

Die Bedeutung der Phosphatase STS-1 bei der Vermittlung einer mutationsunabhängigen Resistenz gegenüber Imatinib in der Ph⁺ ALL

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Marcus Liebermann
aus Bad Homburg

Frankfurt am Main 2015

(D30)

Vom Fachbereich Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

1. Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver G. Ottmann

Datum:

The Man in the Arena

It is not the critic who counts;
not the man who points out how the strong man stumbles,
or where the doer of deeds could have done them better.

The credit belongs to the man who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood; who strives valiantly; who errs, who comes short again and again, because there is no effort without error and shortcoming; but who does actually strive to do the deeds; who knows great enthusiasms, the great devotions; who spends himself in a worthy cause; who at the best knows in the end the triumph of high achievement, and who at the worst, if he fails, at least fails while daring greatly, so that his place shall never be with those cold and timid souls who neither know victory nor defeat.

Excerpt from the speech
"Citizenship In A Republic",
by Theodor Roosevelt
delivered at the Sorbonne,
in Paris, France on 23 April, 1910

Artikel 2: Et kütt wie et kütt.

Artikel 3: Et hätt noch emmer joot jejange.

Et rheinisch Jrundjesetz

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie der medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Marschalek vielmals für die Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit. Bei Herrn Prof. Dr. Oliver G. Ottmann bedanke ich mich für die externe Betreuung und die Bereitstellung des sehr interessanten Forschungsthemas.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver G. Ottmann für die Betreuung und Ausbildung in seinem Labor bedanken, sowie für seine Hilfe bei wissenschaftlichen Fragen und der Erstellung dieser Doktorarbeit.

Herrn PD Dr. Martin Ruthardt danke ich für die direkte Betreuung im Labor, für seine ständige Hilfsbereitschaft und sein ständig offenes Ohr bei allen Fragen im Labor und für die wissenschaftliche Betreuung.

Bei allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe Ruthardt und Ottmann möchte ich mich für die wissenschaftliche und emotionale Unterstützung bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden für die stete Unterstützung, Geduld und ihr Verständnis. Aber auch für die kleinen Sticheleien, die dafür gesorgt haben, dass ich das Ziel nicht aus den Augen verliere. Ein besonderer Dank geht an Lisa, Johannes und Harriet, Alex, Rene, Kibo und Björn.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass Sie mir das Rüstzeug mitgegeben haben eine Doktorarbeit zu schaffen. Sie haben stets an mich geglaubt und mir bei allen Hochs und Tiefs zur Seite gestanden.

Meiner Freundin Uta möchte ich für die Begleitung auf den letzten Metern dieser Arbeit danken. Mit ihrer tollen Hilfe und Fürsorge konnte ich dieser Arbeit den letzten Feinschliff geben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	12
1.1	Hämatopoese	13
1.2	Leukämie	17
1.2.1	Leukämogenese und die leukämische Stammzelle	19
1.2.2	Akute lymphatische Leukämie	23
1.2.3	Genetische Heterogenität und Aberrationen	25
1.2.4	Therapieansätze in der Leukämie.....	29
1.2.5	Klinische Resistenzmechanismen	33
1.2.5.1	Resistenzen durch BCR/ABL Überexpression	33
1.2.5.2	BCR/ABL Punktmutation als Resistenzmechanismus	33
1.2.5.3	BCR/ABL unabhängige Resistenzen.....	37
1.3	Phosphatasen	38
2	MATERIAL & METHODEN	42
2.1	Material	42
2.1.1	Chemikalien	42
2.1.2	Lösungen und Puffer.....	43
2.1.3	Bakterienstämme.....	46
2.1.4	Medien.....	46
2.1.5	Zelllinien	47
2.1.6	Transfektions- und Infektionsreagenzien	49
2.1.7	Antikörper	50
2.1.8	Vektoren und cDNS	52
2.1.9	Oligonukleotide	53
2.1.10	Software	54
2.2	Methoden	55
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	55
2.2.1.1	Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen	55
2.2.1.2	Transformation von kompetenten Bakterienzellen	55
2.2.1.3	Plasmidpräparation aus Bakterienzellen.....	56
2.2.1.4	Polymerasekettenreaktion	56
2.2.1.5	DNS Sequenzierung	57

2.2.1.6	Gatewayklonierung	57
2.2.1.7	Agarosegelelektrophorese	58
2.2.1.8	Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen	58
2.2.1.9	RNS Isolierung	59
2.2.1.10	DNase Behandlung und reverse Transkription.....	59
2.2.1.11	Real-Time PCR	60
2.2.2	Zellbiologische Methoden	62
2.2.2.1	Kultivierung von Suspensionszellen	62
2.2.2.2	Kultivierung von adhärenenten Zellen.....	62
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen	62
2.2.2.4	Calciumphosphat Transfektion.....	63
2.2.2.5	Transfektion mit Transfektionsreagenzien	63
2.2.2.6	Herstellung retroviraler Überstände	64
2.2.2.7	Infektion mit retroviralen Überständen.....	64
2.2.2.8	Durchflusszytometrische Analysen (FACS Analyse).....	65
2.2.2.9	Zytozentrifugation	65
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	66
2.2.3.1	Immunfluoreszenzfärbung.....	66
2.2.3.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien	66
2.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry)	67
2.2.3.4	Immunopräzipitation.....	67
2.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	68
2.2.3.6	Westernblotting	68
2.2.3.7	Messung der Apoptose mittels 7-AAD.....	69
2.2.3.8	Zellkernisolierung und subzelluläre Fraktionierung	70
2.2.3.9	Proliferation competition assays.....	71
3	ERGEBNISSE	72
3.1	Charakterisierung der Sup B15 WT/RT Zelllinie	72
3.1.1	Analyse der Sup B15 Zelllinien mittels FISH.....	73
3.1.2	Immunophänotypisierung beider Sup B15 Zelllinien	74
3.1.3	Mutationsanalyse der Sup B15 WT/RT Zellen.....	76
3.1.4	Untersuchung des inhibitorischen Effekts von Imatinib in Sup B15 WT/RT Zellen.....	77
3.1.5	Analyse des Proteinprofiles in Sup B15 RT/WT Zellen.....	78
3.2	STS-1 interagiert mit BCR/ABL	83
3.3	STS-1 Expression in resistenten Ph⁺ ALL Zellen	85

3.4 Lokalisierung von STS-1 und BCR/ABL	87
3.5 Imatinib beeinflusst die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL	90
3.6 Analyse des Interaktions vermittelten Teil von BCR/ABL	92
3.7 STS-1 wird von BCR/ABL phosphoryliert	95
3.8 STS-1 dephosphoryliert BCR/ABL	96
3.9 STS-1 reduziert die Proliferation in Ph⁺ Zellen	98
3.10 Dexamethason induziert STS-1 Expression	101
4 DISKUSSION	104
4.1 Die Rolle von STS-1 in der resistenten Ph⁺ ALL	109
4.2 Untersuchung des Expressionsprofils in Sup B15 RT und Sup B15 WT Zellen	112
4.3 Hypothese der STS-1 vermittelten Resistenz	116
4.4 Ausblick	119
5 LITERATUR.....	121
6 ABKÜRZUNGEN	133
7 ERKLÄRUNG	136
8 LEBENSLAUF	137
9 PUBLIKATIONEN.....	140

Zusammenfassung

Patienten mit einer BCR/ABL positiven (Ph⁺) akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bilden die größte genetisch definierte Untergruppe der ALL und gelten wegen ihrer schlechten Prognose als Höchststrisiko ALL. Die bisherigen Therapieergebnisse werden durch die Kombination von Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) wie Imatinib und Chemotherapeutika verbessert, sind aber durch das Auftreten von Resistenzen gegen TKI in ihrer langfristigen Wirkung limitiert. Die derzeitige Forschung fokussiert sich weitestgehend auf konstitutive aktive Kinasen, die für die leukämische Transformation verantwortlich sind. Allerdings kann die Deregulation von Phosphatasen, die als Gegenspieler von Kinasen fungieren, durch eine verminderte Inaktivierung dieser Kinasen, ebenso zur Leukämogenese beitragen, indem ihre physiologische Funktion vermindert wird. Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass die deregulierte Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) bei Ph⁺ Leukämien eine partielle Resistenz gegenüber TKI vermitteln kann.¹ Darüber hinaus zeigen von Juric et al. (2007)² publizierte Microarrays von 54 Ph⁺ ALL Patienten eine transkriptionelle Hochregulierung der Phosphatase „Supressor of T-Cell receptor Signalling 1“ (STS-1).² STS-1 (TULA-2) gehört zusammen mit STS-2 (TULA-1) zur Familie der STS/TULA Proteine, von denen keine weiteren Mitglieder bekannt sind. STS-1 dephosphoryliert diverse Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie z.B. den T-Cell Receptor (TCR) und den Epidermal-Growth-Factor Receptor (EGFR) und verhindert somit deren Internalisierung und proteosomalen Abbau.³ Weitere durch STS-1 dephosphorylierte Substrate sind die Proteintyrosinkinase Syk, die eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung des B-Cell-Receptors (BCR) spielt sowie andere SRC-Kinasen (z.B. FYN).⁴ Aufgrund der oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen STS-1 und der Ph⁺ ALL ist die Untersuchung einer möglichen funktionellen Bedeutung von STS-1 bei der Entwicklung einer mutationsunabhängigen Resistenz von Ph⁺ ALL Inhalt dieser Arbeit. Als Modellsystem dienen in der hier vorliegenden Arbeit aus der BCR/ABL Zelllinie Sup B15 abgeleitete TKI resistente Zellen (Sup B15 RT). Imatinib ist in diesen immer noch in der Lage BCR/ABL zu binden und führt zu einer Verschiebung der Dosiswirkungskurve ohne Apoptose zu induzieren. Mutationen in der Tyrosinkinase Domäne von BCR/ABL konnten als zugrunde liegender Resistenzmechanismus durch

Sequenzanalysen ausgeschlossen werden, ebenso wie zusätzliche Translokationen oder genomischen Amplifikationen von BCR/ABL. Eine Analyse der STS-1 Expression zeigte sowohl transkriptionell als auch auf Proteinebene eine deutliche Herunterregulierung von STS-1 in Sup B15 RT Zellen. Die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL wurde in verschiedenen Zellmodellen gezeigt. Dabei konnten bezüglich der Interaktion keine Unterschiede zwischen dem p210^{BCR/ABL} und p185^{BCR/ABL} Fusionsprotein festgestellt werden. Auch die „Gatekeeper“ Mutation T315I hatte keinen Einfluss auf die Interaktion. Die Unabhängigkeit der Bindung von STS-1 und BCR/ABL von einer aktiven BCR/ABL Kinase wurde durch die Zugabe von Imatinib gezeigt. Lediglich auf endogenem Level konnte eine Imatinib vermittelte Reduktion der Interaktion nachgewiesen werden. Durch die Verwendung unterschiedlich trunkierter BCR/ABL Proteine wurde gezeigt, dass STS-1 sowohl mit c-ABL als auch mit dem ABL-Anteil von BCR/ABL interagiert und dass eine Oligomerisierung für diese Interaktion nicht notwendig ist. Als Folge der Interaktion kommt es zu einer Dephosphorylierung von BCR/ABL durch STS-1, wobei vor allem die im ABL Anteil lokalisierten und für die Autophosphorylierung wichtigen Tyrosine 245 und 412 dephosphoryliert werden. Mittels eines Proliferations-Kompetitions-Assay konnte gezeigt werden, dass STS-1 sowohl die Proliferationsrate reduziert als auch erheblich die Sensitivität von SupB15 RT Zellen gegenüber Imatinib steigert. Dieser Befund steht im Einklang mit der Annahme, dass diese Sensitivitätssteigerung durch eine gegenüber den sensitiven Sup B15 WT deutlich verminderte STS-1 Expression bedingt ist. Dexamethason in klinisch relevanten Konzentrationen (10^{-6} M - 10^{-9} M) konnte sowohl in SupB15 WT als auch in SupB15 RT Zellen die STS-1 Expression um ein Vielfaches steigern und führte in Kombination mit 1 μ M Imatinib sogar in den resistenten Zellen zu einer hoch signifikanten Inhibition der Proliferation sowie einer gesteigerten Apoptose. Die Resultate dieser Arbeit rücken Phosphatasen und im speziellen STS-1 in einen stärkeren Fokus, wenn es um die Bildung von Resistenzen geht. Dadurch können sich eine Vielzahl neuer Behandlungsstrategien sowie neue Ansätze für die klinische Wirkstoffforschung ergeben.

1 Einleitung

Der menschliche Organismus zeichnet sich durch eine Vielzahl hochspezialisierter Zellen aus, die sich durch spezifische Differenzierung aus pluripotenten Stammzellen entwickelt haben. Die Differenzierung an sich, sowie die Funktionen der einzelnen Zellen und intrazellulären Prozesse unterliegen zahlreichen Kontroll- und Regulationsmechanismen. Eine Störung innerhalb dieser Mechanismen kann schwerwiegende Folgen haben und je nachdem wo sie auftreten, der Ursprung für organ- oder gewebespezifische Krebsarten sein. Liegt solch eine Störung im Bereich der hämatopoetischen Zellen vor, kann dies zu einer Leukämie führen. Um leukämische Erkrankungen gezielter behandeln zu können, ist ein tieferes Verständnis der Hämatopoese kontrollierenden Mechanismen im gesunden Organismus notwendig.

1.1 Hämatopoese

Als Hämatopoese bezeichnet man die Bildung der verschiedenen zellulären Blutbestandteile (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten), die durch komplexe Differenzierungsvorgänge aus einer begrenzten Anzahl hämatopoetischer Stammzellen (HSC = haematopoetic stem cells) hervorgehen. Es wird zwischen embryonaler und adulter Hämatopoese unterschieden, wobei der Begriff „adult“ in diesem Zusammenhang missverständlich ist, da die adulte Hämatopoese bereits mit der Geburt einsetzt.⁵

In den ersten drei embryonalen Monaten (mesoblastische Periode) erfolgt die Hämatopoese im Mesenchym des Dottersacks, den sogenannten Blutinseln. Diese frühen Erythrozyten enthalten noch einen Kern. Ab dem zweiten Monat, mit eintreten in die hepatische Periode, wird die Blutbildung durch die fetale Leber übernommen. Hier entstehen zum ersten Mal "reife", kernlose Erythrozyten und es findet eine Vermehrung sowie der Erhalt von hämatopoetische Stammzellen statt. Im vierten fetalen Monat, der sogenannten hepatolinalen Phase, wird die Hämatopoese auf Milz und Thymus ausgeweitet. Ab Beginn des sechsten fetalen Monats, mit Beginn der lienomyelopoetischen Periode, wird die Blutbildung von Milz und Knochenmark übernommen und verlagert sich dann, während der myelopoetischen Periode (6.-7. Monat), nahezu vollständig in das Knochenmark. Da in keinen der hier beschriebenen Organe (Leber, Milz, Thymus, Knochenmark) eine Erstanlage hämatopoetischer Stammzellen erfolgt, müssen diese initial in diese Organe einwandern und diese besiedeln. Ursprünglich werden hämatopoetischen Stammzellen in der AGM-Region (AGM = Aorta, Gonaden, Mesonephros) des frühen Embryos gebildet. Sie entstehen nicht aus denen im Dottersack gebildeten Hämangioblasten, sondern haben ihren Ursprung in spezialisierten Endothelzellen (hemogenic endothelial cells). Zwar werden auch im Dottersack hämatopoetische Stammzellen gebildet, jedoch konnte bisher nur bei Zellen der AMG-Region auch lymphoide Zellen gebildet werden. Daher wird bisher angenommen, dass das Knochenmark, als dauerhaftes Organ der Hämatopoese, lediglich von Zellen aus der AGM-Region besiedelt werden kann. Während der adulten Hämatopoese wird zwischen unreifen Lang-Zeit HSCs (LT-HSC = long-term HSCs), die sich durch ein lebenslanges Selbsterneuerungspotenzial auszeichnen, und reiferen Kurz-Zeit HSCs

(ST-HSCs = short-term HSCs), deren Selbsterneuerungspotenzial begrenzt ist, unterschieden. Sowohl LT-HSCs als auch ST-HSCs befinden sich jeweils in einer eigenen Nische im Knochenmark.⁶ Hier wird der Differenzierungsprozess durch diverse Zytokine und Transkriptionsfaktoren reguliert, die die Expression linienspezifischer Gene aktivieren und Proliferation sowie Differenzierung einleiten (**Abb. 1.1**).^{7,8}

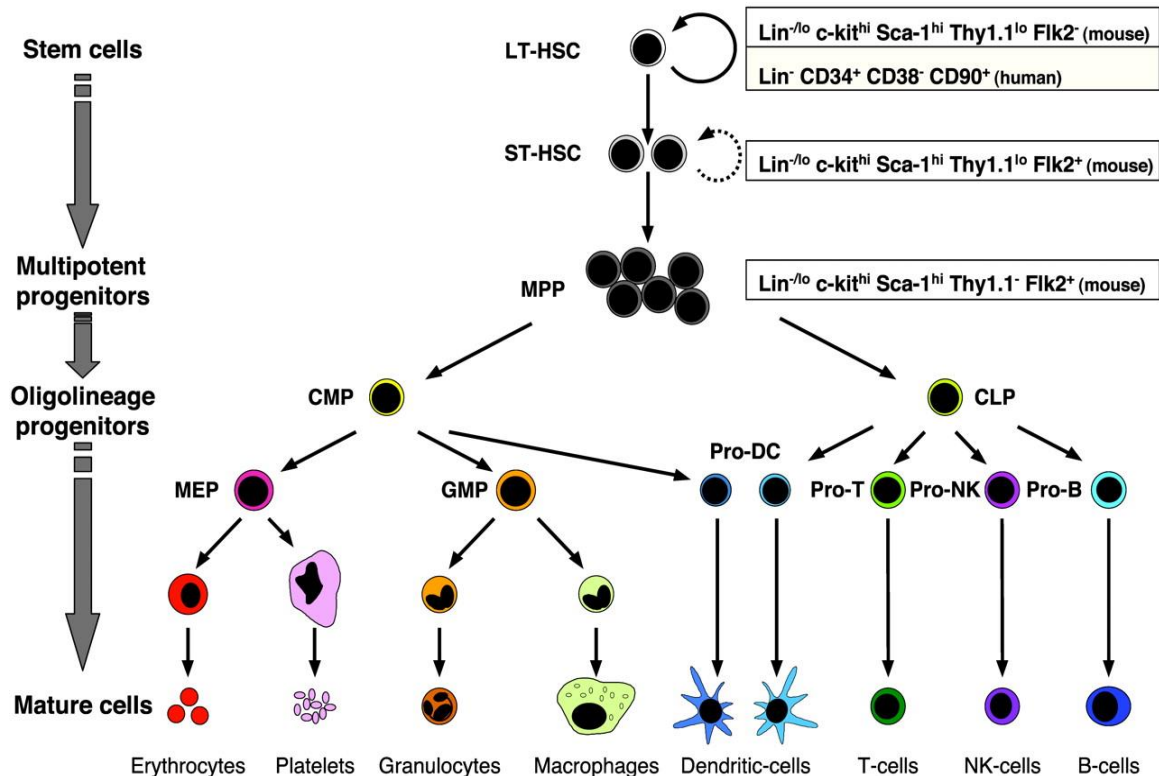


Abb. 1.1
Diagramm der Hämatopoese

Im Rahmen der Hämatopoese werden durch Reifungsprozesse LT-HSCs zu ST-HSCs, um sich dann als MPPs zu Vorläufern der lymphatischen oder myeloischen Zellen zu entwickeln. Diese Entwicklung ist ein unidirektionaler Prozess, der sich nicht auf das Knochenmark beschränkt, sondern gerade bei den lymphatischen Vorläuferzellen auf diverse Organe wie Milz, Thymus und Lymphsystem verteilt.

LT-HSC = Long Term Haematopoetic Stem Cell; ST-HSC = Short Term Haematopoetic Stem Cell;
MPP = Multi-Potent-Progenitor; CMP = Common-Myeloid-Progenitor;
CLP = Common-Lymphoid-Progenitor; MEP = Megakaryotic-Erythroid-Progenitor;
Pro-DC = Pro Dendritic-Cells; GMP = granulocyte-macrophage progenitor
Abbildung nach Passegue et al.⁶

Im Gegensatz zu den Vorläuferzellen verfügen die ausdifferenzierten Zellen über kein Selbsterneuerungspotenzial, sondern zeichnen sich durch unterschiedlich lange Lebensdauern aus, nach deren Ablauf die Zelle stirbt.

Bei der Entwicklung von Lymphozyten aus lymphatisch determinierten Vorläuferzellen (CLP = common lymphoid progenitor) endet der Differenzierungsprozess nicht im Knochenmark. Sie reifen im Thymus zu T-Zellen und im Bursa-äquivalent, beim Menschen das Knochenmark, zu B-Zellen heran, deren weitere Differenzierung in den sekundären lymphatischen Organen (Thymus, Lymphknoten, Milz, Peyer Plaques, Tonsillen, Lymphfollikel) stattfindet. B-Zellen sind als einzige Zellen in der Lage Antikörper zu bilden, sind verantwortlich für die humorale Immunantwort und bilden zusammen mit den T-Zellen den wesentlichen Bestandteil der adaptiven Immunantwort. Die Stromazellen sind der Ort der B-Zell Reifung im Knochenmark, da sie durch die Sezernierung des Wachstumsfaktor IL-7 die Differenzierung und Proliferation der B-Zell Vorläufer fördern. Die Bildung des B-Zell Rezeptors, der Membran-gebundenen Form des Antikörpers, ist ein entscheidendes Merkmal der B-Zell-Entwicklung. Die Antigenpezifität des Rezeptors wird durch die variable Kombination der Gensegmente V, D und J bestimmt, welche die schweren und leichten Ketten des Rezeptors und demzufolge auch der Antikörper bilden. Die B-Zell Vorläufer werden zunächst zu frühen pro B-Zellen und beginnen mit der somatischen VDJ-Rekombination zur Bildung der schweren Ig-Kette. Dabei findet in diesem Stadium der Reifung zunächst die DJ-Umlagerung statt. Ist diese abgeschlossen erfolgt in der späten pro B-Zelle im zweiten Teil der VDJ-Rekombination die Kopplung des fertigen DJ-DNS Segment an ein V-Segment. Das exprimierte Produkt dieser DNS-Rekombination wird als "schwere μ Kette" bezeichnet. Diese wird in der großen/frühen prä B-Zelle mit einem Ersatz für die leichte Ig-Kette auf der Zelloberfläche als prä B-Zell Rezeptor präsentiert. Gleichzeitig wird die VDJ-Rekombinase vom IgH- zum IgL-Lokus umgeleitet.

Mit Beginn der VJ-Rekombination reift die Zelle zur kleinen bzw. späten prä B-Zelle, die mit der Präsentation des fertigen B-Zell Rezeptors, der IgM-Klasse, an der Zelloberfläche sich weiter zur unreifen B-Zelle entwickelt (**Abb. 1.2**). Die endgültige Reifung der B-Zellen erfolgt in den sekundären lymphatischen Organen. In dieser Phase kommt es durch alternatives Splicen der IgM-RNS zu Bildung eines B-Zell Rezeptors der IgD-Klasse, der ebenfalls auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

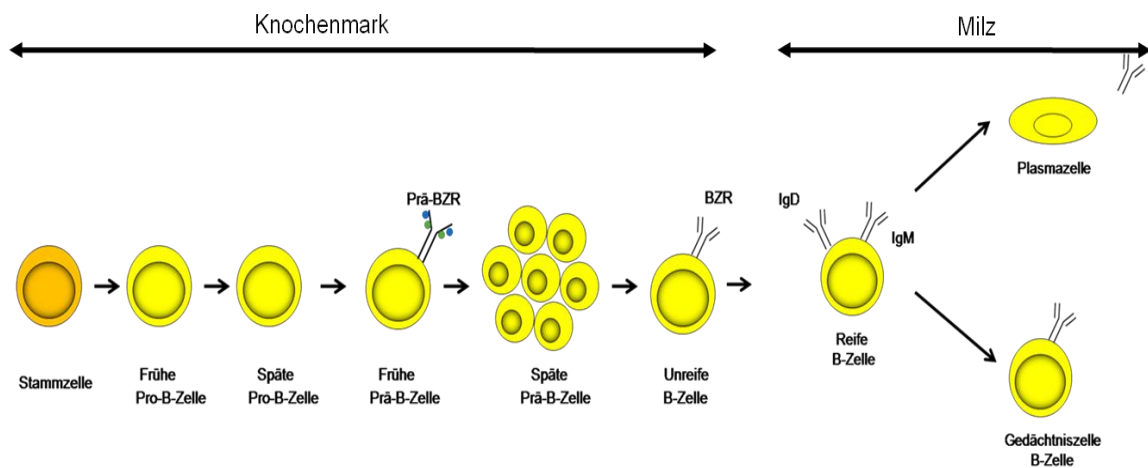


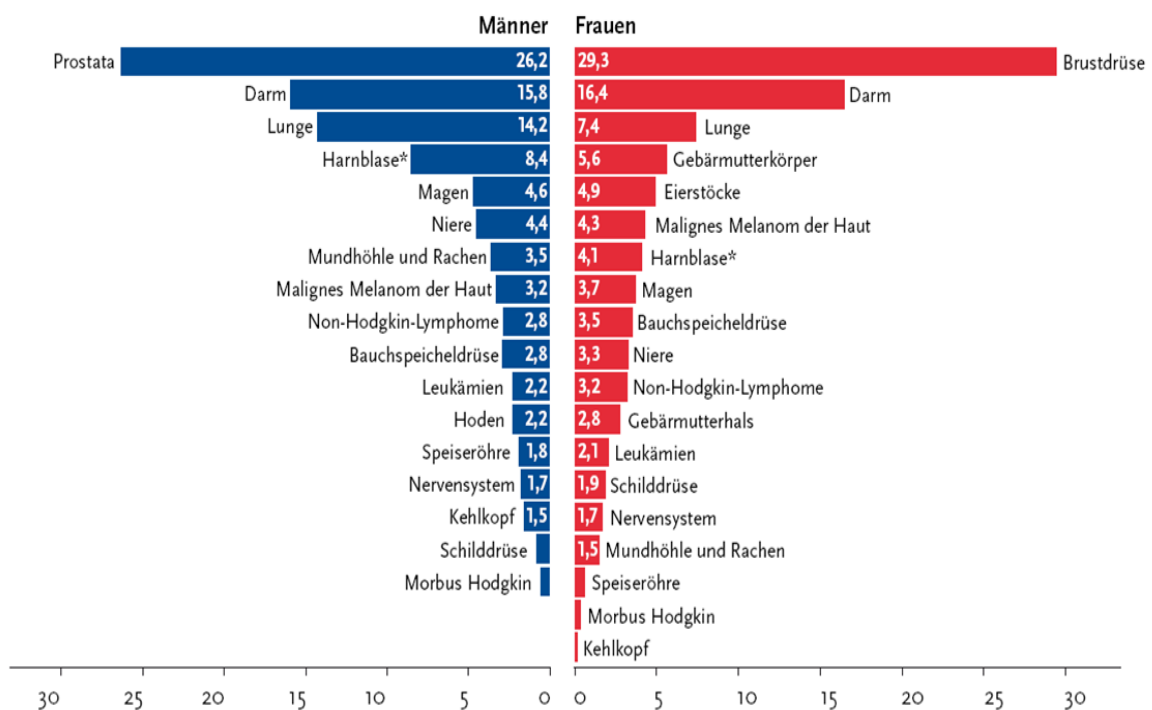
Abb. 1.2 Übersicht der B-Zell Reifung

Die B-Zelle durchläuft während ihrer Differenzierung im Knochenmark mehrere Phasen und verlässt dieses Kompartiment erst als unreife B-Zelle mit der Präsentation des fertigen B-Zell Rezeptors auf ihrer Oberfläche. Dieser kann sowohl zur Klasse der IgMs als auch IgDs gehören, da beide durch alternatives Splicen der gleichen RNS entstehen. Die weitere Differenzierung der B-Zelle erfolgt im Anschluss an das Knochenmark in den sekundären lymphatischen Organen, zu denen unter anderem auch die Milz zählt.

Das Verständnis der grundlegenden Mechanismen, die der Hämatopoese, Zelldifferenzierung und -reifung zugrunde liegen, ist essenziell für die hämatologische Forschung, da eine Störung dieser stark regulierten Mechanismen der Ausgang vieler Erkrankungen, wie z. B. angeborenen Stoffwechselerkrankungen, Anämie, myeloproliferative Erkrankungen und Leukämien ist.⁹

1.2 Leukämie

Als Leukämie wird eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems bezeichnet, die erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben wurde.¹⁰ Der Name Leukämie leitet sich aus den altgriechischen Worten *leukós* „weiß“ und *haima* „das Blut“ ab. Im europäischen Mittel wird allgemein von 10,3 (Männer) bzw. 7,2 (Frauen) Neuerkrankungen pro 100.000 ausgegangen. Damit liegt Leukämie im Vergleich zu anderen Krebsarten mit 2,2 % (Männer) und 2,1 % (Frauen) im unteren Drittel aller Krebsneuerkrankungen bei Erwachsenen (**Abb. 1.3**).



* einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

Abb. 1.3
Prozentualer Anteil ausgewählter Krebsneuerkrankungen

In dieser Auswahl an Krebsneuerkrankungen in Deutschland sind 2006 die Leukämien bei den Männern mit 2,2 % und bei den Frauen mit 2,1 % vertreten. Nicht melanotischer Hautkrebs wurde in dieser Statistik nicht berücksichtigt.

Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut (2006)

Im Gegensatz dazu gehört die Leukämie mit 34,1 % zu der häufigsten malignen Erkrankung bei Kindern bis 15 Jahre (**Abb. 1.4**). Die häufigste Einzeldiagnose ist hierbei die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit 27 %, die in der Altersgruppe bis vier Jahre mehr als doppelt so häufig auftritt wie in anderen Altersgruppen.

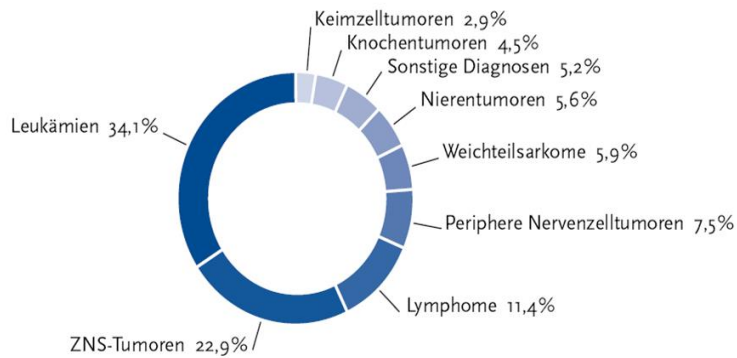


Abb. 1.4
Krebs bei Kindern

Leukämie ist mit 34,1 % die am häufigsten vorkommende Krebsart bei Kindern bis 15 Jahre. Dies ergab die Auswertung der Daten des Deutschen Kinderkrebsregisters (DKKR), die zwischen 1999 und 2008 erhoben wurden.¹¹

Das Krankheitsbild der Leukämie zeichnet sich durch eine stark vermehrte Bildung von funktionsuntüchtigen Leukozyten (Blasten) im Knochenmark aus. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es zu einer verminderten Produktion anderer zellulärer Bestandteile des Blutes (Erythrozyten, Thrombozyten und funktionstüchtiger Leukozyten), wodurch es zu einer Anämie, Thrombopenie und Neutropenie kommt. Aufgrund der übermäßigen Produktion von Blasten werden diese auch an das periphere Blut abgegeben und können von dort aus andere Organe wie Leber, Milz und Lymphknoten infiltrieren.

1.2.1 Leukämogenese und die leukämische Stammzelle

Eine leukämische Erkrankung entsteht durch die Akkumulation zahlreicher erworbener Mutationen, die grob in drei Gruppen eingeteilt werden können.

- 1.) Punktmutationen
- 2.) Chromosomale Mutationen (Deletion, Amplifikation, Translokation)
- 3.) Epigenetische Mutationen

Mutationen mit einem transformatorischen Potential verändern die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der betroffenen Zelle.¹² Für die Transformation einer hämatopoetischen Zelle in eine leukämische Zelle scheinen mindestens zwei Mutationen notwendig zu sein. Die erste sorgt für eine gesteigerte Proliferation der Zelle und eine damit verbundene Akkumulation, während die zweite Mutation eine Differenzierung der betroffenen Zelle unterbindet. Häufig sind Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) von genetischen Veränderungen betroffen, in deren Folge sie unabhängig von einer Ligandenbindung konstitutiv aktiv werden und somit ein permanentes Signal zur Proliferation der Zelle liefern. Die Mutation der RTKs hat zur Folge, dass diese auch membranungebunden innerhalb der Zelle aktiv vorliegen können und so Signalwege aktivieren, die regulär nicht das primäre Ziel dieser RTKs sind. Häufig sind Regulationsmechanismen innerhalb der Zelle, die den lysosomalen Abbau oder eine Inaktivierung der RTKs zur Folge hätten, runter reguliert oder vollständig ausgeschaltet.¹³

Die Diagnose einer Leukämie und ihrer anschließenden Bestimmung erfolgt mittels verschiedener diagnostischer Methoden. Bereits in einem normalen Blutbild oder auch einem Differentialblutbild kann sich durch eine veränderte Menge an Leukozyten sowie Thrombozyten ein Hinweis für eine Leukämie ergeben. Die panoptische Färbung eines Blut- oder Knochenmarkausstriches nach Pappenheim oder Wright¹⁴ bietet die Möglichkeit reaktive Zellen von Blasten einer akuten Leukämie zu unterscheiden. Die derzeit wichtigste Rolle in der Klassifizierung der Leukämie spielt die Immunophänotypisierung. Hierfür wird Vollblut des Patienten mit entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern inkubiert, die im Blut vorliegenden Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert und die vorhandenen Erythrozyten lysiert. Anschließend kann das Präparat mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Durch die simultane Verwendung mehrerer Antikörper können leukämiespezifische

Antigenmuster untersucht werden, wodurch eine exakte Klassifizierung der Leukämie möglich ist. Besonders die akute lymphatische Leukämie (ALL) wird in erster Linie nach immunologischen Kriterien unter Verwendung des EGIL-Schemas (**E**uropean **G**roup on **I**mmunological Classification of **L**eukemia) eingeteilt.^{15,16} Die Einteilung L1-L3 der FAB (**F**rensh-**A**merican-**B**ritish working group for the classification of leukemia) erfolgt bei der ALL nach rein morphologischen Kriterien und gilt als veraltet, lediglich die L3-Morphologie ist für die akute B-ALL charakteristisch.

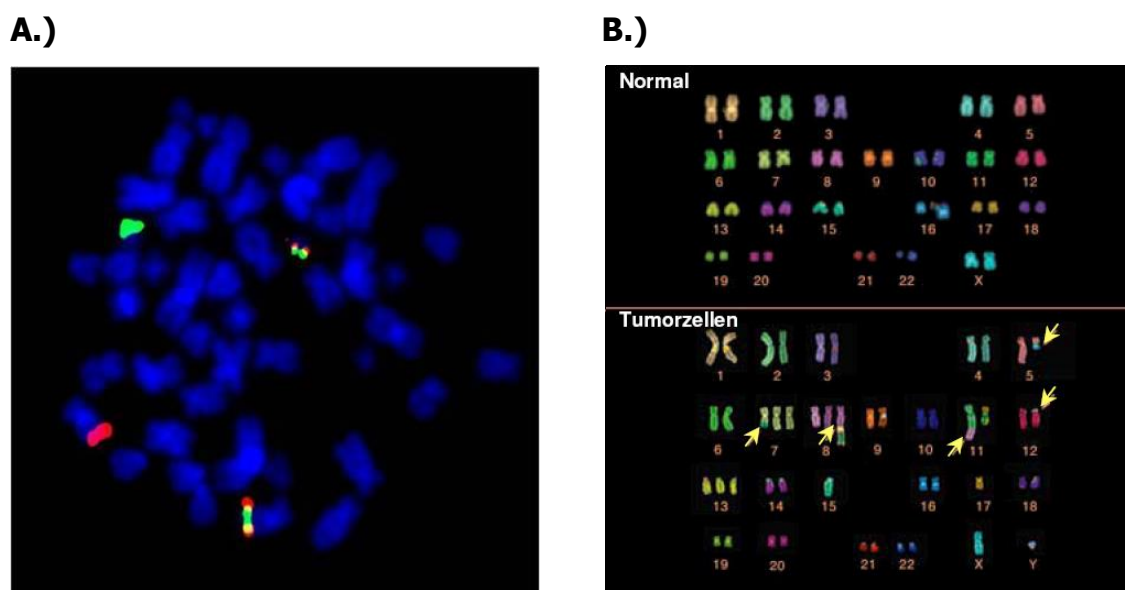


Abb. 1.5
Fluoreszenz In-Situ Hybridisierungs-Analyse

A.) FISH-Analyse mit Region-spezifischen Sonden:

Rotes Signal (Chr.9), grünes Signal (Chr.22) und 2 rot-grüne Fusionssignale der derivativen Chromosomen 9 und 22 bei der Philadelphia-Translokation $t(9;22)(q34;q11.2)$.

B.) FISH-Analyse mit Chromosom-spezifischen Sonden:

Mittels Erstellung eines Karyogrammes können eine Vielzahl chromosomaler Veränderungen detektiert werden. In dem hier gezeigten Bsp. werden Aberrationen in den Chromosomen 5, 7, 8, 11, 12 gezeigt. Durch die Wahl der Chromosomen spezifischen Farben ist eine Identifizierung der an der Translokation beteiligten Chromosomen möglich.

