs S, Robertson DM, Macardle P, Zola H. (2001). The Fc receptor for IgG (Fc gamma RII; CD32) on human neonatal B lymphocytes. *Hum Immunol.* 62(7):679-85.
- Jia HY, Wu JX, Zhu XF, Chen JM, Yang SP, Yan HJ, Tan L, Zeng YX, Huang W. (2009). ZD6474 inhibits Src kinase leading to apoptosis of imatinib-resistant K562 cells. *Leuk Res.* 33(11):1512-9.
- Jing H, Jun-Xia Zhu, Hui-Fu Wang, Wei Zhang, Zhan-Jie Zheng, Ling-Li Kong, Chen-Chen Tan, Zi-Xuan Wang, Lin Tan, and Lan Tan (2016). *INPP5D* rs35349669 polymorphism with late-onset Alzheimer's disease: A replication study and meta-analysis. *Oncotarget.* 7(43): 69225–69230.
- Jo H, Mondal S, Tan D, Nagata E, Takizawa S, Sharma AK, Hou Q, Shanmugasundaram K, Prasad A, Tung JK, Tejada AO, Man H, Rigby AC, Luo HR. (2012). Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(26):10581-6.
- Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul.* 2(12):1001-9.
- Jones PA, Baylin SB. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* (6):415-28.
- Jones D, Thomas D, Yin CC, O'Brien S, Cortes JE, Jabbour E, Breeden M, Giles FJ, Zhao W, Kantarjian HM. (2008). Kinase domain point mutations in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia emerge after therapy with BCR-ABL kinase inhibitors. *Cancer.* 113(5):985-94.
- Jorissen RN, Gibbs P, Christie M, Prakash S, Lipton L, Desai J, Kerr D, Aaltonen LA, Arango D, Kruhøffer M, Orntoft TF, Andersen CL, Gruidl M, Kamath VP, Eschrich S, Yeatman TJ, Sieber OM. (2009). Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 15(24):7642-7651.
- Jotta PY, Ganazza MA, Silva A, Viana MB, da Silva MJ, Zambaldi LJ, Barata JT, Brandalise SR, Yunes JA. (2010). Negative prognostic impact of PTEN mutation in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 24(1):239-42.



- Jücker M, Schiffer CA, Feldman RA. (1997). A tyrosine-phosphorylated protein of 140 kD is constitutively associated with the phosphotyrosine binding domain of Shc and the SH3 domains of Grb2 in acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 89(6):2024-35.
- Kaatsch P, Grabow D, Spix C (2019). German Childhood Cancer Registry – Annual Report 2018 (1980-2017). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
- Kakadia PM, Tizazu B, Mellert G, Harbott J, Röttgers S, Quentmeier H, Spiekermann K, Bohlander SK. (2011). A novel ABL1 fusion to the SH2 containing inositol phosphatase-1 (SHIP1) in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia*. 25(10):1645-9.
- Kandath C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 502(7471):333-339.
- Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, Estey E, Keating MJ, Ku S, Trujillo J, Huh Y, Stass S, Kurzrock R. (1991). Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood*. 78(9):2411-8.
- Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Garcia-Manero G, Verstovsek S, Giles F, Rios MB, Shan J, Letvak L, Thomas D, Faderl S, Ferrajoli A, Cortes J. (2004). High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*. 103(8):2873-8.
- Karasuyama H, Kudo A, Melchers F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med*. 172(3):969-72.
- Kavanaugh WM, Pot DA, Chin SM, Deuter-Reinhard M, Jefferson AB, Norris FA, Masiarz FR, Cousens LS, Majerus PW, Williams LT. (1996). Multiple forms of an inositol polyphosphate 5-phosphatase form signaling complexes with Shc and Grb2. *Curr Biol*. 6(4):438-45.
- Keenan RA, De Riva A, Corleis B, Hepburn L, Licence S, Winkler TH, Mårtensson IL. (2008). Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science*. 321(5889):696-9.
- Kersseboom R, Kil L, Flierman R, van der Zee M, Dingjan GM, Middendorp S, Maas A, Hendriks RW. (2010). Constitutive activation of Bruton's tyrosine kinase induces the formation of autoreactive IgM plasma cells. *Eur J Immunol*. 40(9):2643-54.
- Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, Bloomfield CD, Estey E, Burnett A, Cornelissen JJ, Scheinberg DA, Bouscary D, Linch DC. (2016). Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2:16010.
- Kikuchi K, Lai AY, Hsu CL, Kondo M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med*. 201(8):1197-203.
- Kim AH, Yano H, Cho H, Meyer D, Monks B, Margolis B, Birnbaum MJ, Chao MV. (2002). Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron*. 35(4):697-709.
- Kim A., Stachura D., and Traver D. (2014). Cell Signaling Pathways Involved in Hematopoietic Stem Cell Specification. *Exp Cell Res*. 329(2): 227–233.
- Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol*. 32(3):720-30.
- Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Müller W, Melchers F, Rajewsky K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell*. 69(5):823-31.
- Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA, Magee AI (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J*. 303 (Pt 3):749-53.

- Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, Downing JR, Shurtleff SA, Mills KI, Gilkes AF, Hofmann WK, Basso G, Dell'orto MC, Foà R, Chiaretti S, De Vos J, Rauhut S, Papenhausen PR, Hernández JM, Lumberras E, Yeoh AE, Koay ES, Li R, Liu WM, Williams PM, Wieczorek L, Haferlach T. (2008). An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *Br J Haematol.* 142(5):802-7.
- Koster J., Molenaar JJ. And Versteeg R. (2015). R2: Accessible web-based genomics analysis and visualization platform for biomedical researchers. AACR Special Conference: Translation of the Cancer Genome
- Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. (2005). A novel stem-cell population in adult liver with potent hematopoietic-reconstitution activity. *Blood.* 106(5):1574-80.
- Kowanetz K, Husnjak K, Höller D, Kowanetz M, Soubeyran P, Hirsch D, Schmidt MH, Pavelic K, De Camilli P, Randazzo PA, Dikic I. (2004). CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell.* 15(7):3155-66.
- Kraus M, Alimzhanov MB, Rajewsky N, Rajewsky K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell.* 117(6):787-800.
- Krauss G. (2008): Biochemistry of signal transduction and regulation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 4. Auflage.
- Kudo A, Melchers F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J.* 6(8):2267-72.
- Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, van Reijmersdal SV, Venkatachalam R, Scheijen B, Sonneveld E, van Dongen JJ, Veerman AJ, van Leeuwen FN, van Kessel AG, Hoogerbrugge PM. (2010). IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia.* 24(7):1258-64.
- Kumar CC, Madison V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene.* 24(50):7493-501.
- la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel.* 17(6):527-36.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 6(11):1229-34.
- Lakhanpal GK, Vecchiarelli-Federico LM, Li YJ, Cui JW, Bailey ML, Spaner DE, Dumont DJ, Barber DL, Ben-David Y. (2010). The inositol phosphatase SHIP-1 is negatively regulated by Fli-1 and its loss accelerates leukemogenesis. *Blood.* 116(3):428-36.
- Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell.* 90(6):1073-83.
- Lam YW, Lamond AI (2006). Chapter 15 – Isolation of Nucleoli. *Cell Biology (Third Edition) A Laboratory Handbook.* Volume 2, Pages 103-107.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 45(12):1452-8.
- Lang F, Wojcik B, Rieger MA. (2015). Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Stem Cells Int.* 2015:137164.
- Langer T, Führer M, Stöhr W, Dörffel W, Dörr HG, Bielack S, Rossi R, Kaatsch P, Beck JD (2002). Die Überlebenden einer Krebserkrankung im Kindesalter Nachsorge und Spätfolgen nach erfolgreicher Therapie. *Monatsschrift Kinderheilkunde,* Volume 150, Issue 8, pp 942–953

