

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann

**Src-Kinasen als Mediatoren Bcr-Abl-induzierter
Leukämien: Aktivierungsmechanismus, biologische
Bedeutung und Relevanz als therapeutische
Zielstruktur**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Markus Warmuth
aus
Ingolstadt

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hallek

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P.B. Becker
Prof. Dr. Ch. Bender-Götze
Prof. Dr. St. Endres

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. K Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2002

Für meine Eltern, meine Frau Cindy und meinen Sohn Luis Benedikt

Wenn man in der Wissenschaft
etwas Bedeutendes oder Originelles schaffen will,
muss man sich auf das unvermeidliche Risiko
eines größeren Irrtums einlassen.

Stephen Jay Gould, „Zufall Mensch“

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit bestätige ich, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft und Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

München, 17.01.2002

Inhalte dieser Doktorarbeit wurden veröffentlicht in:

1. Danhauser-Riedl S., **Warmuth M.**, Druker B. J., Emmerich B. and **Hallek M.** (1996) „Activation of Src kinases p53/56^{lyn} and p59^{hck} by p210^{bcr-abl} in myeloid cells.“ *Cancer Research*, 56, 3589 - 3596.
2. **Hallek M.**, Danhauser-Riedl S., Herbst R., **Warmuth M.**, Winkler A., Kolb H. J., Druker B. J., Emmerich B., Griffin J. D. and Ullrich A. (1996). „Interaction of the receptor tyrosine kinase p145^{c-kit} with the p210^{bcr-abl} kinase in myeloid cells.“ *British Journal of Hematology*, 94, 5 - 16.
3. **Warmuth M.**, Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B. and **Hallek M.** (1997). „The Src-family kinase Hck interacts with Bcr/Abl by a kinase independent mechanism and phosphorylates the grb2-binding site of bcr“ *Journal of Biological Chemistry*, 272, 33260 – 33270
4. **Warmuth M.**, Danhauser-Riedl S. and **Hallek M.** (1999). „Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies“ *Annals of Hematology*, 78, 49 - 64.
5. **Warmuth M.**, Mathes R. and **Hallek M.** (2001): Verfahren zum Selektieren von Inhibitoren für Enzyme; Patenschrift DE 100 24 174 A1
6. Schäffer M., Schneiderbauer M., Weidler S., Tavares R., **Warmuth M.**, de Vos, G. and **Hallek M.** (2001). „Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases“. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 8068 – 8081
7. **Warmuth M.**, Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I. and **Hallek M.** (2002). “Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases”. **Blood, im Druck**
8. Schuster C., Forster K., Dierks H., Elsässer A., Behre G., Simon N., Danhauser-Riedl S., **Hallek M.** and **Warmuth M.** (2002). “The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription transcription factor regulation and neutrophilic differentiation are reverted by the Abl kinase inhibitor STI571”. **Blood, im Druck**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Philadelphia-positive Leukämien	1
1.1.1	Die molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation	2
1.1.1.1	Das c-Abl Protoonkogen	2
1.1.1.2	Das Breakpoint-Cluster-Region Gen	2
1.1.1.3	Die Philadelphia-Translokation und ihre molekularen Konsequenzen	3
1.1.2	Ätiologie der Philadelphia-Translokation	4
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie Philadelphia-positiver Leukämien	5
1.1.3.1	CML	5
1.1.3.2	ALL	6
1.1.3.3	CNL	7
1.1.4	Therapie Philadelphia-positiver Leukämien	7
1.1.4.1	CML	7
1.1.4.2	ALL	7
1.1.4.3	Therapie der Philadelphia-positiven Leukämien mit STI571	8
1.2	Molekulare Pathogenese der Ph-positiven Leukämien	10
1.2.1	Regulation der Hämatopoese	10
1.2.2	Die Rolle von Bcr-Abl in der Pathogenese Ph-positiver Leukämien	11
1.2.2.1	Transformierende und leukämogene Potenz von Bcr-Abl in Tier- und Zellkulturmodellen	11
1.2.2.2	Biologische Konsequenzen der Philadelphia-Translokation	13
1.2.2.2.1	Der Einfluss von Bcr-Abl auf das Überleben hämatopoetischer Zellen	13
1.2.2.2.2	Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen	15
1.2.2.2.3	Die Differenzierung Bcr-Abl-positiver hämatopoetischer Zellen	16
1.2.3	Bcr-Abl - ein multifunktionales Signaltransduktions-Protein	17
1.2.3.1	Molekulare Anatomie des Bcr-Abl Onkoproteins	17
1.2.3.1.1	Funktion der „Coiled-Coil“-Oligomerisierungs-Domäne	18
1.2.3.1.2	Y177 – die Grb2-Bindestelle	19
1.2.3.1.3	Die SH2-bindende Region („A-Box/B-Box-Motiv“)	20
1.2.3.1.4	Die SH3-Domäne	20
1.2.3.1.5	Die SH2-Domäne	21
1.2.3.1.6	Die Aktin-bindende Region	21
1.2.3.2	Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktions-Wege durch Bcr-Abl	22
1.2.3.2.1	Aktivierung des Ras-Signalwegs durch Bcr-Abl	22
1.2.3.2.2	Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs durch Bcr-Abl	23
1.2.3.2.3	Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs durch Bcr-Abl	24
1.3	Die Src-Kinasen	26
1.3.1	Struktur und Regulation von Src-Kinasen	26
1.3.1.1	Molekulare Architektur der Src-Kinasen	26
1.3.1.2	Regulation von Src-Kinasen	29
1.3.2	Die Rolle der Src-Kinasen in der Hämatopoese	29
1.3.2.1	Knockout-Studien	29
1.3.2.2	Die Rolle von Src-Kinasen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren	30
2	ZIELE DER ARBEIT	33

3	ERGEBNISSE	35
3.1	Bcr-Abl aktiviert Mitglieder der Familie der Src-Kinasen in myeloischen und lymphatischen Zelllinien	35
3.1.1	Literatur	35
3.1.2	Hintergrund	36
3.1.3	Ergebnisse	36
3.1.3.1	Bcr-Abl induziert die Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine	36
3.1.3.2	Bcr-Abl erhöht die Aktivität von Src-Kinasen in lymphatischen und myeloischen Zelllinien	37
3.1.3.3	Direkte Interaktion von Bcr-Abl und Src-Kinasen	38
3.2	Mechanismus der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl	39
3.2.1	Literatur	39
3.2.2	Hintergrund	39
3.2.3	Ergebnisse	39
3.2.3.1	Bcr-Abl und Src-Kinasen interagieren über einen komplexen tyrosinphosphorylierungs-unabhängigen Mechanismus	39
3.2.3.2	Bcr-Abl aktiviert Src-Kinasen über einen Kinase-unabhängigen Mechanismus	42
3.3	Essentielle Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr in einem Tiermodell für die Philadelphia-(Bcr-Abl)-positive B-ALL	44
3.3.1	Hintergrund	44
3.3.2	Ergebnisse	45
3.4	Genetische Untersuchung des Bindungsmechanismus des Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors STI571	50
3.4.1	Literatur	50
3.4.2	Hintergrund	50
3.4.3	Ergebnisse	51
3.4.3.1	Identifikation und genetische Validierung der Positionen 315 und 380 der Kinase-Domäne von Abl als Determinanten der Bindungsspezifität von STI571	51
3.4.3.2	Die Konformation der katalytischen Schleife („activation loop“) beeinflusst die Bindung von STI571 an Abl	54
3.5	Strukturbasierte Selektion und Validierung der dualspezifischen Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030	57
3.5.1	Literatur	57
3.5.2	Hintergrund	57
3.5.3	Ergebnisse	58
3.5.3.1	Identifikation von PP1 und CGP76030 als prototypische dualspezifische Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren	58
3.5.3.2	PP1 und CGP76030 hemmen Bcr-Abl und Src-Kinasen über einen identischen Bindemechanismus	59
3.5.3.3	Validierung der biologischen Potenz von PP1 und CGP76030 mit Hilfe Inhibitor-resistenter Mutanten	61
4	DISKUSSION	65
4.1	Bcr-Abl aktiviert Mitglieder der Familie der Src-Kinasen in myeloischen und lymphatischen Zelllinien	65
4.2	Mechanismus der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl	67

4.2.1	Limitierende Faktoren bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Bcr-Abl und Src-Kinasen	67
4.2.2	Die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl – ein Modell	68
4.3	Essentielle Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr in einem Tiermodell für die Philadelphia-(Bcr-Abl)-positive B-ALL	70
4.4	Genetische Untersuchung des Bindungsmechanismus des Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors STI571	74
4.4.1	STI571 - ein „Kinase-Reaktivierungs“-Inhibitor, aber kein Kinase-Inhibitor	74
4.4.2	Kann ein Medikament zu spezifisch sein? – mögliche, klinische Auswirkungen der optimalen Bindung von STI571	77
4.5	Strukturbasierte Selektion und Validierung der dualspezifischen Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030	78
4.5.1	Potentielle Bedeutung Inhibitor-resistenter Mutanten für die Selektion und Validierung niedermolekularer Kinase-Inhibitoren	78
4.5.2	PP1 und CGP76030, prototypische dual-spezifische Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren	81
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	LEBENS LAUF	115
8	ANHANG	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1: Molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation.	4
Abb. 1.2.1: Molekulare Architektur des Bcr-Abl Fusionsproteins.	18
Abb. 1.3.1: Molekulare Architektur und Regulationsmechanismus der Src-Kinasen.	27
Abb. 3.2.1: Bcr-Abl interagiert mit der SH2- und SH3-Domäne von Hck.	41
Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der Induktion Bcr-Abl-positiver Leukämien mit Hilfe des Knochenmark-Transduktions-/Transplantations-Systems.	46
Abb. 3.3.2: Die Deletion von Lyn, Hck und Fgr führt nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der durch Bcr-Abl induzierten myeloproliferativen Erkrankung in Mäusen	47
Abb. 3.3.3: Die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr spielen eine entscheidende Rolle für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL in Mäusen.	49
Abb. 3.4.1: Grundlagen der Spezifität von STI571 für Abl.	52
Abb. 3.5.1: Chemische Struktur der Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030.	58
Abb. 3.5.2: Genetische Untersuchung der Interaktion von Hck und PP1.	60
Abb. 3.5.3: PP1 und CGP76030 inhibieren den Akt-Signalweg – ein Abl-Inhibitions-unabhängiger Effekt.	63
Abb. 4.2.1: Modell für die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl.	68
Abb. 4.3.1: Modell zur differentiellen Bedeutung von Lyn, Hck und Fgr für die Bcr-Abl-positiv CML und B-ALL im Transduktions-/Transplantationsmodell.	71
Abb.4.4.1: Modell für die Inaktivierung von Abl durch STI571.	76
Abb. 4.5.1: Schematische Darstellung der Selektion von spezifischen Inhibitoren mit Hilfe von Mutanten eines Enzyms.	79
Abb. 4.5.2: Validierung „Enzym“-spezifischer und „Enzym“-unabhängiger Wirkungen eines Inhibitors mit Hilfe inhibitor-resistenter Mutanten.	80
Abb. 4.5.3: Modell für die Aktivierung von Akt durch das Zusammenwirken von Bcr-Abl und Src-Kinasen.	83

1 Einleitung

Humane Tumorerkrankungen beruhen auf erworbenen genetischen Defekten, die entweder zur Aktivierung eines Protoonkogens oder zur Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Gens führen. Untersuchungen an Tumorentitäten wie dem Kolon-Karzinom oder dem Glioblastom haben gezeigt, dass die Anhäufung und sequentielle Aneinanderreihung solcher Gendefekte zu einer Progression des Malignitätsgrads entsprechender Tumore führt. Vor allem die durch das Humane Genomprojekt zu erwartenden Einblicke in die genetischen Grundlagen der Entstehung von Krankheiten werden zu einem immer breiteren, aber auch detaillierterem Wissen über diejenigen Mechanismen führen, die aus einer gesunden und in einen Gewebskontext eingebetteten Zelle einen malignen, unrestringiert wachsenden Tumor werden lassen. Das Wissen um genetische Defekte und um die daraus resultierenden funktionellen und biologischen Konsequenzen kann helfen, in Zukunft die Idee von maßgeschneiderten Therapien und Medikamenten, sogenannten “molecular-based, tailor-made therapies“, auf breitem Feld zu verwirklichen. Die Philadelphia-(Ph)-Chromosom-positiven Leukämien sind schon heute ein Beispiel dafür.

1.1 Philadelphia-positive Leukämien

Die Philadelphia-Translokation war eine der ersten genetischen Veränderungen, die konsistent mit der Entstehung einer bestimmten Neoplasie, in diesem Falle der chronischen myeloischen Leukämie (CML), assoziiert werden konnte. 1960 beschrieben Nowell und Hungerford ein bei diesen Leukämien auftretendes kleines bzw. verkürztes Chromosom 22 (Nowell und Hungerford, 1960). 1973 konnte gezeigt werden, dass dem verkürzten Chromosom 22 eine balancierte, reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 ($t(9;22)(q34;q11)$) zugrunde lag (Rowley, 1973). Nach ihrem Entdeckungsort wird diese Translokation auch als Philadelphia-Translokation bezeichnet. Weitere Untersuchungen ergaben schließlich, dass diese Translokation zur Fusion des Breakpoint-Cluster-Region (BCR) Gens auf Chromosom 22 mit dem normalerweise auf Chromosom 9 gelegenen c-Abl Gen führt. Das dadurch entstehende Hybrid-Gen wird als Bcr-Abl bezeichnet (Sawyers, 1999; Faderl et al., 1999).

Insgesamt findet man die Philadelphia-Translokation bzw. Transkripte des daraus resultierenden Bcr-Abl Fusionsgens in ca. 95% der Patienten mit CML. Die CML ist aber nicht die einzige leukämische Erkrankung, der eine Philadelphia-Translokation zugrunde liegt. Auch bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) (25 – 30% der Fälle), sowie bei Patienten mit

chronisch neutrophiler Leukämie (CNL) ist dieses zytogenetische Merkmal in einem Teil der Fälle nachweisbar (Sawyers, 1999; Faderl et al., 1999).

1.1.1 Die molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation

1.1.1.1 *Das c-Abl Protoonkogen*

c-Abl ist ein in der Evolution hochkonserviertes Gen, das nicht nur bei Menschen und anderen Vertebraten, sondern auch bei *Drosophila melanogaster* essentielle Funktionen besitzt (Hoffmann, 1991). Ein Teil der biologischen Bedeutung von c-Abl konnte anhand des Phänotyps von Knockout-Mäusen entschlüsselt werden. c-Abl^{-/-}-Mäuse zeichnen sich beispielsweise durch Augen-Abnormalitäten, durch Defekte der Spermatogenese, durch osteoporotische Knochenveränderungen, durch Lymphopenien sowie durch eine ausgeprägte Atrophie von Milz und Thymus aus. Die Lebenserwartung von c-Abl^{-/-}-Mäusen ist stark reduziert (Li et al., 2000; Schwartzberg et al., 1991). Funktionell scheint c-Abl u.a bei der Regulation der Transkription, des Zellzyklus und der Organisation des Zytoskeletts eine Rolle zu spielen (Van Etten, 1999).

Neben der zellulären konnte auch eine virale Form des abl-Gens (v-abl) isoliert werden. Sie kodiert für das transformierende Onkogen des Abelson-Mäuse-Leukämie-Virus (Abelson und Rabstein, 1970; Ramakrishnan und Rosenberg, 1989; Witte, 1986). Beide Formen des Gens kodieren für eine Tyrosinkinase. Auch weisen beide eine große Ähnlichkeit in ihrer DNA-Sequenz auf, wobei die v-abl-ähnlichen Sequenzen im humanen c-abl in den Exons II - X lokalisiert sind (Heisterkamp et al., 1983). Darüber hinaus besitzt c-abl aber noch die Exons IA und IB, von denen eines beim Splicevorgang alternativ an das Exon II gekoppelt wird (Shtivelman et al., 1986). Auf diese Weise entstehen zwei Arten von c-Abl-Proteinen, die sich lediglich in 19 am N-Terminus gelegenen Aminosäuren unterscheiden. Ob diese beiden c-Abl-Proteine unterschiedliche physiologische Funktionen erfüllen, ist ungeklärt.

1.1.1.2 *Das Breakpoint-Cluster-Region Gen*

Das Bcr-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 lokalisiert. Es umfasst insgesamt 23 Exons (Heisterkamp et al., 1985). Der Phänotyp von Bcr^{-/-}-Mäusen ist weitaus weniger dramatisch als derjenige von Abl^{-/-}-Mäusen. Neutrophile Granulozyten von Bcr^{-/-}-Mäusen zeigen einen erhöhten „respiratorischen Ausbruch“ (respiratory burst) nach Exposition gegenüber Endotoxinen. Weitere Auffälligkeiten der Hämatopoese wurden nicht gefunden. Besonderheiten gibt es aber im Verhalten

der Mäuse: Bcr^{-/-}-Mäuse zeigen in Gemeinschaft und unter physiologischem und sozialem Stress eine erhöhte Kampfbereitschaft und eine abnorme Stressreaktion (Voncken et al., 1998; Voncken et al., 1995).

1.1.1.3 Die Philadelphia-Translokation und ihre molekularen Konsequenzen

Wie bereits erwähnt, führt die Philadelphia-Translokation im Bereich des Chromosom 22 zur Fusion von Teilen des Bcr-Gens mit Teilen des normalerweise auf Chromosom 9 lokalisierten Abl-Gens. In beiden Genen können daran jeweils verschiedene Bruchpunkte beteiligt sein, so dass am Ende Fusions- oder Hybridgene unterschiedlicher Größe entstehen. Diese Hybridgene, bzw. die daraus hervorgehenden Fusionsproteine umfassen einen konsistenten Anteil des Abl-Gens, jedoch einen variablen Anteil des Bcr-Gens. Interessanter Weise tragen diese unterschiedlichen Bcr-Abl-Hybride zumindest zum Teil zu unterschiedlichen leukämischen Phänotypen bei.

Im c-Abl-Gen auf Chromosom 9 (9q34) kann die Bruchstelle überall in einem 300 kb umfassenden Bereich zwischen der Region 5' von Exon IA und 3' des Exons IB liegen. Unabhängig vom genauen Ort des Chromosomenstrangbruchs führen Splice-Vorgänge auf mRNA-Ebene zur Fusion der beteiligten Bcr-Sequenzen mit dem Abl-Exon a2.

Im Bcr-Gen sind die Strangbrüche auf umschriebene „breakpoint cluster regions“ (bcr) begrenzt. Im wesentlichen werden dabei 3 Bruchpunkt-Regionen unterschieden, die micro-(μ)-BCR, die minor-(m)-BCR und die major-(M)-BCR. Die am häufigsten von Strangbrüchen betroffene M-BCR umspannt 5,8 kb und liegt im Bereich der Exons 12 – 16. Diese wurden ursprünglich auch als Exons b1 – b5 bezeichnet. Durch alternatives Splicing entstehen Hybrid-mRNA-Moleküle, bei denen entweder Exon b2 oder Exon b3 an das Abl Exon a2 fusioniert wird. Die daraus resultierenden Hybrid-RNAs (b2a2 oder b3a2) kodieren für ein 210 kDa großes Fusionsprotein, p210^{bcr-abl}, welches pathognomonisch für die CML ist. p210^{bcr-abl} findet sich aber auch in ca. 30% der Fälle von Philadelphia-positiver ALL.

Die m-BCR liegt 5' der M-BCR zwischen den alternativen Exons e2' und e2. Das aus einem Bruch in diesem Bereich resultierende Fusions-Transkript e1a2 wird in ein Fusionsprotein von 190 kDa translatiert, und man findet es in erster Linie bei Patienten mit Philadelphia-positiver ALL. Mit sensitiven Methoden, wie beispielsweise einer reversen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), können e1a2-Transkripte auch in Patienten mit klassischer p210^{bcr-abl}-CML gefunden werden. Hier stellen sie aber irrelevante Nebenprodukte, wahrscheinlich auf alternativem Splicing beruhend, dar.

Erst kürzlich identifiziert wurde die μ -BCR. Sie liegt 3' des Exons 19 und das daraus resultierende Fusionsgen kodiert für p230^{bcr-abl}. p230^{bcr-abl} ist pathognomonisch für die sehr seltene CNL.

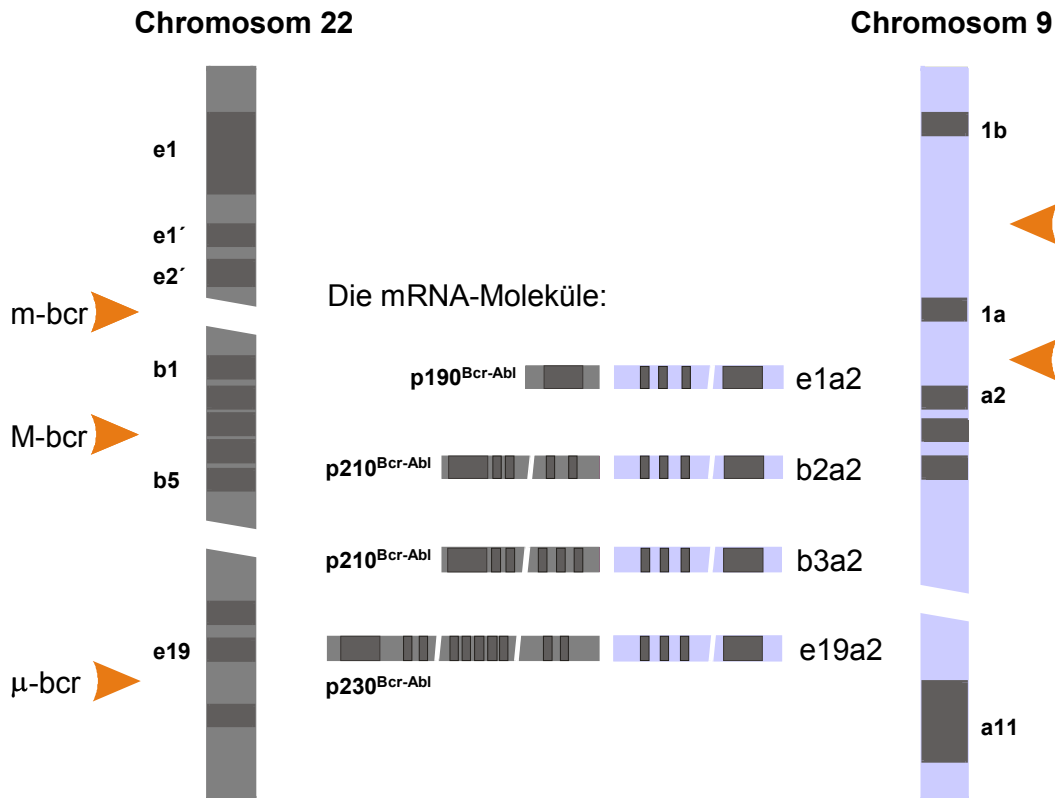


Abb. 1.1.1: Molekulare Anatomie der Philadelphia-Translokation.

Unabhängig vom Bruchpunkt und der Größe des Fusions-Transkripts, führt die Fusion von Bcr mit c-Abl zu einer konstitutiven Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase (Konopka et al., 1984). Die Wichtigkeit dieser Aktivierung für die transformierenden und leukämogenen Eigenschaften von Bcr-Abl konnte in zahlreichen Untersuchungen und in verschiedensten Zellkultur- und Tiermodellen belegt werden (siehe 1.2).

1.1.2 Ätiologie der Philadelphia-Translokation

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Philadelphia-Translokation führen, sind vollkommen unklar. Eine Häufung von Erkrankungsfällen bei Überlebenden der Atombombenangriffe

von Hiroshima und Nagasaki deutet auf eine Beteiligung von ionisierenden Strahlen hin (Tanaka et al., 1989). Tatsächlich konnte durch entsprechende Experimente gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung in hämatopoetischen Zellen zur Entstehung von Bcr-Abl-Fusions-Transkripten führt (Deininger et al., 1998). Interessant ist außerdem die Beobachtung, dass die räumliche Distanz zwischen dem Bcr-Gen und dem Abl-Gen in CD34-positiven Zellen erstaunlich gering ist, zumindest in bestimmten Phasen des Zellzyklus (S-G2-Transition) und abhängig vom Status der Zelldifferenzierung (myeloisch > lymphatisch) (Neves et al., 1999). Diese räumliche Nähe der beiden Gene, vor allem während der S-G2-Transition, könnte die Kollision und damit die reziproke Rekombination der Gene erleichtern.

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild und Epidemiologie Philadelphia-positiver Leukämien

1.1.3.1 CML

Die CML betrifft in erster Linie ältere Menschen. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose liegt bei 45 - 55 Jahren. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 1 – 2 Fällen pro 100 000 Einwohner.

Biologisch gesehen ist die CML definiert als klonale, myeloproliferative Erkrankung ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle. Entsprechend dieses Ursprungs kommt es nicht nur zur malignen Expansion granulözytärer Zellen. Auch monozytäre, erythrozytäre, megakaryozytäre sowie lymphatische Zellreihen sind am Krankheitsgeschehen beteiligt (Fialkow et al., 1977). Neben einer Vermehrung dieser Zellen im peripheren Blut findet man eine deutliche myeloische Hyperplasie des Knochenmarks. In Bezug auf die klinische Symptomatik und die Pathologie zeichnet sich die CML durch einen stadienhaften Verlauf aus, und es wird zwischen der chronischen Phase, der Akzelerationsphase und der Blastenkrise unterschieden. Die Symptomatik während der chronischen Phase ist uncharakteristisch, die Patienten klagen über Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust. Abdominales Völlegefühl reflektiert nicht selten eine massive Vergrößerung von Milz und Leber, die bei ca. 50% der Patienten beobachtet wird (Savage et al., 1997). Nicht selten (50% der Fälle) bleibt die Erkrankung in diesem Stadium symptomlos.

3 – 5 Jahre nach Erstmanifestation, unter Therapie mit Interferon- α (siehe 1.1.4) evtl. auch erst später, geht die CML zunächst in eine Akzelerationsphase, anschließend in eine terminale Blastenkrise über. Die Erkrankung nimmt ein polysymptomatisches Bild an, gekennzeichnet durch Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Schwellung von Milz und Leber. Die periphere Leuko- und Thrombozytenzahl kann nicht mehr adäquat durch Chemotherapeutika kontrolliert werden. Im

Knochenmark kommt es zu einer zunehmenden Verdrängung der regulären Hämatopoese durch den malignen Zellklon. Anämien und Thrombozytopenien sind die Folge.

Zytologisch ist der Übergang der Erkrankung in dieses Finalstadium charakterisiert durch das Auftreten eines hohen Prozentanteils (>30%) undifferenzierter, blastärer Zellen im peripheren Blut oder im Knochenmark sowie durch die Manifestation extramedullärer, leukämischer Infiltrate. Bei einem Drittel der Patienten haben die Blasten eine lymphatische Morphologie und exprimieren typische lymphatische Zellmarker (z.B. CD10). Das Krankheitsbild entspricht dann weitestgehend einer ALL. Bei den übrigen Patienten ähnelt der Phänotyp der malignen Zellen demjenigen einer akuten myeloischen Leukämie. Unbehandelt, aber auch unter Behandlung, führt die Blastenkrise innerhalb weniger Monate zum Tod. Häufige Todesursachen sind Infektionen, Blutungen oder ein terminaler Blastenschub mit Multiorganversagen.

1.1.3.2 ALL

Die ALL wird definiert als maligne Erkrankung der Lymphopoese, charakterisiert durch die klonale Proliferation undifferenzierter lymphatischer Zellen. Sie tritt mit einer Inzidenz von 1 : 100 000 auf.

Ca. 25 - 30% der Fälle von ALL sind mit einer Philadelphia-Translokation assoziiert, wobei dann in erster Linie ältere Patienten betroffen sind. Die klinischen Symptome der Ph-positiven ALL entsprechen zum Großteil der Symptomatik einer lymphatischen Blastenkrise und leiten sich in erster Linie aus der Verdrängung der normalen Hämatopoese, insbesondere der Erythropoese, im Knochenmark durch den malignen Zellpool ab. Häufige Beschwerden sind Schwächegefühl und Abgeschlagenheit, Blutungen und Petechien, Infektanfälligkeit und Knochenschmerzen. Nicht selten findet man bei den Patienten eine Vergrößerung der Lymphknoten (Lymphadenopathie) sowie von Leber und Milz.

Basierend auf zytochemischen und immunzytologischen Kriterien handelt es sich bei der Ph-positiven ALL um eine B-Vorläufer-ALL, d.h. es kommt zu einem tiefgreifenden Differenzierungsstopp in der B-Zell-Reihe. Unklar ist, ob es sich bei allen Fällen der Ph-positiven ALL um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt oder aber um eine erst zum Zeitpunkt der Blastenkrise diagnostizierte CML. Diese Frage wurde von verschiedenen Untersuchern unterschiedlich beantwortet (Radich, 2001).

1.1.3.3 CNL

Die CNL ist eine sehr seltene myeloproliferative Erkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch eine moderate Vermehrung überwiegend ausgereifter neutrophiler Granulozyten. Die Erkrankung verläuft in der Regel weit weniger dramatisch als die Ph-positive B-ALL oder die CML. Bei einigen Patienten mit CNL konnte eine Philadelphia-Translokation und die Expression von p230^{bcr-abl} nachgewiesen werden (Pane et al., 1996).

1.1.4 Therapie Philadelphia-positiver Leukämien

1.1.4.1 CML

Trotz etlicher Fortschritte sind die Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit CML unbefriedigend. Die einzige potentiell kurative Therapieform ist die allogene Knochenmarkstransplantation (KMT) mit „HLA-kompatiblen“ Knochenmark von verwandten oder nichtverwandten Spendern. Aufgrund des Mangels an geeigneten Spendern einerseits sowie der enormen Toxizität des Prozederes andererseits kann eine allogene KMT nur bei ca. 20 - 30% der Patienten durchgeführt werden. Erfolgversprechend ist die allogene KMT vor allem während der chronischen Phase der Erkrankung. Darüber hinaus sind die Erfolgsaussichten bei jungen Patienten (<50 Jahre) weitaus größer als bei älteren Patienten (>50 Jahre) (Clift und Storb, 1996; Horowitz et al., 1996; van Rhee et al., 1997). Eine KMT wird daher nur bei Patienten unter 55 Jahren durchgeführt.

 Patienten, die nicht für eine Transplantation in Frage kommen, erhalten entweder eine Therapie mit Interferon- α oder mit konventionellen Chemotherapeutika, z.B. Busulfan oder Hydroxyurea. Keines der beiden Chemotherapeutika ist in der Lage, die fatale Transformation zur Blastenkrise zu verhindern. Ähnliches gilt für Interferon- α , das aber in Bezug auf die Überlebensraten den beiden vorangenannten Chemotherapeutika überlegen ist (Kantarjian et al., 1998). Trotz erheblicher Nebenwirkungen ist Interferon- α daher Mittel der Wahl bei Patienten, die nicht für eine KMT in Frage kommen (Faderl et al., 1999).

1.1.4.2 ALL

Die Therapie der Ph-positiven ALL ist noch wesentlich problematischer: die Assoziation einer ALL mit einem Philadelphia-Chromosom gilt als negativer prognostischer Marker. Ansprechraten und Überlebenszeiten sind deutlich geringer als bei Patienten mit Ph-negativer ALL (Faderl et al., 2000; Radich, 2001). In Deutschland wird die Ph-positive ALL basierend auf den Leitlinien der deutschen

ALL-Studiengruppe (GMALL) mit einem komplexen Chemotherapie-Schema behandelt, bestehend aus Vorphasetherapie, Induktionstherapie, Konsolidationstherapie und Erhaltungstherapie. Wegen der schlechten Ansprech- und Remissionsraten bei Chemotherapie sollten Patienten mit Ph-positiver B-ALL einer KMT unterzogen werden.

1.1.4.3 Therapie der Philadelphia-positiven Leukämien mit STI571

Die Ph-positiven Leukämien sind ein Paradebeispiel für Erkrankungen, die in Zukunft mit Hilfe eines maßgeschneiderten, mechanismus-basierten Medikaments therapiert werden könnten.

Ausschlaggebend für die Induktion von Leukämien durch Bcr-Abl ist die konstitutive Aktivierung der Abl-Kinase durch die Fusion mit Bcr (s.u.). Schon seit längerem galt daher die spezifische Inhibition dieser Kinase mit ATP-kompetitiven, niedermolekularen Substanzen als ein möglicher, molekular-definierter Therapieansatz (Warmuth et al., 1999). 1996 berichteten Druker und Kollegen erstmals über das therapeutische Potential von STI571 (früher CGP57148), einer Substanz, die nach diesem Prinzip zu wirken schien (Druker et al., 1996). STI571 ist ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat, welches spezifisch Abl-Kinase, Stammzellfaktor-Rezeptor-Kinase und PDGF-Rezeptor-Kinase inhibiert (Buchdunger et al., 2000; Okuda et al., 2001). Untersuchungen an Zelllinien und Patientenzellen zeigten, dass STI571 das Wachstum, die Koloniebildung und das Überleben Bcr-Abl-positiver Zellen, nicht aber Bcr-Abl-negativer Zellen hemmte (Deininger et al., 1997; Druker et al., 1996, Carroll, 1997). Darüber hinaus verminderte STI571 die Expansion humaner Zelllinien in einem Mausmodell (le Coutre et al., 1999).

Mittlerweile befindet sich STI571 in zahlreichen klinischen Studien. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass STI571 gut verträglich ist und kaum Nebenwirkungen verursacht. Eine dosis-limitierende Konzentration wurde nicht gefunden. Bei Patienten in der späten chronischen Phase der CML und mit dokumentierter klinischer Interferon- α -Resistenz führte STI571 in 98% der Fälle zu einer hämatologischen Remission mit Normalisierung des peripheren Blutbildes. In mehr als 50% der Fälle wurde eine zytogenetische Antwort unterschiedlichen Ausmaßes beobachtet. Die unter STI571 erzielten Remissionen waren unter kontinuierlicher Verabreichung der Substanz stabil (Druker et al., 2001b). Erste Daten aus Phase-II-Studien scheinen diese Daten zu belegen (Mauro und Druker, 2001).

Dem großen klinischen Erfolg bei Anwendung in der chronischen Phase der CML steht die rasche Entwicklung einer STI571-Resistenz bei Patienten mit Blastenkrise oder einer primären Ph-positiven B-ALL gegenüber. In einer Phase-I-Studie entwickelten über 90% der Patienten mit Ph-positiver ALL und 82% der Patienten in Blastenkrise ein Rezidiv. In einer Phase-II-Studie lag das

mittlere Überleben der Patienten nicht (ALL) oder nur geringfügig (myeloische Blastenkrise) über demjenigen von Patienten, die mit herkömmlichen Therapieschemata behandelt worden waren. Die Mechanismen der STI571-Resistenz sind heterogen und reichen von der Expression von „drug resistance“-Genen, über eine Amplifikation des Bcr-Abl-Gens bis hin zu spezifischen Punktmutationen in Bcr-Abl, welche die Interaktion von STI571 mit Abl blockieren (Gambacorti-Passerini et al., 2000, Gorre, 2001).

1.2 Molekulare Pathogenese der Ph-positiven Leukämien

1.2.1 Regulation der Hämatopoese

Das Leben aller somatischen Zellen und damit auch aller hämatopoetischen Zellen ist gekennzeichnet durch Proliferation, Zelldifferenzierung und programmierten Zelltod (Apoptose). Um die notwendige Größe des hämatopoetischen Zellpools konstant zu halten und äußeren Umständen anzupassen, müssen im Gegenzug zur Eliminierung von Zellen durch Apoptose ständig Zellen durch Proliferation und Differenzierung neu nachgebildet werden. Diese Neubildung geht von weitgehend undifferenzierten, pluripotenten Stammzellen aus.

Die Steuerung von Teilung, Differenzierung und das Absterben von Zellen wird in der Hämatopoese durch spezifische Wachstumsfaktoren reguliert. Dabei handelt es sich um Glykoproteine, die ihre Wirkung durch die Bindung an transmembranäre Proteinrezeptoren entfalten. Beispiele für hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind der Makrophagen-Kolonie-Stimulierende Faktor (M-CSF oder CSF-1), der Stammzellfaktor (SCF, auch Steel factor, c-Kit-Ligand oder Mastzell-Wachstumsfaktor genannt), FLT3-Ligand, zahlreiche Interleukine (IL, z.B. IL-3 und IL-6), der Granulozyten- sowie der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierende Faktor (G-CSF, GM-CSF) und der Leukämie-Inhibierungs-Faktor (LIF). Die Rezeptoren für diese Wachstumsfaktoren werden aufgrund funktioneller Unterschiede in zwei Gruppen eingeteilt. Einige Rezeptoren (z.B. die Rezeptoren für M-CSF und SCF) besitzen im Bereich des zytoplasmatischen Anteils Tyrosinkinase-Domänen. Sie gehören damit zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (=Rezeptor-Tyrosinkinasen, RTK). Im Gegensatz dazu besitzen die sogenannten Zytokinrezeptoren (CR) weder Tyrosinkinase- noch sonstige bekannte enzymatische Aktivitäten. Sie sind in ihrer Wirkung auf nachgeschaltete zytosolische Tyrosinkinasen und Enzyme angewiesen. Beispiele für diesen Rezeptortyp sind die Interleukin-Rezeptoren. Ausgehend von der Bindung der jeweiligen Liganden an ihren Rezeptor kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Hierzu gehören unter anderem der JAK/STAT-Signalweg (Janus-Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), der Ras-Signalweg und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg.

Neben Zytokinen spielen aber auch Adhäsionsvorgänge zwischen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen einerseits und Stromazellen sowie der extrazellulären Matrix des Knochenmarks andererseits eine wichtige Rolle in der Hämatopoese. Sie können diese positiv oder negativ beeinflussen (Prosper und Verfaillie, 2001; Simmons et al., 1997). Neben CD44, Selectinen (L-Selectin), sowie mucinartigen (CD34, CD43, CD45RA, CD164) und immunglobulinartigen (Platelet-endothelial-(PE) CAM-1) Zellmembranrezeptoren spielen Integrine eine wichtige Rolle bei der

Regulation der Hämatopoese. Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die auf praktisch allen Zellarten exprimiert werden. Sie vermitteln sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Interaktionen (Humphries, 2000).

1.2.2 Die Rolle von Bcr-Abl in der Pathogenese Ph-positiver Leukämien

1.2.2.1 *Transformierende und leukämogene Potenz von Bcr-Abl in Tier- und Zellkulturmodellen*

Die herausragende Bedeutung des Bcr-Abl-Onkoproteins für die Induktion der CML und der Ph-positiven B-ALL konnte in zahlreichen in-vitro- und in-vivo- Modellen belegt werden, u.a. durch die Herstellung Bcr-Abl-transgener Tiere (Heisterkamp et al., 1990; Honda et al., 1995; Honda et al., 1998). Huettner und Kollegen gelang es transgene Mauslinien zu etablieren, die Bcr-Abl unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-sensitiven Promotors exprimierten. Diese Mäuse entwickelten eine B-Vorläuferzell-Leukämie, die morphologisch in hohem Masse der humanen Ph-positiven B-ALL glich. Interessanterweise war der leukämische Phänotyp dieser Mauslinien reversibel, d.h. durch Behandlung der Mäuse mit Tetrazyklin und der damit verbundenen Repression der Bcr-Abl-Expression normalisierten sich die peripheren Zellzahlen und vergrößerte Lymphknoten bildeten sich zurück (Huettner et al., 2000).

Die transformierende und leukämogene Wirkung von Bcr-Abl konnte außerdem mit Hilfe eines retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodells belegt werden (Daley et al., 1990). Dabei wird Spendermäusen Knochenmark entnommen und dieses wird mit Retroviren, die für Bcr-Abl kodieren, infiziert. Nach Injektion des infizierten Knochenmarks in zuvor letal bestrahlte Empfängeräuse entwickeln diese eine Leukämie, eine Beobachtung, welche die Intaktheit der Kinase-Domäne von Abl voraussetzt (Zhang und Ren, 1998). Abhängig von der Vorbehandlung der Spendermäuse mit 5-Fluorouracil (5-FU) sowie von unterschiedlichen Kultivierungs- und Infektionsbedingungen entwickeln die Empfängeräuse entweder eine myeloproliferative Erkrankung (MPE), die phänotypisch der CML gleicht, oder eine akute lymphoblastäre Leukämie, die als Korrelat der humanen Ph-positiven B-ALL gesehen werden kann (Li et al., 1999).

Das dem retroviralen Transduktions-/Transplantationsmodell zugrunde liegende experimentelle Prozedere konnte in den letzten Jahren effizient verbessert werden. Entsprechend wird dieses Modell mittlerweile routinemäßig zur Erforschung Bcr-Abl-abhängiger Leukämien eingesetzt (Li et al., 1999; Pear et al., 1998; Zhang und Ren, 1998). Darüber hinaus kann das Verfahren ohne

große Mühe in unterschiedlichem genetischen Hintergrund (Balb/c, C57BL/6, etc.) und in Knockout-Mauslinien verwendet werden. Vor allem aber die Möglichkeit gezielt die zwei wesentlichen Formen Ph-positiver Leukämien differentiell zu induzieren macht dieses System zu einem wichtigen Werkzeug.

Neben den oben erwähnten Tiermodellen sind Zellkulturmodelle ein wichtiges Hilfsmittel zur Erforschung Ph-positiver Leukämien. Hierzu gehören insbesondere die hämatopoetischen Zelllinien 32D und BaF/B3. Während 32D-Zellen myeloischen Progenitor-Zellen entsprechen und unter Stimulation mit G-CSF zu neutrophilen Granulozyten ausdifferenzieren, handelt es sich bei BaF/B3-Zellen um prä-B-Zellen. Beide Zelllinien sind murinen Ursprungs und benötigen Interleukin-3 (IL-3) als Wachstums- und Überlebensfaktor. Hingegen induziert die Expression von Bcr-Abl in beiden Zelllinien eine IL-3-Unabhängigkeit in Bezug auf Überleben und Proliferation (Daley und Baltimore, 1988; Laneuville et al., 1991) und beide Zelllinien können dann in immundefizienten oder syngeneten Mäusen tödliche Leukämien hervorrufen (Ilaria und Van Etten, 1995; Matulonis et al., 1995; Skorski et al., 1998). Darüber hinaus blockiert Bcr-Abl die in parentalen 32D-Zellen mögliche Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten (Perrotti et al., 1998).

Außer hämatopoetischen Zelllinien wurden auch Fibroblasten als Werkzeug für die Untersuchung der transformierenden Wirkung von Bcr-Abl verwendet. Interessant war dabei vor allem die Beobachtung, dass Bcr-Abl zwar Rat1-Fibroblasten, nicht aber NIH3T3-Fibroblasten zu transformieren vermochte (Daley et al., 1987; Lugo und Witte, 1989).

Vergleicht man Versuchsergebnisse aus hämatopoetischen Zelllinien mit denjenigen aus Fibroblasten, so findet man gerade in Bezug auf Struktur-Funktions-Beziehungen (siehe 1.2.3.1) erhebliche Unterschiede zwischen diesen beiden Zellsystemen. Diese und andere Beobachtungen haben die Wertigkeit von Zellkulturmodellen stark in Frage gestellt, eine Tatsache, die durch die in den letzten Jahren erhobenen Daten im murinen Transplantationsmodell relativiert wurde. Vergleicht man Daten aus dem Transplantationsmodell mit denjenigen aus Zellkultursystemen, so fällt eine starke Korrelation von Beobachtungen zur Induktion einer B-ALL mit Ergebnissen aus Experimenten mit hämatopoetischen Zelllinien auf. Umgekehrt gibt es hohe Übereinstimmungen zwischen Beobachtungen zur Induktion eines myeloproliferativen Syndroms und Resultaten aus Experimenten mit Rat1-Fibroblasten.

1.2.2.2 *Biologische Konsequenzen der Philadelphia-Translokation*

1.2.2.2.1 **Der Einfluss von Bcr-Abl auf das Überleben hämatopoetischer Zellen**

Trotz des Wissens um die Rolle von Bcr-Abl als entscheidendes pathogenetisches Agens für die Entstehung Ph-positiver Leukämien, wird deren Biologie nur zum Teil verstanden.

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass Bcr-Abl in die Abläufe des programmierten Zelltodes (Apoptose) eingreift und das Überleben hämatopoetischer Zellen verlängert. Hierfür spricht u.a. die Tatsache, dass die Expression von Bcr-Abl in hämatopoetischen Zelllinien zu Wachstumsfaktor-unabhängigem Überleben der Zellen führt (Cortez et al., 1995; Kabarowski et al., 1994). Darüber hinaus zeigen Bcr-Abl-positive Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber DNA-schädigenden, pro-apoptotischen Stimuli, z.B. UV-Bestrahlung, ionisierende Strahlung oder Zytostatika (Bedi et al., 1994; McGohan et al., 1994).

Das Phänomen „Apoptose“ definierte sich ursprünglich morphologisch: man versteht darunter den nur z.T. selbstgesteuerten und programmierten Tod von Zellen, charakterisiert durch Zellschrumpfung, Chromatinverdichtung, Durchlöcherung der Zellmembran und Zerfall von Zellen in kleine Fragmente (apoptotische Körper). Getrieben wird dieser organisierte Zerfall von Zellen durch sogenannte Caspasen, Enzyme aus der Familie der Cystein-Proteasen. Diese liegen in normalen Zellen in proenzymatischer, inaktiver Form vor und werden erst als Reaktion auf apoptotische Stimuli aktiviert. Neben sogenannten Todes- („Death“-)Rezeptoren spielen die Mitochondrien eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivität von Caspasen und damit der Apoptose: Cytochrom C, ein Baustein der mitochondrialen Membran, ist einer der stärksten Aktivatoren von sogenannten „Initiator“-Caspasen und seine Freisetzung aus der mitochondrialen Membran induziert Apoptose durch Bildung sogenannter Apoptosome. Dabei handelt es sich um Multiprotein-Komplexe, die neben Pro-Caspasen auch das Protein Apaf-1 enthalten (Green und Reed, 1998).

Es gibt zahlreiche Signalproteine, die sowohl positiv als auch negativ die Stabilität mitochondrialer Membranen beeinflussen und Überlebens- oder Todesignale von der Zellmembran an die Mitochondrien übertragen. Prototypen stabilisierender, also anti-apoptotisch wirkender Proteine sind Bcl-2 und Bcl-XL. Proteine wie Bax, Bad, Bid und Bim reduzieren die Stabilität der Mitochondrienmembran. Bax kommt dabei eine entscheidende Rolle als Effektor zu: es ist in der Lage, Kanäle in der mitochondrialen Membran auszubilden und könnte so die Freisetzung von Cytochrom C bewirken. Bcl-2 und Bcl-XL sind Bax-Antagonisten, die mit Bax interagieren und durch Bildung von Heterodimeren dieses inaktivieren. Bad, Bid und Bim wiederum sind Bax-Agonisten. Sie

binden Bax und führen zu Konformationsänderungen, welche die Bildung von Bax-Kanälen in der Mitochondrienmembran begünstigen. Bad bindet außerdem an Bcl-XL und bewirkt so die Freisetzung von pro-apoptotischem Bax aus Bcl-XL:Bax Heterodimeren (Adrain und Martin, 2001; Gross et al., 1999a). Die Phosphorylierung von Bad an verschiedenen Serin-Resten, beispielsweise durch Akt, verhindert die Interaktion von Bad mit Bcl-XL.

Das wachsende Wissen um die molekularen Abläufe während der Apoptose hat stark zu einem besseren Verständnis der Wirkung von Bcr-Abl auf das Überleben hämatopoetischer Zellen beigetragen. Amarante-Mendes und Kollegen konnten zeigen, dass der durch Bcr-Abl induzierte Block der Apoptose als Antwort auf eine Reihe zytotoxischer Agentien oberhalb der Freisetzung von Cytochrom C und der Aktivierung des Apoptosoms liegt (Amarante-Mendes et al., 1998b). Zwei Beobachtungen scheinen dabei von besonderer Bedeutung. Zum einen erhöht Bcr-Abl die Expression von Bcl-XL (Amarante-Mendes et al., 1998a), zum anderen induziert es die Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad (Neshat et al., 2000). Interessanterweise werden diese Effekte durch unterschiedliche Signalwege vermittelt. Die Induktion von Bcl-XL wird über die Aktivierung des STAT-5-Signalwegs vermittelt (de Groot et al., 2000; Gesbert und Griffin, 2000; Horita et al., 2000), die Phosphorylierung von Bad erfolgt zum einen über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg (siehe 1.2.3.2.2), zum anderen aber auch über einen Ras/Raf-abhängigen Signalweg (Neshat et al., 2000) (siehe 1.2.3.2.1).

Während eine Rolle von Bcl-XL und Bad in der durch Bcr-Abl induzierten Apoptose-Resistenz weitgehend klar ist, ist die Beteiligung von Bcl-2 umstritten. Zwar fanden etliche Arbeitsgruppen die Expression von Bcl-2 in Bcr-Abl-transformierten Zellen hochreguliert (Sanchez-Garcia und Grutz, 1995; Zhu et al., 1996), andere aber berichteten über eine Herunterregulation der Bcl-2 Proteinexpression (Amarante-Mendes et al., 1998a).

Neben der Hemmung apoptotischer Signalwege scheint es noch einen weiteren Mechanismus zu geben, der das Überleben Bcr-Abl-positiver Zellen beeinflusst. Nishii und Kollegen konnten zeigen, dass Bcr-Abl nach Exposition gegenüber DNA-schädigenden Stimuli (Zytostatika, Strahlung) zur Induktion eines protrahierten G2-Zellzyklusarrests führt (Nishii et al., 1996). Diese Verlängerung der G2/M-Übergangsphase könnte Bcr-Abl-positiven Zellen erlauben, DNA-Schäden, die durch genotoxische Substanzen oder Strahlung während der S-Phase verursacht wurden, zu beheben. Dadurch kann die sogenannte „mitotische Katastrophe“, also Zelltod aufgrund stark beschädigter DNA, umgangen werden.

Obwohl all diese Daten auf einen erheblichen Beitrag anti-apoptotischer Signale zum Phänotyp insbesondere der CML-Blastenkrise und der Ph-positiven B-ALL hindeuten, so muss doch beachtet werden, dass ein Großteil der Daten auf Untersuchungen an Zellkulturmodellen beruht. Untersuchungen in in-vivo Modellen gibt es bisher nicht.

1.2.2.2 Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen

Neben anti-apoptotischen Wirkungen werden Bcr-Abl auch *pro*-proliferative Qualitäten zugeschrieben. Hierfür spricht vor allem die Tatsache, dass Bcr-Abl in der Lage ist wachstumsfaktor-unabhängiges Wachstum in hämatopoetischen Zelllinien zu induzieren. Unklar ist, ob die durch Bcr-Abl induzierte Proliferation ein primärer Effekt ist oder ob zusätzlich sekundäre Veränderungen in den Zellen dafür notwendig sind. Kabarowski und Mitarbeiter sowie Carlesso und Kollegen konnten in einem temperatursensitiven und induzierbaren System zeigen, dass Bcr-Abl in BaF/B3- und 32D-Zellen IL-3-unabhängiges Wachstum erst nach einer Lag-Phase von 2 - 3 Wochen induziert (Carlesso et al., 1994; Kabarowski et al., 1994). Interessanterweise waren diese Zellen in Gegenwart von aktivem Bcr-Abl weitaus sensitiver gegenüber niedrigen Konzentrationen von IL-3 als in Gegenwart von inaktivem Bcr-Abl. Ähnliche Beobachtungen wurden in FDCPmix-Zellen gemacht (Pierce et al., 1998). Diese Daten deuteten darauf hin, dass ein grundlegender Mechanismus von Bcr-Abl sein könnte, hämatopoetische Zellen gegenüber bestimmten Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu sensibilisieren. Tatsächlich konnten Bhatia und Kollegen zeigen, dass primitive hämatopoetische Progenitorzellen aus CML Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren haben (Bhatia et al., 2000).

Etliche Arbeiten zeigten, dass Bcr-Abl auch direkt in die Abläufe der Zellzyklusprogression eingreifen kann, und diese Fähigkeit könnte vor allem während der Blastenkrise der CML und bei Ph-positiver B-ALL von Bedeutung sein. Beispielsweise führt Bcr-Abl in wachstumsfaktor-unabhängigen Zellen zur Herunterregulation des Zellzyklus-Inhibitors p27 (Gesbert et al., 2000; Jonuleit et al., 2000). Dies soll auf einen gesteigerten Abbau von p27 über den Proteasom-Signalweg zurückzuführen sein und korreliert außerdem mit der Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs. Cortez und Kollegen konnten zeigen, dass die Aktivierung mitogener Signalwege und Zyklin-abhängiger Kinasen sowie die G1/S-Phasen-Progression ein direkter Effekt von Bcr-Abl ist (Cortez et al., 1997).

Insgesamt sind die Daten zum Einfluss von Bcr-Abl auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen sehr heterogen, nicht zuletzt weil von verschiedenen Untersuchern unterschiedliche Methoden, unterschiedliche Modellsysteme und unterschiedliche Kulturbedingungen verwendet wurden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass sekundäre und tertiäre Mutationen notwendig sind, um die pro-

proliferative Qualität von Bcr-Abl komplett freizusetzen. Auch die Menge an Bcr-Abl, welches in einer Zelle exprimiert wird, und damit das Ausmaß der vorhandenen Tyrosinkinase-Aktivität könnte Einfluss nehmen auf den Phänotyp Bcr-Abl-positiver Zellen. Kinetische Untersuchungen mit STI571 ergaben, dass die Inhibitorische Konzentration 50 (IC50) für Proliferation deutlich niedriger liegt als diejenigen für das Überleben (unpublizierte Daten; eigene Arbeitsgruppe). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass für die Gewährleistung der kontinuierlichen Zellzyklusprogression Bcr-Abl-positiver Zellen eine höhere zelluläre Gesamtaktivität von Bcr-Abl notwendig ist als für das Überleben. Interessanterweise ist die Duplikation des Bcr-Abl-Gens während der Progression von der chronischen Phase der CML zur Blastenkrise und damit eine Erhöhung der Expression von Bcr-Abl ein sehr häufiges Ereignis.

Lediglich kurz erwähnt werden soll hier, dass Bcr-Abl möglicherweise auch auf die Adhäsion hämatopoetischer Zellen an das Knochenmarkstroma Einfluss nimmt und wachstums-hemmende Wirkungen der Zell-Stroma-Interaktion aufhebt (Gordon et al., 1989; Verfaillie et al., 1997). Das verringerte Adhäsionsverhalten Bcr-Abl-positiver Zellen konnte mit einer Dysfunktion des $\alpha 4\beta 1$ -Integrinrezeptors korreliert werden (Bhatia und Verfaillie, 1998).

1.2.2.2.3 Die Differenzierung Bcr-Abl-positiver hämatopoetischer Zellen

Der Einfluss von Bcr-Abl auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen hängt im wesentlichen vom Phänotyp der Leukämie ab, und es scheint, als könnte Bcr-Abl die Differenzierung hämatopoetischer Zellen sowohl antreiben als auch blockieren. Era und Witte konnten durch die regulierte Expression von Bcr-Abl in embryonalen Stammzellen zeigen, dass Bcr-Abl die Entwicklung myeloischer Zellreihen gegenüber erythropoetischer Zellen begünstigt. Dies deutet auf eine Tendenz hämatopoetischer Stammzellen zur Differenzierung in Richtung Myelopoese in Gegenwart von Bcr-Abl hin (Era und Witte, 2000).

Umgekehrt führt die Expression von Bcr-Abl in der Zelllinie 32D zu einem Differenzierungsblock. Diese Zellen können normalerweise unter Zugabe von G-CSF zu neutrophilen Granulozyten ausdifferenzieren (Perrotti et al., 1998). Der durch Bcr-Abl verursachte Differenzierungsstop konnte mit einer Dysregulation hämatopoetischer Transkriptionsfaktoren korreliert werden (unpublizierte Daten; eigene Arbeitsgruppe). Durch Inkubation mit STI571 konnte das normale Differenzierungsverhalten wiederhergestellt werden (unpublizierte Daten; eigene Arbeitsgruppe). Diese Beobachtung belegt, dass der beschriebene Differenzierungsblock direkt durch Bcr-Abl (mit-)verursacht wurde, auch wenn weitere genetische Veränderungen, die in kontinuierlichen Zelllinien typischerweise auftreten, mit zu diesem Phänomen beigetragen haben könnten.

1.2.3 Bcr-Abl - ein multifunktionales Signaltransduktions-Protein

c-Abl ist eine zytosolische und nukleäre Tyrosinkinase. Neben der Lokalisation unterliegt auch die Aktivität von c-Abl strikten Kontrollmechanismen, wobei sowohl intra- und intermolekulare Protein-Protein-Interaktionen als auch posttranslationale Modifikationen an der Regulation der Kinaseaktivität von Abl beteiligt sind (Van Etten, 1999).

Die Fusion von Bcr-Sequenzen an Abl durchbricht diese Regulationsmechanismen: im Gegensatz zu c-Abl zeichnet sich Bcr-Abl durch eine deregulierte Kinase-Aktivität aus (Konopka et al., 1984), und es ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert, wo es u.a. mit Bestandteilen des Aktinzytoskeletts interagiert (Van Etten et al., 1989). Beide Veränderungen in Kombination erlauben es dem Bcr-Abl Fusionsprotein mit Mediatoren verschiedenster intrazellulärer Signalkaskaden zu interagieren und diese konstitutiv zu aktivieren (s.u.).

In der Tat gelang es in den letzten Jahren, einige der durch Bcr-Abl konstitutiv aktivierten Signalwege zu identifizieren und viele dieser Signalwege spielen auch bei der Signaltransduktion ausgelöst durch Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren sowie den Integrinen eine wichtige Rolle. Zu den durch Bcr-Abl aktivierten Signalwegen gehören u.a. der Ras/MAPK-Signalweg, der PI3K/Akt-Signalweg sowie der Jak/STAT-Signalweg. Darüber hinaus phosphoryliert Bcr-Abl wichtige zelluläre Adaptorproteine, z.B. CRKL, Dok und Cbl, sowie etliche Proteine, z.B. FAK, Talin und Paxillin, die im Bereich des Zytoskeletts angesiedelt sind (Warmuth et al., 1999; Deininger et al., 2000).

1.2.3.1 Molekulare Anatomie des Bcr-Abl Onkoproteins

Neben der Tyrosinkinase-Domäne besitzt das Bcr-Abl Fusionsprotein noch weitere strukturell wichtige Unterbereiche, die für seine Rolle als Signaltransduktions-Protein von Bedeutung sind.

Funktionell wichtige Domänen im Bereich des Bcr-Anteils sind (Abb. 1.1.2): die N-terminal gelegene Oligomerisierungsdomäne, ein Tyrosin-Rest an Position 177 und eine als A-Box/B-Box-Motiv bezeichnete Region. Darüber hinaus kodiert der Bcr-Anteil für eine Serin-/Threonin-Kinase-Aktivität sowie für eine Dbl-Homologie-Domäne, deren funktionelle Bedeutung sowohl für c-Bcr als auch für Bcr-Abl weitgehend unklar ist (Warmuth et al., 1999).

Abl ist im N-terminalen Bereich aus 3 Proteinmodulen aufgebaut, die als Src-Homologie-Domänen-(SH)-3, -2 und -1 bezeichnet werden. Die SH1-Domäne entspricht der Tyrosinkinase-Domäne. Am äußersten C-Terminus befindet sich eine Aktin-bindende Region. Zwischen Kinase-

Domäne und Aktinbindebereich besitzt Abl zahlreiche PXXP-Motive, die für Protein-Protein-Wechselwirkungen von Bedeutung sind. Hier bindet unter anderem das Adaptorprotein CRKL, ein Signalmolekül das in Zellen von Patienten mit CML in der chronischen Phase stark hyperphosphoryliert ist. Die ebenfalls in diesem Bereich lokalisierte DNA-bindende Region, die Kernlokalisations-Sequenz, das Kern-Export-Signal und ein p53-Bindungsmotiv spielen für die Funktion von Bcr-Abl keine Rolle (Warmuth et al., 1999).

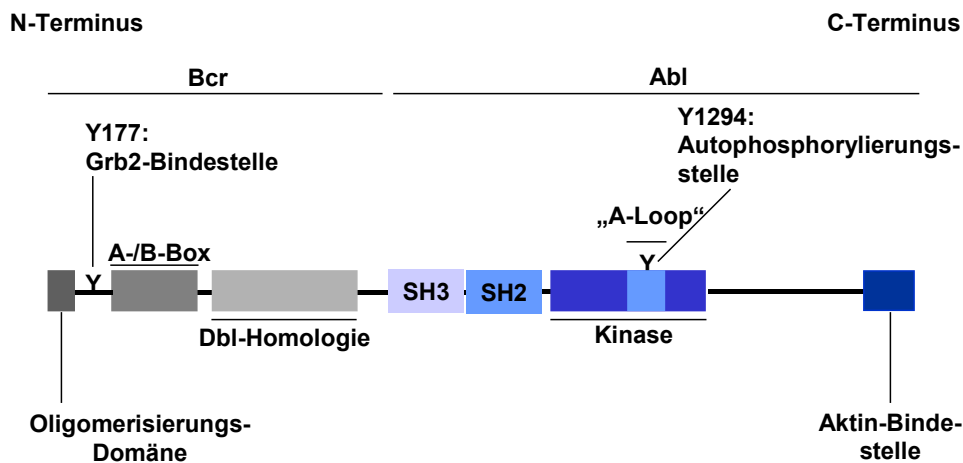


Abb. 1.2.1: Molekulare Architektur des Bcr-Abl Fusionsproteins. Beginnend vom N-Terminus besteht Bcr-Abl aus einer Oligo- bzw. Tetramerisierungs-Domäne, dem A-/B-Box-Motiv, einer Dbl-Homologie-Domäne, den Src-Homologie-Domänen 1, 2 und 3, sowie einer Aktin-Bindestelle. Zwischen der Oligomerisierungsdomäne und dem A-/B-Box-Motiv befindet sich ein funktionell bedeutsamer Tyrosin-Rest, Y177, der als Bindestelle für das Adaptorprotein Grb2 dient. Die Kinase-Domäne von Abl setzt sich aus zwei Untereinheiten, dem „N-Lobe“ und dem „C-Lobe“ zusammen. Zwischen die beiden Untereinheiten eingebettet findet man das katalytische Zentrum. Die katalytische Schleife (A-Loop) ist Teil des C-Lobes und beinhaltet ein autoregulatorisches Tyrosin (Y1294 bezogen auf die Position in p210^{Bcr-Abl}, Y393 bezogen auf die Position in murinem Abl).

1.2.3.1.1 Funktion der „Coiled-Coil“-Oligomerisierungs-Domäne

Der C-terminale Teil von Bcr kodiert für ein sogenanntes „coiled-coil“-Motiv, eine Struktur, die in der Lage ist, die Homodimerisierung und Tetramerisierung von Proteinen zu induzieren. Initiale Struktur-/Funktionsstudien hatten ergeben, dass diese Region wichtig für die konstitutive Aktivierung von Abl und die Bindung des Fusionsproteins an Aktin ist (McWhirter und Wang, 1991). Die Deletion der C-terminalen 63 Aminosäuren von Bcr hemmte die transformierende Aktivität von Bcr-Abl in verschiedenen Zelltypen (Rat1, BaF/B3, frisch isolierten Knochenmarkszellen) und hob die Fähigkeit

von Bcr-Abl, eine MPE im Transplantationsmodell zu induzieren, auf (McWhirter et al., 1993; Zhang et al., 2001). Umgekehrt reicht die Oligomerisierungsdomäne aus, um die Abl-Kinase konstitutiv zu aktivieren und um IL-3-unabhängiges Wachstum in 32D- und BaF/B3-Zellen zu induzieren (Zhang et al., 2001). Dies belegt, dass eine wesentliche Funktion der Bcr-Sequenzen die Oligomerisierung und Aktivierung von Abl ist.

1.2.3.1.2 Y177 – die Grb2-Bindestelle

Die regulierte Phosphorylierung zellulärer Signalmediatoren an Tyrosin-Resten ist ein wichtiges Prinzip der Signaltransduktion. Phosphorylierte Tyrosin-Reste sind wichtige Interaktionsstellen für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sie interagieren entweder mit SH2- oder mit PTB- (Phosphotyrosine-Binding)-Domänen anderer Proteine (Pawson, 1995a). Die Spezifität der Interaktion einer beliebigen SH2- bzw. PTB-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosin-Rest wird dabei vom unmittelbaren Aminosäure-Kontext des Tyrosin-Rests bestimmt (Shoelson, 1997).

Der Tyrosin-Rest 177 (Y177) liegt in einem Aminosäure-Kontext (Y₁₇₇VNV), der dem optimalen Bindungsmotiv für die SH2-Domäne des Ras-aktivierenden Adaptorproteins Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) entspricht.

Der Ras-Signalweg ist einer der am besten untersuchten Signalwege. Er wird von zahlreichen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert (Medema und Bos, 1993; Satoh et al., 1992). Wird der Tyrosin-Rest 177 phosphoryliert, z.B. durch Bcr-Abl selbst (Autophosphorylierung), so kann Grb2 mit seiner SH2-Domäne an Bcr-Abl binden und damit die klassische Ras-Aktivierungskaskade (siehe 1.2.3.2.1) in Gang setzen. Eine Mutation von Y177 zu Phenylalanin (Y177F) verhindert die Bindung von Grb-2 an Bcr-Abl und führt darüber hinaus zum Verlust der transformierenden Aktivität von Bcr-Abl in Rat-1-Fibroblasten (Pendergast et al., 1993; Puil et al., 1994).

Ergebnisse aus dem Transplantations-Model weisen auf eine wichtige Funktion dieses Tyrosin-Rests für die Induktion einer MPE durch Bcr-Abl hin. Zwar entwickelten Mäuse, die mit Bcr-Abl_{Y177F}-transduziertem Knochenmark transplantiert wurden, eine letale Leukämie, diese war aber entweder T- oder B-lymphatischer Natur. Nur in wenigen Tieren wurde eine Myeloexpansion beobachtet, die aber nicht tödlich und deutlich benigner war als in Mäusen mit CML-artigem Krankheitsbild (Million und Van Etten, 2000; Zhang et al., 2001). Die Fähigkeit von Bcr-Abl_{Y177F} lymphatische Leukämien in Mäusen zu induzieren, reflektiert die transformierende Potenz dieser Mutante in hämatopoetischen Zelllinien.

1.2.3.1.3 Die SH2-bindende Region („A-Box/B-Box-Motiv“)

Zelluläre Tyrosinkinase werden durch ein Netzwerk intramolekularer Interaktionen reguliert. Auf der Suche nach potentiellen Interaktionspunkten zwischen den Bcr- und Abl-Anteilen des Bcr-Abl-Fusionsproteins wurden zwei Bcr-Bereiche identifiziert, die in-vitro mit der isolierten SH2-Domäne von Abl interagierten. Diese Abschnitte liegen zwischen den Aminosäurepositionen 192 – 242 bzw. 298 – 413. Sie werden als A-Box/B-Box-Motiv bezeichnet (Pendergast et al., 1991b). Überraschenderweise war die Bindung der Abl SH2-Domäne an diese Bereiche Phosphotyrosin-unabhängig, eine Beobachtung die untypisch ist für SH2-Domänen (siehe 1.2.3.1.2). Weitere in-vitro Studien ergaben, dass neben der SH2-Domäne von Abl auch andere SH2-Domänen an diesen Bereich binden konnten, unter anderem die SH2-Domäne der Tyrosinkinase c-Src (Muller et al., 1992). Diese Daten deuteten auf eine wichtige Rolle der SH2-bindenden Region in der Bcr-Abl-induzierten Transformation und Leukämogenese hin, eine Vermutung, die sich nicht bestätigen ließ (McWhirter und Wang, 1997). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die SH2-bindende Region, möglicherweise in Kombination mit anderen Domänen, den Phänotyp Bcr-Abl-positiver Leukämien mitbeeinflusst.

1.2.3.1.4 Die SH3-Domäne

SH3-Domänen sind wichtige Module für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Sie binden an prolinreiche Peptidsequenzen, die sogenannten PXXP-Motive (Pawson, 1995a).

In c-Abl führt die Deletion der SH3-Domäne zu einer Steigerung der Kinase-Aktivität und zur partiellen Freisetzung der transformierenden Aktivität, eine Beobachtung, die darauf hindeutete, dass die Hauptfunktion der SH3-Domäne in der negativen Regulation der Kinase-Aktivität zu suchen sein könnte (Frank und Varticovski, 1996; Jackson und Baltimore, 1989; Mayer und Baltimore, 1994, Gross, 1999 #798). Barila und Superti-Furga konnten zeigen, dass die Aktivität von c-Abl zumindest teilweise durch eine intramolekulare Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der Region zwischen der SH2- und der Kinase-Domäne reguliert wird (Barila und Superti-Furga, 1998). Andere Arbeiten jedoch deuteten darauf hin, dass SH3-bindende zelluläre Inhibitoren, beispielsweise PAG/Msp23 oder Abi-1 und -2, für die negativ-regulatorische Wirkung der SH3-Domäne unerlässlich sind (Dai et al., 1998; Pendergast et al., 1991a; Wen und Van Etten, 1997).

Die Bedeutung der SH3-Domäne in der Bcr-Abl-abhängigen Leukämogenese ist unklar. Zwar konnten Gross und Kollegen zeigen, dass die Entstehung einer MPE im Transplantationsmodell nicht von der Intaktheit der SH3-Domäne abhängt (Gross et al., 1999b), dies schließt aber nicht aus, dass die

SH3-Domäne im Konzert mit anderen funktionellen Untereinheiten des Fusionsproteins an verschiedenen Schritten der Transformation beteiligt sein könnte. So führt die Kombination von Mutationen der SH3-Domäne mit einer Deletion der SH2-Domäne zu einem Verlust der Transformation hämatopoetischer Zelllinien und dies konnte mit einem Defekt der Aktivierung von STAT5 korreliert werden (Nieborowska-Skorska et al., 1999).

1.2.3.1.5 Die SH2-Domäne

SH2-Domänen sind Protein-Interaktions-Module, die über phosphorylierte Tyrosin-Reste (pY) an ihre Interaktionspartner binden (Pawson, 1995a). In dieser Funktion steuern sie die subzelluläre Lokalisation verschiedener Signalmoleküle, oder aber sie beeinflussen die prozessive Phosphorylierung spezifischer Substrate verschiedener Kinasen (Pawson, 1995b). Kristallstrukturanalysen haben intensiven Einblick in die molekularen Grundlagen SH2/pY-vermittelter Proteininteraktionen zugelassen. Von Bedeutung scheint dabei vor allem die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen einem in SH2-Domänen hochkonservierten Arginin-Rest und der Phosphatgruppe des phosphorylierten Tyrosin-Rests (Waksman et al., 1992; Waksman et al., 1993). Die Mutation dieses Arginins, z.B. zu Lysin, führt zur funktionellen Inaktivierung von SH2-Domänen.

Die Bedeutung der SH2-Domäne für die Bcr-Abl-induzierte Leukämogenese wird nicht komplett verstanden. Initiale Untersuchungen hatten gezeigt, dass die alleinige Mutation der SH2-Domäne zwar die transformierende Aktivität von Bcr-Abl in Rat1-Fibroblasten, nicht aber in hämatopoetischen Zelllinien (32D, BaF/B3) aufhebt (Afar et al., 1994; Cortez et al., 1995; Goga et al., 1995). Lediglich in Kombination mit einer Punktmutation des Tyrosin-Rests 177 (Y177F) und der Autophosphorylierungsstelle (Y1294F) führte die Mutation der SH2-Domäne zu einem Verlust der Fähigkeit von Bcr-Abl IL-3-unabhängiges Wachstum in 32D- und BaF/B3-Zellen zu induzieren. Diese Mutante konnte weder den Ras-Signalweg noch STAT5 suffizient aktivieren (Cortez et al., 1995; Goga et al., 1995; Nieborowska-Skorska et al., 1999).

1.2.3.1.6 Die Aktin-bindende Region

Studien zur subzellulären Lokalisation von c-Abl und seiner onkogenen Varianten hatten gezeigt, dass Bcr-Abl ausschließlich im Zytosol transformierter Zellen lokalisiert ist (Van Etten et al., 1989). Dort interagiert Bcr-Abl mit dem Aktin-Zytoskelett einerseits und mit bisher nicht genauer definierten Vesikeln andererseits (Skourides et al., 1999).

Die Gründe für die ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation von Bcr-Abl sind nicht komplett geklärt, möglicherweise aber stehen sie im direkten Zusammenhang mit der erhöhten Kinase-Aktivität des Fusionsproteins. Vigneri und Wang konnten zeigen, dass der Defekt im Bereich des nukleären Imports liegt, d.h. Bcr-Abl, anders als c-Abl, nicht in den Zellkern eingeschleust wird. Die Inaktivierung von Bcr-Abl durch STI571 einerseits oder durch gerichtete Mutation der ATP-Binde-Stelle andererseits, führte zu einer Wiederaufnahme des nukleären Imports, gekoppelt jedoch an einen gesteigerten nukleären Export (Vigneri und Wang, 2001).

Ausschlaggebend für die Lokalisation im Bereich des Zytoskeletts ist eine Aktin-bindende Region am äußersten C-Terminus des Abl-Anteils (McWhirter und Wang, 1993; Van Etten et al., 1994). Die Deletion dieser Domäne hebt die Lokalisation von Bcr-Abl am Zytoskelett auf. Darüber hinaus führt sie zu einer Reduktion, nicht aber zu einer kompletten Aufhebung der Transformation von Fibroblasten und hämatopoetischen Zelllinien durch Bcr-Abl (McWhirter und Wang, 1993). Dies deutet darauf hin, dass neben Aktin-gebundenem Bcr-Abl auch zytosolisches und an Vesikel gebundenes Bcr-Abl eine Rolle in der Bcr-Abl-induzierten Transformation spielt. Möglicherweise führt die Lokalisation von Bcr-Abl in verschiedenen Zellkompartimenten zur Interaktion mit jeweils unterschiedlichen Signalmolekülen.

1.2.3.2 Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktions-Wege durch Bcr-Abl

Die autonome, Wachstumsfaktor-unabhängige Aktivierung intrazellulärer Signalwege gehört zum Grundprinzip der Wirkweise von Bcr-Abl. Beispielhaft soll hier der Einfluss von Bcr-Abl auf drei Signalwege, den Ras-Signalweg, den PI3-Kinase/Akt-Signalweg und den Jak/STAT-Signalweg, beschrieben werden.

1.2.3.2.1 Aktivierung des Ras-Signalwegs durch Bcr-Abl

Ras gehört zur Familie der GTPasen, Enzyme, die über die Bindung von GTP aktiviert und durch die Hydrolyse von GTP zu GDP und Phosphat reguliert werden (Bar-Sagi und Hall, 2000). Ras-Proteine bilden dabei eine „Umschaltstation“. Sie transferieren mitogene Signale, die ursprünglich von Oberflächenrezeptoren ausgingen, auf nachgeschaltete Proteinkinase-Kaskaden, die sogenannten MAP-Kinase-Signalwege. Grundprinzip der Ras-Aktivierung durch Zytokin- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist die Bildung membrannaher Komplexe bestehend aus den Adaptorproteinen Shc, Grb2 und CRKL sowie dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sos. Letzterer aktiviert Ras, indem er die Bindung von GTP an Ras erleichtert.

Mandanas und Kollegen konnten zeigen, dass Ras in verschiedenen bcr-abl-positiven Zellen aktiviert ist (Mandanas et al., 1993). Für die Aktivierung von Ras scheint unter anderem die Bildung von Bcr-Abl/Grb-2/Sos-Multiprotein-Komplexen, vermittelt durch die Grb2-Bindestelle Y177 in Bcr-Abl, verantwortlich zu sein (Pendergast et al., 1993). Daneben dürften aber noch andere Mechanismen eine Rolle bei der Aktivierung des Ras-Signalwegs durch Bcr-Abl spielen, z.B. die direkte Phosphorylierung von Shc durch Bcr-Abl und die dadurch induzierte Bildung von Shc/Grb2/Sos-Komplexen (Matsuguchi et al., 1994), oder aber die Stimulation von Sos durch Bindung an das ebenfalls durch Bcr-Abl phosphorylierte Adaptorprotein CrkL (Sattler und Salgia, 1998).

Zahlreiche Daten deuten auf eine wichtige Funktion des Ras-Signalwegs in der Transformation hämatopoetischer Zellen durch Bcr-Abl hin: dominant-negative Mutanten von Ras, Grb-2 und Raf, einer durch Ras aktivierten Serin-/Threonin-Kinase, inhibieren die durch Bcr-Abl induzierte Transformation hämatopoetischer Zellen (Gishizky et al., 1995; Sawyers et al., 1995; Skorski et al., 1995b). Dabei scheint Ras sowohl anti-apoptotische als auch pro-proliferative Signale zu vermitteln. Ras ist notwendig für das Überleben von $32D_{\text{Bcr-Ablwt}}$ Zellen in Wachstumsfaktor-freiem Medium (Cortez et al., 1996). Sanchez-Garcia und Kollegen konnten nachweisen, dass Bcr-Abl die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 über einen Ras-abhängigen Signalweg stimuliert (Sanchez-Garcia und Martin-Zanca, 1997). Aber auch die Expression von Zellzyklusproteinen, z.B. CyclinD1 oder p21 und p27 wird über Ras-abhängige Signaltransduktion reguliert, und es ist wahrscheinlich, dass ähnliche Mechanismen in Bcr-Abl-positiven Zellen von Bedeutung sind (Bar-Sagi und Hall, 2000).

1.2.3.2.2 Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs durch Bcr-Abl

Mittelpunkt des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), ein heterodimeres Protein, das aus einer regulatorischen Untereinheit mit 85kDa und einer enzymatischen Untereinheit mit 110 kDa besteht. p110 katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositol, Phosphoinositol-4-Phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat, die als „second messenger“ nachgeschaltete Signalprozesse in Gang setzen (Carpenter und Cantley, 1996).

Zu den zahlreichen Signalmolekülen, die über PI3K-abhängige Signale aktiviert werden, gehört Akt. Akt ist eine Serin-/Threonin-Kinase, und sie wird durch zahlreiche Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren aktiviert. Unabdingbar für die Aktivierung von Akt ist dabei die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und Serin 473, vermittelt durch die PI3K-abhängigen

Kinasen PDK1 und PDK2 (Datta, 1999).

Eine wichtige Rolle von PI3K in der Bcr-Abl-abhängigen Transformation und Leukämogenese konnte durch verschiedenste Arbeiten belegt werden. Mit Hilfe spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von PI3K essentiell ist für das Wachstum Bcr-Abl-positiver Patientenzellen in-vitro (Skorski et al., 1995a). Ähnliches gilt für die Klonogenität von Bcr-Abl-infiziertem murinem Knochenmark (Skorski et al., 1997). Tatsächlich geht die Aktivierung von PI3K durch Bcr-Abl mit einer Aktivierung von Akt einher. Mit Hilfe dominant-negativer Mutanten konnten Skorski und Kollegen zeigen, dass Akt wichtig ist für die Transformation hämatopoetischer Zellen in-vitro und für die Leukämogenese in-vivo. Dabei scheint Akt die Expression von Myc und Bcl-2 positiv, die Expression von p27 negativ zu beeinflussen. Wie Ras, so scheint also auch Akt sowohl proliferative als auch anti-apoptotische Signale zu vermitteln (Skorski et al., 1997). Für die anti-apoptotische Funktion von Akt könnte auch die Phosphorylierung von Bad wichtig sein (Neshat et al., 2000).

Unklar ist, wie es zur Aktivierung von PI3K und Akt durch Bcr-Abl kommt. Skorski und Kollegen konnten zeigen, dass die Aktivierung von PI3K und Akt von der SH2-Domäne von Abl ausgeht (Skorski et al., 1997), andere Arbeiten konnten diese Daten aber nicht bestätigen (Roumiantsev et al., 2001).