Das zytochemische Verhalten von Blasten sowie der zytochemische Nachweis von Monozytenesterase, Myeloperoxidase und PAS-Reaktion spielt für die FAB-Klassifikation der AML eine Rolle und ermöglicht eine Abgrenzung der chronisch myeloischen Leukämie zum myeloproliferativen Syndrom.

Spezifische chromosomale Aberrationen sind charakteristisch für einige Leukämiearten und deren Diagnose ist verknüpft mit Prognose und Therapie. Zur Detektierung chromosomaler Veränderung ist derzeit die Fluoreszenz In-Situ Hybridisierungstechnik die erste Wahl, bei der mittels fluoreszierender Sonden nach bestimmten Aberrationen gesucht werden kann. Dies ist auch gleichzeitig der Nachteil dieser Methode, da auch nur die Veränderungen detektiert werden können, nach denen explizit gesucht wurde. Um sich einen Gesamtüberblick zu verschaffen, wird mit der gleichen Methode ein Karyogramm mit chromosomenspezifischen Antikörpern angefertigt, wodurch nahezu alle chromosomalen Veränderungen angezeigt werden können (**Abb. 1.5**).

Mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction = PCR) können in der molekulargenetischen Diagnostik spezifische Genloki, wie der BCR/ABL-Lokus, in der CML und ALL quantitativ nachgewiesen werden. Dies ist hilfreich, sowohl für das Therapiemonitoring, als auch für die Detektion der minimalen Resterkrankung (MRD = minimal rest disease).

Mit Hilfe der verschiedenen beschriebenen diagnostischen Techniken kann die Leukämie grob in vier verschiedene Arten unterteilt werden. Dabei wird ihrem Zelltyp entsprechend zwischen lymphatischer und myeloischer Leukämie unterschieden sowie den Verlauf beschreibend zwischen chronischer und akuter Leukämie.

Akute lymphatische Leukämie (ALL)	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
<ul style="list-style-type: none"> - Unterformen gemäß EGIL-Schema: pro-B, common B, prä-B- und B-ALL early-, thymische-, mature T-ALL - Häufigste maligne Erkrankung bei Kindern - 15 % aller erwachsenen akuten Leukämien - Diverse genetische Aberrationen <i>B-ALL</i>: BCR/ABL, MLL rearrangements <i>T-ALL</i>: TAL1, Hox11 	<ul style="list-style-type: none"> - CLL als Sonderform der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) - Häufigste Leukämie - Medianes Alter >70 Jahre¹⁷ - Niedrig maligne, Überlebenszahl variable - Häufig Chromosomendeletion
Akute myeloische Leukämie (AML)	Chronische myeloische Leukämie (CML)
<ul style="list-style-type: none"> - Klassifizierung gemäß FAB-Klassifizierung - Proliferation einer Vorläuferzelle mit Differenzierungsblock - Mediane Alter 63 Jahre bei Erwachsenen¹⁸ - Bekannte Fusionsproteine: PML/RARa; AML1/ETO 	<ul style="list-style-type: none"> - CML Sonderform, der chronisch myeloproliferativen Erkrankungen - Medianes Alter 55-60 Jahre^{19,20} - Bekannte Fusionsproteine: BCR/ABL

1.2.2 Akute lymphatische Leukämie

Bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) handelt es sich laut Definition um eine T- bzw. B-lymphatische Neoplasie, deren Blastengehalt im Knochenmark größer als 25 % ist. Die Anzahl der ALL Neuerkrankungen pro Jahr beträgt etwa 1,5/100.000 verteilt auf alle Altersgruppen. Bei einer detaillierteren Analyse lässt sich eine höhere Anzahl an Neuerkrankungen bei männlichen Patienten (1,4:1) nachweisen. Die Verteilung der altersabhängigen Neuerkrankungen in Deutschland zeigt ein Gleichgewicht von 500 Neuerkrankungen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Das Risiko eines Menschen generell in seinem Leben an einer ALL zu erkranken ist im Kindesalter relativ hoch ($6,5/100.000 < 4$ Jahren) und flacht dann mit zunehmendem Alter ab und erhöht sich wieder geringfügig im höheren Alter ($1,5/100.000 > 80$ Jahre).²¹ Mehr als 80 % aller akuten lymphatischen Leukämien treten bei Patienten auf, die jünger als 15 Jahre sind. Die pädiatrische ALL ist mit 75 % die am häufigsten vorkommende Leukämie bei Kindern. Die übrigen 20 % aller ALL-Erkrankungen werden bei Erwachsenen über 50 diagnostiziert.²²

Die ALL wird seit 1976 nach der French-American-British (FAB-) Klassifikation nach morphologischen und zytochemischen Merkmalen in drei Untergruppen (L1-L3) aufgeteilt.^{23,24} Diese Klassifikation spielt heutzutage jedoch lediglich für die Identifikation der reifzelligen B-ALL bzw. Burkitt-Leukämie/Lymphom eine Rolle. Zurzeit erfolgt eine genauere Klassifizierung mittels Immunophänotypisierung basierend auf der Expression verschiedener Antigene, die spezifisch für die jeweilige Untergruppe der akuten Leukämie sind (**Abb. 1.6**).^{25,26} 76 % aller ALL Erkrankungen bei Erwachsenen können der lymphatischen B-Zellreihe zugeordnet werden und werden je nach Grad der Differenzierung als pro-B (11 %), common- (49 %), prä-B (12 %) und reifzellige (4 %) B-ALL klassifiziert. Die verbleibenden 24 % der adulten ALL gehören zur early (6 %), thymischen (12 %) oder reifzelligen (6 %) T-ALL. Den verschiedenen immunologischen Subtypen sind spezifische zyto- und molekulargenetische Aberrationen zugeordnet.

Subgruppe Bezeichnung	Immunphänotypisierung Charakt.Marker	Inzidenz	Zyto/Molekulargenetik	
			Häufige Aberrationen	Molekulare Marker
B- Linien ALL	HLA-DR+, TdT+, CD19+ u./o. CD79a+ u./o. CD22+	76%		
λ B-Vorläufer ALL				
Pro-B	CD10-	11%	t(4;11)	ALL1-AF4
c- (common)	CD10+	49%	t(9;22)	BCR-ABL
Prä-B	CyIgM+	12%	t(1;19)	E2A-PBX1
			t(9;22)	BCR-ABL
λ Reife B	SIgM+	4%	t(8;14)	cMYC
T- Linien ALL	TdT+, cyCD3+, CD7+	24%		
λ „Early“ T	CD2- , sCD3-, CD1a-	6%		
λ Thymische	sCD3±, CD1a+	12%		
λ „Mature“ T	sCD3+ , CD1a-	6%		

Abb. 1.6 Klassifizierung der B- und T-Linien ALL

Die ALL gliedert sich zunächst in B- (76 %) und T-Linien (24 %) ALL und wird innerhalb dieser Linien mittels Immunophänotypisierung sowie nach zyto- und molekulargenetischen Merkmalen in weitere Subtypen unterteilt.

B-Linien ALL: Pro-B ALL 1 %; c-(common) ALL 49 %, Prä-B ALL 12 %, Reife B ALL 4 %

T-Linien ALL: „Early“ T-ALL 6 %; Thymische ALL 12 %; „Mature“ T-ALL 6 %

Abbildung aus Gökbuget et al.¹⁶

1.2.3 Genetische Heterogenität und Aberrationen

Die genetische Heterogenität und das Auftreten von genetischen Aberrationen sind wichtige Merkmale vieler Leukämien. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Fokus auf der Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 $t(9;22)$ liegen, durch die das sogenannte Philadelphia Chromosom (Ph) entsteht. Dieses Translokationsprodukt ist neben der ALL besonders charakteristisch für die CML und wird bei etwa 95 % aller Patienten nachgewiesen. Aber auch bei anderen Formen der Leukämie gibt es Ph positive (Ph^+) Varianten. 5 % aller pädiatrischen sowie 25 % aller adulten akuten lymphatischen Leukämien und etwa 1% der akuten myeloischen Leukämien (**Abb. 1.7**) werden als Ph^+ Leukämien klassifiziert.²⁷

Die Identifikation von Translokationen und anderen Mutationen sind von essentieller Bedeutung für die Prognose und die Auswahl eines passenden Therapiemodells.²⁸

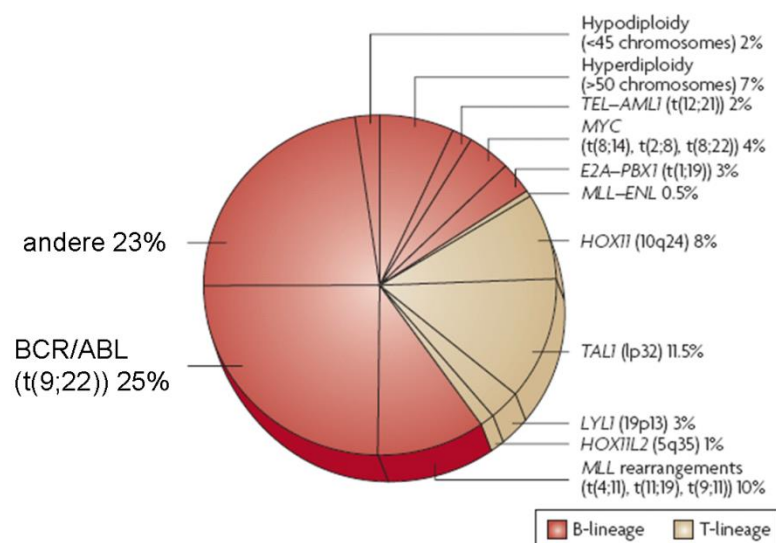


Abb. 1.7
Die genetische Heterogenität in der ALL

Sowohl in der B-Linien- als auch in der T-Linien-ALL können zahlreiche genetische Aberrationen auftreten. Die $t(9;22)$ Translokation ist mit 25 % die häufigste genetische Veränderung in dieser Form der Leukämie. Andere genetischen Veränderungen, wie die MLL Translokation, die in verschiedenen Formen auftauchen kann, können lediglich bei maximal 10 % aller Patienten nachgewiesen werden. *Abbildung aus Pui et al.*²⁸

Der Nachweis einer t(9;22) Translokation ist wie bereits erwähnt charakteristisch für die CML. Dennoch spielt sie eine wichtige Rolle bei der ALL aufgrund der deutlich verschlechterten Prognose, die der Nachweis dieser Aberration mit sich bringt. Das Philadelphia Chromosom ist das Produkt einer Translokation, die in Folge von Chromosomenbrüchen auf dem langen Arm der Chromosomen 9 und 22 entsteht. Der Bruch von Chromosom 9 erfolgt innerhalb des ersten Introns des c-ABL1 Gens (Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1). Auf Chromosom 22 hingegen ist der Bruch innerhalb des BCR Gens (Breakpoint Cluster Region), benannt nach den häufigen Brüchen in diesem Gen, lokalisiert.²⁷ Auch in der hier beschriebenen t(9;22)(q34.1;q11.2) Translokation kann es zu drei verschiedenen Brüchen innerhalb des BCR Gens kommen (**Abb. 1.8**).

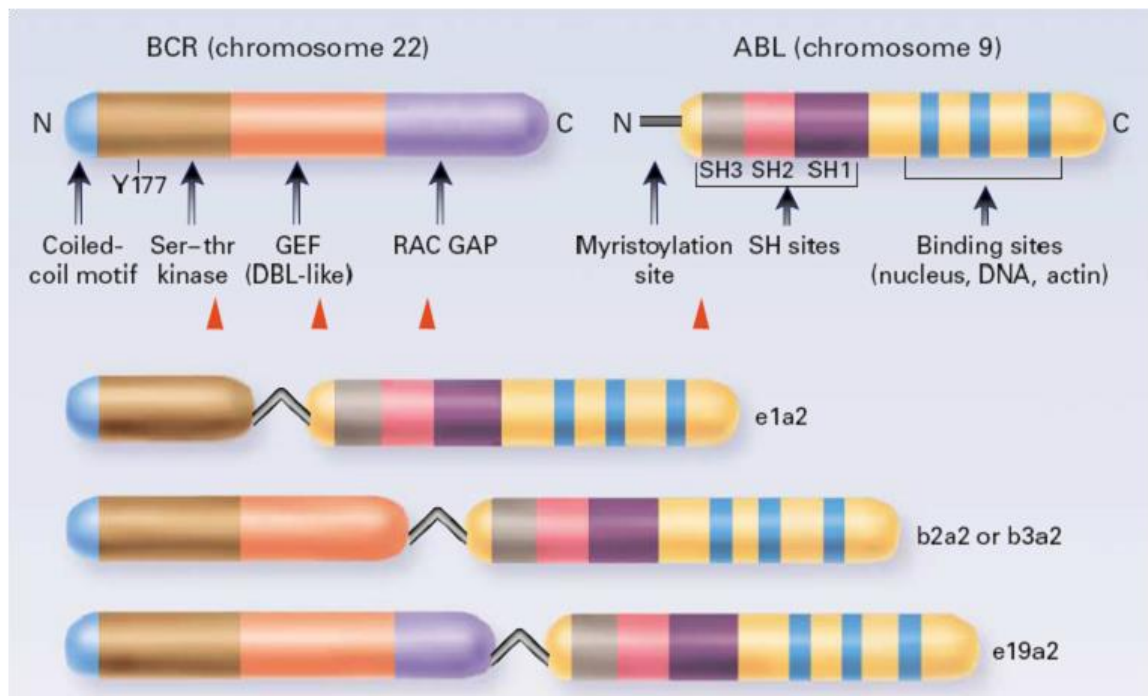


Abb. 1.8
BCR/ABL Fusionsproteine in Abhängigkeit des Bruchpunktes

Das Fusionsprotein BCR/ABL ist das Produkt der t(9;22)(q34.1;q11.2) Translokation. Es werden drei Fusionsproteine unterschieden, die sich abhängig von ihrem jeweiligen Bruchpunkt (minor- (185 kDa), major- (210 kDa) und mycro-Bruchpunkt (230 kDa)) in ihrer Größe unterscheiden.²⁷

Unabhängig der Bruchstelle im BCR Gen verbindet sich das entstandene 5`-Ende des BCR Gens bei dieser Translokation mit dem 3`-Ende vom c-ABL1 Gen. Aufgrund der zuvor erwähnten drei Bruchstellen im BCR Gen kommt es somit auf Chromosom 22, dem Philadelphia Chromosom, zur Bildung des BCR/ABL Fusionsgens, dessen Länge je nach Bruchpunkt im BCR Gen variieren kann. Im Gegenzug entsteht auf Chromosom 9 mit den Resten der jeweiligen Gene das Fusionsgen ABL/BCR.

Je nach Bruchpunkt entstehen drei verschiedene BCR/ABL Fusionsproteine mit 210 kDa, 185 kDa und 230 kDa. Das 210 kDa große BCR/ABL (p210^{BCR/ABL}) resultiert durch den major-Bruchpunkt M-BCR, bei dem der längste BCR-Teil mit dem konstanten Anteil des c-ABL Gens fusioniert. Diese Variante findet man überwiegend in der CML, aber auch in der ALL. Charakteristisch für die ALL ist der minor-Bruchpunkt (m-BCR). Diese Translokation resultiert in der Bildung eines 185 kDa großen Fusionsproteins. Ein dritter Bruchpunkt, mycro-Bruchpunkt (μ -Bcr), führt zu einem 230 kD Fusionstranskript, welches mit der chronisch neutrophilen Leukämie und Thrombozytose assoziiert ist.²⁹

Durch die Transkription des BCR/ABL Fusionsgens wird eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase exprimiert. Vermittelt durch eine coiled-coil Struktur am Amino-Ende von BCR wird die Bildung von Tetrameren ermöglicht, wodurch BCR/ABL in der Lage ist, sich selber zu phosphorylieren und zu aktivieren.^{30,31} Durch die Fusionierung der beiden Proteine geht die Aminoternale Kappe von c-ABL verloren, die durch eine intramolekulare Bindung an die Kinasedomäne eine autoinhibitorische Funktion hatte. In Summe sorgen diese beiden Merkmale für eine konstitutive Aktivität von BCR/ABL. In der aktiven Form kann BCR/ABL sowohl selbstständig als auch vermittelt durch Adapterproteine an verschiedene Interaktionspartner binden. Solch eine Bindung erfolgt meist mittels der SH2 oder SH3 Domäne im ABL-Teil des Fusionsproteins.

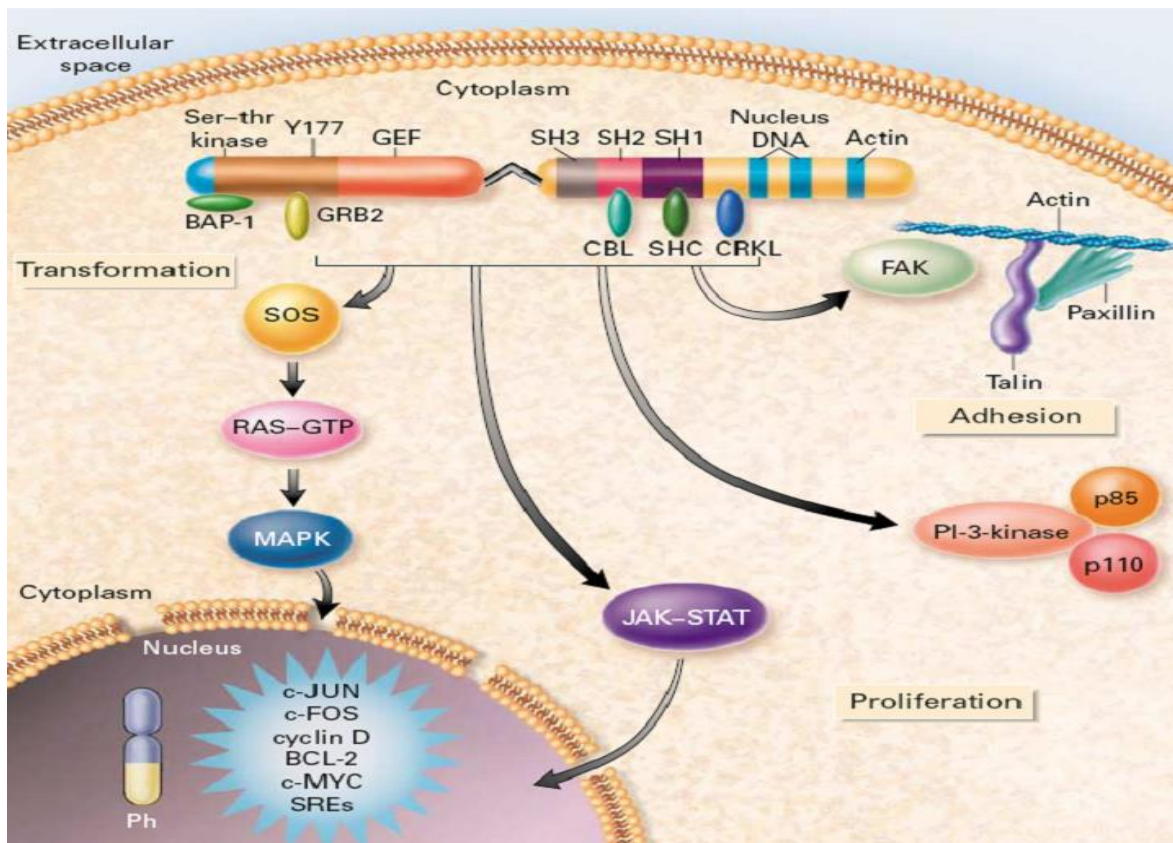


Abb. 1.9
BCR/ABL aktiviert diverse Signalwege innerhalb der Zelle

BCR/ABL ist eine konstitutive aktive Kinase. Dadurch ist sie in der Lage direkt oder mittels Adapterproteine, wie CBL oder CRKL, verschiedene Signalwege, wie den JAK/STAT, RAS oder PI3K Signalweg zu aktivieren. Somit wird die Proliferation in BCR/ABL positiven Zellen gesteigert und Apoptose und Differenzierung verhindert. *Abbildung aus Faderl et al.²⁷*

Die BCR/ABL vermittelte Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung des JAK/STAT, RAS und PI3k Signalweges hat eine gesteigerte Proliferation dieser Zellen zur Folge, während Differenzierung und Apoptose verhindert werden (**Abb. 1.9**).²⁹ Damit erfüllt BCR/ABL die in **Abschnitt 1.2** beschriebenen Mindestvoraussetzungen, die für die Transformation einer hämatopoetischen in eine leukämische Zelle notwendig sind.

1.2.4 Therapieansätze in der Leukämie

In den Anfängen der Krebsforschung war es das Ziel ein Mittel zu entwickeln, um die gesteigerte Proliferation in Neoplasien zu unterbinden.³²

Alle aktuellen und vergangenen Strategien, die versuchten dieses Ziel zu erreichen, haben gemein, dass sie den Krebs als eine veränderte homogene Einheit betrachten, obwohl bereits 1953 Hewitt das Konzept der Tumorheterogenität beschrieb. Dabei betont er, dass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen in der Lage ist die Krankheit zu erhalten und zu verbreiten. Als logische Konsequenz hat sich seit vielen Jahren der Begriff der Krebsstammzelle bzw. der Krebs initiiierenden Zelle etabliert.³³ Krebsstammzellen werden definiert als Zellen innerhalb des Tumors, die in der Lage zur Selbsterneuerung sind und, die für die Heterogenität der Tumorzellen verantwortlich sind.³⁴ Derzeit werden zwei Modelle diskutiert, die versuchen die Tumorheterogenität zu beschreiben. Das stochastische Modell geht von einem biologisch homogenen Tumor aus, der durch nicht vorhersehbare intrinsische und extrinsische Einflüsse seine Heterogenität erlangt. Demnach kann jede Tumorzelle aufgrund der zuvor beschriebenen Einflüsse sich in eine leukämische Stammzelle verwandeln. Das hierarchische Modell hingegen geht davon aus, dass der Tumor ein Abbild des gesunden Gewebes darstellt und sich aus einigen wenigen Zellen entwickelt, die das Potential zu einer leukämischen Stammzelle haben. Gerade im Bereich der akuten Leukämien werden beide Modelle kontrovers diskutiert. Dabei zeigen die Arbeiten von Cox et al.^{35,36}, dass lediglich ein kleiner Teil der leukämischen Zellen in der Lage ist als Vorläuferzelle zu fungieren und dass die Transformation in Zellen stattfindet, die einen wesentlich primitiveren Phänotyp haben, wie das Gros der ALL Zellen.

Die Arbeitsgruppe von J. Vormoor veröffentlichte zahlreiche Arbeiten, in denen das stochastische Modell vertreten wird und durch entsprechende Ergebnisse belegt wurde.^{33,37} In einer aktuellen Arbeit von 2013 zeigen Rehe et al.³⁸, dass B-ALL verbreitende Zellen in hohem Maße in verschiedenen Populationen von Lymphoblasten nachzuweisen sind. Des Weiteren belegt diese Arbeit das Fehlen einer Stammzellhierarchie in der B-ALL. 2009 wurde diese Kontroverse in einer Arbeit von Heidenreich und Vormoor genauer untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Forschungsergebnisse in der

Wahl der Mausmodelle liegen kann. Arbeitsgruppen, die eine geringere Anzahl leukämischer Stammzellen mit einem sehr unreifen Phänotypen nachgewiesen haben, verwendeten für ihre Untersuchungen meist ein konventionelles NOD/SCID Mausmodell. Die so produzierten Ergebnisse unterstützen die Theorie des hierarchischen Modells. Arbeitsgruppen, die für ihre Studien NK-cell depleted NOD/SCID Mäuse oder NSG Mäuse verwendet haben, können mit ihren Ergebnissen das stochastische Modell belegen.³⁷ Ähnliche Beobachtungen konnten auch für solide Tumore gemacht werden. Die Wahl eines einheitlichen Mausmodells mit möglichst guten Voraussetzungen für die Transplantation humaner Zellen ist daher notwendig, um diese Divergenz aufzuklären.³²

Die derzeitige Behandlung akuter lymphatischer Leukämien erfolgt in Deutschland innerhalb der GMALL-Studiengruppe und wird entsprechend der jeweiligen Studienprotokolle durchgeführt. Das Therapiemodell kann in drei Phasen bzw. in drei verschiedene Arten der Therapie unterteilt werden:

- 1.) Induktionstherapie
- 2.) Konsolidierungstherapie
- 3.) Erhaltungstherapie

Zur Vermeidung eines Tumorlyse-Syndroms werden Patienten im Rahmen einer Vorphasetherapie mit Steroiden und Cyclophosphamiden behandelt. Mit Beginn der Therapie erhalten Patienten im Rahmen der Induktionstherapie Vincristin (VCR) in Verbindung mit Steroiden, Anthrazyklin-Derivaten und gegebenenfalls Asparaginase. In der zweiten Hälfte dieser Therapiephase wird die Behandlung durch die Zugabe weiterer Medikamente (Cyclophosphamid, Cytosin Arabinosid, 6-Mercaptopurin und Methotrexat) ergänzt.

Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen einer kompletten Remission. Diese definiert sich laut der Kriterien der internationalen Konsensuskonferenz wie folgt:

- Keine Blasten im peripheren Blut
- Regeneration der Hämatopoese
- Blastenanteil im Knochenmark < 5 %
- Keine nachweisbare extrameduläre Manifestation
- Keine transfusionsbedürftige Anämie

Mit Erreichen einer kompletten Remission folgt die Konsolidierungstherapie, die international unterschiedlichen Konzepten folgt. Derzeit scheint eine zyklische Konsolidierungstherapie mit wechselnden Substanzen, den hochdosierten Einsatz von Methotraxat und Asparaginase sowie die Wiederholung der Induktionstherapie am erfolgreichsten zu sein. Ein wesentlicher Bestandteil der Postremissionstherapie ist die Stammzelltransplantation (SZT). Die Patienten erhalten in erster Linie eine allogene SZT oder, wenn kein passender allogener Spender gefunden werden kann, im Anschluss an eine weitere Konsolidierungstherapie eine autologe SZT. Sollte eine konventionelle SZT kontraindiziert sein, stellt die nicht myeloablative SZT eine therapeutische Alternative dar. Im Rahmen der Erhaltungstherapie wird anhand der MRD (minimale residual disease) Verlaufsuntersuchung die Dauer und Intensität festgelegt.

Die Leukämie induzierende Rolle von BCR/ABL in der Ph⁺-Leukämie und die zentrale Rolle der konstitutiv aktiven ABL Kinase, führte zur Entwicklung zahlreicher Tyrosinkinase Inhibitoren, von denen Imatinib-Mesylate (Glivec® or Gleevec®) als erstes eine Marktzulassung erhielt. Imatinib interagiert mit nicht weniger als 21 Aminosäuren der Kinasedomäne von BCR/ABL. Allerdings kann es nur an die inaktive Form von BCR/ABL binden, wenn die A-Schleife, eines der wichtigsten regulatorischen Elemente, sich in einer inaktiven Konformation befindet, in der sie das katalytische Zentrum des Fusionsproteins verschließt. Befindet sich diese A-Schleife in ihrer aktiven Form, wird die Bindung von Imatinib sterisch verhindert.³⁹ Durch die Bindung an BCR/ABL blockiert Imatinib die ATP-Bindedomäne und verhindert die erneute Bindung von ATP und damit verbunden die Reaktivierung von BCR/ABL. In Folge dessen werden die Signalwege, die verantwortlich sind für Proliferation, Differenzierungsblock und Verhinderung der Apoptose, nicht weiter

aktiviert und die Zelle geht in Apoptose. Im Rahmen der Patientenbehandlung konnten die Prognosen der betroffenen Patienten mit einer Ph⁺ ALL erheblich verbessert werden und liegen nach fünf Jahren bei einer Überlebenswahrscheinlichkeit von über 90 %.^{40,41} Bei etwa 90 % aller behandelten Patienten konnte eine vollständige Remission und bei 50 % sogar eine molekulare Remission erzielt werden.²⁶ Im Rahmen der GIMEMA Studie konnte ein Rezidiv (Rückfall) bei 50 % aller Patienten bereits nach weniger als 12 Monaten festgestellt werden. Nach 24 Monaten sind 68,8 % der Patienten erneut an ALL erkrankt (**Abb 1.10**).

Bei 80 bis 90 % aller Patienten mit einem Rezidiv ist dieses mit Mutationen des BCR/ABL Proteins oder anderen genetischen Veränderungen verbunden.

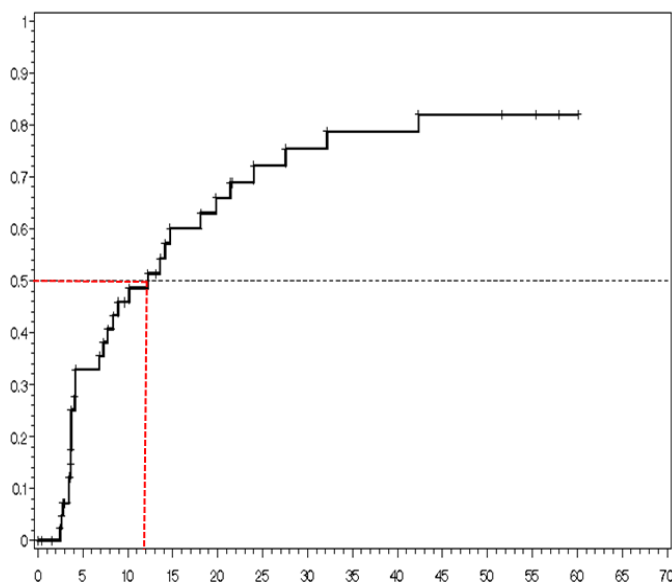


Abb. 1.10
Rückfallhäufigkeit bei
Patienten mit Ph⁺ ALL

Im Rahmen der „GIMEMA Study 0201B“-Studie wurde eine Rückfallwahrscheinlichkeit von 50 % nach weniger als 12 Monaten bei Patienten mit einer Ph⁺ ALL beobachtet. Innerhalb von knapp vier Jahren rezidierten 84 % aller Patienten. *Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Vignetti (2009)*

Aufgrund der Mutationen stellen sich bei diesen Patienten häufig Resistenzen gegenüber den zur Verfügung stehenden Therapeutika ein und erschweren eine notwendige Postremissionstherapie.

1.2.5 Klinische Resistenzmechanismen

Patienten mit Ph⁺ Leukämien können im Laufe ihrer Erkrankung Resistenzen gegenüber Imatinib entwickeln (sekundäre Resistenz) oder bereits zu Beginn der Therapie eine Resistenz aufweisen (primäre Resistenz). Diese entstehen unter anderem durch die Amplifizierung von BCR/ABL, aber auch durch das Auftreten von Punktmutationen in der Kinasedomäne von BCR/ABL. Zusätzlich zu den BCR/ABL abhängigen Resistenzen gibt es jedoch Patienten, die BCR/ABL unabhängige Resistenzmechanismen entwickeln. Zu diesen zählt unter anderem die übermäßige Expression von Efflux Pumpen in Ph⁺ Zellen.

1.2.5.1 Resistenzen durch BCR/ABL Überexpression

Etwa 10 % aller Resistenzfälle lassen sich auf eine Überexpression des BCR/ABL Fusionsproteins zurückführen, die entweder auf genomischer oder auf mRNA Ebene basiert.⁴²⁻⁴⁴ Aufgrund dieser Überexpression wird vermutet, dass die intrazelluläre Konzentration an Imatinib nicht in der Lage ist, die Kinaseaktivität zu unterbinden, wodurch die Zelle eventuell in ihrer Proliferation gehemmt wird, aber nicht in Apoptose geht.

1.2.5.2 BCR/ABL Punktmutation als Resistenzmechanismus

Mutationen der Kinasedomäne können aufgrund ihrer Lokalisation in vier verschiedene Cluster eingeteilt werden:

ATP-Bindedomäne (P-Loop = P-Schleife), T315, M351 und A-Loop (A-Schleife). Die häufigsten Mutationen könne in der P-Schleife nachgewiesen werden, sowie in den Positionen T315 und M351 (**Abb. 1.11**).⁴⁵

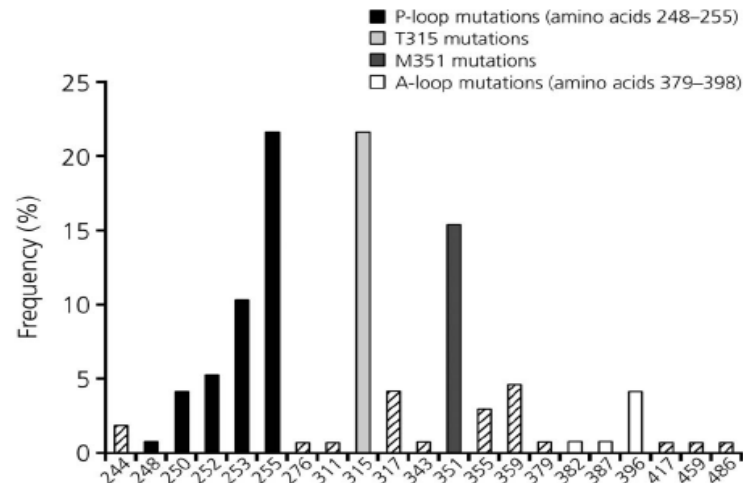


Abb. 1.11
Prozentuale Verteilung möglicher Punktmutation der TKD von BCR/ABL

Mutationen können bezüglich ihrer Lokalisierung innerhalb der TKD in klinisch relevante Cluster eingeteilt werden. Dabei werden Mutationen der P-Schleife (248-255), T315I Mutation und Mutationen innerhalb der A-Schleife (379-398) unterschieden. *Abbildung aus Deininger et al.*³⁹

P-Schleife:

In der P-Schleife befinden sich im Normalfall die Phosphatgruppen des ATPs. Da es sich bei der P-Schleife um eine sehr flexible glycinreiche Struktur handelt, kann sie sich sehr gut der Form von Imatinib anpassen, wenn es an diese Struktur bindet. Stabilisiert wird diese Bindung durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y253 und N322 und der Bildung eines hydrophoben Käfigs, der Teile von Imatinib umgibt.⁴⁶ Kommt es zu Mutationen in diesem Bereich kann dies auf zwei Weisen die Interaktion mit Imatinib unterbinden. Zum einen wird die anpassungsfähige Struktur in diesem Bereich gestört und das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem BCR/ABL zur aktiven Konformation verschoben, wodurch die Bindung von Imatinib verhindert wird. Zum anderen kann die Bindung zwischen BCR/ABL und Imatinib nicht mehr stabilisiert werden, wenn es zu einer Mutation von Y253 kommt.

T315:

Eine weitere wichtige Mutation befindet sich an der Position T315. Das Threonin an dieser Position stabilisiert das an BCR/ABL gebundene Imatinib durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung. Der Austausch des Threonins durch ein Isoleucin verhindert nicht nur die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung, sondern Isoleucin behindert zusätzlich sterisch die Bindung von Imatinib an BCR/ABL. Die T315I Mutation wird auch als „Gatekeeper“-Mutation bezeichnet.

M351:

Methionin an der Position 351 bindet an die ABL SH2 Domäne und stabilisiert dadurch die autoinhibierte Konformation von BCR/ABL. Wird Methionin durch ein Threonin ausgetauscht, kann BCR/ABL nicht mehr in der autoinhibierten Konformation stabilisiert werden. Dadurch wird das Gleichgewicht zum aktiven BCR/ABL hin verschoben und Imatinib kann BCR/ABL nicht mehr inhibieren.

A-Schleife:

Das vierte Cluster an Mutationen befindet sich in der A-Schleife und erstreckt sich über 21 Aminosäuren von Position 381 bis 402 im ABL-Anteil. Die Position der A-Schleife reguliert die Kinaseaktivität von BCR/ABL. Mutationen in diesem Bereich verhindern, dass die Kinase eine inaktive Konformation einnehmen kann, was für eine Bindung von Imatinib notwendig ist. Mutationen in der A-Schleife Region kommen im Vergleich zu Mutationen in den anderen Bereichen vergleichsweise selten vor.

Mutationen in anderen Bereichen der Kinasedomäne können zwar vorkommen, sind aber selten und führen nicht zwangsläufig zu einer Resistenz gegenüber Imatinib. Generell treten die hier beschriebenen Mutationen nicht nur einzeln auf, sondern können auch in Kombinationen auftreten, wodurch die daraus resultierende Resistenz wesentlich ausgeprägter sein kann als einzelne Mutationen.

Als Folge der mutationsvermittelten Resistenzen kamen BCR/ABL Inhibitoren der zweiten Generation auf den Markt (Nilotinib und Dasatinib). Diese Tyrosinkinase Inhibitoren zeichnen sich durch ein breiteres Wirkungsspektrum aus, da sie eine Vielzahl an mutierten BCR/ABL Varianten inhibieren können. Lediglich die „Gatekeeper“-Mutation T315I kann von keinem der hier beschriebenen Inhibitoren überwunden werden (**Abb. 1.12**).⁴⁷

	Imatinib (nM)	Nilotinib (nM)	Dasatinib (nM)
BCR/ABL WT	260	13	0,8
Y253F	3475	125	1,4
Y253H	>6400	450	1,3
T315I	>6400	2000	200
M351T	880	15	1,1
H396R	1750	41	1,3

	Sensitiv		mittlere Sensitivität		Insensitiv
--	-----------------	--	------------------------------	--	-------------------

Abb. 1.12
TKI-Sensitivität vom BCR/ABL mit Mutationen in der Kinasedomäne

Die angezeigten Werte entsprechen dem jeweiligen IC₅₀ Wert der angezeigten Inhibitoren der ersten Generation (Imatinib) im Vergleich zu Inhibitoren der zweiten Generation (Nilotinib, Dasatinib) in BaF3 Zellen. *Abbildung aus O`Hare et al.*⁴⁷

Imatinib:

Sensitiv:

< 1000 nM

mittlere Sensitivität:

< 3000 nM

Insensitiv:

> 3000 nM

Nilotinib:

Sensitiv:

< 50 nM

mittlere Sensitivität:

< 500 nM

Insensitiv:

> 500 nM

Dasatinib:

Sensitiv:

< 3 nM

mittlere Sensitivität:

< 60 nM

Insensitiv:

> 60 nM

1.2.5.3 BCR/ABL unabhängige Resistenzen

Bei der Untersuchung von Resistenzen und deren zugrunde liegenden Mechanismen in der Ph⁺ Leukämie, müssen auch BCR/ABL unabhängige Resistenzmechanismen in Betracht gezogen werden. Ein bereits beschriebener Mechanismus erfolgt über die Aktivierung alternativer, SRC-Kinase gesteuerter, anti-apoptotischer Signalwege. Eine Deregulierung von SRC-Kinasen versetzt die maligne Zelle in die Position, eine Apoptose induzierende Behandlung mit Imatinib zu überleben.⁴⁸ Alternativ kann Imatinib-Resistenz durch die Überexpression von MDR2 erzielt werden. MDR2 ist eine Efflux Pumpe, die das intrazelluläre Level von Imatinib in den Zellen reduziert und somit deren Überleben gewährleistet.⁴⁹ Darüber hinaus gibt es Daten, die eine Beteiligung von NF- κ B bei der Vermittlung BCR/ABL unabhängiger Resistenz in Betracht ziehen.^{50,51}

Koyama et al. konnten zeigen, dass nicht nur die Mutation von alternativen Kinasen zu einer Imatinib-Resistenz führen kann, sondern auch die Deregulation ihrer antagonisierenden Phosphatasen.¹ Es ist für eine Vielzahl an Phosphatasen erwiesen, dass ihnen eine entscheidende Rolle beim Erhalt der verschiedenen Krebsarten zuteilwird.