- Lappalainen I, Thusberg J, Shen B, Vihinen M. (2008). Genome wide analysis of pathogenic SH2 domain mutations. *Proteins*. 72(2):779-92.
- Lawrence T and Hagemann T (2012). *Tumour-Associated Macrophages*. Springer Verlag.
- Lehrer S. (2018). Glioma and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Rep*. 2(1):213-218.
- Leischner H, Albers C, Grundler R, Razumovskaya E, Spiekermann K, Bohlander S, Rönstrand L, Götze K, Peschel C, Duyster J. (2012). SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood*. 119(17):4026-33.
- Lemmon MA, Schlessinger J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141(7):1117-34.
- Leoni V, Biondi A. (2015). Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 100(3):295-9.
- Li X, Sanda T, Look AT, Novina CD, von Boehmer H. (2011). Repression of tumor suppressor miR-451 is essential for NOTCH1-induced oncogenesis in T-ALL. *J Exp Med*. 208(4):663-75.
- Lim LC, Heng KK, Vellupillai M, Tan LT, Boey BC, Lau LC, How GF. (1999). Molecular and phenotypic spectrum of de novo Philadelphia positive acute leukemia. *Int J Mol Med*. 4(6):665-7.
- Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Petrik JJ, Wootton SK. (2014). Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *PLoS One*. 9(4):e94595.
- Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Moorehead R, Jücker M, Wootton SK, Petrik J. (2016). Akt isoform specific effects in ovarian cancer progression. *Oncotarget*. 7(46):74820-74833.
- Lioubin MN, Algate PA, Tsai S, Carlberg K, Aebersold A, Rohrschneider LR. (1996). p150Ship, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. *Genes Dev*. 10(9):1084-95.
- Listovsky T, Oren YS, Yudkovsky Y, Mahubani HM, Weiss AM, Lebediker M, Brandeis M. (2004). Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO J*. 23(7):1619-26.
- Liu X, Brodeur SR, Gish G, Songyang Z, Cantley LC, Laudano AP, Pawson T. (1993). Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene*. 8(5):1119-26.
- Liu L, Damen JE, Hughes MR, Babic I, Jirik FR, Krystal G. (1997). The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J Biol Chem*. 272(14):8983-8.
- Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev*. 13(7):786-91.
- Liu P., Hailing Cheng, Thomas M. Roberts, and Jean J. Zhao (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 8(8): 627–644.
- Liu BA, Eshana Shah, Karl Jablonowski, Andrew Stergachis, Brett Engelmann, and Piers D. Nash (2011). The SH2 Domain-Containing Proteins in 21 Species Establish the Provenance and Scope of Phosphotyrosine Signaling in Eukaryotes. *Sci Signal*. 4(202): ra83.
- Liu S, Zhang H, Li M, Hu D, Li C, Ge B, Jin B, Fan Z. (2013). Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ*. 20(3):456-64.
- Liu T, Kishton RJ, Macintyre AN, Gerriets VA, Xiang H, Liu X, Abel ED, Rizzieri D, Locasale JW, Rathmell JC. (2014). Glucose transporter 1-mediated glucose uptake is limiting for B-cell acute lymphoblastic leukemia anabolic metabolism and resistance to apoptosis. *Cell Death Dis*. 5:e1470.
- Liu-Dumlao T, Kantarjian H, Thomas DA, O'Brien S, Ravandi F. (2012). Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment options. *Curr Oncol Rep*. 14(5):387-94.

- Lo TC, Barnhill LM, Kim Y, Nakae EA, Yu AL, Diccianni MB. (2009). Inactivation of SHIP1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia due to mutation and extensive alternative splicing. *Leuk Res.* 33(11):1562-6.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
- Lu S, Huang W, Zhang J. (2014). Recent computational advances in the identification of allosteric sites in proteins. *Drug Discov Today.* 19(10):1595-600.
- Lu Z, Xie J, Wu G, Shen J, Collins R, Chen W, Kang X, Luo M, Zou Y, Huang LJ, Amatruda JF, Slone T, Winick N, Scherer PE, Zhang CC. (2017). Fasting selectively blocks development of acute lymphoblastic leukemia via leptin-receptor upregulation. *Nat Med.* 23(1):79-90.
- Ma X, Does MB, Metayer C, Russo C, Wong A, Buffler PA. (2005). Vaccination history and risk of childhood leukaemia. *Int J Epidemiol.* 34(5):1100-9.
- Ma K, Cheung SM, Marshall AJ, Duronio V. (2008). PI(3,4,5)P3 and PI(3,4)P2 levels correlate with PKB/akt phosphorylation at Thr308 and Ser473, respectively; PI(3,4)P2 levels determine PKB activity. *Cell Signal.* 20(4):684-94.
- Malbec O, Dana C, Fong, Martin Turner, Victor L. J. Tybulewicz, John C. Cambier, Wolf H. Fridman and Marc Daëron (1998). Fcε Receptor I-Associated *lyn*-Dependent Phosphorylation of Fcγ Receptor IIB During Negative Regulation of Mast Cell Activation. *J Immunol* 160 (4) 1647-1658
- Mandel EM, Grosschedl R. (2010). Transcription control of early B cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 22(2):161-7.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298(5600):1912-34.
- Mansour MR, Sanda T, Lawton LN, Li X, Kreslavsky T, Novina CD, Brand M, Gutierrez A, Kelliher MA, Jamieson CH, von Boehmer H, Young RA, Look AT. (2013). The TAL1 complex targets the FBXW7 tumor suppressor by activating miR-223 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 210(8):1545-57.
- Margolis B, Skolnik EY. (1994). Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol.* 5(6):1288-99.
- Marke R, Havinga J, Cloos J, Demkes M, Poelmans G, Yuniati L, van Ingen Schenau D, Sonneveld E, Waanders E, Pieters R, Kuiper RP, Hoogerbrugge PM, Kaspers GJ, van Leeuwen FN, Scheijen B. (2016). Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 30(7):1599-603.
- Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, Bressanin D, Fini M, McCubrey JA. (2012). Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget.* 3(4):371-94.
- Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, Soverini S, Vitale A, Chiaretti S, Cimino G, Papayannidis C, Paolini S, Elia L, Fazi P, Meloni G, Amadori S, Saglio G, Pane F, Baccarani M, Foà R. (2009). IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol.* 27(31):5202-7.
- Martin-Lorenzo A, Auer F, Chan LN, García-Ramírez I, González-Herrero I, Rodríguez-Hernández G, Bartenhagen C, Dugas M, Gombert M, Ginzel S, Blanco O, Orfao A, Alonso-López D, Rivas JL, García-Cenador MB, García-Criado FJ, Müschen M, Sánchez-García I, Borkhardt A, Vicente-Dueñas C, Hauer J. (2018). Loss of Pax5 Exploits Sca1-BCR-ABL<sup>p190</sup> Susceptibility to Confer the Metabolic Shift Essential for pB-ALL. *Cancer Res.* 78(10):2669-2679.
- Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R, Richardson A. (1999). Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur J Biochem.* 265(1):353-60.