1.2.3.2.3 Aktivierung des Jak/STAT-Signalwegs durch Bcr-Abl

Zu den am besten verstandenen Signalwegen, die durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren aktiviert werden, gehört der Jak/STAT Signalweg (Schindler und Strehlow, 2000). Bis heute wurden 4 Janus-Kinasen isoliert: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2. Nach Aktivierung phosphorylieren sie Tyrosin-Reste im Bereich von Wachstumsfaktorrezeptoren, die als Rekrutierungsstellen für die sogenannten STAT-Proteine dienen. Insgesamt sind 7 STAT-Proteine (STAT1 – 4, 5A, 5B und 6) bekannt. Die Phosphorylierung der Rezeptor-gebundenen STAT-Proteine durch Janus-Kinasen führt schließlich zur Bildung von stabilen STAT-Homo- und Heterodimeren. Diese wandern in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren (Ward et al., 2000).

Die physiologische Bedeutung des Jak/STAT-Signalwegs für die Entwicklung der verschiedenen Linien der Hämatopoese konnte in den letzten Jahren durch Generierung verschiedener Knockoutlinien eindrucksvoll belegt werden. Jak1^{-/-}-Mäuse, beispielsweise, sind charakterisiert durch einen erheblichen Defekt der Lymphopoese (Park et al., 1995; Rodig et al., 1998; Nosaka, 1995 #783), Jak2^{-/-}-Mäuse durch einen Defekt der Erythropoese (Neubauer et al., 1998; Parganas et al., 1998). Die Charakterisierung dieser Defekte wird jedoch zum Teil durch die embryonale oder perinatale Letalität

der Mäuse erschwert. Gezielte Deletionen verschiedener STAT-Gene führten zu weitaus subtileren Phänotypen, eine Beobachtung, die sich möglicherweise durch die Redundanz dieser Signalmoleküle erklären lässt (Ward et al., 2000).

In hämatopoetischen Zelllinien führt Bcr-Abl zur Rezeptor-unabhängigen Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 (Ilaria und Van Etten, 1996). Dies konnte an primären Zellen von Patienten mit Ph-positiven Leukämien bestätigt werden (Chai et al., 1997). Unklar ist, ob dabei die Aktivität von Janus-Kinasen von Bedeutung ist, oder ob Bcr-Abl direkt zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT-Proteinen führt. Insbesondere die Rolle von STAT5 in Bcr-Abl-positiven Leukämien wurde intensiv beforscht. Untersuchungen mit dominant-negativen STAT5-Molekülen in hämatopoetischen Zelllinien deuteten auf eine essentielle Rolle von STAT5 in der Biologie Ph-positiver Leukämien hin. Die Expression solcher Moleküle in Bcr-Abl-positiven Zelllinien, z.B. K562, 32D_{Bcr-Ablwt} oder BaF/B3_{Bcr-Ablwt}, reduzierte deren Überleben und Proliferation in Wachstumsfaktor-freien Kulturbedingungen sowie die Resistenz gegenüber Strahlung oder Zytostatika. (de Groot et al., 1999; Nieborowska-Skorska et al., 1999; Sillaber et al., 2000). Darüber hinaus hemmen sie die Leukämogenität der Zelllinie 32D_{Bcr-Ablwt} in-vivo (Nieborowska-Skorska et al., 1999). Unter den Genen, die in Bcr-Abl-positiven Zellen STAT5-abhängig reguliert werden, finden sich u.a. Bcl-XL, ein Protein mit entscheidender anti-apoptotischer Wirkung (s.o.), sowie CyclinD1, Cis und OSM (de Groot et al., 2000; Gesbert und Griffin, 2000; Sexl et al., 2000).

Unklar ist die Rolle von STAT5 in der Pathogenese Bcr-Abl-positiver Leukämien in-vivo. Zwar entwickeln Mäuse, die mit Bcr-Abl-infiziertem Knochenmark von STAT5a/b^{-/-}-Mäusen transplantiert wurden, eine letale Leukämie ohne Veränderung der Überlebenskurve. Allerdings scheint bei genauer Analyse der Phänotyp dieser Leukämien hin zu B-lymphatischen akuten Leukämien verschoben zu sein (Sexl et al., 2000). Dies könnte für eine spezifische Rolle von STAT5 in der Induktion einer MPE in diesem Model sprechen.

1.3 Die Src-Kinasen

Src-Kinasen bilden eine Familie von 9 Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes und Yrk), die z.T. durch alternatives Splicing in mehreren Isoformen exprimiert werden. Die einzelnen Mitglieder dieser Familie werden in gewebsspezifischen Kontext differenziell exprimiert. C-Src und Fyn beispielsweise werden in nahezu allen Geweben gefunden. Hingegen werden Lck, Hck, Fgr und Blk ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Auch innerhalb der Hämatopoese findet man in unterschiedlichen Zellen ein unterschiedliches Profil exprimierter Src-Kinasen. T-Zellen, beispielsweise, exprimieren Lck und Fyn, in B-Zellen findet man v.a. Lyn, Hck, Blk und Fgr, in myeloischen Zellen hingegen Lyn, Hck und Fgr. Die Zugehörigkeit zur Familie der Src-Kinasen wird einerseits durch die Strukturhomologie, andererseits durch die gleichförmige Regulation der Kinaseaktivität im zellulären Kontext definiert.

1.3.1 Struktur und Regulation von Src-Kinasen

1.3.1.1 *Molekulare Architektur der Src-Kinasen*

Src-Kinasen sind durch eine weitgehende Übereinstimmung sowohl in der Aminosäuresequenz als auch in ihrer Struktur gekennzeichnet (Brown und Cooper, 1996). Sie lassen sich in sechs funktionelle Abschnitte untergliedern. Ausgehend vom Aminoterminus sind dies die Myristoylierungsstelle, die sogenannte „unique region“, die Src-Homologie-Domänen 3, 2 und 1 (SH3, SH2 und SH1), sowie der C-terminale Schwanz („C-terminal tail“) (Abb.1.1.3A). Das regulierte Zusammenspiel dieser Domänen ist von großer Bedeutung für die verschiedenen physiologischen Funktionen von Src-Kinasen.

Im Bereich der Myristoylierungsstelle ist ein konservierter Glycin-Rest an Position 2 von besonderer Bedeutung. Hier wird die Fettsäure Myristat kovalent gebunden, eine posttranslationale Modifikation, die zur Verankerung der Kinasen in der Zellmembran dient (Bagrodia et al., 1993; Cross et al., 1984).

An die Myristoylierungsstelle schließt sich eine Region an, die in ihrer Aminosäuresequenz unter den einzelnen Familien-Mitgliedern am wenigsten homolog ist und daher als „unique region“ bezeichnet wird. Die Funktion dieser Region ist nicht bekannt, möglicherweise aber „kodiert“ sie für spezifische physiologische Funktionen einzelner Src-Kinasen.

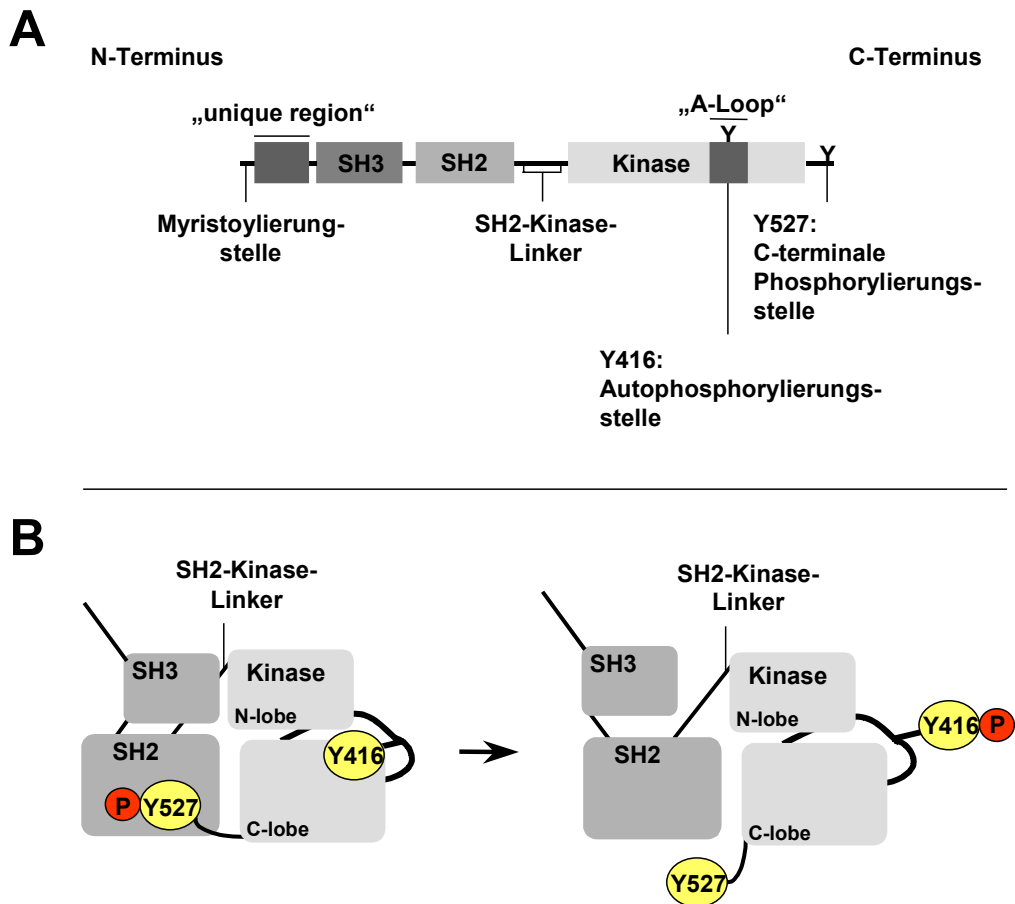


Abb. 1.3.1: Molekulare Architektur und Regulationsmechanismus der Src-Kinasen. (A) Beginnend am N-Terminus bestehen Src-Kinasen aus einer Myristoylierungsstelle, einer „unique region“, einer SH3- und SH2-Domäne, einer Kinase-Domäne und dem C-terminalen Schwanz. Eingebettet zwischen SH2- und Kinase-Domäne liegt der SH2-Kinase-Linker, der strukturell eine Polyprolin-TypII-Helix bildet. Die Kinase-Domäne wiederum setzt sich aus zwei Untereinheiten, dem „N-Lobe“ und dem „C-Lobe“ zusammen. Zwischen den beiden Untereinheiten liegt das katalytische Zentrum. Die katalytische Schleife (A-Loop) ist Teil des C-Lobes und beinhaltet ein autoregulatorisches Tyrosin. Am äußersten C-Terminus liegt ein negativ-regulatorischer Tyrosin-Rest. **(B)** Die Aktivität von Src-Kinasen wird durch ein Netzwerk intramolekularer Interaktionen reguliert. Die Bindung des phosphorylierten C-terminalen Tyrosin-Rests einerseits, und die Interaktion der SH3-Domäne mit dem SH2-Kinase-Linker andererseits stabilisieren die Kinase-Domäne in einer inaktiven, „unproduktiven“ Konformation. Entsprechend führt die Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosin-Rests, oder eine Unterbrechung der Interaktion zwischen SH3-Domäne und dem SH2-Kinase-Linker zu einem Anstieg der Aktivität von Src-Kinasen. Unabdingbar für die Aktivierung ist jedoch die Phosphorylierung von Y416 *in-cis*.

Die darauffolgende SH3-Domäne ist ca. 90 Aminosäuren lang und bindet an prolinreiche Aminosäuresequenzen (P-X-X-P; siehe 1.2.3.1.4). Sie spielt eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der enzymatischen Aktivität von Src-Kinasen (siehe 1.3.1.2). Andererseits greift sie aber auch aktiv in Signaltransduktions-Mechanismen ein. Entsprechend führen Mutationen der Liganden-Bindungs-Fläche zu einer Aktivierung der Kinase-Aktivität. Gleichzeitig aber konnte gezeigt werden, dass die SH3-Domäne für einige physiologische Funktionen von Src-Kinasen unerlässlich ist, so z.B. für die Induktion von DNA-Synthese und Proliferation stimuliert durch PDGF oder EGF. In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass zwei Proteine des Ras-Signalwegs, p62 rasGAP-assoziiertes Protein und Shc, über die SH3-Domänen an Src-Kinasen binden (Weng et al., 1994). Über Protein-Protein-Wechselwirkungen könnte die SH3-Domäne außerdem die subzelluläre Lokalisation verschiedener Src-Kinasen beeinflussen (Bar-Sagi et al., 1993).

Wie die SH3-Domäne, so hat auch die SH2-Domäne unterschiedliche Gesichter. SH2-Domänen binden phosphorylierte Tyrosin-Reste in einem spezifischen Aminosäure-Kontext (Pawson, 1995a). In dieser Funktion bindet die SH2-Domäne verschiedener Src-Kinasen an phosphorylierte Tyrosin-Reste aktivierter Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. PDGF oder M-CSF, und dies scheint wichtig für die biologische Aktivität dieser Rezeptoren (Corey und Anderson, 1999). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die SH2-Domäne unerlässlich für die Regulation der Kinase-Aktivität ist. Funktionell inaktivierende Mutationen im Bereich der SH2-Domäne führen zur Aktivierung der Kinase und zur Freisetzung der transformierenden Aktivität von c-Src und seiner Verwandten (Brown und Cooper, 1996).

Auf die SH2-Domäne folgt schließlich die SH1- bzw. Kinase-Domäne. Wie alle Tyrosinkinase-Domänen besteht sie aus zwei Subdomänen, dem N-Lobe und dem C-Lobe, sowie – dazwischen eingebettet – dem katalytischen Zentrum. Zwei Strukturen innerhalb dieser Domäne sind für die Funktion der Kinase außerordentlich wichtig, zum einen die ATP-Bindestelle, die u.a. von einem konservierten Lysin-Rest ca. 20 Aminosäuren C-terminal der SH2-Domäne gebildet wird, zum anderen die Autophosphorylierungsstelle, durch deren Phosphorylierung die Aktivität der Kinase stabilisiert wird (Brown und Cooper, 1996).

Den Abschluss bildet schließlich ein am C-Terminus gelegener Bereich, der essentiell für die Regulation der Kinaseaktivität ist.

1.3.1.2 Regulation von Src-Kinasen

Außer durch die gemeinsame Architektur zeichnen sich Src-Kinasen durch einen gleichartigen Regulationsmechanismus aus (Abb. 1.1.3B). Im regulierten Zustand sind c-Src und seine Verwandten nicht katalytisch aktiv. Ausschlaggebend dafür ist ein komplexes Netzwerk intramolekularer Interaktionen, das durch die Kristallisation von c-Src und Hck, jeweils in der inaktiven Form, aufgeklärt wurde (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997; Xu et al., 1999). Im Mittelpunkt steht dabei die Interaktion der SH3-Domäne mit einer Polyprolin-Helix zwischen der SH2- und der Kinase-Domäne. Diese Region wird auch als SH2-Kinase-Linker bezeichnet. Über ein konserviertes Leucin an Position 255 bzw. ein konserviertes Tryptophan an Position 260 nimmt der so stabilisierte SH2-Kinase-Linker Einfluss auf die räumliche Struktur der Kinase-Domäne, so dass die Bindung von ATP in das katalytische Zentrum blockiert wird (LaFevre-Bernt et al., 1998; Gonfloni et al., 1999). Hierzu trägt auch die Konformation der katalytischen Schleife, des sogenannten A-Loops, bei (Xu et al., 1997; Sicheri et al., 1997). Zusätzlich stabilisiert wird diese Konformation durch die Interaktion eines phosphorylierten Tyrosin-Rests im C-terminalen Schwanz der Src-Kinasen *in-cis* mit der SH2-Domäne. Die Phosphorylierung dieses Tyrosin-Rests wird von spezifischen Kinasen, den sogenannten C-terminalen Src-Kinasen übernommen (Nada et al., 1991; Okada et al., 1991).

Die Bedeutung der einzelnen Komponenten dieses Interaktionsnetzwerks wird belegt durch Daten aus zahlreichen Struktur-/Funktionsstudien. Mutationen der SH3-Liganden-Bindungs-Oberfläche, der SH2-Domäne, des SH2-Kinase-Linkers oder des C-terminalen Tyrosin-Rests führen zu einer konstitutiven Aktivierung des Enzyms und setzen sein transformierendes Potential frei (Erpel et al., 1995; Gonfloni et al., 1999; LaFevre-Bernt et al., 1998; Marth et al., 1988; Ziegler et al., 1989).

Entsprechend des oben beschriebenen negativen Regulationsmechanismus gibt es mehrere Möglichkeiten Src-Kinasen zu aktivieren, beispielsweise durch Verdrängung der SH3- bzw. SH2-Domänen aus ihren intramolekularen Interaktionen oder durch Dephosphorylierung des C-terminalen Tyrosin-Rests durch verschiedene Phosphatasen (Bjorge et al., 2000).

1.3.2 Die Rolle der Src-Kinasen in der Hämatopoese

1.3.2.1 Knockout-Studien

Die Untersuchung der Rolle von Src-Kinasen, beispielsweise in Knockout-Mäusen, hat sich als äußerst schwierig erwiesen. Dies ist auf die relativ hohe funktionelle Redundanz zwischen den einzelnen Familienmitgliedern zurückzuführen. Entsprechend führte die gezielte homozygote Deletion

einzelner Src-Kinasen aus dem Genom von Mäusen meist nur zu geringen Phänotypen. C-Src^{-/-}-Mäuse, z.B. zeigen eine weitgehend normale Embryonalentwicklung und haben eine ähnliche Lebenserwartung wie Wildtyp-Mäuse. Einzige Auffälligkeit ist die Entwicklung einer Osteopetrose, also eine Verhärtung der Knochen. Fyn^{-/-}-Mäuse fallen durch neuronale Entwicklungsschäden auf. Einige „Single“-Knockout-Mäuse, z.B. für die Src-Kinasen Hck, Fgr oder Blk haben keinerlei erkennbaren Phänotyp. Erst die Kombination zu Doppel- und Triple-Deletionen führte zu erheblichen Defekten in der Embryonalentwicklung und zu perinataler Letalität (Lowell und Soriano, 1996).

In Bezug auf die Hämatopoese fallen vor allem Defekte in der Entwicklung von T-Zellen in Lck^{-/-}- und Fyn^{-/-}-Mäusen auf (Lowell und Soriano, 1996). In Lyn^{-/-}-Mäusen ist die Anzahl reifer peripherer B-Zellen vermindert, dafür die Anzahl lymphoblastoider Zellen erhöht. Darüber hinaus besteht ein Defekt der B-Zell-Rezeptor-Aktivierung mit prolongierter Hyperaktivierung des Rezeptors nach Stimulation. Diese Beobachtung bildet möglicherweise die Grundlage für die Entwicklung einer lupus-artigen Autoimmunerkrankung, deren Erscheinungsbild sich bei Kombination der Lyn-Deletion mit einer Fyn-Deletion verstärkt (Yu et al., 2001). Eine quantitative Beeinträchtigung der Myelopoese in einer der bisher hergestellten Knockout-Kombinationen ist nicht beschrieben, allerdings führen Kombinationen von Lyn-, Hck- und Fgr-Deletionen zu Defekten der Funktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Lowell et al., 1996; Meng und Lowell, 1997).

1.3.2.2 Die Rolle von Src-Kinasen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren

Eine Beteiligung von Src-Kinasen an der intrazellulären Signalübertragung konnte für zahlreiche hämatopoetische Wachstumsfaktor-Rezeptoren nachgewiesen werden (Corey und Anderson, 1999), so z.B. auch für den IL-6 Rezeptor. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin und gilt als wichtigster Wachstumsfaktor des Plasmozytoms. Es konnte gezeigt werden, dass es in Mäusen nach Infektion von Knochenmarkszellen mit einem für IL-6 kodierenden Retrovirus zur Ausbildung eines myeloproliferativen Syndroms kommt. Daten aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass IL-6 zur Aktivierung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fyn führt (Hallek et al., 1997). Diese Aktivierung scheint auf einer direkten Interaktion der Src-Kinasen mit der β -Kette des Rezeptors (gp130) zu beruhen. Mutationsanalysen des entsprechenden Bindungsbereichs in gp130 haben gezeigt, dass dieser für die IL-6 induzierte Proliferation von Bedeutung ist (Schaeffer et al., 2001).

In ähnlicher Weise scheinen Src-Kinasen in die Signaltransduktion der Rezeptoren für IL-2, IL-3, G-CSF, GM-CSF, SCF und PDGF involviert zu sein (Corey und Anderson, 1999). Aber auch in der Signaltransduktion der B- und T-Zell-Rezeptoren haben sie Bedeutung (Mustelin und Burn,

1993; Yamanashi et al., 1990).

Untersuchungen mit kinase-inaktiven Src-Mutanten im Bereich der PDGF-, CSF-1- und der EGF-Rezeptor-Signaltransduktion haben ergeben, dass Src-Kinasen für die durch diese Wachstumsfaktoren induzierte DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus unverzichtbar sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Verwendung von Src-inhibierenden Antikörpern erzielt (Barone und Courtneidge, 1995; Roche et al., 1995a; Roche et al., 1995b; Twamley-Stein et al., 1993). Über welche Signalwege und Mechanismen Src-Kinasen die DNA-Synthese aktivieren bzw. andere Funktionen erfüllen wird nur zum Teil verstanden, allerdings konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen unter anderem an der Aktivierung des Ras-Signalwegs, des PI3K/Akt-Signalwegs und des Jak/STAT-Signalwegs durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren beteiligt sind (Corey und Anderson, 1999).

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst Signalmoleküle gefunden werden, die im Rahmen Bcr-Abl-induzierter Signaltransduktions-Kaskaden von Bedeutung waren. Diese sollten dann im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert und auf ihre biologische und therapeutische Relevanz hin untersucht werden.

Initiale Bemühungen führten zur Identifikation von Src-Kinasen als eine der Proteinfamilien, die in Bcr-Abl-positiven Zellen konstitutiv aktiviert werden (Abschnitt 3.1). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl und Src-Kinasen intrazytosolisch in einem direkten, physikalischen Komplex vorliegen (Abschnitt 3.1). Basierend auf dieser Beobachtung sollten in weiteren Arbeitsabschnitten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Über welche Domänen von Bcr-Abl und Src-Kinasen kommt es zur direkten physikalischen Interaktion dieser Kinasen und wie erklärt sich daraus die konstitutive Aktivierung der Src-Kinasen in Bcr-Abl-positiven Zellen?
2. Welche Rolle spielen Src-Kinasen für die Bcr-Abl-induzierte Leukämogenese *in vivo*?
3. Sind Src-Kinasen therapeutisch relevante Zielmoleküle und ist es möglich durch Inhibition von Src-Kinasen Überleben und Wachstum Bcr-Abl-positiver Zellen negativ zu beeinflussen?

3 Ergebnisse

3.1 Bcr-Abl aktiviert Mitglieder der Familie der Src-Kinasen in myeloischen und lymphatischen Zelllinien

3.1.1 Literatur

1. Danhauser-Riedl S., Warmuth M., Druker B. J., Emmerich B. und Hallek M. (1996) „Activation of Src kinases p53/56^{lyn} and p59^{hck} by p210^{bcr-abl} in myeloid cells.“ *Cancer Research*, 56, 3589 - 3596.
2. Hallek M., Danhauser-Riedl S., Herbst R., Warmuth M., Winkler A., Kolb H. J., Druker B. J., Emmerich B., Griffin J. D. und Ullrich A. (1996). „Interaction of the receptor tyrosine kinase p145^{c-kit} with the p210^{bcr-abl} kinase in myeloid cells.“ *British Journal of Hematology*, 94, 5 - 16.
3. Warmuth M., Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B. und Hallek M. (1997). „The Src-family kinase Hck interacts with Bcr/Abl by a kinase independent mechanism and phosphorylates the grb2-binding site of bcr“ *Journal of Biological Chemistry*, 272, 33260 – 33270
4. Schäffer M., Schneiderbauer M., Weidler S., Tavares R., Warmuth M., de Vos, G., und Hallek, M. (2001). „Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and Activation of Hck and Erk kinases“. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 8068 – 8081
5. Warmuth M., Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I. und Hallek M. (2002). “Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases”. **Blood, im Druck**

6. Schuster C., Forster K., Dierks H., Elsässer A., Behre G., Simon N., Danhauser-Riedl S., Hallek M. und Warmuth M. (2002). "The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription factor regulation and neutrophilic differentiation are reverted by the Abl kinase inhibitor STI571". **Blood, im Druck**

3.1.2 Hintergrund

1984 konnten Konopka und Kollegen zeigen, dass die Philadelphia-Translokation mit einer Zunahme der Tyrosinkinase-Aktivität von Abl und der Phosphorylierung zahlreicher zytosolischer Proteine einhergeht (Konopka et al., 1984). Diese und andere Beobachtungen legten nahe, dass Bcr-Abl über den Eingriff in intrazelluläre Signalkaskaden wirkt. Zu Beginn dieser Arbeit sollten daher Moleküle identifiziert werden, die in entsprechenden Signaltransduktions-Kaskaden unterhalb von Bcr-Abl liegen, also die leukämogene Wirkung von Bcr-Abl vermitteln oder unterstützen.

3.1.3 Ergebnisse

3.1.3.1 *Bcr-Abl induziert die Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine*

Um Signaltransduktions-Moleküle zu identifizieren, die durch Bcr-Abl aktiviert wurden, wurde zunächst das Muster zellulärer Tyrosinphosphorylierungen in verschiedenen bcr-abl-positiven und -negativen Zelllinien untersucht (Hallek et al., 1996; Warmuth et al., 1996). Dabei wurde sowohl auf primäre Zelllinien (K562, BV173, LAMA84), isoliert aus entsprechendem Patienten-Material, wie auch auf ein durch Transfektion und Selektion etabliertes Zellsystem, 32D_{Bcr-Ablwt}, zurückgegriffen. Letzteres bot den Vorteil, dass die transfizierten, Bcr-Abl-positiven Zellen (32D_{Bcr-Ablwt}) direkt mit parentalen, Bcr-Abl-negativen Zellen (32D) verglichen werden konnten. Mit Hilfe eines monoklonalen Pan-Phosphotyrosin-Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die Expression von Bcr-Abl in 32D_{Bcr-Ablwt}-Zellen die Phosphorylierung zahlreicher zellulärer Proteine steigerte bzw. induzierte (Warmuth et al., 1996; Abb.1). Dieser Effekt war abhängig von der Intaktheit der Kinase-Domäne von Bcr-Abl: die Expression einer kinase-inaktiven Mutante von Bcr-Abl, bei welcher die ATP-Bindestelle im Bereich der Kinase-Domäne mutiert war, führte nicht zur Zunahme der Phosphorylierung zellulärer Proteine. Diese Mutante war außerdem nicht in der Lage IL-3-unabhängiges Wachstums und Überleben in 32D-Zellen zu induzieren sowie deren Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten unter Stimulation mit G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) zu blockieren (Schuster et al., 2002; Abb.1), Effekte, die mit Bcr-Ablwt regelmäßig beobachtet wurden.

Eine konstitutive zelluläre Tyrosinphosphorylierung fand sich auch in den „Patienten-Zelllinien“ K562 (myeloisch, erythrozytär), BV173 (lymphoblastoid) und LAMA84 (myeloisch, granulozytär). Dies wurde insbesondere dann deutlich, wenn Bcr-Abl-positive Zelllinien mit Bcr-Abl-negativen Zelllinien, z.B. JoskM, verglichen wurden (Warmuth et al., 1996; Abb.4).

3.1.3.2 Bcr-Abl erhöht die Aktivität von Src-Kinasen in lymphatischen und myeloischen Zelllinien

Die Anstrengungen zur Identifikation der offensichtlich durch Bcr-Abl aktivierten Proteine bzw. Signalmoleküle konzentrierten sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf den Größenbereich zwischen 50 und 65 kDa. In diesem Bereich sind unter anderem die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen angesiedelt. C-Src, Gründer der Familie, war ursprünglich als zelluläres Homolog des viralen Rous-Sarkom-Virus-Onkogens v-Src identifiziert und kloniert worden. Im Laufe der Jahre wurden insgesamt 8 weitere, zu c-Src verwandte Kinasen identifiziert: Fyn, Lyn, Hck, Fgr, Lck, Blk, Yes, Yrk.

Die Überaktivierung einiger dieser Familienmitglieder durch Mutation oder andere Mechanismen konnte mit der Entstehung bzw. Progression verschiedener Tumorarten, z.B. dem Kolon-Karzinom oder dem Mamma-Karzinom, in Verbindung gebracht werden (Biscardi et al., 2000; Irby et al., 1999). Aber auch in der Entstehung und Progression verschiedener Leukämien schienen Src-Kinasen eine Rolle zu spielen. Beispielsweise zeigten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Signaltransduktion des IL-6-Rezeptors, dass die Deletion einer Src-Kinase-Binde- und Aktivierungs-Domäne aus der β -Kette des Rezeptors zu einem Proliferationsdefekt führte (Schäffer et al., 2001). IL-6 ist einer der wesentlichen Wachstumsfaktoren für das Plasmozytom.

Voruntersuchungen in den zuvor auf Tyrosinphosphorylierung getesteten Zelllinien zeigten, dass dort insbesondere die Src-Kinasen Lyn und - mit Einschränkungen - Src, Fyn und Hck exprimiert wurden. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Bcr-Abl zur Aktivierung von Src-Kinasen führte. Dies wurde insbesondere deutlich beim Vergleich der Aktivität dieser Kinasen präzipitiert aus 32D und 32D_{Bcr-Ablwt}-Zellen (Warmuth et al., 1996; Abb.2 und 5). Hier führte die Expression von Bcr-Abl zu einer ca. 5 – 10fachen Erhöhung der Aktivität von Lyn und Hck, gemessen mit Hilfe von Immunkomplex-Kinaseassays. Eine hohe konstitutive Aktivierung von Src-Kinasen in Bcr-Abl positiven Zelllinien konnte später aber auch mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Warmuth et al., 2002; Abb. 7C). Dieser Antikörper erkennt ausschließlich Src-Kinasen, deren autoreglatives Tyrosin an Position 416 phosphoryliert ist. Zahlreiche Arbeiten hatten gezeigt, dass die Phosphorylierung dieses Tyrosins absolute Voraussetzung für die Aktivierung von Src-Kinasen ist (Brown und Cooper, 1996).

3.1.3.3 *Direkte Interaktion von Bcr-Abl und Src-Kinasen*

Wiederholt fand sich in Immunkomplex-Kinaseassays von Lyn, aber auch von Hck, eine kopräzipitierende Bande von ca. 210 kDa (Warmuth et al., 1996; Abb.1, 4 und 5). Dies legte nahe, dass Bcr-Abl Src-Kinasen nicht nur aktiviert, sondern auch in einem direkten intrazytosolischen Komplex mit diesen Kinasen vorliegt. Diese Annahme konnte mit Hilfe der Doppel-Immunpräzipitation und der Immunpräzipitation mit anschließendem Immunoblot bestätigt werden (Warmuth et al., 1996; Abb.6).

3.2 Mechanismus der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl

3.2.1 Literatur

1. Warmuth M., Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B. und Hallek M. (1997). „The Src-family kinase Hck interacts with Bcr/Abl by a kinase independent mechanism and phosphorylates the grb2-binding site of bcr“ *Journal of Biological Chemistry*, 272, 33260 – 33270
2. Warmuth M., Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I. und Hallek M. (2002). “Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases”. **Blood, im Druck**

3.2.2 Hintergrund

Um den Mechanismus der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl besser zu verstehen und um Aufschluss über die biologische Funktion der Src-Aktivierung in Bcr-Abl-positiven Zellen zu erhalten, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die direkte Interaktion der beiden Proteinfamilien näher untersucht werden. Dazu wurde die Komplexbildung der beiden Proteine in Cos7-Zellen, einer Nierenepithelzelle des Affen, sowie in Sf9-Zellen, einer Insektenzelllinie, reproduziert. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die Deletion bzw. funktionelle Inaktivierung verschiedener Strukturdomänen von Bcr-Abl und Src-Kinasen die Kopräzipitation der beiden Protein(familien) beeinflusste. Aus technischen Gründen wurde eine Vielzahl der Experimente auf Hck als Vertreter der Src-Kinasen beschränkt. Wesentliche Daten wurden anschließend für Lyn bestätigt.

3.2.3 Ergebnisse

3.2.3.1 *Bcr-Abl und Src-Kinasen interagieren über einen komplexen tyrosinphosphorylierungs-unabhängigen Mechanismus*

Sowohl Bcr-Abl als auch Src-Kinasen verfügen über sogenannte SH2-Domänen (siehe Einleitung). Sie besitzen einerseits wichtige regulatorische Funktionen, andererseits aber vermitteln sie durch die Interaktion mit phosphorylierten Tyrosin-Resten die Bildung von Protein-Protein-Komplexen (Pawson, 1995a). Die Mutation der SH2-Domäne in Bcr-Abl hemmt einerseits dessen

transformierende Aktivität, andererseits wird die Phosphorylierung zellulärer Proteine negativ beeinträchtigt (Mayer et al., 1992). Umgekehrt lässt die dreidimensionale Struktur verschiedener Src-Kinasen darauf schließen, dass die Interaktion der SH2-Domäne von Src-Kinasen mit phosphorylierten Tyrosin-Resten anderer Proteine zur Aufhebung negativ-regulatorischer, intramolekularer Interaktionen führt (Sicheri und Kuriyan, 1997). Dies wiederum bringt eine Erhöhung der Kinaseaktivität mit sich.

Tatsächlich deuteten „Pull-Down“-Assays mit der isolierten SH2-Domäne von Hck auf eine Beteiligung dieser Struktur-Domäne an der Interaktion zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen hin (Abb. 3.2.1A). Für diese Experimente war die SH2-Domäne an GST fusioniert und in Insektenzellen exprimiert worden. Anschließend wurde das Fusionsprotein über Gluthation-„Beads“ aufgereinigt. Weitere Untersuchungen mit den Bcr- und Abl-Subfragmenten von Bcr-Abl ergaben, dass die Bindestelle für die SH2-Domäne von Hck im Bereich des Bcr-Anteils lag (Abb. 3.2.1A).

Dennoch sprachen zahlreiche Ergebnisse gegen eine Komplexbildung vermittelt durch die alleinige Bindung der SH2-Domäne von Hck (oder Src-Kinasen im allgemeinen) an phosphorylierte Tyrosine in Bcr-Abl. Beispielsweise führte die funktionelle Inaktivierung der SH2-Domäne von Hck sowie die Mutation zweier wichtiger Tyrosin-Reste in Bcr-Abl, Y177 und Y1294, nicht zu einer Abschwächung oder Aufhebung der Kopräzipitation der Gesamtproteine nach Expression in Cos7-Zellen (Warmuth et al., 1997; Abb.2). Dies galt auch, wenn die zwei zuvor genannten Mutationen mit einer Mutation der SH2-Domäne zu einer Tripel-Mutation kombiniert wurden (Warmuth et al., 1997; Abb.2). Von dieser Mutante war bekannt, dass sie die transformierende Wirkung von Bcr-Abl in hämatopoetischen Zellen aufhob, u.a. indem sie mit der Aktivierung des Ras-Signalwegs durch Bcr-Abl interferierte (Cortez et al., 1995). Darüber hinaus war neben der SH2-Domäne auch die isolierte und aufgereinigten SH3-Domänen von Hck zur Interaktion mit Bcr-Abl befähigt (Abb. 3.2.1A). Diese assoziierte jedoch im Unterschied zur SH2-Domäne sowohl mit dem Bcr- als auch mit dem Abl-Anteil. Dies deutete darauf hin, dass der Bindungs- und Aktivierungsmodus zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen sehr komplex ist, und dass möglicherweise mehrere Domänen und Interaktionsstellen beider Proteine daran beteiligt sind. Umgekehrt war zu bedenken, dass die Funktion und Bindefähigkeit einzelner Domänen durch die Isolierung aus dem Gesamtkontext des Proteins stark verändert sein konnte, insbesondere durch Aufhebung intramolekularer Interaktionen und durch den Verlust regulatorischer Autophosphorylierungen. Es war also fraglich, ob die in diesen Untersuchungen identifizierten Interaktionsdomänen, tatsächlich an der Komplexbildung und Src-Kinase-Aktivierung beteiligt waren.

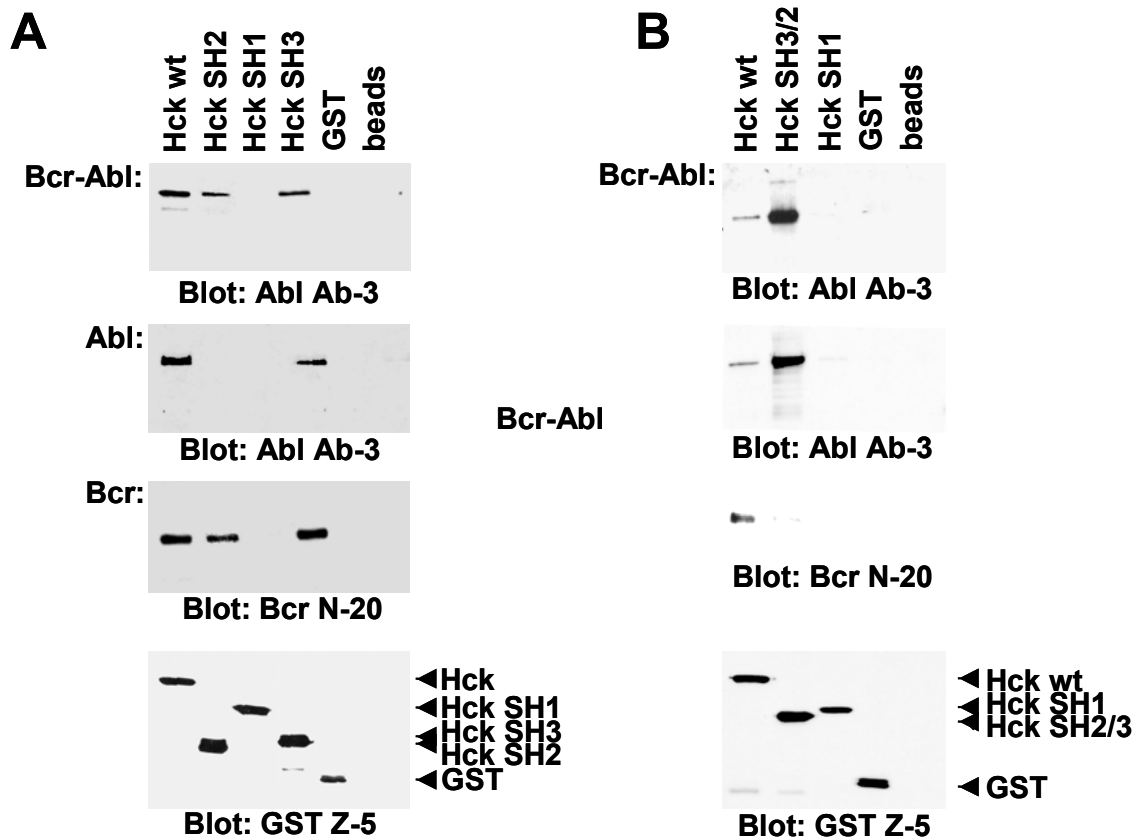


Abb. 3.2.1: Bcr-Abl interagiert mit der SH2- und SH3-Domäne von Hck. Um die Interaktion von Bcr-Abl mit den verschiedenen Domänen der Src-Kinase Hck zu untersuchen, wurden in Sf9-Insektenzellen Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine der einzelnen Subdomänen sowie von Hck wt expremiert. Die Fusion an GST ermöglichte die Aufreinigung der Konstrukte mit Hilfe von Glutathion-Agarose-Mikrosphären (beads). Immunoblots mit einem Antikörper gegen GST belegten, dass alle Konstrukte in etwa gleicher Menge expremiert wurden. Gleiche Mengen der einzelnen, an Glutathion-Agarose-Beads gebundenen Konstrukte wurden mit Lysaten von Cos7 Zellen inkubiert, die entweder Bcr-Abl oder aber lediglich den Bcr- bzw. den Abl-Anteil von Bcr-Abl expremierten. Die einzelnen Reaktionen wurden anschließend mehrfach gewaschen, und die an die Glutathion-Agarose-Beads gebundenen Proteine wurden durch Aufkochen mit Mercaptoethanol-haltigem Puffer aus ihrer Bindung gelöst. Neben den GST-Proteinen selbst, lösten sich dabei auch die an die GST-Fusionsproteine gebundenen Interaktionspartner. Diese Experimente zeigten, dass sowohl die SH2- als auch die SH3-, nicht aber die SH1-Domäne von Hck an Bcr-Abl bindet. Die Bindungsstellen für die SH3-Domäne von Hck sind dabei sowohl im Bcr- wie auch im Abl-Anteil gelegen, die SH2-Domäne bindet ausschließlich an den Bcr-Anteil. Die Deletion der SH1-Domäne von Hck (HckSH3/2; (B)) erhöhte die Bindung an Bcr-Abl und Abl, nicht aber an Bcr.

Um zu untersuchen, inwieweit Tyrosinphosphorylierungen überhaupt die Interaktion von Bcr-Abl mit Src-Kinasen beeinflussten, wurde die Kopräzipitation von Bcr-Abl und Src-Kinasen nach Dephosphorylierung der beiden Proteine mit Hilfe saurerer Kartoffelphosphatase (PAP) untersucht.

Diese Experimente wurden zunächst mit Lysaten von Cos7-Zellen durchgeführt, und es zeigte sich, dass die Vorbehandlung der Lysate mit PAP zu einer kompletten Aufhebung der Bindung von Grb2 an Bcr-Abl führte. Diese Assoziation wird durch die Bindung der SH2-Domäne von Grb2 an das *phosphorylierte* Tyrosin 177 vermittelt (Pendergast et al., 1993). Unter gleichen Bedingungen, jedoch, kam es zu einer signifikanten Zunahme der Komplexbildung zwischen Bcr-Abl und Hck (Warmuth et al., 1997; Abb.3). Dieser Befund konnte sowohl in CML Zelllinien als auch in 32D_{Bcr-Ablwt}-Zellen reproduziert werden, war also nicht auf spezifische Gegebenheiten oder Effekte in Cos7-Zellen zurückzuführen. Interessanter Weise wurde eine Zunahme der Komplexbildung zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen auch dann beobachtet, wenn letztere durch spezifische Punktmutationen inaktiviert wurden oder aber, wenn die Kinase-Domäne komplett deletiert wurde (Warmuth et al., 1997; Abb. 4 und Abb. 3.2.1B). Schließlich konnten Bcr-Abl und Src-Kinasen auch dann wechselseitig kopräzipitiert werden, wenn jeweils beide Kinasen in inaktivierter Form vorlagen (Warmuth et al. 1997; Abb.5). Die Kinase-Inaktivierung wurde dabei durch Mutation eines Lysin-Rests in den ATP-Bindestellen der jeweiligen Kinase zu Arginin bewerkstelligt. Hck wurde außerdem durch die Mutation eines für die Kinaseaktivität wichtigen Tyrosin-Rests (Y416 in c-Src; Y390F bezogen auf die Position in humanem Hck) inaktiviert. Insgesamt deuteten diese Beobachtungen darauf hin, dass Bcr-Abl inaktive, bzw. dephosphorylierte Src-Kinase-Moleküle für die Bindung bevorzugte. Der Interaktionsmodus war phosphorylierungs-unabhängig, wurde also mit hoher Wahrscheinlichkeit von der SH3-Domäne der Src-Kinasen getragen. Darüber hinaus könnte aber auch eine Interaktion der SH2-Domäne mit dem Bcr-Anteil zum Gesamtkomplex beitragen.

3.2.3.2 Bcr-Abl aktiviert Src-Kinasen über einen Kinase-unabhängigen Mechanismus

Überraschend, aber in Korrelation zu den Kopräzipitationsstudien, war nicht nur die strukturelle Interaktion von Src-Kinase mit Bcr-Abl, sondern auch deren konstitutive Aktivierung durch Bcr-Abl unabhängig von der Funktionalität der Abl-Kinase. Beispielweise fand sich in 32D-Zellen eine gleich hohe Aktivität von Lyn und Hck, unabhängig davon ob Bcr-Ablwt oder eine kinase-inaktive Mutante von Bcr-Abl (Bcr-Abl_{K1172R}; Bcr-Abl k.n.) exprimiert wurde (Warmuth et al., 1997; Abb. 6). Darüber hinaus führte die Behandlung von Bcr-Abl-positiven Zellen mit dem Abl-spezifischen Kinase-Inhibitor STI571 zwar zu einer Inaktivierung von Bcr-Abl und zahlreichen Substraten von Bcr-Abl z.B. STAT5 und JNK, nicht aber zu einer Abnahme der Aktivität von Src-Kinasen (Warmuth et al., 2002; Abb. 7C und D).

Die Interaktion zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen führt nicht nur zu deren Aktivierung, sondern ist auch Grundlage für die Phosphorylierung von Bcr-Abl durch Src-Kinasen selbst. Koexpressionsstudien zeigten, dass Src-Kinasen den Tyrosin-Rest 177, also die Bindestelle für das

Adaptorprotein Grb2, phosphorylierten (Warmuth et al., 1997; Abb.7). Dieser Effekt konnte aber nur nachgewiesen werden, wenn Bcr-Abl durch Mutation der Kinase-Domäne inaktiviert wurde und damit die durch Abl induzierten Autophosphorylierungen ausgeschaltet wurden. Das in unmittelbarer Nachbarschaft zu Y177 gelegene A-Box/B-Box-Motiv, eine putative Interaktionsstelle für die SH2-Domäne von Src-Kinasen, war nicht notwendig, um die Phosphorylierung von Y177 durch Src-Kinasen und die dadurch induzierte Assoziation von Grb2 mit Bcr-Abl zu gewährleisten (Warmuth et al., 1997; Abb. 8).

3.3 Essentielle Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr in einem Tiermodell für die Philadelphia-(Bcr-Abl)-positive B-ALL

3.3.1 Hintergrund

Zur Untersuchung der Bedeutung der in Abschnitt 3.1 und 3.2 dargestellten Ergebnisse für die Biologie Bcr-Abl-positiver Leukämien wurde das in der Einleitung beschriebene retrovirale Knochenmarks-Transduktions-/Transplantations-Modell gewählt (Van Etten, 2001). Dieses System erlaubt eine schnelle, reproduzierbare Induktion einer Bcr-Abl-abhängigen Leukämie in Balb/c oder C57BL/6-Mäusen. Abhängig vom Transduktions-/Transplantations-Prozedere kann dabei entweder ein myeloproliferatives (MPE) oder eine akutes lymphatisches Krankheitsbild induziert werden (Li et al., 1999). Während ersteres die chronische Phase der CML reflektiert, entspricht letzteres der primären Bcr-Abl-positiven B-ALL, bzw. der lymphatisch transformierten Blastenkrise. Basierend auf diesem Tiermodell sollte untersucht werden, inwieweit die homozygote Deletion verschiedener Src-Kinasen aus dem Mausgenom den Phänotyp der beiden genannten Krankheitsbilder beeinflusste.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Lysaten von Granulozyten und Makrophagen isoliert aus murinem Knochenmark hatten gezeigt, dass dort insbesondere die Kinasen Lyn, Hck und Fgr exprimiert werden (Meng und Lowell, 1997; Mocsai et al., 1999). Lyn und Hck scheinen aber auch die prädominanten Src-Kinasen innerhalb der B-Zell-Reihe zu sein (Taguchi et al., 2000; Wechsler und Monroe, 1995). Dies ergab sich anhand von Untersuchungen an humanen und murinen B-Zellen verschiedener Differenzierungsgrade.

Die Exploration der physiologischen und pathologischen Aufgaben von Src-Kinasen in verschiedenen Signaltransduktions-Systemen hat sich als äußerst schwierig herausgestellt. Ursache hierfür ist die enorme funktionelle Redundanz zwischen den verschiedenen Mitgliedern dieser Kinase-Familie. So führt die Deletion eines einzigen Familienmitgliedes aus dem Genom von Mäusen in der Regel nur zu sehr subtilen Phänotypen (Corey und Anderson, 1999; Lowell und Soriano, 1996). Basierend auf obigen Beobachtungen zur Expression verschiedener Src-Kinasen in der Myelopoese und B-Zell-Reihe und um Redundanzeffekt auszuschließen, wurde für initiale Experimente eine Mauslinie ausgewählt, bei der durch homologe Rekombination die Gene für Lyn, Hck und Fgr in einer Dreifachkombination eliminiert worden waren. Diese Mäuse waren lebensfähig und zeigten zumindest quantitativ eine weitgehend normale Myelo- und Lymphopoese.

3.3.2 Ergebnisse

Um die Bedeutung von Src-Kinasen für die Entstehung der Bcr-Abl-positiven myeloproliferativen Erkrankung (MPE) zu untersuchen, wurde Knochenmark aus $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -Mäusen sowie aus C57BL/6-Mäusen isoliert und in Kultur genommen (experimentelle Prozedere siehe Abbildung 3.3.1). Die Versuchstiere waren zuvor mit 5-Fluorouracil (5-FU) vorbehandelt worden, ein Schritt, der zur effizienten Induktion der MPE durch Bcr-Abl unerlässlich ist. Die so gewonnenen Zellen wurden in Gegenwart myeloetischer Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-6, SCF) zweimal im Abstand von 24h retroviral transduziert. Dabei wurden Viren verwendet, die für das CML-typische Fusionsprotein mit einer Größe von 210 kDa kodierte. Der Titer lag regelmäßig über 5×10^6 . Die Infektion geschah in Gegenwart von Polybren und wurde als sogenannte „Spin-Infektion“, also unter Zentrifugation der Zellen durchgeführt. 24h nach der zweiten Infektion wurden $0,5 \times 10^6$ vitale Zellen über die Schwanzvenen in zuvor letal bestrahlte C57BL/6-Mäuse injiziert. Diese Mäuse wurden im weiteren Verlauf täglich auf Krankheitszeichen hin untersucht. Die Abb. 3.3.2A zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Zu beachten ist, dass sowohl Knockout- wie auch Wildtyp-Knochenmark jeweils in genetisch unveränderte C57BL/6-Mäuse injiziert wurde, um einen Empfänger- („host“-) Effekt durch die Deletion von Lyn, Hck und Fgr zu vermeiden. Verstorbene Mäuse wurden pathologisch untersucht, insbesondere auf Infiltration von Lunge, Milz und Leber mit leukämischen Zellen. Außerdem wurde eine Differenzierung der leukämischen Zellen anhand von Oberflächenmarkern vorgenommen (Mac-1 für myeloische Zellen, B220 für lymphatische Zellen der B-Zell-Reihe). Abb. 3.3.2.B zeigt die Überlebenskurven für die Empfänger von Bcr-Abl-transduziertem Wildtyp- oder $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -Knochenmark. Dabei ergab sich zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden experimentellen Gruppen. Beide Absterbe-Kurven korrelierten außerdem sehr gut mit einer „historischen“ Kurve, resultierend aus einem Experiment, das bereits früher im Labor von Dr. Rick van Etten am „Center for Blood Research“ der Harvard Medical School in Boston, USA, durchgeführt worden war (Li et al., 2001). Dies bestätigte eine ausreichende Transduktionseffizienz. Jedoch fanden sich in der Knockout-Gruppe – im Unterschied zur historischen Kurve sowie zur Wildtyp-Gruppe – zwei Mäuse, die eine relativ hohe Latenz und eine unerwartet lange Überlebenszeit aufwiesen (130 bzw. 201 Tage). Daraus resultierte eine sichtbare Rechtsverschiebung der Überlebenskurve, die jedoch im Mantel-Cox-Test bei einem P-Wert von 0,319 nicht signifikant war. Zusammengefasst deutete dieses Ergebnis darauf hin, dass Src-Kinasen, insbesondere die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr, für die Entstehung der MPE induziert durch Bcr-Abl nicht von Bedeutung waren.

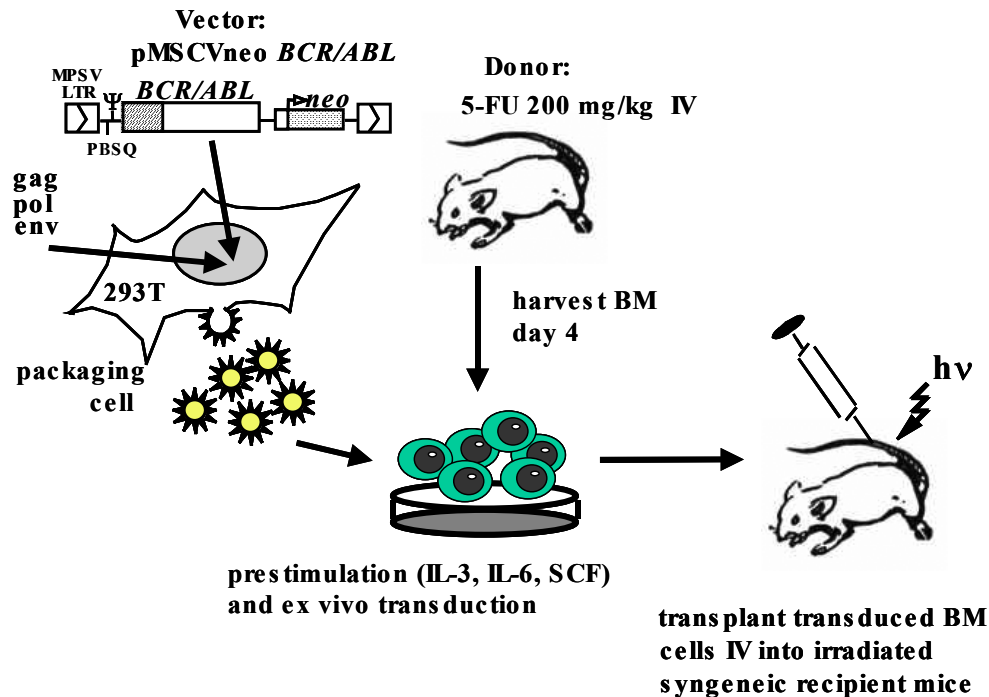


Abb. 3.3.1: Schematische Darstellung der Induktion Bcr-Abl-positiver Leukämien mit Hilfe des Knochenmark-Transduktions-/Transplantations-Systems. Für die retrovirale Infektion von Knochenmark wird auf einen Vektor basierend auf dem murinen Stammzell-Virus (MSCVneoEB) zurückgegriffen. Die cDNA für Bcr-Abl wurde über eine EcoRI-Schnittstelle in diesen Vektor kloniert. Die Produktion retroviraler Stocks erfolgt mit Hilfe transienter, CaCl_2 -vermittelter Co-Transfektion von 293T Zellen mit gereinigter, retroviraler Vektor-DNA sowie mit einem ekotropen Verpackungsplasmid, (MCV-ecopac). 48h nach der Transfektion wird der Überstand geerntet und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2 – 3 Tage vor Entnahme des Knochenmarks werden die Spendermäuse mit 200mg/kg 5-Fluorouracil (Stockkonzentration: 5 – 10mg/ml) behandelt. Dieser Schritt entfällt, falls eine B-ALL induziert werden soll. Idealerweise sollten die Spendertiere 6 – 10 Wochen alt sein. Die eigentliche Infektion des Knochenmarks beginnt mit der Abtötung der Spendermäuse und der Entnahme von Knochenmark aus Tibia und Femur. Die Zellen werden mit Hilfe einer Spritze und DME-Medium aus der Knochenmarkshöhle in ein 50ml Reagiergefäß gespült, gewaschen und anschließend in Prästimulationsmedium aufgenommen (DME; 15% fetales Kälberserum; 5% WEHI3B-konditioniertes Medium; 6ng/ml rekombinantes, murines IL-3; 10 ng/ml rekombinantes murines IL-6; 100ng/ml rekombinanter muriner Stammzell-Faktor (SCF); Antibiotika). 24h später erfolgt die retrovirale Infektion, die zur Steigerung der Transduktionseffizienz nach weiteren 24h wiederholt wird. 48h nach der ersten Infektion erfolgt die Transplantation des Knochenmarks in die Empfängermause (C57BL/6 für beide Arten von Knochenmark). Hierbei werden $0,2 - 1 \times 10^6$ Zellen in 0,4 - 0,5 ml HBSS aufgenommen und über die laterale Schwanzvene in die Mäuse injiziert. Zuvor werden die Empfängermause zur Inaktivierung des eigenen Knochenmarks zweimal mit einer Dosis von jeweils 450 rad im Abstand von 3h bestrahlt. Die Vorstimulation der Zellen in IL-3-, IL-6- und SCF-haltigem Medium sowie die 2. Infektionsrunde entfällt, falls eine B-ALL induziert werden soll. Hier werden die Zellen einmal für 4 Stunden unter Zentrifugation und in Gegenwart von IL-7 transduziert.

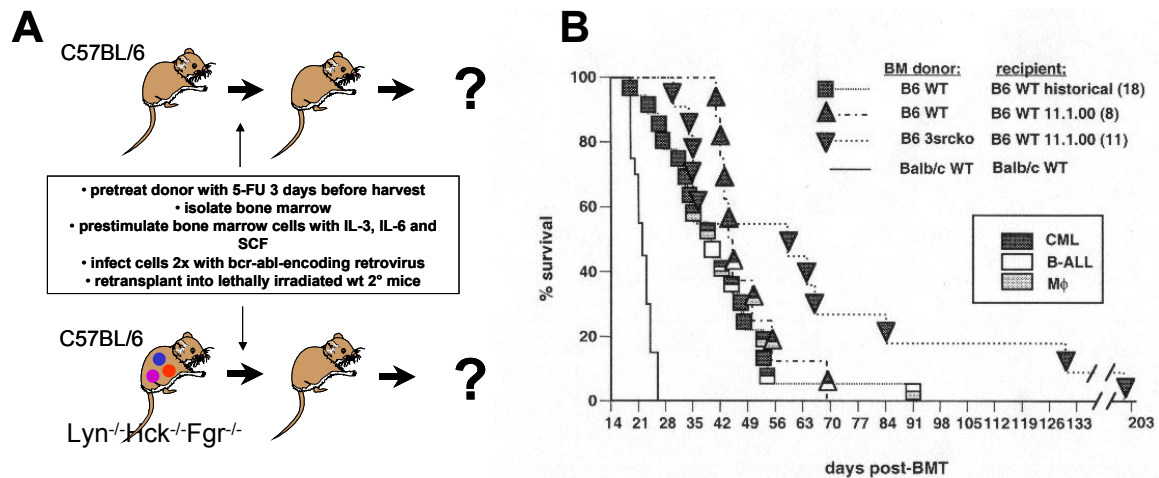


Abb. 3.3.2: Die Deletion von Lyn, Hck und Fgr führt nicht zu einer signifikanten Beeinträchtigung der durch Bcr-Abl induzierten myeloproliferativen Erkrankung in Mäusen. (A) Um die Bedeutung von Src-Kinasen für die Entstehung der Bcr-Abl-positiven myeloproliferativen Erkrankung zu untersuchen, wurde Knochenmark aus Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}-Mäusen sowie aus C57BL/6-Mäusen isoliert und in Kultur genommen (experimentelle Prozedere siehe Abbildung 2.3.1). Die Versuchstiere waren zuvor mit 5-Fluorouracil (5-FU) vorbehandelt worden. Die so gewonnenen Zellen wurden in Gegenwart myeloetischer Wachstumsfaktoren (IL-3, IL-6, SCF) zweimal im Abstand von 24h retroviral transduziert. 24h nach der zweiten Infektion wurden 0,5 x 10⁶ vitale Zellen über die Schwanzvenen in zuvor lethal bestrahlte C57BL/6-Empfänger-Mäuse injiziert. Diese Mäuse wurden im weiteren Verlauf täglich auf Krankheitszeichen hin untersucht. Die Abb. 2.3.2A zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Zu beachten ist, dass sowohl „Knockout“- wie auch „Wildtyp“-Knochenmark jeweils in genetisch unveränderte C57BL/6-Mäuse injiziert wurde, um einen „Empfänger“-Effekt durch die Deletion von Lyn, Hck und Fgr zu vermeiden. Verstorbene Mäuse wurden pathologisch untersucht, insbesondere auf Infiltration von Lunge, Milz und Leber mit leukämischen Zellen. Außerdem wurde eine Differenzierung der leukämischen Zellen anhand von Oberflächenmarkern vorgenommen (Mac-1 für myeloische Zellen, B220 für lymphatische Zellen der B-Zell-Reihe). Außerdem wurde eine Differenzierung der leukämischen Zellen anhand von Oberflächenmarkern vorgenommen (Mac-1 für myeloische Zellen, B220 für lymphatische Zellen der B-Zell-Reihe). (B) Überlebenskurven der unter (A) beschriebenen experimentellen Gruppen. Für die einzelnen Mäuse ist jeweils die Differenzierung der lethalen Leukämie angegeben. Zum Vergleich wurden „historische“ Kurven für die Induktion einer MPD in Balb/c- und C57BL/6-Mäusen eingefügt.

Eine auffällige Besonderheit ergab sich jedoch bei der pathologischen Untersuchung der verstorbenen Mäuse. Vorarbeiten aus dem Labor von Dr. Rick van Etten hatten gezeigt, dass die Effizienz der Induktion einer MPE, verglichen mit Balb/c-Mäusen, in C57BL/6-Mäusen leicht erniedrigt ist. Neben einem CML-artigen Krankheitsbild, entwickelten etliche Mäuse, vor allem bei längerer Überlebenszeit und parallel zur MPE, eine B-ALL, die dann nicht selten auch Todesursache

ist (siehe Abbildung 3.3.2B „historische Kurve). Bei einigen Mäusen kam es darüber hinaus zur Entwicklung aggressiver Makrophagen-Tumore. Diese Beobachtung konnte für die mit Wildtyp-Knochenmark transplantierte experimentelle Gruppe reproduziert werden: während die Mäuse #1 – #4 an einer reinen MPE verstarben, konnte bei den Mäusen #5 und #8 eine parallel etablierte B-ALL identifiziert werden. Die Mäuse #6 und #7 hatten zusätzlich zur MPE aggressiv wachsende Makrophagen-Tumore. Im Gegensatz dazu aber zeigte keine der Mäuse aus der $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -Gruppe Zeichen eines Makrophagen-Tumors oder einer B-ALL. Alle Mäuse verstarben an einer reinen MPE (Abb. 3.3.2B). Dies deutete darauf hin, dass die im murinen Knochenmark exprimierten Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr zwar nicht für die Entstehung der CML-artigen MPE, wohl aber für die Entstehung der aggressiveren Makrophagen-Tumore und der B-ALL notwendig waren.

Um eine differentielle Bedeutung von Lyn, Hck und Fgr für die Entstehung der Bcr-Abl-positiven MPE versus B-ALL zu untersuchen, wurden in einem weiteren Experiment erneut Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -C57BL/6-Mäusen gewonnen. Die Spendermäuse waren im Gegensatz zum ersten Experiment nicht mit 5-FU vorbehandelt worden, eine Maßnahme, welche die Entstehung einer MPE weitgehend ausschließt. Die in Gegenwart von IL-7 kultivierten Zellen wurden lediglich einmal über einen Zeitraum von 4h unter Zentrifugation retroviral transduziert. Erneut wurde dafür eine Viruspräparation verwendet, die für das CML-typische p210 Fusionsprotein kodierte. 4h nach Beginn der Transduktion wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in die Schwanzvenen von letal vorbestrahlten Empfängermäusen verbracht. Die Abb. 3.3.3A zeigt das experimentelle Prozedere, Abb. 3.3.3B die Überlebenskurven der entsprechend behandelten Mäuse. Ähnlich wie bereits für Balb/c-Mäuse beschrieben, entwickelten die meisten C57BL/6-Mäuse, die mit Bcr-Abl-transduziertem Wildtyp-Knochenmark transplantiert worden waren, binnen 4 – 8 Wochen eine letale B-ALL. Lediglich drei Empfängermäuse zeigten auch nach mehr als drei Monaten keine Krankheitszeichen, eine Beobachtung die möglicherweise auf eine Parainjektion des transduzierten Spender-Knochenmarks während des Experiments zurückzuführen war. Im eklatanten Gegensatz dazu, zeigten sich im gleichen Beobachtungszeitraum keinerlei Krankheitszeichen bei Mäusen, die mit Bcr-Abl-transduziertem $Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$ -Knochenmark retransplantiert worden waren. Alle Mäuse dieser Gruppe sind vital und in wiederholten Blutaustriechen waren keine malignen Zellen nachweisbar. Dies belegte eine essentielle Rolle der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr während der Pathogenese der Bcr-Abl-positiven B-ALL.

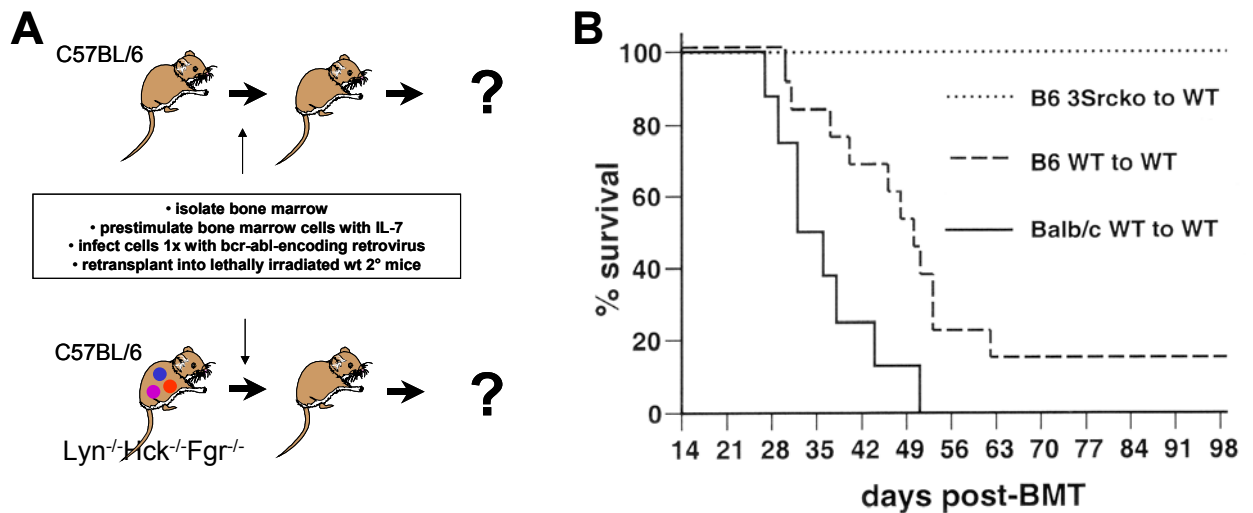


Abb. 3.3.3: Die Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr spielen eine entscheidende Rolle für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL in Mäusen. Es wurden Knochenmarkszellen aus Wildtyp-C57BL/6- und Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}-Mäusen gewonnen. Die Spendermäuse waren nicht mit 5-FU vorbehandelt. Die in Gegenwart von IL-7 kultivierten Zellen wurden 4h unter Zentrifugation retroviral transduziert. Es wurde eine Viruspräparation verwendet, die für das CML-typische p210 Fusionsprotein kodierte. 4h nach Beginn der Transduktion wurden 0,5 x 10⁶ Zellen in die Schwanzvenen von lethal vorbestrahlten Empfängermäusen injiziert. Insgesamt wurden 13 Empfängermäuse mit Bcr-Abl-transduziertem wildtyp-Knochenmark und 10 Mäuse mit retroviral infiziertem Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}-Knochenmark transplantiert. (B) Überlebenskurven der unter (A) beschriebenen experimentellen Gruppen. Zum Vergleich wurde eine „historische“ Kurve für die Induktion der B-ALL in Balb/c-Mäusen eingefügt. Die Induktion einer B-ALL in C57BL/6-Mäusen ist gegenüber Balb/c-Mäusen geringgradig erniedrigt.

3.4 Genetische Untersuchung des Bindungsmechanismus des Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors STI571

3.4.1 Literatur

1. Warmuth M., Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I. und Hallek M. (2002). "Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases". **Blood, im Druck**
2. Schuster C., Forster K., Dierks H., Elsässer A., Behre G., Simon N., Danhauser-Riedl S., Hallek M. und Warmuth M. (2002). "The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription factor regulation and neutrophilic differentiation are reverted by the Abl kinase inhibitor STI571". **Blood, im Druck**

3.4.2 Hintergrund

Tyrosinkinasen, aber auch Serin-/Threonin-Kinasen, sind an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen beteiligt. Dies gilt insbesondere für Tumorerkrankungen und hämatopoetische Neoplasmen (Blume-Jensen und Hunter, 2001). Spezifische Inhibitoren pathogenetisch bedeutsamer Kinasen sind daher attraktive Substanzen für die spezifische Therapie maligner Krankheitsentitäten. Dennoch galt aufgrund der großen strukturellen und funktionellen Homologie innerhalb der Proteinkinase-Familie die Herstellung ausreichend spezifischer Kinase-Inhibitoren zur toxisitäts- und nebenwirkungsfreien Therapie als nahezu unmöglich.

1996 berichteten Druker und Kollegen erstmals über eine Substanz, STI571 (früher bezeichnet als CGP57148), die mit relativ hoher Spezifität Abl bzw. Bcr-Abl inhibierte (Druker et al., 1996). Dieser Effekt beruhte auf einer kompetitiven Verdrängung von ATP aus der Bindung an Abl. Neben Abl/Bcr-Abl konnten lediglich drei weitere Kinasen identifiziert werden, die effizient durch STI571 gehemmt wurden: das zu Abl hoch homologe Arg, PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (PDGF-RTK) und Stammzellfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase (SCF-RTK) (Buchdunger et al., 2000; Okuda et al., 2001). Eine Vielzahl anderer, physiologisch relevanter Tyrosinkinasen, beispielsweise Flt3 oder Src-Kinasen, sind nicht sensitiv gegenüber einer direkten Inhibition durch STI571 (Buchdunger et al., 2000; Druker et al., 1996). In klinischen Studien führte STI571 zu überraschend überzeugenden Ergebnissen: Druker und Kollegen konnten zeigen, dass STI571 in einer Phase-I-Studie bei 98% der

Patienten zu einer hämatologischen Remission führte (Druker et al., 2001b). Bei einem Teil dieser Patienten wurde gar eine komplette zytogenetische Remission festgestellt. Diese Patienten waren zuvor therapie-refraktär gegen eine Behandlung mit Interferon- α . Klinische Erfolge gab es außerdem bei Einsatz von STI571 zur Behandlung von Patienten mit myeloischer/lymphatischer Blastenkrise oder primäre Ph-positiver B-ALL (Druker et al., 2001a). Hier kam es aber relativ rasch zu Rezidiven, die neusten Erkenntnissen zur Folge häufig auf der Entwicklung direkter Resistenzen von Bcr-Abl gegenüber STI571 beruhten (Gorre et al., 2001).

Um den Bindungsmechanismus von STI571 und die Grundlagen seiner Spezifität für Abl besser zu verstehen, sollte dessen Bindung an Abl mit Hilfe gerichteter Mutagenese untersucht werden. Die dabei gewonnenen Daten und Erkenntnisse sollten später zur Identifizierung und Validierung von Substanzen verwendet werden, die sowohl Bcr-Abl als auch Src-Kinasen direkt inhibierten (siehe Abschnitt 2.5).

3.4.3 Ergebnisse

3.4.3.1 *Identifikation und genetische Validierung der Positionen 315 und 380 der Kinase-Domäne von Abl als Determinanten der Bindungsspezifität von STI571*

Grundlage für die experimentell-genetische Exploration der Bindung von STI571 an Abl war eine von Schindler und Kollegen publizierte Kristallstruktur der isolierten Kinase-Domäne von murinem Abl im Komplex mit einer synthetischen Vorstufe von STI571 (STI571a) (Schindler et al., 2000). Diese Arbeit bestätigte, dass STI571 in die ATP-Bindestelle der Kinase-Domäne bindet und so die Bindung von ATP als Substrat für die Phosphorylierungs-Reaktion blockiert. Jedoch schien die hohe Spezifität von STI571 für Abl eher auf der Bindung eines Teils des Inhibitors in eine zur ATP-Bindestelle benachbarte hydrophobe Tasche zu beruhen (Abb. 3.4.1A und B). Diese Tasche liegt im Kern der Kinase-Domäne, eingebettet zwischen den beiden Subdomänen, dem N-Lobe und dem C-Lobe. Die Aminosäuren, die zur Bildung des Taschenkerns beitragen, sind innerhalb der Proteinkinase-Familie hoch konserviert. Von einigen Aminosäurepositionen war bekannt, dass sie wichtige katalytische Funktionen besitzen. Im Gegensatz zur Tasche selbst, variiert der Tascheneingang beträchtlich von Kinase zu Kinase. Dies ist insbesondere auf die hohe Variabilität der Aminosäurepositionen 315 und 380 zurückzuführen (Nummerierung bezogen auf die Position in murinem c-Abl). An diesen Positionen findet sich in Abl ein Threonin (T315) bzw. ein Alanin (A380). In vielen anderen Kinasen, insbesondere in Serin-/Threonin-Kinasen, sind diese Positionen von längeren oder „sperrigeren“ Aminosäuren besetzt. An Position 315 beispielsweise, findet man außer Threonin auch Valin, Leucin,

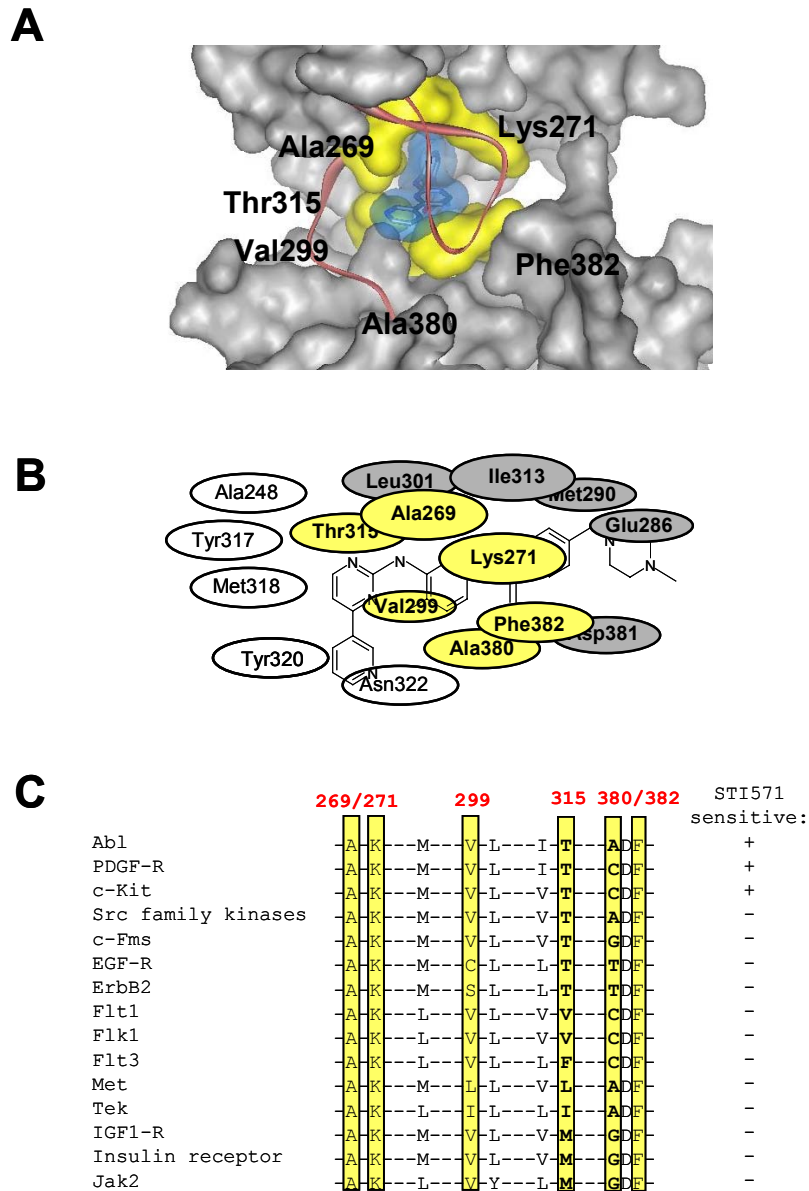


Abb. 3.4.1: Grundlagen der Spezifität von STI571 für Abl. STI571 bindet in eine hydrophobe Tasche in unmittelbarer Nachbarschaft zur ATP-Bindestelle. Die den Tascheneingang bildenden Aminosäuren sind gelb markiert.

Isoleucin, Methionin, Glutamin oder Phenylalanin, an Position 380 außer Alanin und dem kleineren Glycin auch Serin, Cystein oder Threonin. Eine genauere Analyse des publizierten inhibitorischen Profils von STI571 zeigte, dass viele STI571-insensitive Kinasen an diesen Positionen tatsächlich längere oder sperrigere Aminosäuren haben (Abb. 3.4.1C). Dagegen findet sich dort in keiner der vier STI571-sensitiven Kinasen (Abl/Bcr-Abl, Arg, PDGF-RTK, SCF-RTK) eine Aminosäure die länger als Threonin (Position 315) bzw. Cystein (Position 380) ist.

Um die Relevanz dieser Beobachtungen zu bestätigen, wurden zunächst Computermodelle von Mutanten von Abl an Position 315 zu Methionin und an Position 380 zu Threonin angefertigt (Warmuth et al., 2002; Abb.1A). Diese Modelle beruhen auf der von Schindler und Kollegen publizierten Struktur und wurden mit Hilfe der „Swiss Prot Structure Viewer“-Software berechnet. Sie zeigten, dass eine Verlängerung der Aminosäureseitenkette an diesen Positionen den Zugang zur postulierten STI571-Bindetasche kritisch einschränkt bzw. versperrt. Die Positionen 315 und 380 konnten daher tatsächlich molekulare „Kontrollstellen“- oder „Gatekeeper“-Positionen verkörpern, die über die Bindung von STI571 an verschiedene Proteinkinasen entschieden.

Um diese Annahme genetisch-experimentell zu beweisen, wurden die beiden Positionen in Bcr-Abl zu jeweils denjenigen Aminosäuren mutiert, die in anderen Proteinkinasen an den dazu homologen Positionen gefunden wurden. Auf die Mutation der Position 380 zu Serin wurde verzichtet, weil sie sich in ihren strukturellen Auswirkungen nicht von der Mutation zu Cystein unterschied. Die Mutation zu Cystein wurde deswegen gegenüber der Mutation zu Serin bevorzugt, weil Cystein in den beiden STI571-sensitiven Kinasen PDGF-RTK und SCF-RTK an Position 380 zu finden ist.