1.3 Phosphatasen

Die intrazelluläre Signalweiterleitung ist ein hoch spezifischer Prozess, der schnell und exakt erfolgt. Dieser Mechanismus unterliegt strikten Kontroll- und Regulationsmechanismen. Proteinphosphorylierung ist eine der wichtigsten posttranskriptionellen Modifikationen, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, Proteinstabilität kontrolliert, Enzymaktivität reguliert und durch Kinasen weitergegeben wird. Etwa 30 % aller zellulären Proteine sind Phosphoproteine, die überwiegend an einem Serin- und/oder Threoninrest phosphoryliert werden.⁵² Lediglich 0,01 % bis 0,05 % der gesamten Phosphorylierungen erfolgen an einem Tyrosinrest.^{53,54} Nach Stimulierung durch Wachstumsfaktoren oder nach einer onkogenen Transformation erhöht sich der Gesamtanteil der Tyrosinphosphorylierungen um das 20-200-fache auf 1-2 %. Obwohl der Anteil der Tyrosinphosphorylierungen nur einen geringen Anteil der Gesamtphosphorylierungen ausmacht, hat man herausgefunden, dass gerade diese Phosphorylierungen Zellwachstum, Differenzierung, Metabolismus, Zellzyklus, Zell-Zell-Kommunikation sowie Migration, Transkription, Ionenkanäle, Immunantwort und das Überleben kontrollieren.⁵⁵⁻⁵⁷ Eine nicht der Norm entsprechende Tyrosinphosphorylierung wird häufig im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes oder Krebs, beschrieben.⁵³

Die Kinase vermittelten Phosphorylierungen müssen dynamisch und reversibel sein. Daher benötigt die Zelle Phosphatasen als Gegenspieler zu den Kinasen, um Enzymaktivitäten, die Transkription von Genen, Immunantworten und andere Prozesse aktiv regulieren zu können. Im humanen Genom werden etwa 500 Phosphatasen codiert, die ähnlich wie Kinasen bezüglich ihrer Substratspezifität in zwei große Klassen eingeteilt werden:

Zum einen die Serin- / Threoninphosphatasen und zum anderen die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs).⁵² 107 Tyrosinphosphatasen sind im menschlichen Genom codiert⁵⁸, die ihrerseits wiederum in drei Unterklassen eingeteilt werden:

- „Dual-spezifische Phosphatasen“
- „Nieder-Molekulare Phosphatasen“
- „klassische, phosphotyrosin spezifische Phosphatasen“⁵⁹⁻⁶¹

Die Unterklasse der „klassischen-PTPs“ wird nochmals unterteilt in intrazelluläre PTPs und Rezeptor-ähnliche PTPs.⁶² Die meisten Phosphatasen besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum, welches die Dephosphorylierungsreaktion katalysiert. Bei dieser Reaktion bindet der deprotonierte Schwefel des Cysteins über einen nukleophilen Angriff das eher positiv geladene Phosphat. Anschließend wird die Bindung zwischen der Phosphatgruppe und der beteiligten Aminosäure (Serin, Threonin oder Tyrosin) protoniert und somit aufgehoben. Die nun am Cystein gebundene Phosphogruppe wird in einem nächsten Schritt hydrolysiert und löst sich vom Cystein. Gleichzeitig wird das Cystein im aktiven Zentrum der Phosphatase wieder frei für die nächste Reaktion. Für diese Reaktion ist es wichtig, dass der Schwefel der Phosphatase deprotoniert ist.⁶³

Einige Tyrosinphosphatasen verfügen über kein Cystein, sondern besitzen ein konserviertes Histidin im aktiven Zentrum. In diesem Fall erfolgt der nukleophile Angriff über einen freien Stickstoff. Dieser kann im Vergleich zum Schwefel leichter deprotoniert werden, da es über Elektronenumlagerung und die Bildung von mesomeren Grenzstrukturen zu einer spontanen Abspaltung eines Protons kommen kann.⁶⁴

Die Phosphatase STS-1 (Suppressor of T-Cell Receptor Signaling-1) ist ein Mitglied einer Proteinfamilie, zu der bisher nur zwei Proteine gehören, STS-1 und STS-2. Die Bezeichnung STS basiert auf der Erkenntnis, dass ein Knockout beider Proteine in Mäusen zu einer Hyperreaktivierung von T-Zellen führt.⁶⁵ Da verschiedene Gruppen zeitgleich dieses Protein entdeckt und beschrieben haben, sind die beiden Proteine auch als TULA 1 (T-Cell Ubiquitin LigAnd) und TULA 2 bekannt.⁶⁶ Beide Proteine werden von einem Gen codiert, das die Bezeichnung UBASH3 trägt. Dieser Name setzt sich zusammen aus zwei Domänen, die zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation bereits bekannt waren. Dabei handelte es sich um eine Ubiquitin assoziierte (UBA) Domäne und eine SRC-Homology3 (SH3) Domäne.⁶⁷ Sowohl STS-1 (TULA2, UBASH3b) als auch STS-2 (TULA1, UBASH3a) sind zu 45 % identisch und ähneln sich zu 60 %.⁶⁸ Während STS-1 jedoch ein ubiquitär exprimiertes Protein ist, wird STS-2 lediglich in lymphoiden Zellen exprimiert.^{65,69}

Beide Proteine setzen sich aus folgenden drei Domänen zusammen:

N-Terminal befindet sich die bereits erwähnte UBA Domäne, mit der STS-1 und STS-2 Proteine an den konservierten hydrophoben Teil des Ubiquitins und somit auch an ubiquitinierte Proteine binden können.^{66,70} In der Mitte des Proteins liegt die 60 Aminosäure-lange SH3 Domäne, die das Protein in die Lage versetzt, an prolinreiche Sequenzen anderer Proteine zu binden. C-Terminal befindet sich die Phosphoglycerat Mutase (PGM) Domäne, die sowohl eine Dimerisierung der STS Proteine ermöglicht als auch eine Phosphataseaktivität vermittelt (**Abb. 1.13**).^{3,69}

Die Untersuchung der Phosphataseaktivität von STS-1 und STS-2 zeigte, dass STS-1 eine Aktivität vergleichbar zu bekannten Tyrosinphosphatasen aufweist, wohingegen eine Phosphataseaktivität von STS-2 unter gleichen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte.^{4,71} Eine Analyse der Enzymkinetik beider Proteine zeigt einen ca. 2000 – 9000-fach höheren Wert für k_{cat} und k_{cat}/K_m bei STS-1 im Vergleich zu STS-2.^{3,68} Da einige Histidinphosphatasen nur in einem sauren Milieu arbeiten, wurde die Kinaseaktivität von STS-2 bei einem pH-Wert von 5 untersucht. Während die Kinaseaktivität von STS-1 bei pH 5 leicht zurückgeht, steigt sie bei STS-2 um das 10-fache.⁶⁸ Trotz dieser sehr geringen Phosphataseaktivität von STS-2 konnte ZAP-70 als ein Protein identifiziert werden, das von STS-2 in T-Zellen dephosphoryliert wird.⁷² Aufgrund der Struktur der PGM-Domäne, die sowohl bei STS-1 als auch bei STS-2 im aktiven Zentrum der Phosphatase zwei konservierte Histidine aufweist, welche die Phosphataseaktivität vermitteln, zählen beide Proteine zur Klasse der zuvor beschriebenen Histidin-Phosphatasen.^{64,73}

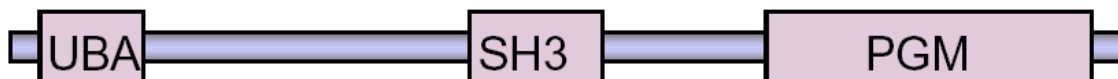


Abb. 1.13
Die Domänenstruktur von STS-1

Die Phosphatase STS-1 besteht aus 649 Aminosäuren und besitzt drei verschiedene Domänen. N-Terminal befindet sich eine Ubiquitin assoziierte Domäne (UBA-Domäne) mit dem das Protein ubiquitinierte Proteine binden kann. Im mittleren Bereich von STS-1 ist eine SH3- (SRC-Homology 3) Domäne lokalisiert. Mittels dieser 60 Aminosäure-langen Domäne kann das Protein an prolinreiche Sequenzen anderer Proteine wie z. B. c-CBL binden. N-Terminal befindet sich die die PGM- (Phosphoglyceratmutase) Domäne, die sowohl eine Dimerisierung des Proteins ermöglicht, als auch die Phosphataseaktivität vermittelt. *Abbildung verändert nach Raguz et al.*⁷¹

Im Rahmen der Charakterisierung dieser neuen Proteinfamilie konnte für STS-2 eine SH3-Domäne vermittelte Interaktion mit der E3-Ligase c-Cbl gezeigt werden.^{66,74-76} Parallel fanden Carpino et al. heraus, dass STS-1 an eine der wichtigsten Autophosphorylierungsstellen der JAK2 Kinase bindet.⁶⁹ Eine Vielzahl der bisherigen Publikationen beschreiben die Interaktionen mit membranständigen Rezeptoren, wie dem T-Zell-Rezeptor oder auch dem EGF- (Epidermal growth factor) Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass STS-1 und STS-2 mittels c-Cbl an die aktiven Rezeptoren transportiert werden. Beide Proteine unterbinden die Internalisierung der aktivierten und phosphorylierten Rezeptoren. STS-1 verhindert die Internalisierung, indem es die aktive Kinase mittels der PGM-Domäne vermittelten Phosphataseaktivität dephosphoryliert. Im Gegensatz dazu verhindert STS-2 aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität an die jeweiligen aktivierten Membranrezeptoren die Bindung von Proteinen (Eps15, epsin, Hrs), die bei der Endozytose aktivierter und daher ubiquitinerter Rezeptoren beteiligt sind. Als Folge davon sind membranständige Kinasen weiterhin aktiv, wenn STS-2 ihre Internalisierung verhindert.⁷¹ Ein weiterer viel beschriebener Interaktionspartner von STS-1 ist die Tyrosinkinase Syk.^{4,77,78} Diese zählt zur Familie der SRC-Kinasen und hatte eine Verbindung zum PI3K-Signalweg. Syk ist keine membranständige Kinase, wird aber dennoch von STS-1 dephosphoryliert.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Lonza Ltd. (Basel, Schweiz), AppliChem GmbH (Darmstadt), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Invitrogen Ltd. (Gibco®) (Paisley, Großbritannien), Mallinckrodt Baker, Inc. (J.T. Baker®) (Phillipsburg, NJ, USA), Merck (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Co. (Fluka, Riedel-de Haën®) (St. Louis, MO, USA) in p.A.-Qualität bezogen und eingesetzt.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tab. 2.1
Übersicht der verwendeten Puffer/Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzungen/Herstellung
6 x DNS-Ladepuffer	0,25 %(w/v) Bromphenolblau, 0,25 %(w/v) Xylen Cyanol FF, 30 %(v/v) Glycerol
10 x Ponceau S	2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Schwefelsalicylsäure, auf 100 ml mit Wasser auffüllen
50 x TAE-Puffer, 1 L	242 g Tris-Base, 51 ml Eisessig, 50 µM EDTA
Blocking Lösung	5 %(w/v) Magermilchpulver in TBST
Aktiviertes Natriumorthovanadat	220 mM Na ₃ VO ₄ in Wasser herstellen, pH 9,0; aufkochen bis die Lösung farblos wird, abkühlen auf RT, wieder pH 9,0 einstellen, wiederholen bis der pH-Wert sich nach dem Abkühlen nicht mehr ändert
ECL Lösung 1	2,5 mM Luminol, 0,44 ml p-Kumarinsäure (90 mM in DMSO), 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5; auf 100 ml mit Wasser auffüllen
ECL Lösung 2	64 µl 30 % H ₂ O ₂ , 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,5; auf 100 ml mit Wasser auffüllen
IF-AK Puffer	1 %(w/v) Magermilchpulver in TBS mit 0,2 %(v/v) Triton X-100
IF-Blocking Puffer	5 %(w/v) Magermilchpulver in TBS mit 0,2 %(v/v) Triton X-100

Puffer/Lösungen	Zusammensetzungen/Herstellung
Mowiol 4-88	20 g Mowiol 4-88 in 80 ml PBS über Nacht bei RT rühren, 40 ml Glycerin zugeben, wieder über Nacht bei RT rühren; Zentrifugation für 1 h bei 10000 rpm; Überstand abnehmen und nach Zugabe von 2 nM NaN_3 im Dunkeln bei 4 °C lagern.
PBST	0,1 % Tween in PBS
TBS	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4
TBST	0,1 % Tween in TBS
Lysis Puffer	50 ml 1 M HEPES, 30 ml 5 M NaCl, 2 ml 0,5M EDTA, 2 ml 0,5 M EGTA, 50 ml 20 % Triton X100, 100 ml Glycerol, 25 ml 1 M NaF, 1 ml 10 mM ZnCl_2 ; pH-Wert einstellen: 7,5; add to 1 Liter; Protease und Phosphatase-Inhibitoren werden frisch hinzugegeben

Tab. 2.2
Liste der verwendeten Kits, gebrauchsfertigen Materialien und Lösungen

Kits und Materialien	Anbieter
0,2 µm Nitrocellulose Membranen	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
0,2 µm PVDF Membranen, Invitrolon™	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Ampecylin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Gene Ruler DNS Ladder Mix	Fermentas GmbH (St.Leon-Rot)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10.000 x)	Biotium, Inc. (Hayward, CA, USA)
Gateway® LR Clonase® Enzym Mix	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Gateway® BP Clonase® Enzym Mix	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Gentamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Immunosorb A	Medicago (Schweden)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
NucleoBond® PC 500 MAXIprep Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH&Co. KG (Düren)
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 x)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Transfer Buffer (20 x)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Tris-Acetat Running Buffer (20 x)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Novex Bis-Tris Pre-Cast Gels	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
NuPAGE® Novex Tris-Acetate Pre-Cast Gels	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Precision Plus Protein Std, dual color	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
RC DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
SimplyBlue SafeStain	Invitrogen GmbH, (Darmstadt)
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL)
TaqMan® Gene Expression Assay Hs00153418_m1	Applied Biosystems GmbH (Darmstadt)
TaqMan® Gene Expression Assay Hs00262721_m1	Applied Biosystems GmbH (Darmstadt)

2.1.3 Bakterienstämme

Tab. 2.3

Verwendete *Escherichia coli* (*E. Coli*) Stämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
DH5a	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-	Plasmidamplifikation
HB101	F- mcrB mrr hsdS20(rB- mB-) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44 λ-	Plasmidamplifikation

2.1.4 Medien

Tab. 2.4

Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

Medium/Zusätze	Anbieter
DMEM Medium	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Opti-MEM® I Reduced Serum Media	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Trypsin EDTA (10 x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
murines IL-3	Pepru Tech (Rocky Hill, NJ, USA)
Imatinib	Novartis (Basel, Schweiz)
L-Glutamin (200 nM)	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	GIBCO®, Invitrogen GmbH (Darmstadt)

2.1.5 Zelllinien

Tab. 2.5
Verwendete murine und humane Zellmodelle

Zelllinie	Beschreibung, Referenz
Sup B15 (ACC 389)	Humane pro B-Zell Leukämie; hergestellt aus dem Knochenmark eines 9-Jahre alten Jungen mit einer akuten lymphatischen Leukämie (pro B-ALL) im zweiten Relaps 1984, diese ALL trägt die m-BCR Variante des BCR/ABL Fusionsgens (e1-a2). ^{79,80}
Sup B15 RT	Tyrosin Kinase Inhibitor resistente Variante der Sup B15 Zelllinie; Resistenz gegenüber Imatinib bis zu 5 µM.
K562 (ACC 10)	Humane CML in der Blastenkrise, 1970 etabliert aus dem Pleuraerguss einer 53-jährigen Frau mit einer CML in der Blastenkrise, Zellen produzieren Hämoglobin, die Zellen tragen das BCR/ABL Fusionsgen (b3-a2). ⁸¹⁻⁸³
Nalm6 (ACC 128)	Humane pro B-Zelle; 1976 etabliert aus dem peripheren Blut eines 19 jährigen Mannes mit ALL im Relaps. ⁸⁴
HEK 293 T (ACC 305)	Humane embryonale Nierenzellen, hoch transfezierbare Zelllinie der humanen primären embryonalen Nierenzelllinie 293, die eine temperatursensitive Mutante des SV40 großen T-Antigens enthält; die Expression dieses Antigens erfolgt nur bei 33 und nicht bei 40 °C. ⁸⁵⁻⁸⁷
293 T Phoenix	Modifizierte 293T Zelllinie, die in der Lage ist ecotrophe oder amphotrophe Verpackungsproteine zu exprimieren; dienen der Herstellung von ecotrophen oder amphotrophen Viren Ref.: Nolan Lab, Stanford, www.stanford.edu/group/nolan/index.html

Zelllinie	Beschreibung, Referenz
HeLa (ACC 57)	Humaner Gebärmutterhalskrebs, 1951 etabliert aus dem epitheloiden Gebärmutterhalskrebs einer 31 Jahre alten Frau. ⁸⁸
BaF3 (ACC 300)	Maus pro B-Zelle; IL-3 abhängige murine pro B-Zelle etabliert aus peripherem Blut von BALB/c Mäusen. ^{89,90}
HEK-293 (ACC 305)	Humane embryonale Nierenzellen, die mittels Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. ⁹¹

2.1.6 Transfektions- und Infektionsreagenzien

Tab. 2.6
Verwendete Reagenzien zur Transfektion und Infektion von Zellen

Reagenzien	Anbieter/Zusammensetzung
2 x HBS	1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 280 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 6,95, steril
CaCl ₂ -Puffer	50 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, steril
Chloroquin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Polybrene	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyfect	Qiagen (Hilden)
RetroNectin®	Takara Bio Inc. (Japan)
Zell-Einfriermedium I	RPMI 1640 Medium, 20 % DMSO
Zell-Einfriermedium II	RPMI 1640 Medium, 20 % FCS

2.1.7 Antikörper

Tab. 2.7
Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

(WB: Western-Blot; IF: Immunfluoreszenz; IP: Immunopräzipitation; FACS: Durchflusszytometrie)

Antikörper	Spezies	Konjugat	Applikation	Anbieter
c-Abl (Ab-3)	Maus	-	WB, IP, IF	EMD Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)
α-Tubulin (Ab-4)	Maus	-	WB	Lab Vision/NeoMarkers Fremont, CA, USA
β-Aktin (AC-40)	Maus	-	WB	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
γ-Tubulin (GTU-88)	Maus	-	IF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
CD 4	Maus	FITC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
CD 8	Maus	PE	FACS	
CD 10	Maus	FITC	FACS	
CD 13	Maus	PE	FACS	
CD 19	Maus	PE	FACS	
CD 22	Maus	PE	FACS	
CD 33	Maus	PE	FACS	
CD 34	Maus	FITC	FACS	
CD 38	Maus	FITC	FACS	
CD 79	Maus	PE	FACS	
CD 90	Maus	FITC	FACS	
CD 117	Maus	PE	FACS	
CD 133	Maus	FITC	FACS	
CDK4 (DCS156)	Maus	-	WB	Cell Signaling Technology Inc.
CDK6 (DCS83)	Maus	-	WB	(Beverly, MA, USA)
Cyclin D3 (DCS22)	Maus	-	WB, IHC-P	
Cyclin E2	Maus	-	WB	
FLAG M2	Maus	-	WB, IP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
JAK2 (D2E12)	Kaninchen	-	WB, IP, IF, FACS	Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)

Antikörper	Spezies	Konjugat	Applikation	Anbieter
MPO	Maus	FITC	FACS	BD Bioscience, Heidelberg
p15	Kaninchen	-	WB, FACS	Cell Signaling Technology Inc.
p21 (DCS60)	Maus	-	WB, IP	(Beverly, MA, USA)
p27	Kaninchen	-	WB, IP	Cell Signaling Technology Inc.
Phospho-c-ABL (Tyr 245) (73E5)	Kaninchen	-	WB	(Beverly, MA, USA)
Phospho-c-ABL (Tyr 412) (247C7)	Kaninchen	-	WB	
Phospho-BCR (Tyr 177)	Kaninchen	-	FACS, WB	
p-JAK2 (Tyr1007/1008) (C80C3)	Kaninchen	-	WB	
p-STAT5 (Tyr 694) (14H2)	Maus	-	WB, IP	
p-Syk (Tyr525/526) (C87C1)	Kaninchen	-	WB, IP	
PARP	Kaninchen	-	WB	
p-Tyr (pY99)	Maus	-	WB, IF, IP	Santa Cruz Biotechnology, Inc
RAD 51 (3C10)	Maus	-	WB, IP	(Santa Cruz, CA, USA)
STAT5 (C-17)	Kaninchen	-	WB, IF, IP	Rockland (Gilbertsville, PA, USA)
STS-1	Kaninchen	-	WB, IP, IF	
Anti-Goat	Kaninchen	HRP	2nd WB	Jackson
Anti-Rabbit	Ziege	HRP	2nd WB	ImmunoResearch
Anti- Mouse	Ziege	HRP	2nd WB	(West Grove, PA, USA)
Anti-Rabbit	Ziege	Alexa Fluor® 488	2nd IF	Invitrogen GmbH, (Darmstadt)
Anti- Mouse	Ziege	Alexa Fluor® 488	2nd IF	
Anti-Rabbit	Ziege	Alexa Fluor® 594	2nd IF	
Anti- Mouse	Ziege	Alexa Fluor® 594	2nd IF	

2.1.8 Vektoren und cDNS

Tab. 2.8
Verwendete Vektoren

Plasmid	Quelle/Referenz
paulo Gateway	92
paulo BCR/ABL p185	92,93
paulo BCR/ABL p185 T315I	92,93
paulo BCR/ABL p210	92,93
paulo BCR	92,93
paulo BCC/ABL	92,93
paulo #ABL	92,93
pinco Gateway	94
pinco FLAG-STS-1	Im Labor hergestellt
pcDNA3	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
pcDNA3 FLAG-STS-1	71
pENTR1A	Invitrogen GmbH (Darmstadt)

Tab. 2.9
Verwendete cDNS

cDNS	Offizielles Gensymbol	GenBank Eintrag
BCR/ABL p185 <i>homo sapiens</i>		
Suppressor of T-Cell Receptor Signaling (STS-1) <i>homo sapiens</i>	UBASH3B	NM_032873
Janus kinase 2 <i>homo sapiens</i>	JAK2	NM_004972

2.1.9 Oligonukleotide

Tab. 2.10
Oligonukleotide und Sonden für Real-Time PCRs

Oligonukleotide/Sonde mit Farbstoff	Quelle
fw-S18 rev-S18 Probe-18S (FAM-TAMRA)	war im Labor vorhanden; Eurogentec; 18S rRNS Control kit (FAM-TAMRA); Ref.: RT-CKFT-18S

Tab. 2.11
Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer	Sequenz
T7 Promotor (FwP)	TATACGACTCACTATAGG
SP6 Promotor (RevP)	GATATCACAGTGGATTTAC
STS-1 (AA1871 FwP)	TTACCAAGGCTGATGAAT
STS-1 (AA2011 RevP)	TGAGGAGAATGATAGTAGA
JAK2 fw	war im Labor vorhanden
JAK2 rev	war im Labor vorhanden
BCR/ABL fw	war im Labor vorhanden
BCR/ABL rev	war im Labor vorhanden

Tab. 2.12
Verwendete Gerätschaften

Geräte	Hersteller
FACS SCAN	BD Bioscience (Heidelberg)
FACS CANTO	
FluorChem®FC2	Cell Biosciences, Inc. (Santa Clara, Ca, USA)
DNA Engine OPTICON2	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
MyCycler thermal cycler	
Tecan Spectrafluor Plus	Tecan Deutschland (Crailsheim)
LSM 510	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
Axioplan2 Imaging	

2.1.10 Software

Tab. 2.13
Verwendete Software

Programme	Firma/Hersteller
Office 2003/2007	Microsoft Cooperation
AlphaEase® FC Software Version 6.0.2	Alpha Innotech Corporation
FCS Express Version 3	De Novo Software
Clone Manager Professional Suite	Scientific & Educational Software
GIMP 2.6.11	GNU Image Manipulation Program
Axio Vision 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
WinMDI Version 2.8	Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry Application
End Note® Windows Version 9	Thomson ResearchSoft
iHOP	http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/ ^{95,96}
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
STRING 9.0	http://string.embl.de/ ^{97,98}
PhosphoSitePlus®	http://www.phosphosite.org/homeAction.do Cell Signaling Technology, Inc. ^{99,100}
Bioinformatic Harvester IV	http://harvester.fzk.de/harvester/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/ ¹⁰¹
UbPred: predictor of protein ubiquitination sites	http://www.ubpred.org/index.html ¹⁰²
KEGG PATHWAY Database	http://www.genome.jp/kegg/pathway.html Kanehisa Laboratories

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung transformationskompetenter *Escherichia coli* erfolgte für die Stämme DH5 α , BL21 und DB3.1 nach der Calciumchlorid Methode. Hierzu wurde eine 400 mL LB-Kultur angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur für 10 min auf Eis gestellt, um das Bakterienwachstum zu stoppen. Die Suspension wurde zentrifugiert (4 °C, 15 min, 3500 rpm), das Zellpellet vorsichtig in 160 mL CaCl₂-Puffer aufgenommen und 25 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die chemokompetenten Bakterien in 11 mL CaCl₂-Puffer resuspendiert und mit 2 mL Glycerol versetzt. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -8 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.2 Transformation von kompetenten Bakterienzellen

50 μ L chemokompetente *E. Colis* wurden mit der Plasmid-DNS 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min, 42 °C) erfolgte die Zugabe von 500 μ L LB-Medium. Die Bakteriensuspension wurde für 60 min bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt, anschließend auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Plasmidpräparation aus Bakterienzellen

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des NucleoBond® PC 500 MAXIprep Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren) oder des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen; Hilden) gemäß Herstellerangaben. Die gewonnene DNS wurde im Anschluss verdaut und im Agarosegel aufgetrennt, um Verunreinigungen und Degradation auszuschließen und die aufgereinigten Plasmide zu charakterisieren.

2.2.1.4 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter anderem aus dem pcDNA3 Flag STS-1 Vektor der kodierende Bereich für STS-1 für die Gatewayrekombination amplifiziert. Um die Fehlerrate bei der Amplifikation so gering wie möglich zu halten, wurde die Phusion DNS Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) eingesetzt (Fehlerrate von $4,4 \times 10^{-7}$). Das Konstrukt wurde im Anschluss an die Klonierung sequenziert.

Folgende Standardbedingungen wurden für einen 20 µL PCR Ansatz gewählt:

DNS Template	10 ng
5 X Phusion HF Puffer	4 µL
10 mM dNTPs	0,4 µL
fw-Primer, 10 µM	1 µL
rev-Primer, 10 µM	1 µL
Phusion Polymerase (2 U/µL)	0,2 µL
Wasser aufgefüllt auf	20 µL

Die PCR wurde in einem Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg) nach dem in **Tab. 2.14** beschriebenen allgemeinen Programm durchgeführt.

Tab. 2.14
Programm für eine Standard PCR

Schritt	Temperatur/°C	Dauer/min:s	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	0:30	1
Denaturierung	98	0:10	
Primeranlagerung	58	0:10	30
Elongation	72	0:30 / 1 kb	
Finale Elongation	72	10:00	1
Lagerung	4	∞	1

Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Anlagerungstemperatur von 58-60 °C aufwiesen. Die Berechnung der Temperatur erfolgte anhand folgender Näherungsformel für die Schmelztemperatur (T_m) doppelsträngiger DNS:

$$T_m = 2 \text{ °C} \times (A + T) + 4 \text{ °C} \times (C + G).$$

2.2.1.5 DNS Sequenzierung

Die DNS Sequenzierung wurde von SeqLab Sequence Laboratories (Göttingen) als Extended HotShot Reaktion übernommen. Hierzu wurden ca. 600 ng Plasmid DNS und 20 pmol Sequenzierprimer in einem 7 µL Maßstab gemischt und eingesendet. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Software BioEdit Sequence Alignment Editor.¹⁰³

2.2.1.6 Gatewayklonierung

Die Gateway® Technologie (Invitrogen GmbH, Darmstadt) basiert auf dem sequenzspezifischen DNS Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ. Es ermöglicht die unidirektionale Klonierung eines DNS Fragments von einem sogenannten Entry Vektor (Entry Clone) in eine Vielzahl von Destination Vektoren ohne weitere Restriktions- und Ligationsschritte.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Da Entry und Destination Plasmide unterschiedliche Antibiotikaresistenzen vermitteln und Vektoren, die keine Rekombinasereaktion eingehen, das ccdB Gen

tragen, welches das Wachstum von *E. coli* Zellen inhibiert^{107,108}, zeichnet sich dieses System zudem durch seine hohe Effizienz aus.

Der Ansatz für eine Rekombinasereaktion wurde wie folgt zusammengesetzt:

Entry Clone	300 ng
Destination Vektor	300 ng
5 x LR Clonase Reaktionspuffer	2 µL
Wasser aufgefüllt auf	9 µL
LR Clonase® Enzym Mix	1 µL

Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h und 5 µL des Ansatzes wurden für die Transformation in *E. coli DH5α* eingesetzt.

2.2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden DNS Fragmente aus PCR Reaktionen oder Restriktionsverdauen charakterisiert und isoliert. Die Gele wurden mit 0,8-2 % (w/v) Agarose in TAE - Puffer hergestellt und die Proben sowie der DNS Standard (GeneRuler™ 1kb Ladder Plus, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die DNS wurde mit GelRed™ (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) oder Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht analysiert.

2.2.1.8 Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarosegelen

DNS Fragmente, die für die Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden per Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNS wurde in 10 µL Wasser von der Säule eluiert.

2.2.1.9 RNS Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNS von Suspensionszellen wurden 1×10^7 Zellen pelletiert (5 min, 400 x g, Raumtemperatur), in 1 mL TRIzol® Reagenz (Invitrogen GmbH, Darmstadt) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Chloroform wurden die Ansätze für ca. 15 sek geschüttelt, erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde zusammen mit 500 µL Isopropanol gemischt und die RNS für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Durch Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 10 min) wurde die RNS pelletiert, zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in mind. 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 58 °C gelöst.

2.2.1.10 DNase Behandlung und reverse Transkription

Vor der reversen Transkription wurde die eingesetzte RNS einer DNase Behandlung unterworfen, um eventuelle DNS Kontamination auszuschließen. Dazu wurde 1 µg RNS mit 1 µL DNase I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) entsprechend Herstellerangaben inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 50 mM EDTA und Erhitzen gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde direkt zur reversen Transkription mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNS Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die cDNS wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll mit random Primern synthetisiert und die cDNS Lösung am Ende 1:5 mit DNase freien Wasser verdünnt. Sie wurde direkt für die Real-Time PCR eingesetzt.

2.2.1.11 Real-Time PCR

Real-Time PCR ermöglicht die relative Quantifizierung von cDNS durch sequenzspezifische Primer und lässt somit direkt Rückschlüsse auf das Expressionslevel der anfänglich eingesetzten mRNA zu. Das Prinzip der Real-Time PCR basiert entweder auf der Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen in den DNS Doppelstrang (SYBR Green Format) oder der Freisetzung fluoreszenzmarkierter Nukleotide während der Amplifikation (TaqMan Probe Format). Die Messung der Fluoreszenzsignale erfolgt simultan und wird als Amplifikationskurve an einem angeschlossenen Computer dargestellt. Bei der Messung mit TaqMan Probe Format wird neben zwei Primern eine spezielle Sonde (Probe) eingesetzt, die zwischen den beiden Primern an die DNS Matrize bindet. Die Sonde trägt am 5'-Ende den fluoreszierenden Reporterfarbstoff 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende den Quencher-Farbstoff 6-Carboxytetramethyl-Rhodamin (TAMRA), der solange er sich in räumlicher Nähe zum Reporterfarbstoff befindet, dessen Fluoreszenz absorbiert. In der Extensionsphase der PCR wird die Sonde von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNS Polymerase abgebaut, wodurch Reporter- und Quencher-Farbstoff freigesetzt werden. Im Fall des SYBR Green Formats enthalten die Reaktionsansätze Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green I, die sich in die kleine Furche der DNS einlagern können, wodurch die von ihnen emittierte Fluoreszenz bei identischer Anregungsintensität vielfach verstärkt wird. In beiden Fällen, SYBR Green und TaqMan Probe Format, ist die Signalstärke somit direkt proportional zur Anzahl vorhandener Doppelstränge.

Tab. 2.15
Reaktionsansätze für die Real-Time PCR

Reagenzien	TaqMan Probe Format	SYBR Green Format
2 x MasterMix	6,25 µL	6,25 µL
Fw-Primer, 10 µM	0,3 µL	0,3 µL
Rev-Primer, 10 µM	0,3 µL	0,3 µL
Sonde, 5 µM	0,3 µL	-
Wasser	2,85 µL	3,15 µL

Zur relativen Quantifizierung verschiedener cDNS wurden die in **Tab. 2.15** beschriebenen 10 µL Ansätze zusammengesetzt und in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Als MasterMix wurden Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) und Maxima™ Probe/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet. Nach Zugabe von 2,5 µL cDNS Lösung wurden die Proben am ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gegen eine Verdünnungsreihe gemessen und mit Hilfe der zugehörigen Software (Sequence Detection System 2.3) ausgewertet. Als endogene Referenz wurde die Expression der ribosomalen Untereinheit S18 gemessen. Das Standard Real-Time PCR Programm ist in **Tab. 2.16** dargestellt. Da die zu amplifizierende Sequenz nur wenige Nukleotide umfasste, wurde bei der Erstellung des Programms auf einen zusätzlichen Extensionsschritt bei 72 °C verzichtet.

Tab. 2.16
Standardprogramm für die Real-Time PCR

Schritt	Temperatur/°C	Dauer/min:s	Zyklen
UDG Vorbehandlung	50	2:00	1
Initiale Denaturierung	95	10:00	1
Denaturierung	95	0:15	40
Primeranlagerung	60	1:00	40

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Eukaryotische Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil kultiviert. Falls nicht anders angegeben wurden die Zellen für 5 min bei 400 * g und 4 °C bzw. Raumtemperatur zentrifugiert. Alle sterilen Arbeiten wurden an der Cleanbench Herasafe (Heraeus Sepatech, Osterode) durchgeführt.

2.2.2.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS (15 % (v/v) FCS bei Sup B15 WT und Sup B15 RT), 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Das Medium der IL-3 abhängig wachsenden Zelllinie BaF3 enthielt zusätzlich 10 ng/ml IL-3. Die Zellen wurden in einer Dichte von 0,1 - 1 x 10⁶/mL kultiviert. Dem Medium der Sup B15 RT Zellen wurde zusätzlich 1 mM Imatinib zugefügt.

2.2.2.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FCS, 0,1 mg/mL Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin kultiviert. Um eine Kultur zu expandieren oder zu splitten, wurde das Medium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit einer 1 x Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im zehnfachen Volumen DMEM gewaschen und anschließend in DMEM resuspendiert und neu ausgesät.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Cryokonservierung von Zelllinien wurden 1 - 1,5x10⁷ Zellen zentrifugiert, der Überstand vollständig verworfen und das Pellet in 1 mL Einfriermedium (RPMI mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 10 % (v/v) DMSO) aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und für mindestens 48 h in einem

Cryoeinfriergerät bei -80 °C gelagert. Für die langfristige Lagerung der Zellen wurden die Cryoröhrchen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Gefrierkulturen von eukaryotischen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 mL des entsprechenden Zellkulturmediums aufgenommen, zentrifugiert und die Zellen in frischem Medium ausgesät.

2.2.2.4 Calciumphosphat Transfektion

18 h vor der Transfektion wurden $2,5-3 \times 10^6$ 293T Zellen auf einer 10 cm Petrischale ausgesät, so dass sie am darauf folgenden Tag eine Konfluenz von 70 % erreicht haben. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurden 5 µg Plasmid DNS in 438 µL Wasser und 62 µL 2 M CaCl₂ Lösung zusammengefügt. Unter kräftigem Mischen wurden tropfenweise 500 µL 2 x HBS dazugegeben. Die Bildung der Calciumphosphat/DNS Präzipitate erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 10-15 min wurde 1 mL des Präzipitats auf die Zellen gegeben und für maximal 30min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 9 ml des 37 °C warmen Mediums mit 2,5 µl 0,1 M Chloroquin vermischt und auf die Zellen gegeben. Nach 6-8 h Inkubation wurde das Medium durch Chloroquin freies Medium ersetzt.