- Matsuda S, Suzuki-Fujimoto T, Minowa A, Ueno H, Katamura K, Koyasu S. (1999). Temperature-sensitive ZAP70 mutants degrading through a proteasome-independent pathway. Restoration of a kinase domain mutant by Cdc37. *J Biol Chem.* 274(49):34515-8.
- Mauro MJ, Druker BJ. (2001). STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist.* 6(3):233-8.
- Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, Liu X, Mets E, Taghon T, Khan AA, Setty M, Rondou P, Vandenberghe P, Delabesse E, Benoit Y, Socci NB, Leslie CS, Van Vlierberghe P, Speleman F, Wendel HG. (2011). A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat Genet.* 43(7):673-8.
- Maxwell MJ, Yuan Y, Anderson KE, Hibbs ML, Salem HH, Jackson SP. (2004). SHIP1 and Lyn Kinase Negatively Regulate Integrin alpha IIB beta 3 signaling in platelets. *J Biol Chem.* 279(31):32196-204.
- Maxwell MJ, Duan M, Armes JE, Anderson GP, Tarlinton DM, Hibbs ML. (2011). Genetic segregation of inflammatory lung disease and autoimmune disease severity in SHIP-1<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 186(12):7164-75.
- Mayer BJ, Jackson PK, Van Etten RA, Baltimore D. (1992). Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol.* 12(2):609-18.
- McClanahan T, Dalrymple S, Barkett M, Lee F. (1993). Hematopoietic growth factor receptor genes as markers of lineage commitment during in vitro development of hematopoietic cells. *Blood.* 81(11):2903-15.
- McGranahan N, Swanton C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell.* 168(4):613-628.
- McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. (1989). Alternative forms of the BCR-ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol Cell Biol.* 9(5):1866-74.
- McWhirter JR, Galasso DL and Wang JY (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol.* 13(12): 7587-7595.
- Meggio F, Pinna LA. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.* 17(3):349-68.
- Memmott RM and Dennis PA (2009). Akt-dependent and independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal.* 21(5): 656-664.
- Meng J and Roux B (2014). Locking the Active Conformation of c-Src Kinase through the Phosphorylation of the Activation Loop. *J Mol Biol.* 426(2): 423-435.
- Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB, Aviszus K, Decote-Ricardo D, Wysocki LJ, Cambier JC. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity.* 25(6):953-62.
- Metzner A, Precht C, Fehse B, Fiedler W, Stocking C, Günther A, Mayr GW, Jücker M. (2009). Reduced proliferation of CD34(+) cells from patients with acute myeloid leukemia after gene transfer of INPP5D. *Gene Ther.* 16(4):570-3.
- Meyer R, Nalaskowski MM, Ehm P, Schröder C, Naj X, Brehm MA, Mayr GW. (2012). Nucleocytoplasmic shuttling of human inositol phosphate multikinase is influenced by CK2 phosphorylation. *Biol Chem.* 393(3):149-60.
- Meyer C, Zur Stadt U, Escherich G, Hofmann J, Binato R, Barbosa TC, Emerenciano M, Pombo-de-Oliveira MS, Horstmann M, Marschalek R. (2013). Refinement of IKZF1 recombination hotspots in pediatric BCP-ALL patients. *Am J Blood Res.* 3(2):165-73.
- Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson RA, Golub TR, Rowley JD, Chen J. (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(50):19971-6.

- Miletic AV, Anzelon-Mills AN, Mills DM, Omori SA, Pedersen IM, Shin DM, Ravetch JV, Bolland S, Morse HC 3rd, Rickert RC. (2010). Coordinate suppression of B cell lymphoma by PTEN and SHIP phosphatases. *J Exp Med.* 207(11):2407-20.
- Minegishi Y, Conley ME. (2001). Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human mu heavy chains with unusual CDR3 regions. *Immunity.* 14(5):631-41.
- Minges Wols HA (2006). Plasma Cells. doi: 10.1038/npg.els.0004030
- Ming-Lum A, Shojania S, So E, McCarrell E, Shaw E, Vu D, Wang I, McIntosh LP, Mui AL. (2012). A pleckstrin homology-related domain in SHIP1 mediates membrane localization during Fcγ receptor-induced phagocytosis. *FASEB J.* 26(8):3163-77
- Mishra S, Zhang B, Cunnick JM, Heisterkamp N, Groffen J. (2006). Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res.* 66(10):5387-93.
- Molnar A and Georopoulos K (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 14(12): 8292–8303.
- Mongini PK, Jackson AE, Tolani S, Fattah RJ, Inman JK. (2003). Role of complement-binding CD21/CD19/CD81 in enhancing human B cell protection from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 171(10):5244-54.
- Moon SK, Lee HY, Li JD, Nagura M, Kang SH, Chun YM, Linthicum FH, Ganz T, Andalibi A, Lim DJ. (2002). Activation of a Src-dependent Raf-MEK1/2-ERK signaling pathway is required for IL-1alpha-induced upregulation of beta-defensin 2 in human middle ear epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1590(1-3):41-51.
- Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, Georgopoulos K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 16(8):2004-13.
- Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(12):8242-7. Epub 2002 Jun 4.
- Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, Yamashita N, Oda M, Morishima T. (2012). Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 59(1):83-9.
- Morra M, Silander O, Calpe S, Choi M, Oettgen H, Myers L, Etzioni A, Buckley R, Terhorst C. (2001). Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood.* 98(5):1321-5.
- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR (2008a). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature.* 453(7191):110-4.
- Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. (2008b). Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science.* 322(5906):1377-80.
- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, Collins-Underwood JR, Schulman BA, Phillips LA, Tasian SK, Loh ML, Su X, Liu W, Devidas M, Atlas SR, Chen IM, Clifford RJ, Gerhard DS, Carroll WL, Reaman GH, Smith M, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. (2009b). JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(23):9414-8.
- Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR; Children's Oncology Group. (2009a). Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 360(5):470-80.

- Mullighan CG (2012). Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 122(10): 3407–3415.
- Mullis K. B., Watson J. D., Gibbs R. A. und von Springer F. F. (1994): The polymerase chain reaction. Boston. Birkhäuser.
- Mukherjee O, Weingarten L, Padberg I, Pracht C, Sinha R, Hochdörfer T, Kuppig S, Backofen R, Reth M, Huber M. (2012). The SH2-domain of SHIP1 interacts with the SHIP1 C-terminus: impact on SHIP1/Ig- $\alpha$  interaction. *Biochim Biophys Acta.* 1823(2):206-14.
- Mummery A, Narendran A, Lee KY. (2011). Targeting epigenetics through histone deacetylase inhibitors in acute lymphoblastic leukemia. *Curr Cancer Drug Targets.* 11(7):882-93.
- Mundt C, Licence S, Shimizu T, Melchers F, Mårtensson IL. (2001). Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med.* 193(4):435-45.
- Nagai K, Takata M, Yamamura H, Kurosaki T. (1995). Tyrosine phosphorylation of Shc is mediated through Lyn and Syk in B cell receptor signaling. *J Biol Chem.* 270(12):6824-9.
- Nahar R, Ramezani-Rad P, Dovat S, Buchner M, Graeber TG and Muschen M (2011). Mechanisms of Ikaros-Mediated Tumor Suppression. *Blood*; 118:408
- Nakase K, Ishimaru F, Avitahl N, Dansako H, Matsuo K, Fujii K, Sezaki N, Nakayama H, Yano T, Fukuda S, Imajoh K, Takeuchi M, Miyata A, Hara M, Yasukawa M, Takahashi I, Taguchi H, Matsue K, Nakao S, Niho Y, Takenaka K, Shinagawa K, Ikeda K, Niiya K, Harada M. (2000). Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* 60(15):4062-5.
- Nalaskowski MM, Ehm P, Giehler S, Mayr GW. (2012). A toolkit for graded expression of green fluorescent protein fusion proteins in mammalian cells. *Anal Biochem.* 428(1):24-7.
- Nalaskowski MM, Metzner A, Brehm MA, Labiadh S, Brauer H, Grabinski N, Mayr GW, Jücker M. (2012). The inositol 5-phosphatase SHIP1 is a nucleo-cytoplasmic shuttling protein and enzymatically active in cell nuclei. *Cell Signal.* 24(3):621-8.
- Nalaskowski MM, Ehm P, Rehbach C, Nelson N, Täger M, Modest K, Jücker M. (2018). Nuclear accumulation of SHIP1 mutants derived from AML patients leads to increased proliferation of leukemic cells. *Cell Signal.* 49:87-94.
- Negro R, Gobessi S, Longo PG, He Y, Zhang ZY, Laurenti L, Efremov DG. (2012). Overexpression of the autoimmunity-associated phosphatase PTPN22 promotes survival of antigen-stimulated CLL cells by selectively activating AKT. *Blood.* 119(26):6278-87.
- Nemazee DA, Bürki K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 337(6207):562-6.
- Nera KP, Alinikula J, Terho P, Narvi E, Törnquist K, Kurosaki T, Buerstedde JM, Lassila O. (2006a). Ikaros has a crucial role in regulation of B cell receptor signaling. *Eur J Immunol.* 36(3):516-25.
- Nera KP, Kohonen P, Narvi E, Peippo A, Mustonen L, Terho P, Koskela K, Buerstedde JM, Lassila O. (2006b). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity.* 24(3):283-93.
- Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G, Ricci F, Tazzari PL, Pagliaro P, McCubrey JA, Capitani S. (2014). Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia.* 28(4):739-48.
- Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med.* 190(9):1201-14.
- Nishizumi H, Horikawa K, Mlinaric-Rascan I, Yamamoto T. (1998). A double-edged kinase Lyn: a positive and negative regulator for antigen receptor-mediated signals. *J Exp Med.* 187(8):1343-8.