Alle hergestellten Mutanten, also T315V, T315L, T315I, T315M, T315Q, T315F, A380C und A380T, behielten ihre Kinase-Aktivität sowie ihr Transformationsvermögen in hämatopoetischen Zelllinien, eine Beobachtung, die belegte, dass diese Positionen nicht essentiell für die Bindung von ATP waren. Dies war bereits aus der geringen Homologie für diese Positionen innerhalb der Proteinkinase-Familie zu schließen. Im Gegensatz zu Bcr-Ablwt zeigten alle Mutanten, mit Ausnahme von A380C, eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den inhibitorischen Effekten von STI571 (Warmuth et al., 2002; Abb.1B). Weder die durch Bcr-Abl induzierte Phosphorylierung zellulärer Substrate noch die Autophosphorylierung der einzelnen Bcr-Abl Mutanten wurde bei Konzentration von STI571, die zu einer kompletten Inhibition von Bcr-Ablwt führten (je nach Zellsystem 1 – 10,0 $\mu\text{mol/l}$), sichtbar reduziert. Die oben erwähnten Mutationen bewirkten aber nicht nur eine biochemische Resistenz. Sie waren auch in der Lage, in IL-3-unabhängig wachsenden Kulturen von 32D- und BaF/B3-Zellen eine biologische Resistenz gegenüber STI571 zu induzieren. Titrationsexperimente hatten gezeigt, dass ca. 1 – 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571 zu einem kompletten Absterben (>85% Annexin-positive Zellen in durchflusszytometrischen Messungen) von 32D_{Bcr-Ablwt}- und BaF/B3_{Bcr-Ablwt}-Zellen führten. Dies korrelierte mit einer kompletten Dephosphorylierung von STAT5, JNK und Bcr-Abl selbst (Warmuth et al., 2002). 32D- und BaF/B3-Zellen, die eine STI571-resistente Mutante exprimierten, zeigten hingegen keine Reaktion auf STI571. Weder Proliferation noch Überleben waren bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571 erkennbar beeinträchtigt (Warmuth et al., 2002; Abb.1C). Lediglich für Zellen, welche die Mutante A380T exprimierten, war die biologische Resistenz nur inkomplett und nur bis zu einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ voll

ausgebildet. Zellen, welche die Mutante A380C exprimierten, zeigten eine normale Sensitivität gegenüber STI571. Dies entsprach der erhaltenen biochemischen Sensitivität der Mutante wie sie bereits in Cos7-Zellen gefunden worden war (Warmuth et al., 2002; Abb.1B und D).

Zusammengefasst, belegten diese Daten eine entscheidende Funktion der Positionen 315 und 380 als molekulare Determinanten der Bindung und Spezifität von STI571, so wie es aus der von Schindler und Kollegen publizierten Kristallstruktur abzulesen war. Sie zeigten, dass STI571 tatsächlich – wie postuliert - in die zur ATP-Bindestelle benachbarte hydrophobe Tasche bindet und bewiesen, dass STI571 eine Proteinkinase nur dann binden und inhibieren kann, wenn sich an Position 315 ein Threonin und an Position 380 entweder ein Alanin, ein Serin oder ein Cystein befindet.

3.4.3.2 Die Konformation der katalytischen Schleife („activation loop“) beeinflusst die Bindung von STI571 an Abl

Vergleicht man Bcr-Abl mit Src-Kinasen, so findet sich für diejenigen Aminosäuren, welche die hydrophobe STI571-Bindungstasche und deren Eingang formen, eine einhundertprozentige Homologie (Abb. 3.4.1). Dennoch sind Src-Kinasen nicht durch STI571 inhibierbar. Die bereits erwähnte Kristallstrukturanalyse von Schindler und Kollegen ließ vermuten, dass sich diese Beobachtung aus der unterschiedlichen Konformation von Phenylalanin (F) 382 in Abl und Src-Kinasen erklärt (Schindler et al., 2000). F382 ist Bestandteil des hochkonservierten, in allen Proteinkinasen enthaltenen Aminosäure-Motivs D-F-G. Trotz dieser Homologie, scheint F382 eine entscheidende funktionelle Spezifitätsdeterminante für die STI571-Bindung zu sein. In inaktivem, STI571-inhibiertem Abl nimmt diese Aminosäure eine Orientierung an, die den Zugang zur STI571-Bindetasche, insbesondere zum unteren Bereich der Tasche, signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu findet man in den Kristallstrukturen von inaktivem Hck und Src, aber auch von FGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (FGF-RTK) und EphB2, eine Orientierung, die den Zugang zur Tasche einschränkt und - basierend auf Computermodellen – eine Bindung von STI571 ausschließt (Mohammadi et al., 1996; Schindler et al., 2000; Schindler et al., 1999; Sicheri et al., 1997; Wybenga-Groot et al., 2001).

Offensichtlich ist die sehr unterschiedliche Orientierung von F382 eng mit der unterschiedlichen Konformation der katalytischen Schleifen („Activation-(A)-Loop“) von Abl einerseits und Src-Kinasen bzw. FGF-RTK und EphB2 andererseits verbunden. Die Konformation des A-Loops in STI571-gebundenem Abl ähnelt in hohem Masse der Konformation in inaktiver Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase (IRK) und dort findet sich F382 (bzw. F1151 entsprechend der Position in IRK) in einer ähnlichen Orientierung wie sie in Abl gefunden wurde (Warmuth et al., 2002). Umgekehrt befindet sich F382 (F1151) in aktivem IRK und in einer berechneten Struktur von aktivem

Abl in einer Position, die derjenigen in inaktiven Src-Kinasen entspricht, eine Bindung von STI571 also ausschließt (Warmuth et al., 2002). In IRK steht die unterschiedliche Orientierung von F382 (F1151) in der aktiven und inaktiven Konformation in enger Korrelation zu einer kompletten Reorientierung des A-Loops, der sich aus der aktiven, autophosphorylierten Konformation auf das katalytische Zentrum und die Substratbindestelle legt und so die enzymatische Aktivität der Kinase hemmt. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass Abl, bevor es in der Lage ist STI571 zu binden, inaktiviert werden muss, bzw. die inaktive Konformation des A-Loops annehmen muss. Demnach könnte STI571 nicht die aktive Kinase inhibieren, sondern lediglich die Reaktivierung von inaktiver, STI571-gebundener Abl-Kinase verhindern (siehe auch Abbildung 4.4.1).

Um diese Hypothese zu beweisen, wurde die Struktur von STI571-gebundenem Abl nach intramolekularen Interaktionen zwischen dem A-Loop und dem Rest der Kinase-Domäne durchsucht. Diese Strategie beruhte auf der Annahme, dass solche Interaktionen den A-Loop vor der Bindung von STI571 in der inaktiven Konformation stabilisieren bzw. eine solche Konformation überhaupt erst induzieren. Eine Unterbrechung entsprechender Interaktionen durch gerichtete Punktmutationen würde demnach die Stabilität der inaktiven Konformation des A-Loops reduzieren und folglich das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Konformation weiter zugunsten der aktiven Konformation verschieben (siehe auch Abbildung 4.4.1). Als Konsequenz sollten entsprechende Mutanten eine größere Kinase-Aktivität besitzen, vor allem aber eine geringere Sensitivität gegenüber STI571 aufweisen.

Eine intramolekulare Interaktion, die dieser Annahme entsprach, war die durch Wasserstoffbrückenbindungen getragene Verknüpfung zwischen Arginin (R) 386 und den Aminosäuren Aspartat (D) 276 bzw. Glutamat (E) 279. Während R386 im Bereich des A-Loops in unmittelbarer Nachbarschaft zu F382 liegt, sind sowohl D276 als auch E279 Bestandteil einer Schleife, die das β 3-Faltblatt mit der α C-Helix der Kinase-Domäne verbindet (Warmuth et al., 2002; Abb.2A). Keine dieser Aminosäuren aber steht in direktem Kontakt mit STI571. Die Mutation der beiden letztgenannten Aminosäuren zu Serin führte entsprechend obiger Arbeitshypothese zu einer geringen aber reproduzierbaren Zunahme der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl, gekennzeichnet durch ein höheres Maß an Auto- und Substratphosphorylierung nach Expression in Cos7-Zellen (Warmuth et al., 2002; Abb.2B). Dies entsprach der postulierten Verschiebung des Gleichgewichts zwischen aktiver und inaktiver Konformation hin zu transaktiviertem Abl. Darüber hinaus führte obige Mutation zu einer deutlichen Abnahme der Sensitivität von Bcr-Abl gegenüber den inhibitorischen Effekten von STI571. So stieg die inhibitorische Konzentration 50 (IC50) für die Hemmung der Zellproliferation um das 10fache von 0,069 μ mol/l auf 0,71 μ mol/l und das Ausmaß des Zelltodes bei einer STI571-Konzentration von 2 μ mol/l reduzierte sich von > 90% auf ca. 30% (Warmuth et al., 2002; Abb.2C,

und D). Diese Daten belegten einerseits eine wichtige Rolle der Interaktion von R386 mit D276/E279 für die Stabilisierung der inaktiven Konformation von Abl, andererseits unterstützten und bewiesen sie die Annahme, dass STI571 inaktives Abl, nicht aber aktives Abl, bindet. Da eine ähnliche Konformationsänderung des A-Loops verbunden mit einer Reorientierung von F382 in vielen anderen Kinasen nicht stattfindet, belegten diese Experimente, dass F382 als dritte entscheidende Spezifitätsdeterminante für die Bindung von STI571 an verschiedene Proteinkinasen fungiert.

3.5 Strukturbasierte Selektion und Validierung der dualspezifischen Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030

3.5.1 Literatur

1. Warmuth M., Simon N., Mitina O., Mathes R., Fabbro D., Manley P.W., Buchdunger E., Forster K., Moarefi I. und Hallek M. "Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases" (2002). **Blood, im Druck**
2. Warmuth M., Mathes R. und Hallek M.: Verfahren zum Selektieren von Inhibitoren für Enzyme; Patentschrift DE 100 24 174 A1

3.5.2 Hintergrund

In den Abschnitten 3.1 und 3.2 konnte gezeigt werden, dass Bcr-Abl Src-Kinasen über einen Abl-Kinase-unabhängigen Interaktionsmechanismus aktiviert und dass Src-Kinasen auch dann aktiv bleiben, wenn Bcr-Abl durch den Abl-spezifischen Kinase-Inhibitor STI571 inhibiert wird. Tierexperimente deuteten darauf hin, dass diese Aktivierung zumindest für die Entstehung der Bcr-Abl-positiven B-ALL essentiell ist (siehe 3.3). Diese Beobachtungen legten nahe, dass Src-Kinasen eine potentielle therapeutische Zielstruktur sind.

Interessanterweise können bei Bcr-Abl-positiver B-ALL, aber auch bei myeloisch und lymphatisch differenzierter Blastenkrise, mit STI571 als Monotherapie nur geringe Erfolge im Sinne kurzanhaltender Remissionen erzielt werden (Druker et al., 2001a). Besonders in diesen Fällen könnte eine zusätzliche Hemmung von Src-Kinasen von Vorteil sein und den Therapieerfolg erhöhen. Dies scheint sinnvoll, da Src-Kinasen durch STI571 weder direkt noch indirekt inhibiert werden.

Die in Abschnitt 3.4 dargestellten Ergebnisse hatten zur Identifikation einer Bindetasche für STI571 in Abl geführt. Mit Einschränkungen besteht diese Tasche auch in Src-Kinasen: lediglich Phenylalanin 382, das zusammen mit anderen Aminosäuren den Tascheneingang begrenzt, befindet sich in einer Position, welche die Bindung von STI571 an Src-Kinasen unmöglich macht (siehe 3.4.2). Zwei weitere molekulare „Kontrollstellen“, die Positionen 315 und 380, die über die Zugänglichkeit der Tasche entscheiden sind in Src-Kinasen und Abl identisch. Basierend auf diesen Beobachtungen sollten mit Hilfe der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Mutanten Substanzen identifiziert werden, die Bcr-Abl über die Bindung in die STI571-Bindetasche inhibierten, jedoch unabhängig von der

Konformation des A-Loops und der Orientierung von F382. Es wurde postuliert, dass derartige Substanzen über einen identischen Bindungsmechanismus zusätzlich die Aktivität von Src-Kinasen inhibieren konnten.

3.5.3 Ergebnisse

3.5.3.1 Identifikation von PP1 und CGP76030 als prototypische dualspezifische Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren

Mit Hilfe der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Mutanten konnten auf rationaler Basis zwei Substanzen, PP1 und CGP76030, identifiziert werden, die Bcr-Abl direkt über die Bindung in die STI571-Bindetasche hemmten (Abb. 3.5.1).

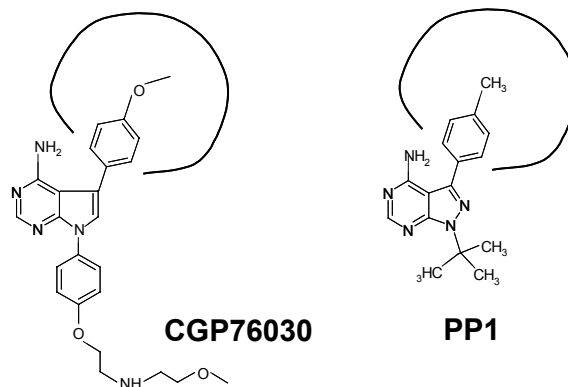


Abb. 3.5.1: Chemische Struktur der Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030.

Beide Substanzen inhibierten sowohl die Autophosphorylierung als auch die durch Bcr-Abl induzierte Substratphosphorylierung nach Expression von Bcr-Abl in Cos7-Zellen in konzentrationsabhängiger Weise (Warmuth et al., 2002; Abb.3C und D). In 32D_{Bcr-Ablwt}- und BaF/B3_{Bcr-Ablwt}-Zellen führten beide Inhibitoren konzentrationsabhängig zu Proliferationsarrest und apoptotischem Zelltod (Warmuth et al., 2002; Abb.3E und F). Intensive Titrationsexperimente identifizierten 50 μmol/l PP1 und 5 μmol/l CGP76030 als die maximal inhibitorischen Konzentrationen für die beiden Substanzen. Proliferationsarrest und Apoptose wurden begleitet von einer Reduktion der Phosphorylierung von STAT5, JNK und von Bcr-Abl selbst.

Eine genaue genetische Validierung des Bindungsmodus von PP1 und CGP76030 ergab, dass die Mutation von Bcr-Abl an Position 315 zu L, I, M, Q oder F zu einer kompletten Resistenz

gegenüber PP1 und CGP76030 führte (Warmuth et al., 2002; Abb.5). Obwohl die Mutation T315V die Sensitivität von Bcr-Abl gegenüber PP1 nicht beeinflusste und nur eine partielle Resistenz gegenüber CGP76030 bewirkte, bestätigten diese Daten, dass beide Inhibitoren über die Bindung in die postulierte STI571-Bindetasche wirkten und dass die Position 315 eine wesentliche Determinante für die Spezifität dieser Inhibitoren ist. Im Gegensatz dazu schien die Position 380 keine entscheidende Rolle für die Entscheidung über die Bindung von PP1 und CGP76030 zu spielen: keine der Mutationen an Position 380 führte zu einer messbaren Resistenz gegenüber diesen Inhibitoren.

Auch die Mutation der Aminosäuren D276 und E279 zu Serin (D276S/E279S) führte nicht zu einer Abnahme der biochemischen und biologischen Potenz von PP1 und CGP76030 (Warmuth et al., 2002; Abb.6). Diese Mutation erschwert die Adaptation der inaktiven Konformation des A-Loops von Abl und führt wie in Abschnitt 2.4 beschrieben zu einer Abnahme der Sensitivität von Abl gegenüber STI571.

Zusammengefasst führten diese Experimente zur Identifikation zweier Inhibitoren, die Bcr-Abl durch Bindung in die STI571-Bindetasche unabhängig von der Konformation des A-Loops banden und inhibierten

3.5.3.2 PP1 und CGP76030 hemmen Bcr-Abl und Src-Kinasen über einen identischen Bindemechanismus

Die in Abschnitt 3.5.3.1 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass PP1 und CGP76030 potentielle dualspezifische Src-/Abl-Inhibitoren waren: sie inhibierten Bcr-Abl unabhängig von der Konformation und Stabilität des A-Loops, und damit unabhängig von der Orientierung von F382. Und in der Tat waren beide Inhibitoren ursprünglich als Src-Kinase-Inhibitoren identifiziert und charakterisiert worden (Hanke et al., 1996; Missbach et al., 1999).

Im weiteren wurde deshalb der Mechanismus der Inhibition von Src-Kinasen, insbesondere Hck, durch PP1 und CGP76030 experimentell-genetisch untersucht, ähnlich wie oben für Bcr-Abl dargestellt. Dabei zeigte sich, dass der Modus der Bindung von PP1 (Abb. 3.5.2) und CGP76030 an Abl und Src-Kinasen nahezu identisch ist. Wie schon für Bcr-Abl beschrieben, behielten alle Mutationen an Position 315 und 380 eine weitgehend normale Kinase-Aktivität, beurteilt anhand der Phosphorylierung zellulärer Substrate in Cos7-Zellen (Abb. 3.5.2B). Für einige Mutanten jedoch, z.B. T315L und T315M, wurde eine Hyperaktivierung gefunden. Die Aktivität dieser Mutanten war in etwa identisch zur Aktivität der bekannten, konstitutiv aktiven und transformierenden Mutante Y501F (Ziegler et al., 1987).

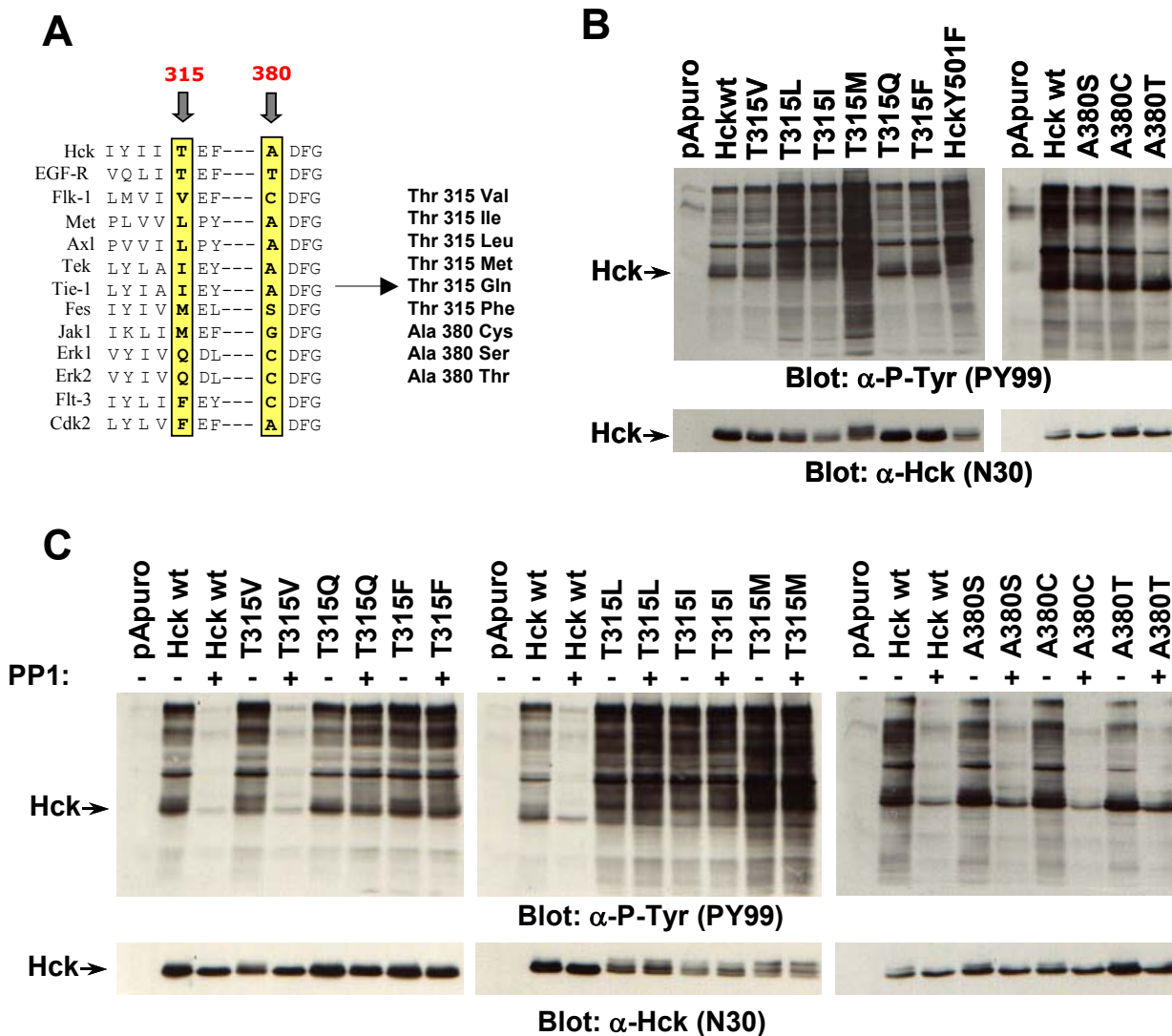


Abb. 3.5.2: Genetische Untersuchung der Interaktion von Hck und PP1. (A) Um die Bindung von PP1 in die zur STI571-Bindestasche in Abl homologe Struktur in Hck zu untersuchen, wurde Hck an den Positionen 315 und 380 mutiert (Nummerierung bezogen auf die homologen Positionen in murinem c-Abl). (B) Die hergestellten Mutanten wurden anschließend in Cos7 Zellen expremiert und mit Hilfe von anti-Phosphotyrosin-Blots semiquantitativ auf ihre Kinase-Aktivität hin untersucht. Keine der Mutationen führte zu einem kompletten Verlust der Kinase-Aktivität, jedoch wurde für die Mutanten T315L, T315I und T315M eine Hyperaktivierung beobachtet. (C) Alle Mutationen an Position 315 mit Ausnahme der Mutation T315V waren komplett resistent gegenüber einer Inhibition mit PP1. Hingegen wirkten sich Mutationen an Position 380 nicht auf die Sensitivität von Hck gegenüber PP1 aus. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Kinase-Inhibitor CGP76030 gefunden.

Die Mutation der Aminosäure 315 (338 bezogen auf die Position in Src) zu L, I, M, Q oder F führte zu einer kompletten Resistenz der resultierenden Mutante gegenüber 100 µmol/l PP1 und 25

$\mu\text{mol/l}$ CGP76030 (Abb. 3.5.2C). Wie schon für Bcr-Abl beobachtet, führte die Mutation von T315 zu V nur zu einer partiellen Resistenz gegenüber CGP76030 und zu keiner entscheidenden Beeinträchtigung der Inhibition von Hck durch PP1. Darüber hinaus, und auch dies entsprach den Daten zur Bindung von PP1 und CGP76030 an Abl, nahmen die Mutationen an Position 380 zu S, C und T keinen Einfluss auf die Fähigkeit von PP1 und CGP76030 Hck zu inhibieren.

Zusammengefasst zeigten diese Daten, dass PP1 und CGP76030 sowohl Src-Kinasen als auch Bcr-Abl direkt über die Bindung in eine hydrophobe Tasche in Nachbarschaft zur ATP-Bindestelle inhibierten und dass sich die Bindungsmodi weitgehend überlappten. PP1 und CGP76030 sind daher als prototypische dual-spezifische Src-/Abl-Inhibitoren anzusehen.

3.5.3.3 Validierung der biologischen Potenz von PP1 und CGP76030 mit Hilfe Inhibitor-resistenter Mutanten

Im Abschnitt 3.5.3.1 waren Mutanten der „Gatekeeper“-Positionen 315 und 380 sowie die A-Loop-destabilisierende Mutante D276S/E279S verwendet worden, um PP1 und CGP76030 als direkte Inhibitoren von Abl zu identifizieren und um ihren Bindungsmodus, insbesondere im Vergleich zu STI571, zu beleuchten. Die Mutation einer Aminosäureposition, die entscheidend die Bindung eines Inhibitors beeinflusst, kann aber auch nützlich sein, um die biologische Potenz von Inhibitoren und deren Zielstruktur-Spezifität in-vivo zu untersuchen.

Initiale Untersuchungen zur biologischen Wirkung von PP1 und CGP76030 hatten gezeigt, dass beide Inhibitoren in der Lage sind Proliferationsarrest und Zelltod in Bcr-Abl-positiven Zellen zu induzieren (Warmuth et al., 2002). Im folgenden Abschnitt sollten PP1- und CGP76030-resistente Mutanten von Bcr-Abl verwendet werden, um den relativen Beitrag der Inhibition von Bcr-Abl versus Src-Kinasen zum biologischen Effekt der beiden Substanzen zu beurteilen.

Zu diesem Zweck wurden die oben beschriebenen Mutanten der „Gatekeeper“-Positionen 315 und 380 in den hämatopoetischen Zelllinien 32D und BaF/B3 exprimiert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.5.3.1 führte die Inkubation von Zellen, die entweder Bcr-Ablwt oder die Mutanten T315V, A380C und A380T exprimierten, mit $50\mu\text{mol/l}$ PP1 oder $5\mu\text{mol/l}$ CGP76030 zu einem raschen Absterben der Zellen innerhalb von 48h (Warmuth et al., 2002; Abb. 7A und B). Dies entsprach der normalen Sensitivität dieser Mutanten gegenüber den beiden Inhibitoren. Aber auch bei Zellen, die PP1- und CGP76030 resistente Mutanten exprimierten, also beispielsweise die Mutanten T315L, T315I, T315M, T315Q und T315F, konnte ein erheblicher biologischer Effekt beobachtet werden. Dieser war vor allen mit CGP76030 sehr stark ausgeprägt und stand im Kontrast zur

kompletten Resistenz dieser Zellen gegenüber STI571. In wiederholten Experimenten führte CGP76030 sowohl zu einem kompletten Proliferationsarrest als auch zu apoptotischem Zelltod in 60 – 80% der Zellen (Warmuth et al., 2002; Abb.7A und B). Dies stand im Kontrast zu der bereits oben beschriebenen kompletten Resistenz dieser Mutanten gegenüber STI571. Kontrollexperimente zeigten, dass Wachstumsstopp und Zelltod induziert durch PP1 und CGP76030 nicht durch eine verbleibende Restsensitivität dieser Mutanten verursacht sein konnten: keiner der beiden Inhibitoren führte in Zellen, die eine PP1- oder CGP76030-resistente Mutante exprimierten, zu einer sichtbaren Reduktion der Aktivität von Bcr-Abl (gemessen mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers). Auch die Aktivität von STAT5 und JNK wurde nicht merklich beeinträchtigt (Warmuth et al., 2002; Abb.7D).

Im Gegensatz dazu führten beide Inhibitoren zu einer Dephosphorylierung von Src-Kinasen an Position Y416 (Warmuth et al., 2002; Abb.7C). Hierbei handelt es sich um ein autoregulatorisches Tyrosin im Bereich des A-Loops von Src-Kinasen, dessen Phosphorylierung essentiell ist für die katalytische Aktivierung der Kinasen. Entsprechend führt die Mutation von Y416 zu Phenylalanin zu einer kompletten Inaktivierung der Kinase, ähnlich wie sie auch durch die Zerstörung der ATP-Bindestelle erreicht wird (Warmuth et al., 1997). Der Status der Phosphorylierung von Y416 ist daher ein direktes Maß für die Aktivität von Src-Kinasen. Die Inaktivierung von Src-Kinasen durch PP1 und CGP76030 war unabhängig davon, ob in den Zellen Bcr-Ablwt oder eine PP1-/CGP76030-resistente Mutante, z.B. T315Q, exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu veränderte STI571 die Aktivität von Src-Kinasen nicht.

Zusätzlich führten PP1 und CGP76030 in Zellen, die eine Inhibitor-resistente Mutante exprimierten, zu einer Abnahme der Aktivität der Serin-/Threonin-Kinase Akt (Abb. 3.5.3). Dies konnte mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern für Akt und für das Akt-Substrat FKHRL belegt werden. Vergleiche der Aminosäuresequenzen von Src-Kinasen, Bcr-Abl und Akt bezüglich der PP1-/CGP76030-Bindetasche, schlossen eine direkte Inhibition von Akt durch PP1 oder CGP76030 aus. Dies galt auch für PDK1 und PDK2, also diejenigen Kinasen, welche die Phosphorylierung von Akt an T308 und S473 katalysieren. Entsprechend deutete diese Beobachtung auf eine Beteiligung von Src-Kinasen an der Aktivierung von Akt in Bcr-Abl-positiven Zellen hin. Umgekehrt führt aber auch STI571 zur Inhibition von Akt, ein Effekt der aufgehoben wurde, wenn eine STI571-resistente Mutante exprimiert wurde. Neben den Src-Kinasen scheint also auch Bcr-Abl selbst die Aktivität von Akt zu beeinflussen.

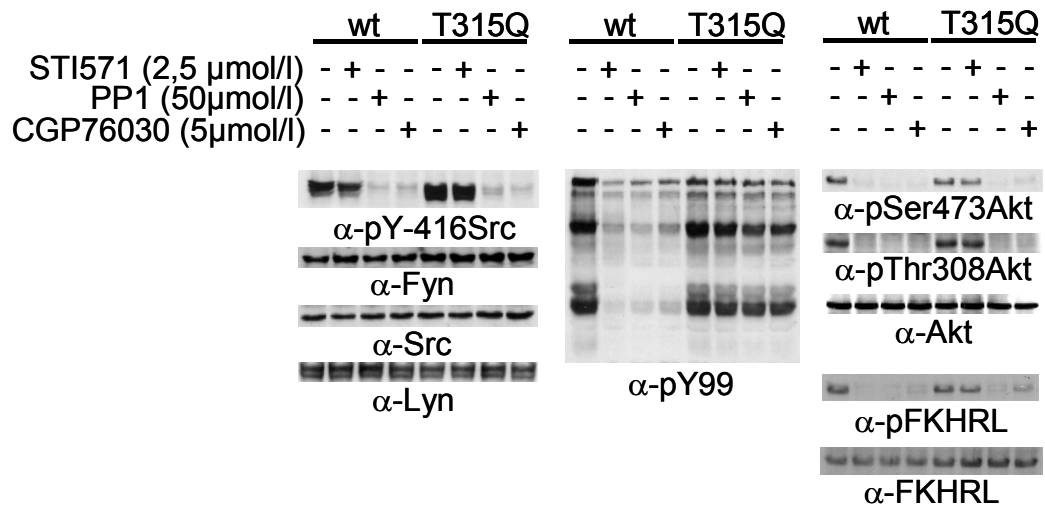


Abb. 3.5.3: PP1 und CGP76030 inhibieren den Akt-Signalweg – ein Abl-Inhibitions-unabhängiger Effekt. Um eine mögliche Auswirkung von PP1 und CGP76030 auf die Aktivität von Akt in Bcr-Abl-positiven 32D Zellen zu untersuchen, wurden 32D Zellen, die entweder Bcr-Abl wt oder aber eine inhibitor-resistente Mutante exprimierten, für 2h mit den angegebenen Konzentrationen von STI571, PP1 und CGP76030 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Aliquots der Lysate wurden mit den angegebenen Antikörpern untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl PP1 als auch CGP76030 die Aktivität von Akt, gemessen mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper, und die Phosphorylierung des Akt-Substrates FKHRL reduzierten. Dieser Effekt trat auch in denjenigen Zellen auf, die eine PP1-/CGP76030-resistente Bcr-Abl-Mutante exprimierten. Darüber hinaus führte auch STI571, jedoch Abl-Inhibitions-abhängig, zur Inaktivierung dieses Signalwegs.

4 Diskussion

Das Konzept der spezifischen Therapie maligner Erkrankungen durch Hemmung bedeutsamer Pathomechanismen hat durch die Erkenntnisse der molekularen Medizin und des humanen Genom-Projekts großen Vorschub erhalten. Die Philadelphia-positiven Leukämien sind ein Paradebeispiel hierfür. Verursacht durch eine reziproke Translokation, kommt es im Rahmen dieser Leukämien zur Bildung eines Fusionsproteins, das sich durch eine konstitutiv hohe Tyrosinkinase-Aktivität auszeichnet. Diese Kinase, Bcr-Abl, ist Zielstruktur („Target“) einer der ersten „maßgeschneiderten“ Anti-Tumor-Substanzen: STI571 (Druker und Lydon, 2000). Der Abl-spezifische Kinase-Inhibitor induziert bei Anwendung in der chronischen Phase bei nahezu 98% von Interferon-refraktären CML-Patienten eine hämatologische Remission, oftmals begleitet von einem kompletten Verschwinden der Philadelphia-Translokation aus dem Knochenmark (Druker et al., 2001b). Im Gegensatz dazu aber ist der therapeutische Erfolg bei Einsatz von STI571 als Monotherapie zur Behandlung der Blastenkrise oder der primären Ph-positiven B-ALL nur eingeschränkt. Hier führt STI571 zwar zu initialen Remissionen, diese sind aber nur von kurzer Dauer und es folgt ihnen ein letales Rezidiv (Druker et al., 2001a).

Ziel dieser Arbeit war es, neben Bcr-Abl weitere molekulare Angriffspunkte für die spezifische Therapie Ph-positiver Leukämien zu identifizieren.

4.1 Bcr-Abl aktiviert Mitglieder der Familie der Src-Kinasen in myeloischen und lymphatischen Zelllinien

Anfängliche Experimente dienten der Identifikation von Signalmolekülen, die durch Bcr-Abl in hämatopoetischen Zellen aktiviert wurden. Dies führte zur Charakterisierung von Src-Kinasen als potentielle Mediatoren Bcr-Abl-induzierter Signaltransduktions-Mechanismen: Bcr-Abl erhöhte in hämatopoetischen Zellen die Aktivität von Src-Familie-Tyrosinkinasen unabhängig von der Gegenwart von Wachstumsfaktoren, z.B. IL-3. Diese Aktivierung schien auf einer direkten, physikalischen Interaktion der beiden Protein(-Familien) zu beruhen.

Die Aktivierung von Src-Kinasen als einer der Mechanismen Bcr-Abl-induzierter Leukämogenese schien vor allem deswegen interessant, weil etliche Arbeiten eine Beteiligung dieser Kinasen an der Signaltransduktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren in normalen und leukämischen Zellen beschrieben hatten (Corey und Anderson, 1999). IL-6 beispielsweise, ein wesentlicher Wachstumsfaktor des Plasmozytoms, führt über seinen Rezeptor, gp130, zur Aktivierung

von Src-Kinasen (Hallek et al., 1997) und die Deletion der Src-Bindungsdomäne aus dem Rezeptor führte zu dessen funktioneller Inaktivierung hinsichtlich der Induktion von Proliferation in einer prä-B-Zelllinie, BaF/B3 (Schaeffer et al., 2001).

Eine Rolle verschiedener Src-Kinasen war aber auch für die Entstehung anderer maligner Erkrankungen diskutiert und beschrieben worden (Irby und Yeatman, 2000). Dies galt insbesondere für das Kolon-Karzinom. Die Progression vom Kolon-Adenom hin zum malignen, invasiven und metastasierenden Kolon-Karzinom ist mit einer stetigen Zunahme der Aktivität von c-Src verbunden. In einigen Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom wurde eine Mutation gefunden, die zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase durch Deletion des negativ-regulatorischen Tyrosin-Rests am C-Terminus der Kinase führte (Irby et al., 1999). Diese Patienten hatten eine offensichtlich schlechtere Prognose als Patienten einer Kontrollgruppe. Ein möglicher Mechanismus könnte dabei die Aktivierung des Promotors von Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) sein, ein Rezeptor, der wichtig für die Proteolyse extrazellulärer Matrix im Rahmen der Invasion und Metastasierung ist (Allgayer et al., 1999). Aber auch für das Mamma-Karzinom deuteten etliche Resultate auf eine Beteiligung von Src-Kinasen hin. Hier könnten sie vor allem in der Signaltransduktion wichtiger Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. EGF-Rezeptor und Her2/Neu-Rezeptor, eine Rolle spielen (Biscardi et al., 2000).

Außer für das Wachstum, die Migration und die Metastasierung von Tumorzellen scheinen Src-Kinasen aber auch für die Durchsetzung des Tumoraggregats mit Gefäßen (Tumorangiogenese) von essentieller Bedeutung zu sein (Eliceiri et al., 1999).

Die offensichtliche Beteiligung von Src-Kinasen an der Transformation hämatopoetischer Zellen und der Pathogenese solider Tumore führte zu der Entscheidung, ihre Rolle im Rahmen Bcr-Abl-positiver Leukämien näher zu beleuchten. Hierzu sollte zunächst der Interaktions- und Aktivierungsmechanismus von Bcr-Abl und Src-Kinasen untersucht werden.

4.2 Mechanismus der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl

4.2.1 Limitierende Faktoren bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Bcr-Abl und Src-Kinasen

Die Suche nach der Interaktionsstelle zwischen Bcr-Abl und Src-Kinase zeigte deutlich die Grenzen derartiger Experimente auf. Dies galt insbesondere für die als Teilprojekt dieses Arbeitsabschnitts durchgeführten „Pull-Down“-Assays unter Verwendung von aufgereinigten Proteinfragmenten bzw. -domänen. Die Herauslösung einzelner Strukturdomänen aus ihrem Kontext führt einerseits nicht selten zur Erzeugung artifizieller Bindestellen, die im Gesamtprotein sonst nicht zugänglich sind, andererseits werden Bindungsspezifitäten verändert, weil die Faltung isolierter Domänen nicht der dreidimensionalen Struktur der Domäne im Gesamtkontext des Proteins entspricht. Vergleicht man beispielsweise die Kristallstruktur der isolierten SH2- und SH3-Domänen von Src-Kinasen (Eck et al., 1994; Mikol et al., 1995; Musacchio et al., 1992; Noble et al., 1993; Waksman et al., 1992) mit der Konformation dieser Domänen in der Kristallstruktur des Gesamtproteins (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997), so ergeben sich erhebliche Unterschiede, auch im Bereich der Liganden-Bindestellen. Darüber hinaus sind in regulierten Src-Kinasen die Liganden-Bindestellen der SH3- und SH2-Domänen durch intramolekulare Bindungen blockiert, stehen also nicht ohne weiteres für Protein-Protein-Wechselwirkungen zur Verfügung. Die Generierung artifizieller Bindestellen könnte zumindest zum Teil die mögliche Komplexität der Ergebnisse zur Interaktion von Bcr-Abl mit Src-Kinasen erklären. Diese deuteten darauf hin, dass mehrere Strukturdomänen sowohl in Src-Kinasen wie auch in Bcr-Abl an der Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen beteiligt sind.

Darüber hinaus ist es aber auch denkbar, dass es tatsächlich verschiedene, möglicherweise funktionell unterschiedliche Interaktionsmodi gibt. So könnte beispielsweise die Interaktion der SH3-Domäne von Src-Kinasen mit Bcr-Abl Grundlage der Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl sein, während die Interaktion der SH2-Domäne mit Bcr-Abl wichtig ist, um Src-Kinasen auch nach ihrer Aktivierung an Bcr-Abl zu binden. Schließlich könnte die Summation der aktivierenden Wirkung verschiedener Bindestellen essentiell sein, um eine dauerhaft hohe Aktivität von Src-Kinasen in der Gegenwart von Bcr-Abl zu gewährleisten.

Unabhängig von der Validität der in diesem Abschnitt gefundenen komplexen Interaktion von Bcr-Abl mit Src-Kinasen, zeigten diese Ergebnisse, dass es nicht möglich sein wird, die „Src-Aktivierungs-Domäne“ in Bcr-Abl so eng einzugrenzen, dass Mutanten dieser Domäne für funktionell-biologische Untersuchungen zur Verfügung stehen würden. Beispielsweise besitzt Bcr-Abl weit über 20 PXXP-Motive, die als Interaktionsstelle für die SH3-Domäne der Src-Kinasen in Frage

kommen. Zur Untersuchung der Rolle von Src-Kinasen für die Transformation hämatopoetischer Zellen durch Bcr-Abl wurde daher im weiteren Verlauf auf ein Tiermodell basierend auf Src-Knockout-Mäusen ($Lyn^{-/-}Hck^{-/-}Fgr^{-/-}$; siehe Abschnitt 3.3) sowie auf Src- und Abl-Kinase-Inhibitoren (STI571, PP1, CGP76030; siehe Abschnitt 3.5) zurückgegriffen.

4.2.2 Die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl – ein Modell

Zwar gaben die in Abschnitt 3.2 dargestellten Untersuchungen keinen genauen Aufschluss über die Bindestelle zwischen Bcr-Abl und Src-Kinasen, dennoch erlaubten sie es, einen hypothetischen, mehrstufigen Aktivierungsmechanismus für Src-Kinase durch Bcr-Abl zu postulieren (Abb. 4.2.1).

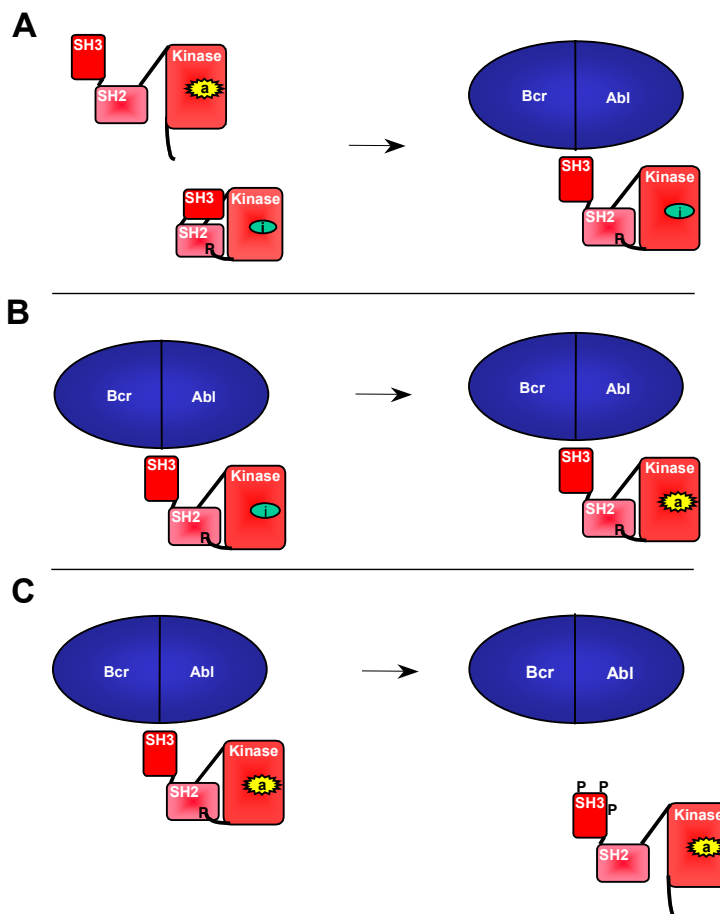


Abb. 4.2.1: Modell für die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl.

Zahlreiche Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Bcr-Abl bevorzugt an inaktive, bzw. dephosphorylierte Src-Kinase-Moleküle bindet. So führte die Dephosphorylierung von Src-Kinasen vor der Kopräzipitation zu einer deutlichen Zunahme der Komplexbildung mit Bcr-Abl. Diese

Interaktion wird mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die SH3-Domäne vermittelt. Interessanterweise liegt die SH3-Domäne von Src-Kinasen normalerweise in einem intramolekularen Komplex mit einer polyprolin-artigen Helix im Bereich des SH2-Kinase-Linkers vor (Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997). Die Bindung der SH3-Domäne inaktiver Src-Kinasen an Bcr-Abl würde folglich zu einer Störung dieses intramolekularen Komplexes führen und somit die Aktivität der an Bcr-Abl gebundenen Src-Kinasen durch Konformationsänderungen des SH2-Kinase-Linkers und der Kinase-Domäne erhöhen. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die Aktivierung von Hck durch das Nef-Protein des HI-Virus gezeigt werden (Moarefi et al., 1997). In der Folge verlieren die aktivierten Src-Kinase Moleküle einen Teil ihrer Affinität für Bcr-Abl. Dies könnte durch strukturelle Veränderungen der Kinase-Domäne selbst, aber auch durch die (Auto-)Phosphorylierung von Tyrosin-Resten im Bereich der Liganden-Bindestelle der SH3-Domäne von Src-Kinasen verursacht sein. Unabhängig vom genauen Mechanismus sind nun die so aktivierten und von Bcr-Abl dissoziierten Src-Kinasen „frei“ verfügbar, um ihre spezifischen Substrate zu phosphorylieren und dadurch entsprechende Signalmechanismen in Gang zu setzen.

4.3 Essentielle Bedeutung der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr in einem Tiermodell für die Philadelphia-(Bcr-Abl)-positive B-ALL

Um Aufschluss über die Relevanz der Interaktion zwischen Src-Kinasen und Bcr-Abl für die Pathogenese Bcr-Abl-positiver Leukämien zu erhalten, sollte der Einfluss dieser Kinasen auf die Induktion einer Bcr-Abl-positiven myeloproliferativen Erkrankung (MPE) bzw. einer B-ALL im retroviralen Knochenmarks-Transduktions-/Transplantations-Modell untersucht werden. Die dabei gewonnenen Daten deuteten auf eine essentielle Rolle der Src-Kinasen Lyn, Hck und Fgr in der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der Bcr-Abl-positiven B-ALL hin. Im Rahmen der Bcr-Abl-positiven MPE spielten sie hingegen keine offensichtlich Rolle.

CML und B-ALL unterscheiden sich erheblich in ihrer Biologie. Obwohl das in Mäusen durch retrovirale Infektion von Knochenmark induzierbare CML-artige Krankheitsbild sehr rasch verläuft und innerhalb weniger Wochen zum Tode führt, ist der biologische Phänotyp eher benigne, d.h. die Zellen zeigen eine praktisch normale Ausdifferenzierung zu neutrophilen Granulozyten und sie haben eine weitgehend normale Funktion. Ihre Produktion scheint weiterhin durch wachstums- und differenzierungsregulierende Zytokine mitbeeinflusst. Lediglich ihre Anzahl ist erhöht, und dies könnte auf eine erhöhte Neigung von mit Bcr-Abl transformierten Stammzellen zur Differenzierung in Richtung Granulopoese zurückzuführen sein (Era und Witte, 2000). Im Transduktions-/Transplantationsmodell verläuft die Erkrankung polyklonal, eine Beobachtung, die belegt, dass zur Etablierung dieser Erkrankung in Mäusen keine weiteren, sekundären oder gar tertiären Mutationen notwendig sind (Li et al., 1999).

Im Gegensatz dazu ist der Phänotyp der Bcr-Abl-positiven B-ALL als hochgradig maligne einzustufen. Die leukämischen Zellen bleiben auf dem Differenzierungsgrad lymphatischer B-Vorläuferzellen stehen und sind in-vitro zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation befähigt. Im Transduktions-/Transplantationsmodell verläuft die Erkrankung monoklonal, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit sind weitere, sekundäre und tertiäre genetische Veränderungen notwendig, um diesen Krankheitsphänotyp zu verursachen (Li et al., 1999). Hier könnte auch die Erklärung für die differentielle Rolle von Src-Kinasen für die Induktion einer CML versus B-ALL liegen. Es ist denkbar, dass Src-Kinasen Signalmechanismen und Gene regulieren, die erst nach funktionell-genetischer Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen zum tragen kommen. Hierfür spricht die Bedeutung von Src-Kinasen für das Überleben und Wachstum zahlreicher hämatopoetischer Zelllinien unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren (Corey und Anderson, 1999). Derartige Zelllinien tragen typischerweise Mutationen im Bereich des $p16^{\text{Ink4}}/19^{\text{Arf}}$ -Genlokus (Serrano, 2000; Sherr und Weber, 2000). Am Beispiel des PDGF-Rezeptors konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen an der Regulation

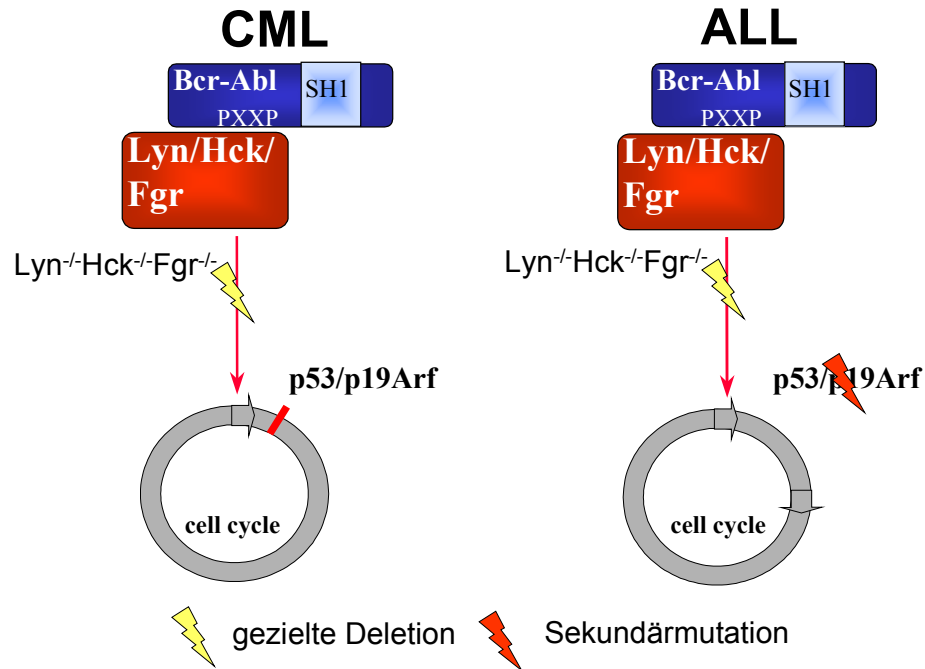


Abb. 4.3.1: Modell zur differentiellen Bedeutung von Lyn, Hck und Fgr für die Bcr-Abl-positive CML und B-ALL im Transduktions-/Transplantationsmodell. Die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl führt zur Aktivierung eines Signaltransduktionswegs, der durch Tumorsuppressorgene, beispielsweise p53 und p19^{Arf}, blockiert wird. Dementsprechend kommt das onkogene Potential der Src-Kinasen nur zur Geltung, wenn dieser „Schutzmechanismus“ durch sekundär genetische Veränderungen aufgehoben wird. Tatsächlich verläuft die Bcr-Abl-induzierte B-ALL monoklonal, d.h. es findet eine weitere genetische Selektion basierend auf Sekundärmutationen statt. Für die Induktion einer B-ALL ist die Aktivität von Src-Kinasen essentiell: die gezielte Ausschaltung von Lyn, Hck und Fgr führt zu einem kompletten Defekt der Induktion dieses Krankheitsbildes im Transduktions-/Transplantationsmodell. Im Gegensatz dazu spielt der durch Src-Kinasen aktivierte Signaltransduktionsweg keine Rolle bei der Entstehung der Bcr-Abl-positiven CML. Diese Erkrankung verläuft in der Regel oligoklonal, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit treten keine weiteren Sekundärmutationen auf.

des Transkriptionsfaktors c-Myc während der Proliferation von Fibroblasten beteiligt sind (Barone und Courtneidge, 1995; Chiariello et al., 2001). c-Myc fördert das Überleben und Wachstum von Zellen verschiedenster Gewebe, kann aber auch Apoptose induzieren. Die Entscheidung für Überleben und gegen Apoptose hängt u.a. von der Funktionalität des p53-p19^{Arf}-Signalwegs ab (Eischen et al., 1999; Zindy et al., 1998). Entsprechend findet man in einem Tiermodell bei der Mehrzahl c-Myc-induzierter Lymphome eine Inaktivierung dieses Signalwegs (Eischen et al., 1999). Möglicherweise wird auch die transformationsfördernde Wirkung von Src-Kinasen erst durch solche Sekundärmutationen freigesetzt, und dies könnte erklären warum Src-Kinasen im Rahmen des myeloproliferativen Krankheitsyndroms keine Bedeutung zukommt (Abb. 4.3.1A). In diesem Fall

würden die im Abschnitt 3.3 gefundenen Ergebnisse den Unterschied „chronische“ versus „akute“ Leukämie reflektieren.

Tatsächlich deuten zahlreiche Publikationen darauf hin, dass p19^{Arf} auch im Rahmen der B-Zell-Transformation durch onkogene Abl-Proteine inaktiviert wird. Dies gilt zumindest für die durch v-Abl verursachte Leukämie in Mäusen. Ähnlich wie Myc oder Ras führt auch Abl in infizierten Zellen zu einer apoptotischen Krise, die durch p53 und p19^{Arf} vermittelt wird (Radfar et al., 1998; Unnikrishnan et al., 1999). Entsprechend fördert der Verlust der Heterozygotie für p19^{Arf} die Transformation von prä-B-Zellen, eine Beobachtung, die erahnen lässt, dass es im Rahmen der Transformation von prä-B-Zellen durch Abl-Onkogene zu einem Verlust dieses Tumorsuppressors kommt (Mostecky et al., 2000).

Die offensichtliche Regulation von Akt durch Src-Kinasen im Rahmen der Bcr-Abl-abhängigen Transformation könnte ein mögliches Bindeglied zwischen dem Verlust von p19^{Arf} und einer funktionell-biologischen Aktivierung von Src-Kinasen in Bcr-Abl-positiven B-ALL sein. Zhou und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass Akt wesentlich an der Regulation von p53 beteiligt ist, indem es MDM2 phosphoryliert und so den Abbau von p53 durch Ubiquitinierung beschleunigt (Zhou et al., 2001). p19^{Arf} ist hierbei der wesentliche Gegenspieler. Es bindet MDM2 kompetitiv und führt so zu dessen funktioneller Inaktivierung.

Neben dieser gibt es aber auch noch andere Erklärungen für die unterschiedliche Bedeutung von Lyn, Hck und Fgr für die Entstehung einer CML versus B-ALL im Transduktions-/Transplantationsmodell. Die verschiedenen Mitglieder der Familie der Src-Kinasen werden differenziell in verschiedenen Geweben exprimiert. Es ist denkbar, dass in den Ursprungszellen der myeloproliferativen Erkrankung, möglicherweise einer frühen hämatopoetischen Stammzelle, nicht Lyn, Hck und Fgr, sondern andere Src-Kinasen, nicht zuletzt c-Src selbst, exprimiert werden. Die in den beschriebenen Experimenten verwendete Kombination von Lyn, Hck und Fgr wäre demnach ungeeignet gewesen, um eine Beteiligung von Src-Kinasen an der „Transformation“ der Ursprungszelle der CML-artigen Erkrankung durch Bcr-Abl zu untersuchen. Zukünftige Experimente sollten daher darauf abzielen, Src-Kinase-Expressionsprofile für die verschiedenen Ursprungszellen der Bcr-Abl-positiven Leukämien nach durchflusszytometrischer Zellsortierung zu erstellen. Darüber hinaus könnten die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente mit verschiedenen anderen Src-Kinase-Knockout Linien wiederholt werden. Dennoch bleibt festzuhalten, dass Lyn, Hck und Fgr die dominanten Src-Kinasen in reifen Granulozyten und Makrophagen sind. Für das Überleben und Wachstum dieser Zellen im Rahmen der myeloproliferativen Erkrankung scheinen sie basierend auf den hier dargestellten Versuchsergebnissen nicht von Bedeutung zu sein.

Unabhängig von diesen Gesichtspunkten, verleihen die im Transduktions-/Transplantationsmodell gewonnenen Daten den Ergebnissen aus den Abschnitten 3.1 und 3.2 zur physikalischen und funktionellen Interaktion von Bcr-Abl mit Src-Kinasen eine hohe biologische Relevanz. Substanzen, welche die Aktivierung von Src-Kinasen durchbrechen, sind aufgrund dieser Resultate potentielle Medikamente für die Behandlung insbesondere der Bcr-Abl-positiven B-ALL.

4.4 Genetische Untersuchung des Bindungsmechanismus des Abl-spezifischen Kinase-Inhibitors STI571

Der klinische Erfolg des ATP-kompetitiven Abl-Kinase-Inhibitors STI571 hatte erstmals belegt, dass die spezifische, nebenwirkungsarme Inhibition von Tyrosinkinase zu therapeutischen Zwecken mit Hilfe niedermolekularer Substanzen möglich ist. Mit Hilfe gerichteter Mutagenese sollten der Bindungsmodus von STI571 untersucht und die molekularen Grundlagen seiner Spezifität erarbeitet werden. Ausgangsbasis hierfür war eine Kristallstrukturanalyse von Abl im Komplex mit einer synthetischen Vorstufe von STI571 (Schindler et al., 1999). Die dabei gewonnenen Daten trugen erheblich zum Verständnis des Mechanismus der Bindung von STI571 an Abl bei. Es wurden drei molekulare „Gatekeeper“-Positionen, Position 315, 380 und 382 identifiziert, die über die Bindung von STI571 an einzelne Proteinkinase entscheiden, indem sie kritisch den Zugang zu einer hydrophoben STI571-Bindetasche im Kern der Kinase beschränken. Aufgrund der Besetzung von Position 315 und 380 mit Threonin und Alanin und als Folge der relativ seltenen Konformation von F382 in Abl (verglichen mit Src-Kinasen, FGF-Rezeptor-Tyrosinkinase, EphB2, etc.) ist der Zugang zur STI571-Bindetasche in Abl größer als in vielen anderen Kinasen. In mehr als 98% aller anderen Tyrosinkinase befindet sich an den Position 315 bzw. 380 eine Aminosäure mit einer längeren oder „sperrigeren“ Seitenkette. Darüber hinaus liegt in inaktivem Abl ein hochkonserviertes Phenylalanin an Position 382 in einer Orientierung vor, die den Zugang zur STI571 Bindetasche zusätzlich erhöht. Diese Konformation wird in den aktiven und inaktiven Strukturen anderer Kinasen nicht gefunden. STI571 macht von dieser Tatsache Gebrauch, indem es den Eingang zu seiner Bindetasche optimal ausfüllt. Schon eine geringfügige, experimentell-genetische Einschränkung des Tascheneingangs, z.B. durch Verlängerung der Aminosäure-Seitenkette an Position 315 oder 380 um einen Kohlenstoff-Körper, führte zu einer Resistenz von Bcr-Abl gegenüber STI571.

4.4.1 STI571 - ein „Kinase-Reaktivierungs“-Inhibitor, aber kein Kinase-Inhibitor

Im Rahmen der genetischen Analyse des Bindungsverhaltens von STI571 konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von D276 und E279 jeweils zu Serin die Sensitivität von Bcr-Abl gegenüber STI571 signifikant erniedrigte. Diese Mutation führte, basierend auf strukturellen Überlegungen, zu einer Destabilisierung der inaktiven Konformation der katalytischen Schleife (A-Loop) der Kinase-Domäne, so dass es zu einer Verschiebung des Äquilibriums zwischen den verschiedenen katalytischen Zuständen hin zu transaktivem und aktivem Abl kam. Die inaktive Konformation von Abl wurde also „unwahrscheinlicher“.

Diese Daten belegten eine Hypothese, die ursprünglich von Schindler und Kollegen aufgestellt worden war: STI571 kann Abl nur dann binden, wenn dieses zuvor seine inaktive Konformation angenommen hat, d.h. endogen inaktiviert wurde (Schindler et al., 2000). Basis dieses Bindungsprinzips, das bisher einzigartig unter Tyrosinkinase-Inhibitoren ist, ist die unterschiedliche Konformation des A-Loops von Abl im aktiven und inaktiven Zustand, verbunden mit einer um 180° unterschiedlichen Orientierung des Aminosäurerests F382. Der Einfluss einer Konformationsänderung des A-Loops auf die Orientierung von F382 konnte in Abschnitt 3.4.3.2 durch den Vergleich der Struktur von aktiver und inaktiver Insulin-Rezeptor-Kinase (IRK) belegt werden. Hier führt die Inaktivierung der Kinase nicht nur zu einer erheblichen Veränderung der dreidimensionalen Struktur des A-Loops, sondern auch zu einer Reorientierung von F382 (F1151 bezogen auf die Position in IRK): während F382 im aktiven Zustand von der ATP-Bindestelle weg zeigt, richtet es sich nach Inaktivierung der Kinase und Rekonformation des A-Loops zur ATP-Bindestelle hin aus. Entsprechend ergab sich für F382 in einer berechneten dreidimensionalen Struktur von Abl, basierend auf der aktiven Struktur von IRK und anderen Kinasen, eine Position, welche die Bindung von STI571 blockierte.

Die Annahme, dass STI571 nur in die bereits inaktivierte Konformation von Abl bindet, erschien zunächst widersprüchlich und wurde kontrovers diskutiert. Das Grundprinzip der transformierenden Aktivität von Bcr-Abl ist die konstitutive Aktivierung seiner Tyrosinkinase-Domäne. Wie also konnte STI571 eine solch hohe biochemische und klinische Potenz haben, wenn es nur inaktives Abl band? Eine Lösung hierfür bietet das in Abbildung 4.4.1 dargestellte Modell. Basierend auf Kenntnissen zur Regulation von Tyrosinkinasen, kann Abl in verschiedenen katalytischen Zuständen vorliegen. Inaktives Abl (3) wird zunächst durch Konformationsänderungen im Bereich des A-Loops transaktiviert (2). Diese Transaktivierung wird anschließend durch Phosphorylierung autoregulatorischer Tyrosine, z.B. Y245 und Y393, stabilisiert (1) (Brasher und Van Etten, 2000). Dieser Vorgang ist reversibel, nicht zuletzt bedingt durch die Aktivität zell-endogener Phosphotyrosin-Phosphatasen. Das Gleichgewicht zwischen den einzelnen katalytischen Zuständen wird durch verschiedenste Faktoren beeinflusst, z.B. durch die Expression endogener Abl-Inhibitoren wie PAG/Msp23 oder durch die Phosphorylierung von Y393 durch andere Tyrosinkinasen als Folge der Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren (Plattner et al., 1999; Wen und Van Etten, 1997). In Bcr-Abl verschiebt die Fusion von Abl mit Bcr das Gleichgewicht dieser „Reaktion“ in Richtung des aktiven, phosphorylierten Abl. Dennoch wird die Faltung in den inaktiven Zustand nicht komplett aufgehoben, nicht zuletzt deswegen, weil der A-Loop seine normale Flexibilität behält. STI571 bindet nun in die inaktive Konformation. Es legt sich wie ein Keil in die Kinase und verhindert so eine Reaktivierung der gebundenen Abl-Moleküle (4). Nach und nach werden damit alle Abl-Moleküle im

inaktiven Zustand „eingefroren“, bis letztlich das Gleichgewicht komplett auf die Seite des inaktiven, STI571-gebundenen Abl verschoben worden ist.

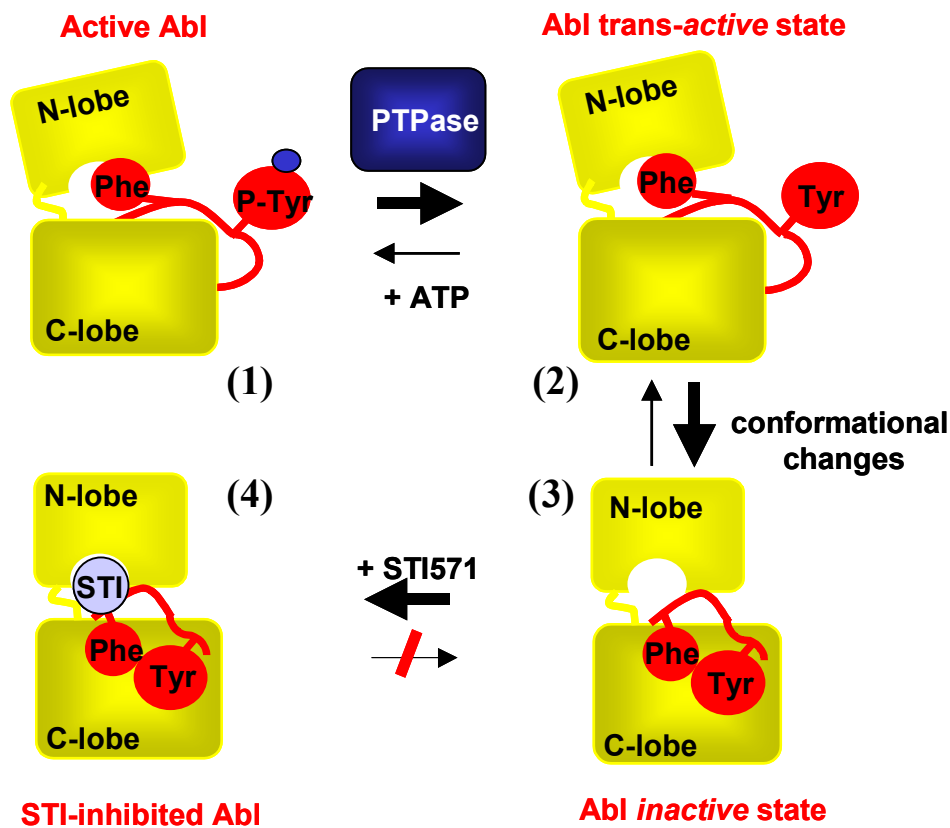


Abb.4.4.1: Modell für die Inaktivierung von Abl durch STI571.

Behindert man aber nun die endogene Inaktivierung von Abl, beispielsweise durch Mutationen die *direkt* die Flexibilität des A-Loops erniedrigen und die aktive Konformation begünstigen, so kann zumindest ein Teil der Abl-Moleküle nicht mehr die inaktive Struktur annehmen und es entwickelt sich eine partielle Resistenz von Abl gegenüber STI571. Dies entspricht dem Wirkmechanismus der Mutation D276S/E279S. Diese Mutation durchbricht die Bindung eines im A-Loop enthaltenen Arginins (R386) über Wasserstoffbrücken an den sogenannten β 3- α C-Loop. Neben dieser gibt es letztlich aber noch weitere intramolekulare Bindungen, welche die inaktive Konformation des A-Loops induzieren bzw. stabilisieren. Um obige Hypothese weiter zu belegen, sollten daher in Zukunft mehrere „A-Loop-destabilisierende“ Mutationen kombiniert und auf einen kooperativen Effekt hin untersucht werden.

4.4.2 Kann ein Medikament zu spezifisch sein? – mögliche, klinische Auswirkungen der optimalen Bindung von STI571

Wie bereits erwähnt, erklärt sich die hohe Spezifität von STI571 für Abl aus der nahezu perfekten Bindung von STI571 in eine Tasche, die benachbart zur ATP-Bindestelle ist. Der Eingang zu dieser Tasche ist in Abl größer als in den meisten anderen Proteinkinasen, und STI571 füllt diesen Eingangsbereich optimal aus. Schon die Verlängerung von T315 um einen C-Körper, beispielsweise durch Mutation zu Leucin, schränkt den Zugang soweit ein, dass eine Bindung von STI571 unmöglich wird.

Die optimale „Passform“ von STI571 scheint aber nicht nur Vorteile zu haben. Bereits in Phase-I-Studien war es bei Patienten mit Blastenkrise oder mit primärer Ph-positiver B-ALL trotz initialem, klinischem Ansprechen auf STI571 zur Entwicklung von STI571-Resistenzen gekommen. Gorre und Kollegen, konnten zeigen, dass etliche STI571-resistenten Patienten zumindest in Subklonen ihrer leukämischen Zellen eine Mutation von Bcr-Abl an Position 315 zu Isoleucin (T315I) trugen (Gorre et al., 2001). Die in dieser Arbeit dargestellten Experimente belegten die Relevanz dieser Mutation für die Entwicklung einer klinischen STI571-Resistenz. Weder 32D- noch BaF/B3-Zellen, die diese Mutante exprimierten, konnten durch STI571 im Konzentrationsbereich bis 2,5 µmol/l abgetötet werden. Diese Konzentration entspricht dem Plasmakonzentrationsbereich nach Verabreichung von 400 – 1000g STI571 pro Tag. Neben T315I konnten in dieser Arbeit aber auch noch weitere Mutationen beschrieben werden, die eine biochemische und zelluläre Resistenz gegenüber STI571 verursachten, ohne die transformierende Potenz von Bcr-Abl aufzuheben. Entsprechend dürfte in Zukunft auch in Patientenmaterial mit der Entdeckung weiterer, Resistenz-induzierender Mutationen zu rechnen sein.

4.5 Strukturbasierte Selektion und Validierung der dualspezifischen Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren PP1 und CGP76030

4.5.1 Potentielle Bedeutung Inhibitor-resistenter Mutanten für die Selektion und Validierung niedermolekularer Kinase-Inhibitoren

Im Rahmen der Experimente zur Interaktion von STI571 mit Abl wurde relativ rasch klar, dass die Mutation von Aminosäuren, die essentiell sind für die Interaktion einer Kinase mit niedermolekularen Inhibitoren, nicht nur hilft die Interaktion eines Inhibitors mit seinem „Target“ zu verstehen, sondern ganz allgemein und in entwicklungstechnischen Schritten zur Selektion, Optimierung und Validierung solcher Substanzen beitragen kann.

Beispielsweise könnten in Kinasen (oder anderen Enzymen) basierend auf Kristallstrukturanalysen und Aminosäurevergleichen Bereiche identifiziert werden, die relativ einzigartig für eine bestimmte Proteinkinase sind. Hierbei könnte es sich um molekulare Taschen oder aber auch nur um einzelne Aminosäurereste handeln. Solche Bereiche würden der Interaktion einer Kinase mit einem Inhibitor eine hohe Spezifität verleihen. Die hydrophobe Tasche im Kern der Abl-Kinase ist eine solche „Spezifitätsdeterminante“. Sie findet sich in dieser sehr offenen Form lediglich in Abl, sowie möglicherweise in Arg, PDGF-RTK und SCF-RTK, die jeweils ebenfalls durch STI571 inhibierbar sind. Mutanten, welche die Qualität solcher Spezifitätsdeterminanten graduell verändern oder sie gar komplett aufheben, könnten dann zur Selektion von Inhibitoren verwendet werden, die diesen Bereich zur Bindung benötigen. Die Abbildung 4.5.1 zeigt schematisch den Ablauf eines solchen Selektionsverfahrens. Dabei werden solche Substanzen als Inhibitoren selektiert, die zwar den Wildtyp einer Kinase inhibieren, nicht aber die Mutante. Die in den Abschnitt 3.4 und 3.5 dargestellten Untersuchungen bestätigten die Durchführbarkeit dieses Verfahrens. Die Spezifitätsdeterminante „hydrophobe Bindungstasche in Nachbarschaft zur ATP-Bindestelle“ wurde hier graduell durch Verlängerung der Aminosäureseitenkette an der Position 315 oder 380 unnutzbar gemacht, die Zugänglichkeit ferner durch die Mutation D276S/E279S funktionell eingeschränkt. Die Verlängerung oder sterische Vergrößerung der Aminosäurekette an Position 315 führte zu einer Resistenz von Bcr-Abl gegenüber drei niedermolekularen Inhibitoren: STI571, PP1 und CGP76030. Bei Anwendung in oben genanntem Selektionsverfahren wären sie also als „Taschenbinder“ identifiziert worden. Im Gegensatz dazu bewirkten Mutationen an Position 380 zu Threonin sowie an Position 276 und 279 zu Serin zwar eine partielle oder komplette Resistenz gegenüber STI571, nicht aber gegenüber PP1 und CGP76030. Im Unterschied zu STI571 erkennen also weder PP1 noch CGP76030 die Positionen 380 und 382 als „Spezifitätsdeterminanten“, d.h. weder PP1 noch CGP76030 füllen den Eingang zur hydrophoben Inhibitor-Bindetasche mit gleicher Perfektion aus wie STI571. Dies lässt auf eine insgesamt geringere

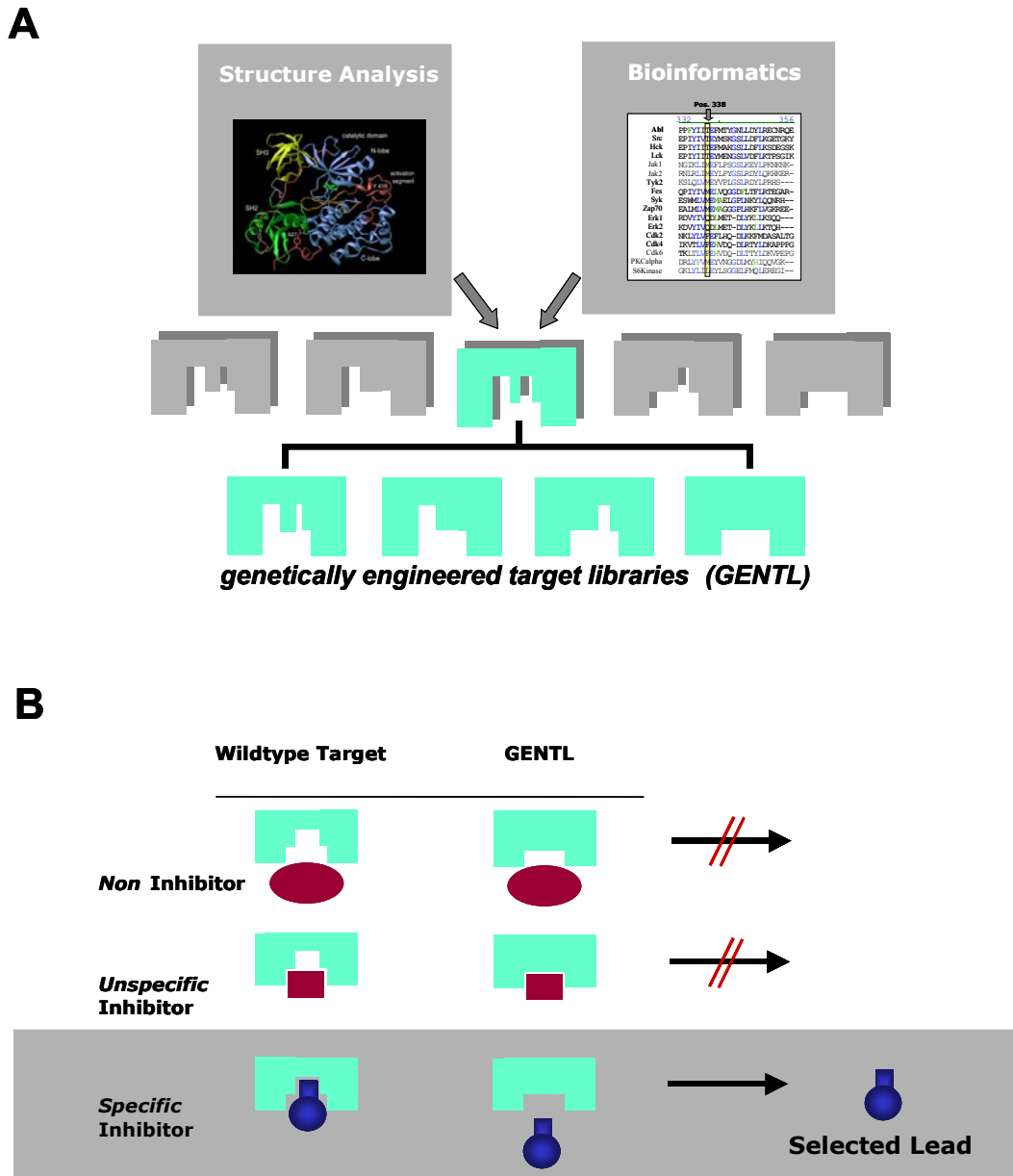


Abb. 4.5.1: Schematische Darstellung der Selektion von spezifischen Inhibitoren mit Hilfe von Mutanten eines Enzyms. (A) Zunächst wird mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen und Aminosäure-Sequenzvergleichen eine Inhibitor-Bindestelle mit hohem Spezifitätspotential (Spezifitätsdeterminante) identifiziert. Diese wird durch gerichtete Mutation graduell verändert oder komplett aufgehoben. (B) Anschließend werden mit Hilfe dieser Mutanten Substanzen selektiert, die ihre inhibitorische Wirkung durch Bindung an die postulierte Spezifitätsdeterminante entwickeln, die also Mutanten der Spezifitätsdeterminante nicht mehr binden. Idealerweise werden diejenigen Substanzen selektiert, bei denen schon geringfügige Veränderungen der Inhibitor-Bindestelle zu einer Resistenz der Mutante gegenüber der Substanz führen, also beispielsweise Mutanten, die eine Inhibitor-Bindestelle möglichst optimal ausfüllen.

Spezifität dieser Inhibitoren schließen, eine Annahme, die den publizierten Inhibitions-Profilen entspricht (Hanke et al., 1996; Missbach et al., 1999). Bei Anwendung im oben postulierten Selektionsverfahren hätten die verschiedenen Mutanten also zur Selektion von STI571 gegenüber PP1 und CGP76030 als dem Abl-Inhibitor mit der größten Spezifität geführt.

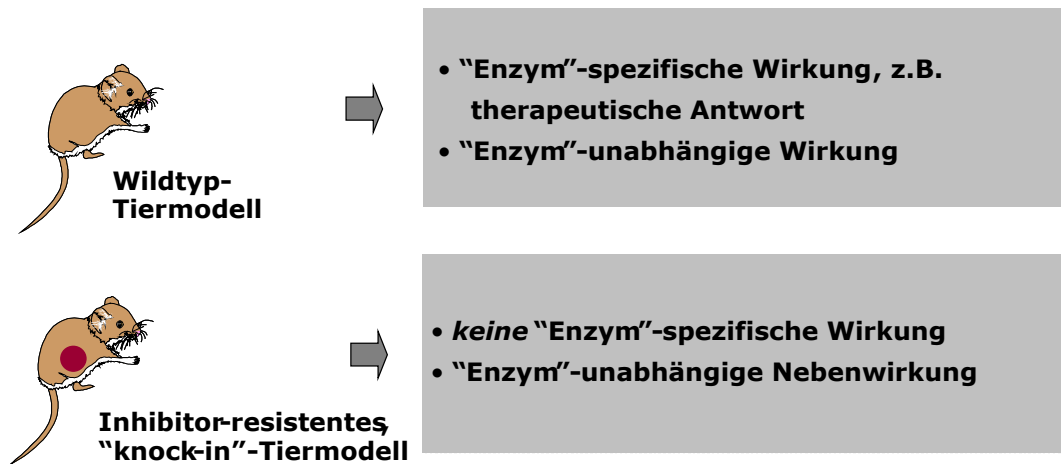


Abb. 4.5.2: Validierung „Enzym“-spezifischer und „Enzym“-unabhängiger Wirkungen eines Inhibitors mit Hilfe inhibitor-resistenter Mutanten. Um die „Enzym“-Spezifität eines Inhibitors zu untersuchen, erfolgt eine Validierung der biologischen Effekte mit Hilfe einer inhibitor-resistenten Mutante. Diese hebt die „Enzym“-spezifischen Wirkungen einer Substanz auf, nicht aber diejenigen Effekte, die durch Kreuzreaktionen mit anderen Zielstrukturen zustande kommen.

Schließlich bildet obiges Selektionsverfahren aber auch die Grundlage für die Identifikation „Inhibitor-resistenter“ Mutanten einer Kinase. Diese können eingesetzt werden, um in biologisch relevanten Systemen die „Target“- oder „Enzym“-Spezifität einer Substanz bzw. seiner Wirkungen zu testen (Abb.4.5.2). Auch dieses Verfahren soll hier in Kürze und auf allgemeiner Basis dargestellt werden. Führt eine Substanz in einem biologischen System zu einer Wirkung, so kann diese entweder über ihr eigentliches „Target“ oder aber über die Interaktion mit einer zuvor nicht bekannten oder nicht bedachten Zielstruktur (z.B. einer kreuzinhibierbaren Kinase) zustande kommen. Inhibitor-resistente Mutanten können zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden, da sie die „Target“-abhängigen Wirkungen aufheben, die „Target“-unabhängigen Wirkungen aber bestehen bleiben. Gemäß den Ergebnissen aus den Abschnitten 3.4 und 3.5 wären demnach die Wirkungen „Proliferationsarrest“ und „Zelltod“ induziert durch STI571 bei Konzentrationen bis zu 2,5 µmol/l „Target“-spezifische Wirkungen. Sie treten zwar bei Expression von Bcr-Ablwt nicht aber bei Expression einer Inhibitor-resistenten Mutante auf. Im Gegensatz dazu sind die Wirkungen „Proliferationsarrest“ und „Zelltod“ induziert durch PP1 und CGP76030 zumindest zum Teil

„Target“-unabhängig, d.h. sie treten auch dann auf, wenn PP1- bzw. CGP76030 resistente Mutanten von Bcr-Abl exprimiert werden. Dies belegt, dass sowohl PP1 als auch CGP76030 in hämatopoetischen Zellen zusätzlich zu Abl noch weitere biologisch relevante Signalmoleküle, möglicherweise Kinasen, inhibieren. Diese biologische „Unspezifität“ korrelierte mit der oben diskutierten reduzierten Passgenauigkeit in die Inhibitor-Bindetasche von Abl. Entsprechend hätte auch dieses Selektionsverfahren zur Identifikation von STI571 gegenüber PP1 und CGP76030 als dem Inhibitor mit der größten biochemischen und biologischen Spezifität für Abl geführt.