2.2.2.5 Transfektion mit Transfektionsreagenzien

293T Zellen wurden ebenfalls mit Polyfect (Qiagen) sowie Lipofectamin™ 2000 (Invitrogen) transient transfiziert. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen nach Herstellerangaben. Bei Polyfect handelt es sich um ein Transfektionsreagenz, das Dendrimere um die DNS bildet und über die Bindung an negativ geladene Membranrezeptoren in die Zelle aufgenommen wird. Des Weiteren ist Polyfect in der Lage im Lysosom die pH-abhängige Enzymaktivität lysosomaler Nukleasen zu inhibieren. Dadurch kann die DNS unbeschädigt in den Kern gelangen. Dem Tranfektionsreagenz Lipofectamin™ 2000 liegt das Prinzip der Lipofektion zugrunde. Hierbei wird die DNS in ein Lumen unilamellarer Phospholipidvesikel eingeschlossen, die den Transport durch die Zellmembran ermöglichen.

2.2.2.6 Herstellung retroviraler Überstände

Plat-E oder 293T Phoenix Zellen wurden entsprechend der Calciumphosphat Methode mit einem retroviralen Expressionsvektor transfiziert. 24-30 h nach der Transfektion wurde der Überstand verworfen und 6ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium (erster retroviraler Überstand) abgenommen, sterilfiltriert (Porengröße des Filters: 0,45 µm) und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden für weitere 24 h in 5,5 ml frischem DMEM kultiviert, bevor der zweite retrovirale Überstand genommen, sterilfiltriert und ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.7 Infektion mit retroviralen Überständen

Für die Infektion von murinen BaF3 Zellen wurde die entsprechende Anzahl an Kammern einer 24-Loch-Platte für nicht-Gewebe Kulturen mit 200 µl Retronektin beschichtet und über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Retronektin entfernt, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit einer 2 % BSA/PBS Lösung blockiert. Nach der Inkubation wurde die 2 % BSA/PBS Lösung entfernt und die Kammern erneut mit 500 µl gewaschen. Anschließend wurden 250 µl eines retroviralen Überstandes in die präparierten Kammern gegeben und die Platte für 15 min bei 4000 rpm und 15 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wird bis zu dreimal noch wiederholt. Anschließend werden die Kammern einmal gewaschen und etwa 80.000 Zellen in einem entsprechenden Volumen an frischem RPMI Medium mit IL-3 auf die Viren gegeben. Eine Zugabe von Polybrene ist nicht notwendig, kann aber in einer Konzentration von 4 µg/ml verwendet werden. Polybrene haltiges Medium muss nach spätestens 4-5 h durch frisches Medium ausgetauscht werden. Danach erfolgt eine Inkubation der Zellen für 1-2 Tage und eine anschließende Überprüfung der Infektionseffizienz.

2.2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen (FACS Analyse)

Die Durchflusszytometrie fand Anwendung, um einerseits die Expression des grün, fluoreszierenden Proteins (GFP) oder von GFP gekoppelten Proteinen, zum Beispiel nach retroviraler Infektion, zu messen und um andererseits vergleichend die Oberflächenexpression von Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen zu analysieren. Die Messungen erfolgten entweder am FACScan oder FACS Canto (Becton Dickinson, Heidelberg). GFP exprimierende Zellen wurden aus der Kultur entnommen und direkt analysiert. Oberflächenmoleküle wurden zunächst mit den angegebenen Antikörpern gefärbt und dann gegen eine Isotypenkontrolle gemessen.

2.2.2.9 Zytozentrifugation

Adhärenz Zellen können auf Deckgläschen wachsen und so für verschiedene mikroskopische Analysen bereitgestellt werden. Im Fall von Suspensionszellen ist dies nicht möglich. Sie können jedoch durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht werden, wodurch die Zellen als Einzelschicht vorliegen, während das Medium über ein Filterpapier abgesaugt wird. Die zu untersuchenden Suspensionszellen wurden in Abhängigkeit von der Zellgröße in einer Dichte von $0,5 - 1 \times 10^6$ / mL in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS aufgenommen. 100-200 μ L der Suspension wurden für die Zytozentrifugation in der Shandon Cytospin 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingesetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 500-1000 rpm auf Objektträger zentrifugiert und anschließend für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Immunfluoreszenzfärbung

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Suspensionszellen wurden diese mittels Zytozentrifugation für die Färbung vorbereitet. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd (in PBS) fixiert, kurz mit TBS gewaschen und dann für 45 min in IF-Blocking Puffer permeabilisiert und geblockt. Die Zellen wurden wieder kurz mit TBS gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper in IF-AK Puffer über Nacht bei 4 °C gefärbt. Die Proben wurden drei Mal für 15 min mit TBS gewaschen, mit einem Alexa Fluor 488 (grün) oder Alexa Fluor 594 (rot) gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut drei Mal mit TBS und einmal mit Wasser gewaschen. Mit Hilfe von Hoechst 33342 (0,1 mM in Wasser) wurde die DNS gefärbt und die Zellen mittels Mowiol 4-88 eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von mind. 12 h bei 4 °C wurden die Immunfluoreszenzfärbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen) bei tausendfacher Vergrößerung betrachtet und fotografiert. Alternativ wurden die Präparate unter einem LSM510 ausgewertet, um eine bessere Auflösung zu erzielen.

2.2.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen abzentrifugiert, das Pellet einmal mit PBS gewaschen und in 100 µl Lysispuffer pro 8×10^6 Zellen resuspendiert. Der Puffer wurde zuvor mit Protease- und Phosphataseinhibitoren komplementiert: Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich; Taufkirchen) nach Herstellerangaben und 1 mM Natriumorthovanadat. Die Proben wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 – 40 min bei 4 °C und mind. 12000 x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde bei -80 °C eingefroren oder direkt für weitere Experimente verwendet. Proteinlysate, die für Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt werden sollten, wurden nach dem gleichen Protokoll behandelt und im selben

Lysispuffer resuspendiert. Die Lysate für die IP wurden nicht eingefroren, sondern direkt weiterverwendet.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry)

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des DC Protein Assay Kit der Firma Bio-Rad gegen eine Rinderserumalbumin (BSA) Standardreihe gemessen. Diese Art der Proteinbestimmung orientiert sich an der von Lowry begründeten und durch Waterborg beschriebenen Methode.¹⁰⁹ Die Messung der Proteinkonzentration wurde entsprechend Herstellerangaben durchgeführt, unter Verwendung eines halben Ansatzes pro zu bestimmender Probe. Die Proben der Proteinlysate sowie die Proben der Standardreihe wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 750 nm am BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen und die Konzentration berechnet.

2.2.3.4 Immunopräzipitation

Nach Herstellung von Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 mg Protein bei der Untersuchung endogener Proteine in Sup B15 RT und WT Zellen mit dem Standard Lysis-Puffer auf 400 µL verdünnt. Bei der Untersuchung überexprimierter Proteine in BaF3 Zellen wurden 250 µg – 500 µg verwendet und ebenfalls auf 400 µL verdünnt. Diese Proteinlösungen wurden zunächst mit 20-25 µL Immunosorb A (Medicago, Uppsala, Schweden) 1-2 h bei 4 °C unter Rotation vorgereinigt, um Proteine herauszufiltern, die unspezifisch an die Agerosekügelchen binden. Danach wurde die Agarose herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 20-25 µL einer 50 % Lysispuffer/ProteinA-Agerose Lösung, sowie 2 µg anti-STS-1 Antikörper bzw. 2 µg Anti-c-ABL Antikörper über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Matrix wurde 5-6mal mit 500 µL Lysispuffer gewaschen (12000 x g, 4 °C, 1 min) und abschließend mit einer 27G Nadel der restliche Lysispuffer restlos abgesaugt. Anschließend wurden die Proben in 20 µL LDS-Ladepuffer aufgenommen und unter starkem Schütteln 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Zentrifugation (1 min, 4 °C, 12000 g) wurden

die isolierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde unter Verwendung eines kommerziellen Systems nach Herstellerangaben durchgeführt:

NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gele sowie NuPAGE® Novex® Tris-Acetat Gele (Invitrogen GmbH, Darmstadt). Als Größenstandard dienten der Precision Plus Protein Standard, dual color (Bio-Rad Laboratories GmbH München). Für die SDS-PAGE wurden identische Mengen Protein mit dem entsprechenden Lysispuffer auf ein einheitliches Volumen eingestellt, mit Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden zusammen mit dem Größenstandard geladen, im Gel unter Anlegen einer konstanten Spannung aufgetrennt und anschließend durch Westernblotting oder Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) Lösung analysiert.

2.2.3.6 Westernblotting

Westernblotting ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen mit immunologischen Methoden nach Trennung durch SDS-PAGE und Transfer auf eine proteinbindende Membran. Hier fanden dieselben kommerziellen Systeme wie bei der SDS-PAGE Verwendung. Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran oder alternativ auf eine in TBST eingelegt Nitrozellulose Membran. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit einer Milchpulverlösung (5 % Milchpulver (w/v) in TBST) abgesättigt, die Membran kurz mit PBST gewaschen und dann bei 4 °C über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert. Dabei wurden die Primärantikörper entweder nach Herstellerangaben oder in 5 % (w/v) BSA in TBST eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen in PBST für 10 min wurden die Membranen für 1h bei Raumtemperatur mit einer 1:5000 Verdünnung der Meerrettich Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Die Membran wurde erneut drei Mal für 10 min in TBST gewaschen und im Dunkeln für 1-2 min mit einer ECL-Lösung inkubiert. Die folgenden ECL-Lösungen werden im Dunkeln kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 zusammengemischt:

ECL-Lösung 1: 2,50 mM Luminol
 0,44 ml p-Coumaric Säure
 (90 mM in DMSO)
 10 ml 1 M TrisHCl, pH8,5
 ddH₂O ad 100 ml.

ECL-Lösung 2: 64 µl 30 % H₂O₂
 10 ml 1 M TrisHCl, pH8,5
 ddH₂O ad 100 ml.

Alternativ wurden zwei kommerzielle ECL Lösungen verwendet:

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

oder

SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate

(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)

2.2.3.7 Messung der Apoptose mittels 7-AAD

Die Methode nach Schmid et al., 1994^{110,111} erlaubt die Diskriminierung lebender Zellen von frühen apoptotischen Zellen und von Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben (späte apoptotische oder nekrotische, tote Zellen). Auf dem Verlust der Membranintegrität beruht die Permeabilität für das Molekül 7-Aminoactinomycin D (7-AAD), das in die DNS der Zellkerne (zwischen Cytosin- und Guanin-Basen) interkalieren kann¹¹² und damit die Identifikation von apoptotischen und toten Zellen im Rotlichtfluoreszenzkanal ermöglicht. Die zu untersuchenden Zellen werden pelletiert, der Überstand verworfen und anschließend die Zellen in 150-200 µL 7-AAD (20 µg/ml) in PBS resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C im Dunkeln werden die Zellen zentrifugiert,

der Überstand verworfen, in 300-500 μL in PBS mit 2 % Paraformaldehyd resuspendiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.8 Zellkernisolierung und subzelluläre Fraktionierung

Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von Proteinen ausschließlich im Zytoplasma oder im Zellkern der jeweiligen Zelle. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, herunter zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit dem dreifachen Volumen der Zellpellets in einem hypotonen Lysispuffer resuspendiert und nach einer Inkubation von 15 min auf Eis mit einer 27G Nadel homogenisiert, wodurch die Zellmembran aufbricht. Die Zellsuspension wurde 15 min bei 4 °C und 500 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser enthielt nun das Zytoplasma und die Membranen, während sich im Pellet die Kerne befanden. Die nukleäre Fraktion konnte nun zweimal in einem Volumen Kern-Waschpuffer 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 rpm zentrifugiert werden. Danach wurden die Kerne mit dem Kern-Lysispuffer für 10 min auf Eis gestellt und 10 min bei 12.500 g und 4 °C zentrifugiert. Die Kernproteine waren im Überstand gelöst und konnten in ein neues Reaktionsgefäß aufgenommen werden. Um eine reine zytoplasmatische Fraktion zu erhalten, wurde diese zwei Mal bei 12.500 g, 4 °C für 15 min zentrifugiert und jedes Mal der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Tab. 2.17
Lösungen zur Zellfraktionierung

Hypotoner Lysispuffer		Kern-Waschpuffer	Kern-Lysispuffer	
Tris/HCl pH 7,5	10 mM	Lysispuffer incl. 0,5 % NP40	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
NaCl	10 mM		NaCl	10 mM
MgCl ₂	3 mM		Triton	2 %
EDTA	1 mM		EDTA	1 mM
DTT	1 mM		DTT	1 mM
Protease- und Phosphatase Inhibitoren frisch zugeben				

2.2.3.9 Proliferation competition assays

Um den Einfluss von STS-1 auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen zu untersuchen, wurde ein Proliferations-Konkurrenz-Test (Proliferation competition assay)¹¹³ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden IL-3 abhängige hämopoetische BaF3 Zellen mit paulo BCR/ABL und pinco STS-1 doppelt infiziert. Da BCR/ABL ein IL-3 unabhängiges Wachstum ermöglicht, wurden diese Zellen 48 – 72 h nach der Infektion in IL-3-freies Medium übertragen und dadurch gleichzeitig auf BCR/ABL exprimierende Zellen selektioniert. Dazu musste IL-3 aus dem Medium durch dreimaliges Waschen mit PBS restlos entfernt werden. Die gewaschenen Zellen wurden in einer Dichte von 100.000 Zellen pro ml ausplattiert und die GFP Expression an Tag 4 nach IL-3 Entzug als Referenzwert verwendet. Die Proliferationsgeschwindigkeit sowie der Anteil an einzel- und doppelinfizierten Zellen wurde anhand der Menge der GFP exprimierenden pinco STS-1 positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Nach einigen Tagen wurden diese Zellen zusätzlich mit Imatinib behandelt, um zu zeigen inwieweit die Antwort auf diese Behandlung durch STS-1 beeinflusst werden kann.

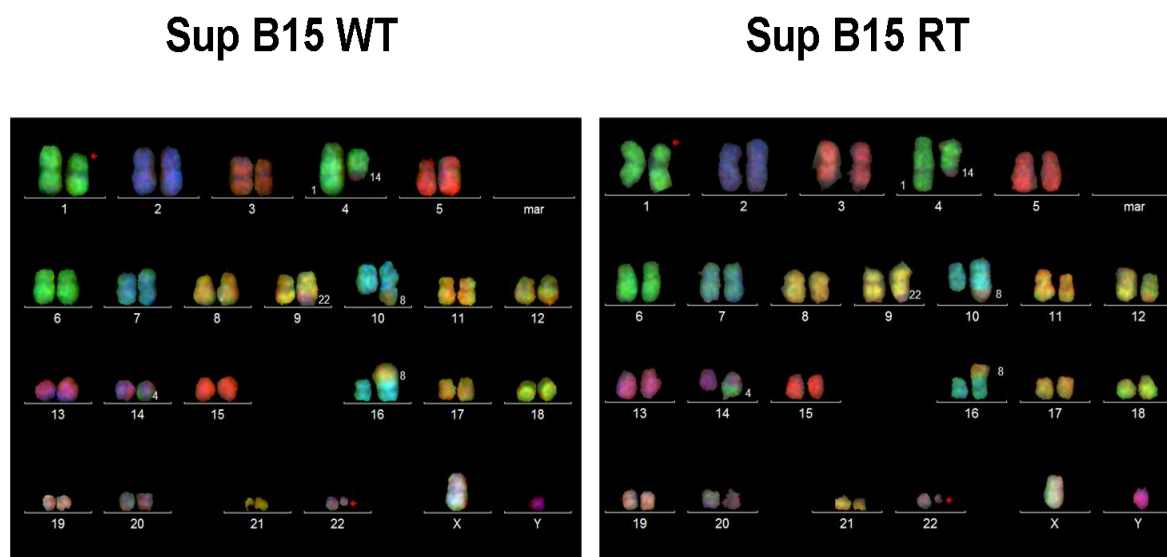
3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Sup B15 WT/RT Zelllinie

Im Vergleich zu den meisten Mutationen der Kinasedomäne von BCR/ABL sind mutationsunabhängige Resistenzen bzw. BCR/ABL unabhängige Resistenzen deutlich schlechter therapierbar. Um diese Arten der Mutationen besser untersuchen zu können, wurden im Labor von Prof. Dr. Ottmann Sub B15 Zellen verwendet. Diese wurden initial 1984 aus dem Knochenmark eines 9-Jährigen Jungen mit einer Ph⁺ ALL im zweiten Rezidiv gewonnen. Im Vorfeld zu der vorliegenden Arbeit wurden diese Imatinib sensitiven Sup B15 Zellen (**Sup B15 WT**) kontinuierlich mit steigenden Konzentrationen Imatinib behandelt, wodurch Imatinib resistente Zellen selektiert wurden. Die so geschaffene Zelllinie (**Sup B15 RT**) ist nicht nur resistent gegenüber Imatinib bis zu einer Konzentration von 5µM, sondern auch gegenüber Nilotinib und Dasatinib, den Inhibitoren der zweiten Generation.

3.1.1 Analyse der Sup B15 Zelllinien mittels FISH

Um Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen für die Untersuchung von mutationsunabhängiger bzw. BCR/ABL unabhängiger Resistenzen nutzen zu können, ist ein Vergleich beider Zellen notwendig. Durch eine Analyse mittels Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH) konnten Amplifikationen, Deletionen und Translokationen innerhalb des Genoms beider Zelllinien ermittelt werden (**Abb. 3.1**). Ein Vergleich beider Karyotypen zeigte, dass beide Zelllinien, trotz der erworbenen Resistenz, einen identischen Karyotyp aufweisen.



Resultierender Karyotyp:

$t(1;4)(p31;q35)$ $t(9;22)(q34;q11)$ $der(10)t(8;10)(q22;q26)$ $t(4;14)(q25;q24)$
 $der(16)t(8;16)(q22;p13)$

Abb. 3.1 FISH-Analyse zur Ermittlung des Karyotyps

Vergleichende Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung (FISH) von Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen. Der ermittelte Karyotyp der Imatinib resistenten Zelllinie (Sup B15 RT) weist keinerlei zusätzliche Translokation, Amplifikation oder andere genomische Veränderung auf, die als primäre Ursache für die Imatinib Resistenz in Betracht gezogen werden konnte.

Aufgrund dieser Daten kann eine genomische Aberration als Ursache der Tyrosinkinase Inhibitor (TKI) Resistenz ausgeschlossen werden. Diese Untersuchung alleine ist allerdings nicht ausreichend, um Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen als vergleichendes Zellmodell verwenden zu können.

3.1.2 Immunophänotypisierung beider Sup B15 Zelllinien

Die Einteilung akuter Leukämien erfolgt zurzeit nach immunphänotypischen Gesichtspunkten basierend auf dem Nachweis von leukämiespezifischen Oberflächenmarker.¹⁶ Um eine durch die kontinuierliche Behandlung mit Imatinib initialisierte Differenzierung der resistenten Sup B15 Zellen auszuschließen, wurden beide Sup B15 Zelllinien immunphänotypisch analysiert. Für diese Analyse wurde die Expression, der in **(Tab. 3.1)** dargestellten CDs (Cluster of Differentiation), mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Tab. 3.1

Auswahl von CDs zur Immunophänotypisierung beider Sup B15 Zelllinien

14 verschiedene CDs wurden untersucht, um den Differenzierungsstatus beider Sup B15 Zelllinien sowie die immunphänotypische Klassifizierung der Leukämie bestimmen zu können. Die Auswahl der Oberflächenmarker orientiert sich an den durch den EGIL-SCORE definierten Kriterien zur Klassifizierung akuter Leukämien erweitert durch klinisch relevante Differenzierungs- und HSC Marker.

CD	Vorkommen			Funktion
	T-Zellen	B-Zellen	Stammzellen	
CD 4	+	-	-	Initiierung/Steigerung der frühen Phase der T-Zell Aktivierung
CD 8	+	-	-	Rolle bei der T-Zell vermittelten Tötung
CD 10	-	-	-	Neutrale Endopeptidase; ALL-Marker
CD 13	+	-	+	Aminopeptidase
CD 19	-	+	+	Reguliert Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphocyten
CD 22	-	+	+	vermittelt B-Zell B-Zell Interaktion
CD 33	-	-	+	Marker für myeloische Vorläufer
CD 34	-	-	+	Marker für hämatopoetische Stammzellen
CD 38	+	+	+	Multifunktionelles Ektoenzym in Leukozyten
CD 79	-	+	-	Initiierung der B-Zell-Signalweiterleitung
CD 90	-	-	+	Nicht ausdifferenzierte hämatopoetische Vorläuferzellen
CD 117	-	-	+	Rezeptor-Tyrosin-Kinase c-KIT, AML Marker
CD 133	-	-	+	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen
MPO	+	+	-	Myeloischer Marker

Die Auswahl der verschiedenen CDs orientierte sich sowohl an den EGIL-Score Kriterien zur Klassifizierung von Leukämien,¹⁵ als auch an CDs, die im Rahmen der klinischen Routine bei der Analyse von Leukämien verwendet werden.

Die Untersuchung beider Zelllinien erfolgte sowohl mit als auch ohne einer vorherigen Behandlung mit 2 μ m Imatinib, um einen möglichen durch Imatinib induzierten Differenzierungsbeginn feststellen zu können. Für 12 der 14 untersuchten Oberflächenmarker konnten unabhängig der Imatinib Behandlung identische Werte gezeigt werden. Lediglich CD33, ein Marker für myeloische Vorläufer, und CD34, ein hämatopoetischer Stammzellmarker, zeigten eine unterschiedlich starke Ausprägung. Während Sup B15 WT Zellen einen Anteil von 2 % CD33 positiver Zellen aufweisen, steigt der Anteil der CD33 positiven Zellen um 25 % in den resistenten Sup B15 Zellen.

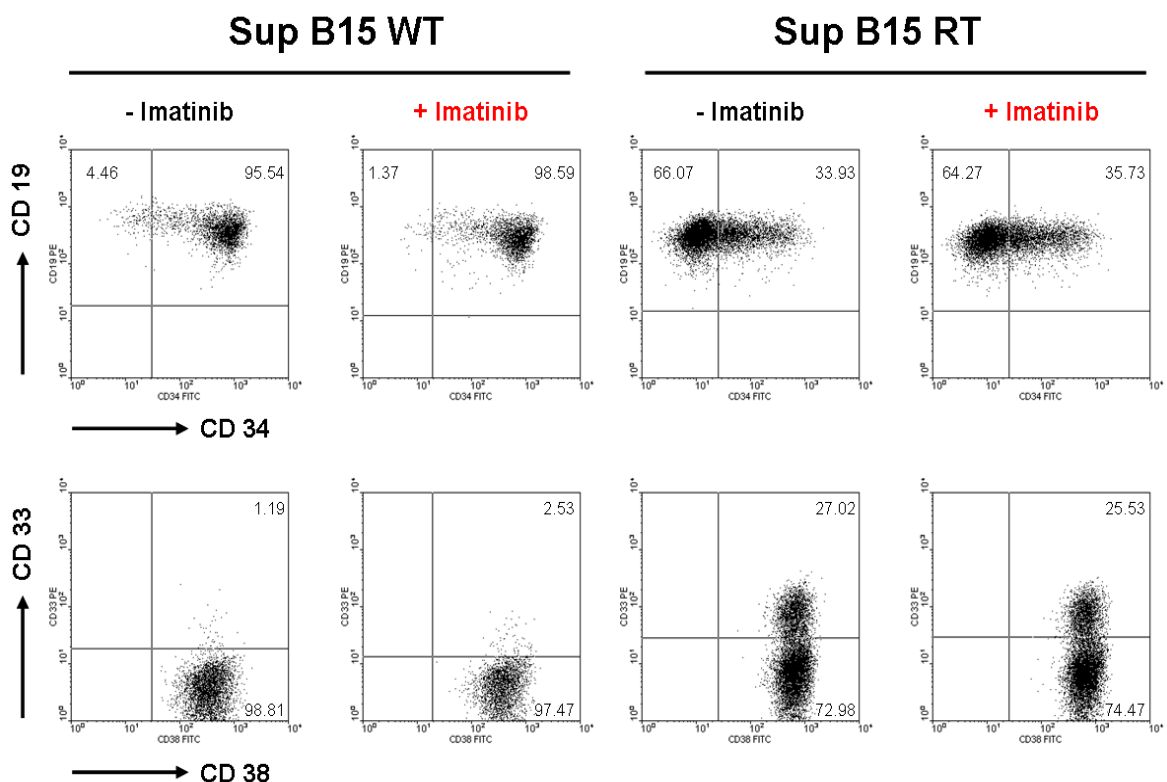


Abb. 3.2
Vergleichende Immunphänotypisierung der beiden Sup B15 Zelllinien

Durch die Messung von 14 verschiedenen Oberflächenmarkern wurde der Grad der Differenzierung und die Art der akuten Leukämie untersucht. Im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen variierte der Anteil der CD 33 positiven Zellen (+25 %) und der Anteil der CD34 positiven Zellen (-63 %) in der Sup B15 RT Zelllinie. Die Expression der übrigen 12 untersuchten CDs (**Tab. 3.1**) stimmten in beiden Zelllinien überein.

Der Anteil der CD34 positiven Zellen in beiden Zelllinien wird durch eine vorherige Behandlung mit Imatinib nicht direkt beeinflusst. Während Sup B15 WT Zellen im Schnitt zu 97 % CD 34 positiv sind, verringert sich dieser Anteil in Sup B15 RT Zellen um 63 % auf ca. 34 % CD34 positive Zellen. Sup B15 RT Zellen präsentieren sich im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen deutlich reifer und mit einem leicht myeloischen Charakter (**Abb. 3.2**).

3.1.3 Mutationsanalyse der Sup B15 WT/RT Zellen

Die häufigste Ursache für Resistenzen in der akuten Leukämie ist das Auftreten von Mutationen im Fusionsprotein BCR/ABL. Um die vordergründigste Ursache für die Resistenz in den Sup B15 RT Zellen auszuschließen, eine Mutation der TKD Domäne, wurde der Bereich von Aminosäure 244 bis Aminosäure 396 sequenziert, da laut Literatur hier die wichtigsten resistenzvermittelnden Mutationen zu finden sind. Es konnte in keiner der beiden Sup B15 Zelllinien eine Mutation im untersuchten Bereich ermittelt werden (**Abb. 3.3**).

Zelllinien:

- Sup B15 WT
- Sup B15 RT

Exon	Mutation	Befund
4	M244V	Negativ
	G250E/A	Negativ
	Q252H/E	Negativ
	Y253H	Negativ
	E255K/V	Negativ
6	T315I	Negativ
	F317L	Negativ
	M351T	Negativ
	E355G	Negativ
	F359C/I/L	Negativ
7	V379I	Negativ
	L387M	Negativ
	H396R	Negativ

Abb. 3.3

Mutationsanalyse von BCR/ABL in Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen

Eine Sequenzierung des kodierenden Bereichs der Tyrosin Kinase Domäne (TKD) von BCR/ABL zeigte keine Punktmutationen in Sup B15 RT Zellen. Dadurch konnte eine Mutation der TKD als Ursache der Resistenz ausgeschlossen werden.

3.1.4 Untersuchung des inhibitorischen Effekts von Imatinib in Sup B15 WT/RT Zellen

In Leukämien mit mutationsvermittelten Resistenzen verhindert eine Mutation der TKD von BCR/ABL das Binden des Inhibitors an das Fusionsprotein. Dadurch verliert Imatinib seine Wirksamkeit und BCR/ABL wird nicht dephosphoryliert. Daher wurde untersucht, welchen Effekt Imatinib auf die Phosphorylierung von BCR/ABL in der resistenten Zelllinie hat. Mittels SDS-Page und anschließendem Western-Blot wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit 2 μ M Imatinib über 24 h auch in den resistenten Sup B15 Zellen BCR/ABL binden und dephosphorylieren kann. Diese Beobachtung bestätigt das Ergebnis aus der zuvor durchgeführten Sequenzierung, die bereits eine Mutation von BCR/ABL ausgeschlossen hat (**Abb. 3.4**).

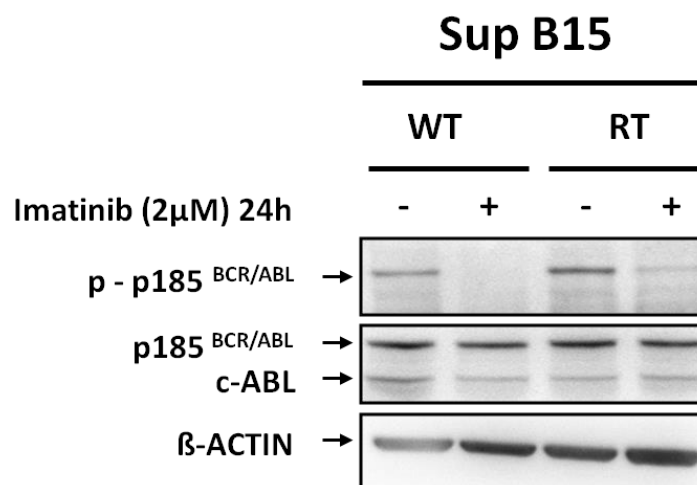


Abb. 3.4
Imatinib dephosphoryliert BCR/ABL in Sup B15 WT und RT Zellen

Zellen aus beiden Zelllinien wurden für 24 h mit 2 μ M Imatinib behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass Imatinib BCR/ABL nicht nur in Sup B15 WT Zellen, sondern auch in Sup B15 RT Zellen dephosphoryliert.

Obwohl die Behandlung mit Imatinib zu einer Dephosphorylierung von BCR/ABL in beiden Sup B15 Zelllinien führt, ist nur bei Sup B15 RT Zellen ein Überleben der selbigen in Verbindung mit Proliferation zu verzeichnen. Dadurch kann ein Mechanismus, der eine aktive BCR/ABL Kinase als Voraussetzung hat, ausgeschlossen werden.

3.1.5 Analyse des Proteinprofiles in Sup B15 RT/WT Zellen

Durch die Generierung einer TKI resistenten Sup B15 Zelllinie, die bezüglich ihrer Klassifizierung immer noch der Ausgangszelllinie entspricht, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ottmann ein Zellmodell geschaffen, das es ermöglicht, den der Resistenz zu Grunde liegenden Mechanismus zu identifizieren und zu analysieren. Da Sup B15 RT Zellen trotz hoher Konzentrationen an Imatinib immer noch in der Lage sind zu proliferieren, wurde in beiden Zelllinien die Expression zellzykluskontrollierender Proteine untersucht und verglichen. (**Abb. 3.5**).

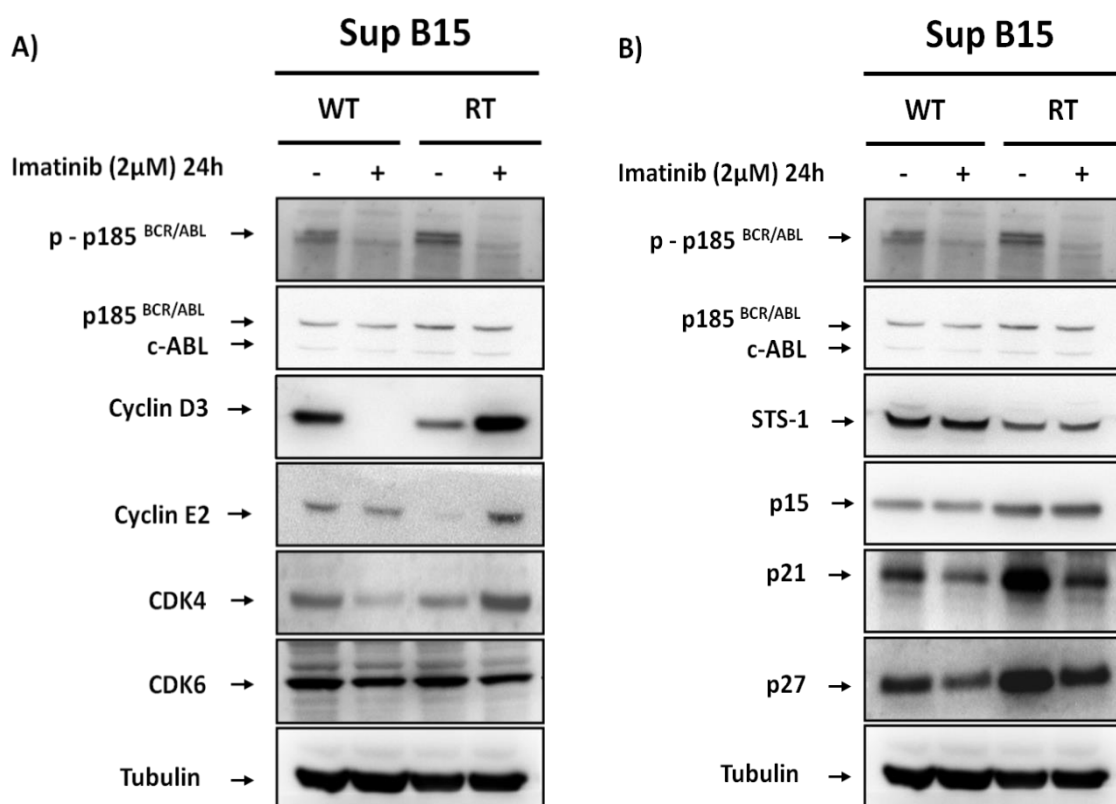


Abb. 3.5
Expressionsanalyse von G1/S Zellzyklus kontrollierenden Proteinen

Die Zelllysate von Imatinib behandelten Sup B15 WT und RT Zellen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen bezüglich ihrer Proteinexpression untersucht, die bei der Kontrolle des Überganges von G1 zur S Phase beteiligt sind. In Sup B15 RT Zellen wurde nach Behandlung mit Imatinib eine Steigerung der Expression für Cycline E2 und D3 sowie CDK4 nachgewiesen; wohingegen die Expression von CDK6, p21 und p27 herunter reguliert ist. In Sup B15 WT Zellen ist die Expression aller untersuchten Proteine, mit Ausnahme von p15 und Cyclin E2, nach Behandlung mit Imatinib reduziert.

Zu diesem Zweck wurden sowohl behandelte als auch unbehandelte Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen verwendet. Die Arbeit von Salloukh et al.¹¹⁴ in Mauszellen

zeigte, dass die Effekte von Chemotherapeutika auf den G2/M Kontrollpunkte lediglich in p210^{BCR/ABL} jedoch nicht in p185^{BCR/ABL} Zellen nachweisbar sind. Aus diesem Grund lag der Fokus dieser Untersuchung auf Proteinen, die eine wichtige Rolle beim Übergang der G1-Phase in die S-Phase spielen. Es zeigte sich, dass Imatinib eine induzierende Wirkung auf Cyclin D3, Cyclin E2 und CDK4 in Imatinib resistenten Sup B15 Zellen hat, wenn diese über 24 Stunden mit Imatinib behandelt werden. Die Expression dieser Proteine konnte durch die genannte Behandlung deutlich gesteigert werden. Im Vergleich dazu blieb die Expression beider hier untersuchten Cycline in behandelten Sup B15 WT Zellen unverändert. Für CDK4 wurde nach Behandlung von Sup B15 WT Zellen mit Imatinib eine verringerte Expression verzeichnet. Die Behandlung mit Imatinib hatte in beiden Zelllinien eine leichte Reduzierung der Expression von CDK6 zur Folge. Die Untersuchung der Proteine p21 und p27 ist in Sup B15 RT Zellen im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen deutlich erhöht. Unter Imatinib sinkt in beiden Zelllinien die Expression. Dabei erreichten in behandelten Sup B15 RT Zellen beide Proteine in etwa das Expressionslevel, wie es sich in unbehandelten Sup B15 WT Zellen darstellt. Die durchgeführte Untersuchung konnte für p15 eine erhöhte Expression in Imatinib resistenten Sup B15 Zellen zeigen. Die Expression von p15 bleibt auch nach der Behandlung mit Imatinib in beiden Zellen unverändert.

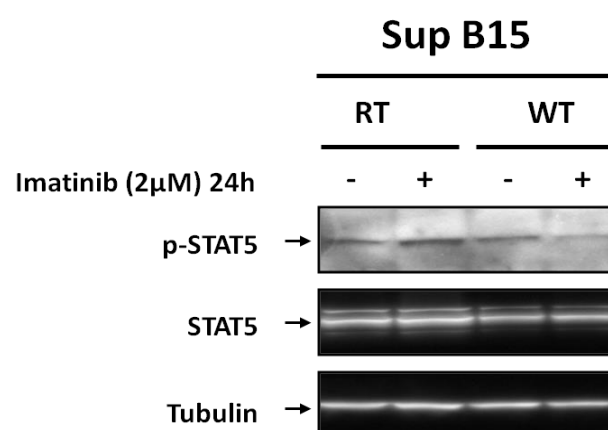


Abb. 3.6
Einfluss von Imatinib auf die STAT5 Phosphorylierung

Sup B15 WT und RT Zellen wurden bezüglich ihrer STAT5 Phosphorylierung unter dem Einfluss von Imatinib untersucht. Dabei zeigt sich eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von STAT5 in Sup B15 WT Zellen nach einer Behandlung mit Imatinib. Im Vergleich dazu bleibt die STAT5 Phosphorylierung in Sup B15 RT Zellen unverändert.