- Noguchi M, Ropars V, Roumestand C, Suizu F. (2007). Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J.* 21(10):2273-84.
- Nowell PC and Hungerford DA (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 25:85-109.
- Nunes de Miranda SM, Wilhelm T, Huber M, Zorn CN. (2016). Differential Lyn-dependence of the SHIP1-deficient mast cell phenotype. *Cell Commun Signal.* 14(1):12.
- Nutt SL, Kee BL. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity.* 26(6):715-25.
- O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Baltimore D (2009). Inositol phosphatase SHIP1 is a primary target of miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(17):7113-8.
- Oda Y, Kazumi Kasakura, Izumi Fujigaki, Azusa Kageyama, Ko Okumura, Hideoki Ogawa, Takuya Yashiro, and Chiharu Nishiyama (2018). The effect of PU.1 knockdown on gene expression and function of mast cells. *Sci Rep.* 8: 2005.
- Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL; Childhood Cancer Survivor Study. (2006). Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 355(15):1572-82.
- O'Garra A. and Vieira P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Medicine* volume 10, pages 801–805
- Ohnishi K, Melchers F. (2003). The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol.* 4(9):849-56.
- Okada M (2012). Regulation of the SRC family kinases by Csk. *Int J Biol Sci.* 8(10):1385-97.
- Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK, Nakagawa H. (2000). Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 275(40):30934-42.
- O'Neill SK, Getahun A, Gauld SB, Merrell KT, Tamir I, Smith MJ, Dal Porto JM, Li QZ, Cambier JC. (2011). Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy. *Immunity.* 35(5):746-56.
- Oneyama C, Iino T, Saito K, Suzuki K, Ogawa A, Okada M. (2009). Transforming potential of Src family kinases is limited by the cholesterol-enriched membrane microdomain. *Mol Cell Biol.* (24):6462-72.
- Ong CJ, Ming-Lum A, Nodwell M, Ghanipour A, Yang L, Williams DE, Kim J, Demirjian L, Qasimi P, Ruschmann J, Cao LP, Ma K, Chung SW, Duronio V, Andersen RJ, Krystal G, Mui AL. (2007). Small-molecule agonists of SHIP1 inhibit the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematopoietic cells. *Blood.* 110(6):1942-9.
- Ono M, Okada H, Bolland S, Yanagi S, Kurosaki T, Ravetch JV. (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell.* 90(2):293-301.
- Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, Mitchell CA. (2009). The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J.* 419(1):29-49.
- Organista-Nava J, Gómez-Gómez Y, Illades-Aguir B, Leyva-Vázquez MA. (2016). Regulation of the miRNA expression by TEL/AML1, BCR/ABL, MLL/AF4 and TCF3/PBX1 oncoproteins in acute lymphoblastic leukemia (Review). *Oncol Rep.* 36(3):1226-32.
- Orgel E, Tucci J, Alhushki W, Malvar J, Sposto R, Fu CH, Freyer DR, Abdel-Azim H, Mittelman SD. (2014). Obesity is associated with residual leukemia following induction therapy for childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 124(26):3932-8.
- O'Riordan M, Grosschedl R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity.* 11(1):21-31.



- Orkin SH. (1995). Transcription Factors and Hematopoietic Development. *J Biol Chem.* 270(10):4955-8.
- Osborne MA, Zenner G, Lubinus M, Zhang X, Songyang Z, Cantley LC, Majerus P, Burn P, Kochan JP. (1996). The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J Biol Chem.* 271(46):29271-8.
- Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, Goldman JM, Reiffers J, Silver RT, Tura S, Fischer T, Deininger MW, Schiffer CA, Baccarani M, Gratwohl A, Hochhaus A, Hoelzer D, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, O'Brien SG. (2002). A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood.* 100(6):1965-71.
- Pallen CJ. (2003). Protein tyrosine phosphatase alpha (PTPalpha): a Src family kinase activator and mediator of multiple biological effects. *Curr Top Med Chem.* 3(7):821-35.
- Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, Caparros E, Buteau J, Brown K, Perkins SL, Bhagat G, Agarwal AM, Basso G, Castillo M, Nagase S, Cordon-Cardo C, Parsons R, Zúñiga-Pflücker JC, Dominguez M, Ferrando AA. (2007). Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med.* 13(10):1203-10.
- Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H, Hosen N, Sontani Y, Hoyne GF, Tunningley R, Smale ST, Weissman IL. (2009). Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem Cells.* 27(12):3082-92.
- Parikh C, Janakiraman V, Wu WI, Foo CK, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stawiski E, Lee B, Lin J, Li H, Lorenzo MN, Yuan W, Guillory J, Jackson M, Rondon J, Franke Y, Bowman KK, Sagolla M, Stinson J, Wu TD, Wu J, Stokoe D, Stern HM, Brandhuber BJ, Lin K, Skelton NJ, Seshagiri S. (2012). Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(47):19368-73.
- Pauls SD, Marshall AJ. (2017). Regulation of immune cell signaling by SHIP1: A phosphatase, scaffold protein, and potential therapeutic target. *Eur J Immunol.* 47(6):932-945.
- Pedersen IM, Dennis Otero, Elaine Kao, Ana V Miletic, Christoffer Hother, Elisabeth Ralfkiaer, Robert C Rickert, Kirsten Gronbaek, and Michael David. (2009). Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF $\alpha$ -dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO Mol Med.* 1(5): 288–295.
- Pelanda R, Torres RM. (2012). Central B-cell tolerance: where selection begins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(4):a007146.
- Perl AE, Kasner MT, Shank D, Luger SM, Carroll M. (2012). Single-cell pharmacodynamic monitoring of S6 ribosomal protein phosphorylation in AML blasts during a clinical trial combining the mTOR inhibitor sirolimus and intensive chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 18(6):1716-25.
- Pesesse X, Backers K, Moreau C, Zhang J, Blero D, Paternotte N, Erneux C. (2006). SHIP1/2 interaction with tyrosine phosphorylated peptides mimicking an immunoreceptor signalling motif. *Adv Enzyme Regul.* 46:142-53.
- Phee H, Jacob A, Coggeshall KM. (2000). Enzymatic activity of the Src homology 2 domain-containing inositol phosphatase is regulated by a plasma membrane location. *J Biol Chem.* 275(25):19090-7.
- Piovan E, Yu J, Tosello V, Herranz D, Ambesi-Impiombato A, Da Silva AC, Sanchez-Martin M, Perez-Garcia A, Rigo I, Castillo M, Indraccolo S, Cross JR, de Stanchina E, Paietta E, Racevskis J, Rowe JM, Tallman MS, Basso G, Meijerink JP, Cordon-Cardo C, Califano A, Ferrando AA. (2013). Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 24(6):766-76.
- Poukka M, Lund-Aho T, Raittinen P, Nikkilä A, Kivinen K, Lundán T, Porkka K, Lohi O. (2018). Acute Lymphoblastic Leukemia With INPP5D-ABL1 Fusion Responds to Imatinib Treatment. *J Pediatr Hematol Oncol.*
- Pritchard NR and Smith KGC (2003). B cell inhibitory receptors and autoimmunity. *Immunology.* 2003 Mar; 108(3): 263–273.

- Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. (2004). Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:118-45.
- Pui CH, Robison LL, Look AT. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 371(9617):1030-43.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. (2011). Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*. 29(5):551-65.
- Qian Y, Du Z, Xing Y, Zhou T, Chen T, Shi M. (2017). Interferon regulatory factor 4 (IRF4) is overexpressed in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and activates the Notch signaling pathway. *Mol Med Rep*. 16(5):6034-6040.
- Quách TD, Manjarrez-Orduño N, Adlowitz DG, Silver L, Yang H, Wei C, Milner EC, Sanz I. (2011). Anergic responses characterize a large fraction of human autoreactive naive B cells expressing low levels of surface IgM. *J Immunol*. 186(8):4640-8.
- Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. (2006). JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 20(3):471-6.
- Raetz EA, Teachey DT. (2016). T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016(1):580-588.
- Rai D, Karanti S, Jung I, Dahia PL, Aguiar RC. (2008). Coordinated expression of microRNA-155 and predicted target genes in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 181(1):8-15.
- Rajewsky K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381(6585):751-8.
- Rauh MJ, Sly LM, Kalesnikoff J, Hughes MR, Cao LP, Lam V, Krystal G. (2004). The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. *Biochem Soc Trans*. 32(Pt 5):785-8.
- Rebollo A, Schmitt C. (2003). Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol*. 81(3):171-5.
- Ren W, Grimsholm O, Bernardi AI, Höök N, Stern A, Cavallini N, Mårtensson IL. (2015). Surrogate light chain is required for central and peripheral B-cell tolerance and inhibits anti-DNA antibody production by marginal zone B cells. *Eur J Immunol*. 45(4):1228-37.
- Resh MD (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1451(1):1-16.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105–111.
- Reynaud D, Demarco IA, Reddy KL, Schjerven H, Bertolino E, Chen Z, Smale ST, Winandy S, Singh H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat Immunol*. 9(8):927-36.
- Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. (2004). ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*. 6(1):1-6.
- Richardson CJ, Gao Q, Mitsopoulous C, Zvelebil M, Pearl LH, Pearl FM. (2009). MoKCa database--mutations of kinases in cancer. *Nucleic Acids Res*. 37 (Database issue):D824-31.
- Rieger MA und Schröder T (2007). Hämatopoetische Stammzellen. *Bio Spektrum* 254-256
- Riggio M, Perrone MC, Polo ML, Rodriguez MJ, May M, Abba M, Lanari C, Novaro V. (2017). AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep*. 7:44244.
- Robb L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*. 15;26(47):6715-23.

- Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten (06.12.17). [www.krebsdaten.de](http://www.krebsdaten.de). Leitung: Dr. K. Kraywinkel; Stichwort: Leukämien
- Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, Chen SC, Payne-Turner D, Churchman ML, Harvey RC, Chen X, Kasap C, Yan C, Becksfort J, Finney RP, Teachey DT, Maude SL, Tse K, Moore R, Jones S, et al. (2012) Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 22(2):153-66.
- Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, McCastlain K, Ding L, Lu C, Song G, Ma J, Becksfort J, Rusch M, Chen SC, Easton J, Cheng J, Boggs K, Santiago-Morales N, Iacobucci I, Fulton RS, et al. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 371(11):1005-15.
- Robey RB, Hay N. (2009). Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*. 19(1):25-31.
- Robinson LJ, Xue J, Corey SJ. (2005). Src family tyrosine kinases are activated by Flt3 and are involved in the proliferative effects of leukemia-associated Flt3 mutations. *Exp Hematol*. 33(4):469-79.
- Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Liu Y, Lucas DM. (2000). Structure, function, and biology of SHIP proteins. *Genes Dev*. 14(5):505-20.
- Roskoski R Jr (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 331(1):1-14.
- Ruschmann J, Ho V, Antignano F, Kuroda E, Lam V, Ibaraki M, Snyder K, Kim C, Flavell RA, Kawakami T, Sly L, Turhan AG, Krystal G. (2010). Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. *Exp Hematol*. 38(5):392-402
- Rychahou PG, Kang J, Gulhati P, Doan HQ, Chen LA, Xiao SY, Chung DH, Evers BM. (2008). Akt2 overexpression plays a critical role in the establishment of colorectal cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(51):20315-20.
- Sabbattini P, Lundgren M, Georgiou A, Chow C, Warnes G, Dillon N. (2001). Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation. *EMBO J*. 20(11):2812-22.
- Sade H, Krishna S, Sarin A. (2004). The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem*. 279(4):2937-44.
- Sakaguchi N, Melchers F. (1986). Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature*. 324(6097):579-82.
- Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. (1998). PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood*. 92(9):3410-5.
- Salesse S and Verfaillie CM (2002). BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* volume 21, pages 8547–8559
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Santi SA, Lee H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298(3):C580-91.
- Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Choi JL, Rohrschneider LR, Griffin JD. (1997). The phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase SHIP and the protein tyrosine phosphatase SHP-2 form a complex in hematopoietic cells which can be regulated by BCR/ABL and growth factors. *Oncogene*. 15(19):2379-84.

- Sattler M, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Winkler T, Algate PA, Rohrschneider LR, Griffin JD. (1999). BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol.* 19(11):7473-80.
- Sattler M, Verma S, Pride YB, Salgia R, Rohrschneider LR, Griffin JD. (2001). SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL. *J Biol Chem.* 276(4):2451-8.
- Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, Beitz LO, Li Z, Lin S, Gout I, Cantley LC, Rawlings DJ, Kinet JP. (1998). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J.* 17(7):1961-72.
- Schjerven H, Jami McLaughlin, Teresita L. Arenzana, Seth Frieze, Donghui Cheng, Sarah Wadsworth, Gregory W. Lawson, Steven J. Bensinger, Peggy J. Farnham, Owen N. Witte, and Stephen T. Smale. (2013). Differential regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. *Nat Immunol.* 14(10): 1073–1083.
- Schmitt C, Tonnelle C, Dalloul A, Chabannon C, Debré P, Rebollo A. (2002). Aiolos and Ikaros: regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis.* 7(3):277-84.
- Schölmerich J. (2003): *Medizinische Therapie in Klinik und Praxis.* Springer-Verlag GmbH
- Schuler F, Weiss JG, Lindner SE, Lohmüller M, Herzog S, Spiegl SF, Menke P, Geley S, Labi V, Villunger A. (2017). Checkpoint kinase 1 is essential for normal B cell development and lymphomagenesis. *Nat Commun.* 8(1):1697.
- Sellars M, Reina-San-Martin B, Kastner P, Chan S (2009). Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 206(5):1073-87.
- Sellars M, Kastner P, Chan S. (2011). Ikaros in B cell development and function. *World J Biol Chem.* 2(6):132-9.
- Senis YA, Mazharian A., Mori J. (2014). Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood.* 2014 Sep 25; 124(13): 2013–2024.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88(5):593-602.
- Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltnane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 17(1):51-62.
- Shivtiel S, Lapid K, Kalchenko V, Avigdor A, Goichberg P, Kalinkovich A, Nagler A, Kollet O, Lapidot T. (2011). CD45 regulates homing and engraftment of immature normal and leukemic human cells in transplanted immunodeficient mice. *Exp Hematol.* 39(12):1161-1170.e1.
- Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- $\alpha$  (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 208(5):901-8.
- Shojaee S, Caeser R, Buchner M, Park E, Swaminathan S, Hurtz C, Geng H, Chan LN, Klemm L, Hofmann WK, Qiu YH, Zhang N, Coombes KR, Paietta E, Molkentin J, Koeffler HP, Willman CL, Hunger SP, Melnick A, Kornblau SM, Müschen M. (2015). Erk Negative Feedback Control Enables Pre-B Cell Transformation and Represents a Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 28(1):114-28
- Shojaee S, Chan LN, Buchner M, Cazzaniga V, Cosgun KN, Geng H, Qiu YH, von Minden MD, Ernst T, Hochhaus A, Cazzaniga G, Melnick A, Kornblau SM, Graeber TG, Wu H, Jumaa H, Müschen M. (2016). PTEN opposes negative selection and enables oncogenic transformation of pre-B cells. *Nat Med.* 22(4):379-87.