4.5.2 PP1 und CGP76030, prototypische dual-spezifische Src-/Abl-Kinase-Inhibitoren

Inhibitor-resistente Mutanten können nicht nur zur Selektion eines möglichst spezifischen Inhibitors beitragen, sondern auch zur Identifikation von Inhibitoren mit möglichst optimalem Wirkprofil.

Eine wesentliche Konsequenz der Fusion von Bcr und Abl im Rahmen der Philadelphia-Translokation ist die konstitutive Aktivierung der Abl-Tyrosinkinase. Eine Inaktivierung der Kinase, z.B. durch Mutation der ATP-Bindestelle, hebt die Fähigkeit von Bcr-Abl Leukämie im Transduktions-/Transplantationsmodell zu induzieren komplett auf (Zhang und Ren, 1998). Entsprechend sind viele der durch Bcr-Abl induzierten Signalmechanismen Abl-Kinase-abhängig und mit STI571 reversibel. Dies gilt beispielsweise wie, in den Abschnitten 3.4 und 3.5 beschrieben, für die Aktivierung bzw. Phosphorylierung von STAT5, JNK und Akt.

Die Aktivierung von Src-Kinasen durch Bcr-Abl steht im strikten Gegensatz zu diesen Beobachtungen: STI571 reduziert die Aktivität von Src-Kinasen weder direkt noch indirekt über eine Inhibition von Abl-Kinase. Diese Tatsache und die markante Rolle von Src-Kinasen für die Induktion einer Bcr-Abl-positiven B-ALL im Tiermodell führten zu der Annahme, dass eine zusätzliche Inhibition von Src-Kinasen den therapeutischen Effekt einer Abl-Inhibition verstärken könnte. Diese Hypothese gewann vor allem in Hinblick auf die beobachtete rasche Entwicklung von STI571-Resistenzen bei Patienten mit Blastenkrise und primärer Ph-positiver B-ALL an Attraktivität.

Die in Abschnitt 3.4 dargelegten Ergebnisse zum Bindungsmodus von STI571 hatten gezeigt, dass die hohe Spezifität dieses Inhibitors in erster Linie auf der Bindung in eine zur ATP-Bindestelle benachbarten Tasche beruhte. Interessanterweise besteht diese Tasche in fast identischer Form auch in Src-Kinasen. Lediglich das den Tascheneingang begrenzende Phenylalanin 405 (homolog zur Position 382 in Abl) befindet sich in aktiven wie in inaktiven Src-Kinasen in einer Orientierung, welche die Bindung von STI571 ausschließt. Es war daher anzunehmen, dass es möglich sein würde, Inhibitoren

zu synthetisieren, die mit überlappendem Bindungsmodus sowohl Abl als auch Src-Kinasen binden und blockieren können. Zwei Prototypen solcher Inhibitoren, PP1 und CGP76030, konnten im Rahmen dieser Arbeit selektiert und charakterisiert werden. In zellbasierten Untersuchungen führten sie sowohl zur Inhibition von Src-Kinasen als auch zur direkten Blockierung der Aktivität von Bcr-Abl. Dieser Effekt konnte jeweils durch Mutation der Position 315, nicht aber durch Mutation der Position 380, zu einer längeren oder sterisch aufwendigeren Aminosäure aufgehoben werden.

Die mögliche biologische Konsequenz der zusätzlichen Inhibition von Src-Kinasen durch PP1 und CGP76030 konnte unter Verwendung von Inhibitor-resistenten Mutanten definiert werden. Beide Substanzen führten zu einer kompletten Einschränkung des Zellwachstums und zur Induktion apoptotischen Zelltodes, ein Effekt der für CGP76030 ausgeprägter war als für PP1. Dies war nicht durch eine Restsensitivität der verschiedenen PP1-/CGP76030-resistenten Mutanten für die jeweiligen Inhibitoren erklärbar, korrelierte aber mit der zusätzlichen Inhibition von Src-Kinasen.

Interessanterweise bewirkten sowohl PP1 als auch CGP76030 eine Inaktivierung des Akt-Signalwegs. Dieser Signalweg wird in Bcr-Abl-positiven Zellen konstitutiv aktiviert und seine Aktivität reguliert über verschiedene Mechanismen sowohl das Wachstum als auch das Überleben transformierter Zellen (Datta et al., 1999). Keiner der beiden Inhibitoren ist in der Lage, Akt oder andere Kinasen, die diesen Signalweg steuern, direkt zu inhibieren. Dies deutete darauf hin, dass Akt in Bcr-Abl-positiven Zellen partiell Src-Kinase-abhängig reguliert wird. In der Tat, konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die Aktivität von Src-Kinasen notwendig ist, um Akt in Fibroblasten zu aktivieren, und die Expression von Akt in einer Src-Kinase-defizienten Zelllinie reduzierte dramatisch dessen Aktivität. Ursache hierfür ist möglicherweise die defiziente Phosphorylierung von Akt durch Src-Kinasen an Tyrosinen im Bereich des „A-Loops“ (Chen et al., 2001).

Aber auch die Inhibition von Abl selbst durch STI571 führte zu einer Abnahme der Akt-Aktivität, eine Beobachtung, die auf eine doppelte Kontrolle dieses Signalwegs hindeutete. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich folgendes Modell für die Aktivierung von Akt in Bcr-Abl-positiven Zellen (Abb. 4.5.3): Einerseits aktiviert Bcr-Abl klassisch und abhängig von der Intaktheit seiner Kinase den PI3K-Pathway, ein Effekt, der zur Phosphorylierung von Akt an T308 und S473 führt. Die Phosphorylierung von Akt an T308 und S473 ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivierung dieser Kinase. Sie wird bewerkstelligt durch PDK1 und PDK2, zwei Kinasen, die in Signalkaskaden unterhalb der Phosphatidylinositol-3-Kinase liegen (Datta et al., 1999). Dies allein reicht aber zur konstitutiven Aktivierung von Akt nicht aus. Eine Phosphorylierung von Akt an Tyrosin-Resten im Bereich des A-Loops, induziert durch Src-Kinasen, ist notwendig, um das transformationsfördernde Potential dieses Signalwegs freizusetzen. Die Aktivierung der Src-Kinasen erfolgt dabei, wie

mehrfach diskutiert, über einen Bcr-Abl-abhängigen, aber Abl-Kinase-unabhängigen Mechanismus. Die Inaktivierung des Akt-Signalwegs durch STI571 einerseits und durch Src-Kinase-Inhibitoren andererseits erklärt suffizient deren biologisches Wirkspektrum.

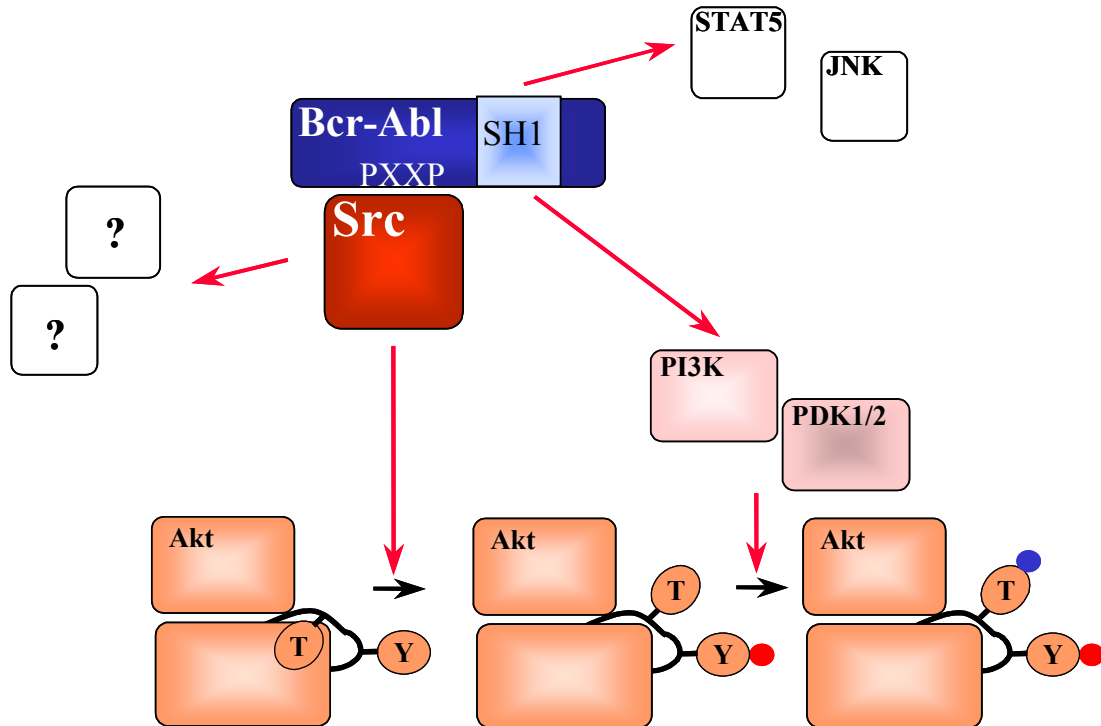


Abb. 4.5.3: Modell für die Aktivierung von Akt durch das Zusammenwirken von Bcr-Abl und Src-Kinasen. Bcr-Abl führt einerseits zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalwegs, andererseits – kinase-unabhängig – zur Aktivierung von Src-Kinasen. Diese phosphorylieren Tyrosinreste im Bereich des A-Loops von Akt, ein Voraussetzung für die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und Serin 473. Beide Phosphorylierungsreaktionen (pT308 und pS473) werden durch PDK1 (bzw. PDK2) katalysiert.

Unklar bleibt, warum die Abl-unabhängige proapoptotische Wirkung von PP1 weitaus geringer ausgeprägt ist als diejenige von CGP76030, und zwar auch dann, wenn Konzentrationen verwendet wurden, welche Src-Kinasen gleichmäßig und komplett inhibierten. Eine denkbare Erklärung ist, dass PP1 Kinasen kreuzinhibiert, die zur Exekution des apoptotischen Zelltodes unerlässlich sind. Eine solche Kinase ist beispielsweise p38^{MAPK} (Khaled et al., 2001), die in der Tat durch PP1 bei ähnlichen Konzentrationen wie Src-Kinasen, nicht aber durch CGP76030, inhibiert wird (Liu et al., 1999).

Zwar ist nicht auszuschließen, dass die im Arbeitsabschnitt 3.5 gefundenen Abl-unabhängigen Wirkungen von PP1 und CGP76030 durch die Inhibition anderer, möglicherweise unbekannter Kinasen, zustande kamen, dennoch sind diese Daten ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Src-Kinasen an der Transformation hämatopoetischer Zellen durch Bcr-Abl. Darüber hinaus stellen sie die therapeutische Verwendung dual-spezifischer Inhibitoren für Src-Kinasen und Abl auf eine rationale Basis. PP1 und CGP76030 sind Prototypen solcher Inhibitoren. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten könnten sie alternativ zu STI571 für die Therapie fortgeschrittener und aggressiver Formen Bcr-Abl-positiver Leukämien eingesetzt werden. Die zusätzliche Inhibition von Src-Kinasen könnte den therapeutischen Effekt einer reinen Abl-Inhibition sichern, da hierdurch das Wachstum und das Überleben leukämischer Zellen zusätzlich und Abl-Inhibitions-unabhängig reduziert wird. Die Selektion von Abl-Inhibitor-resistenten Zellklonen, beispielsweise basierend auf spezifischen Punktmutationen, wird dadurch verhindert. Darüber hinaus könnten diese Substanzen aber auch in der Therapie bereits STI571-resistenter Patienten Bedeutung erlangen.

Festzuhalten bleibt, dass PP1 und CGP76030 nur Prototypen dual-spezifischer Src-/Abl-Inhibitoren sind. Die in dieser Arbeit beschriebenen Tiermodelle sowie das unter 3.5 beschriebene und oben diskutierte Selektionssystem werden in Zukunft die Grundlage für die weitere Identifizierung und Optimierung derartiger Substanzen hin zu einem optimalen Wirkungsprofil bilden.

5 Zusammenfassung

Bcr-Abl, eine onkogene Tyrosinkinase, ist maßgeblich an der Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) sowie einem Teil der Fälle von akuter B-lymphoblastischer Leukämie (B-ALL) beteiligt. Die essentielle Rolle der Kinase-Aktivität von Bcr-Abl für dessen leukämogenes Potential konnte in zahlreichen Arbeiten demonstriert werden. Entsprechend ist Bcr-Abl Zielstruktur des ersten klinisch geprüften Tyrosinkinase-Inhibitors, STI571. STI571 führt bei Anwendung während der chronischen Phase der CML zu einer anhaltenden hämatologischen Remission, die nicht selten begleitet wird von einem kompletten Verschwinden Ph-positiver Zellen aus dem Knochenmark (zytogenetische Remission).

In dieser Arbeit konnten zusätzlich zu Bcr-Abl weitere, therapeutisch relevante Zielstrukturen für die Behandlung Bcr-Abl-positiver Leukämien identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um die Mitglieder der Familie der Src-Kinasen, die über einen komplexen Mechanismus, letztlich aber unabhängig von der Aktivität der Abl-Kinase, aktiviert werden (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2). Tierexperimente zeigten, dass diese Kinasen zumindest im Rahmen der Bcr-Abl-positiven B-ALL von essentieller Bedeutung sind (siehe Abschnitt 3.3). Diese Beobachtung war vor allem deswegen interessant, weil gerade die Bcr-Abl-positive B-ALL nur ein sehr schlechtes Ansprechen auf STI571 als Monotherapie zeigt und weil STI571 Src-Kinasen weder direkt noch indirekt über Bcr-Abl inhibierte. Durch Exploration des Bindungsmodus von STI571 konnte eine Bindetasche in Abl identifiziert werden, die Grundlage für die hohe Spezifität von STI571 ist (Abschnitt 3.4). Die dabei gewonnenen Daten wurden zur Etablierung eines Zellkultursystems genutzt, das die Selektion und Validierung einer neuen Substanzklasse, der dualspezifischen Src-/Abl-Inhibitoren, ermöglichte. PP1 und CGP76030 waren Prototypen derartiger Inhibitoren. Sie blockierten die Aktivität von Src-Kinasen und Abl über einen identischen Bindungsmechanismus. Experimente mit Bcr-Abl-positiven Zelllinien deuteten darauf hin, dass die alleinige oder additive Inhibition von Src-Kinasen durch diese Inhibitoren eine zusätzliche Option für die Therapie Bcr-Abl-positiver Leukämien darstellt (Abschnitt 3.5). Dies gilt insbesondere für Patienten mit fortgeschrittener Leukämie oder dann, wenn sich aufgrund spezifischer Punktmutationen eine Resistenz gegenüber STI571 ausgebildet hat. Derartige Substanzen sollten daher in naher Zukunft in Tiermodellen getestet werden.

6 Literaturverzeichnis

Abelson, H. T., und Rabstein, L. S. (1970). Lymphosarcoma: Virus induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* 30, 2213 - 2222.

Adrain, C., und Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390 - 397.

Afar, D. E., Goga, A., McLaughlin, J., Witte, O. N., und Sawyers, C. L. (1994). Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science* 264, 424 - 426.

Allgayer, H., Wang, H., Gallick, G. E., Crabtree, A., Mazar, A., Jones, T., Kraker, A. J., und Boyd, D. D. (1999). Transcriptional induction of the urokinase receptor gene by a constitutively active Src. Requirement of an upstream motif (-152/-135) bound with Sp1. *J Biol Chem* 274, 18428 - 18437.

Amarante-Mendes, G. P., McGahon, A. J., Nishioka, W. K., Afar, D. E., Witte, O. N., und Green, D. R. (1998a). Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with upregulation of Bcl-xL. *Oncogene* 16, 1383 - 1390.

Amarante-Mendes, G. P., Naekyung Kim, C., Liu, L., Huang, Y., Perkins, C. L., Green, D. R., und Bhalla, K. (1998b). 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.

Bagrodia, S., Taylor, S. J., und Shalloway, D. (1993). Myristylation is required for Tyr-527 dephosphorylation and activation of pp60^{c-src} in mitosis. *Mol Cell Biol* 13, 1464 - 1470.

Barila, D., und Superti-Furga, G. (1998). An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet* 18, 280 - 282.

Barone, M. V., und Courtneidge, S. A. (1995). Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. *Nature* 378, 509 - 512.

Bar-Sagi, D., und Hall, A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227 - 238.

Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., und Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74, 83 - 91.

Bedi, A., Zehnbauer, B. A., Barber, J. P., Sharkis, S. J., und Jones, R. J. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83, 2038 - 2044.

Bhatia, R., Munthe, H. A., Williams, A. D., Zhang, F., Forman, S. J., und Slovak, M. L. (2000). Chronic myelogenous leukemia primitive hematopoietic progenitors demonstrate increased sensitivity to growth factor-induced proliferation and maturation. *Exp Hematol* 28, 1401 - 1412.

Bhatia, R., und Verfaillie, C. M. (1998). The effect of interferon-alpha on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymph* 28, 241 - 254.

Biscardi, J. S., Ishizawar, R. C., Silva, C. M., und Parsons, S. J. (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2, 203 - 210.

Bjorge, J. D., Jakymiw, A., und Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 19, 5620 - 5635.

Blume-Jensen, P., und Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355 - 365.

Brasher, B. B., und Van Etten, R. A. (2000). c-Abl has high intrinsic tyrosine kinase activity that is stimulated by mutation of the Src homology 3 domain and by autophosphorylation at two distinct regulatory tyrosines. *J Biol Chem* 275, 35631-35637.

Brown, M. T., und Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121 - 149.

Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., und Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 139 - 145.

Carlesso, N., Griffin, J. D., und Druker, B. J. (1994). Use of a temperature-sensitive mutant to define the biological effects of the p210BCR-ABL tyrosine kinase on proliferation of a factor-dependent murine myeloid cell line. *Oncogene* 9, 149 - 156.

Carpenter, C. L., und Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153 - 158.

Chai, S. K., Nichols, G. L., und Rothman, P. (1997). Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 159, 4720 - 4728.

Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K. M., McCarthy, J., Chen, H., und Qiu, Y. (2001). Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 31858 - 31862.

Chiariello, M., Marinissen, M. J., und Gutkind, J. S. (2001). Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat Cell Biol* 3, 580 - 586.

Clift, R. A., und Storb, R. (1996). Marrow transplantation for CML: the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant* 17 Suppl 3, S 1 - 3.

Corey, S. J., und Anderson, S. M. (1999). Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* 93, 1 - 14.

Cortez, D., Kadlec, L., und Pendergast, A. M. (1995). Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 5531 - 5541.

Cortez, D., Reuther, G., und Pendergast, A. M. (1997). The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 2333 - 2342.

Cortez, D., Stoica, G., Pierce, J. H., und Pendergast, A. M. (1996). The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* 13, 2589 - 2594.

Cross, F. R., Garber, E. A., Pellman, D., und Hanafusa, H. (1984). A short sequence in the p60^{src} N terminus is required for p60^{src} myristylation and membrane association and for cell transformation. *Mol Cell Biol* 4, 1834 - 1842.

Dai, Z., Quackenbush, R. C., Courtney, K. D., Grove, M., Cortez, D., Reuther, G. W., und Pendergast, A. M. (1998). Oncogenic abl and src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a ras-independent pathway. *Genes Dev* 12, 1415 - 1424.

-
- Daley, G. Q., und Baltimore, D. (1988). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific p210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9312 - 9316.
- Daley, G. Q., McLaughlin, J., Witte, O. N., und Baltimore, D. (1987). The CML-specific p210^{bcr-abl} protein, unlike *v-abl*, does not transform NIH/3T3 fibroblasts. *Science* 237, 532 - 535.
- Daley, G. Q., Van Etten, R. A., und Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824 - 830.
- Datta, S. R., Brunet, A., und Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905 - 2927.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R., und Koenderman, L. (1999). STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94, 1108 - 1112.
- de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., und Koenderman, L. (2000). STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 3, 299 - 305.
- Deininger, M. W., Bose, S., Gora-Tybor, J., Yan, X. H., Goldman, J. M., und Melo, J. V. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res* 58, 421 - 425.
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., Lydon, N., und Melo, J. V. (1997). The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 90, 3691 - 3698.

Deininger, M. W., Goldman, J. M., und Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343 - 3356.

Druker, B. J., und Lydon, N. B. (2000). Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105, 3 - 7.

Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., und Talpaz, M. (2001a). Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344, 1038 - 1042.

Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., und Sawyers, C. L. (2001b). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344, 1031 - 1037.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., und Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561 - 566.

Eck, M. J., Atwell, S. K., Shoelson, S. E., und Harrison, S. C. (1994). Structure of the regulatory domains of the Src-family tyrosine kinase Lck. *Nature* 368, 764 - 769.

Eischen, C. M., Weber, J. D., Roussel, M. F., Sherr, C. J., und Cleveland, J. L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13, 2658 - 2669.

-
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., und Cheresch, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4, 915 - 924.
- Era, T., und Witte, O. N. (2000). Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1737 - 1742.
- Erpel, T., Superti-Furga, G., und Courtneidge, S. A. (1995). Mutational analysis of the Src SH3 domain: the same residues of the ligand binding surface are important for intra- and intermolecular interactions. *EMBO J* 14, 963 - 975.
- Faderl, S., Kantarjian, H. M., Thomas, D. A., Cortes, J., Giles, F., Pierce, S., Albitar, M., und Estrov, Z. (2000). Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 36, 263 - 273.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., und Kantarjian, H. M. (1999). Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 131, 207 - 219.
- Fialkow, P. J., Jacobson, R. J., und Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 63, 125 - 130.
- Frank, D., und Varticovski, L. (1996). BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia* 10, 1724 - 1730.
- Gambacorti-Passerini, C., Barni, R., le Coutre, P., Zucchetti, M., Cabrita, G., Cleris, L., Rossi, F., Gianazza, E., Brueggen, J., Cozens, R., *et al.* (2000). Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo

resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 92, 1641 - 1650.

Gesbert, F., und Griffin, J. D. (2000). Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 96, 2269 - 2276.

Gesbert, F., Sellers, W. R., Signoretti, S., Loda, M., und Griffin, J. D. (2000). BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 through the phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J Biol Chem* 275, 39223 - 39230.

Gishizky, M. L., Cortez, D., und Pendergast, A. M. (1995). Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10889 - 10893.

Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E., Saffran, D. C., und Witte, O. N. (1995). Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82, 981 - 988.

Gonfloni, S., Frischknecht, F., Way, M., und Superti-Furga, G. (1999). Leucine 255 of Src couples intramolecular interactions to inhibition of catalysis. *Nat Struct Biol* 6, 760 - 764.

Gordon, M. Y., Dowding, C. R., Riley, G. P., Goldman, J. M., und Graeves, M. F. (1989). Adhesive defects in chronic myeloid leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 149, 151 - 155.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., und Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876 - 880.

Green, D. R., und Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309 - 1312.

Gross, A., McDonnell, J. M., und Korsmeyer, S. J. (1999a). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899 - 1911.

Gross, A. W., Zhang, X., und Ren, R. (1999b). Bcr-Abl with an SH3 deletion retains the ability To induce a myeloproliferative disease in mice, yet c-Abl activated by an SH3 deletion induces only lymphoid malignancy. *Mol Cell Biol* 19, 6918 - 6928.

Hallek, M., Neumann, C., Schaeffer, M., Danhauser-Riedl, S., von Bubnoff, N., de Vos, G., Druker, B. J., Yasukawa, K., Griffin, J. D., und Emmerich, B. (1997). Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp Hematol* 25, 1367 - 1377.

Hanke, J. E., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., und Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Biol Chem* 271, 695 - 701.

Heisterkamp, N., Jenster, G., ten Hoeve, J., Zovich, D., Pottengale, P. K., und Groffen, J. (1990). Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. *Nature* 344, 251 - 253.

Heisterkamp, N., Stam, K., und Groffen, J. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph1 translocation. *Nature* 315, 758 - 761.

Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hanson, P. F., de Klein, A., Bartram, C. R., und Grosveld, G. (1983). Localization of the c- abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306, 239 - 242.

Hoffmann, F. M. (1991). Drosophila abl and genetic redundancy in signal transduction. *Trends Genet* 7, 351 - 355.

- Honda, H., Fujii, T., Takatoku, M., Mano, H., Witte, O. N., Yazaki, Y., und Hirai, H. (1995). Expression of p210bcr/abl by metallothionein promoter induced T-cell leukemia in transgenic mice. *Blood* 85, 2853 - 2861.
- Honda, H., Oda, H., Suzuki, T., Takahashi, T., Witte, O. N., Ozawa, K., Ishikawa, T., Yazaki, Y., und Hirai, H. (1998). Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias. *Blood* 91, 2067 - 2075.
- Horita, M., Andreu, E. J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., und Fernandez-Luna, J. L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 191, 977 - 984.
- Horowitz, M. M., Rowlings, P. A., und Passweg, J. R. (1996). Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry. *Bone Marrow Transplant* 17 Suppl 3, S 5 - 6.
- Huettner, C. S., Zhang, P., Van Etten, R. A., und Tenen, D. G. (2000). Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nat Genet* 24, 57 - 60.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28, 311 - 339.
- Ilaria, R. L., und Van Etten, R. A. (1995). The SH2 domain of p210bcr/abl is not required for the transformation of hematopoietic factor-dependent cells. *Blood* 86, 3897 - 3904.

-
- Ilaria, R. L. J., und Van Etten, R. A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704 - 31710.
- Irby, R. B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., und Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat Genet* 21, 187 - 190.
- Irby, R. B., und Yeatman, T. J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19, 5636 - 5642.
- Jackson, P., und Baltimore, D. (1989). N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J* 8, 449 - 456.
- Jonuleit, T., van der Kuip, H., Miething, C., Michels, H., Hallek, M., Duyster, J., und Aulitzky, W. E. (2000). Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 96, 1933 - 1939.
- Kabarowski, J. H. S., Allen, P. B., und Wiedemann, L. M. (1994). A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. *EMBO J* 13, 5887 - 5895.
- Kantarjian, H. M., Giles, F. J., O'Brien, S. M., und Talpaz, M. (1998). Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 12, 31 - 80.

Khaled, A. R., Moor, A. N., Li, A., Kim, K., Ferris, D. K., Muegge, K., Fisher, R. J., Fliegel, L., und Durum, S. K. (2001). Trophic factor withdrawal: p38 mitogen-activated protein kinase activates NHE1, which induces intracellular alkalinization. *Mol Cell Biol* 21, 7545 - 7557.

Konopka, J. B., Watanabe, S. M., und Witte, O. N. (1984). An alteration of the human c-Abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37, 1035 - 1042.

LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Pico, A., Porter, M., Kuriyan, J., und Miller, W. T. (1998). Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue. *J Biol Chem* 273, 32129 - 32134.

Laneuville, P., Heisterkamp, N., und Groffen, J. (1991). Expression of the chronic myelogenous leukemia-associated p210bcr/abl oncoprotein in a murine IL-3 dependent myeloid cell line. *Oncogene* 6, 275 - 282.

le Coutre, P., Mologni, L., Cleris, L., Marchesi, E., Buchdunger, E., Giardini, R., Formelli, F., und Gambacorti-Passerini, C. (1999). In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J Natl Cancer Inst* 91, 163 - 168.

Li, B., Boast, S., de los Santos, K., Schieren, I., Quiroz, M., Teitelbaum, S. L., Tondravi, M. M., und Goff, S. P. (2000). Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat Genet* 24, 304 - 308.

Li, S., Gillessen, S., Tomasson, M. H., Dranoff, G., Gilliland, D. G., und Van Etten, R. A. (2001). Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are not required for induction of chronic myeloid leukemia-like myeloproliferative disease in mice by BCR/ABL. *Blood* 97, 1442 - 1450.

-
- Li, S., Ilaria, R. L., Million, R. P., Daley, G. Q., und Van Etten, R. A. (1999). The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J Exp Med* *189*, 1399 - 1412.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D. O., und Shokat, K. M. (1999). Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* *6*, 671 - 678.
- Lowell, C., Fumagalli, L., und Berton, G. (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *Journal of Cell Biology* *133*, 895 - 910.
- Lowell, C. A., und Soriano, P. (1996). Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev* *10*, 1845 - 1857.
- Lugo, T. G., und Witte, O. N. (1989). The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol Cell Biol* *9*, 1263 - 1270.
- Mandanás, R. A., Leibowitz, D. S., Gharehbaghi, K., Tauchi, T., Burgess, G. S., Miyazawa, K., Jayaram, H. N., und Boswell, H. S. (1993). Role of p21 ras in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* *82*, 1838 - 1847.
- Marth, J. D., Cooper, J. A., King, C. S., Ziegler, S. F., Tinker, D. A., Overell, R. W., Krebs, E. G., und Perlmutter, R. M. (1988). Neoplastic transformation induced by an activated lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (pp56^{lck}). *Mol Cell Biol* *8*, 540 - 550.
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. J., und Griffin, J. D. (1994). Src phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating

factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL. *J Biol Chem* 7, 5016 - 5021.

Matulonis, U. A., Dosiou, C., Lamont, C., Freeman, G. J., Mauch, P., Nadler, L. M., und Griffin, J. D. (1995). Role of B7-1 in mediating an immune response to myeloid leukemia cells. *Blood* 85, 2507 - 2515.

Mauro, M. J., und Druker, B. J. (2001). STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 6, 233 - 238.

Mayer, B. J., und Baltimore, D. (1994). Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 14, 2883 - 2894.

Mayer, B. J., Jackson, P. K., Van Etten, R. A., und Baltimore, D. (1992). Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol* 12, 609 - 618.

McGohan, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R., und Cotter, T. G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179 - 1187.

McWhirter, J. R., Galasso, D. L., und Wang, J. Y. J. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13, 7587 - 7595.

McWhirter, J. R., und Wang, J. Y. (1991). Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11, 1553 - 1565.

-
- McWhirter, J. R., und Wang, J. Y. J. (1993). An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J* 12, 1533 - 1546.
- McWhirter, J. R., und Wang, J. Y. J. (1997). Effect of Bcr Sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 15, 1625 - 1634.
- Medema, R. H., und Bos, J. L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 4, 615 - 661.
- Meng, F., und Lowell, C. A. (1997). Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med* 185, 1661-1670.
- Mikol, V., Baumann, G., Keller, T. H., Manning, U., und Zurini, M. G. (1995). The crystal structures of the SH2 domain of p56lck complexed with two phosphopeptides suggest a gated peptide binding site. *J Mol Biol* 246, 344 - 355.
- Million, R. P., und Van Etten, R. A. (2000). The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96, 664 - 670.
- Missbach, M., Jeschke, M., Feyen, J., Muller, K., Glatt, M., Green, J., und Susa, M. (1999). A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone* 24, 437 - 449.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C., Kuriyan, J., und Miller, W. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650 - 653.

- Mocsai, A., Ligeti, E., Lowell, C. A., und Berton, G. (1999). Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol* *162*, 1120-1126.
- Mohammadi, M., Schlessinger, J., und Hubbard, S. R. (1996). Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* *86*, 577 - 587.
- Mostecky, J., Halgren, A., Radfar, A., Sachs, Z., Ravitz, J., Thome, K. C., und Rosenberg, N. (2000). Loss of heterozygosity at the Ink4a/Arf locus facilitates Abelson virus transformation of pre-B cells. *J Virol* *74*, 9479 - 9487.
- Muller, A. J., Pendergast, A. M., Havlik, M. H., Puil, L., Pawson, T., und Witte, O. N. (1992). A limited set of SH2 domains binds BCR through a high-affinity phosphotyrosine-independent interaction. *Mol Cell Biol* *12*, 5087 - 5093.
- Musacchio, A., Noble, M., Pauptit, R., Wierenga, R., und Saraste, M. (1992). Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* *359*, 851 - 855.
- Mustelin, T., und Burn, P. (1993). Regulation of Src family tyrosine kinases in lymphocytes. *Trends Biochem Sci* *18*, 215 - 220.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A., und Nakagawa, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60^{c-src}. *Nature* *351*, 69 - 72.
- Neshat, M. S., Raitano, A. B., Wang, H. G., Reed, J. C., und Sawyers, C. L. (2000). The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol* *20*, 1179 - 1186.

Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., und Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397 - 409.

Neves, H., Ramos, C., da Silva, M. G., Parreira, A., und Parreira, L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93, 1197 - 1207.

Nieborowska-Skorska, M., Wasik, M. A., Slupianek, A., Salomoni, P., Kitamura, T., Calabretta, B., und Skorski, T. (1999). Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med* 189, 1229 - 1242.

Nishii, K., Kabarowski, J. H., Gibbons, D. L., Griffiths, S. D., Titley, I., Wiedemann, L. M., und Greaves, M. F. (1996). ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 13, 2225 - 2234.

Noble, M. E., Musacchio, A., Saraste, M., Courtneidge, S. A., und Wierenga, R. K. (1993). Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin. *EMBO J* 12, 2617 - 2624.

Okada, M., Nada, S., Yamanashi, Y., Yamamoto, T., und Nakagawa, H. (1991). Csk: A protein-tyrosine kinase involved in regulation of Src family kinases. *J Biol Chem* 266, 24249 - 24252.

Okuda, K., Weisberg, E., Gilliland, D. G., und Griffin, J. D. (2001). ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 97, 2440 - 2448.

Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., und Rotoli, B. (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410 - 2414.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M., *et al.* (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385 - 395.

Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., Miyake, K., Nakauchi, H., Shirasawa, T., und Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* 3, 771 - 782.

Pawson, T. (1995a). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573 - 580.

Pawson, T. (1995b). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* 373, 477 - 478.

Pear, W. S., Miller, J. P., Xu, L., Pui, J. C., Soffer, B., Quackenbush, R. C., Pendergast, A. M., Bronson, R., Aster, J. C., Scott, M. L., und Baltimore, D. (1998). Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92, 3780 - 3792.

Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Clark, R., McCormick, F., und Witte, O. N. (1991a). Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5927 - 5931.

Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y., und Witte, O. N. (1991b). BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 66, 161 - 171.

-
- Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., und Gishizky, M. L. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175 - 185.
- Perrotti, D., Bonatti, S., Trotta, R., Martinez, R., Skorski, T., Salomoni, P., Grassilli, E., Lozzo, R. V., Cooper, D. R., und Calabretta, B. (1998). TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *EMBO J* 17, 4442 - 4455.
- Pierce, A., Owen-Lynch, P. J., Spooncer, E., Dexter, T. M., und Whetton, A. D. (1998). p210 Bcr-Abl expression in a primitive multipotent haematopoietic cell line models the development of chronic myeloid leukaemia. *Oncogene* 17, 667 - 672.
- Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K. A., Kazlauskas, A., und Pendergast, A. M. (1999). c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13, 2400 - 2411.
- Prosper, F., und Verfaillie, C. M. (2001). Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol* 69, 307 - 316.
- Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P. G., Arlinghaus, R., und Pawson, T. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13, 764 - 773.
- Radfar, A., Unnikrishnan, I., Lee, H. W., DePinho, R. A., und Rosenberg, N. (1998). p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13194 - 13199.

Radich, J. P. (2001). Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 15, 21 - 36.

Ramakrishnan, L., und Rosenberg, N. (1989). Abl genes. *Biochim Biophys Acta* 989, 209 - 224.

Roche, S., Fumagalli, S., und Courtneidge, S. A. (1995a). Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* 269, 1567 - 1569.

Roche, S., Koegl, M., Barone, M. V., Roussel, M. F., und Courtneidge, S. A. (1995b). DNA synthesis induced by some but not all growth factors requires Src family protein tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 15, 1102 - 1109.

Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, K. C., Yin, L., Pennica, D., *et al.* (1998). Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 93, 373 - 383.

Roumiantsev, S., de Aoz, I. E., Varticovski, L., Ilaria, R. L., und Van Etten, R. A. (2001). The src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 97, 4 - 13.

Rowley, J. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 243, 290 - 293.

Sanchez-Garcia, I., und Grutz, G. (1995). Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5287 - 5291.

-
- Sanchez-Garcia, I., und Martin-Zanca, D. (1997). Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol* 267, 225 - 228.
- Satoh, T., Nakafuku, M., und Kaziro, Y. (1992). Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* 267, 24149 - 24152.
- Sattler, M., und Salgia, R. (1998). Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia* 12, 637 - 644.
- Savage, D. G., Szydlo, R. M., und Goldman, J. M. (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96, 111 - 116.
- Sawyers, C. L., McLaughlin, J., und Witte, O. N. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181, 307 - 313.
- Schaeffer, M., Schneiderbauer, M., Weidler, S., Tavares, R., Warmuth, M., de Vos, G., und Hallek, M. (2001). Signaling through a Novel Domain of gp130 Mediates Cell Proliferation and Activation of Hck and Erk Kinases. *Mol Cell Biol* 21, 8068 - 8081.
- Schindler, C., und Strehlow, I. (2000). Cytokines and STAT signaling. *Adv Pharmacol* 47, 113 - 174.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., und Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938 - 1942.
- Schindler, T., Sicheri, F., Pico, A., Gazit, A., Levitzki, A., und Kuriyan, J. (1999). Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* 3, 639 - 648.

Schwartzberg, P. L., Stall, A. M., Hardin, J. D., Bowditch, K. S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M. L., Robertson, E. J., und Goff, S. P. (1991). Mice homozygous for the *abl*^{m1} mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 65, 1165 - 1175.

Serrano, M. (2000). The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 21, 865 - 869.

Sexl, V., Piekorz, R., Moriggl, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., und Ihle, J. N. (2000). Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but *abl*- and *bcr/abl*-induced transformation are independent of *stat5*. *Blood* 96, 2277 - 2283.

Sherr, C. J., und Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94 - 99.

Shoelson, S. E. (1997). SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. *Curr Opin Chem Biol* 1, 227 - 234.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., Roe, B. A., und Canaani E. (1986). Alternativ splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* gene. *Cell* 42, 277 - 284

Sicheri, F., und Kuriyan, J. (1997). Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7, 777 - 785.

Sicheri, F., Moarefi, I., und Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602 - 609.

Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D. A., Sattler, M., und Griffin, J. D. (2000). STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 95, 2118 - 2125.

-
- Simmons, P. J., Levesque, J. P., und Zannettino, A. C. (1997). Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 10, 485 - 505.
- Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J. K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T. O., *et al.* (1997). Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 16, 6151 - 6161.
- Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M. Z., Wen, S. C., Zon, G., Gewirtz, A. M., Perussia, B., und Calabretta, B. (1995a). Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86, 726 - 736.
- Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Szczylik, C., Kanakaraj, P., Perrotti, D., Zon, G., Gewirtz, A., Perussia, B., und Calabretta, B. (1995b). C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res* 55, 2275 - 2278.
- Skorski, T., Nieborowska-Skorska, M., Wlodarski, P., Wasik, M., Trotta, R., Kanakaraj, P., Salomoni, P., Antonyak, M., Martinez, R., Majewski, M., *et al.* (1998). The SH3 domain contributes to BCR/ABL-dependent leukemogenesis in vivo: role in adhesion, invasion, and homing. *Blood* 91, 406 - 418.
- Skourides, P. A., Perera, S. A., und Ren, R. (1999). Polarized distribution of Bcr-Abl in migrating myeloid cells and co-localization of Bcr-Abl and its target proteins. *Oncogene* 18, 1165 - 1176.
- Taguchi, T., Kiyokawa, N., Sato, N., Saito, M., und Fujimoto, J. (2000). Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp Hematol* 28, 55 - 64.

Tanaka, K., Takechi, M., Hong, J., Shigeta, C., Oguma, N., Kamada, N., Takimoto, Y., Kuramoto, A., Dohy, H., und Kyo, T. (1989). 9;22 translocation and bcr rearrangements in chronic myelocytic leukemia patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo)* 30, 352 - 358.

Twamley-Stein, G. M., Pepperkok, R., Ansorge, W., und Courtneidge, S. A. (1993). The Src family tyrosine kinases are required for platelet-derived growth factor-mediated signal transduction in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7696 - 7700.

Unnikrishnan, I., Radfar, A., Jenab-Wolcott, J., und Rosenberg, N. (1999). p53 mediates apoptotic crisis in primary Abelson virus-transformed pre-B cells. *Mol Cell Biol* 19, 4825 - 4831.

Van Etten, R. A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9, 179 - 186.

Van Etten, R. A. (2001). Models of chronic myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep* 3, 228 - 237.

Van Etten, R. A., Jackson, P., und Baltimore, D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 58, 669 - 678.

Van Etten, R. A., Jackson, P. K., Baltimore, D., Sanders, M. C., Matsudaira, P. T., und Janmey, P. A. (1994). The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124, 325 - 340.

van Rhee, F., Szydlo, R. M., Hermans, J., Devergie, A., Frassoni, F., Arcese, W., de Witte, T., Kolb, H. J., Niederwiser, D., Jacobsen, N., *et al.* (1997). Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic

Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20, 553 - 560.

Verfaillie, C. M., Hurley, R., Zhao, R. C., Prosper, F., Delforge, M., und Bhatia, R. (1997).

Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone? *J Lab Clin Med* 129, 584 - 591.

Vigneri, P., und Wang, J. Y. (2001). Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 7, 228 - 234.

Voncken, J. W., Baram, T. Z., Gonzales-Gomez, I. I., van Schaick, H., Shih, J. C., Chen, K., Groffen, J., und Heisterkamp, N. (1998). Abnormal stress response and increased fighting behavior in mice lacking the bcr gene product. *Int J Mol Med* 2, 577 - 583.

Voncken, J. W., van Schaick, H., Kaartinen, V., Deemer, K., Coates, T., Landing, B., Pattengale, P., Dorseuil, O., Bokoch, G. M., Groffen, J., *et al.* (1995). Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 80, 719 - 728.

Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S. C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R. B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B. J., Overduin, M., *et al.* (1992). Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* 358, 646 - 653.

Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D., und Kuriyan, J. (1993). Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell* 72, 779 - 790.

Ward, A. C., Touw, I., und Yoshimura, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19 - 29.

Warmuth, M., Danhauser-Riedl, S., und Hallek, M. (1999). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* 78, 49 - 64.

Wechsler, R. J., und Monroe, J. G. (1995). Immature B lymphocytes are deficient in expression of the src-family kinases p59fyn and p55fgr1. *J Immunol* 154, 1919 - 1929.

Wen, S. T., und Van Etten, R. A. (1997). The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* 11, 2456 - 2467.

Weng, Z., Thomas, S. M., Rickles, R. J., Taylor, J. A., Brauer, A. W., Seidel-Dugan, C., Michael, W. M., Dreyfuß, G., und Brugge, J. S. (1994). Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: Implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol* 14, 4509 - 4521.

Witte, O. N. (1986). Functions of the abl oncogene. *Cancer Survey* 5, 183 - 197.

Wybenga-Groot, L. E., Baskin, B., Ong, S. H., Tong, J., Pawson, T., und Sicheri, F. (2001). Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 106, 745 - 757.

Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., und Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* 3, 629 - 638.

Xu, W., Harrison, S., und Eck, M. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595 - 602.

Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., und Toyoshima, K. (1990). Association of B-cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* 251, 192 - 194.

Yu, C. C., Yen, T. S., Lowell, C. A., und DeFranco, A. L. (2001). Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol* 11, 34 - 38.

Zhang, X., und Ren, R. (1998). Bcr-Abl efficiently induces a myeloproliferative disease and production of excess interleukin-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mice: a novel model for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3829 - 3840.

Zhang, X., Subrahmanyam, R., Wong, R., Gross, A. W., und Ren, R. (2001). The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol* 21, 840 - 853.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., und Hung, M. C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973 - 982.

Zhu, J., Nabissa, P. M., Hoffman, B., Liebermann, D. A., und Shore, S. K. (1996). Activated abl oncogenes and apoptosis: differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines. *Blood* 87, 4368 - 4375.

Ziegler, S. F., Levin, S. D., und Perlmutter, R. M. (1989). Transformation of NIH 3T3 fibroblasts by an activated form of p59^{hck}. *Mol Cell Biol* 9, 2724 - 2727.

Ziegler, S. F., Marth, J. D., Lewis, D. B., und Perlmutter, R. M. (1987). Novel protein-tyrosine kinase gene (hck) preferentially expressed in cells of hematopoietic origin. *Mol Cell Biol* 7, 2276 - 2285.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., und Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424 - 2433.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Warmuth
Vorname: Markus
Geburtsdatum: 17.01.1971
Geburtsort: Ingolstadt
Familienstand: verheiratet

Privatadresse:
Planeggerstr.29a
81241 München
Telefon: 0177/2663096

Dienstadresse:
GSF - Forschungsinstitut für Umwelt und
Gesundheit
Hämatologikum
KKG Gentherapie
Marchioninstr. 25
81377 München
Telefon: 089/7099-414/424
Fax: 089/7099-400

Email: warmuth@gsf.de oder markwarm@yahoo.com

Schulbildung

- 1977 - 1981 Grundschule in Gaimersheim, Buxheim und Neuburg/Donau
- 1981 - 1990 Descartes-Gymnasium in Neuburg/Donau; Abitur 1990

Studium

- 1991 - 1998 Medizinstudium in München und Houston

Abgelegte Prüfungen

- 05/1990 *Hochschulreife* (Note 1,6)
- 10/1998 *Medizinisches Staatsexamen*: (Note 1,83)

Promotion

Seit 1995 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hallek an der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern sowie der GSF – Forschungsinstitut für Umwelt und Gesundheit. Thema: „Src-Kinasen als Mediatoren Bcr-Abl-induzierter Leukämien: Aktivierungsmechanismus, biologische Bedeutung und Relevanz als therapeutische Zielstruktur.

Berufserfahrung

- 12/1998 – 05/2000 Arzt im Praktikum, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern, Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann)
- seit 06/2000 Assistenzarzt, Medizinische Klinik III Klinikum Großhadern, Universität München (Direktor: Prof. Dr. W. Hiddemann)
- seit November 1998 Leiter der Arbeitsgruppe “Molekulare Pathogenese und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie” innerhalb der klinischen

Kooperationsgruppe Gentherapie am Hämatologikum der GSF (Leiter: Prof. Dr. Michael Hallek)

Drittmittelförderung

- „Aktivierte Src-Kinasen als Angriffspunkt einer molekularen Therapie der chronischen myeloischen Leukämie mit Src-spezifischen Inhibitoren“; **Novartis-Stiftung für therapeutische Forschung**
- „Molekulare Regulationsmechanismen des invasionsassoziierten Moleküls Urokinase-Rezeptor beim gastrointestinalen Karzinom – Entwicklung neuer Ansätze zur anti-metastatischen Therapie durch einen promotorregulierten Vektor und Src-Kinase-Inhibitoren“; **Deutsche Krebshilfe**

Stipendien und Preise

- 1994: *Oskar-Karl-Forster Stipendium* der LMU München
- 1995 - 1998: Stipendium der *Studienstiftung des deutschen Volkes*
- 2000 1. Sieger der Stufen 1 und 2 des *Münchener Businessplan Wettbewerbs* mit der Geschäftsidee: „SiREEN – Signal Regulation Engeneering“
- 2000/2001 Travel Award der American Society of Hematology

8 Anhang

Activation of Src kinases p53/56^{lyn} and p59hck by p210^{bcr-abl} in
myeloid cells

Susanne Danhauser-Riedl, Markus Warmuth Brian J Druker, Berthold Emmerich
and Michael Hallek

Activation of Src Kinases p53/56^{lyn} and p59^{hck} by p210^{bcr/abl} in Myeloid Cells¹

Susanne Danhauser-Riedl, Markus Warmuth, Brian J. Druker, Bertold Emmerich, and Michael Hallek²

Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, Universität München, Ziemssenstrasse 1, D-80336 München, Germany [S. D.-R., M. W., B. E., M. H.], and Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon 97201-3098 [B. J. D.]

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is characterized by the Philadelphia (Ph¹) translocation t(9;22) that generates a hybrid gene, *bcr/abl*, translated to a *M_r* 210,000 tyrosine kinase (p210^{bcr/abl}) with transforming activity for hematopoietic cells. Hematopoietic cell transformation by p210^{bcr/abl} seems to involve activation of the Ras signaling pathway by at least two different signaling intermediates, growth factor receptor-bound protein 2 and Src homology and collagen protein, but additional signaling proteins are likely to be required as well. In an effort to identify additional phosphoproteins activated by p210^{bcr/abl}, we studied the murine, interleukin 3-dependent, myeloid cell line, 32D, and a *bcr/abl*-transfected, factor-independent subline, 32Dp210. The analysis of whole-cell lysates of 32D and 32Dp210 cells showed that several proteins with a molecular weight of *M_r* 50,000–60,000 were phosphorylated on tyrosine residues in 32Dp210 cells. Because Src family kinases have an apparent molecular weight of *M_r* 50,000–60,000, we asked whether they could become activated by p210^{bcr/abl}. Two Src family kinases, p53/56^{lyn} and p59^{hck}, showed a severalfold higher phosphokinase activity in 32Dp210 cells than in 32D cells. Coimmunoprecipitation experiments with anti-Lyn, anti-Hck, and anti-Abl antibodies demonstrated an intracellular association of p210^{bcr/abl} with p53/56^{lyn} and p59^{hck}. Moreover, the phosphokinase activity of p53/56^{lyn} was higher in *bcr/abl*-positive myeloid cell lines (K562, BV173, and LAMA84) than in the *bcr/abl*-negative myeloid cell line JOSK-M. In conclusion, the results show that p210^{bcr/abl} induces the activation of at least two Src family kinases, p53/56^{lyn} and p59^{hck}, in myeloid cells. These findings extend the range of potential targets of p210^{bcr/abl} that might mediate its transforming effects.

INTRODUCTION

The Philadelphia translocation t(9;22) (Ph¹) is a hallmark of CML³ found in >95% of the patients. It creates a hybrid gene by fusing the 5' end of *c-abl* on the long arm of chromosome 9 to the *bcr* gene on chromosome 22 (1, 2). The resulting fusion gene, *bcr/abl*, plays a pivotal role in the pathogenesis of CML. *bcr/abl* generates a chimeric protein of *M_r* 210,000, p210^{bcr/abl}, which, in contrast to its normal counterpart p145^{c-abl}, is located in the cytoplasm and has a high, constitutive tyrosine kinase activity (3).

It is thought that the p210^{bcr/abl} kinase acts, at least in part, through the (constitutive) phosphorylation and stimulation of cellular signaling proteins, which regulate cell growth, shape, and survival. These proteins include growth factor receptors like c-Kit (4), cytoskeletal proteins like paxillin (5), or downstream signaling proteins like GAP, Shc, Grb2, mitogen-activated protein kinase, CRKL, Crk, phospholipase C- γ 1, phosphatidylinositol 3-kinase, or the 14-3-3 family protein BAP-1 (6–14).

The activation of these signaling components by the p210^{bcr/abl}

kinase is thought to play a key role in the pathogenesis of CML. Therefore, understanding the pathogenetic principle of this transforming protein requires a detailed investigation of Abl kinase substrates and the regulation of Abl kinase activity (6). Some Src family kinases are activated by various cytokines including IL-3, granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor, and IL-6, which are important growth factors for early myeloid progenitors (15–18). Since p210^{bcr/abl} is able to replace some of the growth factor requirements of myeloid cells (13, 19), signaling proteins that become activated by hematopoietic growth factors are prime candidates for p210^{bcr/abl} substrates. This led us to ask whether p210^{bcr/abl} would activate Src family kinases, p53/56^{lyn}, becomes activated by IL-3 in myeloid cells (15, 16). Therefore, we decided to focus on the activation of this kinase by IL-3 or p210^{bcr/abl} in the murine factor-dependent myeloid cell line, 32D. We could demonstrate that both IL-3 and p210^{bcr/abl} activated p53/56^{lyn}. We then screened for the activation of other Src family kinases and found that the phosphokinase activity of p59^{hck} was also increased by p210^{bcr/abl}. The activation of p53/56^{lyn} and p59^{hck} seemed to involve a (direct or indirect) intracellular association with p210^{bcr/abl}, since both Src family kinases could be coimmunoprecipitated with p210^{bcr/abl}.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies. Reagents for cell lysis were all purchased from Sigma Chemical Co. (Deisenhofen, Germany). Ingredients for SDS-PAGE were purchased from Bio-Rad (München, Germany). Recombinant IL-3 was purchased from Genzyme (Rüsselheim, Germany). The mAb against phosphotyrosine residues, 4G10, was prepared and used as described previously (20). The polyclonal Abs against Lyn (44), Hck (N30), and Fyn (3), as well as the anti-Abl mAb 24-11 and the corresponding blocking peptides representing amino acids 44–63 of Lyn and 8–37 of Hck were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The monoclonal anti-Abl antibody, Ab3, was purchased from Oncogene Sciences (Uniondale, NJ). For immunoblotting, the primary Abs were used at the following dilutions: anti-Lyn 44, 1:250 to 1:1000; anti-Abl 24-11, 1:500; and anti-phosphotyrosine 4G10, 1:2000. Secondary Abs were either purchased from Bio-Rad (coupled with alkaline phosphatase) or Amersham (horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse mAb; ECL detection system).

Cells and Cell Culture. 32Dcl3 (32D) cells were obtained from Dr. James D. Griffin (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). K 562, LAMA-84, BV 173, and JOSK-M cell lines were obtained from the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (Braunschweig, Germany). 32D cells were grown in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Biochrom) and 10–20% of WEHI-3B conditioned medium to provide murine IL-3. 32Dp210 cells as well as the CML cell lines K 562, LAMA-84, BV 173, and JOSK-M were cultured in RPMI 1640 containing 10% FCS. Transfected cells were selected with G418 (1 mg/ml).

Plasmids and Transfection. The full-length *bcr/abl* cDNA in the expression vector pGD was provided by Dr. G. Daley, Boston (21). The *bcr/abl* plasmid, pGD210, was introduced into 32Dcl3 cells by electroporation as described (11).

Cell Lysis and Stimulation. For cell lysis, appropriate numbers of exponentially growing cells were washed twice in ice-cold PBS (Life Technologies, Inc., Eggenstein, Germany) to remove remaining serum and growth factors. Thereafter, 1×10^7 cells were lysed in 100 μ l lysis buffer containing 1% Brij96, 20 mmol/liter Tris (pH 8.0), 50 mmol/liter NaCl, and 10 mmol/liter EDTA as well as 1 mmol/liter phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml

Received 2/23/96; accepted 5/31/96.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grants Ha 1680/2-1 and Ha 1680/2-2.

² To whom requests for reprints should be addressed. Phone: 49 89 5160-2337; Fax: 49 89 5160-4412; E-mail: hallek@lmb.uni-muenchen.de.

³ The abbreviations used are: CML, chronic myelogenous leukemia; GAP, *ras*GTPase-activating protein; IL, interleukin; rmlL, recombinant murine IL; Ab, antibody; mAb, monoclonal antibody; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; IP, immunoprecipitation; MAPK, mitogen-activated kinase; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; Shc, Src homology and collagen protein; EGFR, epidermal growth factor receptor.

aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, and 2 mmol/liter sodium orthovanadate for 25 min at 4°C. Thereafter, insoluble material was removed by centrifugation at $15,000 \times g$ at 4°C for 15 min. The protein concentration was checked by a protein assay (Bio-Rad). In some experiments, cells were factor deprived prior to lysis by incubation in medium containing only 5% FCS but no growth factors. Before stimulation with rmlL-3, 32D cells were starved for 15 h in FCS and growth factor-free medium containing 1% BSA (BSA, fraction V; Sigma). Thereafter, cells were washed once in PBS, adjusted to a concentration of 1×10^7 cells per ml, and preincubated at 37°C for 30 min prior to stimulation with 50 units/ml rmlL-3 (Genzyme). Stimulation was terminated by adding ice-cold PBS and subsequently pelleting the cells.

Gel Electrophoresis and Immunoblotting. For immunoblots, lysates containing approximately 150 μg of cellular proteins were boiled for 5 min in SDS sample buffer containing 2% β -mercaptoethanol, 125 mmol/liter Tris/Cl, 2% SDS, 20% glycerol, and bromophenol blue and resolved by 7.5% SDS-PAGE. Proteins were electrophoretically transferred onto Immobilon P membranes (Millipore, Eschborn, Germany). Unspecific protein binding to these membranes was blocked by incubating for 1 h in TBS [10 mmol/l Tris base (pH 8.0) and 150 mmol/NaCl] containing 5% BSA (for anti-phosphotyrosine blots) or 5% skim milk powder (for all other Abs). Thereafter, blots were incubated with the primary Ab in TBS containing 5% BSA and 0.02% sodium azide. The concentration of primary Abs varied from 1:250 to 1:2500 (see above). Immunoblots with the mAb 4G10 were developed by using alkaline phosphatase-conjugated secondary Abs at a dilution of 1:2000 in TBS. Blots were developed in developing buffer [0.1 mol/liter Tris (pH 9.5), 100 mmol/l NaCl, and 5 mmol/l MgCl_2], nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Bio-Rad). For blotting with all other Abs, secondary Abs were horseradish peroxidase-conjugated goat Abs used at a dilution of 1:2000 in TBS containing 5% BSA and 0.02% sodium azide; the ECL detection system (Amersham, Braunschweig, Germany) was used according to the guidelines of the manufacturer to visualize the proteins.

Immunoprecipitation. IPs were performed with lysates containing approximately 1 mg of cellular proteins, adjusted to a final volume of 600 μl by adding appropriate amounts of IP buffer [0.1% Brij96, 20 mmol/liter Tris (pH 8.0), 50 mmol/liter NaCl, 10 mmol/liter EDTA, 1 mmol/liter phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, and 2 mmol/liter sodium orthovanadate]. Lyn, Hck, and Bcr/Abl were precipitated by adding 5 μg of the polyclonal Abs Lyn 44 or Hck N30 or the anti-Abl mAb 24-11, respectively. Following 3 h of incubation at 4°C on a rotating plate, 125 μl of Sepharose A beads (Pharmacia Biotech Inc., Freiburg, Germany) diluted 1:1 in IP buffer were added to each sample. For the Ab 24-11, Sepharose G beads were used. After 2 additional h of incubation at 4°C, the precipitates were washed four times with IP buffer, resuspended in 50 μl of IP buffer, and subsequently boiled in $2 \times$ sample buffer before loading on SDS gels.

For peptide blocking experiments, Abs and a 10-fold excess of blocking peptide (*i.e.* 10 μg of peptide per 1 μg of Ab) were preincubated for 2 h at room temperature under permanent agitation. Thereafter, this antibody-peptide mixture was incubated with cell lysates as indicated above.

Immune Complex Kinase Assay and Reimmunoprecipitation. For immune complex kinase assays, cell lysis and IP was performed as described above. However, the precipitates were washed three times in IP buffer and once in kinase buffer 1 (K1) containing 50 mmol/liter Tris (pH 7.4) and 10 mmol/liter MnCl_2 . For the kinase reaction, the pellet was resuspended in 50 μl kinase buffer containing 10 μCi [γ - ^{32}P]ATP (Amersham) and incubated at room temperature. The kinase reaction was stopped after 15 min by adding 50 μl SDS sample buffer and boiling the sample for 5 min at 100°C. The reaction was analyzed by separating the proteins by SDS-PAGE and autoradiography on ECL films (Amersham).

In some experiments, enolase was used as an exogenous substrate for Src family kinases (p53/56^{lyn} and p59^{hck}). For these experiments, a different kinase buffer (K2) containing 100 mmol/liter HEPES (pH 7.0) and 10 mmol/liter MnCl_2 was used (17). Enolase (Boehringer Mannheim) was prepared by resuspending 20–40 μg of enolase in 20 μl of enolase preparation buffer [50 mmol/l HEPES (pH 7.0), 0.1 mmol/liter DTT, and 10 mmol/liter MgCl_2] and an equal volume of 25 mmol/liter acidic acid. This reaction mixture was heated for 15 min at 37°C and neutralized by the addition of 1 ml of K2 buffer. Fifty μl of the neutralized enolase preparation were mixed with 10 μCi of [γ - ^{32}P]ATP and used to determine the kinase activity of Lyn and Hck precipitates. The kinase reaction was performed as described above.

For re-immunoprecipitation, the kinase reaction was performed in K1 buffer and terminated after 30 min by washing the precipitates twice in 500 μl lysis buffer. The pellets were then resuspended in 40 μl of disrupting buffer [20 mmol/liter Tris (pH 8.0), 0.5% SDS, and 1 mmol/l DTT] and heated for 5 min at 100°C. Following centrifugation, 20 μl of the supernatant were diluted in 180 μl lysis buffer, thus reducing the SDS concentration to 0.05%. The remaining, undiluted supernatant was prepared for gel electrophoresis by adding sample buffer as described above. The diluted supernatant (volume, 200 μl) was re-immunoprecipitated with a second Ab for 5 h, with Sepharose A or G beads added for the last 2 h of incubation. The secondary precipitates were washed four times in lysis buffer, prepared for SDS-PAGE, and loaded on SDS gels, together with the primary precipitates as described above.

RESULTS

Stable Transfection of the Myeloid Cell Line 32D with the bcr/abl Gene Induces the Tyrosine Phosphorylation of Multiple Cytosolic Phosphoproteins. To establish a model system for the study of signaling events induced by p210^{bcr/abl}, the murine, myeloid, IL-3-dependent cell line 32D was transfected with the plasmid pGD210 as described in "Materials and Methods." The resulting cell line 32Dp210 stably expressed the p210^{bcr/abl} kinase; it could be grown with G418 (1 mg/ml) and without the addition of growth factors as described (11, 13). To investigate the effects of p210^{bcr/abl} on tyrosine phosphorylation of cellular proteins, exponentially growing 32D and 32Dp210 cells were starved for 15 h in media containing 5% FCS without rmlL-3 or conditioned media; thereafter, cells were lysed as described in "Materials and Methods," and cytosolic proteins were extracted and resolved by 7.5% SDS PAGE. Tyrosine phosphorylation of proteins was assessed by immunoblotting with the 4G10 Ab. Fig. 1 demonstrates that 32Dp210 cells displayed dramatically increased levels of tyrosine phosphorylation of more than 20 cellular proteins as compared with 32D cells. At least 20 different, distinct bands were stained by the 4G10 Ab. The apparent molecular weights of these bands were M_r 38,000, M_r 40,000, M_r 42,000, M_r 44,000, M_r 48,000, M_r 50,000, M_r 52,000, M_r 53,000–57,000, M_r 60,000, M_r 64,000, M_r 72,000, M_r 84,000, M_r 86,000, M_r 90,000, M_r 93,000, M_r 110,000, M_r 117,000, M_r 130,000, M_r 145,000, M_r 180,000, M_r 205,000, and M_r 210,000 (Fig. 1). Interestingly, phosphorylated protein(s) with an apparent molecular weight of M_r 50,000–60,000 were observed, suggesting that Src family kinases known to migrate at this molecular weight might become phosphorylated.

Expression of the p210^{bcr/abl} Kinase in 32D Cells Increases the Kinase Activity of p53/56^{lyn}. The Src family kinase Lyn is preferentially expressed in myeloid cells and becomes activated in response to stimulation with IL-3 (15, 16). Since signaling pathways stimulated by IL-3 and p210^{bcr/abl} show a strong overlap suggesting that p210^{bcr/abl} might bypass some of the signaling pathways stimulated by IL-3 (13), we asked whether Lyn was activated by p210^{bcr/abl}. For this purpose, 32D or 32Dp210 cells were lysed and subjected to IP with anti-Lyn 44 and anti-Abl 24-11 Abs to purify Lyn and Bcr/Abl. The immunoprecipitates were incubated with a radiolabeled phosphor donor ([γ - ^{32}P]ATP) to assess the kinase activity of the purified protein complexes. Proteins phosphorylated by this *in vitro* kinase reaction were resolved by 7.5% SDS-PAGE. Fig. 2A demonstrates that the anti-Lyn Ab 44 allowed to precipitate two proteins of M_r 53,000 and M_r 56,000, presumably p53^{lyn} and p56^{lyn}, the major known isoforms of this kinase. Coincubation with a specific blocking peptide (see "Materials and Methods") allowed the inhibition of IP of both proteins with this Ab, thus confirming the identity of these proteins. In 32Dp210 cells, autophosphorylation of p53^{lyn} and p56^{lyn} was higher than in 32D cells (Fig. 2A). Immune complex kinase assays with the Ab anti-Abl 24-11 resulted in the purification of a M_r 210,000 protein, presumably p210^{bcr/abl}, which was detectable in

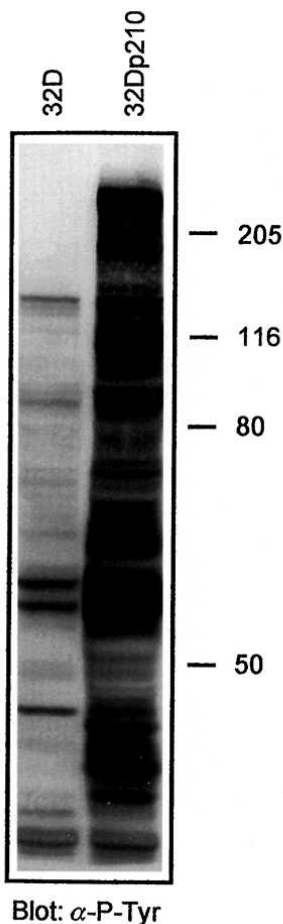


Fig. 1. Tyrosine phosphorylation of total cell lysates of unstimulated 32D and 32Dp210 cells. After cell lysis and protein extraction, proteins were resolved by 7.5% SDS-PAGE and stained by immunoblotting with the monoclonal anti-phosphotyrosine Ab 4G10.

32Dp210 cells (Fig. 2A) but not in 32D cells (data not shown). Several other proteins coprecipitated with p210^{bcr/abl}. Interestingly, one of these coprecipitating proteins had an apparent molecular weight of M_r 56,000 and comigrated with p56^{lyn} on the gel. In addition, longer exposure of the autoradiographs of anti-Lyn immune complex kinase reactions revealed that a M_r 210,000 protein coprecipitated with Lyn in 32Dp210 cells (data not shown).

To assess whether equal amounts of Lyn proteins were used in the kinase reactions, aliquots of the immunoprecipitates were removed and analyzed by anti-Lyn immunoblotting with the anti-Lyn Ab 44. Fig. 2B shows that equal amounts of p56^{lyn} were precipitated; the analysis of the M_r 53,000 isoform in anti-Lyn IPs was hampered by comigration of immunoglobulin heavy chains. In additional experiments, the activity of p53/56^{lyn} was assessed by adding the exogenous Src family kinase substrate enolase to the Lyn immune complex kinase reaction. The phosphorylation of enolase was increased many-fold in 32Dp210 cells as compared with 32D cells (Fig. 2C). Since the activity of Src family kinases is positively and negatively regulated by phosphorylation of specific tyrosine residues, we additionally assessed the tyrosine phosphorylation of p53/56^{lyn} in 32D and 32Dp210 cells. For this experiments, Lyn immunoprecipitates of 32D and 32Dp210 cells were analyzed by 7.5% SDS-PAGE and subsequent immunoblotting with the 4G10 Ab. Fig. 2D demonstrates that two bands of M_r 53,000 and M_r 56,000, presumably p53/56^{lyn}, were stained with the 4G10 Ab in unstimulated 32D cells; staining of these bands increased at least 5-fold in 32Dp210 cells. Taken together, the results show that the phosphokinase activity and the tyrosine phosphorylation of p53/56^{lyn} is increased in 32D cells transfected with the

bcr/abl gene, suggesting that p210^{bcr/abl} increases the activity of this Src family kinase.

The p53/56^{lyn} Kinase Is Activated by IL-3 and p210^{bcr/abl}. The signaling pathways stimulated by IL-3 and p210^{bcr/abl} show considerable overlap in 32D cells (13). Moreover, p53/56^{lyn} is known to be activated by IL-3 (16). This led us to compare the effects of rmIL-3 and p210^{bcr/abl} on p53/56^{lyn} kinase activity. 32D or 32Dp210 cells were factor deprived for 15 h, stimulated with 50 units/ml IL-3 or medium for 10 min, lysed, and subjected to IP with the polyclonal Ab anti-Lyn 44. These immunoprecipitates were analyzed by *in vitro* kinase assays as described above. In 32D cells that were starved for 15 h, only little autophosphorylation of p53/56^{lyn} was detected. Stimulation with 50 units/ml recombinant human IL-3 increased the autophosphorylation of p53/56^{lyn} by at least 3-fold (Fig. 3A). In unstimulated 32Dp210 cells, autophosphorylation of p53/56^{lyn} was higher than in rmIL-3-stimulated 32D cells, and stimulation with rmIL-3 resulted only in a subtle additional increase of Lyn autophosphorylation (Fig. 3A). To assess whether equal amounts of Lyn proteins were used in the *in vitro* kinase reactions, aliquots of the immunoprecipitates were removed and analyzed by anti-Lyn immunoblotting with the anti-Lyn Ab 44. As shown in Fig. 3B (upper panel), equal amounts of p56^{lyn} were precipitated by the anti-Lyn Ab; the analysis of the M_r 53,000 isoform was again difficult due to comigration of immunoglobulin heavy chains. Therefore, the content of p53/56^{lyn} in total cell lysates of 32D and 32Dp210 cells was analyzed as additional control. Fig. 3B (lower panel) demonstrates that neither rmIL-3 nor p210^{bcr/abl} changed the expression of p53/56^{lyn} in 32D or 32Dp210 cells.

Three Human, bcr/abl-positive Cell Lines Show Increased Levels of p53/56^{lyn} Kinase Activity. To substantiate the relevance of our findings, in particular with regard to the pathogenesis of human CML, the kinase activity of Lyn purified from Ph¹-positive and Ph¹-negative myeloid cell lines was determined. Most cell lines were established from bcr/abl-positive myeloid leukemia patients (BV173, LAMA-84, and K562), with the exception of JOSK-M cells. Fig. 4A shows an anti-phosphotyrosine immunoblot of whole-cell lysates of these cell lines. Levels of tyrosine phosphorylation were elevated in the three bcr/abl-positive cell lines as compared with JOSK-M cells. Interestingly, distinct bands of approximately M_r 53,000 to M_r 56,000 became visible on the blot that were phosphorylated on tyrosine residues. This suggested that proteins with a molecular weight similar to p53/56^{lyn} were phosphorylated on tyrosine residues. Therefore, anti-Lyn immune complex kinase assays were performed. As shown in Fig. 4B, the three Ph¹-positive cell lines displayed elevated levels of Lyn autokinase activity when compared to JOSK-M cells. The two bands detected in Lyn *in vitro* kinase assays in the four different cell lines (Fig. 4B, left panel) comigrated with two bands detected by the anti-Lyn Ab on immunoblots (Fig. 4B, right panel). Moreover, the levels of p53/56^{lyn} precipitated were identical in all four cell lines (Fig. 4B, right panel), demonstrating that the differences in kinase activity did not result from different amounts of purified Lyn protein. Taken together, the results suggest that the activation of p53/56^{lyn} might also be relevant in human bcr/abl-positive CML cells.

p210^{bcr/abl} Also Activates the Src Family Kinase p59^{hck}. After having established that p53/56^{lyn} kinase was activated in bcr/abl-positive myeloid cells, we investigated whether additional members of the Src kinase family were activated by p210^{bcr/abl}. Therefore, we screened the expression of all Src family kinases in 32D and 32Dp210 cells by *in vitro* kinase assays and immunoblots and found that, in addition to Lyn, the Src family kinases Hck, Fyn, and Yes were expressed in 32D cells (data not shown). Of these kinases, only Hck was expressed at sufficiently high levels to study its interaction with p210^{bcr/abl} in 32Dp210 cells in more detail. A M_r 59,000 protein could be precipitated from both cell lines with the anti-Hck Ab, and this

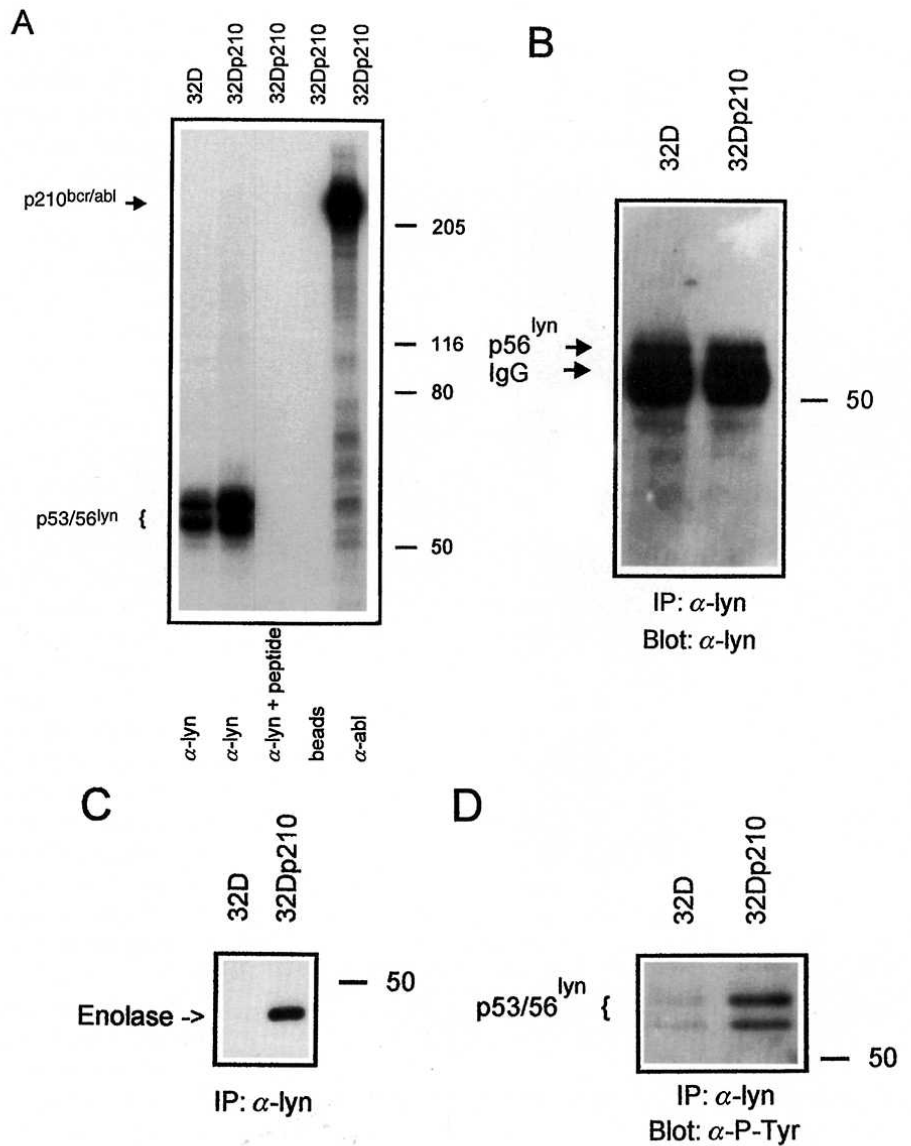


Fig. 2. Activation of p53/56^{lyn} by rML-3 or p210^{bcr/abl}. *A*, immune complex kinase assays following immunoprecipitation of 32D or 32Dp210 cell lysates with anti-Lyn Ab 44 and protein A beads (α -lyn), with anti-Lyn Ab, Lyn blocking peptide, and protein A beads (α -lyn + peptide), with protein A beads alone (beads), and with anti-Abl Ab 24-11 and protein G beads (α -abl). For details, see "Materials and Methods." Molecular weight markers are indicated on the right. *B*, aliquots of the anti-Lyn immunoprecipitates shown in *A* were used for immunoblotting with the anti-Lyn Ab 44 to assess the amount of p53/56^{lyn} precipitated. Similar amounts of p53/56^{lyn} were precipitated in each lane. *C*, aliquots of the anti-Lyn immunoprecipitates shown in *A* were used to assess the phosphorylation of the Lyn substrate enolase in 32D and 32Dp210 cells. *D*, aliquots of the anti-Lyn immunoprecipitates shown in *A* were used to assess the tyrosine phosphorylation of p53/56^{lyn} in 32D and 32Dp210 cells.

protein was recognized by the anti-Hck Ab on immunoblots (Fig. 5, right panel). We then performed *in vitro* kinase assays of anti-Hck and anti-Abl IPs in 32D and 32Dp210 cells. Fig. 5 (left panel) shows that a M_r 59,000 protein, presumably p59^{hck}, was strongly phosphorylated in 32Dp210 cells but not in 32D cells. Several other proteins of M_r 79,000, M_r 84,000, M_r 117,000, M_r 190,000, and M_r 210,000 were also found in the anti-Hck immune complexes, showing that p59^{hck} was present in a complex of several signaling proteins. The addition of the substrate enolase to the kinase reaction showed that p59^{hck} substrate phosphorylation was strongly increased in 32Dp210 cells as compared with 32D cells, similar to our observation with p53/56^{lyn} kinase reactions (Fig. 5, left panel). The addition of an excess of a specific Hck peptide was able to block the IP reaction completely, demonstrating the specificity of the Ab used. Anti-Abl kinase reactions were again performed in parallel. The comparison of these kinase reactions revealed that the M_r 210,000 protein copurified in Hck IPs comigrated with p210^{bcr/abl} on SDS gels, and that the a M_r 59,000 protein copurified in Abl IPs comigrated with p59^{hck} (Fig. 5). Since these data suggested the coprecipitation of p210^{bcr/abl} with p59^{hck}, this possibility was tested in additional experiments.

p53/56^{lyn} and p59^{hck} Coprecipitate with p210^{bcr/abl}. The p210^{bcr/abl} kinase forms complexes with multiple substrates, and binding of these signaling proteins appears to be critical for some

transforming effects. Therefore, we asked next whether the activation of p53/56^{lyn} or p59^{hck} observed in 32Dp210 cells involved an intracellular association of p53/56^{lyn} or p59^{hck} with p210^{bcr/abl}. Whole-cell lysates of 32D and 32Dp210 cells were purified by anti-Hck IP (Fig. 6A). This allowed us to concentrate equal amounts of p59^{hck}, as demonstrated by the appearance of a single M_r 59,000 band on anti-Hck immunoblots (Fig. 6A, lower panel). The addition of Hck peptide was able to block the anti-Hck IP completely. The analysis of IP-purified p59^{hck} complexes by anti-Abl immunoblotting showed a distinct band of M_r 210,000, which was detectable only in 32Dp210 cells but not in 32D cells. Blocking the IP reaction with Hck peptide also abrogated the detection of p210^{bcr/abl} in anti-Hck precipitates, demonstrating that p210^{bcr/abl} was present in p59^{hck} protein complexes (Fig. 6A, upper panel).