Bei der Untersuchung von Proteinen, die in BCR/ABL assoziierten Signalwegen eine wichtige Rolle spielen, konnte in beiden Zellen eine Abnahme der Phosphorylierung von STAT5, in Folge einer Imatinib Behandlung, festgestellt werden (**Abb. 3.6**). Darüber hinaus scheint die Expression von STAT5 in Sup B15 RT Zellen im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen tendenziell höher zu sein. STAT5 ist ein genereller Transkriptionsfaktor für diverse Proteine und wurde im Zusammenhang mit Ph⁺ ALL von Slupianek et al. bereits 2001 als Transkriptionsfaktor für RAD51 beschrieben und ist darüber hinaus an der Vermittlung von Resistenzmechanismen beteiligt.¹¹⁵ RAD 51 ist im Zellkern als DNS-Reparaturprotein aktiv, das durch das Zusammenwirken mit anderen Proteinen, in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus, Doppelstrangbrüche mittels homologer Rekombination repariert.^{115,116} Um die Expression von Rad 51 zu untersuchen, wurden nukleäre Extrakte von unbehandelten und mit Imatinib behandelten Sup B15 WT und -RT Zellen hergestellt. Anschließend wurde mittels SDS-PAGE und Western Blotting die Expression von RAD 51 untersucht. PARP wurde in der untersuchten nukleären Fraktion als Ladekontrolle verwendet.

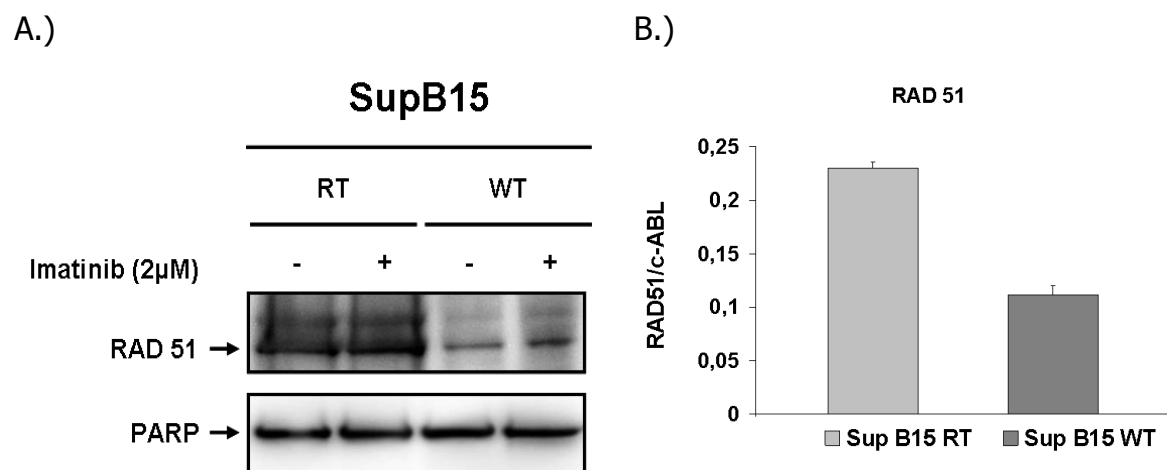
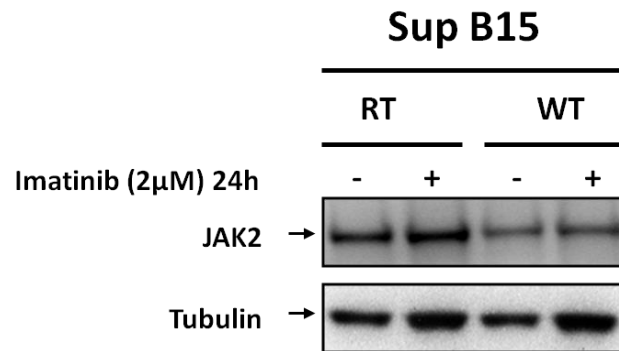


Abb. 3.7
RAD 51 ist in Sup B15 RT auf transkriptioneller Ebene reguliert

Sup B15 RT Zellen haben auf Proteinebene eine deutlich höhere RAD 51 Expression im Zellkern im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen (**A**). Diese Expression ist unabhängig einer Imatinib Behandlung. Mittels qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass dieser Expressionsunterschied transkriptionell reguliert ist (**B**).

Es zeigt sich eine deutlich höhere Expression von RAD 51 in Sup B15 RT Zellen, die allerdings unabhängig von einer Behandlung mit Imatinib ist. Um eine durch STAT5 vermittelte transkriptionelle Regulation von RAD 51 zu überprüfen, wurde cDNA aus Sup B15 RT und Sup B15 WT Zellen verwendet und anschließend die mRNA Menge mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Die gemessenen Werte wurden mit c-ABL normalisiert. Es zeigte sich auf mRNA Ebene eine doppelt so hohe Menge an RAD 51 mRNA in Sup B15 RT Zellen im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen (**Abb. 3.7**).

Wie bereits gezeigt, wird BCR/ABL in Sup B15 RT Zellen durch die Behandlung von Imatinib dephosphoryliert und in Folge dessen inaktiviert. Daher muss die BCR/ABL unabhängige Phosphorylierung von STAT5 durch eine alternative Kinase vermittelt werden. STAT5 ist ein wichtiger Bestandteil des JAK/STAT Signalwegs. Durch die Liganden vermittelte Dimerisierung von JAK Kinasen in der Zellmembran wird diese Kinase aktiviert. Dadurch können gebundene STATs ihrerseits phosphoryliert und aktiviert werden. In der Literatur wird JAK2 als Kinase für STAT5 beschrieben. Im Rahmen myeloproliferativer Erkrankungen kann es zu einer V617F Punktmutation von JAK2 kommen. Aufgrund dieser Mutation wird JAK2 konstitutiv aktiv und kann somit zu einer Imatinib unabhängigen Phosphorylierung von STAT5 führen.¹¹⁷ Um diese These zu überprüfen wurde eine Mutationsanalyse von JAK2 in beiden Sup B15 Zelllinien durchgeführt, die jedoch in beiden Fällen negativ ausfiel. Somit konnte konstitutiv aktives JAK2 im Zusammenhang mit einer V617F Mutation als Grund für eine veränderte STAT5 Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Daher wurde untersucht, ob eine Veränderung der generellen JAK2 Expression vorliegt, wodurch eine erhöhte STAT5 Phosphorylierung erklärt werden kann. Um diese Annahme zu überprüfen wurden Gesamtzelllysate von Imatinib behandelten und unbehandelten Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen verwendet und bezüglich ihrer JAK2 Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in Sup B15 RT Zellen im Vergleich zu Sup B15 WT Zellen unabhängig der Behandlung mit Imatinib deutlich mehr JAK2 exprimiert wird (**Abb. 3.8**). Dies würde eine erhöhte Phosphorylierung von STAT5 trotz einer Behandlung mit Imatinib erklären.

**Abb. 3.8****JAK2 Expression ist in Sup B15 RT Zellen erhöht**

Die JAK2 Expression wurde in beiden Sup B15 Zelllinien untersucht. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression in Sup B15 RT Zellen. Die Expression ist sowohl in Sup B15 RT als auch Sup B15 WT Zellen unabhängig von einer Behandlung mit 2 μ M Imatinib über 24 Stunden.

Es zeigte sich bei allen drei Proteinen (JAK2, STAT5 und RAD 51) eine deutlich erhöhte Expression in Sup B15 RT Zellen, die sich auch nach Behandlung mit Imatinib nicht verändert. Aufgrund der erhöhten JAK2 und STAT5 Expression in Verbindung mit einer trotz Imatinib gleichbleibenden STAT5 Phosphorylierung ist eine transkriptionelle Hochregulierung von RAD 51 eine plausible Folge, die hier experimentell belegt werden konnte.

3.2 STS-1 interagiert mit BCR/ABL

Im Vorfeld zu der hier vorliegenden Arbeit wurde STS-1 als Interaktionspartner von BCR/ABL in K562 Zellen mittels eines Tap-Taq Screenings gefunden.¹¹⁸ Um diese Interaktion zu überprüfen, wurde eine Co-IP in 293T Zellen durchgeführt, die mit der p185 oder der p210 Variante von BCR/ABL transfiziert wurden und dieses in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von STS-1 exprimierten. Mit diesem Experiment war es möglich einen Interaktionsnachweis zwischen BCR/ABL und STS-1 zu erbringen (**Abb. 3.9**). Parallel konnte gezeigt werden, dass die Interaktion unabhängig vom Bruchpunkt und somit nicht exklusiv für die p210 Variante ist wie sie in K562 Zellen exprimiert wird.

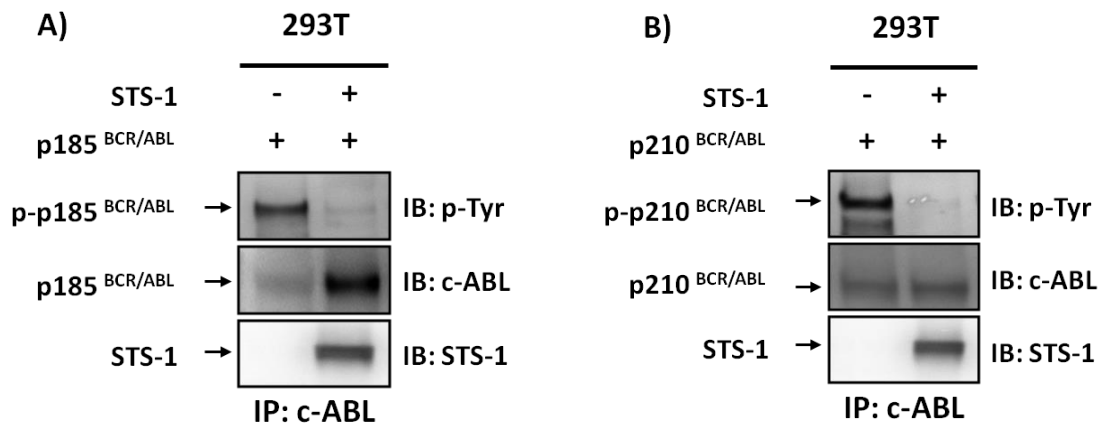


Abb. 3.9
STS-1 interagiert mit p185^{BCR/ABL} und p210^{BCR/ABL}

p185^{BCR/ABL} bzw. p210^{BCR/ABL} exprimierende 293T Zellen wurden mit STS-1 co-transfiziert. Mittels Co-Immunpräzipitationen konnte eine Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 unabhängig der Bruchpunktvariante von BCR/ABL nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl p185^{BCR/ABL} als auch p210^{BCR/ABL} durch STS-1 dephosphoryliert werden.

Des Weiteren galt es herauszufinden, ob STS-1 auch mit der sogenannten Gatekeeper-Mutation von BCR/ABL interagieren kann und inwiefern sich die Behandlung mit Imatinib auf die Interaktion der beiden Proteine auswirkt. Zu diesem Zweck wurden BaF3 Zellen, die bereits p185^{BCR/ABL} oder p185^{BCR/ABL} T315I stabil exprimieren, zusätzlich retroviral mit STS-1 transduziert und anschließend lysiert. Mit den zur Verfügung stehenden Lysaten wurde mittels Co-IP die STS-1 / BCR/ABL Interaktion untersucht (**Abb. 3.10**). Es konnte gezeigt werden, dass

STS-1 sowohl an das mutierte als auch das unmutierte BCR/ABL im gleichen Maße bindet. Durch die Behandlung mit Imatinib wurde unmutiertes BCR/ABL in eine dephosphorylierte und daher inaktive Form gebracht und auch hier konnte eine Interaktion mit STS-1 nachgewiesen werden. Bei einem direkten Vergleich der Autophosphorylierung von BCR/ABL in der Gegenwart von STS-1 konnte in 293T Zellen eine nahezu vollständige Dephosphorylierung gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in BaF3 Zellen lediglich eine geringe STS-1 vermittelte Dephosphorylierung von BCR/ABL nachgewiesen werden.

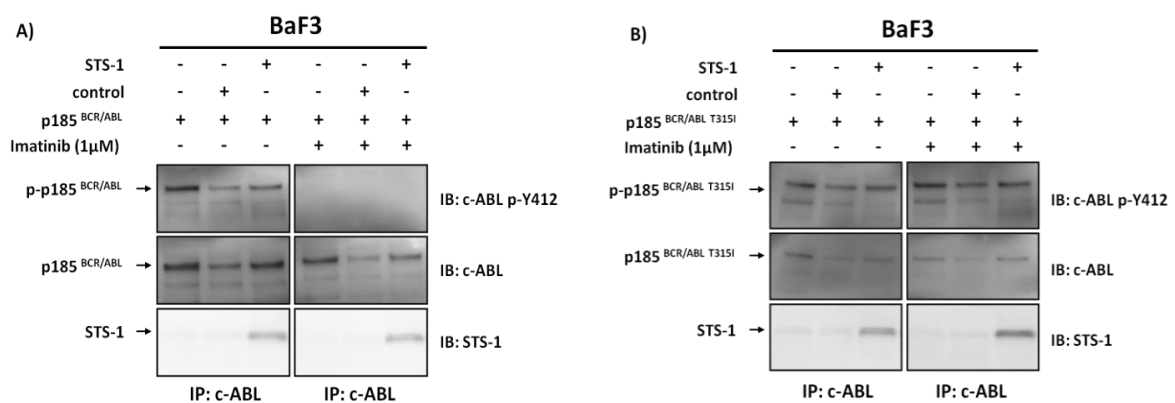


Abb. 3.10

STS-1 interagiert auch mit der Gatekeeper Mutation p185^{BCR/ABL T315I}

Die in 293T Zellen gezeigte Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 wurde in einem murinen Prä-B Zellmodell verifiziert. Zu diesem Zweck wurden p185^{BCR/ABL} **(A)** und p185^{BCR/ABL T315I} **(B)** stabil exprimierende Zellen zusätzlich mit einem Kontrollvektor oder STS-1 transduziert. Mittels Co-IP wurde die Interaktionsfähigkeit von STS-1 und BCR/ABL mit und ohne einer vorherigen Imatinib-Behandlung untersucht. In dem hier verwendeten Zellmodell konnte kein interaktionsvermindernder Effekt von Imatinib oder der Gatekeeper Mutation T315I nachgewiesen werden.

3.3 STS-1 Expression in resistenten Ph⁺ ALL Zellen

Um herauszufinden, ob STS-1 bei der Vermittlung des resistenten Phänotyps beteiligt ist, wurde das Expressionslevel von STS-1 in Sup B15 RT Zellen mit dem von Sup B15 WT Zellen verglichen. Durch die Verwendung einer quantitativen Echtzeit PCR (qRT-PCR – quantitative Real Time Polymerase Chainreaction) konnte eine signifikante Herabregulierung der mRNA in Sup B15 RT Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde mit beiden Zelllinien auf Proteinebene mittels Western-Blot bestätigt (**Abb. 3.11**).

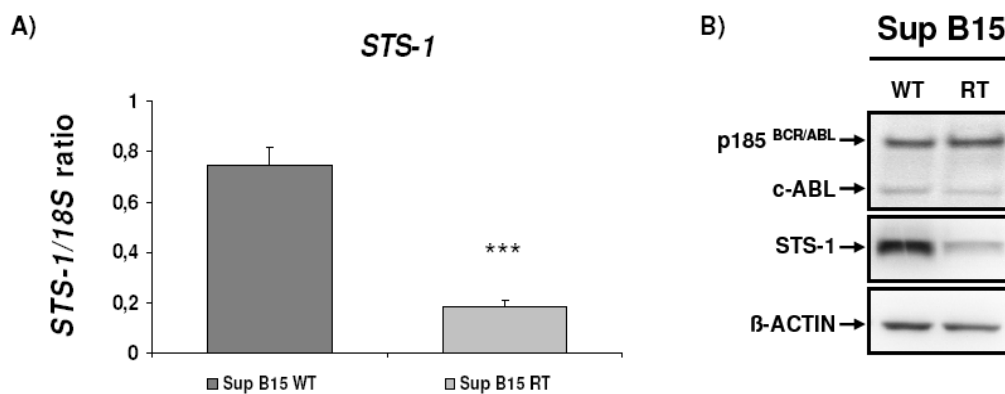


Abb. 3.11
Sup B15 RT Zellen zeigen eine geringere STS-1 Expression

Das Expressionsniveau von STS-1 wurde in beiden Sup B15 Zelllinien sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene vergleichend untersucht. Sowohl in der qRT-PCR (**A**), als auch im Western-Blot (**B**) konnte bezüglich der STS-1 Expression ein stark signifikanter Unterschied zwischen Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen gezeigt werden.

Eines der mit am besten beschriebenen Substrate von STS-1 ist die Kinase Syk.^{4,77,78} Aufgrund der deutlich höheren Expression von STS-1 in Sup B15 WT Zellen im Vergleich zu Sup B15 RT Zellen wäre zu erwarten, dass die Phosphorylierung von Syk in den TKI sensitiven Sup B15 WT im Vergleich zu den STS-1 niedrig exprimierenden Sup B15 RT Zellen deutlich reduziert ist.

Die Analyse der Syk Phosphorylierung in beiden Zelllinien bestätigt die zuvor ausgeführte Annahme. Es konnte eine deutlich geringere Phosphorylierung der Syk Kinase in Sup B15 WT Zellen nachgewiesen werden. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet, um die Analyse einer vergleichbaren Proteingesamtmenge nachweisen zu können (**Abb. 3.12**).

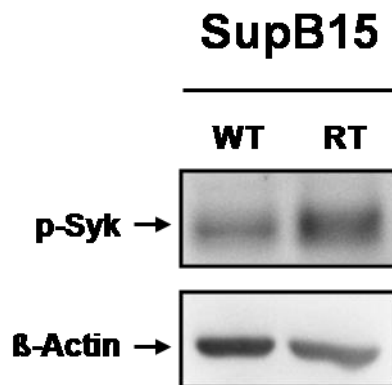


Abb. 3.12
Analyse des Phosphorylierungslevels von Syk in Sup B15 WT und RT Zellen

Die Phosphorylierung von Syk ist aufgrund der deutlich höheren STS-1 Expression in Sup B15 WT Zellen erheblich geringer im Vergleich zu Sup B15 RT Zellen, die eine signifikant geringere STS-1 Expression aufweisen.

3.4 Lokalisierung von STS-1 und BCR/ABL

Nachdem die Expression von STS-1 in beiden Sup B15 Zelllinien auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, galt es herauszufinden, ob beide Proteine im gleichen Kompartiment innerhalb der Zelle lokalisiert sind und ob sich diese Lokalisierung durch die Behandlung mit Imatinib ändert.

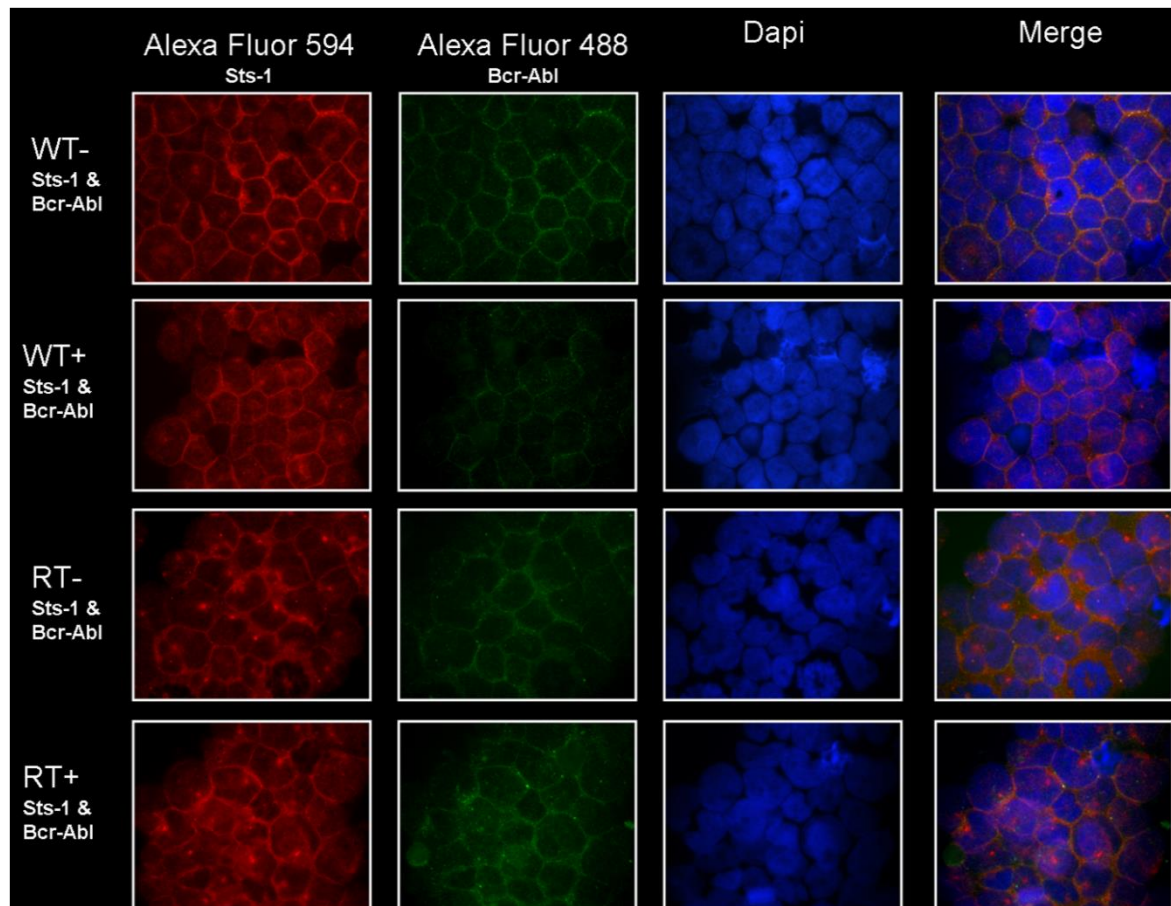


Abb. 3.13

Lokalisierung von STS-1 und BCR/ABL in Sup B15 WT und RT Zellen

In Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz die Lokalisierung von STS-1 und BCR/ABL mit und ohne einer vorherigen Imatinibbehandlung nachgewiesen. In beiden Zelllinien ist eine deutliche Lokalisierung der Proteine im Zytoplasma zu erkennen. Die Behandlung mit Imatinib scheint diese Lokalisierung nicht nennenswert zu beeinflussen. STS-1 wurde mit Alexa Fluor 594 und BCR/ABL mit Alexa Fluor 488 angefärbt. Die Markierung des Zellkerns erfolgte mittels Dapi. Die mittels konfokaler Laserscanmikroskopie aufgenommenen Bilder wurden anschließend mittels einer Bildbearbeitungssoftware übereinander gelegt.

Zu diesem Zweck wurde STS-1 mit Alexa Fluor 594 und BCR/ABL mit Alexa Fluor 488 angefärbt, wohingegen der Zellkern mittels des Farbstoffes Dapi sichtbar gemacht wurde. Durch die Verwendung eines konfokalen Laserscanmikroskopes wurden die Farbstoffe einzeln mit einem Laser der entsprechenden Wellenlänge angeregt. Die emittierten Signale wurden anschließend einzeln detektiert. Die Bilder wurden mit einer Bildbearbeitungssoftware mit konstanten Parametern bearbeitet und anschließend übereinander gelegt, um die Lokalisation von BCR/ABL und STS-1 in Relation zueinander und zum Zellkern besser beurteilen zu können. In beiden Zellen konnte eine Lokalisation von STS-1 und BCR/ABL im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 3.13**). Werden die Zellen im Vorfeld mit Imatinib behandelt, zeigt sich in Sup B15 WT Zellen ein Rückgang der Fluoreszenz, die in Sup B15 RT Zellen nicht beobachtet werden konnte. Auch bei STS-1 konnte ein leichter Effekt auf die Lokalisation durch eine vorhergehende Behandlung mit Imatinib nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass unter Imatinib STS-1 zu einem gewissen Anteil auch im Nukleus lokalisiert ist. Diese Imatinib vermittelte Delokalisation ist in Sup B15 RT Zellen deutlich stärker ausgeprägt als in Sup B15 WT Zellen. Des Weiteren ist in beiden Zellen eine deutliche Konzentration von STS-1 innerhalb des Zytoplasmas an einer bestimmten Stelle nahe dem Nukleus zu sehen. Der Nachweis von γ -Tubulin an dieser Stelle des Zellkerns lässt vermuten, dass es sich hierbei um das Mikrotubuli organisierende Zentrum handelt (MTOZ). Es wurde gezeigt, dass γ -Tubulin ein Bestandteil des zytoplasmatischen und mitotischen MTOZ ist und an der Formierung von Mikrotubulis und Spindelfasern beteiligt ist.¹¹⁹⁻¹²¹

γ -Tubulin ist in vielen Spezies, wie *Schizosaccharomyces pombe*¹¹⁹, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens* und *Drosophila melanogaster*¹²² konserviert, macht aber nur etwa 1 % des gesamten Tubulinpools aus. Mittels Immunfluoreszenzaufnahmen und unter Verwendung eines Laserscanmikroskopes konnte in Imatinib unbehandelten Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen erneut die punktförmige zytoplasmatische Akkumulation von STS-1 im Bereich der Einbuchtung des Zellkernes gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine Ph⁻ ALL Zelllinie untersucht, um eine Zellkontext unabhängige Lokalisation zu demonstrieren.

Die Verteilung von STS-1 in Nalm6 Zellen entspricht in etwa der Verteilung wie sie in Sup B15 RT Zellen festgestellt wurde. Mittels der Verwendung eines gegen γ -Tubulin gerichteten spezifischen Antikörpers konnte die Lokalisierung von γ -Tubulin und damit verbunden des MTOZ nachgewiesen werden. Durch die Überlagerung der drei Einzelaufnahmen zeigt sich eine überwiegende Kolo­kalisierung der beiden Proteine STS-1 und γ -Tubulin in den untersuchten Zellmodellen (**Abb. 3.14**).

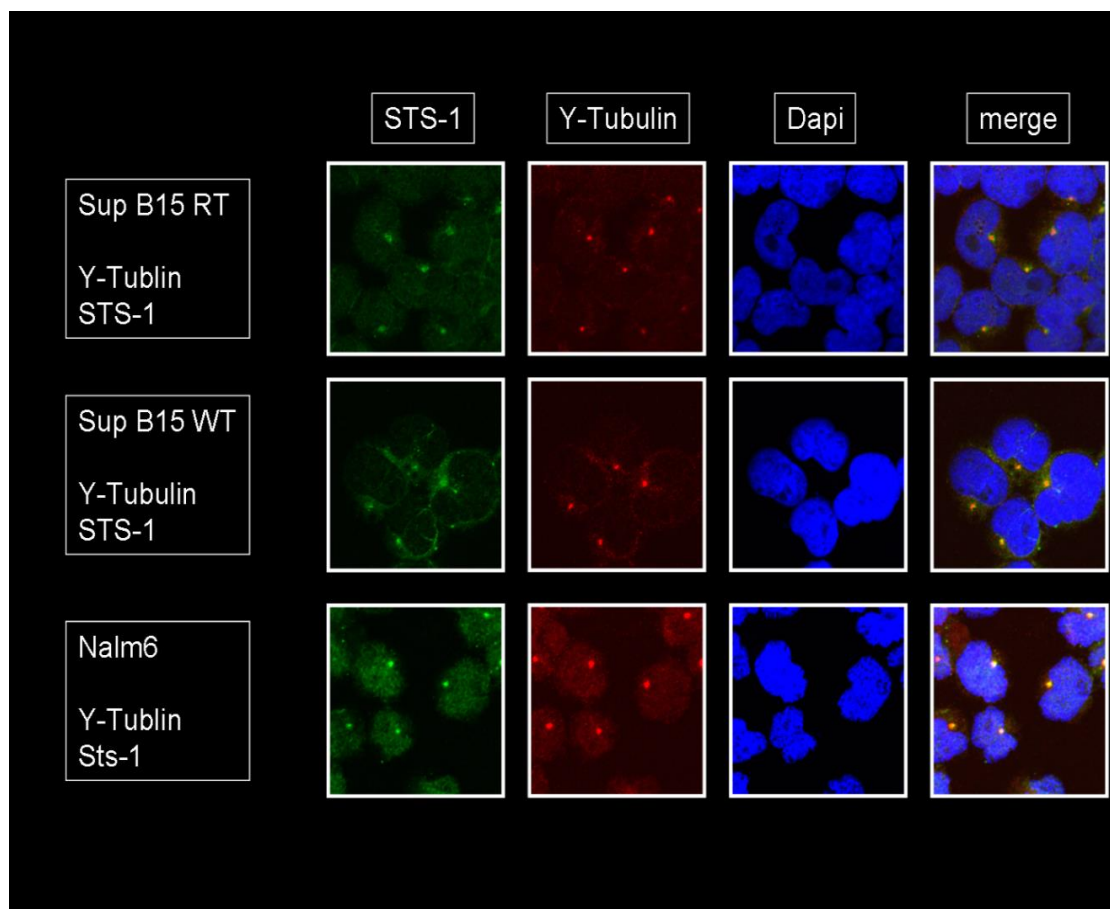


Abb. 3.14
STS-1 und γ -Tubulin sind in beiden Sup B15 Zellen kolokalisiert

Bei der Analyse der STS-1 Lokalisation mittels immunfluoreszenzbasierter Laserscanmikroskopie zeigt sich eine punktuelle Ansammlung von STS-1 innerhalb des Zytoplasmas. Durch die Verwendung eines γ -Tubulin spezifischen Antikörpers konnte gezeigt werden, dass an der gleichen Stelle im Zytoplasma γ -Tubulin lokalisiert ist, welches mit dem MTOZ assoziiert ist. Die Übereinanderlegung der Einzelbilder mittels einer Bildbearbeitungssoftware bestätigt die gleiche Lokalisierung beider Proteine. Eine 100 %ige Kolo­kalisierung von γ -Tubulin und STS-1 kann aufgrund dieser Daten nicht eindeutig belegt werden.

3.5 Imatinib beeinflusst die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL

Um die Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 auf endogener Ebene zu bestätigen, wurde ein von humanen Patienten abgeleitetes Ph⁺ ALL Zellmodell verwendet. Durch die Verwendung eines transgenen Überexpressionssystems können im Gegensatz zu Untersuchungen in endogenen Systemen überzeichnete und teils artifizielle Ergebnisse erzielt werden. Daher wurden Sup B15 WT und Sup B15 RT mit Imatinib behandelt und die Interaktion von endogenem BCR/ABL und endogenem STS-1 unter dem Einfluss von Imatinib mittels Co-IP untersucht. In diesem Zellsystem zeigte sich, dass die Interaktion durchaus abhängig vom Aktivierungszustand von BCR/ABL ist, da die Behandlung von Imatinib in Sup B15 WT Zellen zu einer deutlichen Reduzierung von gebundenem STS-1 führt. In Sup B15 RT Zellen verschwindet die Menge an gebundenem STS-1 nahezu vollständig (**Abb. 3.15**).

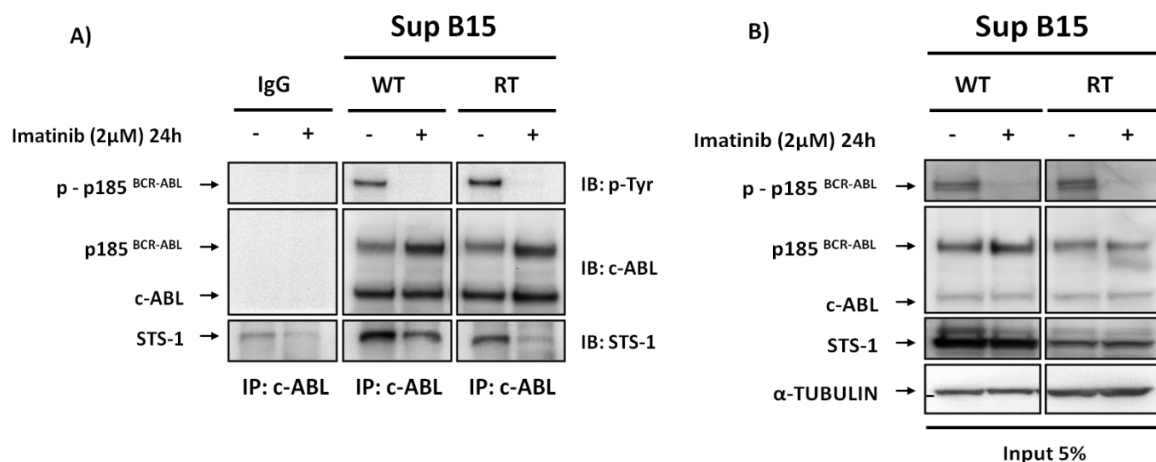


Abb. 3.15
Untersuchung der Interaktion von endogenem BCR/ABL und STS-1

Co-IP, gefolgt von SDS-Page und Western-Blot wurden mit Sup B15 WT und RT Zellen durchgeführt, um eine Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 auf endogenem Level zu untersuchen und die Ergebnisse aus den Überexpressionsmodellen zu bestätigen. Eine zusätzliche Behandlung mit 2 μM Imatinib soll den Einfluss des Inhibitors auf die Interaktion in einem endogenen System zeigen. In beiden Sup B15 Zelllinien konnte eine Interaktion der endogen exprimierten Proteine gezeigt werden. Diese Interaktion wurde durch die Zugabe von Imatinib deutlich reduziert. Eine Bande, die einer mono-ubiquitinierten Form von STS-1 entspricht,¹²³ konnte in der Co-IP nicht detektiert werden.

Im Input konnte zusätzlich eine Bande nachgewiesen werden, die einer mono-ubiquitinierten Form von STS-1 entspricht.¹²³ Diese Bande konnte in der Co-IP nicht mehr nachgewiesen werden. Damit konnte mit diesem Experiment eine Beziehung zwischen dem Autophosphorylierungslevel von BCR/ABL und der Bindung von nicht-ubiquitiniertem STS-1 hergestellt werden. In einem weiteren Experiment konnte erneut eine Reduzierung der spezifischen Sekundärbande unter dem Einfluss von Imatinib in beiden Sup B15 Zelllinien gezeigt werden (**Abb. 3.16A**). Diese Ergebnisse wurden mit den Daten eines Kooperationspartners verglichen, der in einem GST-Pull-Down Experiment die mono-Ubiquitinierung von STS-1 und STS-2 nachweisen konnte (**Abb. 3.16B**).¹²³

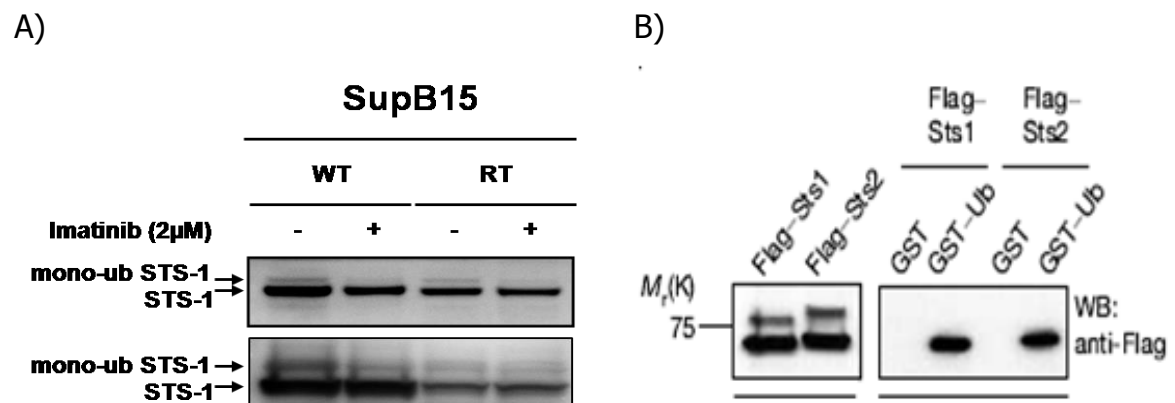


Abb. 3.16 Imatinib moduliert die mono-Ubiquitinierung von STS-1

Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen wurden sowohl mit als auch ohne einer vorherigen Imatinib Behandlung lysiert und untersucht.

Abbildung A → Bei der Untersuchung der Gesamtzelllysate zeigte sich eine Bande oberhalb von STS-1 in beiden Zelllinien, die nach Zugabe von Imatinib sowohl in Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen weitestgehend verschwindet.

Abbildung B → 293T Zellen wurden mit Flag markiertem STS-1 und STS-2 transfiziert. Unter Verwendung eines gegen die Flag-Markierung gerichteten spezifischen Antikörpers konnten zwei Banden detektiert werden. Da nur nicht ubiquitiniertes STS-1 seinerseits ubiquitinierte Proteine mittels der UBA Domäne binden kann, konnte lediglich nicht ubiquitiniertes STS-1 an GST-Kügelchen binden, die ihrerseits Ubiquitin gebunden hatten. Dies führt zu dem Schluss, dass die Sekundärbande eine mono-ubiquitinierte Form von STS-1 darstellt.

*Abbildung aus Hoeller et al.*¹²³

3.6 Analyse des Interaktionsvermittelten Teil von BCR/ABL

Um den funktionellen Mechanismus der Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 erklären zu können, ist es notwendig zu erfahren, welche Domänen bei dieser Interaktion beteiligt sind. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Interaktionsschnittstelle im BCR- oder ABL-Anteil des p185^{BCR/ABL} Fusionsproteins liegt. Zu diesem Zweck wurden BaF3 Zellen, die bereits BCR, den ABL Anteil (#ABL) von BCR/ABL oder den ABL-Anteil inklusive der Oligomerisierungsdomäne von BCR (BCC-ABL) stabil exprimieren, zusätzlich mit STS-1 transduziert (**Abb. 3.17**).



Abb. 3.17
BCR/ABL Konstrukte zur Identifizierung der Interaktionsdomäne

Um den interagierenden Bereich von BCR/ABL zu identifizieren, wurden BaF3 Zellen verwendet, die die native bzw. unterschiedlich trunkierten Varianten von BCR/ABL stabil exprimieren. Bei BCR und #ABL handelt es sich um den jeweiligen Einzelteil des p185^{BCR/ABL} Fusionsproteins. Um die Rolle der N-Terminal lokalisierten Oligomerisierungsdomäne (Coiled-Coil Domäne = CC) zu berücksichtigen, wurden BaF3 Zellen mit BCC-ABL transduziert. Bei dieser ABL Form wurde die Coiled-Coil Domäne direkt an #ABL kloniert.