- Shoji K, Oda K, Nakagawa S, Hosokawa S, Nagae G, Uehara Y, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Hiraike-Wada O, Nei T, Kawana K, Kuramoto H, Aburatani H, Yano T, Taketani Y. (2009). The oncogenic mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in endometrial carcinomas. *Br J Cancer*. 101(1):145-8.
- Shvartsman DE, John C. Donaldson, Begoña Diaz, Orit Gutman, G. Steven Martin, and Yoav I. Henis (2007). Src kinase activity and SH2 domain regulate the dynamics of Src association with lipid and protein targets. *J Cell Biol*. 178(4): 675–686.
- Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, Bliesath J, Omori M, Huser N, Ho C, Proffitt C, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG, Anderes K. (2010). CX-4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy. *Cancer Res*. 70(24):10288-98.
- Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M, Nowill AE, Leslie NR, Cardoso AA, Barata JT. (2008). PTEN posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest*. 118(11):3762-74.
- Silverman LB (2018). Everolimus With Multiagent Re-Induction Chemotherapy in Pediatric Patients With ALL (CRAD001NUS175T). [clinicaltrials.gov Identifier: NCT01523977](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01523977)
- Simon JA, Schreiber SL. (1995). Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol*. 2(1):53-60.
- Sly LM, Rauh MJ, Kalesnikoff J, Büchse T, Krystal G. (2003). SHIP, SHIP2, and PTEN activities are regulated in vivo by modulation of their protein levels: SHIP is up-regulated in macrophages and mast cells by lipopolysaccharide. *Exp Hematol*. 31(12):1170-81.
- Smeets MF, Chan AC, Dagger S, Bradley CK, Wei A, Izon DJ. (2013). Fli-1 overexpression in hematopoietic progenitors deregulates T cell development and induces pre-T cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma. *PLoS One*. 8(5):e62346.
- Smith KG, Tarlinton DM, Doody GM, Hibbs ML, Fearon DT. (1998). Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J Exp Med*. 187(5):807-11.
- Song M, Kim MJ, Ha S, Park JB, Ryu SH, Suh PG. (2005). Inositol 5'-phosphatase, SHIP1 interacts with phospholipase C-gamma1 and modulates EGF-induced PLC activity. *Exp Mol Med*. 37(3):161-8.
- Song JJ, Joo-Hang Kim, Bo K. Sun, Marco A. Alcalá, Jr, David L. Bartlett, and Yong J. Lee (2010). c-Cbl acts as a mediator of Src-induced activation of the PI3K-Akt signal transduction pathway during TRAIL treatment. *Cell Signal*. 22(3): 377–385.
- Song C, Li Z, Erbe AK, Savic A, Dovat S. (2011). Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1. *World J Biol Chem*. 2(6):126-31.
- Song C, Gowda C, Pan X, Ding Y, Tong Y, Tan BH, Wang H, Muthusami S, Ge Z, Sachdev M, Amin SG, Desai D, Gowda K, Gowda R, Robertson GP, Schjerven H, Muschen M, Payne KJ, Dovat S. (2015). Targeting casein kinase II restores Ikaros tumor suppressor activity and demonstrates therapeutic efficacy in high-risk leukemia. *Blood*. 126(15):1813-22.
- Souabni A, Cobaleda C, Schebesta M, Busslinger M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity*. 17(6):781-93.
- Srinivasan L, Sasaki Y, Calado DP, Zhang B, Paik JH, DePinho RA, Kutok JL, Kearney JF, Otipoby KL, Rajewsky K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell*. 139(3):573-86.
- Staal SP. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(14):5034-7.
- Stam RW, den Boer ML, Schneider P, Nollau P, Horstmann M, Beverloo HB, van der Voort E, Valsecchi MG, de Lorenzo P, Sallan SE, Armstrong SA, Pieters R. (2005). Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 106(7):2484-90.

- Stang SL, Lopez-Campistrous A, Song X, Dower NA, Blumberg PM, Wender PA, Stone JC. (2009). A proapoptotic signaling pathway involving RasGRP, Erk, and Bim in B cells. *Exp Hematol.* 37(1):122-134.
- Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, Boeree A, de Haas V, de Groot-Kruseman HA, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, den Boer ML. (2019). Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 9(1):4634.
- Stenton GR, Mackenzie LF, Tam P, Cross JL, Harwig C, Raymond J, Toews J, Wu J, Ogden N, MacRury T, Szabo C. (2013). Characterization of AQX-1125, a small-molecule SHIP1 activator: Part 1. Effects on inflammatory cell activation and chemotaxis in vitro and pharmacokinetic characterization in vivo. *Br J Pharmacol.* 168(6):1506-18.
- Sulis ML, Williams O, Palomero T, Tosello V, Pallikuppam S, Real PJ, Barnes K, Zuurbier L, Meijerink JP, Ferrando AA. (2008). NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood.* 112(3):733-40.
- Sun L, Liu A, Georgopoulos K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 15(19):5358-69.
- Suryanarayan K, SP Hunger, S Kohler, AJ Carroll, W Crist, MP Link and ML Cleary (1991). Consistent involvement of the bcr gene by 9;22 breakpoints in pediatric acute leukemias. *Blood* 77:324-330
- Suzuki A, Kaisho T, Ohishi M, Tsukio-Yamaguchi M, Tsubata T, Koni PA, Sasaki T, Mak TW, Nakano T. (2003). Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 197(5):657-67.
- Täger M, Horn S, Latuske E, Ehm P, Schaks M, Nalaskowski M, Fehse B, Fiedler W, Stocking C, Wellbrock J, Jücker M. (2017). SHIP1, but not an AML-derived SHIP1 mutant, suppresses myeloid leukemia growth in a xenotransplantation mouse model. *Gene Ther.* 24(11):749-753.
- Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. (2011). Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood.* 117(10):2887-90.
- Tamir I, Stolpa JC, Helgason CD, Nakamura K, Bruhns P, Daeron M, Cambier JC. (2000). The RasGAP-binding protein p62dok is a mediator of inhibitory FcγRIIB signals in B cells. *Immunity.* (3):347-58.
- Tamburini J, Chapuis N, Bardet V, Park S, Sujobert P, Willems L, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C, Bouscary D. (2008). Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition activates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by up-regulating insulin-like growth factor-1 receptor signaling in acute myeloid leukemia: rationale for therapeutic inhibition of both pathways. *Blood.* 111(1):379-82.
- Tan J, Chen-Yang Yu, Zhen-Hua Wang, Hao-Yan Chen, Jian Guan, Ying-Xuan Chen, and Jing-Yuan Fang (2015). Genetic variants in the inositol phosphate metabolism pathway and risk of different types of cancer. *Sci Rep.* 5: 8473.
- Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR. (2001). AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 61(2):589-93.
- Tasian SK, Doral MY, Borowitz MJ, Wood BL, Chen IM, Harvey RC, Gastier-Foster JM, Willman CL, Hunger SP, Mullighan CG, Loh ML. (2012). Aberrant STAT5 and PI3K/mTOR pathway signaling occurs in human CRLF2-rearranged B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 120(4):833-42.
- Tchirkov A, Bons JM, Chassagne J, Schoepfer C, Kanold J, Briançon G, Giollant M, Malet P, Deméocq F. (1998). Molecular detection of a late-appearing BCR-ABL gene in a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol.* 77(1-2):55-9.
- Terwilliger T und Abdul-Hay M (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 7(6): e577.