Since the coprecipitation of p53/56^{lyn} and p210^{bcr/abl} could not be demonstrated by simple IP and subsequent immunoblotting (data not shown), we had to choose a more sensitive technique (22). For this purpose, anti-Lyn immunoprecipitates from 32Dp210 cells were subjected to an *in vitro* kinase assay; the resulting reaction was treated with disruption buffer (see "Materials and Methods") to dissociate protein complexes and then re-precipitated with secondary Abs, either anti-Lyn 44 or anti-Abl 24-11. As shown in Fig. 6B, the anti-Lyn IP precipitated two bands of M_r 53,000 and M_r 56,000 but also several

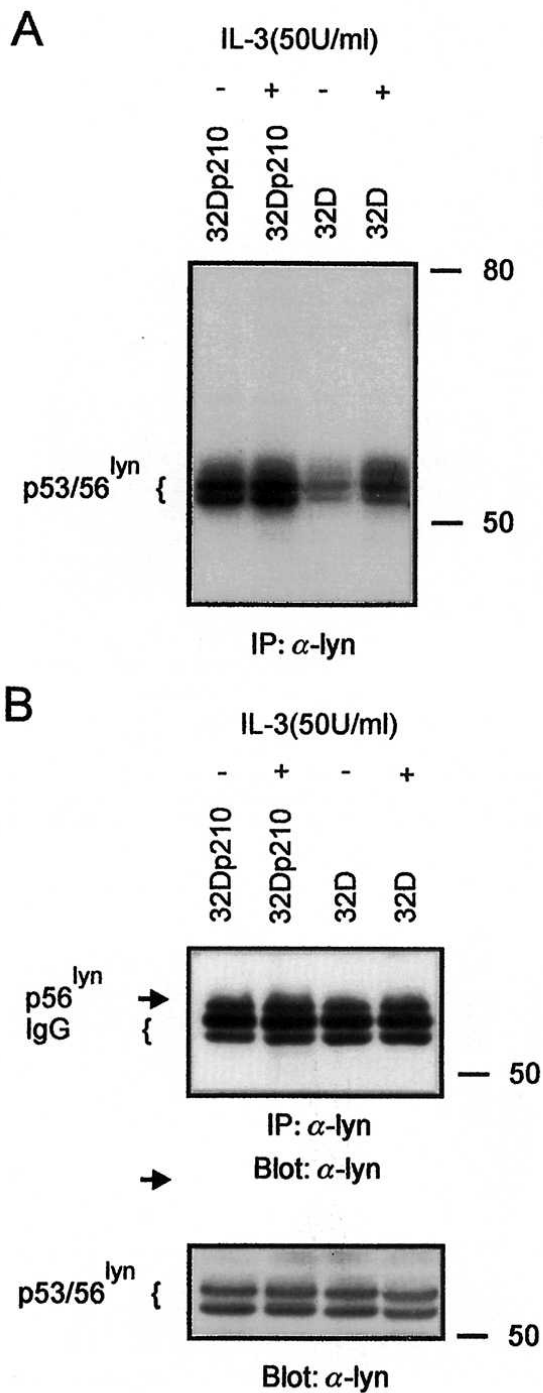


Fig. 3. A, anti-Lyn *in vitro* kinase assay with total cell lysates from 32Dp210 or 32D cells stimulated with media (-) or with 50 units/ml rmlL-3 for 5 min. Right, molecular weight markers. B, aliquots of the anti-Lyn immunoprecipitates (upper part) or of total cell lysates (lower part) used for the experiment shown in A were subjected to immunoblotting with anti-Lyn Ab 44. Similar amounts of p53/56^{lyn} were present in all four lanes.

other proteins, including one of M_r 210,000 protein. When these anti-Lyn immune complex kinase reactions were subjected to a secondary IP with the anti-Abl Ab 24-11, a faint but distinct band of M_r 210,000 was purified from Lyn precipitates (Fig. 6B). This band comigrated with p210^{bcr/abl} from a primary anti-Abl IP of the same lysate, which strongly suggested that the M_r 210,000 protein in anti-Lyn immune complexes was p210^{bcr/abl} (Fig. 6B). The relatively weak signals from secondary IPs are explained by the loss of more than 90% of precipitated proteins during disruption and re-precipitation. This loss of activity is best demonstrated by experiments where primary and secondary IPs were identical (anti-Lyn or anti-Abl); in

secondary IPs, only a small fraction (<10%) of the originally precipitated Lyn or Abl proteins could be rescued (Fig. 6B).

Experiments were also performed in the opposite direction (first IP anti-Abl and then IP anti-Lyn). Primary anti-Abl IP allowed to coprecipitate proteins of M_r 56,000 that comigrated with p56^{lyn} precipitated by primary anti-Lyn IPs (Fig. 6B). When the primary anti-Abl IP mixture was disrupted and reprecipitated with anti-Lyn Ab 44, a very faint but distinct band became visible at M_r 56,000, which presented p56^{lyn} (Fig. 6B). p53^{lyn} was also detected in these secondary IPs when longer exposures were chosen (data not shown). Several other phosphoproteins, including a M_r 72,000 protein, coprecipitated in all anti-Lyn IPs; the identity of these proteins is unknown at present. Taken together, these experiments demonstrate that p53/56^{lyn} and p210^{bcr/abl} coprecipitate in 32Dp210 cells, suggesting that the two kinases exist in an intracellular protein complex.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time that at least two Src family kinases, p53/56^{lyn} and 59^{hck}, are activated in *bcr/abl*-transfected myeloid cells and form an intracellular protein complex with p210^{bcr/abl}. The fact that an increased kinase activity of p53/56^{lyn} and 59^{hck} is found in *bcr/abl*-positive cells obtained from Ph¹-positive patients or by *bcr/abl* transfection suggests that these Src family kinases become activated during the interaction with p210^{bcr/abl}.

It is unclear at present whether Src family kinases contribute to the transforming effects of p210^{bcr/abl}. However, the potential relevance of these findings is underscored by the fact that Src family kinases and p210^{bcr/abl} seem to stimulate identical downstream signaling targets. Bcr/Abl is known to interact with the Ras signaling pathway by binding/activating the growth factor receptor-bound protein 2, Grb2 (10), the Src homology and collagen protein, Shc (9, 12), and the rasGTPase-activating protein, GAP (11), which are all known to modulate the activity of Ras. Their activation ultimately leads to the activation of a pathway commonly referred to as a Ras signaling pathway that involves the coordinate activation of Ras, Raf-1, and MAPK, and which seems to be critical for the regulation of cell growth (23-25). Src family kinases are likely to initiate similar signaling events; GAP is found in complexes with *v-src* and *c-src* and seems to be phosphorylated by the activated Src kinase (26-28). Briggs *et al.* (29) could demonstrate that GAP binds to the SH3 domain of Hck; this interaction was mediated by the highly conserved YXY sequence from the Hck SH3 domain and by a proline-rich N-terminal domain of GAP. Shc is also phosphorylated in *v-src*-transformed fibroblasts (30). We could show recently that the stimulation of lymphoid cells with IL-6 induces the complex formation of the Src family kinases Hck or Lyn with Shc/Grb2.⁴ Finally, Src family kinases also seem to associate with MAPK (22). Given this apparent overlap of the signal transduction pathways of Src family kinases and p210^{bcr/abl}, it is possible that the activation of Shc, Grb2, GAP, or MAPK by p210^{bcr/abl} may involve the cooperation of Src family kinases that bind to p210^{bcr/abl} or *vice versa*. In this regard, a similar cooperation has been demonstrated recently for the oncogenic effects of EGFR and c-Src in fibroblasts, where the combined overexpression of EGFR and c-Src increased the DNA synthesis, growth rate, and the tumor formation in nude mice (31). These effects were associated with the formation of a c-Src/EGFR heterocomplex and an enhancement of the phosphorylation of receptor substrates like phospholipase C- γ and Shc (31).

The speculation that p210^{bcr/abl} and Src family kinases might collaborate in stimulating the signaling pathways to Ras is further

⁴ C. Neumann, M. Schäffer, N. von Bubnoff, and M. Hallek, unpublished observation.

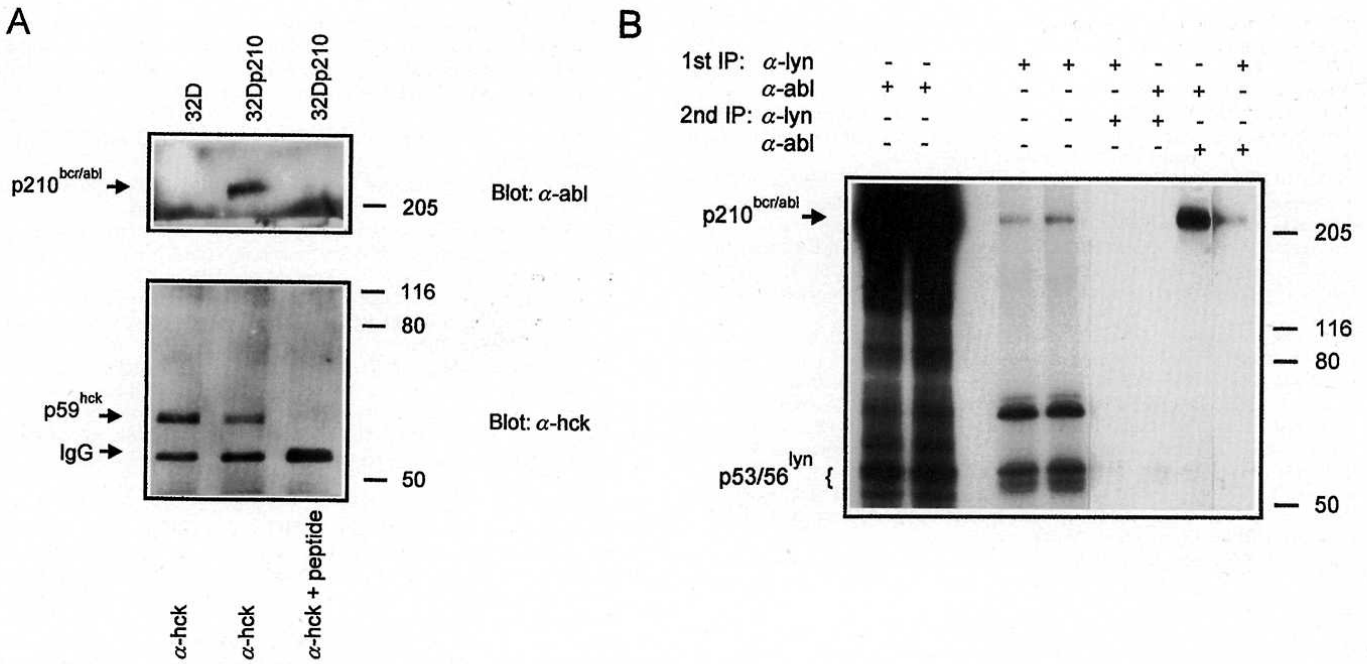


Fig. 6. p210^{bcr/abl} coprecipitates with p59^{hck} or p53/56^{lyn}. A, lysates of 32D and 32Dp210 cells were purified by anti-Hck immunoprecipitation with (α-hck + peptide) or without peptide (α-hck), resolved by 7.5% SDS-PAGE, and analyzed by anti-Hck or anti-Abl immunoblotting. B, immune complex kinase assays using lysates of 32Dp210 cells which were subjected to a first immunoprecipitation (1st IP) with anti-Lyn Ab 44 (α-lyn) or with anti-Abl Ab 24-11 (α-abl). After disruption of protein complexes in disruption buffer (see "Materials and Methods"), a second immunoprecipitation (2nd IP) with the same Abs was performed. Immune complex kinase reactions were resolved by 7.5% SDS-PAGE and visualized by autoradiography as indicated in "Materials and Methods."

nourished by the observation that Bcr/Abl seems to use at least two independent mechanisms for Ras activation. Y177F point mutations that inactivate the Grb2-binding site in Bcr continue to activate Ras and to transform hematopoietic cells (32, 33). Careful examination of these Y177F mutants revealed that phosphorylation and activation of Shc occurs independently of Grb2 binding (32, 33). Moreover, Grb2 seems to complex with Shc (instead of Bcr) in myeloid cells transfected with Y177F mutants (32, 33). Thus, Shc activation seems to complement Bcr/Abl in myeloid cell transformation. Only simultaneous triple point mutations of the Grb2-binding site in Bcr (Y177L), of the SH2 domain in Abl (R552L), and of an autophosphorylation site in Abl (Y793F) were able to suppress the Shc-Grb2 interaction in hematopoietic cells; these triple mutants seemed also defective in blocking apoptosis, inducing IL-3 independence, activating Ras, and inducing myc mRNA expression (33). However, the precise mechanism by which Bcr/Abl stimulates Shc or other Ras-activating proteins is unknown. Non-receptor tyrosine kinases like Fps/Fes or Src family kinases may mediate some of these effects, since Fps/Fes has been shown to associate with Bcr (34).

At present, the role of Src family kinases for normal hematopoiesis is not fully defined. Single knock-out experiments of different Src kinases did not result in abnormalities of murine myelopoiesis (35). Even when *hck*- and *fgr*-deficient animals were interbred to generate double knockout animals, animals appeared completely healthy, and hematopoiesis was not defective (35). Interestingly, *hck/src*-deficient mice showed hematopoietic deficiencies characterized by anemia, leukopenia, and an accumulation of abnormal immature cells in the spleen (35). This suggests that at least some Src family kinases regulate the differentiation and function of blood cells, probably in a redundant manner. These findings from knock-out experiments are supported by the observation that different Src family kinases are activated by hematopoietic growth factors like IL-3, granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor, and IL-6, which promote the growth and differentiation of myeloid progenitors (16-18). Although a role for Src family kinases for myeloid leukemogenesis remains to

be established, the potential contribution of Src family kinases to lymphoid leukemogenesis has been demonstrated by Abraham *et al.* (36), who observed an increased frequency of progression to T-cell leukemias after overexpression of Lck (under the control of a lymphoid-specific promoter and enhancer) in transgenic mice. One might speculate that the constitutive activation of Src family kinases by p210^{bcr/abl} may induce similar effects in myeloid cells.

Although the results allow us to hypothesize that Src family kinases might cooperate with p210^{bcr/abl}, additional evidence is needed to prove this concept. Future experiments should identify the binding domains that are functionally relevant for mediating the interaction of p210^{bcr/abl} with p53/56^{lyn} or p59^{hck}.

REFERENCES

- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosfeld, G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr*, on chromosome 22. *Cell*, 36: 93-99, 1984.
- Ben, N. Y., Daley, G. Q., Mes, M. A. M., Witte, O. N., and Baltimore, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the *bcr/abl* hybrid gene. *Science* (Washington DC), 233: 212-214, 1986.
- Daley, G. Q., and Ben, N. Y. Implicating the *bcr/abl* gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Adv. Cancer Res.*, 57: 151-84, 1991.
- Hallek, M., Danhauser-Riedl, S., Herbst, R., Warmuth, M., Winkler, A., Kolb, H.-J., Druker, B., Emmerich, B., Griffin, J. D., and Ullrich, A. Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells. *Br. J. Haematol.*, in press, 1996.
- Salgia, R., Li, J.-L., Lo, S. H., Brunckhorst, B., Kansas, G. S., Sobhany, E. S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., Tantravahi, R. T., Chen, L. B., and Griffin, J. D. Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by p210^{Bcr/Abl}. *J. Biol. Chem.*, 270: 5039-5047, 1995.
- Feller, S. M., Ren, R., Hanafusa, H., and Baltimore, D. SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends Biochem. Sci.*, 19: 453-458, 1994.
- ten Hoeve, J., Arlinghaus, R. B., Guo, J. Q., Heisterkamp, N., and Groffen, J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia⁺ leukemia. *Blood*, 84: 1731-1736, 1994.
- Reuther, G. W., Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J., and Pendergast, A. M. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* (Washington DC), 266: 129-133, 1994.
- Tauchi, T., Boswell, H. S., Leibowitz, D., and Broxmeyer, H. E. Coupling between

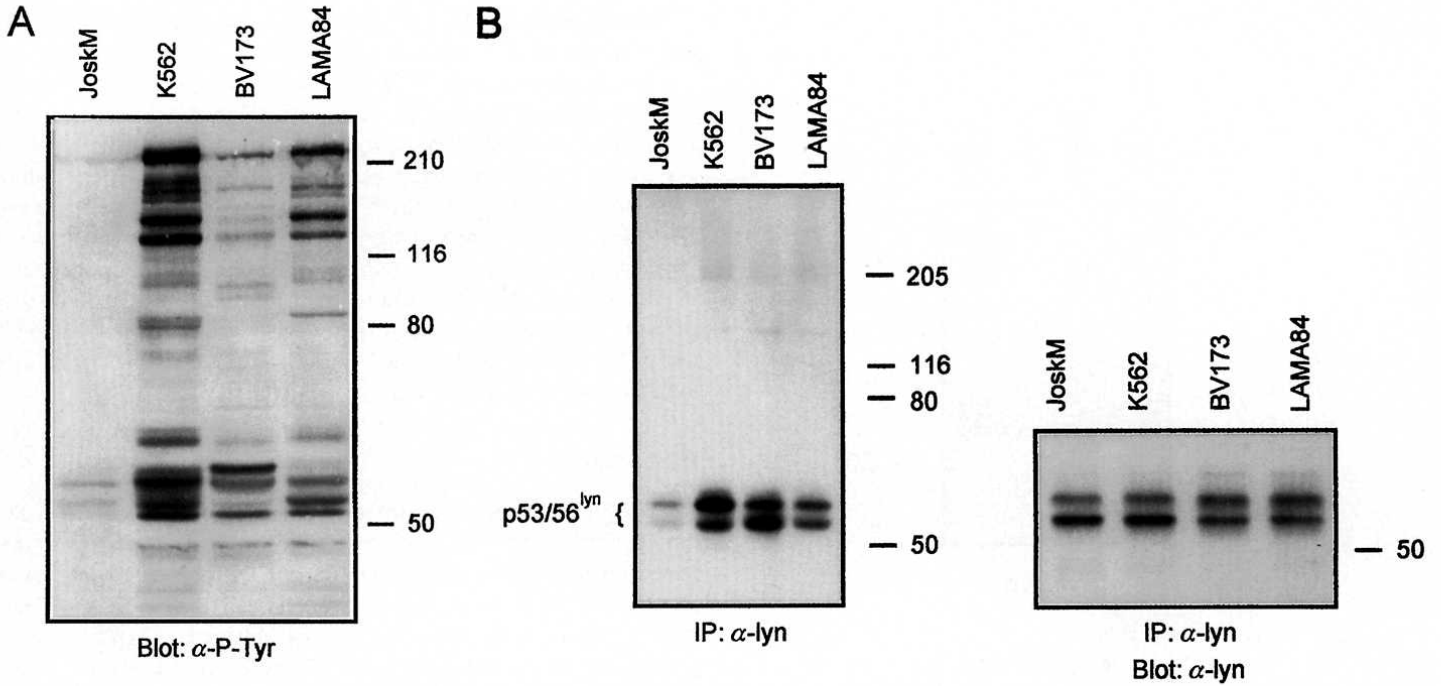


Fig. 4. A, analysis of tyrosine phosphorylation of proteins in whole cell lysates from *bcr/abl*-positive (K562, BV173, and LAMA-84) or *bcr/abl*-negative (JOSK-M) CML cell lines. B, p53/56^{lyn} kinase activity in anti-Lyn immunoprecipitates of *bcr/abl*-positive (K562, BV173, and LAMA-84) or *bcr/abl*-negative (JOSK-M) myeloid cell lines (left). To control for the amount of Lyn protein used in these kinase assays, aliquots of the anti-Lyn immunoprecipitates were analyzed by anti-Lyn immunoblotting with the anti-Lyn Ab 44 (right). Similar amounts of p53/56^{lyn} were precipitated in all four lanes.

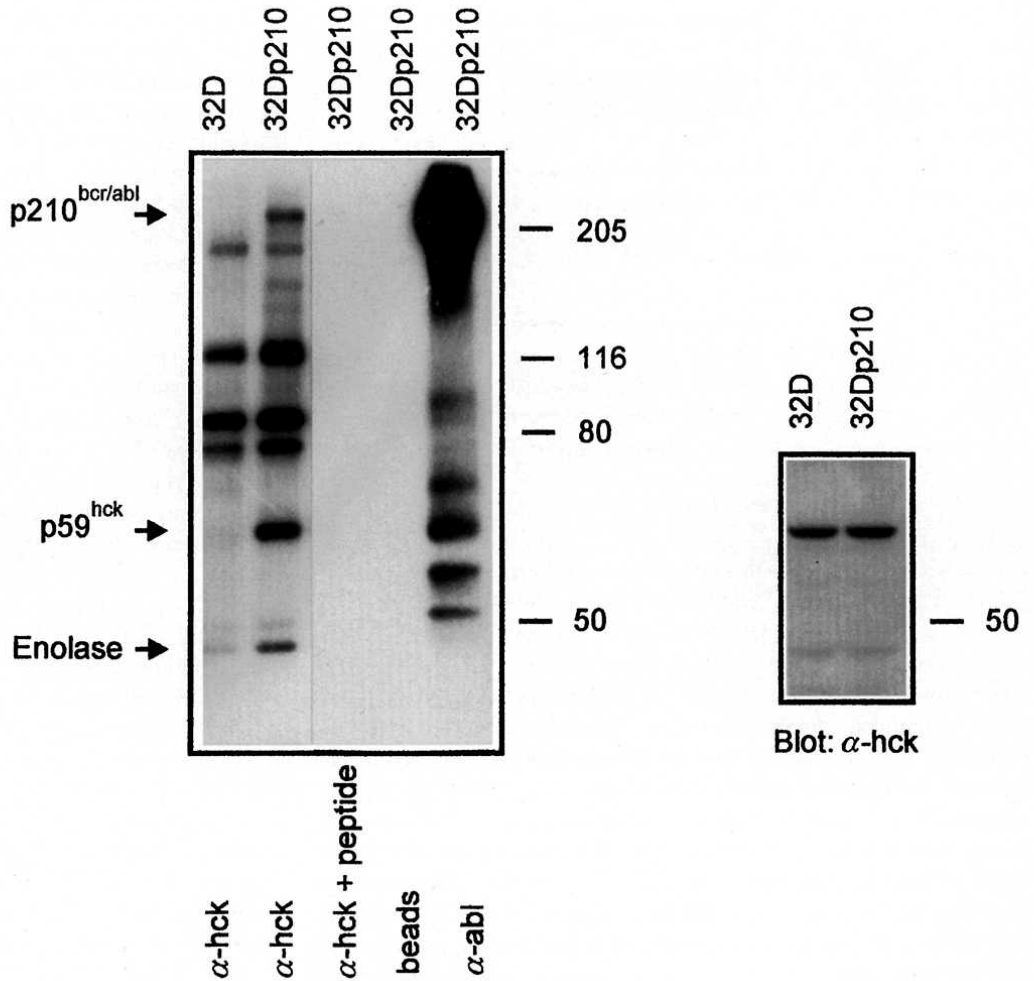


Fig. 5. Immune complex kinase assays following immunoprecipitation of 32D or 32Dp210 cell lysates with anti-Hck Ab N30 and protein A beads (α -hck), with anti-Hck Ab, blocking peptide, and protein A beads (α -hck + peptide), with protein A beads alone (beads), and with anti-Abl Ab 24-11 and protein G beads (α -abl; left). IP aliquots of the same experiment were used for anti-Hck immunoblotting. Similar amounts of p59^{hck} protein were precipitated by anti-Hck IP (right).

- p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to Ras-activation pathway. *J. Exp. Med.*, *179*: 167-175, 1994.
10. Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., and Gishizky, M. L. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, *75*: 175-185, 1993.
 11. Druker, B., Okuda, K., Matulonis, U., Salgia, R., Roberts, T., and Griffin, J. D. Tyrosine phosphorylation of rasGAP and associated proteins in chronic myelogenous leukemia cell lines. *Blood*, *79*: 2215-2220, 1992.
 12. Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T., and Griffin, J. D. Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and Steel factor and is constitutively increased by p210^{bcr/abl}. *J. Biol. Chem.*, *269*: 5016-5021, 1994.
 13. Matulonis, U., Salgia, R., Okuda, K., Druker, B., and Griffin, J. D. Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line. *Exp. Hematol.*, *21*: 1460-1466, 1993.
 14. Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., and Toyama, K. Potential molecules implicated in downstream signaling pathways of p185^{BCR/ABL} and Ph+ ALL involve GTPase-activating protein, phospholipase C- γ 1, and phosphatidylinositol 3'-kinase. *Leukemia (Baltimore)*, *8*: 115-120, 1994.
 15. Torigoe, T., O'Connor, R., Fagard, R., Fischer, S., Santoli, D., and Reed, J. C. Regulation of SRC-family protein tyrosine kinases by interleukins, IL-2, and IL-3. *Leukemia (Baltimore)*, *6*: 345-375, 1992.
 16. Torigoe, T., O'Connor, R., Santoli, D., and Reed, J. C. Interleukin-3 regulates the activity of the LYN protein-tyrosine kinase in myeloid-committed leukemic cell lines. *Blood*, *80*: 617-624, 1992.
 17. Ernst, M., Gearing, D. P., and Dunn, A. R. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.*, *13*: 1574-1584, 1994.
 18. Corey, S., Eguinoa, A., Puyana-Theall, K., Bolen, J. B., Cantley, L., Mollinedo, F., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., and Stephens, L. R. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and src-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells. *EMBO J.*, *12*: 2681-2690, 1993.
 19. Laneville, P., and Sullivan, A. K. Clonal succession and deletion of bcr/abl sequences in chronic myelogenous leukemia with recurrent lymphoid blast crisis. *Leukemia (Baltimore)*, *5*: 752-756, 1991.
 20. Hallek, M., Druker, B., Lepisto, E. M., Wood, K. M., Ernst, T. J., and Griffin, J. D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Steel factor induce phosphorylation of both unique and overlapping signal transduction intermediates in a human factor dependent hematopoietic cell line. *J. Cell. Physiol.*, *153*: 176-186, 1992.
 21. Daley, G. Q., Van Etten, R. A., and Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science (Washington DC)*, *247*: 824-830, 1990.
 22. Pleiman, C. M., Clark, M. A., Gauen, L. K. T., Winitz, S., Coggeshall, K. M., Johnson, G. L., Shaw, A. S., and Cambier, J. C. Mapping of the sites of Src family of protein tyrosine kinases p55blk, p59fyn, p56lyn which interact with the effector molecules phospholipase C- γ 2, microtubule-associated protein kinase, GTPase-activating protein, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.*, *13*: 5877-5887, 1993.
 23. Schlessinger, J. How receptor tyrosine kinases activate ras. *Trends Biochem. Sci.*, *18*: 273-275, 1993.
 24. Marshall, M. S. The effector interactions of p21^{ras}. *Trends Biochem. Sci.*, *18*: 250-254, 1993.
 25. Hallek, M. Tyrosine kinases and phosphatases in hematopoietic growth factor signaling. In: Herrmann, F., and Mertelsmann, R. (eds.), *Advances in Hematopoietic Growth Factors*, pp. 19-48. New York: Marcel Dekker, 1994.
 26. Brott, B. K., Decker, S., Shafer, J., Gibbs, J. B., and Jove, R. GTPase-activating protein interactions with the viral and cellular Src kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*: 755-759, 1991.
 27. Seidel-Duncan, C., Meyer, B. E., Thomas, S. M., and Brugge, J. S. Effects of SH2 and SH3 deletion mutants on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-Src. *Mol. Cell. Biol.*, *12*: 1835-1845, 1992.
 28. Koch, C. A., Moran, M. F., Anderson, D., Liu, X., Mbamalu, G., and Pawson, T. Multiple SH2-mediated interactions in v-src-transformed cells. *Mol. Cell. Biol.*, *12*: 1366-1374, 1992.
 29. Briggs, S. D., Bryant, S. S., Jove, R., Sanderson, D., and Smithgall, T. E. The ras GTPase-activating protein (GAP) is an SH3 domain-binding protein and substrate for the Src-related tyrosine kinase, Hck. *J. Biol. Chem.*, *270*: 14718-14724, 1995.
 30. McGlade, J., Cheng, A., Pelicci, G., Pelicci, P. G., and Pawson, T. Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *89*: 8869-8873, 1992.
 31. Maa, M.-C., Leu, T.-H., McCarley, D. J., Schatzman, R. C., and Parsons, S. J. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*: 6981-6985, 1995.
 32. Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E., Saffran, D. C., and Witte, O. N. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR/ABL oncogene. *Cell*, *82*: 981-988, 1995.
 33. Cortez, D., Kadlec, L., and Pendergast, A. M. Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, *15*: 5531-5541, 1995.
 34. Maru, Y., Peters, K. L., Afar, D. E. H., Shibuya, M., Witte, O. N., and Smithgall, T. E. Tyrosine phosphorylation of BCR by FPS/FES protein-tyrosine kinases induces association of BCR with GRB-2/SOS. *Mol. Cell. Biol.*, *15*: 835-842, 1995.
 35. Varmus, H. E., and Lowell, C. A. Cancer genes and hematopoiesis. *Blood*, *83*: 5-9, 1994.
 36. Abraham, K. M., Levin, S. D., Marth, J. D., Forbush, K. A., and Perlmutter, R. M. Delayed thymocyte development induced by augmented expression of p56lck. *J. Exp. Med.*, *173*: 1421-1432, 1991.

Interaction of the receptor tyrosine kinase 145^{c-kit} with the
p210^{bcr-abl} kinase in myeloid cells

Michael Hallek, Susanne Danhauser-Riedl, Markus Warmuth, Almuth Winkler,
Hans-Joachim Kolb, Brian J. Druker, Berthold Emmerich, James D. Griffin and
Axel Ullrich

Interaction of the receptor tyrosine kinase p145^{c-kit} with the p210^{bcr/abl} kinase in myeloid cells

MICHAEL HALLEK,¹ SUSANNE DANHAUSER-RIEDL,¹ RONALD HERBST,² MARKUS WARMUTH,¹ ALMUT WINKLER,² HANS-JOCHEN KOLB,³ BRIAN DRUKER,⁴ JAMES D. GRIFFIN,⁵ BERTOLD EMMERICH¹ AND AXEL ULLRICH²
¹Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, Universität München, Germany; ²Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Germany; ³Medizinische Klinik III, Klinikum Grosshadern, Universität München, Germany; ⁴Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon, U.S.A.; ⁵Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, U.S.A.

Received 18 October 1995; accepted for publication 26 March 1996

Summary. The chimaeric *bcr/abl* oncogene is detected in virtually all cases of chronic myelogenous leukaemia (CML). It encodes a constitutively active tyrosine kinase of 210 kDalton, p210^{bcr/abl}, which stimulates a variety of cytosolic signalling intermediates. The effects of *bcr/abl* on the activity of growth factor receptors are less well known. In order to investigate interaction of p210^{bcr/abl} with the receptor tyrosine kinase p145^{c-kit}, we used two myeloid, factor-dependent cell lines, MO7 and 32D, to generate *bcr/abl* positive sublines, MO7p210 and 32Dp210, by transfection with the *bcr/abl* gene. Since 32D and 32Dp210 cells did not express p145^{c-kit}, a *c-kit* retrovirus was used to generate *c-kit* positive cell lines (32Dkit, 32Dp210kit). In contrast to MO7 and 32Dkit cells, MO7p210 and 32Dp210kit cells were factor independent and did not respond to the growth-promoting effects of recombinant human Steel factor (rhSF). Preincubation with a monoclonal antibody (MAb) neutralizing the binding of SF to p145^{c-kit} did not affect the growth of MO7p210 cells, thus eliminating the possibility of an autocrine SF secretion. 32Dkit cells transfected with *bcr/abl* containing an inactivating point mutation (Lys→Arg271) in

the Abl kinase domain (32Dp210(Arg271)kit) retained their responsiveness to the effects of rhSF. Immune complex kinase assays showed that the kinase activity of p145^{c-kit} was several-fold higher in MO7p210 and 32Dp210kit cells than in MO7, 32Dkit and 32Dp210(Arg271)kit cells, suggesting that Abl kinase activity was necessary to activate p145^{c-kit}. Co-immunoprecipitation experiments with anti-Kit and anti-Abl MAbs demonstrated that p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} were associated in an intracellular complex in human *bcr/abl* positive, *c-kit* positive cell lines (MO7p210; GM/SO). Finally, colony assays with bone marrow from *bcr/abl* positive CML patients showed that the haemopoietic progenitors of three of four patients did not respond to rhSF. Taken together, the results suggest that p145^{c-kit} can be activated by p210^{bcr/abl} via an Abl-kinase dependent mechanism involving the complex formation of both proteins. These findings could explain some clinical features (basophilia, increase of immature myeloid cells) of chronic-phase CML.

Keywords: *bcr/abl*, *c-kit*, oncogene, chronic myeloid leukaemia, pathogenesis.

The human proto-oncogene *c-kit* encodes a 145 kDalton transmembrane tyrosine kinase, p145^{c-kit} (Chabot *et al*, 1988; Qiu *et al*, 1988; Yarden *et al*, 1987), which is the receptor for a haemopoietic growth factor variously termed Steel factor (SF), stem cell factor, mast cell growth factor (MGF) or *c-Kit* ligand (Anderson *et al*, 1990; Copeland *et al*, 1990; Flanagan & Leder, 1990; Martin *et al*, 1990; Nocka *et al*, 1990; Williams *et al*, 1990; Zsebo *et al*, 1990a, b). In colony assays, SF has little effect on its own, but stimulates

Correspondence: Dr Michael Hallek, Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, Universität München, Ziemssenstrasse 1, D-80336 München, Germany.

the expansion of haemopoietic precursors in a synergistic manner with other growth factors such as interleukin-(IL)-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IL-6, or IL-1 β (Anderson *et al*, 1990; Bernstein *et al*, 1991; Broxmeyer *et al*, 1991; McNiece *et al*, 1991; Zsebo *et al*, 1990b). In addition to its effects on lympho-haemopoietic precursor cells, SF regulates the development, proliferation and function of mast cells, germ cells, and melanocytes (reviewed in Galli *et al*, 1994).

Although soluble SF has only modest effects on haemopoietic progenitors, when used as a single exogenous

growth factor *in vitro* it can expand and/or change the distribution of haemopoietic precursors when administered as a single agent *in vivo*. For example, the administration of SF to mice or baboons *in vivo* promotes striking increases in the numbers of primitive haemopoietic precursors in the bone marrow, spleen and peripheral blood (Andrews *et al*, 1991; Galli *et al*, 1994; McNiece & Zsebo, 1994; Molineux *et al*, 1991).

The *in vivo* effects of SF on haemopoietic precursors and mast cells are reminiscent of the haemato-morphological picture of chronic myelogenous leukaemia (CML) where an expansion of early haemopoietic precursors and mast cells is frequently observed in bone marrow biopsies (Begemann & Rastetter, 1979). In CML, a malignant pool of haemopoietic precursors is thought to have a prolonged survival acquired with the Philadelphia translocation t(9;22) (Ph¹) found in $\geq 95\%$ of the patients. Ph¹ generates a hybrid gene, *bcr/abl*, which is translated to a fusion protein of 210 kDalton, p210^{*bcr/abl*} (Ben *et al*, 1986; Groffen *et al*, 1984). This chimaeric protein is a tyrosine kinase which, in contrast to its normal counterpart *c-Abl*, is located in the cytoplasm and phosphorylates a number of substrates on tyrosine residues (Daley & Ben, 1991). Some of the p210^{*bcr/abl*} substrates have recently been identified; they include several members of the Ras signalling pathway such as *rasGAP*, *Shc*, *Grb2*, and mitogen-activated protein kinase (Druker *et al*, 1992; Gotoh *et al*, 1994; Matsuguchi *et al*, 1994; Matulonis *et al*, 1993; Pendergast *et al*, 1993; Tauchi *et al*, 1994), *CRKL* (ten Hoeve *et al*, 1994), *Crk* (Feller *et al*, 1994), and the 14-3-3 family protein *BAP-1* (Reuther *et al*, 1994). *Bcr/Abl* may also activate phospholipase C- γ 1 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), as both kinases were shown to be activated in *bcr/abl* positive cells (Gotoh *et al*, 1994).

Given the similarity of biological effects of SF and the haemato-morphological picture of chronic-phase CML, we asked whether p210^{*bcr/abl*} would interfere with the effects of SF or its receptor, p145^{*c-kit*}. In haemopoietic cell lines transfected with a plasmid containing the *bcr/abl* gene, SF did not stimulate cell growth, in contrast to the respective parental cell lines. This effect was not caused by an autocrine secretion of SF in *bcr/abl* positive cells, as shown by addition of an inhibitory anti-Kit antibody. A constitutive activation of p145^{*c-kit*} was demonstrated in *bcr/abl* positive cells by immune complex kinase assays. Co-precipitation experiments with anti-Kit and anti-Abl antibodies showed that p145^{*c-kit*} and p210^{*bcr/abl*} associated physically in myeloid cells. Finally, colony assays with bone marrow from *bcr/abl* positive CML patients showed that haemopoietic precursors of most patients did not respond to rhSF, suggesting that p145^{*c-kit*} was already activated, presumably by p210^{*bcr/abl*}.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies. All reagents for cell lysis were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). Ingredients for SDS-Page were purchased from Biorad (München, Germany). Cell culture media and supplements were obtained from Biochrom (Berlin, Germany). Purified recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor

(rhGM-CSF) and recombinant human interleukin-3 (rhIL-3) were kindly provided by Sandoz (Nürnberg, Germany), recombinant mouse interleukin-3 (rmIL-3) was obtained from Genzyme (Rüsselsheim, Germany). Purified recombinant human Steel factor (rhSF) was obtained as a gift from Amgen (Thousand Oaks, Calif., U.S.A.). The anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 was generated by B. Druker as described recently (Hallek *et al*, 1992; Kanakura *et al*, 1990) and used for immunoblotting at a 1:2000 dilution. The anti-Kit monoclonal antibodies 14A3 and 3D6 were generated as described (Bühning *et al*, 1993). The 14A3 antibody was used for immunoblotting at a dilution of 1:1000 and for immunoprecipitation at a concentration of 5 μ g for 1 mg of cellular protein. The 3D6 anti-Kit antibody with a specific activity neutralizing the binding of SF to p145^{*c-kit*} was used to block SF-induced cell growth in [³H]thymidine incorporation assays (Bühning *et al*, 1993). The anti-Abl monoclonal antibody 24-21 was obtained from Oncogene Science (Uniondale, N.Y., U.S.A.) and was used for immunoblotting at a dilution of 1:500. The anti-Abl monoclonal antibody 24-11 was purchased from Santa Cruz Inc. (Santa Cruz, Calif., U.S.A.) and used at a concentration of 5 μ g for 1 mg of cellular protein for immunoprecipitation. The alkaline phosphatase linked anti-mouse IgG secondary antibody for Western blotting was obtained from Biorad (München, Germany). The horseradish peroxidase conjugated anti-mouse IgG secondary antibody was used for immunoblotting with the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham, Braunschweig, Germany). pGD210, an expression plasmid for the *bcr/abl* gene, was obtained from Dr G. Daley, Boston, Mass., U.S.A. (Daley *et al*, 1990).

Generation and infection with *c-kit* retrovirus. The *c-kit* cDNA was subcloned into pLEN (E. Wagner and T. von Rüden, Institute of Molecular Pathology, Vienna, Austria) in order to generate pLEN/*c-kit*/wt. PA 317 (ATCC, Rockville, Md., U.S.A.) cells were electroporated with pLEN/*c-kit*/wt. After 48 h, virus supernatant was collected and used for infection of GP + E86 (ATCC). Cells were incubated with the virus supernatant for 4 h at 37°C in the presence of 8 μ g/ml polybryene (Sigma). After 24 h, the medium was changed and cells were incubated in the presence of G418 (1 mg/ml; GIBCO, Eggenstein, Germany) for 14 d. Single clones were picked and expression analysed by Western blotting. GP + EP 86 LEN/*c-kit*/wt clone 7 showed a high virus expression with a titre of 10⁷ cfu/ml. 32D, 32Dp210(Arg271), and 32Dp210 cells were infected with LEN/*c-kit*/wt. Virus supernatant was collected from subconfluent GP + E86/LEN/*c-kit*/wt and filtered under sterile conditions (Millex HA, 0.45 μ m, Millipore, France). 1 \times 10⁶ 32D cells in exponential growth phase were centrifuged (1200 rpm, 5 min) and resuspended in 6 ml virus supernatant. Infections were carried out as described above and repeated five times.

Cells and cell culture. The human GM-CSF and IL-3-dependent cell line MO7 was originally derived from the peripheral blood of an infant with megakaryocytic leukaemia, and obtained from Dr L. Pegoraro, Torino, Italy. The cell line was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 10 ng/ml recombinant human interleukin-3 (rhIL-3). A growth factor independent subline of

MO7 cells was generated by electroporation with the pGD210 plasmid and subsequent selection for G418 (400 µg/ml; GIBCO) resistance; the resulting cell line, MO7p210, stably expressed p210^{bcr/abl} and was factor independent.

The murine IL-3-dependent myeloid cell line 32D was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and 10–15% WEHI-3B conditioned medium as a source of murine IL-3. The 32D cells transfected with pGD210 or a pGD plasmid containing a *bcr/abl* kinase negative mutant (Lys-Arg 271) were created by site-directed mutagenesis as described recently (Oda *et al.*, 1995). The cell lines 32Dp210 and 32Dp210(Arg271) both expressed p210^{bcr/abl} as shown by immunoblotting. 32Dp210(Arg271) cells lacked p210^{bcr/abl} kinase activity and still required IL-3 for growth, whereas 32Dp210 cells were growth factor independent. In a second step we used a *c-kit* retrovirus, LEN, to introduce the human oncogene *c-kit*, into 32D, 32Dp210 or 32Dp210(Arg271) cells. Selection for expression of *c-kit* was performed by staining the cells with phycoerythrin conjugated anti-c-Kit antibody 95C3 (clone 17F11; An der Grub, Kaumberg, Austria) and subsequent fluorescence-activated cell sorting (FACSTAR, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Thereafter, c-Kit positive cells were plated in methylcellulose (Stemcell Tech. Inc., Terry Fox Laboratory, British Columbia, Canada) supplemented with 20% FCS and 10% WEHI-3B supernatant (where necessary) containing 1 mg/ml G418 (GIBCO), and cultured for 5–10 d. G418-resistant colonies were picked and G418-resistant clones were established. All clones were evaluated for Bcr/Abl and c-Kit protein expression by Western blot.

The human CML cell lines LAMA-84, GDM-1, K562 and JOSK-M were purchased from DSM (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Germany). They were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS. The growth factor dependent CML cell line GM/SO was kindly provided by Dr S. Oez (Städt. Krankenhaus, Nürnberg, Germany) and grown in RPMI-1640 with 10% FCS and 10 ng/ml rhGM-CSF.

Human bone marrow cells were collected from diagnostic bone marrow aspirates of four CML patients (three female, one male; age 30–46 years) and one patient with normal bone marrow. All four patients gave their informed consent. All leukaemia patients had cytogenetically proven Ph¹ positive CML. Three CML patients were previously treated with hydroxyurea, and one patient was untreated. Blasts and progenitor cells were isolated by density gradient centrifugation with Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Interphase cells were frozen and stored in liquid nitrogen until use.

Clonogenic assays. Clonogenic assays were performed either to establish different clones of transfected G418 resistant cell lines, or to examine the colony forming unit (CFU) activity of progenitor cells from normal or CML bone marrow. For selection of G418 resistant clones, 10³ transfected cells/ml were plated in 0.9% Iscove's methylcellulose semisolid medium (Stemcell Tech. Inc., Terry Fox Laboratory, British Columbia, Canada) supplemented with 20% FCS, 2 mmol/l glutamine (GIBCO) and WEHI-supernatant or rhIL-3 (where necessary) and with different

concentrations of G418 (final concentrations given). After 5–10 d of incubation at 37°C and in 5% CO₂, colonies were isolated under the microscope, and monoclonal sublines were established.

For CFU assays, 10⁵ mononuclear bone marrow cells/ml were plated in 0.9% Iscove's methylcellulose semisolid medium supplemented with 30% FCS, 1% bovine serum albumin (Sigma), 2 mmol/l glutamine and 10⁻⁴ mol/l 2-mercaptoethanol (Sigma). CFU activity of progenitor cells was determined in control plates without cytokines, and after addition of 20 ng/ml rhIL-3 or 100 ng/ml rhSF alone or in combination. Colonies of more than 40 cells were counted after 10–14 d.

[³H]thymidine incorporation assay. The mitogenic activity of rhSF alone or in combination with IL-3 was determined in a [³H]thymidine incorporation assay. Exponentially growing cells were washed two times with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS and then plated in a final concentration of 10⁴ cells/ml in 96-well flatbottom microtitre plates (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) in a final volume of 200 µl/well. rhSF and IL-3 (0–100 ng/ml) were added alone or in combination. In some experiments cells were incubated with a neutralizing monoclonal anti-Kit antibody (3D6; final concentration of 2 µg/ml). 2 µg/ml of 3D6 antibody inhibited the effects of SF (100 ng/ml) in MO7 cells by 60%. 3D6 was added 30 min before stimulating with SF and was present for the whole incubation period of 48 h. After 44 h the cells were pulsed for 4 h with 0.5 µCi [³H]thymidine (Amersham, Braunschweig, Germany) and frozen immediately thereafter at -20°C. To count the incorporation of [³H]thymidine, cells were thawed, harvested on glass fibre strips with an automatic cell harvester (Skatron, Tranby, Norway), and the incorporated radioactivity was measured in a scintillation counter (Packard, Frankfurt, Germany). All assays were performed in triplicate.

Cell lysis, SDS gel electrophoresis, and immunoblotting. Cell lysis, SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described (Hallek *et al.*, 1992). Usually, 5 × 10⁶ cells were lysed in 50 µl NP-40 buffer (1% Nonidet P-40, 20 mmol/l Tris base, pH 8.0; 137 mmol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA, 10% glycerol) containing 1 mmol/l phenyl methylsulphonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin and 2 mmol/l sodium orthovanadate and 100 mmol/l sodium fluoride at 4°C for 25 min. Insoluble material was removed by centrifugation at 4°C for 15 min at 10 000 g. In some experiments, cell lysis was performed with 1% Brij instead of 1% NP-40. Protein concentration of the cell lysate was determined by the Biorad protein assay (Biorad, München, Germany). Lysates from 5 × 10⁶ cells were mixed 1:1 with 2× sample buffer, containing 2-mercaptoethanol, and heated at 100°C for 5 min. The eluted proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred electrophoretically from the gel onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) filter (Immobilon P; Millipore, Eschborn, Germany). Unspecific binding sites on the filter were blocked by incubating the PVDF filter in TBS (10 mmol/l Tris base, pH 8.0; 150 mmol/l NaCl) containing 5% bovine serum albumin (BSA; Sigma) for 30 min at room temperature. The blots were incubated overnight with the primary

antibody in TBS with 5% BSA and 0.02% sodium azide. The primary antibody was removed and the blots were then washed four times in TBS. Incubation of the blots with the alkaline phosphatase or horseradish peroxidase conjugated secondary antibody was then performed in TBS with 5% BSA for 2 h. After washing three times in TBS, blots were developed with nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP), or with the ECL detection system (Amersham, Braunschweig, Germany) as indicated by the manufacturer.

Immunoprecipitation and in vitro immune complex kinase assays. Cell lysates (0.75–1 mg of cellular proteins) were preincubated with 5 µg of anti-Kit or anti-Abl-antibody overnight at 4°C, followed by addition of 100 µl of protein G Sepharose beads (Pharmacia, Freiburg, Germany). After 2 h, immunoprecipitates were washed five times with ice-cold NP-40 lysis buffer containing all inhibitors. The immunoprecipitates were then subjected to SDS-PAGE as described above.

For *in vitro* kinase assays, immune complexes were collected on protein G Sepharose beads, washed three times with lysis buffer and once in kinase buffer (50 mmol/l Tris, pH 7.4, 10 mmol/l MnCl₂). The pellet was resuspended in 50 µl kinase buffer containing 10 µCi of [γ -³²P]ATP (Amer-

sham, Braunschweig, Germany) and incubated for 15 min at room temperature. Thereafter, 50 µl of 2 × sample buffer were added and immunoprecipitates were heated at 100°C for 5 min and resolved by SDS-PAGE. ³²P-containing proteins were visualized by autoradiography of the dried gel.

RESULTS

The presence of the p210^{bcr/abl} kinase confers unresponsiveness of myeloid cells to the proliferative effects of Steel factor

To assess if p210^{bcr/abl} interfered with the biological effects of SF, the proliferative effects of this growth factor were examined in *bcr/abl* positive (MO7p210, GM/SO, LAMA-84) and *bcr/abl* negative (MO7) myeloid cell lines. The factor dependent human myeloid cell line, MO7, and a *bcr/abl* transfected MO7 subline, MO7p210, as well as two stable CML cell lines (GM/SO, LAMA-84) which expressed both p210^{bcr/abl} and p145^{c-kit}, were stimulated with various concentrations of rhSF for 48 h. Cell proliferation was assessed by monitoring [³H]thymidine incorporation during the last 4 h of cell culture (Fig 1A). MO7 cells did not grow without growth factors, whereas *bcr/abl* positive cell lines proliferated without growth factors added. SF was

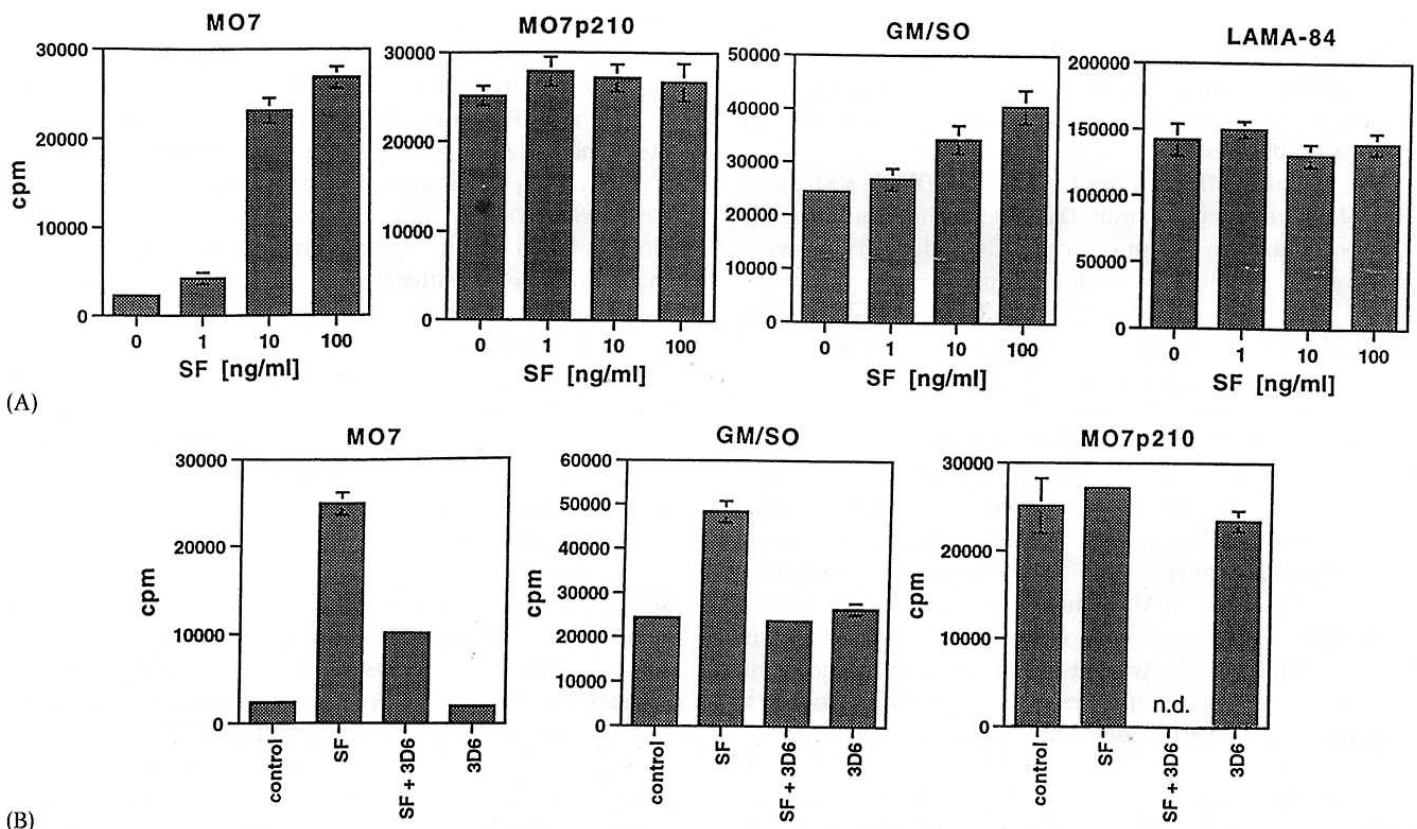


Fig 1. The presence of the p210^{bcr/abl} kinase confers unresponsiveness of myeloid cells to the proliferative effects of Steel factor (SF). (A) The factor-dependent cell line MO7 was stably transfected with a plasmid containing the *bcr/abl* gene, pGD210 (see Methods). The resulting cell line, MO7p210, the parental cell line, MO7, and two stable, *bcr/abl* positive cell lines from CML patients (LAMA-84, GM/SO) were stimulated with various concentrations (0–100 ng/ml) of Steel factor (SF). SF was not able to induce a significant proliferative response in the *bcr/abl* positive cell lines, MO7p210 and LAMA-84. (B) Unresponsiveness of *bcr/abl* positive cell lines (GM/SO, MOp210) to SF is not caused by an autocrine secretion of SF. Cells were stimulated with media (control), 100 ng/ml SF, the SF-neutralizing antibody 3D6 (2 µg/ml), and a combination of SF and 3D6. 3D6 blocked the effects of SF in the SF-responsive cell line MO7, whereas it did not affect the SF-independent [³H]thymidine incorporation of MO7p210 and GM/SO cells. n.d. = not done. All results are shown as mean values ± SD of triplicate experiments. Some columns do not contain error bars because SD values are too small.

able to induce a significant proliferative response in MO7 cells, whereas it did not stimulate the growth of the factor independent *bcr/abl* positive cell lines (MO7p210, LAMA-84). Similar effects were observed when serum-free media which contained 1% BSA instead of FCS were used (data not shown). Of the three *bcr/abl* positive cell lines, only GM/SO cells retained some responsiveness to SF in [³H]thymidine incorporation assays (Fig 1A).

The unresponsiveness of bcr/abl positive cell lines to SF is not caused by an autocrine secretion of SF

A potential mechanism by which the expression of p210^{bcr/abl} could abrogate the responsiveness to SF would be the autocrine secretion of this growth factor in *bcr/abl* transformed cells. In the classic model of autocrine growth, cells stimulate themselves by secretion of growth factors that bind to specific receptors on their surface. If such a mechanism accounted for the unresponsiveness of *bcr/abl* positive cells to SF, the autonomous growth of these cell lines would be inhibited by specific neutralizing anti-Kit antibodies. The ability of the anti-Kit antibody, 3D6, to inhibit cell proliferation was tested alone or in the presence of optimal stimulating rhSF concentrations. As shown in

Fig 1B, 3D6 (2 µg/ml) was able to neutralize the stimulatory effects of rhSF in MO7 cells by 60%, similarly to a previous report (Bühning *et al*, 1993). In GM/SO cells, the stimulatory effects of rhSF on [³H]thymidine incorporation could be completely blocked by 3D6 at this concentration. In marked contrast, the autonomous cell growth of *bcr/abl* positive cell lines (MO7p210, GM/SO) was not inhibited by the neutralizing anti-Kit MAb 3D6. These results demonstrate that the SF-independent growth of *bcr/abl* positive cells is not induced via an autocrine secretion of SF.

The catalytic activity of the p210^{bcr/abl} tyrosine kinase domain is required to replace the proliferative effects of SF

Since we observed that the expression of p145^{c-kit} varied greatly in the different *bcr/abl* positive cell lines (Fig 5A; S. Danhauser-Riedl and M. Hallek, unpublished observations), we looked for a stable experimental system which enabled us to study the interactions of p210^{bcr/abl} and p145^{c-kit} in more detail. For this purpose, the murine, factor-dependent, *c-kit* negative cell line, 32D, was transfected either with the pGD plasmid containing the wild-type *bcr/abl* gene (→32Dp210) or a *bcr/abl* gene with an

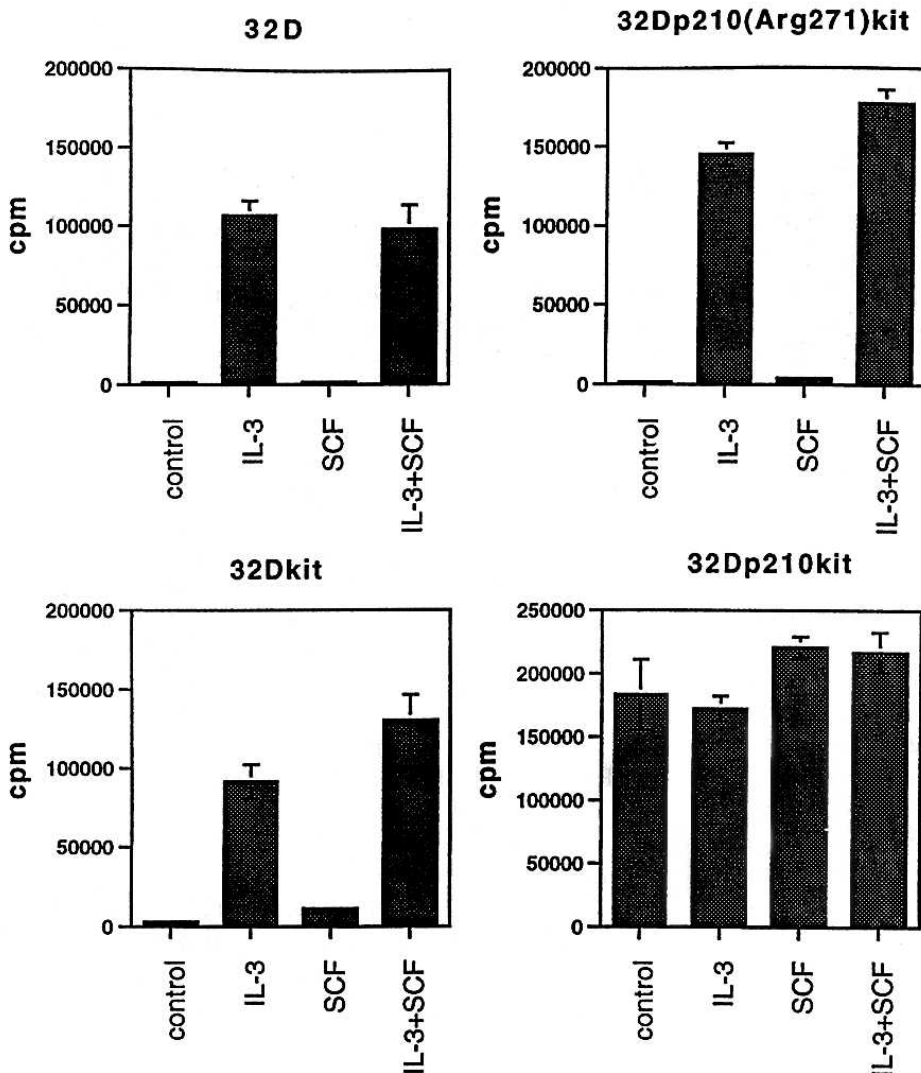


Fig 2. Effects of rmIL-3 (10 ng/ml) and/or rhSF (100 ng/ml) on the proliferation of different sublines of 32D cells which were engineered to express *c-kit* (32Dkit), a kinase negative mutant of *bcr/abl* and *c-kit* (32Dp210(Arg271)kit), or wild-type *bcr/abl* and *c-kit* (32Dp210kit). Cells were incubated with media, 100 ng/ml rhSF, 10 ng/ml rmIL-3, or a combination of rhSF and rmIL-3, and [³H]thymidine incorporation was measured after 48 h (see Methods). Results are shown as mean values ± SD of triplicate experiments. Some columns do not contain error bars because SD values are too small.

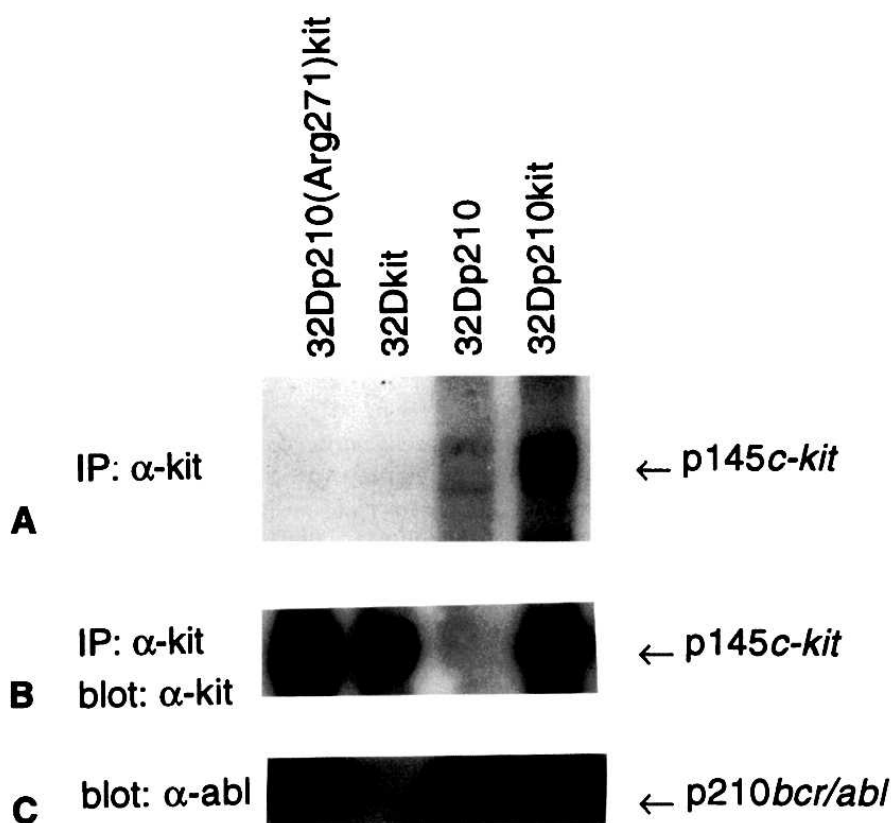


Fig 3. The p145^{c-kit} kinase is activated by wild-type p210^{bcr/abl}, but not by kinase-deficient p210^{bcr/abl} in 32D cells. (A) Immune complex kinase assays with anti-Kit antibody 14A3 in different sublines of 32D cells expressing wild-type p210^{bcr/abl} (32Dp210), a kinase deficient p210^{bcr/abl} mutant and p145^{c-kit} (32Dp210(Arg271)kit), wild-type p210^{bcr/abl} and p145^{c-kit} (32Dp210kit), or p145^{c-kit} (32Dkit). (B) After immunoprecipitation with the anti-Kit antibody 14A3, equal fractions of the lysates used for the immune complex kinase assays shown in (A) were taken to examine the amount of p145^{c-kit} precipitated by anti-Kit immunoblotting. Results were visualized by chemoluminescence (ECL method). (C) Anti-Abl immunoblots (anti-Abl MAb 24-11; ECL method) with lysates from the same experiment indicated that the level of wild type or mutant p210^{bcr/abl} expression was similar in 32Dp210, 32Dp210(Arg271)kit, and 32Dp210kit cells.

inactivating point mutation at the Abl kinase domain (\rightarrow 32Dp210(Arg271) cells). In a second step, these cell lines were infected with a retrovirus containing the human *c-kit* proto-oncogene. Different clones of the resulting sublines, 32Dkit, 32Dp210(Arg271)kit and 32Dp210kit, as well as the parental cell line, 32D, were incubated with 10 ng/ml rmIL-3 or 100 ng/ml rhSF alone or in combination for 48 h, and [³H]thymidine incorporation was assessed (Fig 2). In parental 32D cells, rhSF did not stimulate [³H]thymidine incorporation (control: 1287 \pm 51 cpm; rhSF: 1266 \pm 11 cpm; mean values \pm SD), whereas rmIL-3 stimulated their proliferation (106 763 \pm 9749 cpm). In contrast, rhSF induced a subtle, but significant, increase of [³H]thymidine incorporation in 32Dkit cells which expressed the human p145^{c-kit} receptor, from 1256 \pm 75 cpm (control) to 4746 \pm 79 cpm (rhSF). Moreover, rmIL-3 and rhSF stimulated the [³H]thymidine incorporation of 32Dkit cells in a synergistic manner (Fig 2). In marked contrast, the growth of *bcr/abl* positive 32Dp210kit cells was not further stimulated by rhSF, and no synergy of rhSF with rmIL-3 was observed (Fig 2). 32Dp210(Arg271)kit cells which contained the kinase deficient *bcr/abl* gene continued to depend on rmIL-3 or rhSF for permanent cell growth and retained their responsiveness to rhSF (control: 1.253 \pm 66 cpm; rhSF: 4118 \pm 243 cpm), similar to parental 32Dkit cells. All differences indicated above were statistically significant ($P < 0.01$, Wilcoxon test). Taken together, the results indicate that an intact Abl kinase domain in p210^{bcr/abl} is necessary to confer unresponsiveness of p145^{c-kit} positive 32D cells to the mitogenic effects of rhSF.

The activation of p145^{c-kit} by p210^{bcr/abl} requires an intact Abl kinase domain

The observation that rhSF-independent growth of different *bcr/abl*-transfected myeloid cells (MO7p210 and 32Dp210kit) was apparently not caused by an autocrine rhSF secretion, led us to question whether the cellular SF receptor, p145^{c-kit}, was activated by p210^{bcr/abl} and whether this activation also required an intact Abl kinase domain. To address this, anti-Kit immune complex kinase assays were performed in the different 32D transfectants expressing p145^{c-kit}, p210^{bcr/abl}, and/or a kinase deficient p210^{bcr/abl} mutant. Lysates of the different cell lines were IP-purified with the anti-Kit MAb 14A3, washed four times, incubated in the presence of [γ -³²P]ATP, separated by SDS-PAGE, and phosphorylated proteins visualized by autoradiography. As shown in Fig 3 (upper panel), p145^{c-kit} was only activated in 32Dp210kit cells, but not in 32Dkit, 32Dp210 or 32Dp210(Arg271)kit cells, suggesting that the p145^{c-kit} kinase was only activated in the presence of an intact p210^{bcr/abl} kinase domain. In order to determine the amount of p145^{c-kit} immunoprecipitated with the 14A3 MAb in this experiment, aliquots of the IP reactions were analysed by SDS PAGE and anti-Kit immunoblotting. Similar amounts of p145^{c-kit} protein were precipitated from lysates of the p145^{c-kit} positive cell lines 32Dkit, 32Dp210(Arg271)kit, and 32Dp210kit, whereas p145^{c-kit} was not detectable in 32Dp210 cells (Fig 3, middle panel). Finally, the expression of the different Abl proteins was assessed by anti-Abl immunoblotting using aliquots of cell lysates before anti-Kit IP. The lower panel of Fig 3 shows that similar amounts of mutant or wild-type p210^{bcr/abl} could be detected by anti-Abl immunoblotting in 32Dp210(Arg271)kit, 32Dp210 and

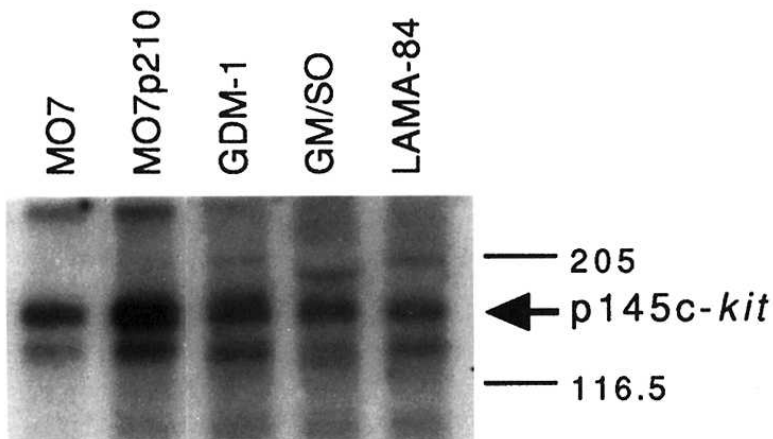
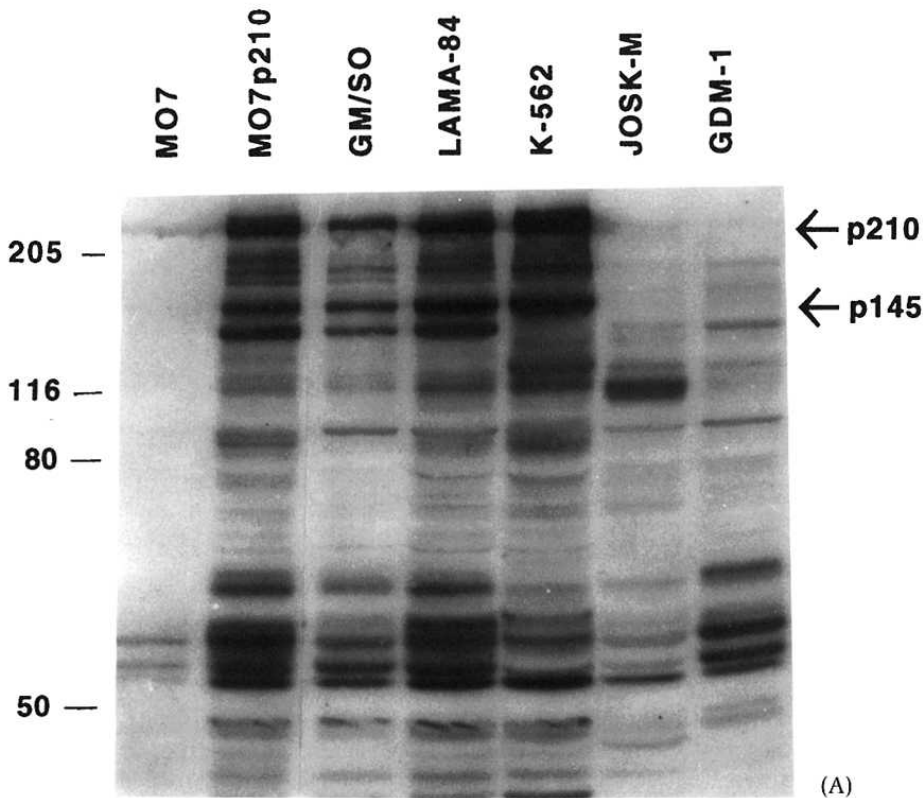


Fig 4. (A) Tyrosine phosphorylation of whole cell lysates from different *c-kit* positive cell lines. MO7, JOSK-M, and GDM-1 cells are *bcr/abl* negative, the other cell lines are *bcr/abl* positive (MO7p210, LAMA-84, GM/SO, K562). (B) Immune complex kinase assays using the anti-Kit antibody 14A3 in different myeloid cell lines (see Methods).

32Dp210kit cells, but not in 32Dkit cells (Fig 3, lower panel). Taken together, the results show that the p210^{bcr/abl} kinase is able to activate the p145^{c-kit} kinase in 32D cells.

The p145^{c-kit} kinase is active and coprecipitates with p210^{bcr/abl} in different human, bcr/abl positive cell lines

In order to explore whether an activation of p145^{c-kit} was also seen in human *bcr/abl* positive cell lines, we performed a series of experiments in different *c-kit* positive cell lines (Hu *et al*, 1994; Pietsch *et al*, 1992). Some of these cell lines were *bcr/abl* positive (MO7p210, GM/SO, LAMA-84, K562), others *bcr/abl* negative (JOSK-M, GDM-1). In a first step, whole cell lysates were analysed by anti-phosphotyrosine immunoblotting in order to determine whether cellular proteins of approximately 145 kD were phosphorylated on tyrosine residues. As shown in Fig 4A, increased levels of tyrosine phosphorylation of multiple cellular proteins were seen in all *bcr/abl* positive cell lines (MO7p210, GM/SO, LAMA-84, K562) as compared with *bcr/abl* negative cell

lines (MO7, JOSK-M, GDM-1). Phosphoproteins with apparent molecular weights of 210 and 140–150 kD (p210, p145) were among the most prominent bands detected by antiphosphotyrosine immunoblotting in *bcr/abl* positive cells. In marked contrast, tyrosine phosphorylation of p210 or p145 was not detectable in *bcr/abl* negative cells (Fig 4A).

Although the phosphorylation of p145 in *bcr/abl* positive cells was suggestive of an activation of p145^{c-kit}, the tyrosine phosphorylation of other proteins of similar molecular weight (e.g. phospholipase C γ) was also possible. In order to investigate the activation of p145^{c-kit} by p210^{bcr/abl} in a more definitive manner, p145^{c-kit} immune complex kinase assays were performed in *bcr/abl* positive and negative human myeloid cell lines. Fig 4B shows that the *bcr/abl*-transfected cell line MO7p210 showed the highest p145^{c-kit} kinase activity; in this experiment, autophosphorylation of p145^{c-kit} was approximately 5 times higher in MO7p210 cells than in MO7 cells, as

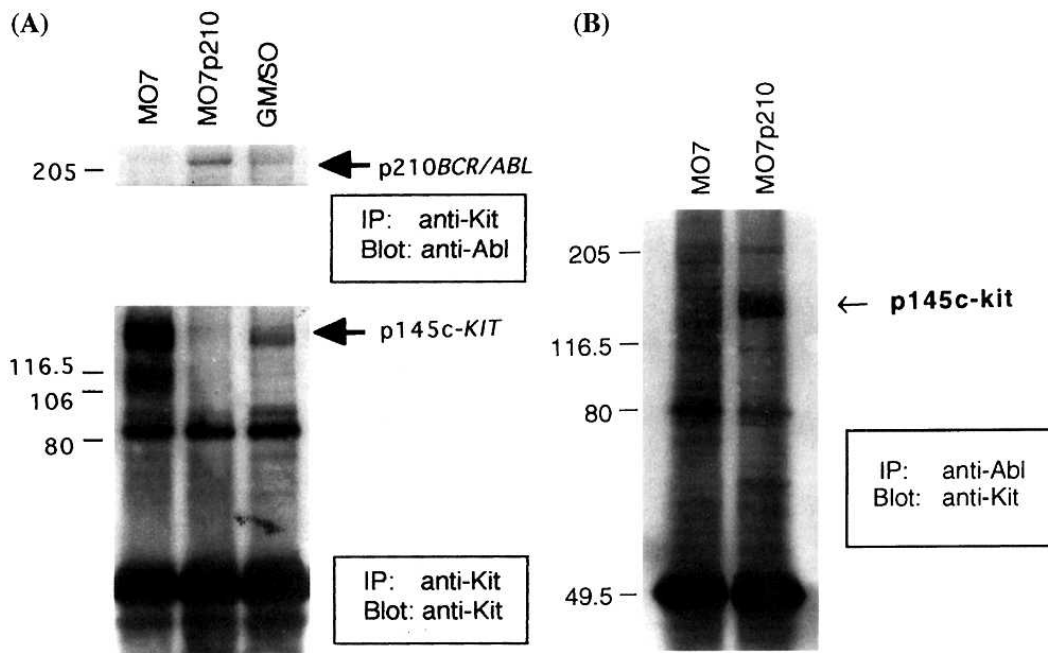


Fig 5. p145^{c-kit} coprecipitates with p210^{BCR/ABL} in different human *bcr/abl* positive cell lines. (A) *Bcr/abl* positive cells (MO7p210, GM/SO) and *bcr/abl* negative MO7 cells were lysed, subjected to immunoprecipitation (IP) with the anti-Kit antibody 14A3, and protein complexes were separated by SDS-PAGE. p210^{BCR/ABL} was detected by immunoblotting with the anti-Abl antibody 24-11. (B) p145^{c-kit} coprecipitates with p210^{BCR/ABL} in MO7 cells transfected with the *bcr/abl* gene. MO7, and MO7p210 cells were lysed, subjected to immunoprecipitation with an anti-Abl antibody, and proteins were separated by SDS-PAGE. p145^{c-kit} was detected by immunoblotting with the anti-Kit antibody 14A3.

demonstrated by optical densitometry of the autoradiographs. Similar results were obtained with anti-phosphotyrosine immunoblots of anti-Kit immunoprecipitates from MO7p210 and MO7 cell lysates. Anti-Kit immunoblot analysis of whole cell lysates or anti-Kit immunoprecipitates of MO7 or MO7p210 cells consistently showed a decreased p145^{c-kit} expression in MO7p210 cells (Fig 5A), demonstrating that the increased p145^{c-kit} kinase activity could not be explained by an elevated p145^{c-kit} protein expression in MO7p210 cells. The cause of the decreased p145^{c-kit} expression in MO7p210 cells is unknown. The other *bcr/abl* positive cell lines (GM/SO, LAMA-84) had also detectable levels of p145^{c-kit} kinase activity, but less than MO7p210 cells (Fig 4B). However, the relatively high p145^{c-kit} kinase activity in the *bcr/abl* negative cell line

GDM-1 suggested that alternative mechanisms of p145^{c-kit} kinase activation may also exist (Fig 4B).

To examine the mechanism of the p145^{c-kit} activation by p210^{BCR/ABL} in more detail, the possibility of an intracellular association with p145^{c-kit} was investigated by co-immunoprecipitation of the two proteins. MO7p210, GM/SO and MO7 cells were lysed, subjected to immunoprecipitation with the anti-Kit antibody 14A3, and protein complexes were separated by SDS-PAGE. Expression of p210^{BCR/ABL} and p145^{c-kit} was analysed by immunoblotting with anti-Abl and anti-Kit MAbs, respectively. As shown in Fig 5A, only small (GM/SO) or minute (MO7p210) amounts of p145^{c-kit} were detected in *bcr/abl* positive cell lines. In marked contrast, MO7 cells contained high levels of p145^{c-kit}. Despite the low level of p145^{c-kit} expression, p210^{BCR/ABL} could be

Table I. CFU assay of normal and CML bone marrow cells stimulated with rhIL-3, rhSF or both.

Stimulation	Conc. (ng/ml)	Healthy donor	CML1	CML2	CML3	CML4
Media	—	0.5 ± 0.7*	0.0 ± 0.0	45.5 ± 0.7	147.5 ± 20.5	129.5 ± 21.9
rhIL-3	20	17.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	44.0 ± 0.0	137.5 ± 9.2	122.5 ± 7.8
rhSF	100	20.5 ± 2.1	4.5 ± 0.7	46.5 ± 4.9	150.5 ± 12.0	136.0 ± 11.3
rhIL-3 + rhSF	20/100	56.0 ± 2.8	26.5 ± 2.1	48.0 ± 2.8	140.5 ± 9.2	128.0 ± 5.7

* Number of colonies (mean of duplicates) and standard deviations (± SD). Data were analysed simultaneously from one healthy donor and four CML patients (CML1–CML4).

co-precipitated with an anti-Kit antibody in lysates of the two *bcr/abl* positive cell lines, as demonstrated by the detection of a 210 kDa protein by anti-Abl immunoblotting (Fig 5A). To confirm this, we examined the coprecipitation of p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} in the reverse direction. Cell lysates of MO7 and MO7p210 cells were subjected to immunoprecipitation (IP) with an anti-Abl antibody. Following extensive washing, the immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and then analysed for the presence of p145^{c-kit} by immunoblotting with the anti-Kit antibody 14A3. As shown in Fig 5B, a 145 kD protein was detected by anti-Kit immunoblotting in Abl IPs of MO7p210 lysates, but not MO7 lysates, confirming that p210^{bcr/abl} associated with p145^{c-kit} in MO7p210 cells.

The expansion of haemopoietic progenitors is unresponsive to rhSF stimulation in most Ph¹ positive CML patients

In order to address the biological relevance which might be caused by a constitutive activation of p145^{c-kit} by p210^{bcr/abl} in CML cells, we examined the influence of the haemopoietic growth factors rhSF and rhIL-3 on the colony forming activity of progenitor cells from normal and CML bone marrow. Cells of normal bone marrow were not able to form colonies without growth factors added to the semisolid culture medium (Table I). After stimulation with rhIL-3 or rhSF, colony formation occurred and was synergistically increased by combinations of both cytokines as previously published (Table I) (Anderson *et al*, 1990; Bernstein *et al*, 1991; Broxmeyer *et al*, 1991; McNiece *et al*, 1991; Zsebo *et al*, 1990b). In one CML patient (CML1) the effects of both growth factors on colony formation were similar to normal bone marrow cells. In marked contrast, the haemopoietic progenitors of the three other CML bone marrow aspirates (CML2, CML3, CML4) formed colonies without growth factors added. Additional stimulation with rhIL-3 and/or rhSF did not increase number of colonies (Table I). These data demonstrate that p210^{bcr/abl} may replace the stimulation of haemopoietic progenitors with rhSF (and with other growth factors like IL-3) in Ph¹ positive CML bone marrow.