Die vier doppeltransduzierten Zelllinien wurden verwendet, um mittels Co-Immunpräzipitation die Interaktion zwischen STS-1 und den jeweils trunkierten Formen von BCR/ABL zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL durch den ABL-Teil vermittelt wird (**Abb. 3.18**). Im Gegensatz dazu konnte eine Interaktion zwischen BCR und STS-1 nicht nachgewiesen werden. Da STS-1 auch an das trunkeierte ABL ohne Oligomerisierungsdomäne bindet, kann geschlossen werden, dass eine Oligomerisierung von BCR/ABL für die Bindung an STS-1 nicht notwendig ist.

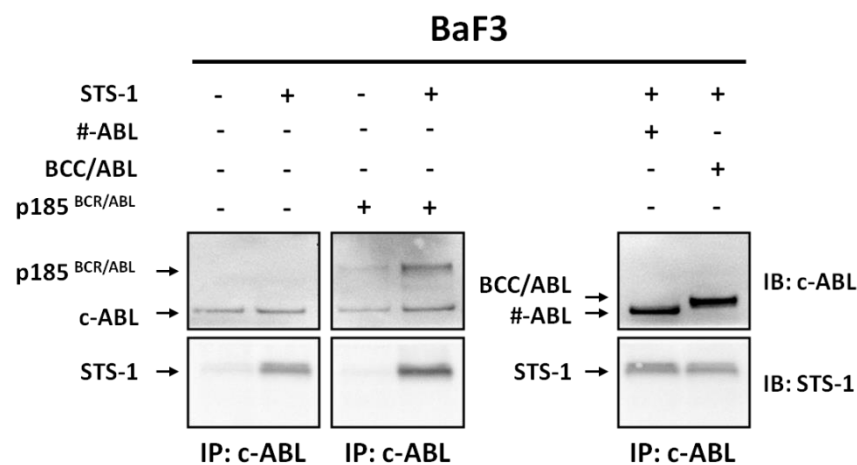


Abb. 3.18
Der ABL-Anteil von BCR/ABL interagiert mit STS-1

BaF3 Zellen wurden mit STS-1 sowie p185^{BCR/ABL}, mit einer trunkeierten BCR/ABL Version (BCC/ABL) oder #-ABL transduziert. Es konnte eine Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL sowie den trunkeierten ABL Formen gezeigt werden. Die Oligomerisierungsdomäne scheint demnach für die Interaktion der beiden untersuchten Proteine nicht von Bedeutung zu sein.

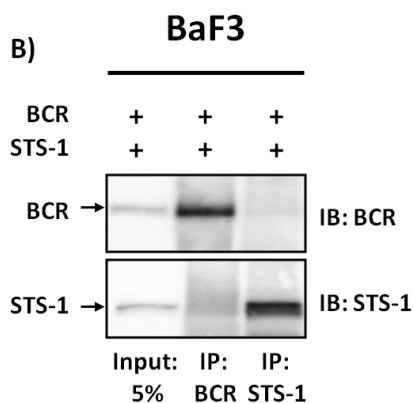
Nachdem die Interaktion mit dem ABL-Anteil von BCR/ABL nachgewiesen werden konnte, musste gezeigt werden, ob auch der BCR-Anteil von BCR/ABL eine Bindung mit STS-1 vermitteln kann. Unter Verwendung von BCR und STS-1 überexprimierenden BaF3 Zellen wurde wiederum mittels Co-Immunpräzipitation eine mögliche Interaktion untersucht. Bei diesem Experiment wurde die Präzipitation sowohl mit BCR Antikörpern, als auch mit STS-1 Antikörpern durchgeführt. In beiden Fällen konnte eine Interaktion nicht nachgewiesen werden (**Abb. 3.19**).

A)



Abb. 3.19 Interaktionsanalyse zwischen BCR und STS-1

B)



Für die Untersuchung einer Interaktion zwischen dem BCR Anteil von BCR/ABL und STS-1 wurden BaF3 Zellen verwendet, die beide Proteine stabil exprimieren. Mittels Co-Immunpräzipitation konnte eine Bindung der beiden Proteine ausgeschlossen werden. Für die Präzipitation wurden sowohl BCR Antikörper als auch STS-1 Antikörper verwendet.

3.7 STS-1 wird von BCR/ABL phosphoryliert

Es ist bekannt, dass BCR/ABL die Aktivität oder das Expressionsniveau verschiedener Gruppen an Phosphatasen beeinflussen kann^{124,125}. Im Gegenzug sind verschiedene Phosphatasen in der Lage BCR/ABL zu dephosphorylieren.¹²⁶ Daher wurde untersucht, inwiefern es eine bidirektionale funktionelle Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1 gibt. Es wurde mittels Co-IP untersucht, inwiefern BCR/ABL die Phosphorylierung von STS-1 beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden BaF3 Zellen verwendet, die stabil STS-1 exprimieren und anschließend mit p185^{BCR/ABL} oder einem Kontrollvektor transduziert. Die resultierenden Ergebnisse zeigten eine deutliche Phosphorylierung von STS-1 in der Anwesenheit von BCR/ABL (**Abb. 3.20**). Durch die Zugabe von 1 μ M Imatinib wurde BCR/ABL in den BaF3 Zellen weitestgehend dephosphoryliert und dieses führte ebenfalls zu einer reduzierten Phosphorylierung von STS-1. Durch die Behandlung mit Imatinib konnte somit eine BCR/ABL vermittelte Phosphorylierung von STS-1 bestätigt werden.

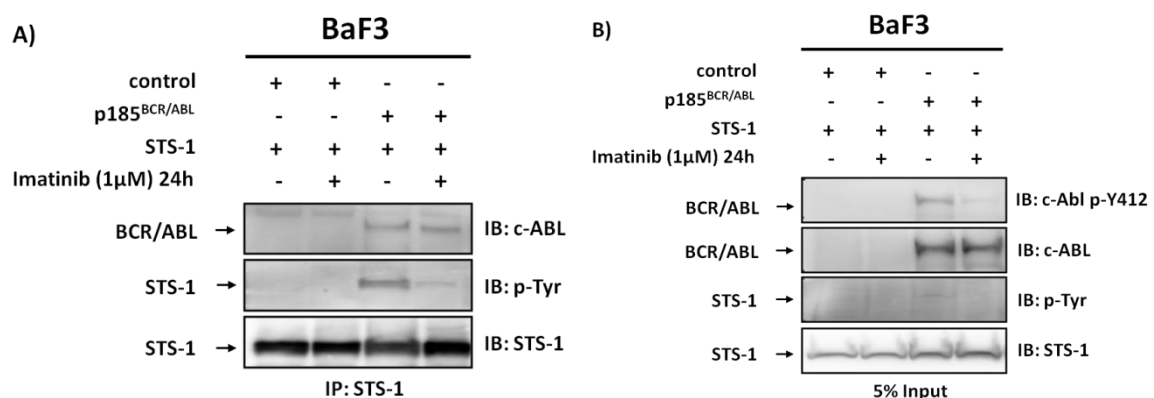


Abb. 3.20
Imatinib unterbindet die Phosphorylierung von STS-1

BaF3 Zellen wurden mit STS-1 und p185^{BCR/ABL} oder einem Kontrollvektor transduziert. Mittels STS-1 spezifischen Antikörpern wurde eine Co-IP durchgeführt, mit der eine BCR/ABL abhängige Phosphorylierung von STS-1 durch die Verwendung eines Phospho-Tyrosin spezifischen Antikörpers nachgewiesen wurde. Diese Phosphorylierung von STS-1 konnte nach Behandlung mit Imatinib nicht mehr nachgewiesen werden.

3.8 STS-1 dephosphoryliert BCR/ABL

Die Autophosphorylierung von BCR/ABL kann an drei verschiedenen Tyrosinresten erfolgen. Ein Tyrosin liegt im BCR-Anteil (Y177) und zwei weitere sind im ABL-Anteil von BCR/ABL (Y245 und Y412) lokalisiert. Um festzustellen, ob STS-1 eine oder mehrere dieser Autophosphorylierungsstellen dephosphoryliert, wurde der Effekt von STS-1 auf diese Tyrosine in BaF3 Zellen untersucht, die BCR/ABL in der An- bzw. Abwesenheit von STS-1 stabil exprimieren. Im Einklang mit der Erkenntnis, dass STS-1 nur mit dem ABL-Anteil des Fusionsproteins interagiert, wurde eine vorrangige Dephosphorylierung der ABL-ständigen Tyrosine bestätigt. Mittels densitometrischer Analysen konnte eine etwa 60 %ige Dephosphorylierung von Y245 und Y412 nachgewiesen werden (**Abb. 3.21**).

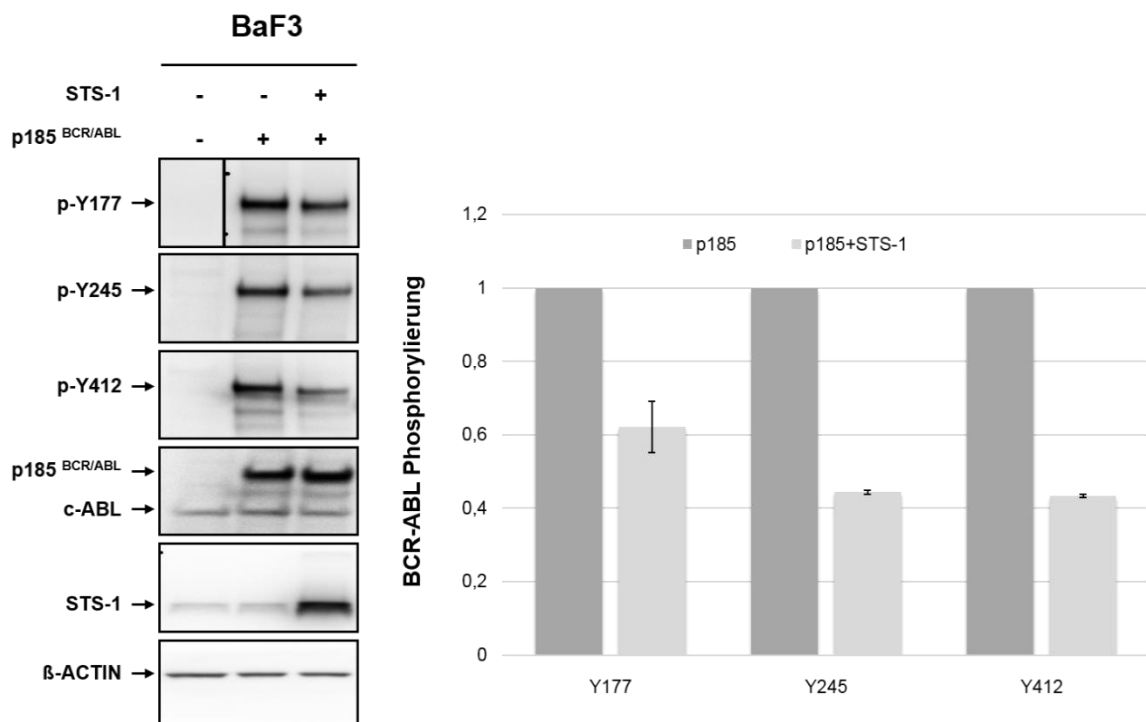


Abb. 3.21
STS-1 kann BCR/ABL partiell dephosphorylieren

Die Proteine aus BCR/ABL und STS-1 exprimierenden BaF3 Zelllysaten wurden mittels SDS-Page der Größe nach aufgetrennt und anschließend das Phosphorylierungslevel von drei Tyrosinresten (Y177, Y245, Y412) untersucht, die die Autophosphorylierungsstellen von BCR/ABL darstellen. Die resultierenden Daten wurden densitometrisch ausgewertet und anschließend bezüglich der BCR/ABL sowie β -Actin Expression normalisiert.

Die im BCR-Anteil lokalisierte Autophosphorylierungsstelle Tyrosin 177 wies im Gegensatz dazu lediglich eine Dephosphorylierung von ~40 % auf. Um herauszufinden inwiefern eine reduzierte STS-1 Expression zur TKI Resistenz in Sup B15 RT Zellen beiträgt, wurde die Autophosphorylierung von BCR/ABL in Sup B15 WT und RT vergleichend untersucht. Das Level der Autophosphorylierung in beiden Sup B15 Zelllinien wurde densitometrisch analysiert und mittels des BCR/ABL und β -Actin Expressionslevels normalisiert. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchung in BaF3 Zellen war eine Reduzierung der Autophosphorylierung in Sup B15 WT Zellen zu erwarten, da in diesen Zellen die STS-1 Expression signifikant höher ist als in Sup B15 RT Zellen.

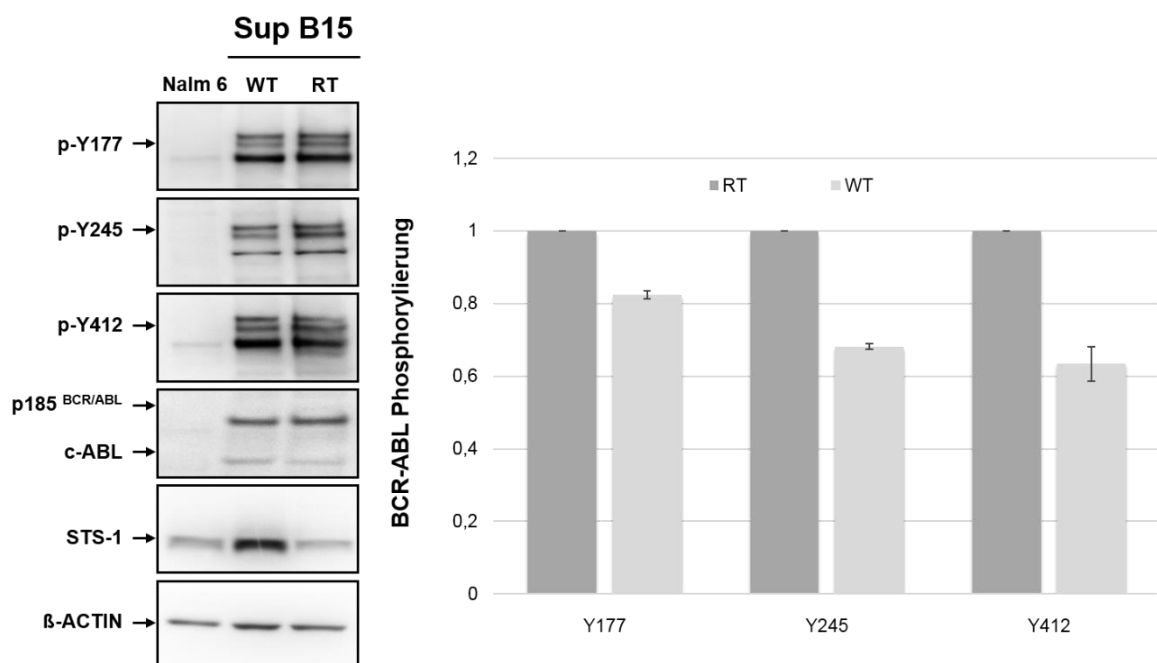


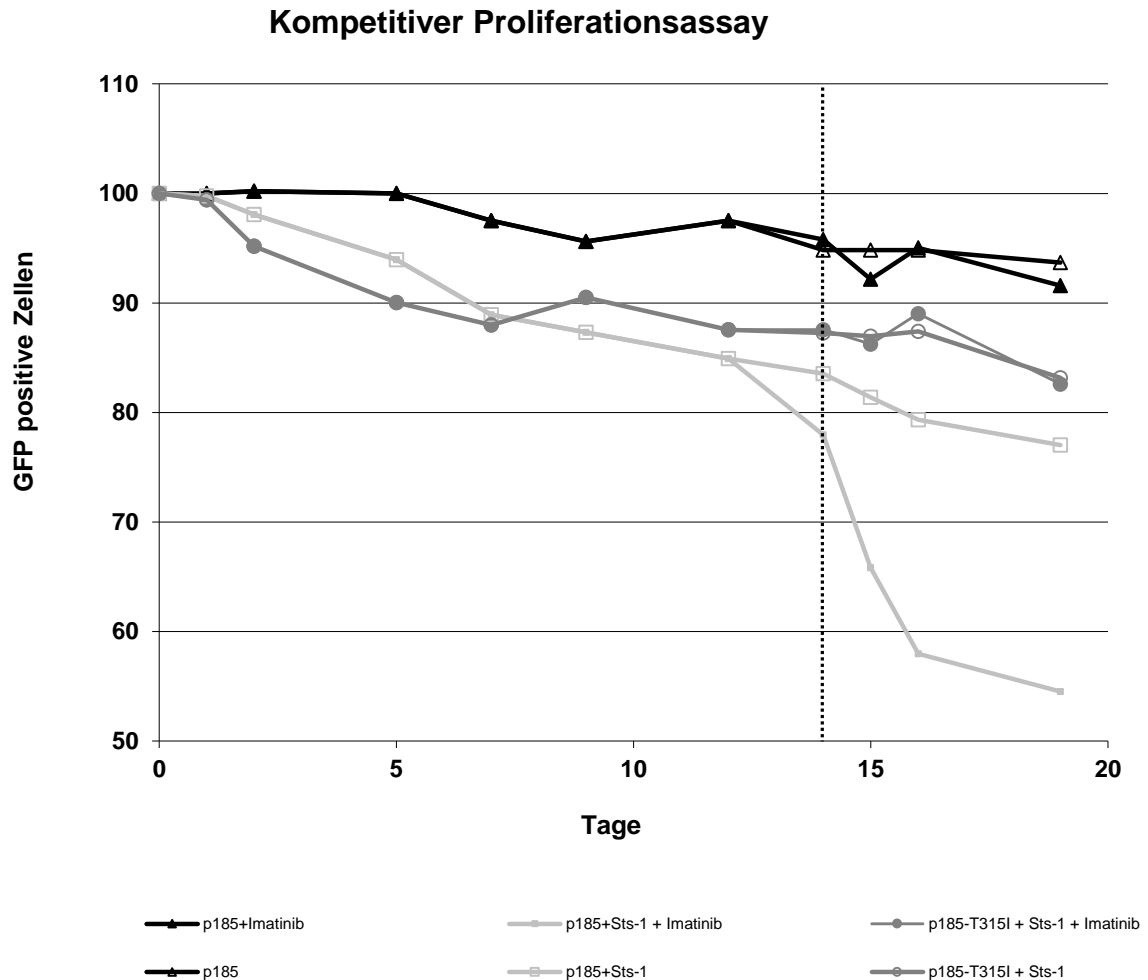
Abb. 3.22 **Endogenes STS-1 dephosphoryliert BCR/ABL in Ph⁺ ALL Zellen**

Das Phosphorylierungslevel von Y177, Y245 und Y412 von endogenem BCR/ABL wurde in Sup B15 WT und -RT Zellen untersucht und verglichen. Eine gesteigerte STS-1 Expression in Sup B15 WT Zellen hat eine Dephosphorylierung von BCR/ABL zur Folge, die deutlich ausgeprägter im ABL-Anteil von BCR/ABL ist.

Gerade im ABL-Anteil von BCR/ABL konnte eine deutliche Reduzierung der Phosphorylierung an beiden dort lokalisierten Autophosphorylierungsstellen (Y245 und Y412) gezeigt werden. Die Reduzierung der Phosphorylierung in Sup B15 WT Zellen betrug an beiden Tyrosinen 30 - 40 % im Vergleich zu Sup B15 RT Zellen. Tyrosin 177 zeigt im Vergleich zu den resistenten Zellen eine ~17 %ige Dephosphorylierung in den TKI sensitiven Sup B15 Zellen (**Abb. 3.22**). Diese Daten führen zu der Schlussfolgerung, dass eine geringere STS-1 Aktivität zum Resistenzphänotyp in Sup B15 RT Zellen beiträgt.

3.9 STS-1 reduziert die Proliferation in Ph⁺ Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass STS-1 die Autophosphorylierung von BCR/ABL reduziert, wurde untersucht, welchen Einfluss STS-1 auf die Proliferation von BCR/ABL exprimierenden BaF3 Zellen (Ph⁺ BaF3 Zellen) hat. Mittels BCR/ABL transformierte BaF3 Zellen sind in der Lage auch ohne Zugabe von IL-3 zu proliferieren, so dass BCR/ABL regulierende Effekte, die Auswirkungen auf das Wachstum haben, in diesem Zellsystem nachgewiesen werden können. Ein möglicher Effekt von STS-1 auf Ph⁺ BaF3 Zellen wurde mittels eines modifizierten kompetitiven Proliferationstests (PCA: proliferation competition assay) ermittelt. Der Entzug von IL-3 bewirkt eine Selektion von p185^{BCR/ABL} stabil exprimierenden BaF3 Zellen, welche anschließend mit einem GFP Vektor oder mit GFP markiertem STS-1 transduziert wurden. Die Proliferation dieser beiden Zelllinien wurde mit BaF3 Zellen verglichen, die p185^{BCR/ABL T315I} und GFP markiertes STS-1 stabil exprimieren. Der Effekt von STS-1 wurde durch die Bestimmung des Anteils GFP positiver Zellen mittels FACS-Analyse innerhalb der jeweiligen Zelllinie ermittelt. Die GFP-Expression an Tag vier nach der Transduktion wurde als Wert zur Normalisierung verwendet. Ebenso wurde die BaF3 Zelllinie, die lediglich GFP ohne STS-1 exprimiert, als Kontrolle verwendet, um einen proliferationsinhibierenden Effekt des verwendeten Vektors auszuschließen. Im Vergleich zur Kontrolle konnte ein leichter inhibitorischer Effekt auf die Proliferation in STS-1 exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte in BaF3 Zellen gezeigt werden, die sowohl p185^{BCR/ABL} als auch p185^{BCR/ABL T315I} exprimieren (**Abb. 3.23**).

**Abb. 3.23****STS-1 erhöht die TKI Sensitivität und reduziert die Proliferation**

BaF3 Zellen wurden mit p185^{BCR/ABL} oder p185^{BCR/ABL T315I} in Kombination mit STS-1 oder einem GFP exprimierenden Kontrollvektor transduziert. Um ein BCR/ABL abhängiges Wachstum in diesen BaF3 Zellen zu gewährleisten, wurde den Zellen IL-3 entzogen. Die Größe der GFP-positiven Zellfraktion wurde vier Tage nach Transduktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt, um eine optimale Expression der transduzierten Proteine zu gewährleisten. **14 Tage nach IL-3 Entzug wurden die Zellen zusätzlich mit 0,5 µM Imatinib behandelt (gestrichelte Linie).** STS-1 hat einen leicht proliferationshemmenden Effekt, der durch die Zugabe von Imatinib noch verstärkt wird.

Die Proliferation von BCR/ABL transformierten BaF3 Zellen kann durch die Behandlung mit Imatinib reduziert werden und führt in diesen Zellen schließlich zu Apoptose. Nachdem gezeigt werden konnte, dass STS-1 die Proliferation von Ph⁺ BaF3 Zellen reduziert, galt es nun zu untersuchen, welchen Effekt eine zusätzliche Behandlung mit 0,5 µM Imatinib auf STS-1 und BCR/ABL exprimierende Zellen hat. Im Gegensatz zur Kontrollpopulation und der T315I Mutante konnte eine um etwa das fünffache reduzierte Proliferationsrate in BCR/ABL positiven BaF3

Zellen nachgewiesen werden. Diese Experimente konnten zeigen, dass STS-1 nicht nur einen leicht reduzierenden Effekt auf die Proliferation von Ph⁺ Zellen hat, sondern auch deren Sensitivität gegenüber Imatinib deutlich steigern kann. Die Sensitivität der T315I Mutation gegenüber Imatinib konnte jedoch nicht durch die Überexpression von STS-1 erhöht werden.

3.10 Dexamethason induziert STS-1 Expression

Dexamethason ist ein therapeutisch vielseitig eingesetztes künstliches Glukokortikoid,¹²⁷⁻¹²⁹ welches die Immunantwort pharmakologisch herunterreguliert durch die Modulierung der Signalweitergabe des T-Zell Rezeptors.¹³⁰ Dexamethason ist 20-30-mal potenter in seiner Wirkung wie natürlich vorkommendes Kortisol und 4-5-mal potenter wie Prednison, ein weiteres künstliches Glukokortikoid, das neben anderen Bereichen auch bei der Behandlung von ALL eingesetzt wird. Onkologisch kann Dexamethason sowohl begleitend zu einer Chemotherapie eingesetzt werden, um Nebenwirkungen zu minimieren, als auch als alleiniges Chemotherapeutikum bei einigen hematopoetischen Erkrankungen.¹³¹ Aufgrund der Tatsache, dass STS-1 ein wichtiger molekularer Suppressor des T-Zell Rezeptor Signalweges ist,^{65,132} liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Dexamethason die STS-1 Aktivität durch die Regulierung der Expression verändern kann.

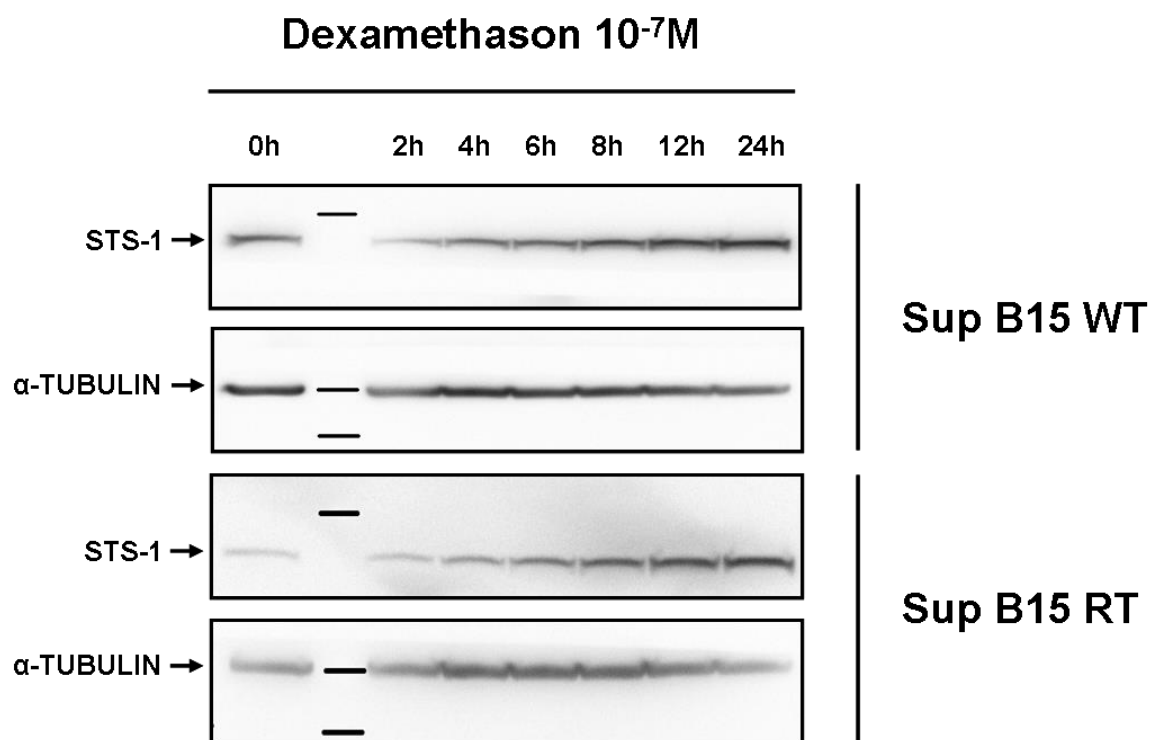


Abb. 3.24
Dexamethason erhöht die Expression von STS-1

Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen wurden 24 h lang mit $10^{-7} M$ Dexamethason behandelt. Anschließend wurde die STS-1 Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h – 24 h) gemessen. In beiden Zelllinien wurde ein deutlicher Anstieg der STS-1 Expression nachgewiesen.

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen mit klinisch relevanten Konzentrationen (10^{-7} M) an Dexamethason behandelt. Anschließend wurde die Veränderung der STS-1 Expression mittels Western-Blot Analysen ermittelt. Es wurde die Expression von STS-1 in einem zeitlichen Verlauf von 0 h - 24 h gemessen (**Abb. 3.24**).

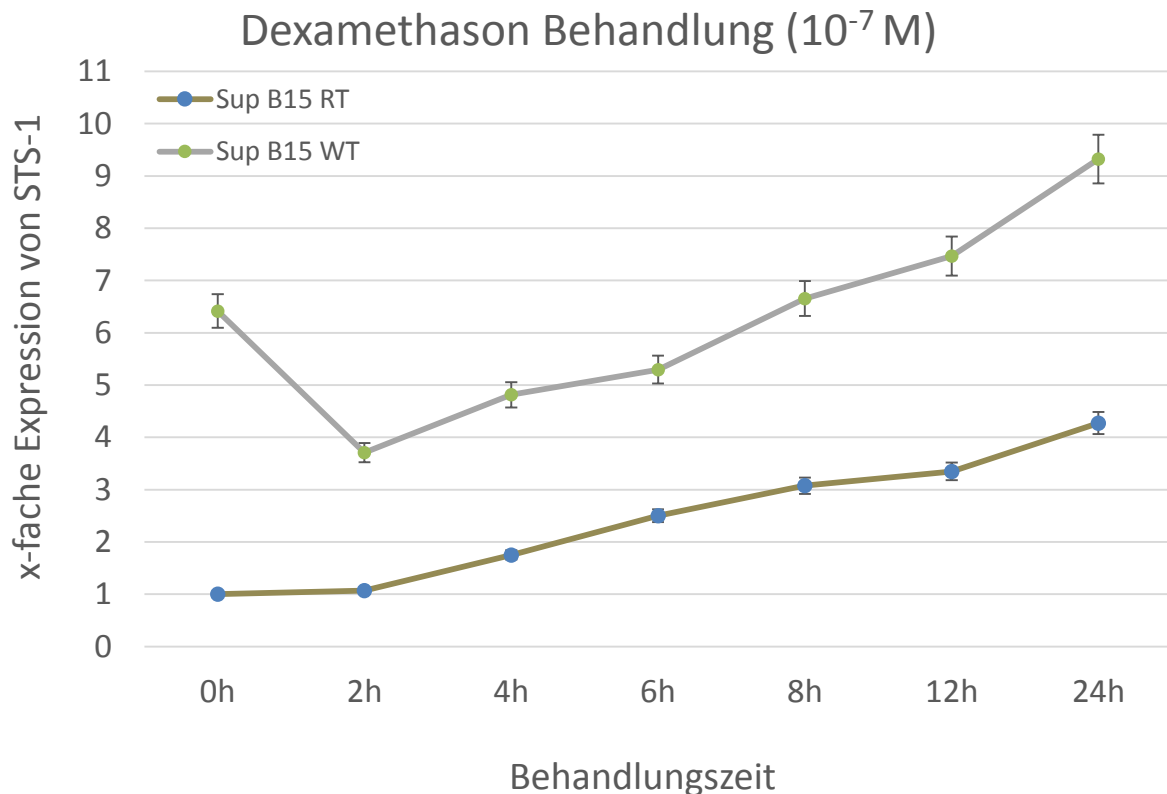


Abb. 3.25
Dexamethason erhöht die STS-1-Expression in Sup B15 Zelllinien

Die Analyse der STS-1-Expression nach Dexamethasonbehandlung wurde densitometrisch ausgewertet. Sup B15 RT Zellen weisen nach 24 h eine 4,5 mal höheres STS-1 Expression auf, wohingegen die Expression von STS-1 in Sup B15 WT Zellen nach 24 h Dexamethasonexposition nur um das 2,5 fache steigt.

Es ist zu erkennen, wie die Expression von STS-1 im Laufe der Zeit im Vergleich zu unbehandelten Zellen ansteigt, bis sie sich in Sup B15 RT Zellen nach 24 h um das 4,5-fache gesteigert hat. In Sup 15 WT Zellen hingegen konnte lediglich eine Steigerung um das 2,5-fache gezeigt werden (**Abb. 3.25**). Mittels dieser Daten kann ein expressionssteigernder Effekt von Dexamethason auf STS-1 bestätigt werden.

Neben der hier beschriebenen Wirkung auf die STS-1 Expression findet Dexamethason auch Anwendung als Therapeutikum bei ALL Patienten. Dies führte zu der Annahme, dass Dexamethason induzierte Expressionssteigerung von STS-1 eine erhöhte Dephosphorylierung von BCR/ABL zur Folge hat und dadurch die Sensitivität beider Sup B15 Zelllinien gegenüber Imatinib steigert. Um dies zu zeigen, wurden Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen mit 10^{-9} M Dexamethason alleine und in Kombination mit Imatinib behandelt und anschließend die Proliferationsrate mittels eines XTT Tests ermittelt. Man erkennt in beiden Zelllinien einen deutlich inhibitorischen Effekt von Dexamethason auf die Proliferation. Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Behandlung mit Imatinib deutlich verstärkt. Gerade in Sup B15 RT Zellen konnte eine hoch signifikante Reduktion der Proliferation mittels der Doppelbehandlung im Vergleich zu einer Imatinib Einzelbehandlung festgestellt werden (**Abb. 3.26**).

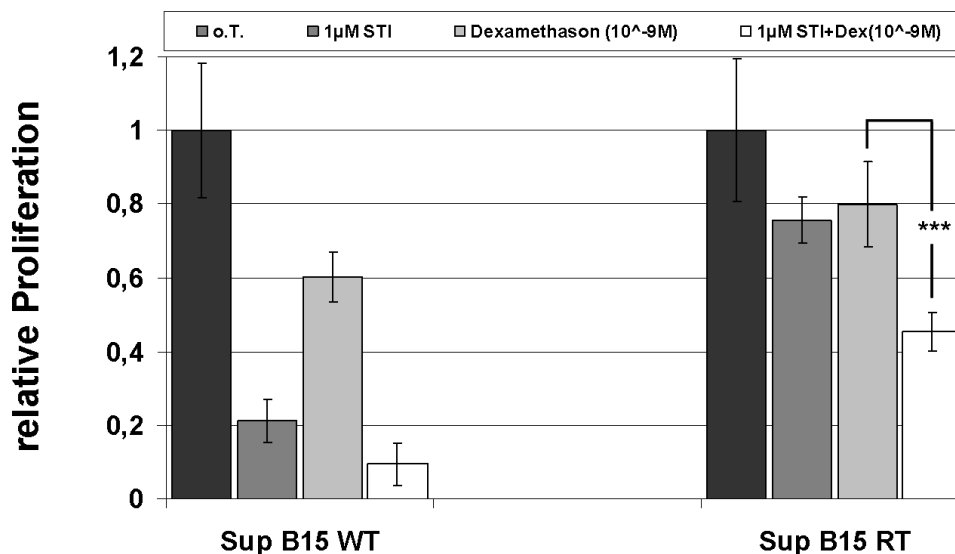


Abb. 3.26

Dexamethason erhöht die Imatinibsensitivität in TKI resistenten Zellen

Sup B15 WT und Sup B15 RT Zellen wurden mit 1 μ M Imatinib und 10^{-9} M Dexamethason jeweils allein oder in Kombination behandelt. Nach zwei Tagen wurde ein XTT Test durchgeführt. Eine kombinierte Dexamethason- und Imatinib-Behandlung reduziert die Proliferation in Sup B15 RT Zellen. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle verwendet.

4 Diskussion

Die Behandlung Philadelphia positiver Leukämien mittels inhibitorisch wirkender Therapien sowie die Erforschung von Resistenzmechanismen fokussieren sich überwiegend auf konstitutiv aktive Kinasen, die für die leukämische Transformation verantwortlich sind und den leukämischen Phänotyp wesentlich beeinflussen. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die Deregulation von Phosphatasen ebenso zur Leukämogenese beitragen kann. Phosphatasen fungieren als Gegenspieler von Kinasen, indem sie der Kinaseaktivität durch deren Inaktivierung entgegenwirken und damit die involvierten Signalwege modulieren. Dadurch können Signalwege trotz einer unveränderten Kinase konstitutiv aktiv sein.

Dass die Veränderung der Phosphatasefunktion ein ähnlich starkes onkogenes Potential hat wie dysfunktionale Kinasen, konnte für Phosphatasen wie PTP1B, PTEN und PP2A in diversen hämatopoetischen Erkrankungen,¹³³⁻¹³⁶ aber auch in soliden Tumoren¹³⁷ gezeigt werden. Gerade die Arbeit von Koyama et al.¹ zeigt, dass die

Inhibierung der Phosphatase PTP1B eine Imatinib Resistenz in Ph⁺ Leukämiezellen zur Folge hat.

Basierend auf den Arbeiten von Juric et al., 2007² und Marc Brehme et al., 2009¹¹⁸ wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression von STS-1 in der Ph⁺ prä B-ALL Zelllinie Sup B15 (Sup B15 WT) sowie einer im Labor von Prof. Dr. Ottmann daraus abgeleiteten Imatinib resistenten Zellpopulation (Sup B15 RT) untersucht. Zunächst wurde die Vergleichbarkeit der beiden Zelllinien mittels zytogenetischer Untersuchungen, Immunophänotypisierung und Mutationsanalysen der TKD bestätigt (**Abb. 3.1-3.3**). Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine Mutation im Bereich der Tyrosinkinase Domäne als Ursache einer erworbenen Imatinib-Resistenz ausgeschlossen werden (**Abb. 3.3**). Es konnten die Ergebnisse von Juric et al., 2007² im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass in der Ph⁺ ALL Zelllinie Sup B15 STS-1 höher exprimiert wird als in der Ph⁻ ALL Zelllinie Nalm6 (**Abb. 3.21**). Beim Vergleich der STS-1 Expression in den beiden Sup B15 Zelllinien konnte eine deutlich geringere Expression von STS-1 in Sup B15 RT Zellen festgestellt werden (**Abb. 3.11**). Mittels qRT-PCR konnte eine transkriptionelle Regulation der hier untersuchten Phosphatase nachgewiesen werden (**Abb. 3.11**). Aufgrund der zuvor erwähnten Publikationen lag die Vermutung nahe, dass auch die Herunterregulation von STS-1 einen Einfluss auf den Resistenzmechanismus in der Ph⁺ ALL haben könnte.^{1,133-136}

Um dies zu untersuchen, wurden BaF3 Zellen mit p185^{BCR/ABL} oder p185^{BCR/ABL}T315I transduziert und mit den gleichen Zellen, denen zusätzlich STS-1 transduziert wurde, in einem kompetitiven Proliferationsassay vergleichend untersucht. Die Auswertung dieses Experimentes zeigte, dass Zellen, die STS-1 co-exprimieren, im Vergleich zu einfach transduzierten Zellen eine reduzierte Proliferation aufweisen. Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Behandlung mit 0,5 µM Imatinib an Tag 14 in p185^{BCR/ABL} + STS-1 doppelt transduzierten Zellen erheblich verstärkt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und auf das prä B-ALL spezifische Zellmodell zu übertragen, wurde die Auswirkung von STS-1 auf die Proliferation sowie das Ansprechen auf Imatinib in Sup B15 Zellen untersucht.