- Thandla S, Aplan PD. (1997). Molecular biology of acute lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 24(1):45-56.
- Thorpe LM, Spangle JM, Ohlson CE, Cheng H, Roberts TM, Cantley LC, Zhao JJ. (2017). PI3K-p110 $\alpha$  mediates the oncogenic activity induced by loss of the novel tumor suppressor PI3K-p85 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(27):7095-7100.
- Tiacci E, Park JH, De Carolis L, Chung SS, Broccoli A, Scott S, Zaja F, Devlin S, Pulsoni A, Chung YR, Cimminiello M, Kim E, Rossi D, Stone RM, Motta G, Saven A, Varettoni M, Altman JK, Anastasia A, Grever MR, Ambrosetti A, Rai KR, Fraticelli V, Lacouture ME, Carella AM, Levine RL, Leoni P, Rambaldi A, Falzetti F, Ascani S, Capponi M, Martelli MP, Park CY, Pileri SA, Rosen N, Foà R, Berger MF, Zinzani PL, Abdel-Wahab O, Falini B, Tallman MS. (2015). Targeting Mutant BRAF in Relapsed or Refractory Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med.* 373(18):1733-47.
- Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med.* 177(4):1009-20.
- Toker A. (2012). Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul.* 52(1):78-87.
- Trageser D, Iacobucci I, Nahar R, Duy C, von Levetzow G, Klemm L, Park E, Schuh W, Gruber T, Herzog S, Kim YM, Hofmann WK, Li A, Storlazzi CT, Jäck HM, Groffen J, Martinelli G, Heisterkamp N, Jumaa H, Müschen M. (2009). Pre-B cell receptor-mediated cell cycle arrest in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia requires IKAROS function. *J Exp Med.* 206(8):1739-53.
- Tran TH, Loh ML. (2016). Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016(1):561-566.
- Tridandapani S, Kelley T, Pradhan M, Cooney D, Justement LB, Coggeshall KM. (1997). Recruitment and phosphorylation of SH2-containing inositol phosphatase and Shc to the B-cell Fc gamma immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif peptide motif. *Mol Cell Biol.* 17(8):4305-11.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development.* 132(13):2943-54.
- Turner M, Gulbranson-Judge A, Quinn ME, Walters AE, MacLennan IC, Tybulewicz VL. (1997). Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med.* 186(12):2013-21.
- Uings IJ and Farrow SN (2000). Cell receptors and cell signalling. *Mol Pathol.* 2000 Dec; 53(6): 295–299.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 37(12):1317-9.
- Vassal G, Kearns P, Blanc P, Scobie N, Heenen D, Pearson A. (2017). Orphan Drug Regulation: A missed opportunity for children and adolescents with cancer. *Eur J Cancer.* 84:149-158.
- Verrma SP, Dutta TK, Vinod KV, Dubashi B, Ariga KK. (2014). Philadelphia chromosome positive pre-T cell acute lymphoblastic leukemia: a rare case report and short review. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 30(Suppl 1):177-9.
- Vitanza NA, Zaky W, Blum R, Meyer JA, Wang J, Bhatla T, Morrison DJ, Raetz EA, Carroll WL. (2014). Ikaros deletions in BCR-ABL-negative childhood acute lymphoblastic leukemia are associated with a distinct gene expression signature but do not result in intrinsic chemoresistance. *Pediatr Blood Cancer.* 61(10):1779-85.
- Wagener C und Müller O (2010). *Molekulare Onkologie.* Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity.* 5(6):537-49.

- Wang W., Malcolm B.A. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis *Biotechniques* 26,680-2
- Wang L, Toomey NL, Diaz LA, Walker G, Ramos JC, Barber GN, Ning S. (2011). Oncogenic IRFs provide a survival advantage for Epstein-Barr virus- or human T-cell leukemia virus type 1-transformed cells through induction of BIC expression. *J Virol.* 85(16):8328-37.
- Wang WZ, Lin XH, Pu QH, Liu MY, Li L, Wu LR, Wu QQ, Mao JW, Zhu JY, Jin XB. (2014). Targeting miR-21 sensitizes Ph+ ALL Sup-b15 cells to imatinib-induced apoptosis through upregulation of PTEN. *Biochem Biophys Res Commun.* 454(3):423-8.
- Wang J, Zhao W, Guo H, Fang Y, Stockman SE, Bai S, Ng PK, Li Y, Yu Q, Lu Y, Jeong KJ, Chen X, Gao M, Liang J, Li W, Tian X, Jonasch E, Mills GB, Ding Z. (2018). AKT isoform-specific expression and activation across cancer lineages. *BMC Cancer.* 18(1):742.
- Wang LW, Shen H, Nobre L, Ersing I, Paulo JA, Trudeau S, Wang Z, Smith NA, Ma Y, Reinstadler B, Nomburg J, Sommermann T, Cahir-McFarland E, Gygi SP, Mootha VK, Weekes MP, Gewurz BE. (2019). Epstein-Barr-Virus-Induced One-Carbon Metabolism Drives B Cell Transformation. *Cell Metab.* pii: S1550-4131(19)30306-7.
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science.* 301(5638):1374-7.
- Ware MD, Rosten P, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. (1996). Cloning and characterization of human SHIP, the 145-kD inositol 5-phosphatase that associates with SHC after cytokine stimulation. *Blood.* 88(8):2833-40.
- Waters LR, Ahsan FM, Wolf DM, Shirihai O, Teitell MA. (2018). Initial B Cell Activation Induces Metabolic Reprogramming and Mitochondrial Remodeling. *iScience.* 5:99-109.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther.* 16(4):698-706.
- Weber K, Thomaschewski M, Warlich M, Volz T, Cornils K, Niebuhr B, Träger M, Lütgehetmann M, Pollok JM, Stocking C, Dandri M, Benten D, Fehse B (2011). RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat Med.* 17(4):504-9.
- Weiser MA, Cabanillas ME, Konopleva M, Thomas DA, Pierce SA, Escalante CP, Kantarjian HM, O'Brien SM. (2004). Relation between the duration of remission and hyperglycemia during induction chemotherapy for acute lymphocytic leukemia with a hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone/methotrexate-cytarabine regimen. *Cancer.* 100(6):1179-85.
- Wellbrock J, Latuske E, Köhler J, Wagner K, Stamm H, Vettorazzi E, Vohwinkel G, Klokow M, Uibelesen R, Ehm P, Riecken K, Loges S, Thol F, Schubert C, Amling M, Jücker M, Bokemeyer C, Heuser M, Krauter J, Fiedler W. (2015). Expression of Hedgehog Pathway Mediator GLI Represents a Negative Prognostic Marker in Human Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibition Exerts Antileukemic Effects. *Clin Cancer Res.* 21(10):2388-98.
- West KA, Castillo SS, Dennis PA. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat.* 5(6):234-48.
- Whisstock JC, Wiradjaja F, Waters JE, Gurung R. (2002). The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life.* 53(1):15-23.
- Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM, Masera G, Saha V, Biondi A, Greaves MF. (1999). Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet.* 354(9189):1499-503.
- Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell.* 83(2):289-99.
- Wojcik H, Griffiths E, Staggs S, Hagman J, Winandy S. (2007). Expression of a non-DNA-binding Ikaros isoform exclusively in B cells leads to autoimmunity but not leukemogenesis. *Eur J Immunol.* 37(4):1022-32.