DISCUSSION

The Ph¹ translocation is found in the majority of CML patients. The pathogenic principle of the Ph¹ translocation is the generation of a fusion protein, p210^{bcr/abl}, a constitutively active, cytosolic tyrosine kinase. The understanding of the oncogenic effects of this transforming protein is believed to require a detailed knowledge of Abl kinase substrates and regulation of its kinase activity (Feller *et al*, 1994). During past years, several proteins binding to and/or activated by p210^{bcr/abl} have been identified (reviewed in Feller *et al*, 1994). These proteins include rasGAP, Shc, Grb2 and mitogen-activated protein kinase (MAPK), CRKL, the 14-3-3 family protein BAP-1, phospholipase C- γ 1, 3BP1, 3BP2, c-CrkI and II, v-Crk, Nck, PI 3-kinase, Rb, AIP-1, and G and F actin (Druker *et al*, 1992; Gotoh *et al*, 1994; Matsuguchi *et al*, 1994; Matulonis *et al*, 1993; Pendergast *et al*, 1993; Reuther *et al*, 1994; Tauchi *et al*, 1994; ten Hoeve *et al*, 1994). By mutagenetic studies, specific binding domains in

the p210^{bcr/abl} protein or its normal counterparts, Bcr and c-Abl, have been identified for some of these different signalling proteins.

These studies created the concept that p210^{bcr/abl} induces the growth factor-independent activation of several pathways which are involved in the regulation of cell growth. For example, activation of the Ras signalling pathway has been shown to occur by binding of at least two proteins known to activate Ras, Grb2 and Shc, to the p210^{bcr/abl} kinase (Matsuguchi *et al*, 1994; Pendergast *et al*, 1993; Tauchi *et al*, 1994). Mutation of a specific tyrosine residue (Y177) of Bcr neutralizes the transforming effects of *bcr/abl* in fibroblasts by deleting a Grb2 binding site (Pendergast *et al*, 1993). Therefore, activation of downstream signalling proteins by p210^{bcr/abl} is believed to render the survival or expansion of Ph¹ positive haemopoietic progenitor cells less dependent from the influence of haemopoietic growth factors. This paper demonstrates that growth factor receptors such as p145^{c-kit} may also become activated by p210^{bcr/abl}, in addition to the above-mentioned downstream signalling intermediates. The activation of p145^{c-kit} seems to be mediated by a direct or indirect physical association with p210^{bcr/abl} and to require a functionally active Abl kinase domain.

There is still some controversy about the extent to which the constitutive activation of growth factor receptors may contribute to leukaemogenesis (Witte, 1994); there are a few examples demonstrating that the autocrine stimulation by haemopoietic growth factors may induce clonal overgrowth and leukaemogenesis in humans. The specific activation of the IL-3 gene by the t(5;14) translocation in a subset of patients with acute pre-B cell leukemias is well documented (Meeker *et al*, 1990). However, in most cases, the *in vitro* growth of malignant haemopoietic cells requires the presence of specific growth factors. For example, in acute myeloid leukaemia, factor-independent proliferation *in vitro* is seen in 20–30% of cases (Murohashi *et al*, 1989; Young & Griffin, 1986; Young *et al*, 1987). In some cases, leukaemic cells have acquired the ability to produce their own growth factors, whereas in most cases no growth factor production is observed (Murohashi *et al*, 1989; Young & Griffin, 1986; Young *et al*, 1987). It has been shown that the expression of a growth factor gene in a factor dependent, myeloid cell line may induce its transformation (Lang *et al*, 1985).

For Ph¹ positive CML, some factors and/or oncogenes which cooperate with the principal CML oncogene, *bcr/abl*, in inducing malignant cell growth, have recently been identified. In addition to the phosphoprotein substrates which are activated directly by binding to p210^{bcr/abl}, Sirard *et al* (1994) observed that the expression of *bcr/abl* might induce factor-independent growth by an autocrine factor secretion. Growth factors such as GM-CSF and IL-3 were detected at various levels in concentrated conditioned media of *bcr/abl* positive MO7 cells. In their experiments, neutralizing antibodies to IL-3, GM-CSF and mast cell growth factor (MGF) were able to inhibit proliferation of the factor responsive clones by 60–90% (Sirard *et al*, 1994). These results are in apparent contrast to our results which show that the neutralizing anti-Kit antibody, 3D6, does not inhibit the proliferation of *bcr/abl* positive MO7 cells (Fig 1).

Sirard *et al* (1994) show that the neutralizing activity of the anti-MGF antibody was demonstrated only in some of the *bcr/abl*-positive MO7 clones, and that its inhibitory activity was relatively weak (< 20%); moreover, significant effects were observed only with combinations of anti-MGF, anti-GM-CSF and anti-IL-3 antibodies. Finally, their data were obtained using only one cell line, MO7. Although our data provide evidence that an extracellular, autocrine secretion of SF does not stimulate p145^{c-kit} (Figs 1 and 2), we cannot exclude that SF stimulates p145^{c-kit} intracellularly, although the association of p145^{c-kit} with p210^{bcr/abl} suggests that the intracellular interaction of these two signalling proteins (and probably of additional signalling intermediates) might trigger activation of p145^{c-kit}. Experiments with anti-sense oligonucleotides for *c-kit* would help to clarify this question, but were not possible due to the high toxicity of the oligonucleotides used in several experiments with 32D or MO7 cells (data not shown).

Given the fact that p210^{bcr/abl} is an active, cytosolic tyrosine kinase, the heterologous phosphorylation and subsequent activation of the p145^{c-kit} kinase by the Bcr/Abl kinase seems to be an alternative mechanism of activation. In addition to the failure of the anti-Kit antibody, 3D6, to inhibit the growth of *bcr/abl* positive cell lines, evidence for this mechanism is derived from our observation that p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} formed an intracellular complex in MO7p210 cells and in stable cell lines derived from CML patients (Fig 5). Despite intense efforts, the intracellular complex of p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} could not be investigated in myeloid cells of peripheral blood or bone marrow from CML patients, because the level of p145^{c-kit} expression was too low in these cells (data not shown). Nevertheless, these data corroborate the concept of a factor-independent activation of signalling proteins or cellular receptors such as p145^{c-kit} which is mediated by a complex formation with p210^{bcr/abl}.

The role of Steel factor and its receptor, p145^{c-kit}, for leukaemogenesis has been studied in acute myeloid leukaemia (AML), but less in CML. Most AML blasts seem to express p145^{c-kit} at the cell surface, at a density of 600–29 000 receptors per cell (Broudy *et al*, 1992). The expression of Kit or a naturally occurring splice variant, KitA, in AML does not correlate with the AML phenotype or the clinical course of the disease (Piao *et al*, 1994). In AML blasts, p145^{c-kit} seems active and (hyper)phosphorylated. The addition of SF is able to stimulate the proliferation of AML blasts in approximately 50% of cases (Broudy *et al*, 1992; Ikeda *et al*, 1991; Kuriu *et al*, 1991; Pietsch *et al*, 1992). This effect seems to be enhanced by TNF α which stabilizes *c-kit* mRNA expression (Brach *et al*, 1992). So far, an autocrine secretion of SF has not been clearly demonstrated in this disease. The expression of p145^{c-kit} in CML cells has been less studied. A significant fraction of CML cell lines seem to express p145^{c-kit} (Hu *et al*, 1994; Pietsch *et al*, 1992); in agreement with our data, these cell lines could not be stimulated by the addition of SF to the media (Pietsch *et al*, 1992).

At present, the precise biological role of p145^{c-kit} for the pathogenesis of CML remains uncertain. However, *c-kit* seems to be relevant in CML pathogenesis, since the

disruption of *c-kit* mRNA expression by antisense-oligonucleotides inhibits the growth of haemopoietic colonies from patients with myeloproliferative disorders (polycythaemia vera and CML), but not in AML patients (Ratajczak *et al*, 1992). Our data demonstrate that p210^{bcr/abl} is able to replace the interaction of SF with p145^{c-kit}: while SF, when combined with IL-3, has strong effects on the expansion of normal haemopoietic precursors *in vitro*, the expansion of CML bone marrow precursors can be independent of the presence of SF (Table I). This effect was not observed in all patients, indicating that CML cells may retain some susceptibility to the effects of SF (Goselink *et al*, 1992). Taken together, these data allow the formation of a hypothesis for a biological role of p145^{c-kit} in CML pathogenesis: at some stage of CML development, *bcr/abl* positive bone marrow cells may constitutively activate p145^{c-kit} by direct phosphorylation. Together with other growth-promoting and/or anti-apoptotic signals stimulated by p210^{bcr/abl}, the constitutive activation of p145^{c-kit} may provide a survival advantage to the *bcr/abl* positive haemopoietic precursors. The clinical picture which might be linked to this mechanism is the expansion of haemopoietic precursor cells and basophilic cells which is typically seen in CML at the chronic phase (Begemann & Rastetter, 1979).

Based on these assumptions, it may be of interest to study the role of p145^{c-kit} activation by p210^{bcr/abl} for the pathogenesis of CML in a more definitive way, e.g. by expressing the *bcr/abl* gene in bone marrow of *W* mutant mice. One might expect different forms of CML in animals with defective *c-Kit* receptors. Moreover, the precise mode of interaction between p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} remains to be determined. It remains unclear whether the interaction of p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl} is direct or requires the presence of intermediate signalling components. Therefore, further analyses should include the identification of the functional domains of p145^{c-kit} and p210^{bcr/abl}, which are responsible for their interaction by techniques such as site-directed mutagenesis or the use of peptides blocking the interaction. These investigations are currently underway.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) no. Ha 1680/2-1, to M.H. The authors thank Sabine Hildenbrand for her technical assistance.

REFERENCES

- Anderson, D.M., Lyman, S.D., Baird, A., Wignall, J.M., Eisenman, J., Rauch, C., March, C.J., Boswell, H.S., Gimpel, S.D., Cosman, D. & Williams, D.E. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, **63**, 235–243.
- Andrews, R.G., Knitter, G.H., Bartelmez, S.H., Langley, K.E., Farrar, D., Hendren, W., Appelbaum, F.R., Bernstein, I.D. & Zsebo, K.M. (1991) Recombinant human stem cell factor, a *c-kit* ligand, stimulates hematopoiesis in primates. *Blood*, **78**, 1975–1980.

- Begemann, H. & Rastetter, J. (1979) *Atlas of Clinical Hematology*. Springer, Berlin.
- Ben, N.Y., Daley, G.Q., Mes, M.A.M., Witte, O.N. & Baltimore, D. (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, **233**, 212–214.
- Bernstein, I.D., Andrews, R.G. & Zsebo, K.M. (1991) Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34⁺ and CD34⁺lin⁻ cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34⁺lin⁻ cell cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **77**, 2316–2321.
- Brach, M.A., Bühring, H.-J., Gruss, H.-J., Ashman, L.K., Ludwig, W.-D., Mertelsmann, R.H. & Herrmann, F. (1992) Functional expression of c-kit by acute myelogenous leukemia blasts is enhanced by tumor necrosis factor- α through posttranscriptional mRNA stabilization by a labile protein. *Blood*, **80**, 1224–1230.
- Broudy, V.C., Smith, F.O., Lin, N., Zsebo, K.M., Egrie, J. & Bernstein, I.D. (1992) Blasts from patients with acute myelogenous leukemia express functional receptors for stem cell factor. *Blood*, **80**, 60–67.
- Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Lu, L., Hangoc, G., Anderson, D., Cosman, D., Lyman, S.D. & Williams, D.E. (1991) Effect of murine mast cell growth factor (c-kit proto-oncogene ligand) on colony formation by human marrow hemopoietic progenitor cells. *Blood*, **77**, 2142–2149.
- Bühring, H.-J., Herbst, R., Kostka, G., Bossenmaier, B., Bartke, I., Kropshofer, H., Kalbacher, H., Busch, F.W., Müller, C.A., Schlessinger, J. & Ullrich, A. (1993) Modulation of p145c-kit expression in cells of patients with acute myeloblastic leukemia. *Cancer Research*, **53**, 4424–4431.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P. & Bernstein, A. (1988) The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, **335**, 88–89.
- Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Cho, B.C., Donovan, P.J., Jenkins, N.A., Cosman, D., Anderson, D., Lyman, S.D. & Williams, D.E. (1990) Mast cell growth factor maps near the Steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of Steel alleles. *Cell*, **63**, 175–183.
- Daley, G.Q. & Ben, N.Y. (1991) Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Advances in Cancer Research*, **57**, 151–84.
- Daley, G.Q., Van Etten, R.A. & Baltimore, D. (1990) Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, **247**, 824–30.
- Druker, B., Okuda, K., Matulonis, U., Salgia, R., Roberts, T. & Griffin, J.D. (1992) Tyrosine phosphorylation of rasGAP and associated proteins in chronic myelogenous leukemia cell lines. *Blood*, **79**, 2215–2220.
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H. & Baltimore, D. (1994) SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl. *Trends in Biochemical Sciences*, **19**, 453–8.
- Flanagan, J.G. & Leder, P. (1990) The kit ligand: a cell surface molecule altered in Steel mutant fibroblasts. *Cell*, **63**, 185–194.
- Galli, S.J., Zsebo, K.M. & Geissler, E.N. (1994) The kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology*, **55**, 1–96.
- Goselink, H., Williams, D.E., Fibbe, W.E., Wessels, H.W., Beverstock, G.C., Willemze, R. & Falkenburg, J.H.F. (1992) Effect of mast cell growth factor (c-kit ligand) on clonogenic leukemic precursor cells. *Blood*, **80**, 750–757.
- Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K. & Toyama, K. (1994) Potential molecules implicated in downstream signaling pathways of p185^{bcr/abl} and Ph⁺ ALL involve GTPase-activating protein, phospholipase C- γ 1, and phosphatidylinositol 3'-kinase. *Leukemia*, **8**, 115–120.
- Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R. & Grosveld, G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, **36**, 93–99.
- Hallek, M., Druker, B., Lepisto, E.M., Wood, K.M., Ernst, T.J. & Griffin, J.D. (1992) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and Steel factor induce phosphorylation of both unique and overlapping signal transduction intermediates in a human factor dependent hematopoietic cell line. *Journal of Cellular Physiology*, **153**, 176–186.
- Hu, Z.-B., Ma, W., Uphoff, C.C., Quentmeier, H. & Drexler, H.G. (1994) c-kit expression in human megakaryocytic leukemia cell lines. *Blood*, **84**, 2133–2144.
- Ikeda, H., Kanakura, Y., Tamaki, T., Kuriu, A., Kitayama, H., Ishikawa, J., Kanayama, Y., Yonezawa, T., Tarui, S. & Griffin, J.D. (1991) Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*, **78**, 1211–1218.
- Kanakura, Y., Druker, B., Cannistra, S.A., Furukawa, Y., Torimoto, Y. & Griffin, J.D. (1990) Signal transduction of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 receptors involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmic proteins. *Blood*, **76**, 706–715.
- Kuriu, A., Ikeda, H., Kanakura, Y., Griffin, J.D., Druker, B., Yagura, H., Kitayama, H., Ishikawa, J., Nishiure, T., Kanayama, Y., Yonezawa, T. & Seilchiro, T. (1991) Proliferation of human myeloid leukemia cell line associated with the tyrosine phosphorylation and activation of the proto-oncogene c-kit product. *Blood*, **78**, 2834–2840.
- Lang, R.A., Metcalf, D., Gough, N.M., Dunn, A.R. & Gonda, T.J. (1985) Expression of a hematopoietic growth factor cDNA in a factor-independent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell*, **43**, 531–542.
- Martin, F.H., Suggs, S.V., Langley, K.E., Lu, H.S., Ting, J., Okino, K.H., Morris, C.F., McNiece, I., Jacobsen, F.W., Mendiaz, E.A., Birkett, N.C., Smith, K.A., Johnson, M.J., Parker, V.P., Flores, J.C., Patel, A.C., Fisher, E.F., Erjavec, H.O., Herrera, C.J., Wypych, J., Sachdev, R.K., Lin, C.-H., Cupples, R.L. & Zsebo, K.M. (1990) Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, **63**, 203–211.
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. & Griffin, J.D. (1994) Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and Steel factor and is constitutively increased by p210^{bcr/abl}. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 5016–5021.
- Matulonis, U., Salgia, R., Okuda, K., Druker, B. & Griffin, J.D. (1993) Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line. *Experimental Hematology*, **21**, 1460–1466.
- McNiece, I.K., Langley, K.E. & Zsebo, K.M. (1991) Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and Epo to stimulate human progenitor cell of the myeloid and erythroid lineages. *Experimental Hematology*, **19**, 226–231.
- McNiece, I.K. & Zsebo, K.M. (1994) The in vivo hematopoietic role of stem cell factor. *Hematopoietic Growth Factors in Clinical Applications* (ed. by R. H. Mertelsmann and F. Herrmann), pp. 381–391. Marcel Dekker, New York.
- Meeker, T.C., Hardy, D., Willman, C., Hogan, D. & Abrams, J. (1990) Activation of the interleukin-3 gene by chromosomal translocation in acute lymphocytic leukemia with eosinophilia. *Blood*, **76**, 285–289.
- Molineux, G., Migdalska, A., Szmikowski, M., Zsebo, K.M. & Dexter, T.M. (1991) The effects on hematopoiesis of recombinant stem cell factor (ligand for c-kit) administered in vivo to mice either alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, **78**, 961–966.

- Murohashi, I., Tohda, S., Nagata, K., Yamashita, Y. & Nara, N. (1989) Autocrine growth mechanisms of the progenitors of blast cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **74**, 35–41.
- Nocka, K., Huang, E., Beier, D.R., Chu, T.Y., Buck, J., Lahm, H.W., Wellner, D., Leder, P. & Besmer, P. (1990) The hematopoietic growth factor KL is encoded by the *Sl* locus and is the ligand of the *c-kit* receptor, the gene product of the *W* locus. *Cell*, **63**, 225–233.
- Oda, T., Tamura, S., Matsuguchi, T., Griffin, J.D. & Druker, B. (1995) The SH2 domain of ABL is not required for factor independent growth induced by BCR-ABL in a murine myeloid cell line. *Leukemia*, **9**, 295–301.
- Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger, J. & Gishizky, M.L. (1993) BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, **75**, 175–185.
- Piao, X., Curtis, J.E., Minkin, S., Minden, M.D. & Bernstein, A. (1994) Expression of the *Kit* and *KitA* receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood*, **83**, 476–481.
- Pietsch, T., Kyas, U., Steffens, U., Yakisan, E., Hadam, M.R., Ludwig, W.-D., Zsebo, K. & Welte, K. (1992) Effects of human stem cell factor (*c-kit* ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood*, **80**, 1199–1206.
- Qiu, F., Ray, P., Brown, K., Barker, P.E., Jhanwar, S., Ruddle, F.H. & Besmer, P. (1988) Primary structure of *c-kit*: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family: oncogenic activation of *v-kit* involves deletion of extracellular domain and C terminus. *European Molecular Biology Organisation Journal*, **7**, 1003–1011.
- Ratajczak, M.Z., Luger, S.M., DeRiel, K., Abraham, J., Calabretta, B. & Gewirtz, A.M. (1992) Role of the *KIT* protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 1710–1714.
- Reuther, G.W., Fu, H., Cripe, L.D., Collier, R.J. & Pendergast, A.M. (1994) Association of the protein kinases *c-Bcr* and *Bcr-Abl* with proteins of the 14-3-3 family. *Science*, **266**, 129–133.
- Sirard, C., Laneuville, P. & Dick, J.E. (1994) Expression of *bcr-abl* abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic MO7e cells by an autocrine mechanism. *Blood*, **83**, 1575–1585.
- Tauchi, T., Boswell, H.S., Leibowitz, D. & Broxmeyer, H.E. (1994) Coupling between p210^{bcr-abl} and *Shc* and *Grb2* adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to Ras-activation pathway. *Journal of Experimental Medicine*, **179**, 167–175.
- ten Hoeve, J., Arlinghaus, R.B., Guo, J.Q., Heisterkamp, N. & Groffen, J. (1994) Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia⁺ leukemia. *Blood*, **84**, 1731–1736.
- Williams, D.E., Eisenman, J., Baird, A., Rauch, C., Van Ness, K., March, C.J., Park, L.S., Martin, U., Mochizuki, D.Y., Boswell, H.S., Burgess, G.S., Cosman, D. & Lyman, S.D. (1990) Identification of a ligand for the *c-kit* proto-oncogene. *Cell*, **63**, 167–174.
- Witte, O.N. (1994) Mechanisms of leukemogenesis. *The Molecular Basis of Blood Diseases* (ed. by G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. W. Majerus and H. Varmus), pp. 835–859. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Yarden, Y., Kuang, W.-J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T.J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U. & Ullrich, A. (1987) Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *European Molecular Biology Organisation Journal*, **6**, 3341–3351.
- Young, D.C. & Griffin, J.D. (1986) Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **68**, 1178–1181.
- Young, D.C., Wagner, K. & Griffin, J.D. (1987) Constitutive expression of the GM-CSF gene in acute myeloblastic leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, **79**, 100–106.
- Zsebo, K.M., Williams, D.A., Geissler, E.N., Broudy, V.C., Martin, F.H., Atkins, H.L., Hsu, R.-Y., Birkett, N.C., Okino, K.H., Murdock, D.C., Jacobsen, F.W., Langley, K.E., Smith, K.A., Takeishi, T., Cattanach, B.M., Galli, S.J. & Suggs, S.V. (1990a) Stem cell factor is encoded at the *Sl* locus of the mouse and is the ligand for the *c-kit* tyrosine kinase receptor. *Cell*, **63**, 213–224.
- Zsebo, K.M., Wypych, J., McNiece, I., Lu, H.S., Smith, K.A., Karkare, S.B., Sachdev, R.K., Yuschenkoff, V.N., Birkett, N.C., Williams, L.R., Satyagal, V.N., Tung, W., Bosselman, R.A., Mendiaz, E.A. & Langley, K.E. (1990b) Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, **63**, 195–201.

The Src-family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase independent mechanism and phosphorylates the grb2-binding site of Bcr

Markus Warmuth, Manuela Bergmann, Andrea Priess, Kathrin Häuslmann,
Berthold Emmerich and Michael Hallek

The Src Family Kinase Hck Interacts with Bcr-Abl by a Kinase-independent Mechanism and Phosphorylates the Grb2-binding Site of Bcr*

(Received for publication, July 24, 1997, and in revised form, September 24, 1997)

Markus Warmuth, Manuela Bergmann, Andrea Prieß, Kathrin Häuslmann, Bertold Emmerich, and Michael Hallek‡

From the Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, Universität München, D-80336 München, Germany

***bcr-abl*, the oncogene causing chronic myeloid leukemia, encodes a fusion protein with constitutively active tyrosine kinase and transforming capacity in hematopoietic cells. Various intracellular signaling intermediates become activated and/or associate by/with Bcr-Abl, including the Src family kinase Hck. To elucidate some of the structural requirements and functional consequences of the association of Bcr-Abl with Hck, their interaction was investigated in transiently transfected COS7 cells. Neither the complex formation of Hck kinase with Bcr-Abl nor the activation of Hck by Bcr-Abl was dependent on the Abl kinase activity. Both inactivating point mutations of Hck and dephosphorylation of Hck enhanced its complex formation with Bcr-Abl, indicating that their physical interaction was negatively regulated by Hck (auto)phosphorylation. Finally, experiments with a series of kinase negative Bcr-Abl mutants showed that Hck phosphorylated Bcr-Abl and induced the binding of Grb2 to Tyr¹⁷⁷ of Bcr-Abl. Taken together, our results suggest that Bcr-Abl preferentially binds inactive forms of Hck by an Abl kinase-independent mechanism. This physical interaction stimulates the Hck tyrosine kinase, which may then phosphorylate the Grb2-binding site in Bcr-Abl.**

Bcr-Abl (p210^{*bcr-abl*}), the transforming agent in chronic myeloid leukemia, is the gene product of the *bcr-abl* hybrid gene, which results from the Philadelphia translocation t(9;22) by fusing parts of the *c-abl* gene, normally located on chromosome 9, to the *bcr* gene on chromosome 22 (1, 2). Previous studies have demonstrated that Bcr-Abl is a constitutively active tyrosine kinase (3) that has transforming capacity in fibroblasts and hematopoietic cells (4, 5)

Bcr-Abl-induced transformation seems to require the activation of the Ras signaling pathway (6, 7), involving at least two different signaling intermediates, Grb2 and Shc (8–10). In addition, the association of Bcr-Abl with the SH3-SH2 adaptor protein CRKL (11), the activation of the Jak-STAT pathway (12, 13) and of the PI3-Kinase pathway (14–16), the phosphorylation of a variety of cytoskeletal proteins (17–19) and the interaction with cytokine and growth factor receptors (20, 21)

may also play pivotal roles in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. However, the precise mechanisms of transformation by p210^{*bcr-abl*} are unknown, and some characteristics of chronic myeloid leukemia, like induction of blast crisis after chronic phase or prolonged viability of chronic myeloid leukemia cells under serum starvation, are still unexplained.

Some critical domains of Bcr-Abl that are necessary for transformation and induction of leukemia have been identified. The coiled-coil oligomerization domain, localized at the N terminus of Bcr-Abl, seems to induce tetramerization of Bcr-Abl, which is in turn necessary for the constitutive activation of the tyrosine kinase of Bcr-Abl, as well as for the complex formation with other Src homology (SH)¹ 2-containing proteins (22, 23). Further important residues or domains within Bcr are the tyrosine at position 177, which is a binding site for the Ras adaptor protein Grb2 (24), and a SH2-binding motif, alternatively named A-Box and B-Box (25, 26), that binds SH2 domains by a phosphotyrosine-independent mechanism. The N-terminal portion of Abl mainly consists of molecular modules with homology to corresponding domains of the tyrosine kinase c-Src, therefore called SH domains 3 and 2 (27). The putative function of these domains is to direct the subcellular localization of Bcr-Abl to compartments where it interacts with specific proteins via specific binding motifs (28). The optimal binding motif for SH3 domains is polyproline (PXXP) (29), whereas SH2 domains predominantly bind to phosphorylated tyrosine residues in a specific amino acid context (30). In addition, the SH3 and SH2 domains of Bcr-Abl seem to regulate the tyrosine kinase activity as well as the transforming capacity of Abl proteins *in vivo* (26, 31, 32). As in Src family kinases, a kinase domain (SH1 domain) is located next to the SH2 domain. The C-terminal part includes proline-rich motifs that are the molecular anchor for the adaptor protein CRKL (33, 34), a nuclear localization sequence, which is "inactivated" in Abl fusion genes (35), a DNA-binding domain (36), and an actin binding site allowing interaction with the cytoskeleton (37).

We have recently described the activation and association of two members of the Src family of tyrosine kinases, p53/56^{*lyn*} and p59^{*hck*}, with Bcr-Abl (38). Src kinases are composed of a N-terminal unique domain, a PXXP-binding SH3 domain, a phosphotyrosine-binding SH2 domain, a tyrosine kinase domain, and a C-terminal tail, which is closely involved in negative regulation of the kinase activity (39). One of the common features of Src family kinases seems to be their mechanism of autoregulation. Two cooperative mechanisms negatively regulate the activity of Src family kinases (40): the interaction of the

* This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Ha 1680/2-2 and by a stipend of the Studienstiftung des Deutschen Volkes (to M. W.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed: Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt, Ziemssenstrasse 1, D-80336 München, Germany. Tel.: 49-89-5160-2337; Fax: 49-89-5160-4412; E-mail: hallek@imb.uni-muenchen.de.

¹ The abbreviations used are: SH, Src homology; k.n., kinase negative; Ab, antibody; PCR, polymerase chain reaction; wt, wild type; IP, immunoprecipitation; DOTAP, *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methylsulfate.

SH3 domain with a polyproline type II helix located between the SH2 domain and the kinase domain and an interaction of the tyrosine phosphorylated C-terminal tail (Tyr⁵⁰¹ in Hck) with the SH2 domain. On the contrary, phosphorylation of a conserved autophosphorylation site within the activation loop of the kinase domain (Tyr³⁹⁰ in Hck) positively regulates the kinase activity (41). Autophosphorylated Src retains significant activity even if phosphorylated at the negative regulatory tyrosine in the C-terminal tail (42).

This study presents experiments on structural and functional requirements for the interaction of Bcr-Abl with Src kinases. Using several mutants of Bcr-Abl and Hck we were able to demonstrate that the mechanism of interaction of Bcr-Abl with Src-Kinases is independent of Src and Abl kinase activity and is not mediated by any of the known Bcr-Abl-binding motifs. Moreover, the experiments showed that Tyr¹⁷⁷ is phosphorylated by Hck, because coexpression of Hck induced the binding of Grb2 to k.n. Bcr-Abl; this effect was abrogated by a Y177F point mutation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Antibodies—Reagents for cell lysis were purchased from Sigma Chemicals (Deisenhofen, Germany). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed with chemicals provided by Bio-Rad (München, Germany) with the exception of acrylamide/bisacrylamide, which was purchased from Boehringer Bioproducts (Ingelheim, Germany). The polyclonal antibodies (Abs) against Hck (N-30), Lyn (44), Bcr (N-20 and 7C6), Abl (K-12), and Grb2 (c-23) and the anti-phosphotyrosine Ab PY20 as well as the corresponding blocking peptides were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The monoclonal anti-Abl Ab Ab3 was purchased from Oncogene Sciences (Uniondale, NJ). For immunoblotting, all primary Abs were used at 1:1000 dilutions, with the exception of PY20 and anti-Abl Ab3, which were used in a 1:500 dilution. Secondary Abs were either purchased from Bio-Rad (coupled with alkaline phosphatase) or Amersham (coupled with horseradish peroxidase; ECL detection system) and used in dilutions from 1:2000 to 1:5000.

Cloning of *bcr-abl* Point and Deletion Mutants—The wild type cDNA clone of *bcr-abl* was provided by Dr. George Daley (Massachusetts General Hospital, Boston, MA) (43). The point mutations Y177F, R1053L, and Y1294F were introduced by site-directed mutagenesis using the Bio-Rad mutaphage kit. For the introduction of the Y177F mutation, a *bcr-abl* subfragment containing the *bcr* sequences up to the *AccI* restriction site was used. This fragment was subsequently recloned into full-length *bcr-abl* using *StuI/NsiI* digests. The R1053L and Y1294F mutations were introduced into a *KpnI/EcoRI* fragment. Thereafter, a *KpnI/KpnI* fragment from pUCbcr-abl (one *KpnI* site form pUC, the other at position 3082 in *bcr-abl*) containing *bcr* and the *abl* 5' sequences up to the *KpnI* site was added to reconstitute full-length *bcr-abl*. All mutated fragments were completely sequenced to confirm the mutations and to exclude additional mutations.

Double and triple mutants of these residues were accomplished by substitution of the *DraIII/DraIII* fragment of the R1053L mutant with a corresponding fragment containing the Y1294F mutation and/or by substitution of the *HindIII/HindIII* fragment (first *HindIII* site from pUC19 and second *HindIII* site at position 2609 in *bcr-abl*) of the R1053L and Y1294F single mutants and of the R1053L/Y1294F double mutant with a corresponding fragment containing the Y177F mutation. The A/B-box deletion (Δ A/B-box) was introduced by digesting a *BsiEI/SacI* subfragment of Bcr-Abl cloned into pUC19 with *EcoNI* and *BglII*. Following religation the fragment was sequenced to ensure that the reading frame had been saved. Finally, the mutation was repackaged into full-length *bcr-abl* using *BsaAI/NheI* digests. The double mutants *bcr-abl* k.n./Y177F and *bcr-abl* k.n./ Δ A/B-box were obtained using the same strategy as used for the generation of the Y177F/R1053L or Y177F/Y1294F double mutants.

Deletion of amino acids 1–223 of *bcr-abl* was accomplished by PCR mutagenesis using the following primers: 5'-gdcgaattcattgggatgcac-caggecccttac-3' and 5'-ccggaattctcatttgaactctgettaaatcag-3'. The PCR fragment was subcloned into pUC containing an *EcoRI/HindIII* fragment of wild type *bcr-abl* using *EcoRI/NheI* digests. This fragment was converted to full-length by ligating the deleted subfragment with a *HindIII* fragment containing the missing *bcr* and *abl* sequences. For deletion of the noncatalytic C-terminal portion of Bcr-Abl (amino acids 1426–2031), a similar strategy was used. The primer sequences

were 5'-cacgccagctcaacagctctggag-3' and 5'-gggcaggaattctcactgcagcaagg-tactcacaga-3'. The PCR fragment was subcloned into the *KpnI/EcoRI* sites of pUC19. This fragment was converted to full-length by ligation of the subfragment with a *KpnI* fragment containing the residual *bcr-abl* sequences. All PCR reactions were run with Vent polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). Fragments were sequenced to ensure that no mutations had been introduced during the PCR reactions. All *bcr-abl* mutants were cloned into pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Netherlands) for expression in COS7 cells.

Cloning of *hck* Point Mutations—The wild type (wt) cDNA clone of *hck* was purchased from ATCC (Rockville, Maryland). Tyr⁵⁰¹ was mutated to phenylalanine by PCR modification using the following primers: 5'-gaatgtgaattcatgggtgcatgaagccaag-3' and 5'-tggatagaattctcazggct-gctgttgaactggctctc-3'. The resulting full-length *hck* fragment was subcloned into pUC19 and sequenced subsequently. The mutations K269R and Y390F were accomplished using a two-fragment PCR strategy; wt *hck* was cloned into a pUC vector that had been modified by deleting one *PvuI* site. The resulting vector, pUC Δ NdeI/XbaI was used as a template for two PCR reactions producing PCR fragments overlapping at the remaining *PvuI* site within the ampicillin resistance (AmpR) gene of pUC and meeting within the *hck* insert near the triplet to be mutated. Thus, the primers binding in *hck* allowed us to obtain PCR fragments that could be blunt end-ligated without introducing a deletion; one of these primers contained a mutagenic triplet. Finally, the PCR fragments were *PvuI*-digested and ligated. For mutation of Lys²⁶⁹ the following primers were used: 5'-gtggcagtcggacgatgaagccagg-3' and 5'-cttgggtgcttggtaggtggc-3'. Sequences for primers used for the mutation of Tyr³⁹⁰ were 5'-gacaacagttacggctcggaagg-3' and 5'-gtcaat-gaccggccaggccaagtc-3'. The sequences for the primers binding in pUC were 5'-ccagcagcgggaagggcggagc-3' and 5'-ctcttactgtcatgccatccg-3'. All *hck* constructs as well as a wt *lyn* cDNA were cloned into the *EcoRI* site of the expression vector pApuro (vector and *lyn* cDNA provided by Dr. Seth Corey, Children's Hospital of Pittsburgh, PA).

Cell Culture and Transfection—32D, 32D k.n. *bcr-abl* (K1172R) and 32D wt *bcr-abl* (32Dp210) cells were obtained from Dr. Brian J. Druker (Oregon Health Sciences University, Portland, OR). 32D cells were transfected by electroporation as described (44). 32D and 32D *bcr-abl* k.n. cells were grown in RPMI 1640 medium (Boehringer Bioproducts, Ingelheim, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (Boehringer Bioproducts) and 10% WEHI-3B conditioned medium to provide murine interleukin-3. 32Dp210 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum.

COS7 cells were routinely grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/liter glucose. For transient transfection, cells of one confluent 175-cm² flask were diluted 1:3 and replated into 175-cm² tissue culture flasks. 18–24 h thereafter, cells grown to >95% confluency were transiently transfected by lipofection using DOTAP (Boehringer, Mannheim, Germany) according to the guidelines of the manufacturer. Briefly, 50 μ g of *bcr-abl* cDNA and/or 25 μ g of *hck* cDNA were diluted to concentrations of 0.1 μ g/ μ l and preincubated for 15 min with a 6-fold excess (in μ g) of DOTAP. For transfection, Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1.0 g/liter glucose, 10% fetal calf serum, and antibiotics was used. 24 h after transfection, cells were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline (Life Technologies, Inc., Eggenheim, Germany) and serum-deprived by incubation in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1.0 g/liter glucose and 0.5% fetal calf serum. Transfected cells were normally harvested 48 h after transfection by trypsinization. To protect cells from forming unresuspendible aggregates, 10 μ g/ml aprotinin was added to the cells immediately after trypsinization.

Cell Lysis—32D cells were lysed in lysis buffer containing 1% Brij97 as described previously (38). For lysis, COS7 cells were washed twice in ice-cold phosphate-buffered saline to remove remaining serum. Thereafter, cells were lysed in lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris (pH 8.0), 50 mM NaCl, and 10 mM EDTA as well as 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and in most cases 2 mM sodium orthovanadate. In general, pelleted cells from one 175-cm² tissue culture flask (about 5×10^7 cells) were resuspended in 500 μ l of lysis buffer solution and incubated on ice for 25 min. Thereafter insoluble material was removed by centrifugation at 15,000 \times g. Afterward lysates were checked for protein concentrations using a Bio-Rad protein assay.

Immunoprecipitation and Immune Complex Kinase Assay—For immunoprecipitation (IP), 150 μ l of COS7 cell lysate was diluted by the addition of 450 μ l of incubation buffer containing 20 mM Tris (pH 8.0), 50 mM NaCl, and 10 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 2 mM sodium orthovanadate to inhibit phosphatase activity where desired. Lyn, Hck, and Bcr-Abl were

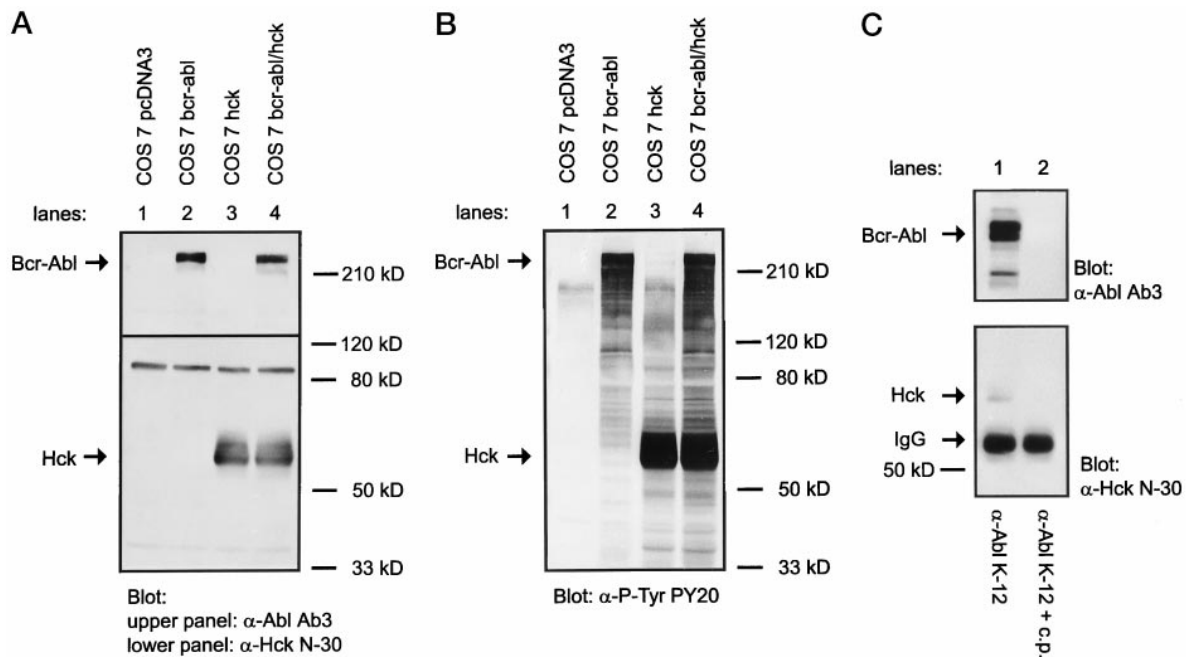


FIG. 1. Complex formation of Hck kinase with Bcr-Abl in COS7 cells. *A*, COS7 cells were transfected by lipofection with control vector (pcDNA3) and two different vectors based on pcDNA3 that contained the full-length cDNAs of wt *bcr-abl* and *hck* (see "Materials and Methods"). 48 h post-transfection, expressed proteins were detected by Western blotting using the indicated antibodies. *B*, the blot of *A* was stripped and reblotted with an anti-phosphotyrosine antibody (α -P-Tyr, PY20). Expression of the Hck and Bcr-Abl kinases resulted in a strong increase of the phosphotyrosine content of cellular proteins. The arrows indicate the apparent molecular masses of Bcr-Abl and Hck kinases. *C*, lysates of COS7 cells (from *A*, lane 4) coexpressing Bcr-Abl and Hck were subjected to immunoprecipitation with a polyclonal anti-Abl antibody, K-12, and subsequent SDS gel electrophoresis. Hck and Bcr-Abl were detected by immunoblotting with the indicated antibodies.

precipitated by adding 5 μ g of the appropriate Abs, *i.e.* anti-Lyn 44 for precipitation of Lyn, anti-Hck N-30 for precipitation of Hck, and either anti-Bcr 7C6 or anti-Abl K-12 for precipitation of Bcr-Abl. IP reactions were incubated overnight at 4 °C on a rotating plate. After 18 h of incubation, 125 μ l of Sepharose A beads (Pharmacia Biotech Inc., Freiburg, Germany) diluted 1:1 in IP buffer (0, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris (pH 8.0), 50 mM NaCl, and 10 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml leupeptin, and 2 mM sodium orthovanadate) were added to each sample. Following an additional 2 h of incubation at 4 °C, the precipitates were washed three times with IP buffer and subsequently boiled in 2 \times sample buffer before loading on SDS gels. Peptide blocking experiments were performed as described previously (38).

For immune complex kinase assays of Src kinases precipitated from 32D cells, cell lysis, and the IP protocol were slightly modified; IP incubation periods were reduced to 3 h, and three times of washing with IP buffer were followed by washing the precipitates one time with kinase buffer (50 mM Tris (pH 7.4), 10 mM MnCl₂). Kinase reaction and analysis of autophosphorylation was performed as described (38).

Gel Electrophoresis and Immunoblotting—Gel electrophoresis and immunoblotting were performed using standard methods. Proteins were either transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Eschborn, Germany) or nitrocellulose (Schleicher & Schüll, Dassel, Germany). Immunoblots with PY20 were developed by using alkaline phosphatase-conjugated secondary Abs at a dilution of 1:2000 in Tris-buffered saline containing 5% bovine serum albumin when polyvinylidene difluoride membranes were probed. For detection of phosphorylated proteins transferred to nitrocellulose or other membranes, secondary horseradish peroxidase-conjugated Abs were used. The ECL detection system was used according to the guidelines of the manufacturer (Amersham, Braunschweig, Germany).

Protein Dephosphorylation—Dephosphorylation was achieved by omitting orthovanadate, a potent phosphatase inhibitor, from the lysis buffer, followed by preincubation of cleared lysate at 4 °C for 24 h prior to IP.

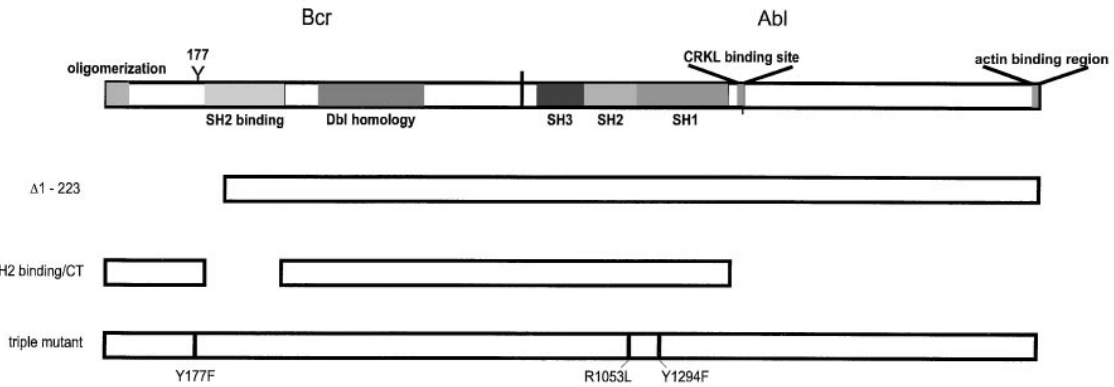
RESULTS

Complex Formation of Hck Kinase with Bcr-Abl in COS7 Cells—We have recently described the association and activation of two kinases of the Src family, p53/56^{lyn} and p59^{hck}, with or by Bcr-Abl (38). The mechanism and function of this inter-

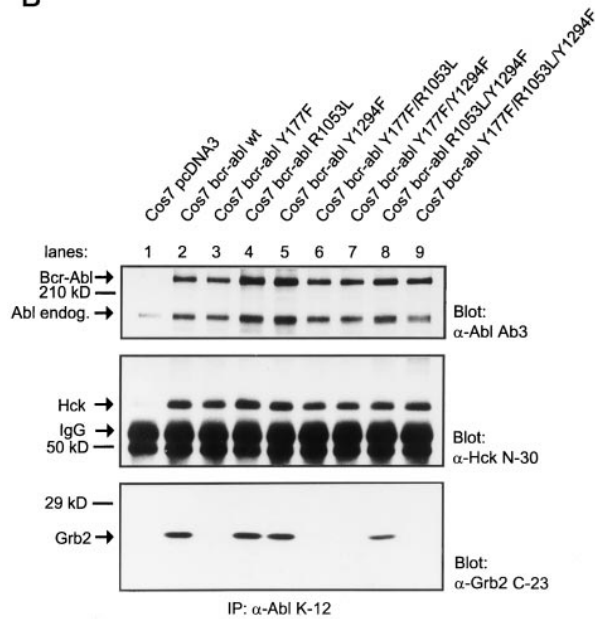
action is unknown. This led us to investigate the structural and functional requirements for the complex formation of Bcr-Abl with Hck kinase, a Src family member preferentially expressed in hematopoietic cells. To establish an expression system that would allow the rapid screening of Bcr-Abl and Hck mutants, wt full-length cDNAs of *bcr-abl* and *hck* were cloned into appropriate mammalian expression vectors (pcDNA3 or pAuro) and prepared for transient transfection into COS7 cells. cDNAs were introduced into these cells using lipofection (see "Materials and Methods"). Fig. 1*A* demonstrates that considerable amounts of Bcr-Abl (lane 2) and Hck (lane 3) were expressed 48 h post-transfection when compared with lysates from cells transfected with control vector (lane 1). Cotransfection of *bcr-abl* and *hck* cDNAs (lane 4) lead to expression of Bcr-Abl and Hck similar to that of single cDNA transfections. To demonstrate that the expressed kinases were active *in vivo*, the blot was stripped and reblotted with an anti-phosphotyrosine Ab, PY20. Fig. 1*B* shows that both kinases were highly (auto)phosphorylated and that expression of these kinases resulted in an increased overall phosphotyrosine content in cellular proteins. Because both kinases, Bcr-Abl and Hck (lanes 2 and 3), seemed maximally activated, no synergism was detectable by anti-phosphotyrosine blotting when Bcr-Abl and Hck were coexpressed.

We then wished to demonstrate that Bcr-Abl and Src kinases were found in a complex in COS7 cells, similar to our previous findings in myeloid cells (38). For this purpose, lysates of transiently transfected COS7 cells coexpressing Bcr-Abl and Hck were subjected to immunoprecipitation with the polyclonal anti-Abl Ab K-12. Subsequent immunoblotting with the anti-Hck Ab N-30 demonstrated that Hck (Fig. 1*C*, lane 1) formed a complex with Bcr-Abl. Coprecipitation was completely blocked by the addition of corresponding blocking peptide, indicating that the coprecipitation of Hck with Bcr-Abl was not caused by unspecific binding (lane 2). Similar results were obtained when

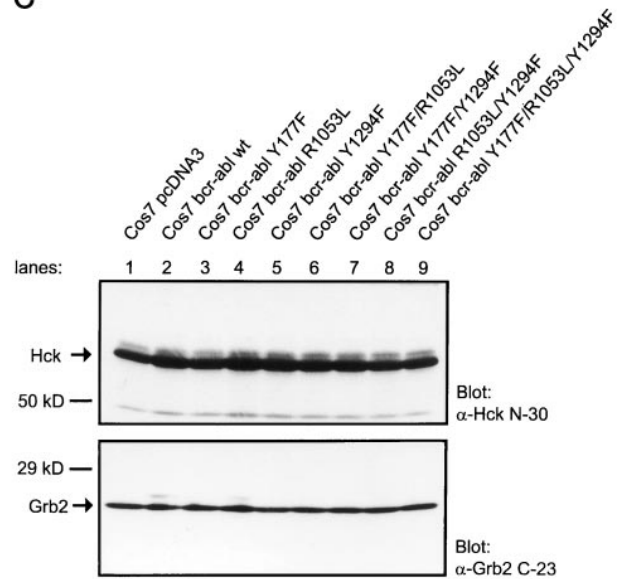
A



B



C



D

	Hck binding	Grb-2 binding
bcr-abl wt	+	+
Δ1-223	+	-
ΔSH2 binding/ΔCT	+	+
triple mutant	+	-

FIG. 2. Mutations of several known binding domains of Bcr-Abl do not disrupt complex formation with Hck kinase. A, schematic presentation of the different point mutations and deletions introduced into Bcr-Abl. B, Hck was transiently cotransfected into COS7 cells in combination with control vector pcDNA3 (lane 1) or with various single, double, or triple mutants of *bcr-abl* as indicated. Lysates of transfected cells were used for anti-Abl IPs and subsequent Western blot analysis using anti-Abl (top panel), anti-Hck (middle panel), and anti-Grb2 (bottom panel) antibodies. The arrows indicate the apparent molecular masses of Bcr-Abl, Hck, and Grb2. C, Western blot of whole cell lysates used for B. D, summary of Hck and Grb2 binding to the following different Bcr-Abl mutants in transiently transfected COS7 cells: a deletion of the N-terminal 223 amino acids (Δ1–223), a combined deletion of the SH2-binding domain of Bcr (ΔSH2 = deletion of A/B-box) and the entire C terminus of Abl (ΔCT), and a triple mutant (Y177F plus R1053L plus Y1294F; see results in B). The different mutants are schematically illustrated in A. Grb2 binding was disrupted by Δ1–223 and the triple mutant containing Y177F, whereas Hck bound to all Bcr-Abl mutants shown.

Bcr-Abl was precipitated using the polyclonal anti-Bcr Ab 7C6 (not shown). Moreover, we could also coprecipitate Bcr-Abl in anti-Hck IPs (not shown). Finally, similar results were obtained in cotransfection and coprecipitation experiments with Lyn and Bcr-Abl in COS7 cells (not shown).

Mutations of Several Known Binding Motifs of Bcr-Abl Do Not Disrupt Complex Formation with Hck Kinase—Several domains have been described as functionally relevant protein interaction modules of Bcr-Abl (Fig. 2A) (8, 45, 46). To investigate which of these regions were necessary for the interaction of Bcr-Abl with Src kinases, several mutations were introduced

into *bcr-abl* cDNAs (Fig. 2A). Surprisingly, none of these mutations introduced into *bcr-abl* alone or in combination was able to disrupt or diminish the formation of Bcr-Abl-Hck complexes in COS7 cells (Fig. 2D). Fig. 2B shows a typical example of such an experiment. The *hck* gene was cotransfected into COS7 cells either in combination with a control vector (lane 1) or with various single, double, or triple *bcr-abl* mutants containing amino acid substitutions recently shown to be critical for Ras activation by Bcr-Abl (8): Tyr¹⁷⁷, a binding site for the Grb2 adaptor protein; Arg¹⁰⁵³, an amino acid embedded in the conserved FLVRESE motif of the Abl SH2 domain that is

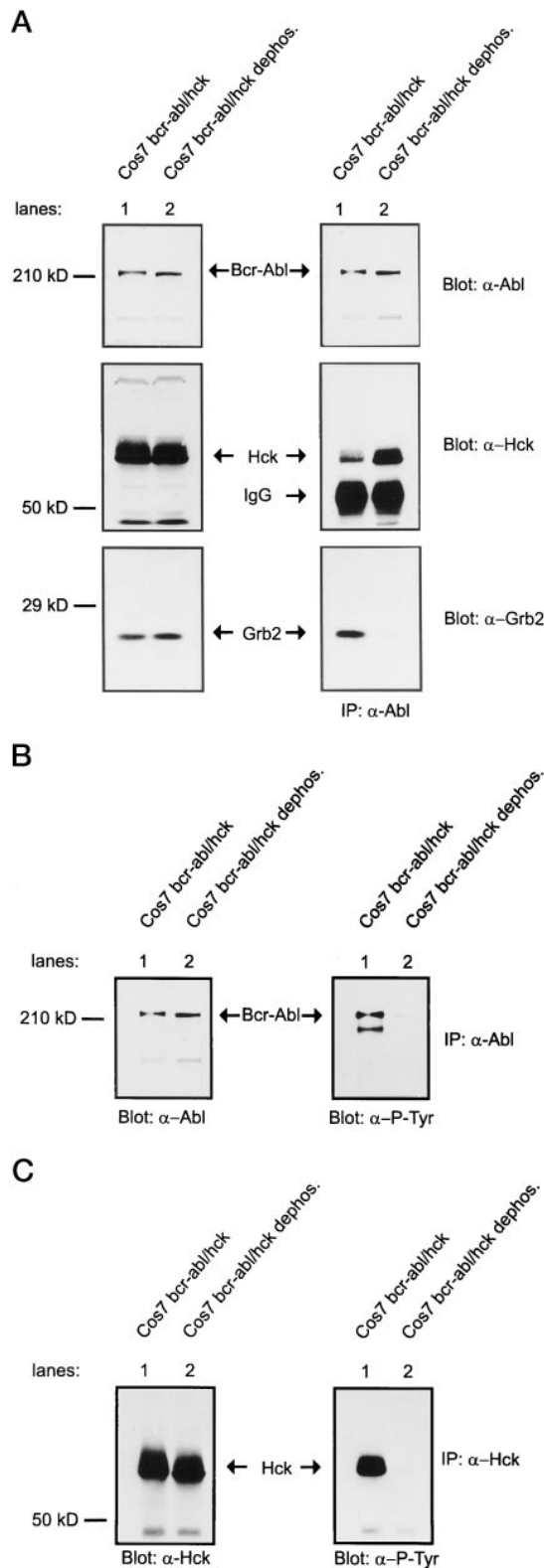


FIG. 3. Dephosphorylation enhances the complex formation between Bcr-Abl and Hck. *A*, right panels, IPs of Bcr-Abl from untreated or dephosphorylated COS7 cell lysates coexpressing Bcr-Abl and Hck. Immune complexes were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. IPs were examined for (co-)precipitated Bcr-Abl, Hck, and Grb2 by immunoblotting with the indicated antibodies. The arrows identify the different proteins at their known apparent molecular masses. *Left panels*, anti-Bcr-Abl, anti-Hck, and anti-Grb2 immunoblots of whole cell lysates. *B*, Bcr-Abl was precipitated from the same lysates used in the experiment shown in *A*. IPs were analyzed for precipitated Bcr-Abl (*left panel*). Thereafter, blots were stripped and

essential for SH2-directed binding to phosphorylated tyrosines; and Tyr¹²⁹⁴, a major autophosphorylation site located in the Abl kinase domain. Lysates of transiently transfected cells were used for anti-Abl IPs. Subsequent immunoblot analysis demonstrated that considerable amounts of Hck were coprecipitated with wt Bcr-Abl (Fig. 2*B*, middle panel, lane 2). However, similar amounts of Hck were found in complexes with all single, double, and triple mutants (lanes 3–9). Similar results were obtained when Lyn was coexpressed with these mutants (not shown). Anti-Grb2 immunoblots showed that the association of Bcr-Abl with the Ras adaptor protein Grb2 was constantly disrupted by the Y177F mutation (Fig. 2*B*, bottom panel, lanes 3, 6, 7, and 9). Anti-Abl immunoblots demonstrated that equal amounts of Bcr-Abl were precipitated from Bcr-Abl-expressing cells (Fig. 2*B*, top panel). Finally, control blots of whole cell lysates showed that comparable amounts of Hck and Grb2 were expressed in the different cells used for the experiment (Fig. 2*C*). Longer exposure of films during chemoluminescence detection also revealed that small amounts of Hck could be coprecipitated with endogenous c-Abl (faintly visible in Fig. 2*B*, lane 1). In addition, the deletion of the coiled-coil oligomerization domain (amino acids 1–223), the complete deletion of an SH2-binding motif in bcr (A/B-Box), and the truncation of the noncatalytical C terminus, which included binding sites for the SH2-SH3 adaptor protein CRKL and an actin-binding region, did not interfere with Bcr-Abl-Src binding (Fig. 2*D*). In conclusion, these results suggest that the interaction of Bcr-Abl and Src kinases is not mediated by any of the known protein interaction modules of Bcr-Abl. Moreover, the coprecipitation of Hck kinase with Bcr-Abl Δ 1–223 lacking the oligomerization site necessary for the constitutive activation of the Bcr-Abl tyrosine kinase (Fig. 2*D*), as well as the complex formation of Hck kinase with endogenous c-Abl that normally has only low kinase activity in COS7 cells, suggested that the tyrosine kinase activity of Bcr-Abl might not be indispensable for this interaction.

Dephosphorylation Induces Complex Formation between Bcr-Abl and Hck—To investigate whether Bcr-Abl-Hck complex formation was due to binding of the SH2 domain of Hck to phosphorylated tyrosine residues in Bcr-Abl (similar to the binding mechanism of Grb2 to Tyr¹⁷⁷) or *vice versa*, immunoprecipitations of Bcr-Abl from COS7 cell lysates coexpressing Bcr-Abl and Hck were performed under conditions allowing dephosphorylation of cellular proteins. Dephosphorylation of cell lysates was achieved by omitting orthovanadate, a phosphatase inhibitor, from the lysis buffer, followed by preincubation of the cleared lysate at 4 °C for 24 h prior to IP. After immunoprecipitation and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the precipitates were assayed by immunoblotting for co-precipitating Hck and Grb2. Dephosphorylation of the lysate resulted in nearly complete abrogation of the binding of Grb2 to Bcr-Abl (Fig. 3*A*, right panels, anti-Grb2 blot, lane 2). In marked contrast to Grb2, Hck was still found in a complex with Bcr-Abl, and the amount of coprecipitated Hck was even enhanced by dephosphorylation (Fig. 3*A*, right panels, anti-Hck blot, lanes 1 and 2). Similar results were obtained with dephosphorylation of Hck by the addition of potato acid phosphatase (not shown). Anti-Abl blotting of the precipitates indicated that similar amounts of Bcr-Abl were precipitated from both lysates (Fig. 3*A*, upper panels). In addition Bcr-Abl, Hck, and Grb2

reblotted with anti-phosphotyrosine antibodies (PY20) (*right panel*). *C*, Hck was precipitated from the same lysates used in the experiment shown in *A*. IPs were analyzed for precipitated Hck (*left panel*). Thereafter, blots were stripped and reblotted with anti-phosphotyrosine antibodies (PY20) (*right panel*).

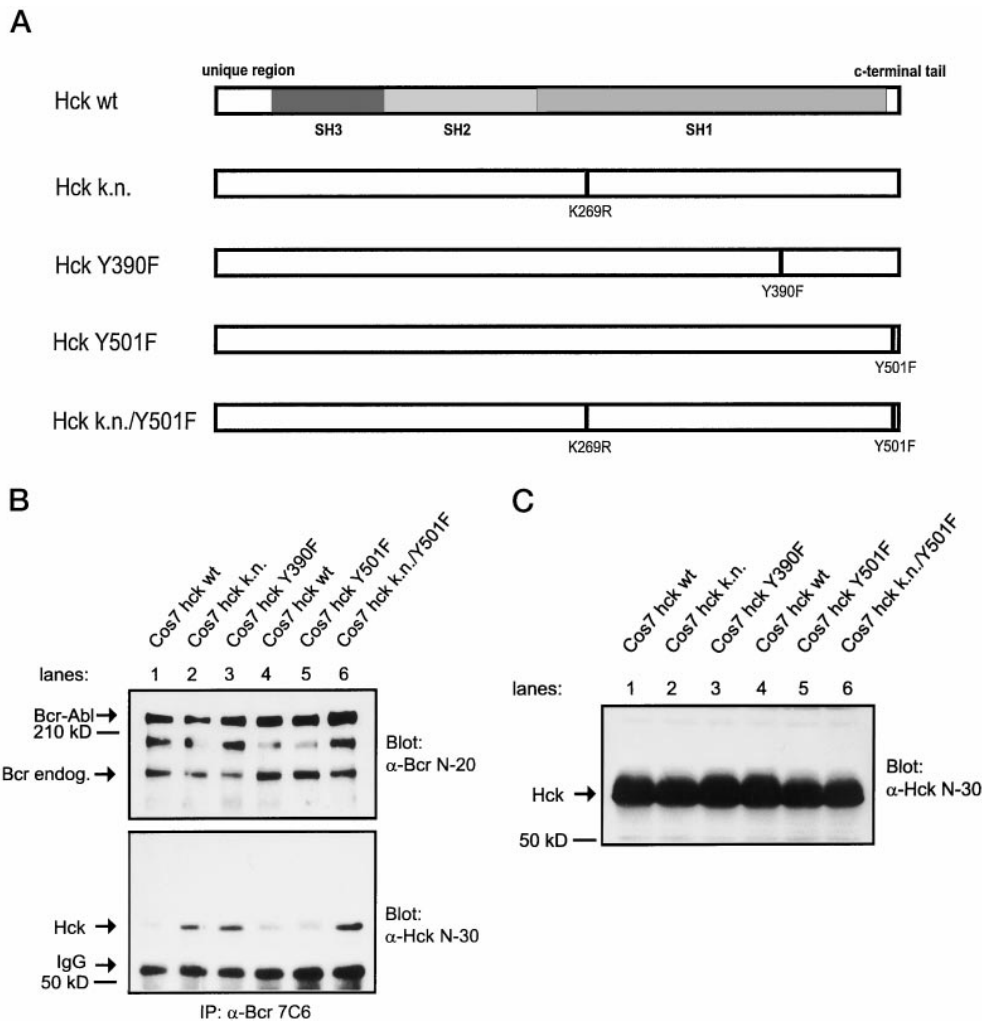


FIG. 4. **Enhanced binding of kinase inactive mutants of Hck to Bcr-Abl.** *A*, schematic representation of the Hck constructs used. The different point mutations are explained in detail under "Results." *B*, all four mutants were coexpressed with wt Bcr-Abl in COS7 cells. Bcr-Abl was precipitated from the lysates using anti-Bcr antiserum (7C6). IPs were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. *C*, anti-Hck immunoblot of whole cell lysates.

blotting showed that about equal amounts of Bcr-Abl, Hck, and Grb2 were detectable in both lysates. Control experiments (Figs. 3, *B* and *C*) were performed to demonstrate that dephosphorylation of the signaling proteins involved was nearly complete. Bcr-Abl (Fig. 3*B*) and Hck (Fig. 3*C*) were precipitated from the lysates used in the experiment of Fig. 3*A*. Bcr-Abl and Hck blots (*left panels*) demonstrated that similar amounts of each protein were precipitated from the lysates using the indicated Abs. Stripping and reblotting with anti-phosphotyrosine Abs revealed that the content of phosphorylated tyrosine residues in Bcr-Abl and in Hck was substantially reduced in the dephosphorylated lysates. Similar observations were made in the *bcr-abl* positive human K562 cell line, where dephosphorylation enhanced the binding of Bcr-Abl to the Src family kinase Lyn (not shown). In conclusion, the results suggested that the complex formation of Src kinases and Bcr-Abl was strongly enhanced by dephosphorylation. Moreover, the interaction of Bcr-Abl and Src kinases was probably not mediated by binding of a SH2 domain to phosphotyrosine residues.

Enhanced Binding of Kinase Inactive Mutants of Hck to Bcr-Abl—The regulation of the activity of Src kinases critically depends on the phosphorylation of at least two distinct tyrosine residues (41). In Hck, C-terminal phosphorylation of Tyr⁵⁰¹ induces a "closed" kinase inactive conformation, whereas phosphorylation of Tyr³⁹⁰ is necessary for full activation of the

catalytic domain. Therefore, we hypothesized that the enhanced binding of Bcr-Abl to dephosphorylated Hck was due to dephosphorylation of one of these two important tyrosine residues.

To test these hypotheses, several activating (Y510F) and inactivating (K269R and Y390F) point mutations were introduced into Hck (Fig. 4*A*): K269R to delete the ATP-binding site of the kinase; Y390F to delete the positive regulatory autophosphorylation site of the catalytic domain; and Y501F to delete the C-terminal negative regulatory phosphorylation site. Finally, the Y501F mutation was combined with the K269R mutation. All four mutants were coexpressed with wt Bcr-Abl in COS7 cells (Fig. 4*B*). Bcr-Abl was precipitated from the lysates using anti-Bcr antisera (7C6). Anti-Bcr blotting showed that similar amounts of Bcr-Abl were precipitated (Fig. 4*B*, *upper panel*, lanes 1–6). Again, wild type Hck was found to co-precipitate with Bcr-Abl (Fig. 4*B*, *lower panel*, lanes 1 and 4). Co-precipitation was not enhanced with the Hck Tyr⁵⁰¹ mutant, suggesting that "dephosphorylation" of this negative regulatory tyrosine residue was not important for the binding to Bcr-Abl. In marked contrast, co-precipitation of all three inactivating Hck mutants (K269R, Y390F, and K269R/Y501F) with Bcr-Abl was significantly increased (Fig. 4*B*, lanes 2, 3, and 6). Control blots of cell lysates with Hck antisera showed that similar amounts of each mutant were expressed (Fig. 4*C*).

These results strongly suggested that Bcr-Abl preferentially bound inactive forms of Hck kinase.

The Abl Kinase Is Not Required for Bcr-Abl-Hck Complex Formation in COS7 Cells—We asked next whether the Abl kinase was required for the interaction of Bcr-Abl with Hck. Therefore, we expressed wt Bcr-Abl or a k.n. mutant of Bcr-Abl (K1172R) with either wt or k.n. (K269R) Hck in COS7 cells. Immunoprecipitations with anti-Abl Abs showed that similar levels of wt Hck were found in complex with wt and k.n. Bcr-Abl (Fig. 5A, lower panel, lanes 1 and 3). As observed above (Fig. 4B), co-immunoprecipitation of both wt and k.n. Bcr-Abl was stronger with k.n. Hck than with wt Hck (Fig. 5A, lower panel). Peptide controls for all precipitations demonstrated the specificity of the precipitating antibodies used (Fig. 5A, lanes 2, 4, 6, and 8). Similar amounts of Hck were expressed in all cell lines (Fig. 5B). Taken together, the results indicated that the complex formation of Hck with Bcr-Abl was enhanced by inactivating the Hck kinase but not the Abl kinase. Furthermore, the kinase activity of Bcr-Abl was not necessary for the complex formation with Hck kinase.

Bcr-Abl Induces Activation of Src Kinases Lyn and Hck in 32D Cells by a Kinase-independent Mechanism—Experiments on the activation of Src kinases Hck and Lyn by Bcr-Abl were difficult in COS7 cells, because both kinases showed a relatively high constitutive activation level in these cells. To address this question, we therefore had to use the murine, interleukin-3-dependent hematopoietic cell line, 32D, which shows a lower activation of Src kinases Hck and Lyn than COS7 cells. In these experiments Src kinases Lyn and Hck were immunoprecipitated from 32D cells transfected with wt or k.n. *bcr-abl* (K1172R). Fig. 6A shows a representative immune complex kinase assay for the Lyn kinase. Compared with control cells, both wt and k.n. Bcr-Abl induced a substantial increase of autophosphorylation of Lyn (Fig. 6A). Blots of aliquots of the IP reactions and of lysates indicated that equal amounts of precipitated Lyn were used for the assay (Fig. 6B) and that comparable amounts of Lyn were expressed in the different 32D sublines (Fig. 6C). Immune complex kinase assays with precipitated Bcr-Abl from the same cell lysates demonstrated that the k.n. Bcr-Abl had a dramatically reduced kinase activity (Fig. 6D). Again, anti-Abl immunoblotting of IP aliquots used for the assay showed that equal amounts were precipitated (Fig. 6E). Comparable results were obtained with Hck, although Hck expression was slightly lower than Lyn expression in 32D cells (not shown). In conclusion, these results further support an Abl kinase-independent mechanism for the activation of Src kinases (Hck and Lyn).

Hck Induced Association of Bcr-Abl with Grb2—Preliminary results indicated that substantial amounts of Grb2 were found in complex with Bcr-Abl, even in 32D cells expressing k.n. Bcr-Abl (K1172R), despite the fact that the docking site for Grb2, Tyr¹⁷⁷ in Bcr, is thought to be (auto)phosphorylated by the Abl kinase. Because we had observed that k.n. Bcr-Abl activated Src kinases (Fig. 6), we hypothesized that Src kinases might phosphorylate Tyr¹⁷⁷ in k.n. Bcr-Abl, thus creating a binding site for Grb2. To demonstrate that Hck induced phosphorylation of k.n. Bcr-Abl, the blot from a previous experiment (Fig. 5) was reprobed using the anti-phosphotyrosine Ab PY20. Fig. 7A shows that the content of phosphorylated tyrosine was dramatically reduced in k.n. Bcr-Abl (K1172R) as compared with wt Bcr-Abl (compare lanes 1 and 3 with lanes 5 and 7). However, k.n. Bcr-Abl showed a slightly increased phosphotyrosine staining, when wt Hck (but not k.n. Hck) was coexpressed, suggesting that Hck was able to induce some phosphorylation of k.n. Bcr-Abl. The same blot then was reanalyzed by anti-Grb2 blotting. As shown in the lower panel of Fig. 7A,

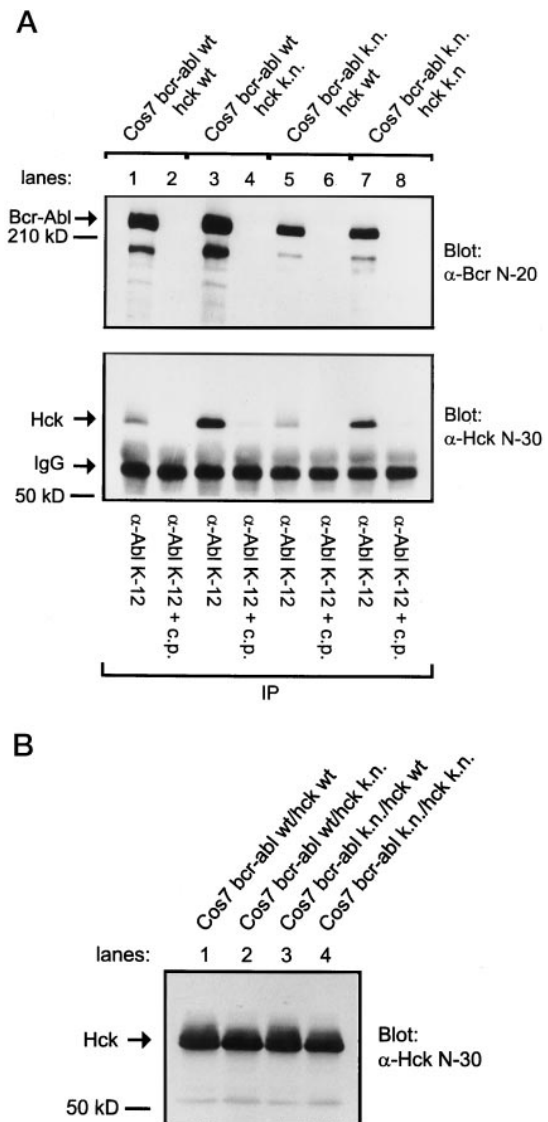


FIG. 5. Kinase-independent interaction of Bcr-Abl with Hck in COS7 cells. A, wt (lanes 1 and 3) or k.n. (lanes 5 and 7) Bcr-Abl was coexpressed with wt (lanes 1 and 5) or k.n. (lanes 3 and 7) Hck, and cells were lysed 48 h post-transfection. Bcr-Abl was precipitated from the lysates using the polyclonal anti-Abl Ab K-12. To control for the specificity of the IP reactions, controls with specific blocking peptides (*c.p.*; see "Materials and Methods") were performed in parallel (lanes 2, 4, 6, and 8). IPs were analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. B, Hck immunoblots of whole cell lysates.

coexpression of wt Hck induced a severalfold increase of the amount of Grb2 bound to k.n. Bcr-Abl. A larger amount of Grb2 co-precipitated with wt Bcr-Abl, indicating that Hck did not completely substitute for the Abl tyrosine kinase activity. In control blots, equal amounts of Hck and Grb2 were detected in the COS7 cell lysates used (Fig. 7B).

The SH2-binding Motif of Bcr Is Not Required for the Effects of Hck Kinase on Tyr¹⁷⁷ Phosphorylation and Grb2 Binding—To study the effects of Hck on Tyr¹⁷⁷ phosphorylation in k.n. Bcr-Abl in more detail, the K1172R mutation was combined with the Y177F point mutation or the deletion of the SH2-binding motif (A/B-Box). With these mutants, we wished to determine whether any of these regions was important for Tyr¹⁷⁷ phosphorylation by Hck kinase (Fig. 8A). Previous studies indicated that isolated SH2 domains of Src kinases are able to bind to Bcr via this SH2-binding motif (A/B-Box) *in vitro* (25). We therefore speculated that the binding of the Hck SH2

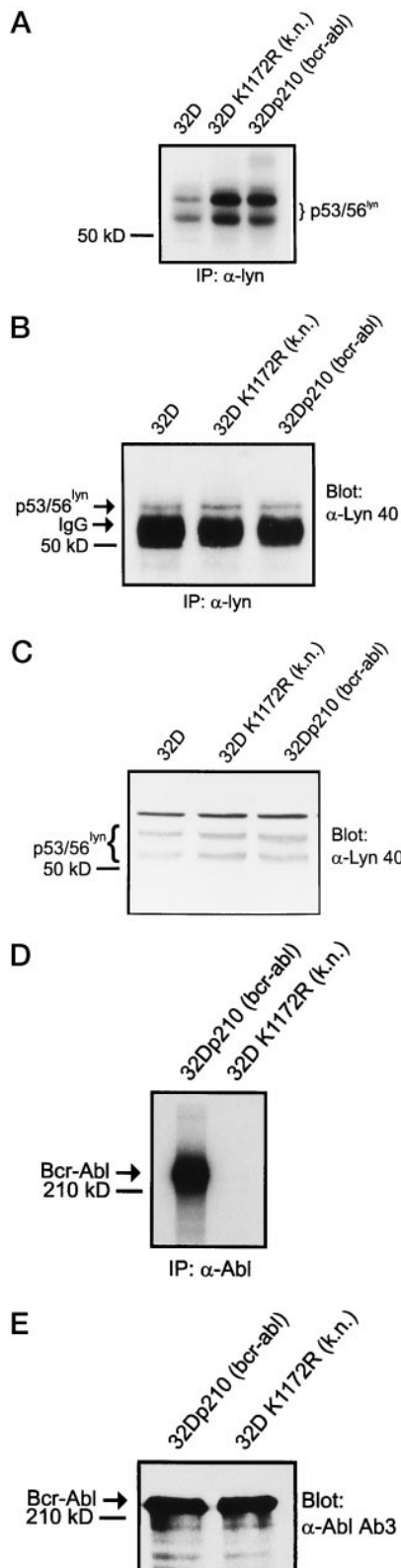


FIG. 6. Bcr-Abl induces activation of Lyn kinase in 32D cells by a Abl kinase-independent mechanism. A, immune complex kinase assays with the Src kinase Lyn precipitated from 32D cells stably transfected with control vector, *bcr-abl* wt, or the k.n. *bcr-abl* mutant (K1172R). Lyn was precipitated from cell lysates, and (auto)phosphorylation of Lyn was measured by ³²P incorporation and subsequent autoradiography. B, Lyn blots of aliquots of the IP reactions. C, Lyn blots of the whole cell lysates used for A. D, immune complex kinase assays of wt and k.n. Bcr-Abl. E, Bcr-Abl immunoblot of whole cell lysates used for D.