Die Manipulation der Proteinexpression mittels Trans-, Lipo- und Nukleofektion sowie lentiviraler Transduktion war in diesen Zellen nicht erfolgreich. Daher wurde

ein pharmakologischer Ansatz gewählt. Dieser basierte auf der Hypothese, dass die bekannte immunsuppressive Wirkung von Glukokortikoiden auf T-Zellen über STS-1 vermittelt werden kann. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass ein potentes Glukokortikoid wie Dexamethason, welches eine gegenüber Cortisol 30-fach stärkere Wirksamkeit aufweist, eine Hochregulation von STS-1 induzieren könnte. Diese Hypothese konnte in mehreren Experimenten bestätigt werden, die zeigten, dass eine Behandlung mit Dexamethason für 24 h bereits in nanomolarer Konzentration eine bis zu vierfache Steigerung der STS-1 Expression in Sup B15 RT Zellen zur Folge hat. Im Verhältnis zu unbehandelten Zellen ist die Steigerung der STS-1 Expression in Sup B15 RT Zellen deutlich ausgeprägter als bei der Imatinib sensitiven Population (**Abb. 3.24**). Obwohl dieses Experiment mehrfach wiederholt wurde, konnte mittels Western-Blot und anschließender densitometrischer Auswertung lediglich eine qualitative Aussage über den expressionssteigernden Effekt von Dexamethason gemacht werden (**Abb. 3.25**). Dexamethason erweist sich somit nicht nur als Modulator für die STS-1 Expression, sondern auch als klinisch relevantes Therapeutikum. Aufgrund der Vermutung, dass eine geringere Expression von STS-1 zur Vermittlung der Resistenz in Sup B15 Zellen beiträgt, müsste eine Dexamethason vermittelte Hochregulierung der STS-1 Expression in Sup B15 RT Zellen ein erneutes Ansprechen von Imatinib zur Folge haben. Diese Annahme wurde mittels beider Sup B15 Zelllinien und einem XTT Proliferationsassay untersucht. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden, zeigen eine signifikante Reduktion der Proliferation in Sup B15 RT Zellen, wenn diese mit Dexamethason und Imatinib behandelt werden. Dieser Effekt konnte mit einer alleinigen Behandlung mit Dexamethason nicht gezeigt werden (**Abb. 3.26**).

Da Glukokortikoide und ihre Analogons bei lymphatischen Erkrankungen therapeutisch eingesetzt werden und Apoptose und/oder einen Zellzyklusarrest induzieren,¹³⁸⁻¹⁴⁰ stellte sich die Frage, ob die bekannten Wirkmechanismen tatsächlich STS-1 vermittelt sind oder andere Signalwege involvieren.

Buttgereit et al. entwickelten das modulare Konzept der Glukokortikoidwirkung, nachdem sich drei qualitative Wirkmechanismen unterscheiden lassen.¹⁴¹⁻¹⁴³

- 1.) Therapeutische Wirkung über genomische und ligandenspezifische Mechanismen vermittelt durch niedrige Konzentration mit einer zeitlichen Latenz von mehreren Stunden.
- 2.) Spezifische nicht genomische Wirkung, die ebenfalls rezeptorabhängig ist, aber dafür transkriptions- und translationsunabhängig, vermittelt durch niedrige bis mittlere Konzentrationen. Die Wirkung ist nach Sekunden bis Minuten messbar.
- 3.) Es gibt Hinweise auf unspezifische nicht genomische Effekte, die weder durch Induktion noch Repression der Transkription bestimmter Gene erklärt werden können.

Im Rahmen der therapeutischen Wirkung, die ihre volle Wirkung erst nach mehreren Stunden entfaltet, wandert das Glukokortikoid durch die Zellmembran und bindet im Zytoplasma an den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR). Dies hat eine Konformationsänderung zur Folge, wodurch verschiedene Chaperone und Hitzeschockproteine vom GR abgespalten werden.¹⁴⁴ Der so freigesetzte GR kann die Transkription potentieller Zielgene auf zwei verschiedene Arten kontrollieren (**Abb. 4.1**). Zum einen können aktivierte GR-Homodimere an spezifische Gene binden, die über ein GRE (Glucocorticoid-response-elements) ihrer Promotorregion verfügen. Dadurch kommt es zu einer Induktion antiinflammatorischer Gene, wie z. B. Lipocortin-1,¹⁴⁵ IL-1-Rezeptorantagonist¹⁴⁶ oder IκBα^{147,148}. Darüber hinaus konnte aber auch eine Kontrolle von Genen nachgewiesen werden, die über keine GRE-Bindestelle verfügen.¹⁴⁹ Zum anderen wird vermutet, dass aktivierte GR-Monomere mit anderen Transkriptionsfaktoren (TF) interagieren und so repressiv auf verschiedene Gene, wie z. B. proinflammatorische Zytokine¹⁵⁰ wirken können. Direkte Protein-Protein Interaktionen zwischen GR-Monomeren und TF wurden bereits für die p65 Untereinheit von NFκB¹⁵¹, AP-1¹⁵², STAT3¹⁵³, STAT5¹⁵⁴ und STAT6¹⁵⁵ beschrieben. Nicht zuletzt bewirken Glukokortikoide eine posttranskriptionelle Beeinflussung über eine Modifizierung der mRNS-Stabilität.¹⁵⁶

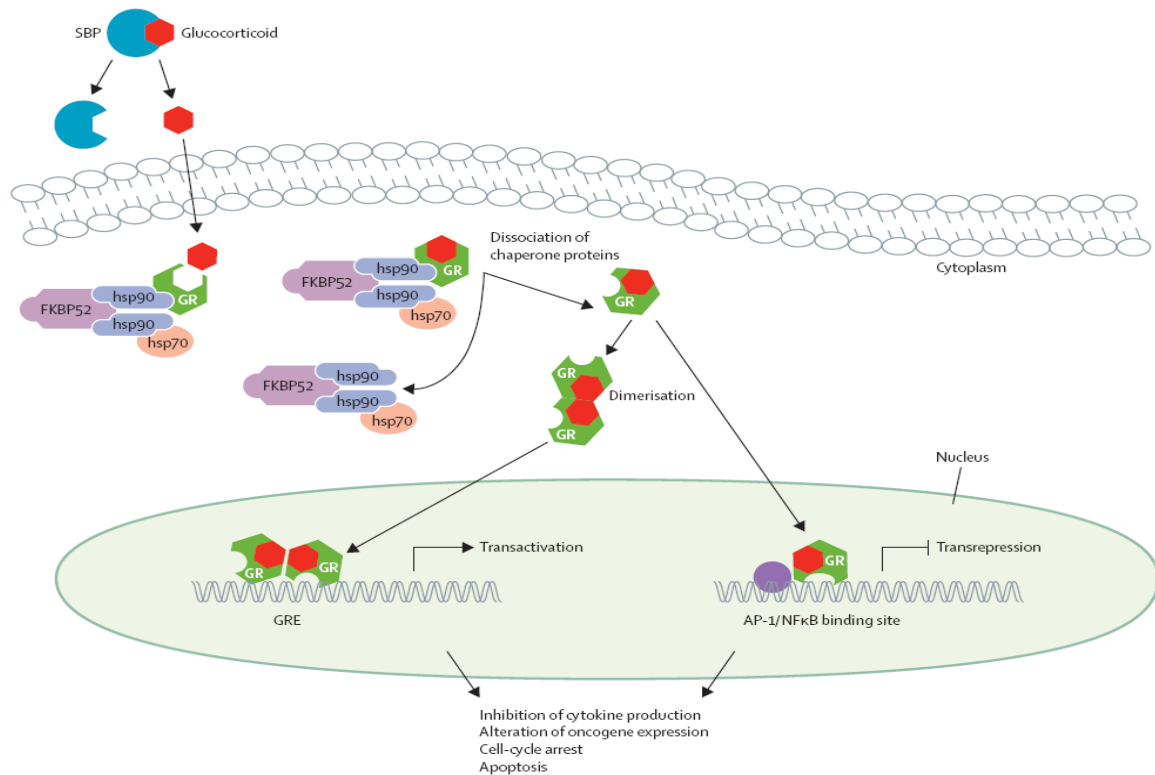


Abb. 4.1

Glukokortikoidvermittelte Transkriptionsregulation von Genen

Extrazelluläres Glukokortikoid löst sich vom Steroid-Bindeprotein (SBP), diffundiert durch die Zellmembran und bindet an den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR). Dieser formt einen Proteinkomplex mit Chaperonen und Hitzeschock-Proteinen. Sobald ein Glukokortikoid an den GR bindet löst sich dieser aus dem Proteinkomplex und wandert als Homodimer oder Monomer in den Zellkern. Dimere sind in der Lage sich an der DNS an sogenannte Glucocorticoid-response-elements (GRE) zu binden und die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren. Als Monomere können sie mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NFκB interagieren und deren Aktivität als Transkriptionsfaktor unterbinden. Beide Mechanismen produzieren einen klinischen Effekt, der sich in Form von Apoptose, Zellzyklusarrest, veränderte Expression von Onkogenen oder der Inhibierung der Zytokinproduktion widerspiegelt. *Abbildung aus Inaba et al.*¹³¹

Bezug nehmend auf die von Buttgerit beschriebenen Wirkmechanismen beruht der klinische Einsatz von Dexamethason auf seiner stark genomischen Wirkung, die bereits bei geringen Dosierungen einen immunsuppressiven sowie antiinflammatorischen Effekt hat. Im Rahmen der Behandlung von akuten lymphatischen Leukämien muss allerdings auch der spezifische nicht genomische Effekt von Dexamethason berücksichtigt werden, der durch steroidselektive Membranrezeptoren vermittelt wird. Diese werden nicht nur in Monozyten oder Lymphomzellen exprimiert, sondern auch in humanen B-Lymphozyten.¹⁵⁷

4.1 Die Rolle von STS-1 in der resistenten Ph⁺ ALL

Aus den im Ergebnisteil präsentierten Resultaten wurden zwei Aussagen abgeleitet. Zum einen inhibierte eine erhöhte Expression von STS-1 die Proliferation in einer prä B-ALL Zelllinie und zum anderen zeigten BaF3 und TKI-resistente Sup B15 Zellen ein deutlich besseres Ansprechen auf Imatinib, wenn die Expression von STS-1 gesteigert wurde. Aufgrund der im Vorfeld zu dieser Arbeit publizierten Ergebnisse von Marc Brehme et al., 2009¹¹⁸ wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Interaktion von STS-1 und BCR/ABL in drei verschiedenen Zellsystemen mittels Co-IP untersucht (**Abb. 3.9, 3.10 und 3.15**). In allen Co-IP Experimenten konnte eine Wechselwirkung zwischen dem STS-1 Vektor und den Sapherose Beads durch die Verwendung eines Leervektors als Kontrolle ausgeschlossen werden (**Abb. 3.18 und 3.19**). Da wie zuvor erläutert eine genetische Modifizierung beider Sup B15 Zelllinien nicht erfolgreich war, wurde zunächst bei leicht transfizierbaren 293T Zellen demonstriert, dass BCR/ABL unabhängig vom Bruchpunkt an STS-1 bindet (**Abb. 3.9**). Um zu verifizieren, dass die Ergebnisse auch im Zellkontext der ALL gelten, wurde anschließend die Interaktion in stabil transduzierten murinen prä B-ALL Zellen (BaF3) erfolgreich nachgewiesen (**Abb. 3.10**). Schlussendlich konnten die bisherigen Beobachtungen mit endogen exprimiertem STS-1 und BCR/ABL in beiden Sup B15 Zelllinien verifiziert werden (**Abb. 3.15**). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in den murinen BaF3 Zellen konnte hier gezeigt werden, dass eine vorherige Imatinib-Behandlung die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL reduziert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Bindung der beiden untersuchten Proteine durch den Aktivierungszustand von BCR/ABL gesteuert wird. Wieso dieser Effekt in BaF3 Zellen nicht wiedergespiegelt wurde, konnte nicht geklärt werden. Gegebenenfalls wird dieser durch die Überexpression beider Proteine nivelliert. Auch wäre ein sekundärer Effekt von Imatinib denkbar, der im murinen Überexpressionssystem nicht zum Tragen kommt bzw. mittels Western-Blot nicht dargestellt werden kann. Aufgrund des eindeutigen Nachweises einer Interaktion beider Proteine auch auf endogenem Level, wurde erstens der Frage nachgegangen, welcher Teil von BCR/ABL die Bindung vermittelt und zweitens inwiefern eine Tetramerisierung für die Bindung wichtig ist. Diese Fragen konnten durch die Wahl von drei BCR/ABL Konstrukten beantwortet werden (**Abb. 3.18, 3.19**).

Es zeigte sich, dass alle ABL assoziierten Konstrukte eine Bindung zu STS-1 vermitteln konnten, wohingegen eine Interaktion zwischen BCR und STS-1 nicht nachzuweisen war (**Abb. 3.19**). Der zuvor beschriebene Effekt von Imatinib auf die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL ließ vermuten, dass der Aktivierungszustand sowie die Tetramerisierung von BCR/ABL eine wichtige Rolle spielt. Diese Frage war durchaus relevant, da die Tetramerisierung von BCR/ABL die Aktin-Bindedomäne aktiviert und für die konstitutive Aktivierung der Kinase verantwortlich ist. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da STS-1 mit dem trunkierten BCR/ABL (BCC-ABL), dem alleinigen ABL-Teil (#ABL) sowie dem endogenen c-ABL interagiert (**Abb. 3.18**). Es darf bei dieser Schlussfolgerung jedoch nicht vergessen werden, dass es sich hierbei um ein murines Zellsystem handelt, indem der inhibierende Effekt von Imatinib auf die Bindung auch in den anfänglichen Co-IP Experimenten nicht nachzuweisen war (**Abb. 3.10**). Um diese Frage abschließend zu klären, wäre es möglich die gleichen Konstrukte in einer modellierbaren humanen B-Zell Zelllinie zu untersuchen. Welche Domänen im Detail für die Interaktion von STS-1 und BCR/ABL verantwortlich sind und ob eventuell noch andere Proteine bei der Bindung selbst bzw. bei der Vermittlung dieser Bindung eine entscheidende Rolle spielen, konnte aus zeitlichen Gründen nicht nachgegangen werden. Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen Phosphatasen und BCR/ABL zum einen die Phosphorylierung der Phosphatase bedingt, aber auch zu einer Dephosphorylierung von BCR/ABL führt.¹²⁴⁻¹²⁶ In der hier vorliegenden Arbeit konnten im murinen Überexpressionssystem BaF3 gezeigt werden, dass STS-1 in Gegenwart von BCR/ABL phosphoryliert wird. Sobald die Zellen mit Imatinib behandelt werden ist parallel zur reduzierten BCR/ABL Phosphorylierung auch ein Rückgang der STS-1 Phosphorylierung zu erkennen (**Abb. 3.20**). Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die zusätzlich zu STS-1 einen Leervektor stabil exprimierten, wodurch die Vermittlung der STS-1 Phosphorylierung durch ein endogenes Protein ausgeschlossen werden konnte. Dieses Ergebnis könnte im Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Daten von Hoeller et al., 2006¹²³ und Kowanetz et al., 2004⁷⁰ ein Hinweis darauf sein, dass STS-1 durch die BCR/ABL vermittelte Phosphorylierung mono-ubiquitiniert und anschließend inaktiviert wird. Durch die Behandlung mit

Imatinib wird STS-1 nicht phosphoryliert und es kommt daher auch zu keiner mono-Ubiquitinierung und anschließenden Inaktivierung. Dieser Arbeitshypothese wird in **Kapitel 4.3** im Detail nachgegangen. Dieses Experiment wurde aus zeitlichen Gründen nicht in Sup B15 Zellen wiederholt. Auch wenn das gleiche Resultat zu erwarten ist, müsste die Beteiligung anderer Proteine oder ein Sekundäreffekt von Imatinib berücksichtigt werden. In einem vorher gezeigten Experiment konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen STS-1 und BCR/ABL nach Imatinib-Behandlung in der TKI resistenten Sup B15 Zelllinie sehr stark reduziert ist, wäre eine Untersuchung der Phosphorylierung von STS-1 nach Imatinib-Behandlung schwierig nachzuweisen.

Im Anschluss wurde untersucht, inwiefern sich die Phosphorylierung von BCR/ABL in Abhängigkeit von der STS-1 Expression in BaF3 Zellen (**Abb. 3.21**) und beiden Sup B15 Zelllinien (**Abb. 3.22**) verhält. Die densitometrische Auswertung zeigt eine partielle Dephosphorylierung der drei untersuchten Tyrosine (Tyr177, Tyr 245, Tyr 412). Diese Ergebnisse konnten durch die vergleichende Analyse der Sup B15 WT und -RT Zellen bestätigt werden. Auch wenn der Effekt nicht so deutlich ist wie im murinen Überexpressionssystem, so ist auch hier eine deutlich stärkere Dephosphorylierung an den ABL lokalisierten Tyrosinen zu erkennen. Wie in (**Abb. 3.5**) und (**Abb. 3.22**) zu erkennen, wird durch die hier verwendeten Phospho-Antikörper des Öfteren eine Doppelbande detektiert. Anhand dieser (**Abb. 3.5**) zeigt sich jedoch deutlich, dass bei der Behandlung der Zellen mit Imatinib die obere der beiden Banden verschwindet. Alle auswertbaren Versuchsansätze wiesen diese Doppelbanden auf. Anhand der zuvor beschriebenen Beobachtung wurde lediglich die oberste Bande für die densitometrische Auswertung verwendet. Aufgrund der Konstanz in der Auswertung, gezeigt durch die geringe Standardabweichung sowie der Parallelität zu den Ergebnissen in den BaF3 Zellen, sind diese Ergebnisse als valide anzusehen.

Basierend auf den zuvor beschriebenen Effekt von Dexamethason auf diese Zellen, wäre als Folgeexperiment denkbar gewesen, diese Zellen mit Dexamethason zu behandeln, um anschließend den Effekt auf die BCR/ABL Phosphorylierung zu untersuchen. Basierend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen wäre eine stärkere Dephosphorylierung von BCR/ABL zu erwarten. In einer zuvor in der Arbeitsgruppe

von Prof. Dr. Ottmann durchgeführten Arbeit von Dr. Mambou Kamdem Gwanmesia Patricia Neh wurde gezeigt, dass BCR/ABL in Sup B15 RT Zellen im Vergleich zu Imatinib sensitiven Sup B15 Zellen erst bei einer höheren Imatinib Dosierung dephosphoryliert wird. Es wäre denkbar, dass dieses verzögerte Ansprechen auf die Imatinib-Behandlung durch deregulierte Phosphatasen wie STS-1 und PTP1B vermittelt werden.¹ Der zeitliche Vorteil, den die Zellen dadurch erlangen, könnte ausreichen, um alternative Signalwege zu aktivieren, die das Überleben der Zelle garantieren. Durch das oben erwähnte Folgeexperiment könnte gezeigt werden, ob eine Dexamethason vermittelte Erhöhung der STS-1 Expression in ein frühes Ansprechen auf Imatinib resultiert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in BaF3 Zellen muss in beiden Sup B15 Zelllinien der Einfluss anderer bereits beschriebener deregulierter Phosphatasen in Betracht gezogen werden. Es ist denkbar, dass STS-1 lediglich im Verbund mit anderen Phosphatasen eine Resistenz vermitteln kann.

4.2 Untersuchung des Expressionsprofils in Sup B15 RT und Sup B15 WT Zellen

Wie bisher gezeigt, hat STS-1 nicht nur einen Einfluss auf die Phosphorylierung von BCR/ABL, sondern auch auf die Proliferation der Ph⁺ Sup B15 Zellen. Um Hinweise auf alternative Mechanismen der mutationsunabhängigen Resistenz zu erhalten, die nicht zwangsläufig im funktionellen Zusammenhang mit Phosphatasen stehen, wurde die Expression verschiedener Zellzyklus kontrollierender Proteine und BCR/ABL assoziierter Proteine sowie die Phosphorylierung letzterer untersucht. Wie in **(Abb. 3.6)** zu sehen, ist nicht nur die STAT5 Expression in Sup B15 RT Zellen höher als in den Sup B15 WT Zellen, darüber hinaus zeigt die STAT5 Phosphorylierung in diesen Zellen keinerlei Ansprechen auf Imatinib.

Da BCR/ABL auch in Sup B15 RT Zellen durch Imatinib inaktiviert werden kann, wurde zunächst eine V617F Punktmutation von JAK2, die zu einer konstitutiven Aktivierung der JAK2 Kinase führt und somit eine STAT5 Phosphorylierung vermittelt,¹²² experimentell ausgeschlossen. In Sup B15 RT Zellen konnte eine erhöhte JAK2 Expression als mögliche Ursache für eine BCR/ABL unabhängige STAT5 Phosphorylierung¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ gezeigt werden **(Abb. 3.8)**. Ein Nachweis der JAK2

Phosphorylierung war jedoch nicht möglich. 2011 wurde von Samanta et al. gezeigt, dass JAK2 die BCR/ABL Stabilität und die Phosphorylierung onkogener Signalwege kontrolliert und somit eine Überexpression von JAK2 eine Imatinib Resistenz in CML Zellen vermitteln kann.¹³³ In diesem Zusammenhang wäre es interessant, den Effekt von STS-1 auf JAK2 zu untersuchen. In der Literatur wurde die Interaktion zwischen JAK2 und STS-1 bereits beschrieben.^{3,69} Gegebenenfalls kann unter anderem durch die Überexpression von STS-1 ein erneutes Ansprechen auf Imatinib über den JAK/STAT Signalweg vermittelt werden.

Wie zuvor bereits erwähnt, ist STAT5 im Kontext der Ph⁺ ALL ein bekannter Transkriptionsfaktor für RAD 51. Durch das Zusammenwirken mit anderen Proteinen verzögert RAD 51 in der späten S und G2 Phase des Zellzyklus den Übergang von G2- in die M-Phase, repariert Doppelstrangbrüche (DSB) und schützt so die Zellen vor Apoptose.^{115,116}

Um DNS-Schäden zu reparieren stehen der Zelle verschiedene DNS-Reparatur-Mechanismen, wie zum Beispiel die "Homologues recombination repair" (HRR) oder auch die "Non-homologues end joining" (NHEJ), zur Verfügung.¹⁶¹⁻¹⁶³ Die Behandlung mit Chemotherapeutika induziert Doppelstrangbrüche von deren Folgen sich Ph⁺ Leukämie Zellen, wie bereits mehrfach gezeigt werden konnte, effektiv schützen können.^{115,164-167} DNS-Schäden können jedoch nicht nur infolge anti-leukämischer Therapien induziert werden, sondern auch durch Ungenauigkeiten bei der Replikation sowie die Anhäufung von chemischen Stoffen wie ROS (reactiv oxigen species) auftreten.¹⁶⁸ Die ROS Bildung in Ph⁺ Zellen wird durch BCR/ABL erhöht und hat unter anderem seinen Ursprung in der NADPH Oxidase, wie sie in Granulozyten vorkommt.^{169,170} ROS werden unter anderem produziert, um oxidative Schäden an der DNS von Pathogenen zu verursachen.¹⁷¹ Wie wichtig die HRR für die Ph⁺ Leukämie ist, wird durch Daten bestätigt, die zeigen, dass ein NHEJ, ein weiterer entscheidender Reparaturmechanismus für DSB durch BCR/ABL runterreguliert wird.¹⁷² Die Hochregulierung von HRR in Ph⁺ Leukämiezellen basiert auf der durch BCR/ABL induzierten Überexpression und Phosphorylierung von RAD 51.

Wie in **(Abb. 3.7)** gezeigt, konnte durch die Analyse von RAD 51 mRNA mittels qRT-PCR eine transkriptionelle Regulierung der in Sup B15 RT Zellen gesteigerten RAD 51 Expression im Zellkern verifiziert werden.

Die gesteigerte HRR in RAD 51 hochexprimierenden Sup B15 RT Zellen kann genomische Instabilität induzieren, die chromosomale Translokationen, Deletionen, zusätzliche Chromosomen, Genamplifikationen und Mutationen zur Folge haben kann.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Darüber hinaus kann ein HRR-abhängiger Mechanismus zu einem kopieneutralen Verlust der Heterozygotie führen (Copy neutral Loss of Heterozygosity = LOH). LOH können nicht mittels FISH oder Array CGH detektiert werden.

Aufgrund der erhöhten RAD 51 Expression in Sup B15 RT Zellen wäre sowohl

- 1.) ein erhöhtes Auftreten von Translokationen, Deletionen und zusätzlichen Chromosomen möglich sowie
- 2.) der Verlust der Heterozygotie von verschiedenen Genen.

Der erste Punkt konnte weitestgehend durch die durchgeführte FISH Analyse widerlegt werden **(Abb. 3.1)**. Der Verlust der Heterozygotie kann lediglich mittels SNP-based arrays^{176,177} nachgewiesen werden, wodurch eine SNP Analyse beider Zelllinien notwendig wäre, um einen RAD 51 vermittelte Effekt zeigen zu können.

Bei der Untersuchung Zellzyklus kontrollierender Proteine in Sup B15 WT und -RT Zellen fiel eine deutlich unterschiedliche Expression von Cyclin D3, Cyclin E2 und CDK4 **(Abb. 3.5)** in Abhängigkeit der Imatinib-Behandlung auf. Alle drei Proteine sind an der Regulierung des G1/S Transfers beteiligt.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Die Untersuchung von D-Typ Cyclin Knock-Out Mäusen hat gezeigt, dass Mäuse ohne Cyclin D3 schwere Defekte in der frühen B- und T-Zell Differenzierung aufweisen sowie eine gestörte Proliferation von Granulozyten.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Gerade die Überexpression von Cyclin D3 und der damit verbundenen konstitutiven Aktivierung des Notch Signalweges spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der reifen T-ALL, sondern auch bei anderen malignen Erkrankungen.^{185,186}

Basierend auf früheren Arbeiten von Li et al., 2008¹⁸⁷ und Joshi et al., 2009¹⁸⁸ wurde Cyclin D3 2012 von Sawai et al.¹⁸⁹ als therapeutisches Ziel in der T-ALL identifiziert. Durch eine Reduktion von Cyclin D3 kann der Cyclin D3 CDK4/6 Komplex nicht

gebildet werden und aufgrund der dadurch ausbleibenden Retinoblastom Phosphorylierung kommt es zu einem G1 Arrest in diesen Zellen. Eine Überexpression, wie sie in malignen Zellen beobachtet werden kann, hebt den G1 Arrest auf und verhindert den programmierten Zelltod.¹⁹⁰ Die Behandlung von Sup B15 WT Zellen mit Imatinib reguliert die Expression von Cyclin D3 komplett herunter, was zur Apoptose der Zellen führt. Im Gegensatz dazu wird die im Vergleich schwächere Cyclin D3 Expression in Sup B15 RT Zellen deutlich hochreguliert. Aufgrund der zuvor zitierten Literatur wird durch dieses Experiment sofort ersichtlich, dass TKI-sensitive Zellen nach der Imatinib-Behandlung in Apoptose gehen. Im Gegensatz dazu haben Sup B15 RT Zellen einen Mechanismus entwickelt, der Cyclin D3 hochregulieren lässt und die Zellen aus dem G1 Arrest holen und somit die Imatinib induzierte Apoptose verhindert. Ein gleiches Expressionsmuster zeigt sich bei dem Cyclin D3 assoziierten Protein CDK4. CDK6, das letzte Protein in dem Cyclin D3 CDK4/6 Komplex, der für die Retinoblastom Phosphorylierung verantwortlich ist, zeigt keine durch Imatinib modulierbare Expression. In CML Patienten konnte gezeigt werden, dass BCR/ABL und mTORC1 die Formierung des Translation initiierenden Komplexes eIF4F induzieren. Ein Zieltranskript für diesen Komplex ist Cyclin D3, welches somit durch BCR/ABL und mTORC1 translationell reguliert wird.¹⁹¹

Aufgrund der hier diskutierten Ergebnisse zeichnet sich das Bild von einer TKI resistenten Zelle, die die notwendigen Signalwege zur Verhinderung der Imatinib induzierten Apoptose erst durch die Zugabe von Imatinib aktiviert.

4.3 Hypothese der STS-1 vermittelten Resistenz

Aufgrund der bisher vorgestellten Ergebnisse kann bezüglich der Entstehung nicht mutationsbedingter Resistenzen unter Beteiligung von STS-1 folgende Hypothese aufgestellt werden.

Die BCR/ABL vermittelte Phosphorylierung von STS-1 induziert die Ubiquitinierung der Phosphatase mittels einer E3-Ligase (z.B. c-CBL), da eine Interaktion zwischen c-Cbl und STS-1 bereits gezeigt wurde.⁷⁰ Sobald STS-1 mono-ubiquitiniert ist, kann es mit seiner eigenen UBA Domäne an dieses mono-Ubiquitin binden und eine inaktive Konformation einnehmen. Mono-ubiquitiniertes STS-1 ist nicht in der Lage an mögliche Zielproteine wie Syk oder andere Tyrosin-Kinasen zu binden und anschließend zu dephosphorylieren.^{3,4} Dadurch bleiben Signalwege, die unter der Kontrolle dieser Kinasen stehen und zur Proliferation und zum Überleben der Zelle beitragen können, weiterhin aktiv (**Abb. 4.1A**).

Die Zugabe des TKI Imatinib inaktiviert BCR/ABL und unterbindet somit die Phosphorylierung von STS-1. Dadurch bleibt STS-1 aktiv und dephosphoryliert entsprechende Kinasen, wodurch die beteiligten Signalwege inaktiviert werden und ein Überleben der Zellen verhindert wird.

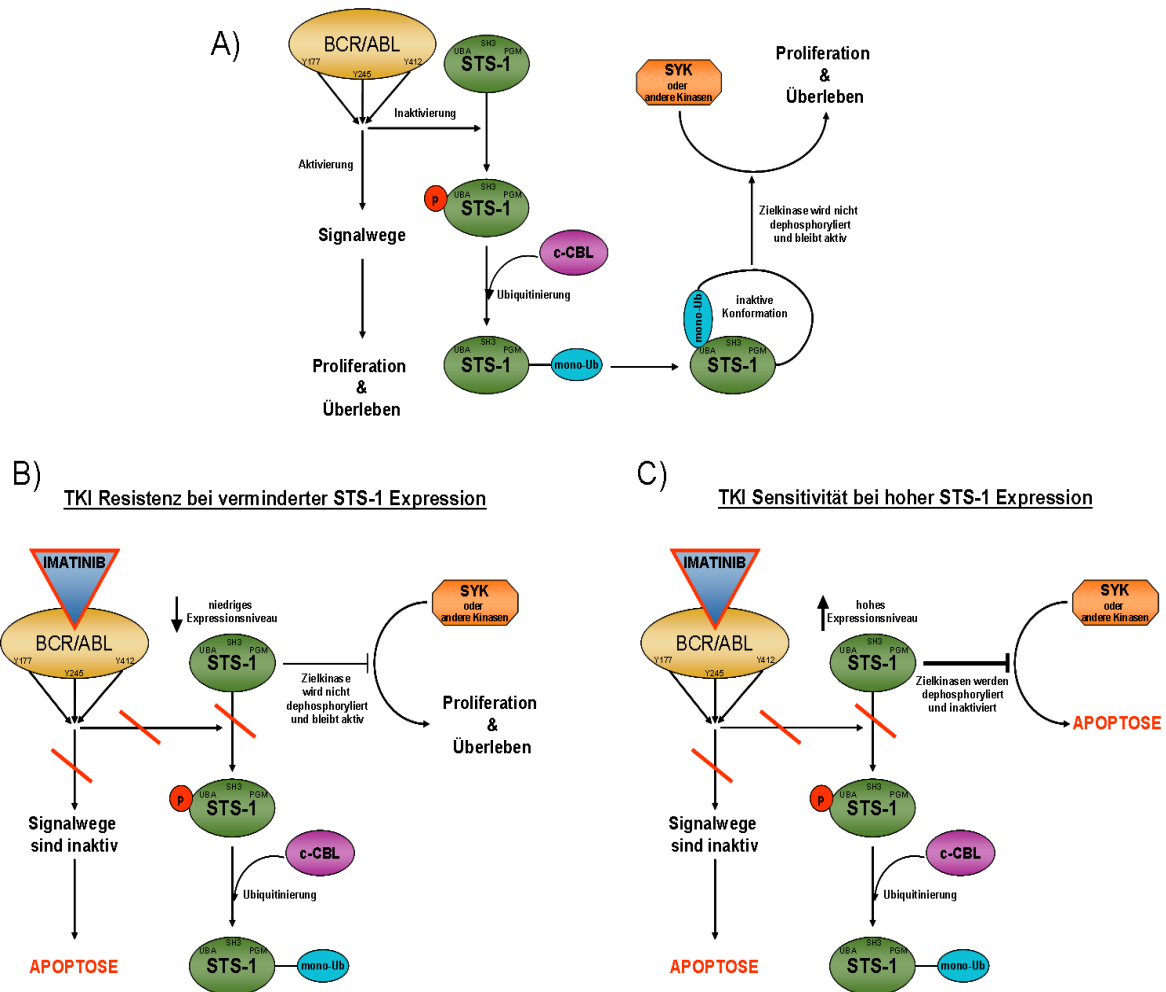


Abb. 4.2

Postulierte Effekte der Interaktion zwischen BCR/ABL und STS-1

- A) Aufgrund der Phosphorylierung von STS-1 durch BCR/ABL wird STS-1 von c-CBL ubiquitiniert. Dadurch nimmt STS-1 eine inaktive Konformation ein und betroffene Signalwege bleiben aktiv.
- B) Bei einer Behandlung von Imatinib wird BCR/ABL inaktiviert und es kommt zu keiner Phosphorylierung und Aktivierung wichtiger Signalwege, die für das Überleben der Zelle notwendig sind. Darüber hinaus wird auch STS-1 nicht mehr phosphoryliert und verbleibt somit in seiner aktiven Konformation. In Verbindung mit einem hohen Expressionsniveau von STS-1, wie es in TKI sensitiven Ph⁺ ALL Zellen (Sup B15 WT) nachgewiesen wurde, kommt es zu einer Inaktivierung alternativer Überlebenssignalwege und Apoptose wird ausgelöst.
- C) In Zellen deren STS-1 Expressionslevel niedrig ist, wie in TKI resistenten Ph⁺ ALL Zellen (Sup B15 RT), kommt es durch die Behandlung von Imatinib zu keiner Beeinträchtigung alternativer, durch STS-1 regulierter Signalwege. Dadurch ist es der Zelle möglich trotz einer Behandlung mit Imatinib zu überleben.

Es konnte gezeigt werden, dass resistente Sup B15 RT Zellen trotz Imatinib vermittelte Deaktivierung der Kinaseaktivität von BCR/ABL nicht in Apoptose gehen. Daher werden in der hier vorliegenden Arbeit BCR/ABL unabhängige Überlebenssignalwege postuliert, die im Fall einer Imatinib-Behandlung das Überleben der Zellen gewährleisten. Die verminderte STS-1 Expression in

Sup B15 RT könnte zur unveränderten Aktivität dieser alternativen Signalwege führen, indem deren STS-1 vermittelte Dephosphorylierung entfällt (**Abb. 4.1B**).

Dies wäre in den TKI sensitiven Sup B15 WT nicht der Fall, da aufgrund der hohen STS-1 Expression potentielle Überlebenssignalwege dephosphoryliert und inaktiviert werden, wodurch diese Zellen in Apoptose gehen können (**Abb. 4.1C**).

Durch eine pharmakologische Steigerung der STS-1 Expression mittels Dexamethason Exposition, könnten diese alternativen Signalwege durch die Steigerung der STS-1 vermittelten Dephosphorylierung wichtiger Kinasen nachträglich abgeschaltet und somit die Sensitivität gegenüber Imatinib wieder hergestellt werden. In Zellen, deren STS-1 Expressionslevel niedrig ist, wie in TKI resistenten Ph⁺ ALL Zellen (Sup B15 RT) gezeigt, kommt es durch die Behandlung von Imatinib zu keiner Beeinträchtigung alternativer, durch STS-1 regulierte Signalwege. Dadurch ist es der Zelle möglich, trotz einer Behandlung mit Imatinib, zu überleben.

Die Src-Kinase Syk, die als Ziel von STS-1 bereits zahlreich beschrieben wurde, hat eine Verbindung zum PI3K Signalweg.¹⁹² Somit wäre sie, ebenso wie die zuvor diskutierte JAK2 Kinase mit ihrer Verbindung zur STAT5 Phosphorylierung und ihrem BCR/ABL stabilisierenden Effekt, ein attraktives Ziel für weitere Untersuchungen.