- Wu XZ, Chen D. (2006). Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 21(7):1093-8.
- Wu WI, Voegtli WC, Sturgis HL, Dizon FP, Vigers GP, Brandhuber BJ. (2010). Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One.* 5(9):e12913.
- Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, Shen CH, Wen J, Asara J, McGraw TE, Kahn BB, Cantley LC. (2013). AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell.* 49(6):1167-75.
- Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, Zhu X, Qu C, Chen X, Zhang J, Easton J, Edmonson M, Ma X, Lu C, Nagahawatte P, Hedlund E, Rusch M, Pounds S, Lin T, Onar-Thomas A, Huether R, Kriwacki R, Parker M, Gupta P, Becksfort J, Wei L, Mulder HL, Boggs K, Vadodaria B, Yergeau D, Russell JC, Ochoa K, Fulton RS, Fulton LL, Jones C, Boop FA, Broniscer A, Wetmore C, Gajjar A, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Taylor MR, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 46(5):444-450.
- Wullschlegel S, Wasserman DH, Gray A, Sakamoto K, Alessi DR. (2011). Role of TAPP1 and TAPP2 adaptor binding to PtdIns(3,4)P2 in regulating insulin sensitivity defined by knock-in analysis. *Biochem J.* 434(2):265-74.
- [www.cellsignal.de](http://www.cellsignal.de) (18.10.16). <https://www.cellsignal.de/contents/science/cst-pathways/science-pathways>
- Xiao W, Nishimoto H, Hong H, Kitaura J, Nunomura S, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Lowell CA, Ra C, Kawakami T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεpsilonRI. *J Immunol.* 175(10):6885-92.
- Xiao G, Chan LN, Klemm L, Braas D, Chen Z, Geng H, Zhang QC, Aghajani-refah A, Cosgun KN, Sadras T, Lee J, Mirzapozazova T, Salgia R, Ernst T, Hochhaus A, Jumaa H, Jiang X, Weinstock DM, Graeber TG, Müschen M. (2018). B-Cell-Specific Diversion of Glucose Carbon Utilization Reveals a Unique Vulnerability in B Cell Malignancies. *Cell.* 173(2):470-484.e18.
- Xing H, Yang X, Liu T, Lin J, Chen X, Gong Y. (2012). The study of resistant mechanisms and reversal in an imatinib resistant Ph+ acute lymphoblastic leukemia cell line. *Leuk Res.* 36(4):509-13.
- Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell.* 3(5):629-38.
- Xu Y, Fairfax K, Light A, Huntington ND, Tarlinton DM. (2014). CD19 differentially regulates BCR signalling through the recruitment of PI3K. *Autoimmunity.* 47(7):430-7.
- Yang L, Luo JM, Liu XJ, Wen SP, Yang JC and Zhang JY (2009). Effects of SHIP gene mutation on cell cycle related proteins and phosphorylated Akt in K562 cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 30, 548-552.
- Yang L, Luo Y, Wei J. (2010). Integrative genomic analyses on Ikaros and its expression related to solid cancer prognosis. *Oncol Rep.* 24(2):571-7.
- Yang X, He G, Gong Y, Zheng B, Shi F, Shi R, Yang X. (2014). Mammalian target of rapamycin inhibitor rapamycin enhances anti-leukemia effect of imatinib on Ph+ acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur J Haematol.* 92(2):111-20.
- Yokoyama T, Kamata Y, Ohtsuki K. (2004). Casein kinase 2 (CK2)-mediated reduction of the activities of Src family tyrosine kinases in vitro. *Biol Pharm Bull.* 27(12):1895-9.
- You MJ, Medeiros LJ, Hsi ED. (2015). T-Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 144, Issue 3, Pages 411–422
- Young RM, Staudt LM. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov.* 12(3):229-43.

- Young RM, Wu T, Schmitz R, Dawood M, Xiao W, Phelan JD, Xu W, Menard L, Meffre E, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM. (2015). Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(44):13447-54.
- Yu M, Lowell CA, Neel BG and Gu H (2006). Scaffolding Adapter Grb2-Associated Binder 2 Requires Syk to Transmit Signals from FcεRI. *J Immunol* 176 (4) 2421-2429
- Yu JS, Cui W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development*. 143(17):3050-60.
- Zabriskie MS, Eide CA, Tantravahi SK, Vellore NA, Estrada J, Nicolini FE, Khoury HJ, Larson RA, Konopleva M, Cortes JE, Kantarjian H, Jabbour EJ, Kornblau SM, Lipton JH, Rea D, Stenke L, Barbany G, Lange T, Hernández-Boluda JC, Ossenkoppele GJ, Press RD, Chuah C, Goldberg SL, Wetzler M, Mahon FX, Etienne G, Baccarani M, Soverini S, Rosti G, Rousselot P, Friedman R, Deininger M, Reynolds KR, Heaton WL, Eiring AM, Pomicter AD, Khorashad JS, Kelley TW, Baron R, Druker BJ, Deininger MW, O'Hare T. (2014). BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell*. 26(3):428-442.
- Zhang TT, Li H, Cheung SM, Costantini JL, Hou S, Al-Alwan M, Marshall AJ. (2009). Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. *Immunol Rev*. 232(1):255-72.
- Zhang J, Ravichandran KS, Garrison JC. (2010). A key role for the phosphorylation of Ser440 by the cyclic AMP-dependent protein kinase in regulating the activity of the Src homology 2 domain-containing Inositol 5'-phosphatase (SHIP1). *J Biol Chem*. 285(45):34839-49.
- Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, Wu G, Chen X, Edmonson M, Buetow KH, Carroll WL, Chen IM, Devidas M, Gerhard DS, Loh ML, Reaman GH, Relling MV, Camitta BM, Bowman WP, Smith MA, Willman CL, Downing JR, Hunger SP. (2011a). Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 118(11):3080-7.
- Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F, Heller EJ, Kashiwagi M, Yoshida T, Gounari F, Petrie HT, Georgopoulos K. (2011b). Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat Immunol*. 13(1):86-94.
- Zhang Z, Xu Z, Wang X, Wang H, Yao Z, Mu Y, Ma Z, Liu Z. (2013). Ectopic Ikaros expression positively correlates with lung cancer progression. *Anat Rec (Hoboken)*. 296(6):907-13.
- Zhang L, Li H, Ge C, Li M, Zhao FY, Hou HL, Zhu MX, Tian H, Zhang LX, Chen TY, Jiang GP, Xie HY, Cui Y, Yao M, Li JJ (2014). Inhibitory effects of transcription factor Ikaros on the expression of liver cancer stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 5(21):10621-35.
- Zhang CS, Hawley SA, Zong Y, Li M, Wang Z, Gray A, Ma T, Cui J, Feng JW, Zhu M, Wu YQ, Li TY, Ye Z, Lin SY, Yin H, Piao HL, Hardie DG, Lin SC. (2017). Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*. 548(7665):112-116.
- Zoghbi A, Zur Stadt U, Winkler B, Müller I, Escherich G. (2017). Lineage switch under blinatumomab treatment of relapsed common acute lymphoblastic leukemia without MLL rearrangement. *Pediatr Blood Cancer*. 64(11).

Mein Dank gilt Herrn Prof. Jücker für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Biochemie und Signaltransduktion durchzuführen. Insbesondere für die Überlassung dieses spannenden und sehr wichtigen Themas. Außerdem möchte ich mich auch für die Möglichkeit bedanken meine Ideen frei verfolgen zu dürfen.

Ich danke Frau Prof. Kehr, die sich freundlicherweise zur Übernahme des Zweitgutachtens zur Verfügung gestellt hat.

Ich möchte mich bei Herrn Horn-Glander und Herrn Dr. Horn für die große Unterstützung beim Tierversuch bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Kriegs und seinem Team für die Unterstützung bei der PamStation-Messung.

Ich möchte mich sehr bei Frau Dr. Sophia Buhs für ihre Unterstützung und der Zurverfügungstellung einiger Vektoren bedanken.

Ich möchte den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Signaltransduktion danken, insbesondere Bettina Bettin, Christine Blechner, Susanne Gehler, Astrid Grottke, Nadja Kleist, Fabiola Lange, Jacqueline Siekiera, Nico Hinz, Dr. Marcus Nalaskowski und Matthias Schaks danken.

Wenn Worte nur Worte sind, die mit der Zeit verblassen und an Bedeutung verlieren können, so sind es die Menschen, die ohne große Worte nur durch ihre Handlungen der Welt an Bedeutung verleihen. Ich möchte mich daher vom ganzen Herzen bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die immer für mich da waren, mich immer unterstützt haben und an mich geglaubt haben. DANKE!

**Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Elmshorn, den 28.10.2019

.....