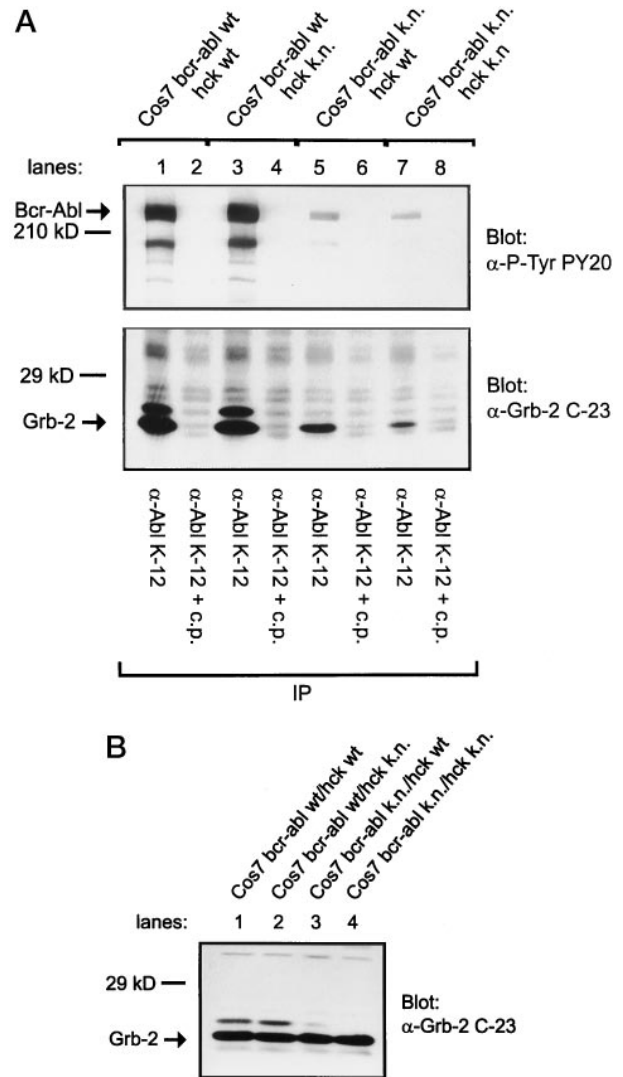


FIG. 7. Hck induces the association of kinase negative Bcr-Abl with Grb2. A, the blot shown in Fig. 5A was reprobed using the anti-phosphotyrosine antibody PY20 (upper panel) and anti-Grb2 antiserum C-23 (lower panel). B, anti-Grb2 immunoblot of whole cell lysates of the same experiment.

domain to the A/B-Box motif could bring the Hck kinase domain into proximity with Tyr¹⁷⁷, thus allowing its transphosphorylation. Fig. 8B shows an immunoblot of COS7 cells transiently transfected with these mutants. Anti-Bcr blotting of precipitated k.n. Bcr-Abl showed that similar amounts of Bcr-Abl were purified from each lysate (Fig. 8B, top panel). Only little Grb2 was detected by anti-Grb2 blotting when wt Hck was not co-expressed (Fig. 8B, bottom panel, lane 1). The expression of wt Hck induced a severalfold increase of the amount of Grb2 coprecipitating with Bcr-Abl (Fig. 8B, bottom panel, lane 2). The association of Grb2 with Bcr-Abl was completely abolished in the Y177F mutant (Fig. 8B, bottom panel, lane 3). In marked contrast, the deletion of the A/B-Box motif had no influence on the amount of Grb2 bound to Bcr-Abl, indicating that this region was not essential for the phosphorylation of Tyr¹⁷⁷ by Hck (Fig. 8B, bottom panel, lane 4). In contrast to Grb2, Hck was found to coprecipitate with all three Bcr-Abl constructs (Fig. 8B, middle panel), suggesting that Tyr¹⁷⁷ acted as a substrate but not as binding site for Hck kinase. Finally, the blot was reprobed with anti-phosphotyrosine Ab to investigate the influence of the different Bcr-Abl mutants on the tyrosine phosphorylation by Hck (Fig. 8C). Again, a slight

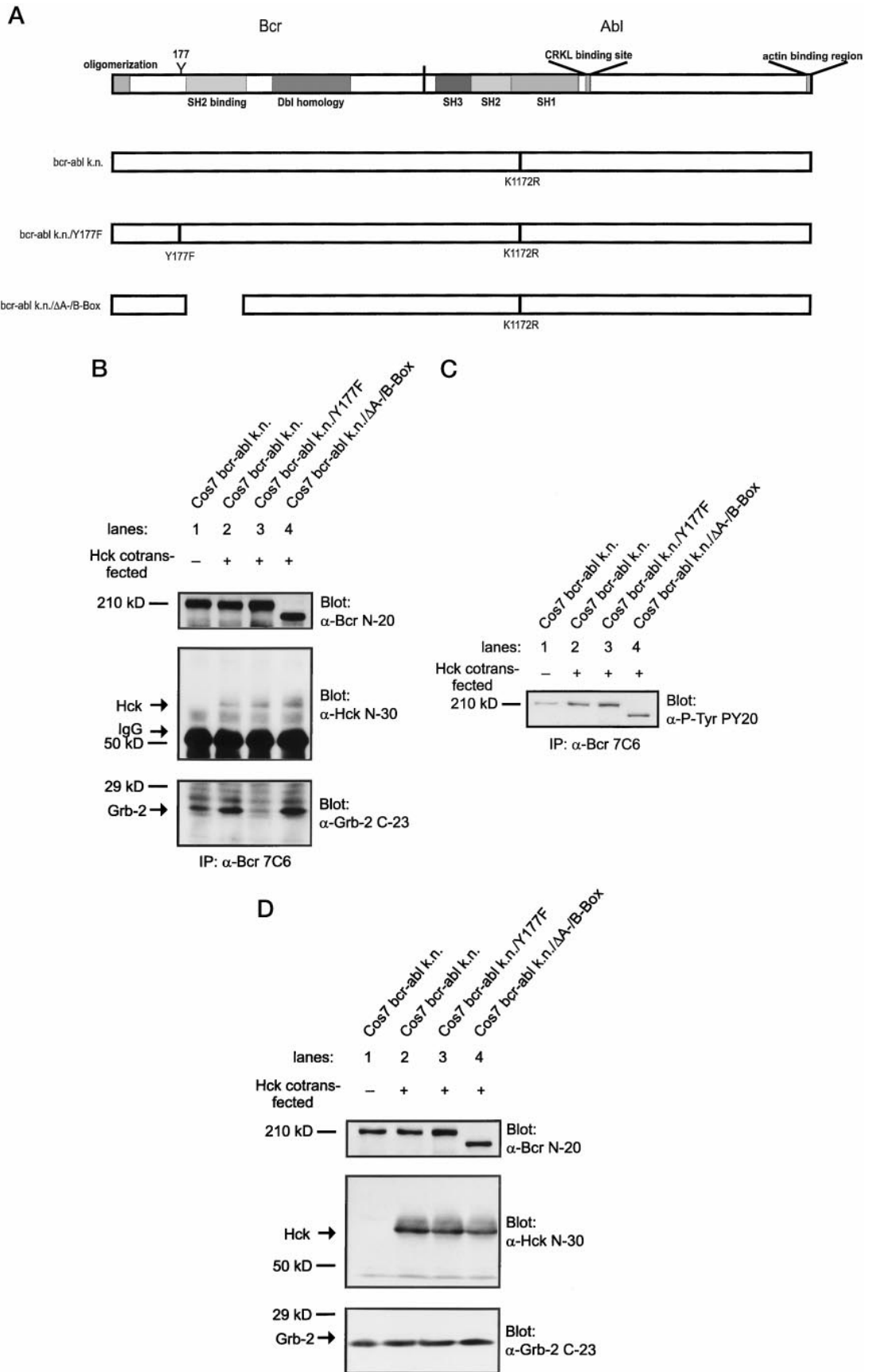


FIG. 8. **The SH2-binding region of Bcr-Abl is not necessary for Hck-induced Grb2 binding.** A, schematic representation of the different Bcr-Abl constructs used for the experiments. B, immunoblot analysis of IP reaction with anti-Bcr antiserum (7C6) from lysates of COS7 cells transfected with the mutants shown in A. C, the blot from B (upper panel) was reprobed with anti-phosphotyrosine antibody. D, immunoblots of whole cell lysates of the same cells.

increase in tyrosine phosphorylation of k.n. Bcr-Abl was detectable when Hck was coexpressed (compare lanes 1 and 2). However, we did not find any decrease in Hck-induced phosphorylation in the two double mutants, suggesting that Tyr¹⁷⁷ may not be the only tyrosine residue to be phosphorylated by Hck. Fig. 8D demonstrates that equal amounts of Bcr-Abl and Grb2 were expressed in all four cell lines and that no Hck was expressed in COS7 cells not transfected with the hck cDNA.

DISCUSSION

We have recently reported the interaction of Bcr-Abl with two Src family kinases, p53/56^{lyn} and p59^{hck} in myeloid cells (38). In this manuscript, structural requirements and functional consequences of the complex formation of Bcr-Abl with Hck and Lyn kinase were investigated. Our results suggest that Hck (and Lyn) kinase might cooperate in phosphorylating a binding site for Grb2, Tyr¹⁷⁷, in Bcr. Although we have not yet been able to identify the domain(s) necessary for the interaction of Bcr-Abl with Src kinases, experiments with dephosphorylated proteins (Fig. 3) and inactivating mutants of Hck (Figs. 4–6) gave some clues concerning potential mechanisms for this association. Src kinases are thought to be regulated by phosphorylation at distinct tyrosine residues (47). Phosphorylation of Tyr³⁹⁰ is necessary for full activation of Hck, whereas phosphorylation of Tyr⁵⁰¹ is thought to negatively regulate the kinase activity by intramolecularly stabilizing an inactive conformation (39, 40). In this regard, the demonstration that dephosphorylation of cellular proteins prior to IP increased Bcr-Abl-Hck complex formation seemed particularly interesting. This observation led us to ask whether inactive Hck kinase could interact with Bcr-Abl. Therefore, we performed additional experiments using two mutations of the Hck kinase, Y390F, inactivating a critical regulatory autophosphorylation site in the kinase domain, and K269R, inactivating the catalytic ATP-binding site. Both mutants showed enhanced binding to Bcr-Abl when compared with wt Hck, confirming that Bcr-Abl preferentially bound to inactive forms of Hck. In addition, both binding and activation of Src kinases Hck and Lyn by Bcr-Abl was shown to be Abl kinase-independent, suggesting that the complex formation with Bcr-Abl alone was sufficient for activation of Src kinases. A similar mechanism has previously been reported for the activation of Lck following the complex formation with Syk in T cells (48).

The comparison of the crystallographic analysis of inactive and active forms of Src kinases has revealed that major structural differences are solely found within the kinase domain of different Src kinases (40, 49, 50). This suggests that the affinity of Src kinases for Bcr-Abl may be regulated by activation state-dependent conformational differences in this domain and that at least one interaction site in Src kinases may be the kinase domain itself, similar to the mechanism proposed for binding of Src kinases to Polyomavirus middle T antigen (51). Binding of Bcr-Abl to the kinase domain of Src kinases may then induce an alteration of the orientation of certain amino acid residues necessary for catalytic activity, finally leading to increased activity and enhanced autophosphorylation of Src kinases. A similar mechanism has previously been proposed for the induction of kinase activity of Cdk2 by Cyclin A (52, 53).

One might ask whether Src kinases are also activated by endogenous c-Abl, because the Abl tyrosine kinase activity does not seem to be necessary for Src kinase activation. Regarding this, it is important to recall that Bcr does not only alter the kinase activity of Abl but also its subcellular distribution. Although c-Abl is normally found in both the nucleus and the cytoplasm, the fusion to Bcr seems to favor its cytosolic localization (54), thus bringing it in closer proximity to Src kinases. The transfer of the (Bcr)Abl kinase to the cytoplasm is sup-

posed to induce new signaling events, including the activation of (membrane-associated) Src kinases.

In addition to the evidence for a physical interaction of Bcr-Abl and Src kinases, our results indicate that these kinases may also functionally cooperate with each other. Co-expression of Hck with a k.n. mutant of Bcr-Abl resulted in increased tyrosine phosphorylation of Bcr-Abl. Further analysis of this Hck-induced phosphorylation of Bcr-Abl demonstrated that one tyrosine to be phosphorylated by Hck was Tyr¹⁷⁷, resulting in increased binding of Grb2 to Abl kinase negative Bcr-Abl. A similar effect has been reported for the coexpression of Bcr and Fps/Fes tyrosine kinases in Sf9 insect cells by Maru *et al.* (55). In some contrast to the findings of Maru and colleagues, our kinase negative double mutants containing either a point mutation of Tyr¹⁷⁷ or a deletion of amino acids 190–412 (comprising a total of 8 tyrosine residues) barely showed any decrease in tyrosine phosphorylation, strongly suggesting that multiple tyrosine residues within Bcr-Abl might be substrates for Src kinases. Although it is unclear whether Src kinases are necessary for the phosphorylation of tyrosine residues in wt Bcr-Abl *in vivo*, the phosphorylation of k.n. Bcr-Abl by activated Src kinases may explain some so far unexplained findings in 32D cells expressing high levels of k.n. Bcr-Abl. In these cells, we found substantial amounts of Grb2 in complex with k.n. Bcr-Abl, an observation that contrasts the current opinion that Tyr¹⁷⁷ is an autophosphorylation site of the Abl tyrosine kinase. Because Src kinases were activated in these cells by an Abl kinase-independent mechanism, they were likely to substitute for the Abl kinase activity in phosphorylating Tyr¹⁷⁷. Whether Src kinases cooperate with Bcr-Abl in activating the Ras signaling pathway remains to be determined.

Taken together, the results imply that Bcr-Abl preferentially binds inactive Hck molecules. One might hypothesize that this interaction leads to the activation of Hck by altering the three-dimensional structure of Hck. Once activated, Hck may lose its affinity for its “activation site” in Bcr-Abl and become oriented toward its substrates, one of which is located in Bcr-Abl itself. Further experiments will now have to elucidate the precise mechanism of activation of Src kinases by Bcr-Abl and the pathophysiological role of this interaction in Philadelphia chromosome positive leukemias.

Acknowledgment—We thank Annette Schulz for help in the early phase of this project.

REFERENCES

- Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N., and Baltimore, D. (1986) *Science* **233**, 212–214
- Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosfeld, G. (1984) *Cell* **36**, 93–99
- Konopka, J. B., Watanabe, S. M., and Witte, O. N. (1984) *Cell* **37**, 1035–1042
- Lugo, T. G., and Witte, O. N. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1263–1270
- Daley, G. Q., and Baltimore, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 9312–9316
- Sawyers, C. L., McLaughlin, J., and Witte, O. N. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 307–313
- Skorski, T., Nieborowska-Kaskorska, M., Szczylik, C., Kanakaraj, P., Perotti, D., Zon, G., Gewirtz, A., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995) *Cancer Res.* **55**, 2275–2278
- Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E. H., Saffran, D. C., and Witte, O. N. (1995) *Cell* **82**, 981–988
- Cortez, D., Kadlec, L., and Pendergast, A. M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5531–5541
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. J., and Griffin, J. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5016–5021
- ten Hoeve, J., Arlinghaus, R., Guo, J., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1994) *Blood* **84**, 1731–1736
- Ilaria, R. L., Jr., and Van Etten, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31704–31710
- Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X., and Sawyers, C. (1996) *Oncogene* **13**, 247–254
- Jain, S., Susa, M., Keeler, M., Carlesso, N., Druker, B., and Varticovski, L. (1996) *Blood* **88**, 1542–1550
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M., Pisick, E., Xu, G., Li, J., Prasad, K., and Griffin, J. (1996) *Oncogene* **12**, 839–846
- Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M., Wen, S., Zon, G., Gewirtz, A., Perussia, B., and Calabretta, B. (1995) *Blood* **86**,

- 726–736
17. Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., Tauchi, T., Boswell, H. S., Broxmeyer, H. E., and Toyama, K. (1995) *Exp. Hematol.* **23**, 1153–1159
 18. Salgia, R., Li, J.-L., Lo, S. H., Brunkhorst, B., Kansas, G. S., Sobhany, E. S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., Tantravahi, R., Chen, L. B., and Griffin, J. D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5039–5047
 19. Salgia, R., Brunkhorst, B., Pisick, E., Li, J., Lo, S., Chen, L., and Griffin, J. (1995) *Oncogene* **11**, 1149–1155
 20. Wilson-Rawls, J., Xie, S., Liu, J., Laneuville, P., and Arlinghaus, R. (1996) *Cancer Res.* **56**, 3426–3430
 21. Hallek, M., Danhauser-Riedl, S., Herbst, R., Warmuth, M., Winkler, A., Kolb, H. J., Druker, B. J., Emmerich, B., Griffin, J. D., and Ullrich, A. (1996) *Br. J. Haematol.* **94**, 5–16
 22. Tauchi, T., Miyazawa, K., Feng, G.-S., Broxmeyer, H. E., and Toyama, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 1389–1394
 23. McWhirter, J. R., Galasso, D. L., and Wang, J. Y. J. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7587–7595
 24. Pendergast, A. M., Quilliam, L. A., Cripe, L. D., Bassing, C. H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K. M., Der, C. J., Schlessinger, J., and Gishizky, M. L. (1993) *Cell* **75**, 175–185
 25. Muller, A. J., Pendergast, A. M., Havlik, M. H., Puil, L., Pawson, T., and Witte, O. N. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5087–5093
 26. Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y., and Witte, O. N. (1991) *Cell* **66**, 161–171
 27. Ramakrishnan, L., and Rosenberg, N. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **989**, 209–224
 28. Pawson, T. (1995) *Nature* **373**, 573–580
 29. Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993) *Science* **259**, 1157–1161
 30. Songyang, Z., and Cantley, L. C. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 470–475
 31. Mayer, B., and Baltimore, D. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2883–2894
 32. Walkenhorst, J., Goga, A., Witte, O., and Superti-Furga, G. (1996) *Oncogene* **12**, 1513–1520
 33. Heaney, C., Kolibaba, K., Bhat, A., Oda, T., Ohno, S., Fanning, S., and Druker, B. (1997) *Blood* **89**, 297–306
 34. Senechal, K., Halpern, J., and Sawyers, C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23255–23261
 35. Van Etten, R., Jackson, P., and Baltimore, D. (1989) *Cell* **58**, 669–678
 36. Kipreos, E. T., and Wang, J. Y. J. (1992) *Science* **256**, 382–385
 37. McWhirter, J. R., and Wang, J. Y. J. (1993) *EMBO J.* **12**, 1533–1546
 38. Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., and Hallek, M. (1996) *Cancer Res.* **56**, 3589–3596
 39. Brown, M., and Cooper, J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 121–149
 40. Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997) *Nature* **385**, 602–609
 41. Cooper, J., and MacAuley, A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4232–4236
 42. Boerner, R., Kassel, D., Barker, S., Ellis, B., DeLacy, P., and Knight, W. (1996) *Biochemistry* **35**, 9519–9525
 43. Daley, G. Q., Van Etten, R. A., and Baltimore, D. (1990) *Science* **247**, 824–830
 44. Druker, B. J., Okuda, K., Matulonis, U., Salgia, R., Roberts, T., and Griffin, J. D. (1992) *Blood* **79**, 2215–2220
 45. Feller, S. M., Ren, R., Hanafusa, H., and Baltimore, D. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 453–458
 46. Cohen, G. B., Ren, R., and Baltimore, D. (1995) *Cell* **80**, 237–248
 47. Cooper, J. A., and Howell, B. W. (1993) *Cell* **73**, 1051–1054
 48. Couture, C., Baier, G., Oetken, C., Williams, S., Telford, D., Marie-Cardine, A., Baier-Bitterlich, G., Fischer, F., Burn, P., Altman, A., and Mustelin, T. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5249–5258
 49. Yamaguchi, H., and Hendrickson, W. A. (1996) *Nature* **384**, 484–489
 50. Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C., Kuriyan, J., and Miller, W. (1997) *Nature* **385**, 650–653
 51. Dunant, N., Senften, M., and Ballmer-Hofer, K. (1996) *J. Virol.* **70**, 1323–1330
 52. Jeffrey, P., Russo, A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. (1995) *Nature* **376**, 313–320
 53. Johnson, L. N., Noble, M. E. M., and Owen, D. J. (1996) *Cell* **85**, 149–158
 54. Wetzler, M., Talpaz, M., Van Etten, R., Hirsh-Ginsberg, C., Beran, M., and Kurzrock, R. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 1925–1939
 55. Maru, Y., Peters, K. L., Afar, D. E. H., Shibuya, M., Witte, O. N., and Smithgall, T. E. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 835–842

Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases

Michael Schaeffer, Michaela Schneiderbauer, Sascha Weidler, Rosario Tavares,
Markus Warmuth, Gabriele de Vos and Michael Hallek

Signaling through a Novel Domain of gp130 Mediates Cell Proliferation and Activation of Hck and Erk Kinases

MICHAEL SCHAEFFER, MICHAELA SCHNEIDERBAUER, SASCHA WEIDLER, ROSÁRIO TAVARES, MARKUS WARMUTH, GABRIELE DE VOS, AND MICHAEL HALLEK*

Medizinische Klinik III, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, and Klinische Kooperationsgruppe Gentherapie, National Research Center for Health and Environment (GSF), D-81377 Munich, Germany

Received 1 June 2001/Returned for modification 19 July 2001/Accepted 16 August 2001

Interleukin-6 (IL-6) induces the activation of the Src family kinase Hck, which is associated with the IL-6 receptor β -chain, gp130. Here we describe the identification of an “acidic” domain comprising amino acids 771 to 811 of gp130 as a binding region for Hck, which mediates proliferative signaling. The deletion of this region of gp130 (i.e., in deletion mutant d771-811) resulted in a significant reduction of Hck kinase activity and cell proliferation upon stimulation of gp130 compared to wild-type gp130. In addition, d771-811 disrupted the growth factor-stimulated activation of Erk and the dephosphorylation of Pyk2. Based on these findings, we propose a novel, acidic domain of gp130, which is responsible for the activation of Hck, Erk, and Pyk2 and signals cell proliferation upon growth factor stimulation.

To exert its biological effects, interleukin-6 (IL-6) must bind to the IL-6 receptor (IL-6R), composed of two α -chains (IL-6R α , 80 kDa) and two β -chains (IL-6R β or gp130, 130 kDa). Two moieties of IL-6 and two pairs of these receptor chains form a functional hexameric IL-6R complex (42, 43, 55). The subsequent intracellular signaling events are activated via gp130, which is the common β -chain of the receptors for cardiotrophin 1, ciliary neurotrophic factor, oncostatin M, leukemia inhibitory factor, IL-11, and IL-6 (24). Activation of the IL-6R stimulates at least two major signaling pathways, the Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase 2 (Shp-2)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade (8, 26, 31, 32, 41, 46) and the Janus kinase (Jak)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway (6, 18, 25, 45). It was shown in recent *in vivo* studies that gp130-mediated signals were regulated by a balance between these two pathways (33). However, the signaling cascades mediating IL-6-induced cell growth are not fully defined. It was shown that Jak and STAT proteins are activated by IL-6 in multiple myeloma (MM) cells independently of the proliferative response. In contrast, MAPK was activated only in cells showing a proliferative response to IL-6 (32). Moreover, the physical separation of gp130 and Shp-2 reduced cell proliferation (26).

We have shown previously that at least three members of the Src family of tyrosine kinases, i.e., Fyn, Hck, and Lyn, coprecipitate with gp130 in lysates of MM cells (20). Stimulation of cells with IL-6 increased the activity of these kinases. The association of Hck kinase with gp130 appeared to be stronger than either of the other two kinases. Therefore, we decided to focus on the Hck kinase to elucidate the mechanism(s) and biological significance of the IL-6-mediated Src kinase activa-

tion. To identify the gp130 binding domain for Hck, several mutants of gp130 were constructed. These mutants were based on a chimeric receptor consisting of the extracellular part of the erythropoietin receptor (EPOR) and the intracellular part of human gp130 (23). These EPOR/gp130 receptor chimeras (Eg) allowed study of the activation of gp130 by erythropoietin (EPO) after transfection of a single molecule. By genetically modifying these chimeric receptor constructs, we identified a 41-amino-acid (aa) stretch (aa 771 to 811) located C terminal of the Box3 motif of gp130, which was necessary for Hck binding. This region was rich in negatively charged amino acids and therefore designated acidic domain in analogy to the Lck binding region of the IL-2R β -chain (22). Both C-terminal truncation up to aa 775 of gp130 and the deletion of its acidic domain significantly reduced the gp130-mediated cell proliferation upon growth factor stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Purified recombinant murine EPO (rmEPO) was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany) and purified murine IL-3 (rmIL-3) was obtained from Biosource International (Nivelles, Belgium). All reagents for cell lysis, protein extraction, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and immunoblotting were purchased from Sigma (Munich, Germany) or Bio-Rad (Munich, Germany). Protein A-Sepharose was obtained from Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany). The purified mouse monoclonal antibodies anti-His (C terminal) and anti-V5 were purchased from Invitrogen (Leek, The Netherlands). The specific antibody against serine-phosphorylated STAT3 was purchased from New England Biolabs (Schwalbach, Germany). The antibodies against phosphorylated Pyk2 were purchased from Biosource (Solingen, Germany). All other antibodies and the specific blocking peptide representing aa 8 to 37 of Hck were ordered from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.). [³H]thymidine and [³²P]ATP were purchased from Amersham (Braunschweig, Germany). The Src kinase substrate Sam 68 was obtained as a 51-kDa tagged fusion protein from Santa Cruz Biotechnology. The tyrosine kinase inhibitor PP2 was purchased from Calbiochem (Bad Soden, Germany). Cell culture media and sera were obtained from BioWhittaker (Verviers, Belgium) and Gibco (Paisley, United Kingdom). The wild-type EPOR-gp130 (i.e., Eg) fusion protein was a kind gift from Friedemann Horn (Universität Leipzig, Leipzig, Germany). All enzymes for cloning procedures and the liposomal transfection reagent DOTAP were purchased from Boehringer. The mammalian expression vectors pcDNA3, pcDNA3.1(-)/myc-His, and pcDNA6/V5-His and the selec-

* Corresponding author. Mailing address: GSF-KKG Gentherapie, Marchioninstr. 25, D-81377 Munich, Germany. Phone: 49-89-7095-3038. Fax: 49-89-2180-6797. E-mail: michael.hallek@med3.med.uni-muenchen.de.

tion reagent blasticidin were purchased from Invitrogen. The expression vector pDpuro was a gift from Seth Corey, Pittsburgh, Pa. Puromycin was obtained from Sigma.

Cloning of Eg and mutants. (i) **Cloning of Eg.** The chimeric receptor (Eg) was constructed by cloning the extracellular domain of the mouse EPOR to the cytoplasmic domain of human gp130 by using an introduced *EcoRI* site as described elsewhere (23). This construct was then cloned into pcDNA3.1/myc-His by using introduced *XbaI* and *BamHI* sites and standard PCR methods.

(ii) **Truncation mutations.** The C-terminal truncation (t) mutants t828, t770, t722, t702, t685, and t650 (with the numbers referring to the amino acid positions of wild-type human gp130) were constructed by using the full-length fusion protein (Eg) cloned into pcDNA3.1/myc-His as a template in a single-step PCR protocol. A universal sense primer, containing an integrated *XbaI* site and a Kozak signal sequence (5'-GGGCCCTCTAGACCAGCCATGGACAAACTC-3') and the following truncation specific antisense primers containing an integrated *BamHI* site were used: t828a, ATCTGGGGATCCTTCATGCTGACTG CAGTTCCTG; t770a, GACTTGGACTGAGGATCCTTGGTGTCTGTGA; t722a, ACTGCTGGATCCTTCAGTATTAATTTTTC; t702a, TTCTGGGGATCCC TTTTGTCAATTTGCTTCTAT; and t685a, GGCAATATGACTGGATCCAG GATCTGGAAC; and t650a, ATCTGGAACATTAGGGGATCCGTGTTTT TAATTAG. By using the same strategy, the truncation mutants t775 and t710 were cloned into pcDNA6 by using *BamHI* and *XbaI* sites. The primers used were as follows: t775/t710s, GGGCCGGATCCCCAGCCATGGACAAACTC; t710a, GAGCTCTAGACTGAGGCATGTAGCCGCC; and t775a, TCTTG ATCTAGATTGGACTGACGGAACCTG.

(iii) **Deletion mutations.** The deletion (d) mutants d681-721, d771-827, d771-811, d820-827, d812-827, and d812-819 were established by using Eg as a template in a two-step PCR protocol. In the first step, the deletions were performed by using internal, partially complementary primers (d681-721s, CACAATTTTA ATCAAAGGACACAGCAGTGGTATT; d681-721a, AATACCACATGCTG TGTCCTTTTGAATTAATTTGTTG; d771-827s, AGTGGCTACAGACACC AAATTTCAATTTGAAAGG; d771-827a, CCTTCAAAATGTGAAATTTGGTGTCTGTAGCCACT; d771-811s, AGTGGCTACAGACACCAACAAC AGTACTTCAAACAG; d771-811a, CTGTTTGAAGTACTGTTGTTGGTGT CTGTAGCCACT; d820-827s, TACTTCAAACAGAAGTGCATTTCCATTT TGAAAGG; d820-827a, CCTTCAAAATGTGAAATGCAGTCTGTGTTGA AGTA; d812-827s, GATGGTATTTTGCCAGGAGTCAGCATGAATCCA GT; d812-827a, ACTGGATTCATGCTGACTCCTGGGCAAAATACCATC; d812-819s, GATGGTATTTTGCCAGGAGTCAGCATGAATCCAGT; d812-819a, ACTGGATTCATGCTGACTCCTGGGCAAAATACCATC) and two end-standing primers binding 5' (*Ecosfp*, CTGACCCTAGCGAATTCACTT TACTACC) and 3' (*Bamafp*, GGTACCGAGCTCGGATCCCTGAGGCATG TAGCC) of gp130. The two corresponding PCR products were annealed in the second step by using *Ecosfp* and *Bamafp* for completion of the internal deleted *EcoRI*-*BamHI* fragments. These fragments were ligated to *EcoRI*-*BamHI*-cut Eg and inserted in pcDNA3.1(-)/myc-His.

(iv) **Point mutations.** The point mutant Y814F was constructed by a two-step PCR protocol as described above by using specific internal oligonucleotides containing the desired mutation.

(v) **Vectors for stable transfection in Baf-B03 cells.** For stable transfection of receptor mutants into Baf-B03 cells, the specific DNAs were cloned into the DNA6/V5-His vector by using *XbaI* and *ApaI* as restriction enzymes.

Construction of pDpuro-Hck. The transfection vector pDpuro was constructed by fusion of the promoter region and the multiple cloning site of pcDNA3 into the backbone of pApuro. This was done in a two-step ligation protocol by using *NcoI* and *PvuI* restriction sites. Hck cDNA was obtained from the American Type Culture Collection and cloned into this vector by using the *EcoRI* site.

Cells, cell culture, and transfection. Cos-7 cells were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture (DSMZ) (Braunschweig, Germany). The IL-3-dependent murine pro-B-cell line Baf-B03 was a gift from Mark Showers (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Mass.). The IL-6-dependent murine plasmocytoma cell line 7TD-1 was obtained from the DSMZ. These cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum (FCS), 5 pM recombinant IL-6, and 50 μ M 2-mercaptoethanol. Cos-7 cells were routinely grown in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with 10% FCS and L-glutamine. Baf-B03 cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 10% WEHI-3B cell conditioned medium as a source for murine IL-3. Cos-7 cells were transiently transfected by using the liposomal transfection reagent DOTAP according to the manufacturer's protocol and as described previously (56). For transient cotransfection, 50 μ g of fusion receptor DNA and 25 μ g of Hck DNA (cloned into pcDNA3 expression vector) were used. Baf-B03 cells were stably transfected by electroporation, by using 10^7 cells and 20 μ g of DNA of the receptor constructs. Cells were resuspended in 800 μ l of phosphate-

buffered saline (PBS) without calcium and magnesium (BioWhittaker) and electroporated by using a pulse of 350 V and 950 μ F. Selection of transfected cells was started 48 h later by using 8 μ g of blasticidin/ml. After 10 days, single clones of positively transfected cells were established by limiting dilution. Highly expressing single clones were electroporated with Hck cDNA (cloned into pDpuro Hck expression vector) as described above. Selection of transfected cells was started 48 h later by the addition of 5 μ g of puromycin/ml and 8 μ g of blasticidin/ml. Generally, cells were cultured under selection until 3 days prior to stimulation and lysis. At least three similar expressing clones per mutant were cultivated for these experiments.

Preparation of cell lysates. Prior to all experiments, cells were starved by serum deprivation for 16 to 20 h. Cos-7 cells and Baf-B03 cells were lysed with a lysis buffer containing 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 50 mM Tris (pH 7.4), 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g of leupeptin/ml, 10 μ g of aprotinin/ml, and 2 mM sodium orthovanadate. In brief, 2×10^7 pelleted Baf-B03 cells were washed two times with PBS. For stimulation, the pellet was resuspended in 1 ml of PBS with 40 U of EPO/ml and incubated under light shaking for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 40 ml of ice-cold PBS. After an additional washing step, the pellet was resuspended in 300 μ l of ice-cold lysis buffer per 2×10^7 cells. Cos-7 cells were scraped off the bottom of confluent 175-cm² tissue flasks after starvation, washed once with PBS, and resuspended in 1.2 ml of ice-cold lysis buffer.

After rotation for 25 min on an overhead rotor at 4°C, the lysates were pelleted at 14,000 rpm and at 4°C for 15 min to remove insoluble material. The total protein concentration was measured by using a Bradford protein assay (Bio-Rad). Lysates were stored at -20°C or used immediately for experiments.

IP and Western blot. For immunoprecipitation (IP), 500 μ g of Cos-7 cell lysate or 500 μ g of Baf-B03 cell lysate was incubated with 2 μ g of the appropriate antibodies from 2 h up to 18 h at 4°C on an overhead rotator. A total of 100 μ l of protein A beads were washed two times in IP washing buffer (0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 50 mM Tris [pH 7.4]) and then resuspended in 50 μ l of IP washing buffer. Then, 100 μ l of this mixture was added to each IP reaction. After an additional incubation for 2 h at 4°C, each precipitate was washed four times in 500 μ l of IP washing buffer. After being boiled in 4 \times sample buffer, the precipitates were pelleted, and the supernatants were loaded onto 10% SDS gels. Peptide blocking experiments for Hck kinase and STAT3 were performed with the specific blocking peptides (Santa Cruz Biochemicals) according to the manufacturer's protocol. For normal expression controls of recombinant proteins, lysate containing 100 μ g of proteins was subjected to electrophoresis.

After transfer of the proteins to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham), membranes were blocked for 2 h in TBST (Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20) containing 2% skim milk or 2% bovine serum albumin (BSA; Merck, Darmstadt, Germany). After a 1-min wash in TBST, the primary antibodies diluted 1:1,000 in TBST-1% BSA were incubated for 2 h or overnight. Membranes were washed four times with TBST, and then the appropriate peroxidase-linked secondary antibody diluted 1:3,000 in TBST-1% BSA was incubated for 35 min. After a final washing step, the proteins were detected by using the ECL System or ECL-Plus System from Amersham according to the manufacturer's guidelines.

In vitro kinase assay. Immune complex tyrosine kinase assays were performed by using affinity-purified Sam 68 (Santa Cruz Biochemicals) as an external substrate for the measurement of Hck kinase activity. In brief, Hck kinase was precipitated from lysates of EPO-stimulated or unstimulated Baf-B03 transfectants as described above. The precipitates were washed two times with IP washing buffer and then one time with kinase buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.3), 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, and 200 μ M Na₃VO₄. After the last wash 20 μ l of kinase buffer was added to the precipitates, and the isotope-free tyrosine kinase assays were initiated by adding 5 μ Ci of [³²P]ATP and 3 μ g of Sam 68/ μ l. After incubation for 15 min at 30°C under constant shaking, the reaction was stopped by adding SDS sample buffer, followed by boiling for 5 min. The supernatant of the samples was then loaded onto an SDS gel, transferred to nitrocellulose, and finally tested for autoradiography.

Proliferation assay. Proliferation assays were carried out in 96-well plates by using 5×10^3 Baf-B03 cells or 1×10^3 7TD-1 cells per well. Two days prior to these experiments, cells were seeded in equal concentrations into tissue culture flasks. All assays were performed with PBS-washed cells in RPMI medium supplemented with 10% FCS only. Wild-type cells or triplicate aliquots of monoclonal cells expressing recombinant proteins were stimulated with the indicated concentrations of EPO, IL-3, or IL-6. After incubation for 72 h at 37°C, the proliferation was assessed by microscopic cell counting after trypan blue staining.

RESULTS

Binding of Hck to gp130. Src family kinases Fyn, Lyn, and Hck were physically associated with gp130 in MM and embryonic stem (ES) cells (16, 20). However, the structural requirements for this association remain unclear. In previous experiments, the interaction of gp130 with Hck was more prominent than with the other two kinases. Therefore, we focused on Hck in the studies presented here. In order to identify the Hck binding site of gp130, we generated several truncation and deletion mutants of gp130 (Fig. 1). For this purpose, we used a chimeric receptor comprising the extracellular domain of the EPOR and the transmembrane and intracellular parts of gp130 (Eg). This strategy allowed us to transfect only a single chimeric receptor molecule, since the EPOR is functional as a homodimer. Furthermore, when EPOR-negative cells were used, the effects of endogenously expressed IL-6R components could be excluded because activation of the chimeric receptor is achieved by stimulation with EPO. In order to facilitate the detection of the chimeric receptors, all receptor mutants were tagged with a poly-His peptide, allowing the detection by the antihistidine antibody, anti-His-C-term. These mutants were transfected together with a wild-type Hck expression plasmid, pcDNA3-Hck, into Cos-7 cells, which did not express EPOR endogenously. A similar protein expression of the various receptor mutants and of Hck was obtained (Fig. 2C, D, G, and H). The double or triple bands of the different receptor mutants (Fig. 2C and G) were most likely explained by differential glycosylation. However, only one of these forms seemed to coprecipitate with Hck (Fig. 2A and E). Lysates of doubly transfected Cos-7 cells were used for coprecipitation experiments, in which anti-Hck precipitates were resolved by SDS-PAGE and then immunoblotted with anti-His antibody to detect complexes of receptor mutants with Hck (Fig. 2A and E). Aliquots of the IP reaction mixtures were loaded on an additional gel and blotted with the Hck antibody (N-30) to verify that similar amounts of Hck were precipitated (Fig. 2B and F). To evaluate the specificity of the precipitating anti-Hck antibody, blocking experiments with a specific blocking peptide (see Materials and Methods) were also performed, showing that precipitation of Hck was completely disrupted by the peptide (Fig. 2A, B, E, and F, lanes 1). C-terminal truncation at aa 770 (mutant t770) led to a substantial loss of Hck binding (Fig. 2A, lane 5). In contrast, Hck binding remained unaffected when further C-terminal truncations of gp130 were used (mutant t828; Fig. 2A, lane 4). It was not possible to perform the experiment in the opposite direction, i.e., with an anti-His IP, followed by anti-Hck immunoblotting, because a significant fraction of Hck consistently bound unspecifically to protein A beads. Taken together, these results suggested that a putative Hck binding domain was located between aa 770 and 828 of gp130. This region did not include any of the homology boxes (Fig. 1A) shared among different growth factor receptors that were shown to be important docking regions for signaling proteins (2, 27, 29, 30, 37, 50). However, a striking feature of the gp130 region from aa 770 to 828 was a remarkably high content of negatively charged amino acids. It has been shown earlier that the Src family kinases Lck and Fyn were associated via domains with a high content of aspartic and glutamic acids with the IL-2R β -chain and IL-7R (22, 54). Therefore, we searched

for potential Hck binding motifs in gp130 with a high fraction of negatively charged amino acids. Two such regions were identified: one between aa 771 and 827, matching the above mentioned putative Hck binding domain, and another between aa 681 and 721. Although a contribution of the region from aa 681 to 721 for Hck binding seemed very unlikely, considering the results obtained with gp130 truncation mutants (Fig. 2A, lanes 4 to 6), we constructed Eg mutants with internal deletions for both regions, d771-827 and d681-721, respectively (Fig. 1). When coexpressing these mutants with Hck in Cos-7 cells, the Hck-gp130 association remained unchanged when aa 681 to 721 were deleted (d681-721) (Fig. 2A, lane 3). In marked contrast, the internal deletion of residues 771 to 827 (d771-827) resulted in a >90% decrease of Hck coprecipitation with gp130 in Cos-7 cells (Fig. 2E, lane 3).

In order to define the Hck binding domain more precisely, we constructed additional mutants containing smaller deletions (Fig. 1B). It seemed possible that two well-characterized docking sites for STAT3, tyrosine residues 814 and 767 (Y814 and Y767), which lay within or near this putative Hck binding domain (18, 23), played a role in Hck binding. To address this problem, we created internal deletions, either encompassing Y814 (d812-827 and d812-819) or located N terminally (d771-811) or C terminally (d820-827) of it. The constructs were again coexpressed with Hck (pcDNA3 Hck) in Cos-7 cells (Fig. 2E to H). In addition, lysates of nontransfected Cos-7 cells were loaded (Fig. 2E and F, lanes 1) to control for the expression of Hck and receptor mutants. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Hck antibody and immunoblotted with anti-His antibody to detect Hck-gp130 complexes. As shown, a complete disruption of the Hck association with gp130 was observed with mutant d771-811 (Fig. 2E, lane 4). The faint signals (<10% of wild-type gp130) we obtained when the d771-827 mutant coprecipitated with Hck (Fig. 2E, lane 3) implied the existence of an additional Hck binding region in gp130. However, Hck binding was completely disrupted in the smaller deletion mutant d771-811 (Fig. 2E, lane 4), suggesting that structural changes of gp130 in the d771-827 mutant led to the exposure of an usually hidden binding motif in gp130. In marked contrast, Hck binding to mutants d812-827, d812-819, and d820-827 was similar to that with wild-type gp130 (Fig. 2E, lane 2 and lanes 5 to 7). These results suggested that the formation of the Hck-gp130 complex was independent of STAT3 association at Y814. In addition, we created mutants of gp130 in which the docking site for Shp-2, Y759, or the STAT3 docking sites, Y767 and Y814, were mutated to phenylalanine. All of these mutants coprecipitated with Hck to the same extent as wild-type gp130, indicating that Hck binding to gp130 occurred independently of these docking sites (data not shown). Therefore, we concluded that Hck bound to gp130 at a domain rich in negatively charged amino acids, spanning positions 771 to 811, and that this association was not mediated via tyrosine residues 759, 767, and 814. In analogy to the Lck kinase binding domain in the IL-2R β -chain (22), we termed this region the acidic domain of gp130.

Stimulation of gp130 but not d771-811 induces activation of Hck in the growth factor-dependent cell line Baf-B03. To explore the functional significance of the association of Hck with gp130, we generated stable transfectants of the growth factor-dependent pro-B-cell line, Baf-B03 expressing the different

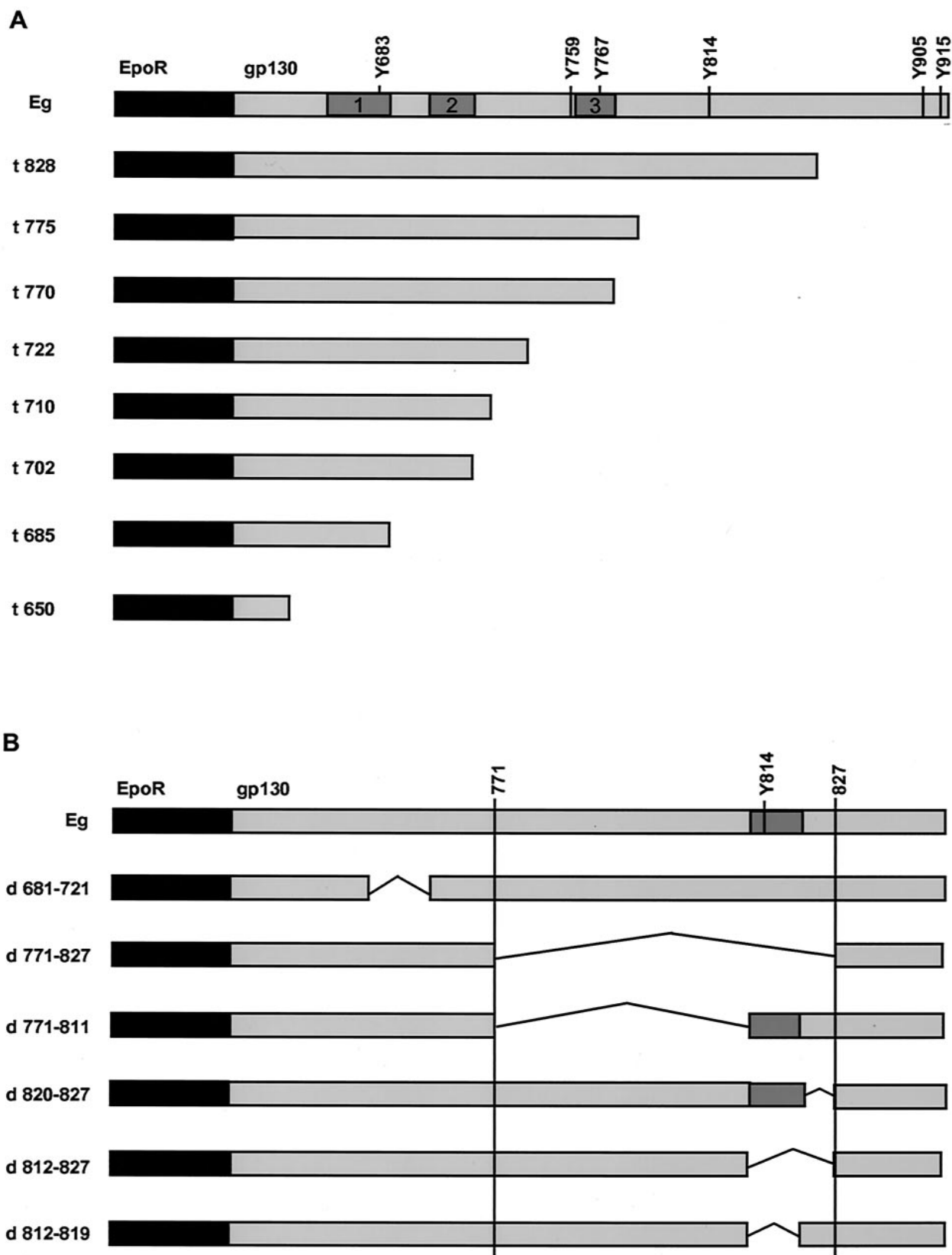


FIG. 1. Schematic overview of gp130 truncation and deletion mutants. Several truncation (A) and deletion (B) mutants of gp130 were cloned as chimeric receptor molecules as described in Materials and Methods; the numbers of amino acids refer to wild-type gp130. The locations of tyrosine residues and the STAT3 binding region at tyrosine 814 are indicated. The homology boxes are shaded gray as boxes 1 to 3. All truncation (t) and deletion (d) mutants, as well as the wild-type gp130 (Eg) bearing C-terminal His and myc tags for expression in Cos-7 cells (or His and V5 tags for Baf-B03 cell experiments), are indicated.

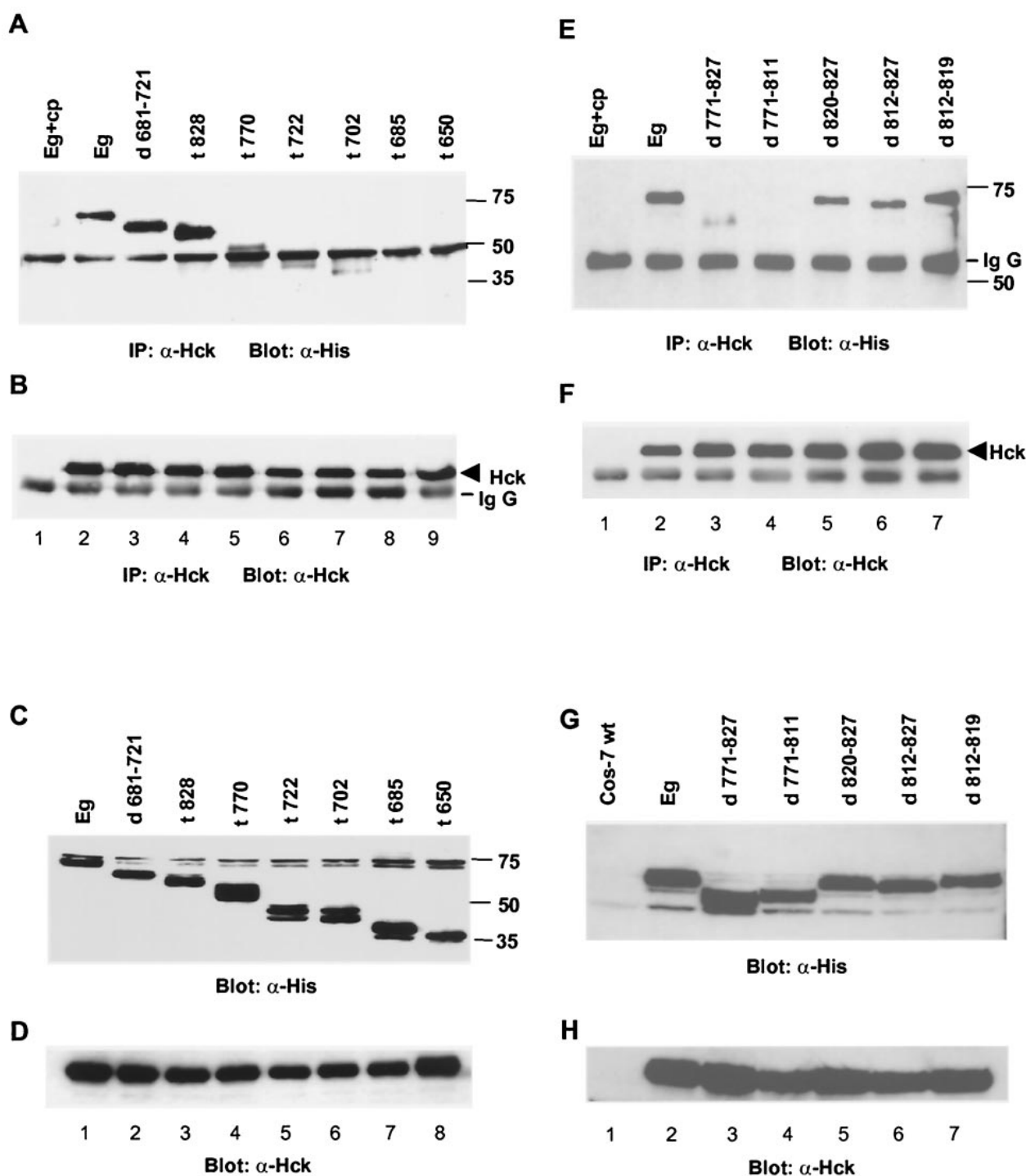


FIG. 2. Deletion of 41 aa inhibits Hck binding. Different gp130 mutants were expressed together with Hck cDNA in Cos7 cells. The expression of recombinant proteins was controlled by Western blotting with specific antibodies against the His tag (C and G) or Hck (D and H), respectively. The association of Hck to gp130 was tested by IP with Hck antibody and subsequent blotting with His-tag antibody for the detection of coprecipitated EPOR-gp130 fusion protein (A and E). Aliquots of the IP reaction mixtures were loaded on an additional gel and blotted with Hck antibody to demonstrate equal precipitation of Hck (B and F). In lanes 1 of panels A, B, E, and F, Hck interaction was blocked by preincubation with a specific blocking peptide. The molecular mass markers and the immunoglobulin G (Ig G) bands are indicated. α -Hck, anti-Hck antibody.

gp130 mutants (see Materials and Methods). To investigate the activation state of Hck, we performed *in vitro* tyrosine kinase assays by using the affinity-purified Sam 68 as an Src kinase substrate. A stimulation-dependent increase in sub-

strate phosphorylation occurred only in cells expressing Eg (Fig. 3, lane 6) but not in cells expressing d771-811 or Hck alone. Moreover, faint bands in lanes 6 and 7 showed that Hck was autophosphorylated upon stimulation in Eg-expressing

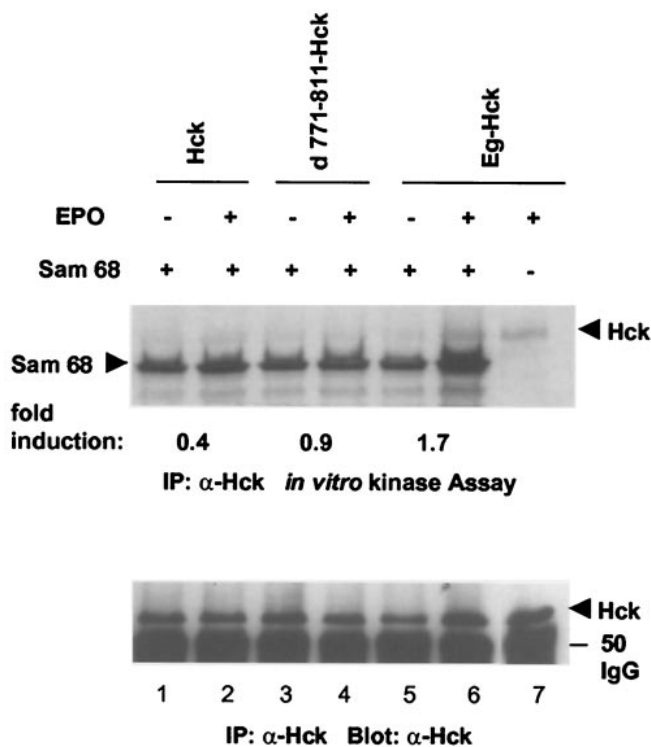


FIG. 3. Stimulation of gp130 but not d771-811 induces activation of Hck in the growth factor-dependent cell line Baf-B03. Baf-B03 cells were transfected with expression vectors for Hck (pDpuro Hck) and for Eg and d771-811, respectively (pcDNA6/V5-His). These cells were then either stimulated with 40 U of EPO/ml (+) or with medium only (-). The activity of Hck was tested by performing *in vitro* kinase assays in the presence of radiolabeled ATP and the external Src kinase substrate Sam 68 as described in the text. After separation with SDS-10% PAGE the EPO-induced phosphorylation of Sam 68 was assessed by autoradiography (upper panel). Aliquots of the Hck immunoprecipitate were blotted with anti-Hck antibody (α -Hck) to control for comparable precipitation. The results were quantified by using phosphorimaging analysis software. Normalized induction levels of kinase activity were as indicated.

cells only. Comparable precipitation of Hck was confirmed by immunoblotting with anti-Hck antibody. The similar expression of the receptor constructs Eg and d771-811 was confirmed by immunoblot with the anti-V5 antibody (data not shown). This result showed that the chimeric Epo/gp130 receptor was functional in activating Hck in response to EPO in Baf-B03 cells and that the disruption of the Hck binding domain lead to a decreased Hck tyrosine kinase activity after stimulation.

Deletion of the acidic domain of gp130 does not reduce the activation of STAT3. Next, we investigated the phosphorylation status of STAT3 in d771-811-transfected Baf-B03 cells. Complete activation of STAT3 requires phosphorylation at tyrosine residue 705 and serine residue 727 (57, 59). To examine the activation status of STAT3, we precipitated endogenous STAT3 from normal and EPO-stimulated cells (Fig. 4D to F) and then blotted the immunoprecipitates with the anti-phosphotyrosine antibody PY99 (Fig. 4E) or an antibody specific for STAT3 phosphorylated at serine 727 (Fig. 4F). Baf-B03 transfectants expressed endogenous STAT3 (Fig. 4A), as well as the transfected receptor mutants (Fig. 4B) and Hck (Fig. 4 C), at similar levels. As shown in Fig. 4E and F, neither

the deletion of residues 771 to 811 (lanes 3 and 4) nor the point mutation of tyrosine 814 (lanes 5 and 6) led to significant changes in STAT3 tyrosine or serine phosphorylation in comparison to cells transfected with wild-type Eg and Hck (lanes 1 and 2). Figure 4D shows that STAT3 was precipitated in comparable amounts and that a specific blocking peptide inhibited the precipitation of STAT3 (Fig. 4D, lane 7). These results demonstrated that the deletion of the Hck binding domain did not interfere with the overall activation of STAT3. The unchanged STAT3 phosphorylation observed with the point mutant Y814F can be explained by the fact that STAT3 binds to four phosphorylated tyrosine residues of gp130, namely, residues 767, 814, 905, and 915 (18). Therefore, the remaining three STAT3 docking motifs of gp130 were able to compensate for the Y814F mutation. Additionally, the results suggested that STAT3 activation was independent of the association of Hck with gp130, since the transfection of mutant d771-811 did not cause significant changes of EPO-induced STAT3 phosphorylation.

The tyrosine kinase inhibitor PP2 reduces the gp130 mediated proliferation significantly. To further explore the functional relevance of Hck for gp130-mediated proliferation, the selective Src kinase inhibitor PP2 was used (21). The IL-6-induced proliferation of the IL-6-dependent murine plasmocytoma cell line 7TD-1 was significantly reduced when the cells were incubated with PP2 (Fig. 5). This result supported our previous finding that Src kinases are involved in IL-6 signaling in MM cells (20). In an additional approach, we used Baf-B03 cells expressing either the wild-type chimeric receptor (Eg) or the mutant d771-811. Baf-B03 wild-type cells and cells coexpressing Eg or d771-811 and Hck stimulated with IL-3 showed a similar reduction of proliferation when PP2 was present (Fig. 5B, lower panel), indicating that the clones were comparable and confirming that Src kinases were also involved in IL-3-mediated signaling (3). However, EPO-induced proliferation of Baf-B03 cells expressing Eg was reduced five times when cells were cultivated in the presence of 10 μ M PP2 (Fig. 5B, upper panel). In contrast, there was no additional decrease in cell proliferation of d771-811 transfectants, indicating that PP2 acted mainly on Hck kinase or its substrates in these cells. These results corroborated a function of Hck kinase in the proliferative signaling of gp130. To omit the potential lack of specificity of PP2 and to explore the biological relevance of the Hck-gp130 interaction in more detail, we used Baf-B03 cells expressing either the receptor constructs alone or together with Hck in an additional approach.

The deletion of the Hck binding domain impairs gp130-mediated cell proliferation. To investigate the biological function of the Hck-gp130 association, we used various Baf-B03 transfectants to perform proliferation assays. Similar expression of receptor mutants and Hck was controlled by immunoblotting lysates of the different clones with specific antibodies (data not shown). Since Baf-B03 cells depended on IL-3 for cell growth, maximal stimulation of cell proliferation was tested by stimulation with IL-3 (Fig. 6, lower panels). To evaluate the impact of an intact Hck-gp130 complex on proliferative signaling, we stimulated Baf-B03 cells expressing either Eg and d771-811 alone or together with Hck with various amounts of EPO or IL-3 (Fig. 6A). All clones and controls showed the same range of cell proliferation when stimulated with IL-3.

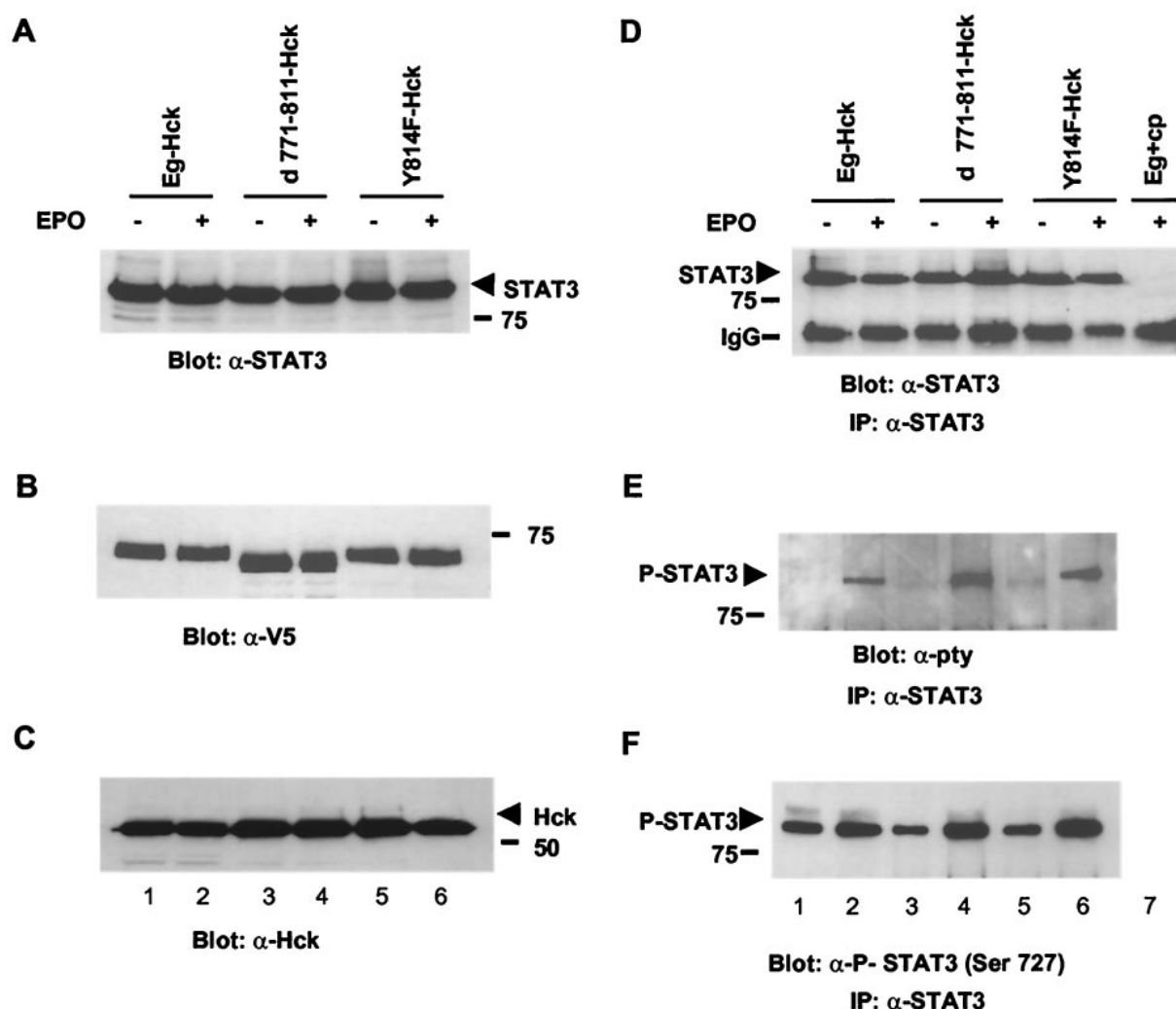


FIG. 4. Deletion of the acidic domain of gp130 does not reduce the activation of STAT3. Baf-B03 cells were transfected with cDNAs for Hck and Eg, Y814F, or d771-811. These cells were either not treated (-) or stimulated with 40 U of EPO/ml (+). The lysates were tested for endogenous STAT3 expression by blotting with anti-STAT3 antibody (A), for the detection of the receptor constructs with V5 antibody (B), and for the detection of Hck with anti-Hck antibody (α -Hck) (C). Thereafter, lysates were used for precipitation experiments with anti-STAT3 antibody (right panel). (D) For control of STAT3 precipitation, aliquots of the IP reaction mixtures were incubated with anti-STAT3 antibody, and the specificity of STAT3 antiserum was tested by preincubation of anti-STAT3 with a specific blocking peptide (lane 7). (E and F) To check the STAT3 phosphorylation, separated lysates were blotted with the antiphosphotyrosine antibody PY99 (E) and then stripped and blotted with an antibody directed against serine 727-phosphorylated STAT3 (F).

Maximum growth was achieved with 4 U of IL-3/ml (lower panel). When the cells were stimulated with EPO, maximum growth was achieved with 8 U/ml but was about three times lower than with IL-3, a result most likely due to the difference between endogenous and transgenic effects. Wild-type cells and cells expressing Hck alone showed no proliferation in response to EPO. Not surprisingly, cells that expressed the receptor but lacking the Hck binding domain (d771-811) still grow in response to EPO, indicating that Hck-independent pathways were activated. Coexpression of Hck with d771-811 did not significantly change cell growth. Cells that expressed the full cytoplasmic domain of gp130 (Eg) proliferated about twofold more strongly in response to EPO than did the d771-811 transfectants. This effect was magnified when Hck was coexpressed. Taken together, these data supported the importance of an intact Hck-gp130 complex in these cells. In contrast

to results published previously (17, 29), the membrane proximal region of gp130 was not sufficient for mediating proliferative effects, since cells transfected with the C-terminal truncation mutant t775 or t710 showed the same decrease in EPO-induced proliferation as did the cells bearing the d771-811 mutant (Fig. 6B, upper panel). Taken together, these findings suggested that the deletion of the acidic Hck binding domain significantly reduced the proliferative response to gp130 stimulation.

Pyk2 and Erk regulation is impaired by the disruption of the Hck binding site. To investigate downstream signaling events mediated by the Hck-gp130 interaction, we first investigated the possible role of the focal adhesion-associated kinase RAFTK/Pyk2 (related adhesion focal tyrosine kinase), which was shown to be involved in Src kinase-mediated signaling events (7, 13). In addition, dexamethasone-induced phosphor-

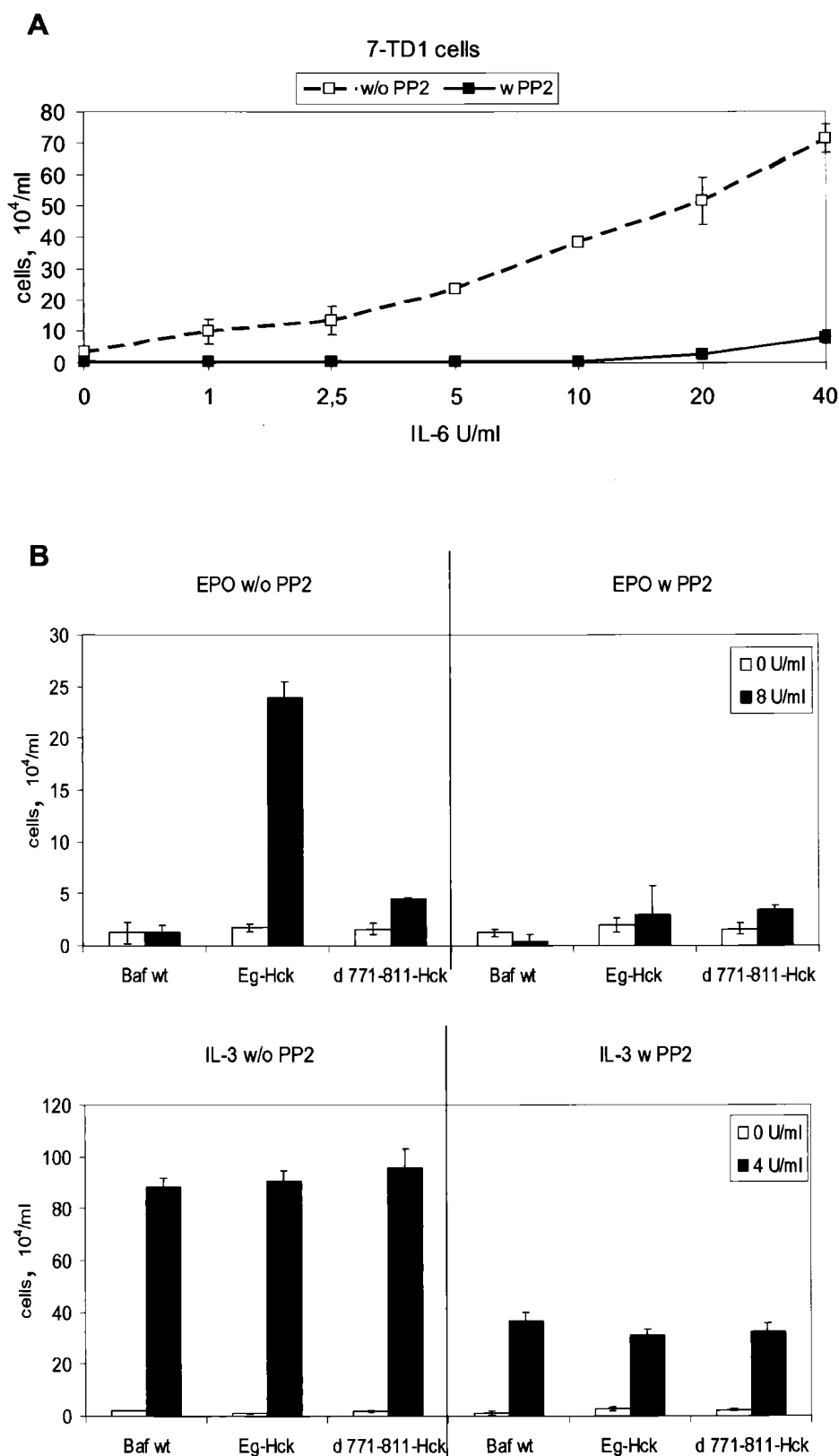


FIG. 5. The tyrosine kinase inhibitor PP2 reduces gp130-mediated proliferation. (A) The IL-6-dependent murine plasmacytoma cell line 7TD-1 was kept in the absence (□) or presence (■) of the tyrosine kinase inhibitor PP2 (10 μmol). After 3 days of IL-6 stimulation with the indicated amounts the cell proliferation was assessed by microscopic counting. (B) Baf-B03 cells expressing the indicated proteins were stimulated with 8 U of EPO/ml (solid bars, upper panel), 4 U of IL-3/ml (solid bars, lower panel), or medium alone (open bars, both upper and lower panels) for 72 h. Cells were kept in the absence (left) or presence (right) of 10 μmol of PP2. Proliferation was assessed by counting the cells under the microscope after trypan blue staining. Triplicate results from two different clones are shown, with the standard deviations indicated by the error bars.

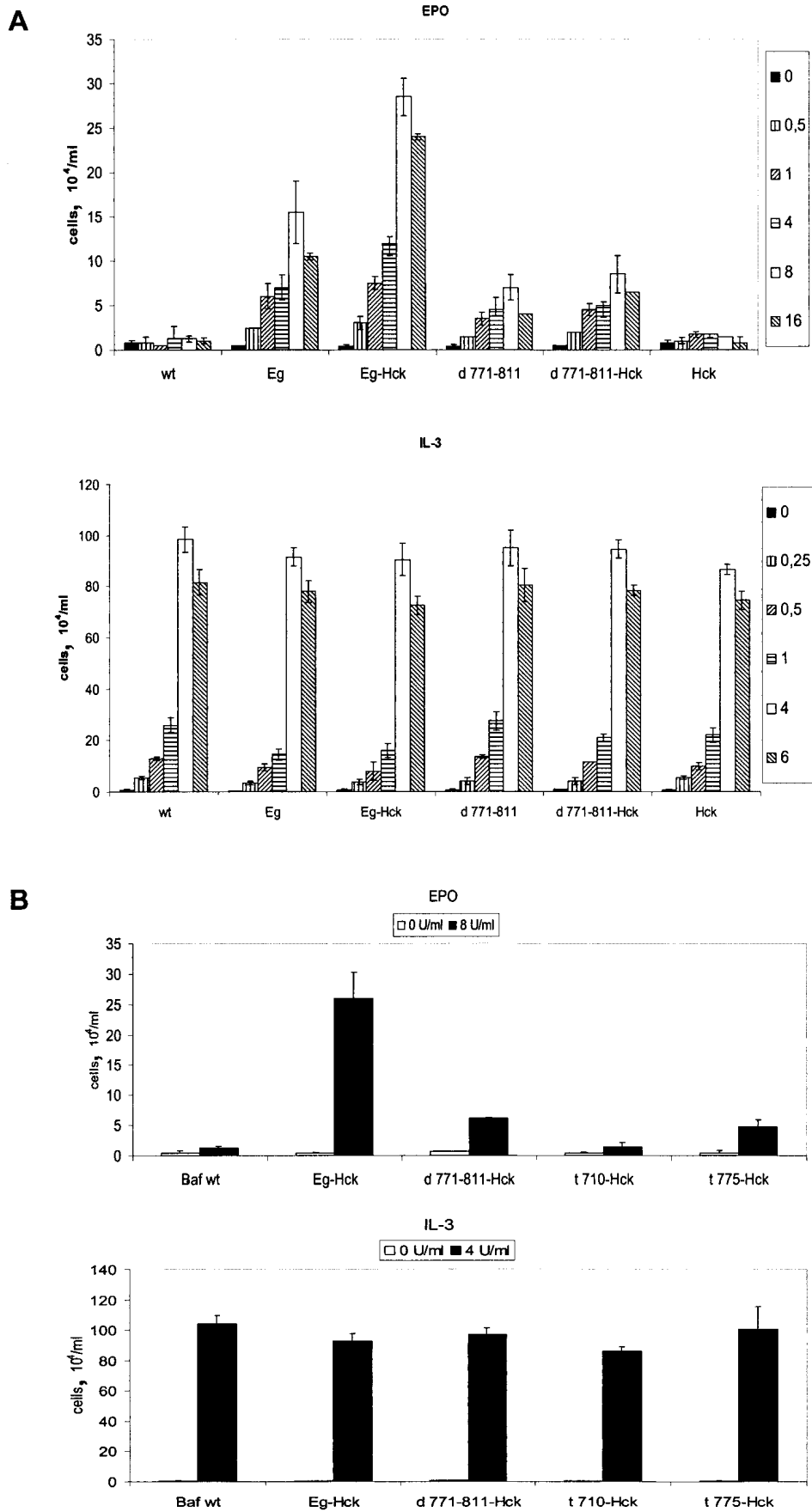


FIG. 6. Deletion of the Hck binding domain impairs gp130-mediated cell proliferation. Clonally derived Baf-B03 cells expressing the indicated proteins were stimulated with the indicated amounts (in units per milliliter) of EPO (upper panels) or IL-3 (lower panels) for 72 h. Proliferation was assessed by microscopic counting after trypan blue staining. Triplicate results from two different clones are shown, with the standard deviations indicated by the error bars.

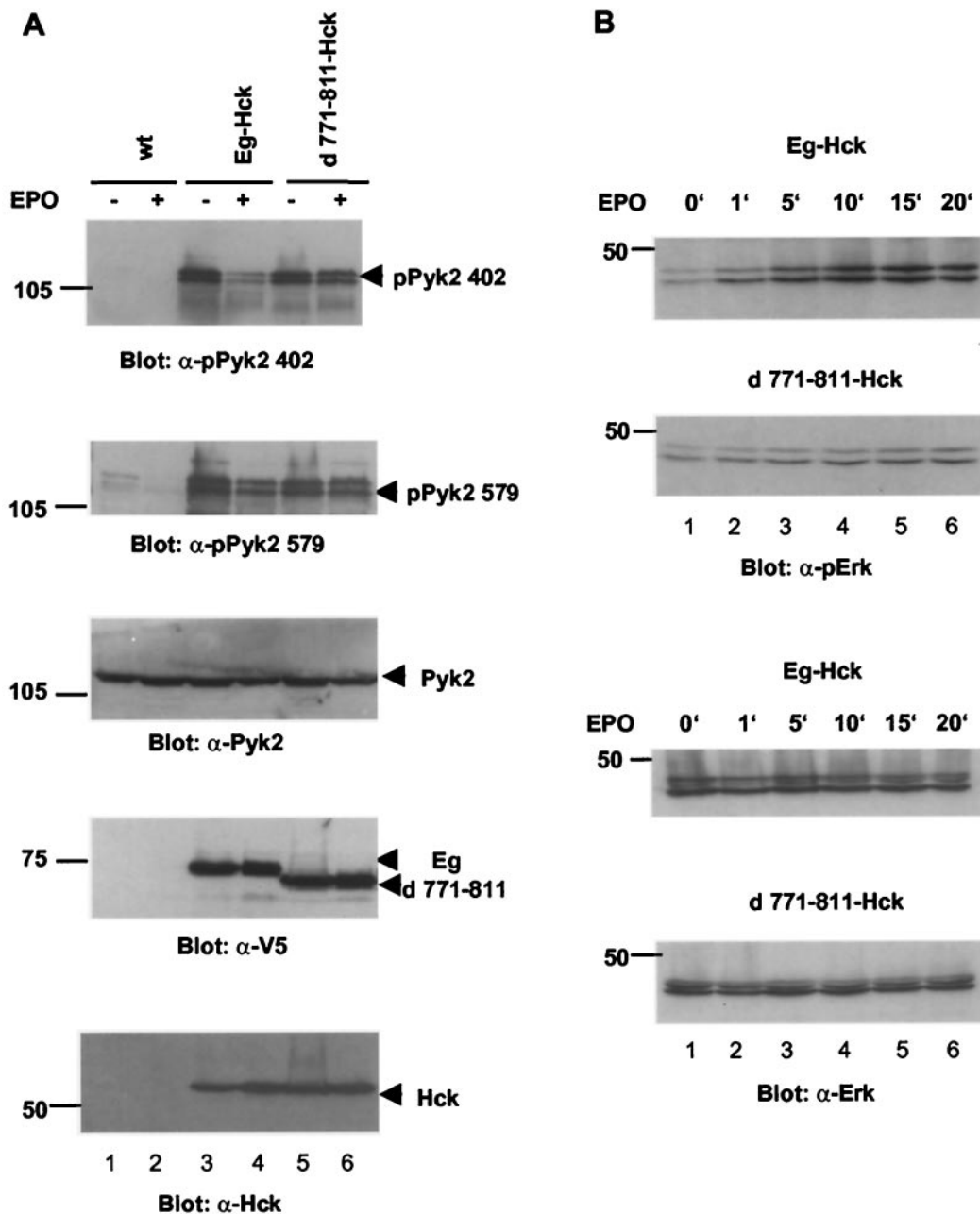


FIG. 7. Pyk2 and Erk regulation is impaired by the disruption of the Hck binding site. (A) Baf-B03 cells were cotransfected with the expression vectors for Eg (lanes 3 and 4) or d771-811 (lanes 5 and 6) and Hck. After stimulation with medium or EPO, cells were lysed as described in the text. Lysates were separated on 10% SDS gels. After blotting, the membranes were incubated with antibodies against phosphorylated Pyk2 (upper panels) or with several control antibodies as indicated (lower panels). (B) Baf-B03 cells expressing the indicated proteins were stimulated for the indicated times with 40 U of EPO/ml. Thereafter, membranes were subjected to Western blots by using antibodies specific for activated Erk1/2 (upper panels). Equal loading was confirmed by blotting with normal Erk antibody (lower panels).

ylation of Pyk2 was strongly impaired in MM cells after stimulation with IL-6. Finally, the dephosphorylation of Pyk2 was leading to decreased apoptosis in these cells (10, 11). We used lysates of Baf-B03 cells cotransfected with Hck and Eg or d771-811, respectively. Control experiments showed that recombinant proteins and endogenous Pyk2 were expressed in similar amounts in all cells (Fig. 7A, lower panels). By blotting experiments with antibodies specific for Pyk2 phosphorylated

at tyrosine residues Y402 or Y579 (Fig. 7A, upper panels), we could show that Pyk2 was strongly dephosphorylated at Y402 and, to a minor extent, at residue Y579 in cells expressing Eg and Hck, indicating the activation of a tyrosine phosphatase for Pyk2. In contrast, there was no significant decrease in Pyk2 phosphorylation in d771-811-expressing cells (Fig. 7A, lanes 5 and 6). Overexpression of Hck lead to a significant increase in basal phosphorylation of Pyk2 (Fig. 7A, lanes 1 and 2), indicat-

ing that in these cells the endogenously expressed Src kinases, mainly Lyn, were not involved in Pyk2 phosphorylation. The double bands we could detect in these experiments were most likely due to a differential phosphorylation of Pyk2. Src and Pyk2 kinases both seemed to be implicated in MAPK signaling pathways (1, 7). Therefore, we investigated next whether we could detect a differential MAPK activation in cells expressing Eg or d771-811. After EPO stimulation of Baf-B03 cells expressing Eg, a time-dependent increase in Erk1/2 activation of about fivefold was detected by a phosphospecific Erk antibody. In contrast, only a twofold increase of Erk phosphorylation was observed after stimulation of d771-811-transfected cells (Fig. 7B, upper panels), suggesting that additional pathways are able to contribute to Erk activation after gp130 stimulation. Expression of Erk was controlled by blotting with a specific Erk antibody (lower panels). These findings suggest that the signaling pathway mediated by the Hck gp130 interaction strongly contributes to Erk activation.

DISCUSSION

We have shown previously that the Src kinase Hck is activated by stimulation of gp130 (20). The present study demonstrates that the Src family kinase Hck binds to gp130 via an acidic domain comprising aa 771 to 811. The internal deletion of this acidic domain resulted in a complete loss of Hck association and a severalfold reduction of growth factor-stimulated proliferation. The acidic domain of gp130 is directly C terminal to the box3 motif in gp130. In agreement with these findings, Ernst et al. (15) found that C-terminal gp130 deletions, including the box3 motif and all STAT3 binding motifs, impaired the activation of Hck by murine gp130 in ES cells. However, and in clear contrast to our results, the growth factor-induced proliferation was not reduced in comparison to wild-type gp130 (15). The acidic domains of murine and human gp130 are highly conserved (with only 1 aa being different in the acidic stretch). Therefore, the most likely explanation for the apparent difference in signaling is that ES cells represent a different cellular background for the effects of gp130 than the Baf-B03 cells we used and that Hck has various tasks in distinct cell types. Hence, Hck-dependent signaling pathways might support cell proliferation in Baf-B03 cells but suppress differentiation in ES cells (15).

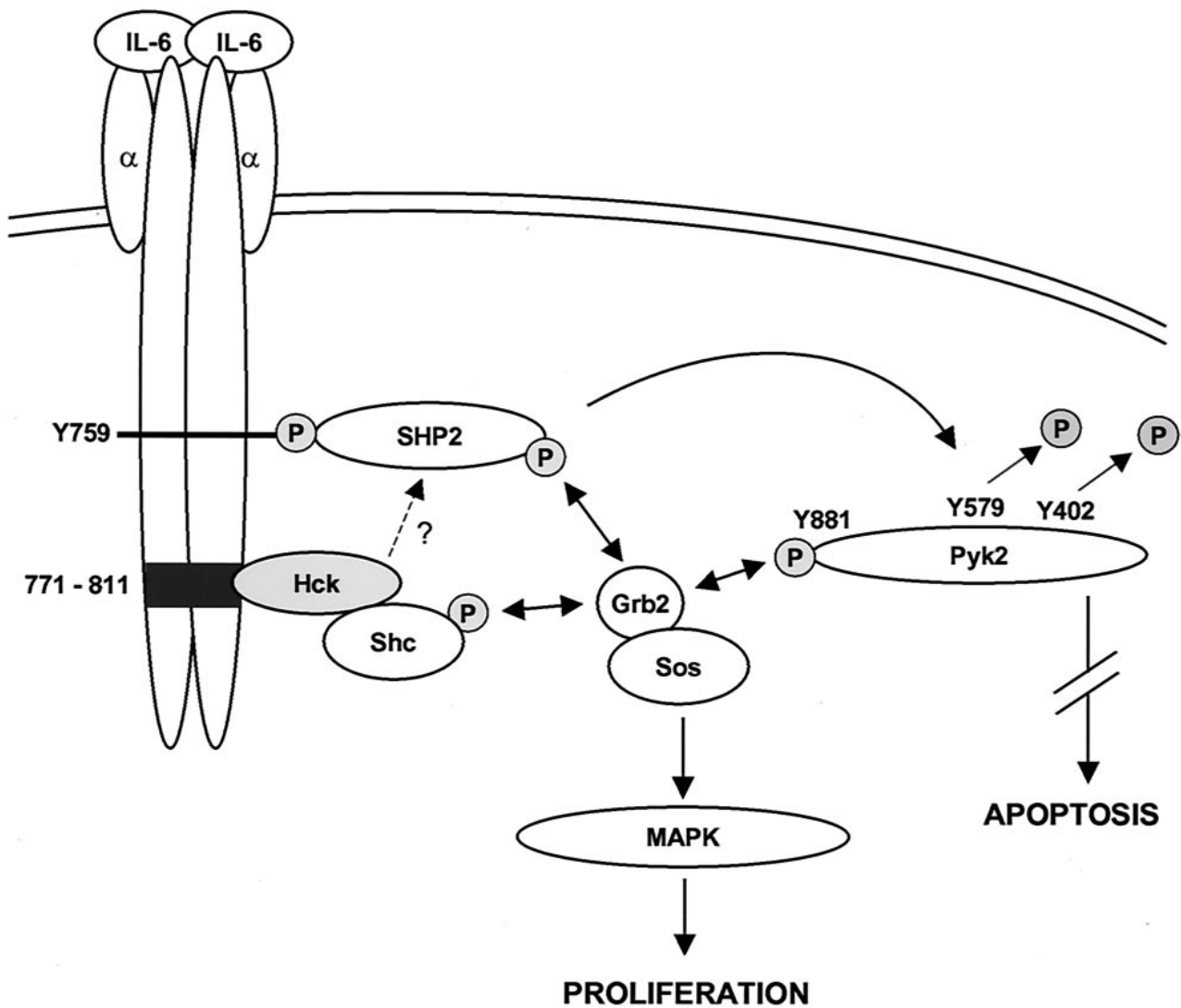
The acidic domain of gp130 includes two motifs which play a role in receptor internalization, a serine residue at position 782 and a dileucine motif (L786 and L787) (14, 19). It was shown recently by mutational analysis that both signal generation and signal termination were independent of gp130 endocytosis (51, 52). It is intriguing to speculate about a role for Hck at this point, since it was shown that inhibition of CD4 endocytosis depended on interaction of CD4 with Src family kinase Lck in lymphocytes (35). The precise contribution of the gp130 internalization to the proliferative signaling remains to be identified.