4.4 Ausblick

Weiterführende Experimente könnten sich zunächst auf den nachgewiesenen Effekt konzentrieren, den Dexamethason auf die STS-1 Expression in dem hier verwendeten ALL Zellmodell hat. Zu diesem Zweck könnte mittels quantitativer Real-Time PCR Dexamethason behandelte Sup B15 Zellen bezüglich ihrer mRNA Menge analysiert werden. Der Vergleich mit unbehandelten Sup B15 Zellen würde Aufschluss über den Effekt von Dexamethason auf die mRNA Produktion und somit die Transkription des UBASH3B Gens geben. Die Einzelbehandlung mit Dexamethason hat nicht nur eine erhöhte Expression von STS-1 in diesen Zellen zur Folge, sondern induziert einen Rückgang der Proliferationsrate, sowohl in Sup B15 WT als auch in Sup B15 RT Zellen. Werden diese zusätzlich mit Imatinib behandelt, so wird auch in Sup B15 RT Zellen der proliferationsinhibierende Effekt signifikant verstärkt. Die reduzierte Proliferation geht einher mit einer starken Zunahme der Apoptose in beiden Sup B15 Zelllinien. Die Glukokortikoid vermittelte Apoptose wird größtenteils durch rezeptor- und kernabhängige Mechanismen ausgelöst.^{150,193} Ein mögliches Modell beschreibt die Repression von Genen, die für die zelluläre Homöostase verantwortlich sind, durch die Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NFκB¹³⁸. Darüber hinaus gibt es Ansätze, die auf eine schnelle, durch den zytoplasmatischen GR vermittelte Apoptose hinweisen, die transkriptionsunabhängig ablaufen.¹⁹⁴ Es konnte im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit leider nicht ermittelt werden, welcher der hier vorgestellten Apoptosemechanismen durch die Behandlung mit Imatinib in den Sup B15 Zellen ausgelöst wird und weshalb Dexamethason diesen Effekt noch verstärkt. Aufgrund der geringen Dexamethason-Konzentrationen und der großen zeitlichen Latenz bis der Effekt deutlich wird, ist zu vermuten, dass es sich um einen genomisch vermittelten Prozess handelt. Apoptose ist ein ATP abhängiger Prozess, der sich in Nekrose umwandelt, wenn der Zelle nicht in ausreichender Menge ATP zur Verfügung steht.¹⁹⁵ Wird nun durch die Zugabe von Imatinib BCR/ABL, ein wichtiger ATP-Verbraucher innerhalb der Dexamethason behandelten Zelle, inhibiert, könnte dies eine mögliche Ursache für eine gesteigerte Apoptose sein.

Welche Rolle STS-1 nun genau bei der BCR/ABL unabhängigen Resistenzvermittlung spielt und inwiefern der Effekt von Dexamethason durch STS-1 in Ph⁺ ALL Zellen vermittelt wird, muss noch weiter untersucht werden. Es zeigt sich jedoch, dass die mutationsunabhängige Resistenz im Gegensatz zu einer Resistenz wie sie durch die BCR/ABL^{T315I} Mutation vermittelt wird, nicht an einer einzelnen Mutation oder einem veränderten Protein festgemacht werden kann. Vielmehr tragen viele Veränderungen zum Überleben der mit Imatinib behandelten Zellen bei. Durch die präsentierten Ergebnisse und den im Vorfeld dieser Doktorarbeit erzielten Resultate, lassen sich viele Veränderungen in den Sup B15 Zellen auf eine Deregulation von Phosphatasen zurückführen. Durch das oftmals breite Spektrum an Substraten sind die Auswirkungen einer deregulierten Phosphatase dementsprechend mannigfaltig und ebenso vielfältig wie bei einer konstitutiv aktiven Kinase. Gerade STS-1 präsentiert sich in diesem Zusammenhang als interessantes Ziel für weitere Untersuchungen, da es durch die Interaktion mit Kinasen wie Syk, JAK2 und BCR/ABL viele regulatorische Mechanismen wie Apoptose, DNS Reparatur, Proliferation und Zellzykluskontrolle innerhalb der Zelle beeinflussen und steuern kann. Durch die gezeigte Modulierung der STS-1 Expression mittels Dexamethason bietet sich ein therapeutisch relevanter Ansatz zur Behandlung nicht-mutationsbedingter und BCR/ABL-unabhängiger Resistenzen.

5 Literatur

- 1 Koyama, N. *et al.* Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL-positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* **12**, 2025-2031 (2006).
- 2 Juric, D. *et al.* Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol* **25**, 1341-1349 (2007).
- 3 Mikhailik, A. *et al.* A phosphatase activity of Sts-1 contributes to the suppression of TCR signaling. *Mol Cell* **27**, 486-497 (2007).
- 4 Agrawal, R., Carpino, N. & Tsygankov, A. TULA proteins regulate activity of the protein tyrosine kinase Syk. *J Cell Biochem* **104**, 953-964 (2008).
- 5 Rieger, M. A. a. T. in *BIOspektrum* Vol. 03(13. Jahrgang) 254-256 (2007).
- 6 Passegue, E., Jamieson, C. H., Ailles, L. E. & Weissman, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11842-11849 (2003).
- 7 Kronenwett, R., Martin, S. & Haas, R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells* **18**, 320-330 (2000).
- 8 Gottgens, B. *et al.* The scl +18/19 stem cell enhancer is not required for hematopoiesis: identification of a 5' bifunctional hematopoietic-endothelial enhancer bound by Fli-1 and Elf-1. *Mol Cell Biol* **24**, 1870-1883 (2004).
- 9 Smith, C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control* **10**, 9-16 (2003).
- 10 Virchow, R. C. Report on the typhus epidemic in Upper Silesia. 1848. *Am J Public Health* **96**, 2102-2105 (2006).
- 11 Gabriele Husmann (Krebsregister Rheinland-Pfalz), D. P. K. K., Prof. Dr. Alexander Katalinic (GEKID), Dr. Joachim Bertz, Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel MSc, Dr. Ute Wolf (RKI). *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 7. Ausgabe. edn, (Robert Koch-Institut; Nordufer 20; 13353 Berlin
Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.; Ratzeburger Allee 160, Haus 50; 23538 Lübeck, 2010).
- 12 Gilliland, D. G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* **39**, 6-11, doi:10.1053/shem.2002.36921 (2002).
- 13 Toffalini, F. & Demoulin, J. B. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. *Blood* **116**, 2429-2437, doi:10.1182/blood-2010-04-279752 (2010).

- 14 Tverdnyin, M. S., Bulanova, T. P. & Chernysheva, E. S. [Pappenheim method of panoptic staining of histological sections]. *Arkhiv patologii* **42**, 80-81 (1980).
- 15 Bene, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783-1786 (1995).
- 16 N. Gökbuget, A. G. u. R. F. S. in *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie*.
- 17 Regierer, K. P. u. A. C. *Facharzt Hämatologie und Onkologie*. (Urban&Fisher Verlag/Elsevier GmbH).
- 18 Juliusson, G. *et al.* Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood* **113**, 4179-4187, doi:10.1182/blood-2008-07-172007 (2009).
- 19 Hehlmann, R., Hochhaus, A., Baccarani, M. & European, L. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **370**, 342-350, doi:10.1016/S0140-6736(07)61165-9 (2007).
- 20 Rohrbacher, M. & Hasford, J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best practice & research. Clinical haematology* **22**, 295-302, doi:10.1016/j.beha.2009.07.007 (2009).
- 21 Howlader N, N. A., Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (National Cancer Institute, 2011).
- 22 Hoelzer, D. *et al.* [Acute lymphatic leukemia of the adult. Diagnosis, risk groups and therapy]. *Internist (Berl)* **37**, 994-1007 (1996).
- 23 Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **51**, 189-199 (1982).
- 24 Hayhoe, F. G. Classification of acute leukaemias. *Blood Rev* **2**, 186-193 (1988).
- 25 Hossfeld, D. K. E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman (eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology* **13**, 490-491, doi:10.1093/annonc/mdf146 (2002).
- 26 Gökbuget, N. (ed Kompetenznetz „akute und chronische Leukämien“) (Klinikum der J.W.Goethe Universität, Medizinische Klinik II, Frankfurt).
- 27 Faderl, S. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **341**, 164-172 (1999).
- 28 Pui, C. H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 149-165 (2007).
- 29 Pane, F. *et al.* Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* **88**, 2410-2414 (1996).
- 30 McWhirter, J. R., Galasso, D. L. & Wang, J. Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* **13**, 7587-7595 (1993).
- 31 Beissert, T. *et al.* Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface of BCR interferes with the transformation potential of BCR-ABL and increases sensitivity to STI571. *Blood* **102**, 2985-2993 (2003).

- 32 Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793-4807, doi:10.1182/blood-2008-08-077941 (2008).
- 33 Bomken, S., Fiser, K., Heidenreich, O. & Vormoor, J. Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer* **103**, 439-445, doi:10.1038/sj.bjc.6605821 (2010).
- 34 Clarke, M. F. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**, 9339-9344, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126 (2006).
- 35 Cox, C. V. *et al.* Characterization of acute lymphoblastic leukemia progenitor cells. *Blood* **104**, 2919-2925, doi:10.1182/blood-2004-03-0901 (2004).
- 36 Cox, C. V. *et al.* Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **109**, 674-682, doi:10.1182/blood-2006-06-030445 (2007).
- 37 Heidenreich, O. & Vormoor, J. Malignant stem cells in childhood ALL: the debate continues! *Blood* **113**, 4476-4477; author reply 4477, doi:10.1182/blood-2009-02-203109 (2009).
- 38 Rehe, K. *et al.* Acute B lymphoblastic leukaemia-propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO molecular medicine* **5**, 38-51, doi:10.1002/emmm.201201703 (2013).
- 39 Deininger, M., Buchdunger, E. & Druker, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **105**, 2640-2653 (2005).
- 40 Schiffer, C. A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* **357**, 258-265 (2007).
- 41 Druker, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408-2417 (2006).
- 42 le Coutre, P. *et al.* Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* **95**, 1758-1766 (2000).
- 43 Gorre, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880 (2001).
- 44 Hochhaus, A. *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* **16**, 2190-2196 (2002).
- 45 Soverini, S. *et al.* Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* **12**, 7374-7379 (2006).
- 46 Schindler, T. *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942 (2000).
- 47 O'Hare, T., Eide, C. A. & Deininger, M. W. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* **110**, 2242-2249 (2007).
- 48 Donato, N. J. *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* **101**, 690-698 (2003).
- 49 Mahon, F. X. *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**, 1070-1079 (2000).

- 50 Dai, Y., Rahmani, M., Pei, X. Y., Dent, P. & Grant, S. Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood* **104**, 509-518 (2004).
- 51 Dai, Y. *et al.* Interruption of the NF-kappaB pathway by Bay 11-7082 promotes UCN-01-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human multiple myeloma cells. *Blood* **103**, 2761-2770 (2004).
- 52 Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25**, 596-601 (2000).
- 53 Zhang, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 209-234 (2002).
- 54 Hunter, T. & Sefton, B. M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1311-1315 (1980).
- 55 Hunter, T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127 (2000).
- 56 Neel, B. G. & Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 193-204 (1997).
- 57 Li, L. & Dixon, J. E. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases. *Semin Immunol* **12**, 75-84 (2000).
- 58 Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711 (2004).
- 59 Ducruet, A. P., Vogt, A., Wipf, P. & Lazo, J. S. Dual specificity protein phosphatases: therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**, 725-750 (2005).
- 60 Raugei, G., Ramponi, G. & Chiarugi, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell Mol Life Sci* **59**, 941-949 (2002).
- 61 Sulis, M. L. & Parsons, R. PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* **13**, 478-483 (2003).
- 62 Andersen, J. N. *et al.* Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **21**, 7117-7136 (2001).
- 63 Barford, D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* **21**, 407-412 (1996).
- 64 Rigden, D. J. The histidine phosphatase superfamily: structure and function. *Biochem J* **409**, 333-348 (2008).
- 65 Carpino, N. *et al.* Regulation of ZAP-70 activation and TCR signaling by two related proteins, Sts-1 and Sts-2. *Immunity* **20**, 37-46 (2004).
- 66 Feshchenko, E. A. *et al.* TULA: an SH3- and UBA-containing protein that binds to c-Cbl and ubiquitin. *Oncogene* **23**, 4690-4706 (2004).
- 67 Wattenhofer, M. *et al.* Isolation and characterization of the UBASH3A gene on 21q22.3 encoding a potential nuclear protein with a novel combination of domains. *Hum Genet* **108**, 140-147 (2001).
- 68 Chen, Y., Jakoncic, J., Carpino, N. & Nassar, N. Structural and functional characterization of the 2H-phosphatase domain of Sts-2 reveals an acid-dependent phosphatase activity. *Biochemistry* **48**, 1681-1690 (2009).
- 69 Carpino, N. *et al.* Identification, cDNA cloning, and targeted deletion of p70, a novel, ubiquitously expressed SH3 domain-containing protein. *Mol Cell Biol* **22**, 7491-7500 (2002).

- 70 Kowanetz, K. *et al.* Suppressors of T-cell receptor signaling Sts-1 and Sts-2 bind to Cbl and inhibit endocytosis of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* **279**, 32786-32795 (2004).
- 71 Raguz, J., Wagner, S., Dikic, I. & Hoeller, D. Suppressor of T-cell receptor signalling 1 and 2 differentially regulate endocytosis and signalling of receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett* **581**, 4767-4772 (2007).
- 72 San Luis, B., Sondgeroth, B., Nassar, N. & Carpino, N. Sts-2 is a phosphatase that negatively regulates zeta-associated protein (ZAP)-70 and T cell receptor signaling pathways. *J Biol Chem* **286**, 15943-15954.
- 73 Chen, Y., Jakoncic, J., Parker, K. A., Carpino, N. & Nassar, N. Structures of the phosphorylated and VO(3)-bound 2H-phosphatase domain of Sts-2. *Biochemistry* **48**, 8129-8135 (2009).
- 74 Swaminathan, G. & Tsygankov, A. Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* **209**, 21-43 (2006).
- 75 Tsygankov, A. in *Cbl proteins* (Nova Science Publishers, New York, 2008).
- 76 Nau MM, L. S. in *Cbl-Proteins* (ed Tsygankov A.) (Nova Science Publishers, 2008).
- 77 Chen, X. *et al.* Determination of the substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase TULA-2 and identification of Syk as a TULA-2 substrate. *J Biol Chem* **285**, 31268-31276.
- 78 Thomas, D. H. *et al.* A novel histidine tyrosine phosphatase, TULA-2, associates with Syk and negatively regulates GPVI signaling in platelets. *Blood* **116**, 2570-2578.
- 79 Naumovski, L. *et al.* Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cell lines without classical breakpoint cluster region rearrangement. *Cancer Res* **48**, 2876-2879 (1988).
- 80 Drexler, H. G. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* **24**, 109-115 (2000).
- 81 Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst* **50**, 535-538 (1973).
- 82 Lozzio, C. B. & Lozzio, B. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-334 (1975).
- 83 Drexler, H. G. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* **18**, 919-927 (1994).
- 84 Hurwitz, R. *et al.* Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* **23**, 174-180 (1979).
- 85 Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8392-8396 (1993).
- 86 Rio, D. C., Clark, S. G. & Tjian, R. A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science* **227**, 23-28 (1985).
- 87 DuBridge, R. B. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* **7**, 379-387 (1987).
- 88 Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**, 695-710 (1953).

- 89 Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M. & McKearn, J. P. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* **309**, 126-131 (1984).
- 90 Palacios, R. & Steinmetz, M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **41**, 727-734 (1985).
- 91 Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74 (1977).
- 92 Beissert, T. *et al.* Targeting of the N-terminal coiled coil oligomerization interface by a helix-2 peptide inhibits unmutated and imatinib-resistant BCR/ABL. *Int J Cancer* **122**, 2744-2752 (2008).
- 93 Mian, A. A., Oancea, C., Zhao, Z., Ottmann, O. G. & Ruthardt, M. Oligomerization inhibition, combined with allosteric inhibition, abrogates the transformation potential of T315I-positive BCR/ABL. *Leukemia* **23**, 2242-2247 (2009).
- 94 Grignani, F. *et al.* High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* **58**, 14-19 (1998).
- 95 Hoffmann, R. & Valencia, A. A gene network for navigating the literature. *Nat Genet* **36**, 664 (2004).
- 96 Hoffmann, R. & Valencia, A. Implementing the iHOP concept for navigation of biomedical literature. *Bioinformatics* **21 Suppl 2**, ii252-258 (2005).
- 97 Jensen, L. J. *et al.* STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* **37**, D412-416 (2009).
- 98 Szklarczyk, D. *et al.* The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* **39**, D561-568.
- 99 Hornbeck, P. V., Chabra, I., Kornhauser, J. M., Skrzypek, E. & Zhang, B. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* **4**, 1551-1561 (2004).
- 100 Rush, J. *et al.* Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* **23**, 94-101 (2005).
- 101 Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**, 365-386 (2000).
- 102 Radivojac, P. *et al.* Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* **78**, 365-380.
- 103 Rokas, A., Williams, B. L., King, N. & Carroll, S. B. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**, 798-804 (2003).
- 104 Landy, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* **58**, 913-949 (1989).
- 105 Weisberg, R. A., Enquist, L. W., Foeller, C. & Landy, A. Role for DNA homology in site-specific recombination. The isolation and characterization of a site affinity mutant of coliphage lambda. *J Mol Biol* **170**, 319-342 (1983).
- 106 Hartley, J. L., Temple, G. F. & Brasch, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* **10**, 1788-1795 (2000).

- 107 Bernard, P. & Couturier, M. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745 (1992).
- 108 Miki, T., Park, J. A., Nagao, K., Murayama, N. & Horiuchi, T. Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in Escherichia coli. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**, 39-52 (1992).
- 109 Waterborg, J. H. & Matthews, H. R. The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* **1**, 1-3 (1984).
- 110 Schmid, I., Uittenbogaart, C. H. & Giorgi, J. V. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry* **15**, 12-20, doi:10.1002/cyto.990150104 (1994).
- 111 Schmid, I., Uittenbogaart, C. H., Keld, B. & Giorgi, J. V. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *Journal of immunological methods* **170**, 145-157 (1994).
- 112 Wadkins, R. M. & Jovin, T. M. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry* **30**, 9469-9478 (1991).
- 113 Griswold, I. J. *et al.* Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol* **26**, 6082-6093 (2006).
- 114 Salloukh, H. F., Vowles, I., Heisterkamp, N., Groffen, J. & Laneuville, P. Early events in leukemogenesis in P190Bcr-abl transgenic mice. *Oncogene* **19**, 4362-4374 (2000).
- 115 Slupianek, A. *et al.* BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* **8**, 795-806 (2001).
- 116 Slupianek, A. *et al.* Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**, 4189-4201 (2002).
- 117 Oh, S. T. & Gotlib, J. JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol* **3**, 323-337.
- 118 Brehme, M. *et al.* Charting the molecular network of the drug target Bcr-Abl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 7414-7419 (2009).
- 119 Horio, T. *et al.* The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J Cell Sci* **99 (Pt 4)**, 693-700 (1991).
- 120 Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in Aspergillus nidulans. *Cell* **61**, 1289-1301 (1990).
- 121 Stearns, T., Evans, L. & Kirschner, M. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**, 825-836 (1991).
- 122 Zheng, Y., Jung, M. K. & Oakley, B. R. Gamma-tubulin is present in Drosophila melanogaster and Homo sapiens and is associated with the centrosome. *Cell* **65**, 817-823 (1991).
- 123 Hoeller, D. *et al.* Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* **8**, 163-169 (2006).

- 124 Bruecher-Encke, B., Griffin, J. D., Neel, B. G. & Lorenz, U. Role of the tyrosine phosphatase SHP-1 in K562 cell differentiation. *Leukemia* **15**, 1424-1432 (2001).
- 125 LaMontagne, K. R., Jr., Flint, A. J., Franza, B. R., Jr., Pandergast, A. M. & Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatase 1B antagonizes signalling by oncoprotein tyrosine kinase p210 bcr-abl in vivo. *Mol Cell Biol* **18**, 2965-2975 (1998).
- 126 Liedtke, M., Pandey, P., Kumar, S., Kharbanda, S. & Kufe, D. Regulation of Bcr-Abl-induced SAP kinase activity and transformation by the SHPTP1 protein tyrosine phosphatase. *Oncogene* **17**, 1889-1892 (1998).
- 127 Pearson, O. H. & Eliel, L. P. Use of pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisone in lymphomas and leukemias. *J Am Med Assoc* **144**, 1349-1353 (1950).
- 128 Pui, C. H. & Evans, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **354**, 166-178 (2006).
- 129 Whitehouse, M. W. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years. *Inflammopharmacology* **19**, 1-19.
- 130 Lowenberg, M., Verhaar, A. P., van den Brink, G. R. & Hommes, D. W. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* **13**, 158-163 (2007).
- 131 Inaba, H. & Pui, C. H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* **11**, 1096-1106.
- 132 Carpino, N., Chen, Y., Nassar, N. & Oh, H. W. The Sts proteins target tyrosine phosphorylated, ubiquitinated proteins within TCR signaling pathways. *Mol Immunol* **46**, 3224-3231 (2009).
- 133 Samanta, A. K. *et al.* Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* **28**, 1669-1681 (2009).
- 134 Neviani, P. *et al.* The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* **8**, 355-368 (2005).
- 135 Perrotti, D. & Neviani, P. ReSETting PP2A tumour suppressor activity in blast crisis and imatinib-resistant chronic myelogenous leukaemia. *Br J Cancer* **95**, 775-781 (2006).
- 136 Montiel-Duarte, C. *et al.* Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk Res* **32**, 709-716 (2008).
- 137 Ferraldeschi, R., Pezaro, C., Karavasilis, V. & de Bono, J. Abiraterone and novel antiandrogens: overcoming castration resistance in prostate cancer. *Annual review of medicine* **64**, 1-13, doi:10.1146/annurev-med-121211-091605 (2013).
- 138 Distelhorst, C. W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **9**, 6-19 (2002).
- 139 Greenstein, S., Ghias, K., Krett, N. L. & Rosen, S. T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res* **8**, 1681-1694 (2002).
- 140 Kofler, R. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem Cell Biol* **114**, 1-7 (2000).

- 141 Buttgereit, F. Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions. *Z Rheumatol* **59 Suppl 2**, II/119-123 (2000).
- 142 Buttgereit, F., Wehling, M. & Burmester, G. R. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* **41**, 761-767 (1998).
- 143 Gold, R., Buttgereit, F. & Toyka, K. V. Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* **117**, 1-8 (2001).
- 144 Quddus, F. F. *et al.* Glucocorticoid receptors in immunological subtypes of childhood acute lymphocytic leukemia cells: a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer Res* **45**, 6482-6486 (1985).
- 145 Sudlow, A. W., Carey, F., Forder, R. & Rothwell, N. J. The role of lipocortin-1 in dexamethasone-induced suppression of PGE2 and TNF alpha release from human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol* **117**, 1449-1456 (1996).
- 146 Levine, S. J., Benfield, T. & Shelhamer, J. H. Corticosteroids induce intracellular interleukin-1 receptor antagonist type I expression by a human airway epithelial cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 245-251 (1996).
- 147 Adcock, I. M. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* **14**, 211-219 (2001).
- 148 Adcock, I. M. & Caramori, G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* **79**, 376-384 (2001).
- 149 Thompson, E. B., Webb, M. S., Miller, A. L., Fofanov, Y. & Johnson, B. H. Identification of genes leading to glucocorticoid-induced leukemic cell death. *Lipids* **39**, 821-825 (2004).
- 150 Barnes, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* **94**, 557-572 (1998).
- 151 Ito, K., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* **20**, 6891-6903 (2000).
- 152 Tissing, W. J., Meijerink, J. P., den Boer, M. L. & Pieters, R. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **17**, 17-25 (2003).
- 153 Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J. S., Fuentes, N. L. & Fuller, G. M. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* **272**, 30607-30610 (1997).
- 154 Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. & Groner, B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* **383**, 726-728 (1996).
- 155 Moriggl, R. *et al.* Comparison of the transactivation domains of Stat5 and Stat6 in lymphoid cells and mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **17**, 3663-3678 (1997).
- 156 Almawi, W. Y. & Tamim, H. Posttranscriptional mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: glucocorticoids inhibit IL-6-induced proliferation of B9 hybridoma cells. *Cell Transplant* **10**, 161-164 (2001).
- 157 Bartholome, B. *et al.* Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-

- regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J* **18**, 70-80 (2004).
- 158 Ihle, J. N. *et al.* Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* **19**, 222-227 (1994).
- 159 Neilson, L. M. *et al.* Coactivation of janus tyrosine kinase (Jak)1 positively modulates prolactin-Jak2 signaling in breast cancer: recruitment of ERK and signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and enhancement of Akt and Stat5a/b pathways. *Mol Endocrinol* **21**, 2218-2232 (2007).
- 160 Taniguchi, T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**, 251-255 (1995).
- 161 Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374 (2001).
- 162 Norbury, C. J. & Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 367-401 (2001).
- 163 Khanna, K. K. & Jackson, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**, 247-254 (2001).
- 164 Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* **91**, 1700-1705 (1998).
- 165 Bedi, A. *et al.* BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* **86**, 1148-1158 (1995).
- 166 Dubrez, L. *et al.* BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* **91**, 2415-2422 (1998).
- 167 Nishii, K. *et al.* ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* **13**, 2225-2234 (1996).
- 168 Aitken, R. J. & Krausz, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* **122**, 497-506 (2001).
- 169 Benhar, M., Dalyot, I., Engelberg, D. & Levitzki, A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **21**, 6913-6926 (2001).
- 170 Sattler, M. *et al.* The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **275**, 24273-24278 (2000).
- 171 Laval, J. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* **44**, 14-24 (1996).
- 172 Deutsch, E. *et al.* BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* **97**, 2084-2090 (2001).
- 173 Honda, H. *et al.* Acquired loss of p53 induces blastic transformation in p210(bcr/abl)-expressing hematopoietic cells: a transgenic study for blast crisis of human CML. *Blood* **95**, 1144-1150 (2000).
- 174 Salloukh, H. F. & Laneuville, P. Increase in mutant frequencies in mice expressing the BCR-ABL activated tyrosine kinase. *Leukemia* **14**, 1401-1404 (2000).
- 175 Skorski, T. *et al.* Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13137-13142 (1996).

- 176 Gondek, L. P. *et al.* Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood* **111**, 1534-1542 (2008).
- 177 Lo, K. C. *et al.* Comprehensive analysis of loss of heterozygosity events in glioblastoma using the 100K SNP mapping arrays and comparison with copy number abnormalities defined by BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 221-237 (2008).
- 178 Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. & Reed, S. I. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* **14**, 1669-1679 (1994).
- 179 Quelle, D. E. *et al.* Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* **7**, 1559-1571 (1993).
- 180 Owa, T., Yoshino, H., Yoshimatsu, K. & Nagasu, T. Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr Med Chem* **8**, 1487-1503 (2001).
- 181 Cooper, A. B. *et al.* A unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nature immunology* **7**, 489-497, doi:10.1038/ni1324 (2006).
- 182 Peled, J. U. *et al.* Requirement for cyclin D3 in germinal center formation and function. *Cell research* **20**, 631-646, doi:10.1038/cr.2010.55 (2010).
- 183 Sicinska, E. *et al.* Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell* **4**, 451-461 (2003).
- 184 Sicinska, E. *et al.* Essential role for cyclin D3 in granulocyte colony-stimulating factor-driven expansion of neutrophil granulocytes. *Mol Cell Biol* **26**, 8052-8060, doi:10.1128/MCB.00800-06 (2006).
- 185 Filipits, M. *et al.* Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **8**, 729-733 (2002).
- 186 Shaughnessy, J., Jr. *et al.* Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* **98**, 217-223 (2001).
- 187 Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K. & von Boehmer, H. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med* **205**, 2851-2861, doi:10.1084/jem.20081561 (2008).
- 188 Joshi, I. *et al.* Notch signaling mediates G1/S cell-cycle progression in T cells via cyclin D3 and its dependent kinases. *Blood* **113**, 1689-1698, doi:10.1182/blood-2008-03-147967 (2009).
- 189 Sawai, C. M. *et al.* Therapeutic targeting of the cyclin D3:CDK4/6 complex in T cell leukemia. *Cancer Cell* **22**, 452-465, doi:10.1016/j.ccr.2012.09.016 (2012).
- 190 Ando, K., Ajchenbaum-Cymbalista, F. & Griffin, J. D. Regulation of G1/S transition by cyclins D2 and D3 in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9571-9575 (1993).
- 191 Prabhu, S. *et al.* A novel mechanism for Bcr-Abl action: Bcr-Abl-mediated induction of the eIF4F translation initiation complex and mRNA translation. *Oncogene* **26**, 1188-1200, doi:10.1038/sj.onc.1209901 (2007).
- 192 Chiou, W. F., Don, M. J., Liao, J. F. & Wei, B. L. Psoralidin inhibits LPS-induced iNOS expression via repressing Syk-mediated activation of PI3K-IKK-IkappaB signaling pathways. *Eur J Pharmacol* **650**, 102-109.

-
- 193 Reichardt, H. M., Tuckermann, J. P., Bauer, A. & Schutz, G. Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Z Rheumatol* **59 Suppl 2**, II/1-5 (2000).
- 194 Marchetti, M. C., Di Marco, B., Cifone, G., Migliorati, G. & Riccardi, C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* **101**, 585-593 (2003).
- 195 Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kuhnle, S. & Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**, 1481-1486 (1997).

6 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AGM-Region	Aorta, Gonaden, Mesonephros - Region
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Cell Rezeptor
μ-BCR	mycro breakpoint cluster region
m-BCR	minor breakpoint cluster region
M-BCR	major breakpoint cluster region
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CLP	Common-Lymphoid-Progenitor
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMP	Common-Myeloid-Progenitor
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EGF-R	Epidermal Growth Factor - Receptor
EGIL	European Group of Immunol. Classific. of Leukemias
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung
g/μg/ng/kg	(mycro/nano/kilo) gramm
GIMEMA	Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Ddell'Adulto
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GMP	granulocyte-macrophage progenitor

GMALL	Study Group on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid-response-elements
GST	Glutathione S-transferase
H	hour/Stunde
HSC	Hematopoetic stem cells
IL-3/IL-7	Interleukin-3 / Interleukin-7
IgG/IgM	Immunglobulin G / Immunglobulin M
IP/ Co-IP	Immunpräzipitation
JAK	Januskinase
Kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
L/ μ L	Liter / mycro Liter
LSM	Laserscan Mikroskop
LT-HSC	Longterm - Hematopoetic stem cells
M	molare Masse
MPP	Multi-Potent-Progenitor
MEP	Megakaryotic-Erythroid-Progenitor
Min	Minute
mL	Milliliter
MRD	Minimal Rest Disease
MTOZ	Microtubuli Organisierendes Zentrum
N	Asparagin
P	Prolin
PBS	Phosphat buffered saline
PCA	Proliferation competition assay
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Real Time Polymerase Kettenreaktion
PGM	phosphoglycerate mutase
Ph ⁺	Philadelphia Chromosom positiv
PTP1b	Protein-Tyrosine Phosphatase 1B

PTP	Protein-Tyrosine Phosphatase
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Resistent
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SBP	Steroid-Bindeprotein
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	second
Ser	Serin
SH2/SH3	Src-homology 2/3
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
ST-HSC	Shortterm Hematopoetic stem cells
STS-1	Supressor of T-Cell Receptor Signaling 1
SZT	Stammzelltransplantation
T	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
TBS	Tris Buffered Saline (Tris gepufferte Saline
TCR	T-Cell Receptor (T-Zell Rezeptor))
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TKD	Tyrosin Kinase Domäne
TKI	Tyrosin Kinase Inibitor
TULA	T-cell Ubiquitin Ligand
Tyr/ Y	Tyrosin
UBA	Ubiquitin assoziiert
UV	Ultraviolet
WT	Wildtyp

7 Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderen Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, den _____

(Datum)

Marcus Liebermann _____

(Unterschrift)

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marcus Theo Martin Liebermann
Anschrift: Neugasshohl 1
61352 Bad Homburg
Geburtsdatum: 16.12.1978
Geburtsort: Leverkusen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Berufserfahrung

01/2012 – 02/2015

Clinical Research Associate (Trainee - CRA2)
Chiltern International GmbH / Bad Homburg

Studienerfahrungen in folgenden Indikationen:

- Diabetische Polyneuropathie (Phase 3)
- Kastrationsresistentes Prostatakarzinom (Phase 3)
- Morbus Crohn (Phase 3)
- Polycythaemia vera (Phase 2)
- Essentielle Thrombozythämie (Phase 2)

Tätigkeitserfahrungen:

- Selbstständige Durchführung von Feasibilities für div. Indikationen und Study Start-Up
- Vertragsverhandlungen mit den Zentren
- Durchführung von Ersteinreichungen & (Substantial) Amendments bei Ethiken
- Country-/Site IP Release
- Übersetzungen studienrelevanter Dokumente
- Vorbereitung, Durchführung und Follow-Up von:
 - Pre Study Besuchen, Initiierungen
 - Monitoring Besuche
 - Close Out Besuche
- Site management & query resolution mit Zentren und Data Management
- eCRFs (RAVE, Datalabs)
- QC-Checks (Übersetzungen, ISF, TMF)
- Filing von studienrelevanten Dokumenten
- Training von Trainee-CRAs
- Optimierung Firmen interner Prozesse
- Vorbereitung und Halten von Vorträgen im Rahmen von Investigator und Sponsoren Meetings

- Durchführung eines Trainings zum Thema:
„Investigator Fee Invoices and VAT & Reverse Charge“
- Entwicklung und Durchführung eines Trainings zum Thema:
„Body Language and Self Presentation“

Promotion, Studium und Schulbildung

08/2007 - 01/2015

Promotion in der Hämatologie/Onkologie, Prof. Dr. O. G. Ottmann

J. W. Goethe-Universität / Frankfurt am Main

Thema:

Die Bedeutung der Phosphatase STS-1 bei der Vermittlung einer mutationsunabhängiger Resistenz gegenüber Imatinib in der Ph⁺ ALL

Zentrale Arbeitstechniken:

- Zellkultur
- protein-biochemische Methoden
- Durchflusszytometrie
- genetische Methoden
- Wirkungsanalyse pharmazeutisch relevanter Substanzen

Forschungsaufenthalt in Innsbruck/Österreich

04/2006 - 01/2007

Diplomarbeit im Fachbereich Genetik, AK Prof. K. Willecke,

Rheinische Friedrich Wilhelms Universität / Bonn

Abschluss: Diplom-Biologe

Gesamtnote: sehr gut (1,5)

Thema:

Charakterisierung von Antikörpern gegen das humane Connexin31.9 Protein

Note: sehr gut (1,3)

Zentrale Arbeitstechniken:

- Zellkultur
- protein-biochemische Methoden
- genetische Methoden

10/2003 - 04/2006

Hauptstudium Biologie

Rheinische Friedrich Wilhelms Universität / Bonn

10/2001 - 10/2003

Vordiplom Biologie

Goethe Universität / Frankfurt am Main

10/1999 - 10/2001

Studium der Elektrotechnik

Rheinisch Westfälische Technische Hochschule / Aachen

08/1989 - 06/1998

Allgemeine Hochschulreife

Städtisches Gymnasium Herkenrath

Note: 2,3

Zivildienst

1998 - 1999

Zivildienst

Städtische Feuerwehr Bergisch Gladbach

Abgeschlossene Ausbildung: Rettungsanitäter

Note: 1,0

Weitere Kenntnisse

Sprachkenntnisse:

Englisch

verhandlungssicher

Französisch

Grundkenntnisse

Spanisch

Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse:

MS Office

sehr gut

Photoshop/Lotus Notes

gut

Sonstige Interessen

NLP; Body language und Kommunikation

Kochen

Triathlon und Cross-Fit

9 Publikationen

Marcus Liebermann, Nicola Crosetto, Patrick Brück, Oliver G. Ottmann, and Ivan Dikic
„Posttranscriptional modifications of Signal proteins in resistant Bcr-Abl positive leukaemias“
2nd INTERNATIONAL CONFERENCE ON MOLECULAR PERSPECTIVES ON
PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS; June 27-July 1, 2008, Dubrovnik, Croatia

Beitrag wurde für das Mildred Scheel scholarship ausgewählt

Marcus Liebermann, Daniela Hoeller, Susanne Badura, Tamara Tesanovic, Martin Ruthardt,
Oliver G. Ottmann

“The Role of the phosphatase Sts-1 in the Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)”
XVIII. Wilsede Meeting - MODERN TRENDS IN HUMAN LEUKEMIA AND CANCER;
June 19 -23, 2010; Wilsede, Germany

Marcus Liebermann, Daniela Hoeller, Susanne Badura, Tamara Tesanovic,
Martin Ruthardt, Oliver G. Ottmann

“The Role of the phosphatase Sts-1 in the Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)”
2rd UCT Science Day; September 8th, 2010; Frankfurt, Germany

Marcus Liebermann, Daniela Hoeller, Susanne Badura, Tamara Tesanovic, Hubert Serve,
Martin Ruthardt, Oliver G. Ottmann

The Protein Tyrosine Phosphatase STS-1 interacts with BCR-ABL and impairs the Response
of Philadelphia-positive Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) to Tyrosine Kinase Inhibitors
52nd ASH Annual Meeting and Exposition, December 4-7, 2010; Orlando, Florida, America

Beitrag erhielt den „ASH Travel Award“

Marcus Liebermann, Daniela Hoeller, Susanne Badura, Tamara Tesanovic,
Martin Ruthardt, Oliver G. Ottmann

“The Role of the phosphatase Sts-1 in the Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL)”
3rd UCT Science Day; September 9th, 2011; Frankfurt, Germany

Marcus Liebermann, Susanne Badura, Tamara Tesanovic, Martin Ruthardt, Oliver G. Ottmann

“Die Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren in der Ph+ ALL wird durch die Phosphatase STS-
1 vermittelt”

Jahrestagung der DGHO; 30. September - 4. Oktober, 2011; Basel, Schweiz