The association of Hck kinase with gp130 will need require examination to identify the precise mechanism of interaction. The SH2 and SH3 domains of Src family kinases account for most interactions with other signaling molecules. In the case of the Src kinase SH2 domain, a phosphorylated tyrosine residue and the C-terminal flanking amino acids, which determine the

specificity, serve as a binding motif. SH3 domains are able to recognize proline-rich sequences (34, 44, 58). For example, Src interacts with focal adhesion kinase (FAK) via its SH3 domain (53). The interaction of numerous signaling proteins with Src family kinases is mediated by SH2 domains. For instance, the association of Lyn and Blk with Syk kinase (4) and the binding of Hck to the β -subunit of the IL-3R (9) are mediated by the SH2 domain of the Src kinase(s). In marked contrast, the Hck binding region of gp130 identified in our studies did not contain any SH2 or SH3 consensus-binding motifs for Src kinases. The most striking feature of the Hck binding domain of gp130 was its relatively high content of negatively charged amino acids (9 of 41). A similar acidic domain has been shown to mediate the association of the Src family kinase Lck with the β -chain of the IL-2R. This interaction was mediated by the kinase domain (SH1) of Lck. Therefore, it should be investigated further whether the SH1 domain of Hck mediates the interaction with gp130. These experiments are currently under way.

The five C-terminal Y residues (Y759, Y767, Y814, Y905, and Y915) are docking sites for the association of downstream mediators of gp130 signaling. Y759 is involved in Shp-2 binding and IL-6-induced MAPK activation (32); Y767, Y814, Y905, and Y915 mediate STAT3 activation; and STAT1 binds to Y905 and Y915 (18). Furthermore, it has been shown that the presence of the MAPK activation site alone is not sufficient for growth factor-mediated proliferation (J. D. French, R. C. Tschumper, J. A. Isaacson, E. Nygren, and D. F. Jelinek, unpublished data). Our findings add a new aspect to gp130-mediated effects on cell growth and survival in showing that activation of an Src family kinase, Hck, is critical for transmitting proliferative signals. Cells expressing receptors that lacked the Hck binding domain showed a fourfold-lower response to gp130 stimulation than cells expressing wild-type gp130. In addition, the proliferation of IL-6-dependent plasmocytoma cells (7TD-1) and Baf-B03 cells expressing wild-type gp130 was decreased to basal levels after treatment with the Src kinase inhibitor PP2, further supporting a role of Src kinases in proliferative signaling. However, because of the unspecificity of PP2, these results should be treated with care. The activation of STAT3 was not impaired by the deletion d771-811. It should be pointed out that the EPO-induced proliferation, as well as Erk activation, was not completely abrogated in cells expressing the d771-811 mutant receptor. This suggests that additional signaling events, such as the activation of Jaks and STATs, might also be involved in supporting the growth of Baf-B03 cells. Our studies could not confirm earlier findings that the region up to residue 775 of gp130 alone was necessary for mediating cell proliferation (17, 29). In our experiments, cells expressing the C-terminal truncation mutant t775 did not proliferate significantly upon gp130 stimulation (Fig. 6B). This difference might be explained by a severe disturbance of the protein integrity and/or loss of relevant docking sites at gp130 by large truncations such as t775, as recently suggested by others (40).

Our results suggest the activation of a tyrosine phosphatase downstream of Hck upon gp130 stimulation, since we could demonstrate a decrease in Pyk2 phosphorylation in Eg-expressing cells but not in d771-811-expressing cells (Fig. 7A). The dephosphorylation of Pyk2 blocks dexamethasone-in-



Ⓟ = Tyrosines potentially phosphorylated by Hck

FIG. 8. Model of Hck involvement in gp130 signaling. Binding of IL-6 to the IL-6R results in the activation of Hck via gp130. Hck can then act on downstream signaling events by creating docking sites for signaling molecules such as Grb2 or Shp-2 and/or by activating adapter molecules such as Shc. The recruitment of Shp-2 to the Hck/gp130 complex might then lead to the dephosphorylation of Pyk2, resulting a block in apoptotic signaling in MM cells. Grb2 forms stable complexes with Sos, a GDP-GTP exchange factor for Ras. Thus, the binding of Grb2 to Shc, Pyk2, and/or Shp-2 via its SH2 domain can lead to the activation of Ras and Erk.

duced apoptosis in MM cells (10). Our observation of a Hck-dependent dephosphorylation of Pyk2 would support the proposed role of Src kinases in blocking apoptotic signals (39). The tyrosine phosphatase Shp-2, whose docking site is located close to the Hck binding region of gp130, might be involved in Pyk2 dephosphorylation, since Pyk2 is a substrate for Shp-2 (48). Finally, the activation of Erk via the gp130/Hck interaction (Fig. 7B) confirms the proposed role for Src kinases by activating the Ras/MAPK signaling cascade (1, 31). In the context of a signaling complex involving gp130/Hck/Shp-2/Pyk2, it is possible that Hck phosphorylates docking sites for

Grb2 in Shp-2 and/or Pyk2, thus leading to Erk activation (5, 38). This model and the finding that Shp-2 can be activated by Src kinases (47) suggest that Hck and Shp-2 might be members of the same signaling pathway. Moreover, it was shown recently that Pyk2 activation inhibits Erk activation, in contrast to the closely related FAK (60). Thus, the inactivation of Pyk2 by dephosphorylation of its major autophosphorylation site Y402 (38) in Eg-expressing Baf-B03 cells suggests that Pyk2 kinase is upstream of Erk in gp130 signaling. An alternative pathway, which might cause Erk activation, is a gp130/Hck/Shc/Grb2 complex, because we found Shc and Grb2 to be

associated with Hck in LP-1 cells (unpublished data) and (31). Taken together, we suggest that Hck is involved in gp130 signaling by creating docking sites for signaling molecules such as Grb2 or Shp-2 and/or by activating adapter molecules such as Shc (Fig. 8).

A role for Src family kinases has been described in the transmembrane signaling of many cytokines (1, 49). IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), and granulocyte-CSF were shown to activate Src kinases (3, 12, 16, 20, 28, 36, 54). Furthermore, Src kinases interact physically with the receptors for IL-2, IL-6, and IL-7 and the common β -chain of the receptors for IL-3, GM-CSF, and IL-5 (2, 20, 22, 54, 55). With the exception of the common β -chain of the receptors for IL-3, GM-CSF, and IL-5, where Lyn binds via its SH1 domain to a PXP motif in the receptor (2), the common denominator of the binding regions for Src kinases, such as Lck with the IL-2R and Fyn with the IL-7R, is their high content of negatively charged amino acids (22, 54). Our results suggest that the IL-6R β -chain, gp130, also uses an acidic domain for the interaction with Hck. Furthermore, we could show that the deletion of this Hck binding site in gp130 reduced cell proliferation and Erk activation in response to growth factor stimulation, suggesting that Hck contributed a mitogenic signal in addition to the previously described activation of Shp-2/Grb2/Erk (17).

In conclusion, our results suggest that the Src family kinase Hck mediates proliferative effects of gp130 by binding to a novel acidic domain thus far not described for gp130. This interaction seems to lead to the dephosphorylation of Pyk2 and to the activation of Erk. To further elucidate the mechanism of Hck activation, we are currently studying further downstream signaling events which depend on the interaction of this acidic domain of gp130 with Src kinases. Since IL-6 is important for the growth of MM cells and the expansion of early hematopoietic progenitor cells, these studies might enable us to identify some of the relevant signaling intermediates supporting the growth of these cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Susanne Anton for excellent technical assistance, Friedemann Horn (Leipzig, Germany) for providing the EpoR-gp130 chimera cDNA, and Mark Showers (Boston, Mass.) for providing Baf-B03 cells.

This work was supported by grants of the Deutsche Krebshilfe 10-1094-HA and 10-1678-HA2 (to M.H.).

REFERENCES

- Abram, C. L., and S. A. Courtneidge. 2000. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.* **254**:1–13.
- Adachi, T., K. Pazdrak, S. Stafford, and R. Alam. 1999. The mapping of the Lyn kinase binding site of the common beta subunit of IL-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-5 receptor. *J. Immunol.* **162**:1496–1501.
- Anderson, S. M., and B. Jorgensen. 1995. Activation of Src-related tyrosine kinases by IL-3. *J. Immunol.* **155**:1660–1670.
- Aoki, Y., Y. T. Kim, R. Stillwell, T. J. Kim, and S. Pillai. 1995. The SH2 domains of Src family kinases associate with Syk. *J. Biol. Chem.* **270**:15658–15663.
- Avraham, H., S. Y. Park, K. Schinkmann, and S. Avraham. 2000. Raftk/Pyk2-mediated cellular signaling. *Cell Signal* **12**:123–133.
- Berger, L. C., T. S. Hawley, J. A. Lust, S. J. Goldman, and R. G. Hawley. 1994. Tyrosine phosphorylation of Jak-Tyk kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**:596–605.
- Blaukat, I. A., I. Ivankovic-Dikic, E. Gronroos, F. Dolfi, G. Tokiwa, K. Vuori, and I. Dikic. 1999. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* **274**:14893–14901.
- Boulton, T. G., N. Stahl, and G. D. Yancopoulos. 1994. Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J. Biol. Chem.* **269**:11648–11655.
- Burton, E. A., S. Hunter, S. C. Wu, and S. M. Anderson. 1997. Binding of Src-like kinases to the β -subunit of the interleukin-3 receptor. *J. Biol. Chem.* **272**:16189–16195.
- Chauhan, D., T. Hideshima, P. Pandey, S. Treon, G. Teoh, N. Raje, S. Rosen, N. Krett, H. Husson, S. Avraham, S. Kharbanda, and K. C. Anderson. 1999. RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells. *Oncogene* **18**:6733–6740.
- Chauhan, D., P. Pandey, T. Hideshima, S. Treon, N. Raje, F. E. Davies, Y. Shima, Y. T. Tai, S. Rosen, S. Avraham, S. Kharbanda, and K. C. Anderson. 2000. SHP2 mediates the protective effect of interleukin-6 against dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *J. Biol. Chem.* **275**:27845–27850.
- Corey, S. J., A. L. Burkhardt, J. B. Bolen, R. L. Geahlen, L. S. Tkatch, and D. J. Tweardy. 1994. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4683–4687.
- Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge, and J. Schlessinger. 1996. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* **383**:547–550.
- Dittrich, E., C. R. Haft, L. Muys, P. C. Heinrich, and L. Graeve. 1996. A dileucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and downregulation of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* **271**:5487–5494.
- Ernst, M., U. Novak, S. E. Nicholson, J. E. Layton, and A. R. Dunn. 1999. The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation: involvement of STAT3. *J. Biol. Chem.* **274**:9729–9737.
- Ernst, M., D. P. Gearing, and A. R. Dunn. 1994. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *EMBO J.* **13**:1574–1584.
- Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, and T. Hirano. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5**:449–460.
- Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. C. Heinrich, and L. Graeve. 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. *J. Biol. Chem.* **271**:12991–12998.
- Gibson, R. M., W. P. Schiemann, L. B. Prichard, J. M. Reno, L. H. Ericsson, and N. M. Nathanson. 2000. Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the di-leucine internalization motif. *J. Biol. Chem.* **275**:22574–22582.
- Hallek, M., C. Neumann, S. Schäffer, M. Danhauser-Riedl, N. von Bubnoff, G. de Vos, B. J. Druker, K. Yasukawa, J. D. Griffin, and B. Emmerich. 1997. Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp. Hematol.* **25**:1367–1377.
- Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly. 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* **271**:695–701.
- Hatakeyama, M., T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and T. Taniguchi. 1991. Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56^{lck}: identification of a novel intermolecular association. *Science* **252**:1523–1528.
- Hemmann, U., C. Gerhartz, B. Heesel, J. Sasse, G. Kurapatk, J. Grötzinger, A. Wollmer, Z. Zhong, J. E. Darnell, Jr., L. Graeve, P. C. Heinrich, and F. Horn. 1996. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. *J. Biol. Chem.* **271**:12999–13007.
- Hibi, M., K. Nakajima, and T. Hirano. 1996. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* **74**:1–12.
- Ihle, J. N., B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.* **19**:222–227.
- Kim, H., and H. Baumann. 1999. Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase Shp-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**:5326–5338.
- Lai, C. F., J. Ripperger, K. K. Morella, Y. Wang, D. P. Gearing, G. H. Fey, and H. Baumann. 1995. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J. Biol. Chem.* **270**:14847–14850.

28. Minami, Y., T. Kono, K. Yamada, N. Kobayashi, A. Kawahara, R. M. Perlmutter, and T. Taniguchi. 1993. Association of p56^{lck} with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56^{lck}. *EMBO J.* **12**:759–768.
29. Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1991. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:11349–11353.
30. Narazaki, M., B. A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J. N. Ihle, T. Kishimoto, and T. Taga. 1994. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2285–2289.
31. Neumann, C., S. Zehentmaier, G. Danhauser-Riedl, B. Emmerich, and M. Hallek. 1996. Interleukin-6 induces tyrosine phosphorylation of the Ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 in the human multiple myeloma cell line LP-1. *Eur. J. Immunol.* **26**:379–384.
32. Ogata, A., D. Chauhan, G. Teoh, S. P. Treon, M. Urashima, R. L. Schlossman, and K. C. Anderson. 1997. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Immunol.* **159**:2212–2221.
33. Ohtani, T., K. Ishihara, T. Atsumi, K. Nishida, Y. Kaneko, T. Miyata, S. Itoh, M. Narimatsu, H. Maeda, T. Fukada, M. Itoh, H. Okano, M. Hibi, and T. Hirano. 2000. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* **12**:95–105.
34. Pawson, T. 1995. Protein modules and signaling networks. *Nature* **373**:573–579.
35. Pelchen-Matthews, A., I. Boulet, D. R. Littman, R. Fagard, and M. Marsh. 1992. The protein tyrosine kinase p56^{lck} inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits. *J. Cell Biol.* **117**:279–290.
36. Pignata, C., K. V. Prasad, M. Hallek, B. Druker, C. E. Rudd, M. J. Robertson, and J. Ritz. 1995. Phosphorylation of Src family lck tyrosine kinase following interleukin-12 activation of human natural killer cells. *Cell. Immunol.* **165**:211–216.
37. Rao, P., and R. A. Mufson. 1995. A membrane proximal domain of the human interleukin-3 receptor beta c subunit that signals DNA synthesis in NIH 3T3 cells specifically binds a complex of Src and Janus family tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **270**:6886–6893.
38. Schlaepfer, D. D., and T. Hunter. 1996. Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **16**:5623–5633. (Erratum, **16**:7182–7184.)
39. Schlessinger, J. 2000. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* **100**:293–296.
40. Schmitz, J., H. Dahmen, C. Grimm, G. Gendo, C. Müller-Newen, P. C. Heinrich, and F. Schaper. 2000. The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *J. Immunol.* **164**:848–854.
41. Shi, Z. Q., W. Lu, and G. S. Feng. 1998. The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**:4904–4908.
42. Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews, and L. D. Ward. 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci.* **6**:929–955.
43. Somers, W., M. Stahl, and J. S. Seehra. 1997. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* **16**:989–997.
44. Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnoffsky, J. R. Lechleider, B. G. Neel, R. B. Birge, E. J. Fajardo, M. M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, and L. C. Cantley. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**:767–778.
45. Stahl, N., T. J. Farugella, T. G. Boulton, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barberi, S. Pellegrini, J. N. Ihle, and G. D. Yancopoulos. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science* **263**:92–95.
46. Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi, and T. Hirano. 1998. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **18**:4109–4117.
47. Tang, H., Z. J. Zhao, X. Y. Huang, E. J. Landon, and T. Inagami. 1999. Fyn kinase-directed activation of SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-2 by Gi protein-coupled receptors in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **274**:12401–12407.
48. Tang, H., Z. J. Zhao, E. J. Landon, and T. Inagami. 2000. Regulation of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2 by angiotensin II in endothelial cells: roles of Yes tyrosine kinase and tyrosine phosphatase SHP-2. *J. Biol. Chem.* **275**:8389–8396.
49. Taniguchi, T. 1995. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* **268**:251–255.
50. Tanner, J. W., W. Chen, R. L. Young, G. D. Longmore, and A. S. Shaw. 1995. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J. Biol. Chem.* **270**:6523–6530.
51. Thiel, S., I. Behrmann, E. Ditttrich, L. Muys, J. Tavernier, J. Wijdens, P. C. Heinrich, and L. Graeve. 1998. Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* **330**:47–54.
52. Thiel, S., U. Sommer, M. Kortylewski, C. Haan, I. Behrmann, P. C. Heinrich, and L. Graeve. 2000. Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis. *FEBS Lett.* **470**:15–19.
53. Thomas, J. W., B. Ellis, R. J. Boerner, W. B. Knight, I. I. G. C. Withe, and M. D. Schaller. 1998. SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J. Biol. Chem.* **273**:577–583.
54. Venkataraman, A. R., and R. J. Cowling. 1992. Interleukin 7 receptor functions by recruiting the tyrosine kinase p59^{lyn} through a segment of its cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:12083–12087.
55. Ward, L. D., A. Hammacher, G. J. Howlett, J. M. Matthews, L. Fabri, R. L. Moritz, E. C. Nice, J. Weinstock, and R. J. Simpson. 1996. Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high-affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **271**:20138–20144.
56. Warmuth, M., M. Bergmann, A. Priess, K. Häusmann, B. Emmerich, and M. Hallek. 1997. The Src kinase HCK interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding Site of Bcr. *J. Biol. Chem.* **272**:33260–33270.
57. Wen, Z., Z. Thong, and J. E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**:241–250.
58. Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, and S. L. Schreiber. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* **76**:933–945.
59. Zhang, X., J. C. Blenis, H. Li, C. Schindler, and S. Chen-Kiang. 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* **267**:1990–1994.
60. Zhao, J., C. Zheng, and J. Guan. 2000. Pyk2 and FAK differentially regulate progression of the cell cycle. *J. Cell Sci.* **113**:3063–3072.

Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and
CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing
STI571 resistant Bcr/Abl kinases

Markus Warmuth, Nicola Simon, Olga Mitina, Ruth Mathes, Dorian Fabbro, Paul
W. Manley, Elisabeth Buchdunger, Karin Forster, Ismail Moarefi and Michael
Hallek

Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing STI571 resistant Bcr/Abl kinases

Running title: binding mode of STI571, PP1 and CGP76030

Scientific Section: Neoplasia

Markus Warmuth^{1,2} ||, Nicola Simon^{1,2} ||, Olga Mitina^{1,2}, Ruth Mathes¹, Dorian Fabbro³, Paul W. Manley³, Elisabeth Buchdunger³, Karin Forster^{1,2}, Ismail Moarefi⁴, and Michael Hallek^{1,2,5}

1 Klinische Kooperationsgruppe für Gentherapie, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Marchioninistrasse 25, 81377 München, Germany;

2 Medizinische Klinik III, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Grosshadern, Marchioninistrasse 15, 81377 München, Germany;

3 Novartis Pharma AG, Oncology Research, 4002 Basel, Lichtstr.35, Switzerland.

4 Max-Planck-Institute for Biochemistry, Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried, Germany

5 Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 München

|| these authors contributed equally to the work

Several of the authors (D.F., P.W.M., E.B.) are employed by a company (Novartis) whose (potential) product was studied in the present work.

total text word count: 5176

abstract word count: 189

Correspondence should be addressed to:

Michael Hallek, MD

Medizinische Klinik III

Universität München

Grosshadern

Marchioninistrasse 15

D-81377 München

Germany

Fax: +49/89/7095 6039

Phone +49/89/7095 6038

E mail: mhallek@med3.med.uni-muenchen.de

Abstract

The leukemogenic tyrosine kinase Bcr-Abl contains a highly conserved inhibitor binding pocket (IBP), which serves as a binding site for STI571. Mutations at the IBP may lead to resistance of the Abl kinase against STI571. To examine the mechanisms of resistance to STI571 in more detail, we created several point mutations at amino acid positions 315 and 380 in Abl, which blocked the access to the IBP. In addition, mutations stabilizing the active conformation of Abl (D276S/E279S) also lead to STI571 resistance, suggesting that the inhibitor required inactivation of the kinase prior to binding. These Bcr-Abl mutants were then used to evaluate the binding mode and specificity of two compounds, PP1 and CGP76030, originally characterized as Src kinases inhibitors. In contrast to STI571, PP1 and CGP76030 blocked cell growth and survival in cells expressing various inhibitor resistant Abl mutants. Studies on the potential signaling mechanisms demonstrated that PP1 and CGP76030 inhibited the activity of Src family tyrosine kinases and Akt but not STAT5 and Jnk. The results suggest that the use of Src kinase inhibitors is a potential strategy to prevent or overcome STI571 resistance in Bcr/Abl positive leukemia.

Introduction

c-Abl is a non-receptor tyrosine kinase that contributes to several leukemogenic fusion proteins, including Bcr-Abl. The latter was found to be the hallmark of chronic myeloid leukemia (CML), a clonal malignancy of a hematopoietic stem cell. In addition, Bcr-Abl is detectable in a subset (25 – 30%) of patients with acute lymphoblastic leukemias (ALL). Fusion of c-Abl to Bcr is caused by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 and has been shown to result in constitutive activation of the Abl kinase domain¹.

STI571 is an ATP-competitive inhibitor of Abl. Several clinical trials revealed that STI571 induces hematological remissions in up to 98% of patients, depending on the disease phenotype and stage²⁻⁵. The lack of dose-limiting toxicity obviously reflects the specificity of STI571. In addition to Abl, only Arg, as well as c-Kit and PDGF receptor (PDGF-R) kinases have been reported to be inhibited by STI571^{6,7}.

A recently published crystal structure of Abl in complex with an analogue of STI571 suggested that the high specificity of STI571 results from binding into an inhibitor binding pocket (IBP), which is located in close proximity to the ATP binding site⁸. In Abl, 6 amino acids, including alanine (A) 269, lysine (K) 271, valine (V) 299, threonine (T) 315, alanine (A) 380 and phenylalanine (F) 382 (Fig. 1A) define the entrance of the IBP. Two of these positions, residues 315 and 380, show high variability amongst different protein kinases. Position 315 is occupied by either threonine (T), valine (V), leucine (L), isoleucine (I), methionine (M), glutamine (Q) or phenylalanine (F), and position

380 by either alanine (A) cysteine (C), serine (S) or threonine (T). Interestingly, in most STI571 insensitive kinases the side chains of the amino acids at these positions are bulkier as compared to Abl.

A third gate keeping amino acid position, Phe382, was suggested to act as a determinant of specificity. In STI571-inhibited Abl, Phe382 adopts an orientation, which markedly increases the access to the IBP. This orientation is different to the configuration found in the inactive structures of kinases such as Src, Hck, FGF-RK or EphB2-RK⁹⁻¹². This specific orientation of Phe382 in inactive Abl seemed to depend closely on the conformation of the activation loop, which in many kinases structurally varies considerably between the active and inactive states. Therefore, it was hypothesized that the A-loop of Abl needs to adopt the inactive conformation prior to STI571 binding.

Emerging data about the resistance of patients towards STI571 has somewhat reduced the initial enthusiasm about STI571^{2,13}. Gorre and colleagues have reported Bcr-Abl gene amplification and a point mutation at position 315 to isoleucine to be potential causes of such resistances, the latter observation corroborating the importance of this position for STI571 binding¹³. Other mutations, such as Y253H, Y253F, E255K or E255V have been reported. Their mechanism of reducing STI571 sensitivity, however, remains not fully understood, as most residues are not directly involved in STI571 binding¹⁴⁻¹⁶. Moreover, these residues are not conserved amongst STI571 sensitive kinases and some of the residues, such as phenylalanine at position 253 or lysine at position 255, are actually found at homologous positions in PDGF-R and c-Kit.

In addition, the upregulation of expression of signaling molecules such as Btk or Src family kinases has been observed in cells from STI571 resistant patients^{17,18}. It was hypothesized that such signaling molecules might at least in part substitute for Abl kinase activity to induce important signaling pathways. Interestingly, we could show previously that Bcr-Abl activates Src family kinases in an Abl kinase independent manner and that active Src kinases are able to induce phosphorylation of Bcr-Abl and its interaction with Grb2^{19,20}. Moreover, STI571 does not inhibit Src family kinases directly²¹, further corroborating a possible importance of Src kinases in the development of clinical STI571 resistance.

This study was undertaken to investigate the use of dual specific Src/Abl kinase inhibitors to treat Bcr-Abl-positive leukemias and to set up an experimental system which would enable us to dissect the biological properties of such inhibitors. We show here that dual specific Src/Abl inhibitors target Src kinases to induce growth arrest and apoptosis in Bcr-Abl-positive cells independent of Abl inhibition. The results suggest the use of dual specific Src/Abl-inhibitors as a potential strategy to prevent or overcome STI571 resistance in Bcr-Abl-positive leukemias.

Methods

Antibodies. Rabbit polyclonal antibodies (abs) to Lyn (44), Fyn (Fyn3), Src(N16), STAT5(C-17), Akt (N19) and Jnk (FL) as well as anti-phosphotyrosine antibody (PY99) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The monoclonal α -Abl ab Ab3 was purchased from Oncogene Sciences (Uniondale, NJ). Phospho-specific polyclonal antibodies to Abl (pY245), STAT5 (pY694), Jnk (pT183/pY185), Akt (pT308, pS473) and Src kinases (pY416) were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA). All secondary abs for western blot were provided by Amersham (Braunschweig, Germany).

Tyrosine kinase inhibitors. The pyrazolo-pyrimidine derivative PP1 was bought from Alexis Biochemicals, San Diego, CA and dissolved in DMSO to a concentration of 25mM. STI571 and CGP76030 were from Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland.

Plasmids and site directed mutagenesis. In order to introduce point mutations into Bcr-Abl, a KpnI/Eco47III-subfragment of Bcr Abl containing the sequence coding for Bcr-Abl's kinase domain was cloned into pUC Δ NdeI/XbaI engineered by site directed mutagenesis to contain a Eco47III site in the polylinker. Cloning of pUC Δ NdeI/XbaI was described elsewhere. After introduction of point mutations, this fragment was first recloned into pcDNA3abl. Thereafter, the 5' part of abl up to the KpnI site was substituted by Bcr coding sequences and the respective part of Abl using a KpnI-fragment from pcDNA3bcr-abl. All

mutations were confirmed by sequencing. For expression in COS7 and 32D cells cDNAs were cloned into the EcoRI sites of pApuro or pMSCV.

Cell lines. Parental 32D cells as well as 32D cells expressing Bcr-Abl and mutants thereof (32Dp210) were grown in Iscove's modified dulbecco's media (IMDM) supplemented with 10% FBS. COS7 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) containing 4,5g/l glucose) and supplemented with 10% FBS. K562, LAMA, U937, HL60 and OCI-AML5 cells were grown in RPMI supplemented with 10% FBS. All media and FBS were purchased from Gibco Life Technologies, Inc, Karlsruhe, Germany.

Transfection of cells. COS7 cells were transfected using Effecten® transfection reagent as to the guidelines of the manufacturer (Quiagen, Hilden, Germany).

Generation of retroviral stocks. For generation of retroviral stocks all DNAs were purified using endotoxine free DNA preparation Kits (Quiagen, Hilden, Germany). 293T cells were transfected with 10 µg of retroviral vector DNA(pMSCV) and 5 µg of MCV-ecopac, an ecotropic packaging construct, in a 6-cm dish using conventional calcium precipitation. Medium was changed at 24 h, and virus containing media was harvested at 48 h after transfection. Virus titers for neomycin resistance was determined by transduction of Rat1 fibroblast cells.

Retroviral infection of 32D cells. 32D cl3 cells grown in RPMI media containing 10% FBS and 10% WEHI supernatant. 5×10^4 cells per 24 well were transduced with equal MOIs of retroviral stocks in a total volume of 500 µl in the presence of polybrene for 4 – 5h. Thereafter 1,5 ml of medium was added

and cells were incubated at 37°C. 48h after infection G418 was added at a concentration of 1mg/ml. Finally 4 days after infection cells were selected for IL-3 independence. At day 6 dead cells were removed by density centrifugation, viable cells were counted and plated at 5×10^4 cells per ml in a TC25 flask in the presence of either vehicle (DMSO) or various kinase inhibitors (STI571, PP1, CGP76030). The number of viable cells and ration of cell death were determined 48h later.

Cell lysis. COS7 cells were lysed as described recently²⁰. For lysis of 32D cells, cells were harvested and washed twice in cold PBS. For experiments evaluating the activity profile of PP1 or STI571 cells were incubated with the indicated concentrations of inhibitor or with DMSO at a density of 5×10^6 cells/ml for 1,5 - 2h. 10^7 cells were lysed in 100 μ l of lysis buffer containing 1% NP-40, 20 mM Tris (pH 8,0), 50mM NaCl, and 10mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonylfluorid, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 2 mM sodium orthovanadate. After resuspension in lysis buffer cells were incubated for 25min on ice. Finally, insoluble material was removed by centrifugation at 15 000g. Clarified lysates were checked for protein concentrations using a BioRad protein assay.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Gel electrophoresis and immunoblotting were performed as described with some minor modifications²⁰. Proteins were routinely blotted on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Membranes were blocked in 5% milk powder for 1h. Primary and secondary antibodies were diluted 1:500 to 1:5000 in TBS containing 1% milk powder. Phospho-specific antibodies were used as to the

guideline of the manufacturer. Proteins were detected using the ECL or ECL Plus detection system as recommended by the manufacturer (Amersham, Braunschweig, Germany).

Detection of apoptosis by flow cytometry. For assessing apoptosis induced by the various kinase inhibitors, cells were incubated with the indicated concentrations of PP1 or STI571 at a density of 5×10^4 per ml. Apoptosis was routinely assessed by measuring the binding of FITC-conjugated Annexin V to the membranes of apoptosing cells. About 5×10^4 cells were taken at the indicated time points and washed once in PBS. Thereafter, cells were resuspended in 195 μ l of Annexin V binding buffer and 5 μ l of Annexin V-FITC (Bender MedSystems Diagnostics, Vienna, Austria) were added. Cells were mixed and incubated at room temperature for 10 - 20 min. Afterwards, cells were pelleted again, washed once and resuspended in 190 μ l of Annexin V binding buffer. 10 μ l of a 20 μ g/ml propidium iodide stock solution were added and the ratio of Annexin V-positive to negative cells was determined by FACS-analysis using a Coulter EPICS XL 4-color cytometer.

Generation of computer animated structural data. Figures containing structural data were prepared using WebLab™ ViewerPro software and are based on the previously published coordinates of the Abl/STI571 crystal structure complex⁸. Amino acid exchanges were introduced into this structure using Swiss Prot Structure Viewer software.

Results

Mutation of positions T315 and A380 of Abl to bulky amino acids induces resistance to STI571.

Computer models of the Abl/STI571 complex with mutations of T315 to M or A380 to T suggested that bulkier amino acid side chains at these positions restrict the access for STI571 to a IBP, located adjacent to the ATP binding site (Fig.1A). Thus, amino acid positions 315 and 380 might act as molecular gatekeepers controlling the access for STI571 to the IBP in individual protein kinases. In order to prove this genetically, mutations to V, L, I, M, Q or F at position 315 and to C or T at position 380 were generated, representing most of the amino acids found at these positions in other kinases. When expressed in Cos7 cells all mutants at position 315 showed a similar or slightly enhanced spontaneous kinase activity as compared with Bcr-Ablwt (Fig. 1B and data not shown; left panel). In contrast, activity of mutants A380C and A380T was decreased by approximately 50% (Fig. 1B and data not shown). More importantly, STI571 inhibited substrate and autophosphorylation (pY245-Abl) of Bcr-Ablwt in a concentration dependent manner (data not shown), but failed to inhibit mutants T315V, T315L, T315I, T315M, T315Q and T315F as well as A380T at concentrations of up to 10 $\mu\text{mol/l}$ (Fig. 1B).

We next introduced Bcr-Ablwt and the various mutants into the murine IL-3-dependent cell line 32D. Concentration kinetics showed that exposure of 32D_{Bcr-Ablwt} cells to about 1 to 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571 was both necessary and sufficient to induce a complete stop of cell proliferation and to cause apoptosis in more than 90% of cells within 2 days (data not shown). These effects

correlated to a complete down regulation of Bcr-Abl autophosphorylation as well as inhibition of STAT5 and Jnk phosphorylation/activation (data not shown). In contrast, when STI571 resistant Bcr-Abl mutants were expressed in 32D cells, both the block of cell proliferation and the induction of apoptosis caused by 1 and 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571 were completely abolished (Fig. 1C). Comparable results were obtained for all mutants except A380C, which did not confer any resistance to STI571 in 32D cells (Fig. 1C). Resistance of cells expressing mutant A380T was only incomplete with about 20 – 25% percent apoptotic cells and a considerable reduction of cell proliferation at 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571 (Fig. 1C). Taken together, the results confirmed the importance of positions 315 and 380 as molecular gatekeepers controlling the access to the IBP, thereby determining the specificity of STI571 for Abl.

Destabilization of the inactive conformation of the A-loop decreases the sensitivity of Abl for STI571

Adoption of the inactive conformation of the A-loop was suggested to be indispensable for STI571 binding⁸. In order to prove this hypothesis, we studied the intramolecular interactions of the A-loop of STI571-inhibited Abl with other regions of the enzyme. We hypothesized that the disruption of such interactions would destabilize the A-loop, thereby hyper-activating Abl and rendering it less sensitive to STI571. This led us to the identification of an H-bond system between R386 on the one hand and D276/E279, located on the β 3- α C-loop, on the other hand (Fig. 2A). Importantly, this motive was found to be highly conserved within STI571 sensitive kinases (not shown) and none of these amino acids does directly contribute to STI571 binding⁸.

In order to test the importance of the above described interaction for kinase regulation and STI571 binding, both residues were mutated to serine. When expressed in Cos7 cells, the resultant mutant, Bcr-AblD276S/E279S, displayed an increased kinase activity (Fig.2B) and a markedly decreased sensitivity towards STI571 inhibition (Fig.2C). Moreover, if expressed in 32D cells, the IC₅₀ for inhibition of cell proliferation by STI571 was increased about tenfold from 0,069 $\mu\text{mol/l}$ in 32D_{Bcr-Ablwt} cells to 0,71 $\mu\text{mol/l}$ in 32D_{Bcr-AblD276D/E276S} cells (Fig.3D; upper panel), and the rate of apoptotic cell death at 2 $\mu\text{mol/l}$ STI571 was reduced from greater than 90% to about 30% (Fig.2D; lower panel).

The residue R386 was shown to interact with conserved autophosphorylated tyrosines located on the A-loop in structures of active kinases such as Lck or IRK^{22,23}. This suggested that dephosphorylation of Y393, the major autophosphorylation site of Abl, is another prerequisite for STI571 binding. We hypothesized that a mutant of this autophosphorylation site to phenylalanine would not be dephosphorylated prior to STI571 binding and have increased sensitivity to STI571. Surprisingly, however, the mutation of the respective autophosphorylation site in Bcr-Abl to phenylalanine (Y393F) had little effect on the sensitivity of Bcr-Abl to STI571 in Cos7 and almost no effect in 32D cells (Fig.2C and D), suggesting that dephosphorylation of Y393 by endogenous phosphatases is not a rate limiting factor for STI571 binding.

PP1 and CGP 76030 inhibit Bcr-Abl and induce growth arrest and apoptosis in Bcr-Abl-positive cells.

The rapid development of direct STI571 resistance during therapy of patients with advanced Bcr-Abl-positive leukemias suggests that inhibition of additional signaling molecules might be needed to treat primary Bcr-Abl-positive B-ALL or CML in blast crisis. We could recently show that Bcr-Abl activates - by an Abl kinase independent mechanism - Src family kinases, which are not directly inhibited by STI571^{19,20}. The lack of inhibition of Src kinases by STI571 might be due to differences of Abl and Src kinases in the conformation of the A-loop and the orientation of F382, only⁸. Still, Bcr-Abl and Src kinases share high homology as to the amino acids forming the STI571 binding pocket and, as a consequence, many Src family kinase inhibitors do indeed show cross reactivity on Abl kinase. We used the above described Bcr-Abl mutants to validate the binding mode and biological action of two such dual specific Src/Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030 (Fig. 3A and B)^{24,25}.

As shown in Fig. 3C and D both compounds, PP1 and CGP76030, inhibited Bcr-Abl in a concentration dependent manner. Approximately 25 – 50 $\mu\text{mol/l}$ PP1 or 5 – 10 $\mu\text{mol/l}$ CGP76030 were necessary to inhibit substrate phosphorylation by and autophosphorylation of Bcr-Abl in Cos7 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells (Fig 3C and D). Interestingly, in difference to the close correlation of inhibition of substrate and autophosphorylation of Bcr-Abl caused by STI571 (data not shown), PP1- and CGP76030-inhibited Bcr-Abl retained considerable levels of autophosphorylation at concentrations completely abolishing substrate phosphorylation (Fig. 3C and D; data not shown). Both compounds induced growth arrest and apoptosis in 32D_{Bcr-Ablwt} cells; 50 $\mu\text{mol/l}$ PP1 (Fig. 3E; left panel) and 5 $\mu\text{mol/l}$ CGP76030 (Fig. 4F; left panel) were equipotent to 2.5 $\mu\text{mol/l}$ STI571. This effect correlated well with the concentrations needed for

inhibition of Bcr-Abl and Src kinases in 32D_{Bcr-Ablwt} cells, as assessed by immunoblots with phospho-specific antibodies (Fig 8C and data not shown). However and in marked contrast to STI571, both inhibitors also reduced survival and proliferation of parental 32D cells, probably reflecting the inhibition of Src kinases in IL-3 dependent signaling, which is well known²⁶. The action of both compounds on parental 32D cells correlated with their inhibition of Src kinase and Akt kinase activity (data not shown). However, since PP1 and CGP76030 also acted on parental 32D cells, it was not possible to link the biological effects of PP1 and CGP76030 to the inhibition of either Bcr-Abl or Src-Kinases in these cells.

To further evaluate the potential of CGP76030 to reduce cell growth and survival of Bcr-Abl-positive cells, two Bcr-Abl-positive cell lines (K562 and LAMA84) and a number of Bcr-Abl-negative leukemic cell lines (U937, HL-60, OCI-AML5) were incubated with various concentrations of STI571 or CGP76030. Similar to STI571, CGP76030 inhibited cell growth and survival only in Bcr-Abl positive cell lines (Fig. 4A and B), suggesting that this compound was not generally cytotoxic but rather acted by a specific mechanism. Similar results were obtained for PP1 (data not shown).

STI571, PP1 and CGP76030 share overlapping binding modes.

Using above mutants, we evaluated the binding of PP1 and CGP76030 to Abl in more detail. Similar to STI571, PP1(100 $\mu\text{mol/l}$) and CGP76030 (25 $\mu\text{mol/l}$) failed to inhibit Bcr-Abl in cells expressing the mutants T315L, T315I, T315M, T315Q and T315F (Fig. 5). In marked contrast to STI571, normal PP1 sensitivity was found for the mutant T315V. Inhibition of Bcr-Abl T315V by 25 $\mu\text{mol/l}$

CGP76030 was significantly reduced (Fig. 5). Taken together, these results suggested a differential requirement for H-bonding between T315 and PP1 versus T315 and CGP76030 for inhibitor binding.

While position 315 was of critical importance for PP1 and CGP76030 binding, position 380 was not. Both mutants (A380C, A380T) displayed a similar sensitivity to PP1 and CGP76030 as Bcr-Ablwt (Fig. 5). This observation is in accordance with the ability of PP1 and CGP76030, but not STI571, to inhibit EGF-R, a kinase which has a threonine at the position homologous to position 380 in Abl. Finally, PP1 and CGP76030 inhibited Bcr-AblD276S/E279S expressed in Cos7 cells with similar kinetics as Bcr-Ablwt (Fig. 6A and B). Taken together, the results suggest that PP1, CGP76030 and STI571 bind into the same IBP adjacent to the ATP binding site of Abl and have largely overlapping binding modes. However, PP1 and CGP76030 seem to dock into Abl in a manner that is independent of the conformation of the A-loop. Obviously, both inhibitors fill the entrance of the IBP of Abl less perfectly than STI571. This conclusion is consistent with their ability to additionally inhibit Src kinases and other targets, but needs to be confirmed by crystal structure analysis.

Mutation of T315 of Bcr-Abl to bulkier amino acids does not completely disrupt the inhibitory effects of PP1 and CGP76030 on cell growth and survival.

Importantly, comparison of the binding modes of STI571, PP1 and CGP76030 using the various mutants of the gatekeeping amino acid positions, identified Bcr-Abl mutants (T315L, T315I, T315M, T315Q, T315F), which were equally resistant to all three inhibitors. We next wished to make use of this mutants to

dissect Abl- and Src-dependent effects of such inhibitors. Therefore, 32D cells expressing the various mutants of the gate keeping positions 315 and 380 were incubated with STI571, PP1 or CGP76030. As shown above, expression of the STI571-resistant Bcr-Abl mutants T315V, L, I, M, Q, F and A380T caused a complete or partial (A380T) resistance of 32D cells to the inhibitory effects of STI571 with regard to cell proliferation and survival (Fig. 7A and B). In marked contrast, PP1 and CGP76030 considerably blocked the proliferation and inhibited the survival of 32D cells expressing the PP1- and CGP76030-resistant Bcr-Abl mutants T315L, T315I, T315M, T315Q and T315F (Fig. 7A and B). Interestingly, while both compounds inhibited cell proliferation to a similar degree, CGP76030 was more potent to induce apoptosis than PP1. As expected from the above experiments in Cos7 cells, 32D cells expressing the Bcr-Abl mutants T315V, A380C and A380T showed ratios of cell death and inhibition of proliferation similar to cells expressing Bcr-Ablwt (Fig. 7A and B). Finally no significant influence of the mutation D276S/E279S was seen on the inhibition of cell proliferation and survival by PP1 and CGP76030 in 32D cells (Fig. 6C and D), an observation that might be due to both the partially Abl-unrelated action of this compound and the unaltered sensitivity of the D276S/E279S mutant for PP1 and CGP76030 as observed in Cos7 cells.

We next determined the effect of PP1 and CGP76030 on Bcr-Abl activity in cells expressing either Bcr-Ablwt or an inhibitor resistant mutant, such as T315Q. As shown in Fig. 7C, all three inhibitors completely reduced the activity of Bcr-Ablwt as assessed by using phospho-specific antibodies. In contrast, no influence of the various inhibitors on the activity of Bcr-Abl was seen in 32D_{Bcr-AblT315Q} cells. Similar results were obtained from cells expressing other inhibitor

resistant mutants such as T315L, T315I, T315M or T315F. In summary, these results suggest that PP1 and CGP76030 are able to induce growth arrest and apoptosis independent of Abl inhibition.

Differential effects of PP1, CGP76030 and STI571 on the activity of Src kinases.

We investigated next whether the Abl independent biological effects of PP1 and CGP76030 correlated with their ability to additionally inhibit Src kinases. In the absence of inhibitors, a high level of Src kinase autophosphorylation was seen using a phospho-specific pan-Src-antibody (Fig. 7C). Four major autophosphorylated bands were detected (not resolved in Figure 7C). In 32D_{Bcr-Ablwt} cells PP1 and CGP76030 but not STI571 completely blocked the autophosphorylation of Src kinases, corroborating the concept of Abl-kinase independent activation of Src kinases²⁰. Inhibition of Src kinase autophosphorylation by PP1 and CGP76030 occurred independently of whether Bcr-Ablwt or an inhibitor resistant mutant was expressed (Fig. 7C). Moreover, in 32D_{Bcr-AblT315Q} cells, PP1 and CGP76030 still led to a subtle but reproducible reduction of the tyrosine phosphorylation of cytosolic phosphoproteins (Fig. 7C), whereas STI571 showed no effect.

We also wished to study the influence of the various inhibitors on the activity of potential downstream signaling intermediates. All three inhibitors lead to a disruption of the phosphorylation and/or activity of STAT5, JNK and Akt in cells expressing Bcr-Ablwt. Inhibition of STAT5 and JNK was not seen in cells expressing the inhibitor resistant mutant T315Q, suggesting that these signaling pathways are directly downstream of Abl-Kinase activity (Fig. 7D).

Similarly, inhibition of Akt by STI571 was reversed by expression of T315Q (Fig. 7D). Surprisingly, however, activity of Akt was still reduced by PP1 and CGP76030 in cells expressing T315Q (Fig. 7D). These data were reproduced using other inhibitor resistant mutants. This suggested that in addition to Bcr-Abl Src kinases contributed to regulate Akt in Bcr-Abl-positive cell lines.

In summary, these findings suggest that the differential biological effects of PP1/CGP76030 versus STI571 on 32D_{Bcr-Ablwt} and 32D_{Bcr-AblT315} mutant cells are explained - at least in part - by their ability to inactivate Lyn and other Src kinases. However, we wish to emphasize at this point that PP1 and CGP76030 might inhibit additional, yet unknown kinases, which explain their biological properties in our experiments.

Discussion

Based on a recently published crystal structure analysis⁸, work presented in this manuscript characterizes the functional role of two amino acid positions, 315 and 380, as gatekeepers, which control the access for STI571 to an inhibitor binding pocket (IBP). Moreover, we could confirm by genetic experiments the hypothesis that STI571 would bind into inactive rather than active Abl, a feature that considerably contributes to the high specificity of STI571⁸. A mutation was introduced into Abl proposed to destabilize the A-loop and to shift the equilibrium of the different states of the A-loop towards the active conformation. This mutation was based on the disruption of an H-bond system between R386 located on the A-loop and D276 as well as E279, both located within the β 3- α C-loop. This interaction is of special interest, because in the structures of active IRK and Lck, the arginine residues homologous to R386 are H-bond donors for the phosphate groups of autophosphorylated tyrosines located within the A-loop, thereby contributing to the stabilization of the active conformation^{22,23}. In our study, disruption of the above described bonding system generated a Bcr-Abl mutant that was considerably less sensitive to STI571 when compared to Bcr-Ablwt.

Also, this work proposes a more general use of inhibitor resistant mutants to validate kinase inhibitors. In our experiments, we used inhibitor resistant mutants to validate the binding mode and action of two small molecule Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, which inhibit Src kinases in addition to Abl^{24,25,27}. We could show that both inhibitors block growth and survival of Bcr-Abl-positive 32D cells to a degree similar to STI571. Moreover, both compounds

killed Bcr-Abl positive cell lines derived from CML patients, but not several AML cell lines. However, both compounds also affected growth and survival of parental 32D cells, possibly reflecting the published role of Src kinases in the IL-3-dependent growth and survival of several leukemic cells lines²⁶.

A comparison of the binding of PP1, CGP76030 and STI571 to the various Bcr-Abl mutants showed that these inhibitors had largely overlapping binding modes in that all of them were sensitive to mutations at position 315. However, binding of PP1 and CGP76030 was not influenced by the mutation of D276/E279 to serine. This suggested that both compounds bound and inhibited Bcr-Abl independently of the A-loop conformation. Clearly, a crystal structure analysis will be needed to prove this interesting concept. However, our hypothesis is in agreement with a recently published crystal structure of a different Abl kinase inhibitor, PD173955, in complex with the kinase domain of Abl. In this study the authors could show that PD173955 binds to a conformation of Abl similar to the active conformation of active tyrosine kinases, especially with regard to the structure of the A-loop²⁸.

Finally, mutations influencing position 380 did not interfere with inhibition of Bcr-Abl by PP1 and CGP76030. This observation might reflect the larger molecular distance between position 380 and PP1/CGP76030 versus position 380 and STI571^{27,29}, but again, crystal structure analysis will be necessary to elucidate the nature of this finding.

The reduced complexity of binding concluded from testing both compounds with inhibitor resistant mutants explains the somewhat broader target

profile of PP1 and CGP76030^{24,25}. Therapeutically, however, the reduced specificity of PP1 and CGP76030 may be an advantage, as the additional targets of this compounds, above all Src kinases, fit into a therapeutic concept. Despite the success of STI571 in clinical trials, patients with blast crisis or Bcr-Abl positive B-ALL rapidly relapse on STI571². A recent publication suggested that specific point mutations interfering with STI571 binding might contribute to STI571 resistance: a mutation of Bcr-Abl at position 315 to isoleucine was identified in 3 patients with clinical STI571 resistance¹³. Additional mutations have been found at other positions, but the importance of these mutations for clinical resistance needs to be determined¹⁴⁻¹⁶. In our study we confirmed that a mutation of T315 to isoleucine, but also to other amino acids, resulted in a complete resistance of 32D cells to the inhibitory effects of STI571. In contrast, PP1 and CGP76030 still significantly reduced cell growth and survival of cell lines expressing inhibitor resistant Bcr-Abl T315 mutants, suggesting that both compounds inhibited additional kinase targets. This might help to avoid selection for inhibitor resistant point mutations as observed for STI571. We are fully aware that our data did not formally prove the inhibition of Src kinases as the sole or major explanation for the Abl-unrelated biological effects observed. However, the biochemical experiments above showed a strong correlation of the effects of PP1 and CGP76030 on the growth of cells expressing inhibitor resistant Bcr-Abl mutants with their ability to inactivation of Src kinases.

Interestingly, data on a different Abl inhibitor, PD180970, which also inhibits Src kinases was published recently³⁰. In this study, the authors concluded that most of the effect of this compound depended on Abl inhibition. However, only indirect evidence was shown to prove this hypothesis and it

would be interesting to see how PD180970 acts compared to PP1 or CGP76030 on cells engineered to express inhibitor resistant Bcr-Abl.

Importantly, inhibition of Src kinases in cells expressing T315 mutants was associated with a loss of activity of Akt. It was shown only recently that Src kinases influence Akt activity by phosphorylation of tyrosines in the Akt A-loop and by regulating PDK1, a serine/threonine kinase upstream of Akt^{31,32}. Importantly, neither PP1 nor CGP76030 are direct inhibitors of Akt or the upstream kinase PDK1 (M.W, D.F. and M.H.; unpublished observation). This suggests that Src kinases by direct phosphorylation of PDK1 and above all Akt might contribute to the activation of this pathway, which is crucial in regulating cell growth and survival of Bcr-Abl positive cells³³. Future experiments will clarify this question.

In summary, the results presented here point to a potential role of dual specific inhibitors of Abl *and* Src kinases such as PP1 or CGP76030 for the treatment of advanced or STI571 resistant Ph⁺ leukemias. Due to their less complex binding mode and the additional inhibition of Src (and maybe other) kinases, they might avoid selection of inhibitor-resistant cells as observed with STI571. Importantly, CGP76030 has already been used in a rat model for osteoporosis without causing serious toxicity²⁵. No influence on bone marrow cellularity or on peripheral WBC counts was seen (M.W., D.F. and M.H; unpublished observations). It now remains to be determined whether these or similar Src kinase inhibitors are sufficiently specific and safe for clinical use.

References

1. Warmuth M, Danhauser-Riedl S, Hallek M. Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol.* 1999;78:49 - 64
2. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001;344:1038-1042.
3. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344:1031-1037.
4. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2002;346:645-652
5. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase

- chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99:1928-1937
6. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295:139-145.
 7. Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood*. 2001;97:2440-2448.
 8. Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-1942.
 9. Xu W, Harrison S, Eck M. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*. 1997;385:595-602
 10. Sicheri F, Moarefi I, Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature*. 1997;385:602 - 609
 11. Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR. Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*. 1996;86:577-587.
 12. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, Tong J, Pawson T, Sicheri F. Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell*. 2001;106:745-757.
 13. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001;293:876-880.

14. Shah N, Nicoll J, Gorre ME, Paquette RL, Ford J, Sawyers CI. Resistance to Gleevec: sequence analysis reveals a spectrum of Bcr-Abl kinase domain mutations in both acquired and de-novo-resistant cases of CML in myeloid blast crisis. 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology. Orlando; 2001:Abstract: 3205
15. Hofmann WK, Jones LC, Lemp NA, de Vos S, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Ottmann OG, Koefler HP. Ph(+) acute lymphoblastic leukemia resistant to the tyrosine kinase inhibitor STI571 has a unique BCR-ABL gene mutation. *Blood*. 2002;99:1860-1862
16. von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*. 2002;359:487-491
17. Hofmann WK, de Vos S, Elashoff D, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Koefler HP, Ottmann OG. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*. 2002;359:481-486
18. Donato NJ, Wu JY, Albitar M, Arlinghaus RB, Kantarjian H, Talpaz M. Multiple Resistance Mechanisms Identified through Studies of Cell Lines Derived from Chronic Myelogenous Leukemia Patients Progressing on STI-571 Therapy. 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology. Orlando, Florida; 2001:Abstract: 3206

19. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, Emmerich B, Hallek M. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr-abl in myeloid cells. *Cancer Res.* 1996;56:3589 - 3596
20. Warmuth M, Bergmann M, Prieß A, Häuslmann K, Emmerich B, Hallek M. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J Biol Chem.* 1997;272:33260 - 33270
21. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561 - 566
22. Yamaguchi H, Hendrickson WA. Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation. *Nature.* 1996;384:484 - 489
23. Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *Embo J.* 1997;16:5572-5581.
24. Hanke JE, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *J Biol Chem.* 1996;271:695 - 701
25. Missbach M, Jeschke M, Feyen J, Muller K, Glatt M, Green J, Susa M. A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo. *Bone.* 1999;24:437-449.

26. Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene*. 2000;19:2532-2547
27. Liu Y, Bishop A, Witucki L, Kraybill B, Shimizu E, Tsien J, Ubersax J, Blethrow J, Morgan DO, Shokat KM. Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol*. 1999;6:671-678
28. Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P, Schindler T, Veach DR, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571). *Cancer Res*. 2002;62:4236-4243
29. Schindler T, Sicheri F, Pico A, Gazit A, Levitzki A, Kuriyan J. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell*. 1999;3:639-648
30. Dorsey JF, Jove R, Kraker AJ, Wu J. The pyrido[2,3-d]pyrimidine derivative PD180970 inhibits p210Bcr-Abl tyrosine kinase and induces apoptosis of K562 leukemic cells. *Cancer Res*. 2000;60:3127-3131
31. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276:31858-31862
32. Park J, Hill MM, Hess D, Brazil DP, Hofsteenge J, Hemmings BA. Identification of tyrosine phosphorylation sites on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and their role in regulating kinase activity. *J Biol Chem*. 2001;276:37459-37471
33. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, Trotta R, Wlodarski P, Perrotti D, Chan TO,

Wasik MA, Tschlis PN, Calabretta B. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. EMBO J. 1997;16:6151 - 6161

Acknowledgements

We thank S. Reis for technical assistance, C. Kurzeder and C. Schuster for advice with FACS analysis, and R. van Etten and S. Li (Center for Blood Research, Boston, USA) for providing reagents. This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (M.H., grants Ha 1680/2-3 and Ha 1680/2-4) and the Novartis Foundation for Therapeutic Research (M.H. and M.W.).

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.H. (email: mhallek@med3.med.uni-muenchen.de)

Figure legends

Fig. 1 Effect of amino acid substitutions at positions 315 and 380 on inhibition of Bcr-Abl by STI571. (A) Stick representations of STI571 in complex with Abl or mutants of Abl at position 315 to M and 380 to T. Mutants were introduced into the Abl structure using Swiss Prot Structure Viewer software and are based on previously published coordinates of the Abl/STI571 analogue complex⁸. (B) Cos7 cells were transfected with either pApuro, Bcr-Ablwt or the indicated mutants of Bcr-Abl at positions 315 and 380. Cells were either left untreated or incubated with 10 $\mu\text{mol/l}$ STI571 4h prior to lysis. Phosphorylation of Bcr-Abl was assessed using anti-phospho-Abl antibodies. Expression of Bcr-Abl was controlled using anti-Abl antibody. (C) Survival and proliferation of 32D cells expressing Bcr-Ablwt or the various mutants of Bcr-Abl at positions 315 and 380. 5×10^4 cells were seeded per 6 well and treated with DMSO, 1 or 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571. Survival and proliferation were determined 48h later as described under material and methods.

Fig. 2 Genetic characterization of a possible role of Phe382 as a functional gatekeeper controlling STI571 binding. (A) Schematic representation of the interaction between the A-loop and the $\beta 3$ - αC -loop mediated by H-bonds between R386 and D276/E279. (B) Cos7 cells were transfected with 1 μg of either pApuro, Bcr-Ablwt, Bcr-AblY393F or Bcr-AblD276S/E279S. Activity of the various Bcr-Abl mutants was assessed using Phospho-Abl and Phosphotyrosine antibodies. (C) Phospho-Abl and Abl-immunoblots of lysates from Cos7 cells transfected with either pApuro, Bcr-Ablwt, Bcr-AblY393F or Bcr-AblD276S/E279S. Cells were

either left untreated or incubated with the indicated concentrations of STI571. (G) Proliferation (left panel) and survival (right panel) of 32D cells expressing either Bcr-Ablwt, Bcr-AblY393F or Bcr-AblD276S/E279S grown in the presence of the indicated concentrations of STI571.

Fig. 3 PP1 and CGP76030 inhibit Bcr-Abl in a concentration dependent manner to induce apoptosis in 32D_{Bcr-Ablwt} cells. (A) and (B) Structural formula of the kinase inhibitors CGP76030 and PP1. (C) and (D) Cos7 cells were transfected with either pApuro or Bcr-Ablwt. Cells were either left untreated or incubated with the indicated concentrations of CGP76030 and PP1 4h prior to lysis. Phosphorylation of Bcr-Abl and cellular proteins was assessed using anti-phospho-Abl or anti-phosphotyrosine antibodies. Expression of Bcr-Abl was controlled using anti-Abl antibody. (E) and (F) Survival (solid line) and proliferation (dashed line) of 32D_{Bcr-Ablwt} cells in the presence of the indicated concentrations of PP1 (E) or CGP76030 (F).

Fig. 4 CGP76030 inhibits growth and survival of Bcr-Abl-positive but not of AML cell lines. The indicated cell lines were seeded in triplicate into 6 well plates and treated with the indicated concentrations of STI571 or CGP76030. DMSO was used as a vehicle control. Cell counts and the ratio of annexin-V-positive cells were determined three days later as described in material and methods.

Fig. 5 Binding mode of the dual specific Src/Abl kinase inhibitors PP1 and CGP76030. Phospho-Abl and Abl-immunoblots of lysates from Cos7 cells transfected with either pApuro, Bcr-Ablwt or the indicated mutants of Bcr-Abl at

positions 315 and 380. Cells were either left untreated, incubated with 25 $\mu\text{mol/l}$ CGP76030 or 100 $\mu\text{mol/l}$ PP1.

Fig. 6 The conformation of the A-loop does not influence inhibition of Abl by PP1 and CGP76030. (A) and (B) Phospho-Abl and Abl-immunoblots of lysates from Cos7 cells transfected with either pApuro, Bcr-Ablwt, Bcr-AblY393F or Bcr-AblD276S/E279S. Cells were either left untreated or incubated with the indicated concentrations of PP1 (A) or CGP76030 (B). (C) and (D) Proliferation (left panels) and survival (right panels) of 32D_{Bcr-Ablwt} or 32D_{Bcr-AblD276S/E279S} cells grown in the presence of the indicated concentrations of PP1 (C) or CGP76030 (D).

Fig. 7 Incomplete biological resistance of 32D_{Bcr-Abl} cells expressing mutants resistant to CGP76030 and PP1 correlates with inhibition of Src kinases and Akt. (A) and (B) Proliferation (A) and survival (B) of 32D cells expressing Bcr-Ablwt or the various mutants of Bcr-Abl at positions 315 and 380 in response to STI571, PP1 or CGP76030. 5×10^4 cells were seeded per 6 well and treated with DMSO, 2,5 $\mu\text{mol/l}$ STI571, 50 $\mu\text{mol/l}$ PP1, 5 $\mu\text{mol/l}$ CGP76030. Survival and proliferation were determined 48h later by FACS-analysis and trypan blue exclusion. (C) and (D) Phospho-Abl, Phospho-Src, pan-Phosphotyrosine, Phospho-STAT5, Phospho-Jnk and Phospho-Akt western blots of 32D_{Bcr-Ablwt} or 32D_{Bcr-AblT315Q} cells treated with the indicated concentrations of STI571, PP1 and CGP76030 1.5h prior to lysis. Equal expression of the various signaling molecules in the presence of the various inhibitors was assessed using rabbit polyclonal antibodies to Abl, Src, Fyn, Lyn, STAT5, Jnk, and Akt.

Fig.1 Warmuth, et al

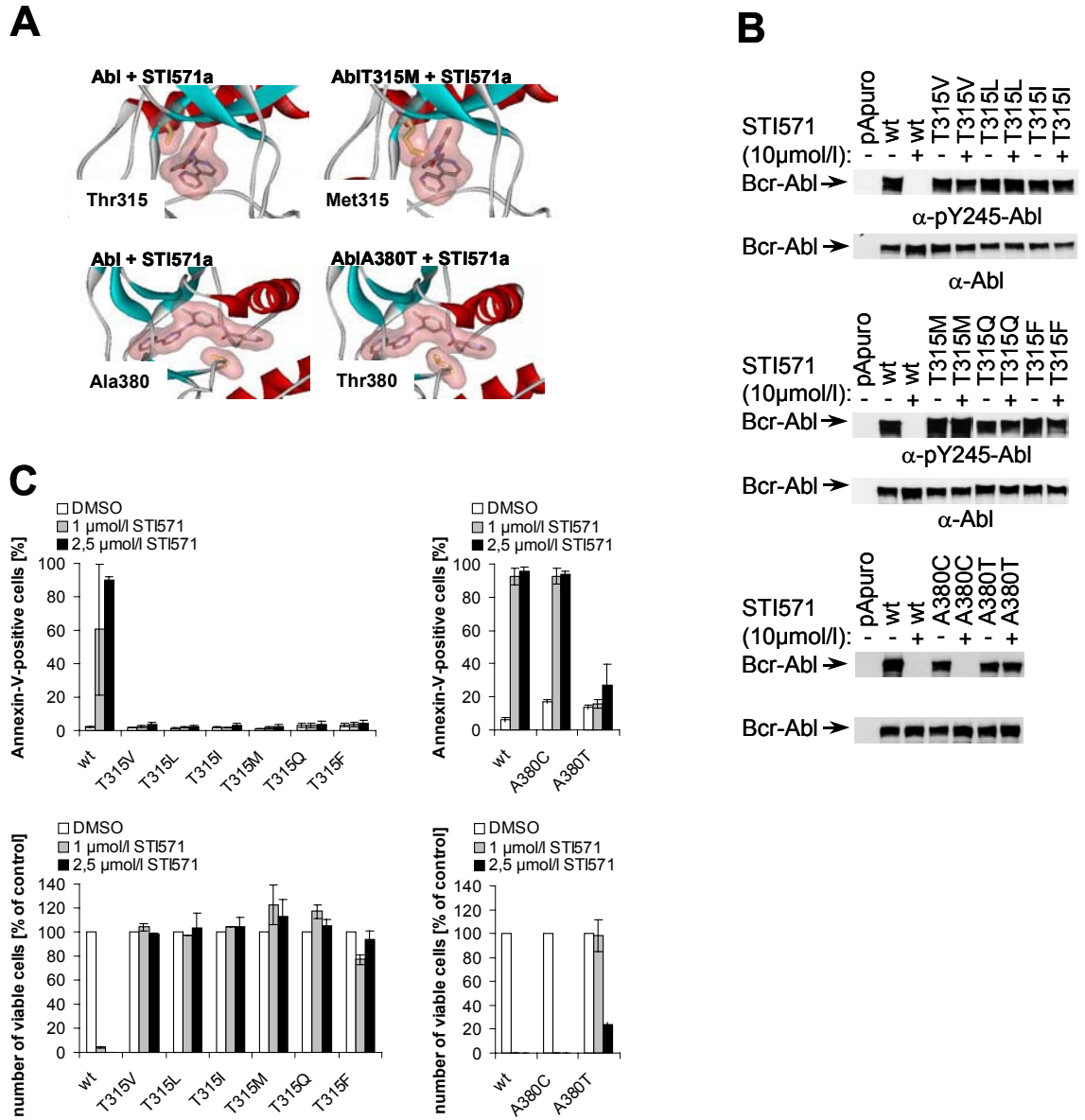


Fig.2 Warmuth, et al

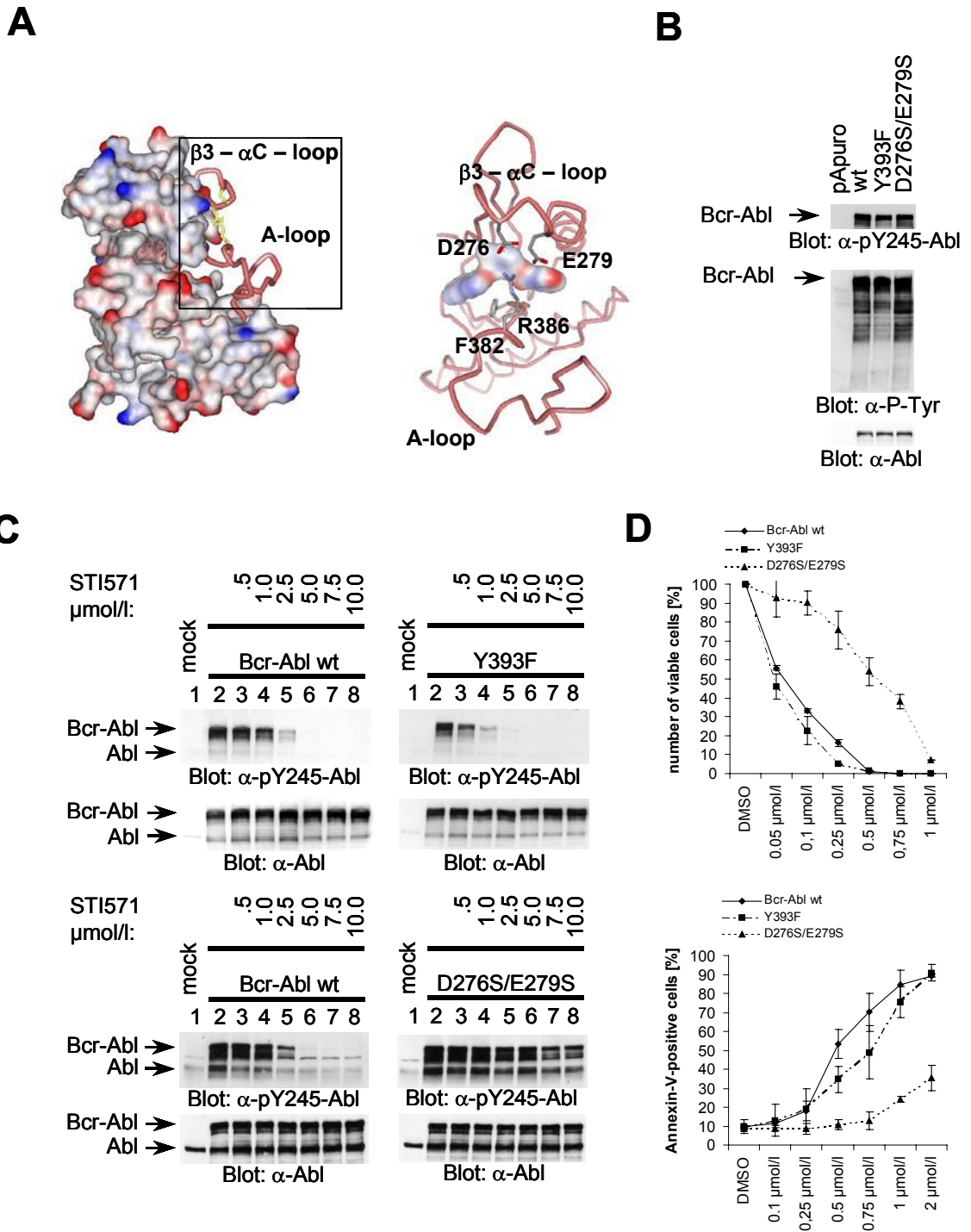


Fig.3 Warmuth, et al

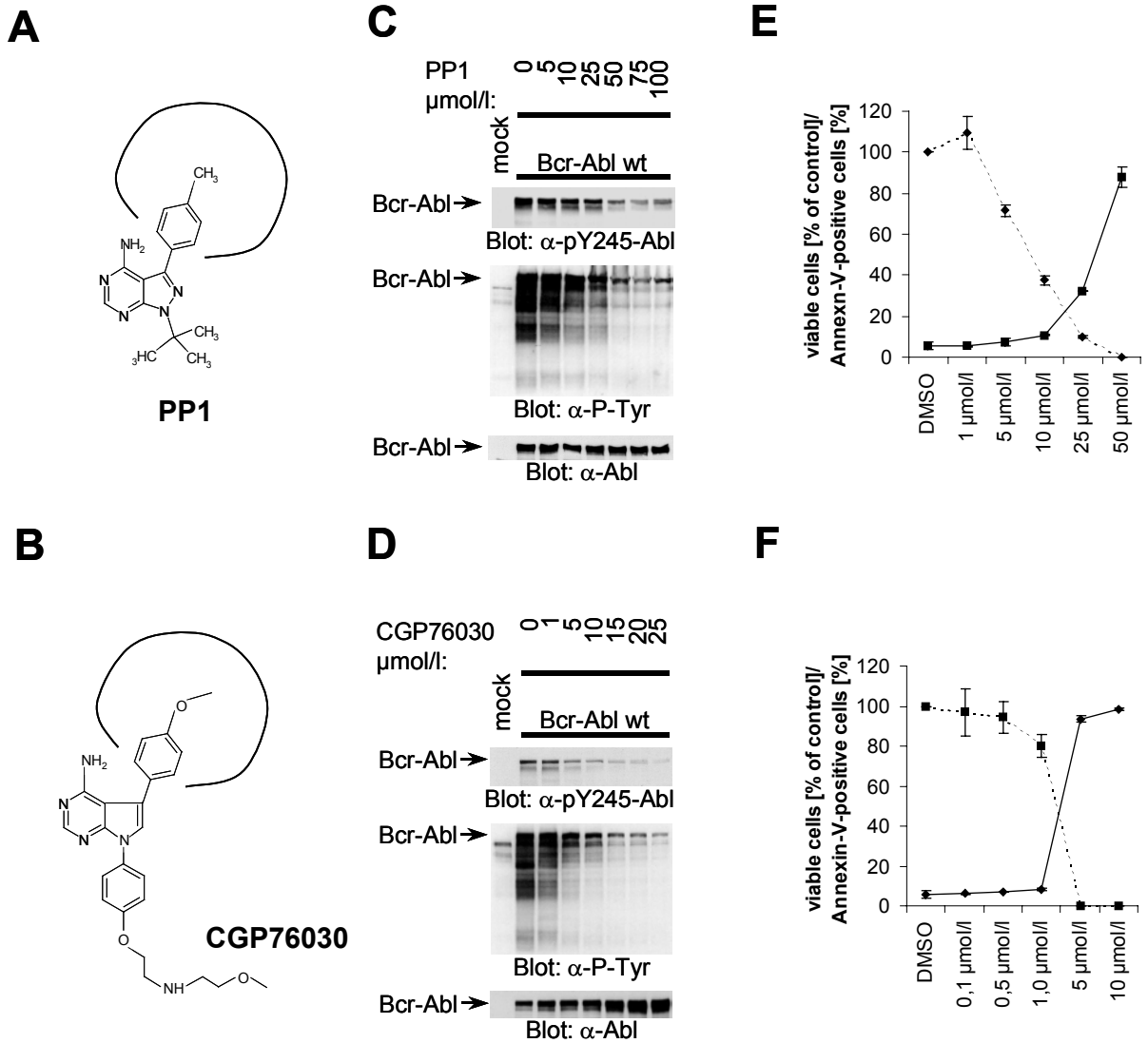


Fig.4 Warmuth, et al

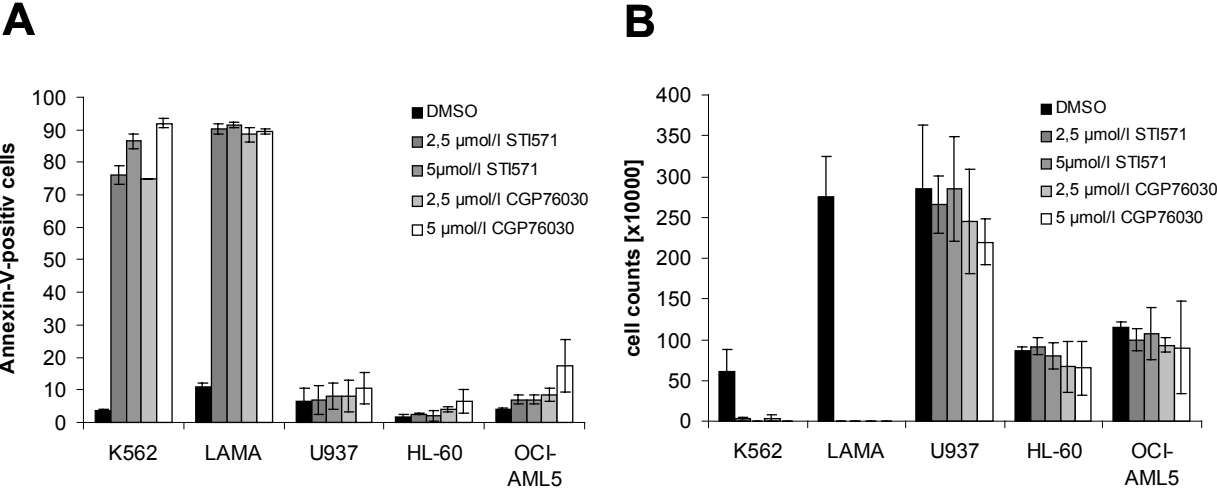


Fig.5 Warmuth, et al

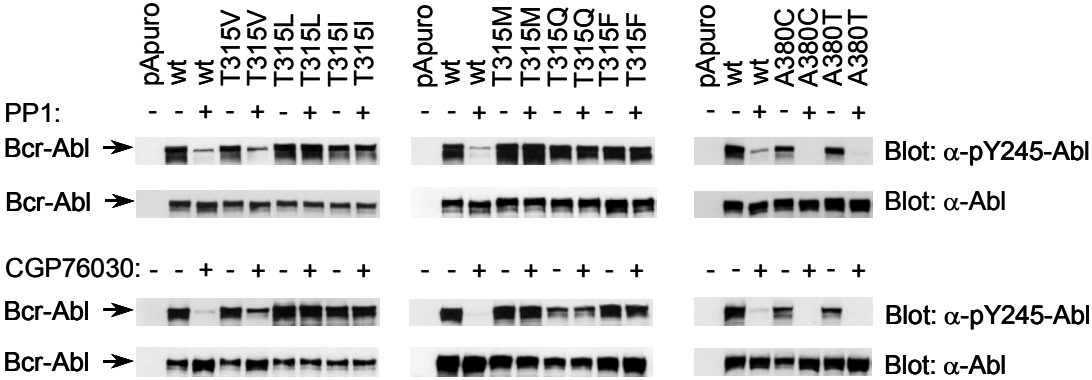


Fig.6 Warmuth, et al

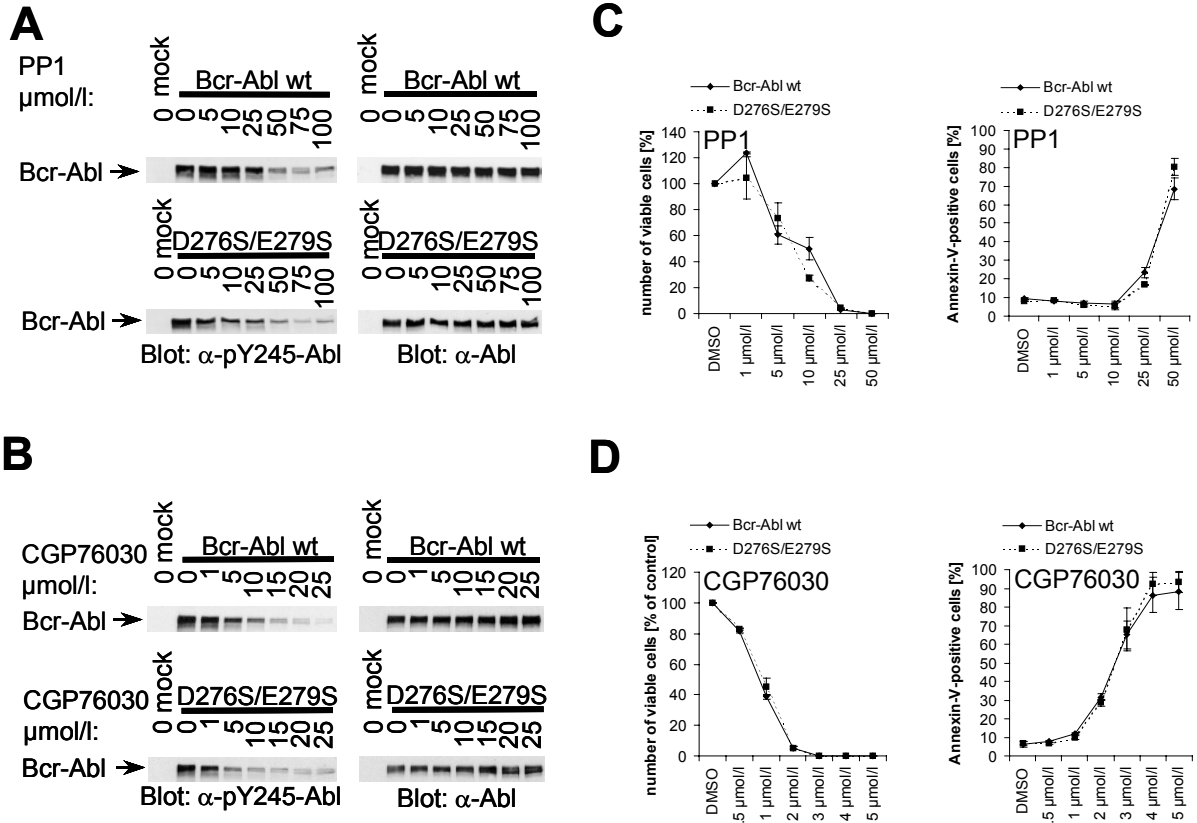
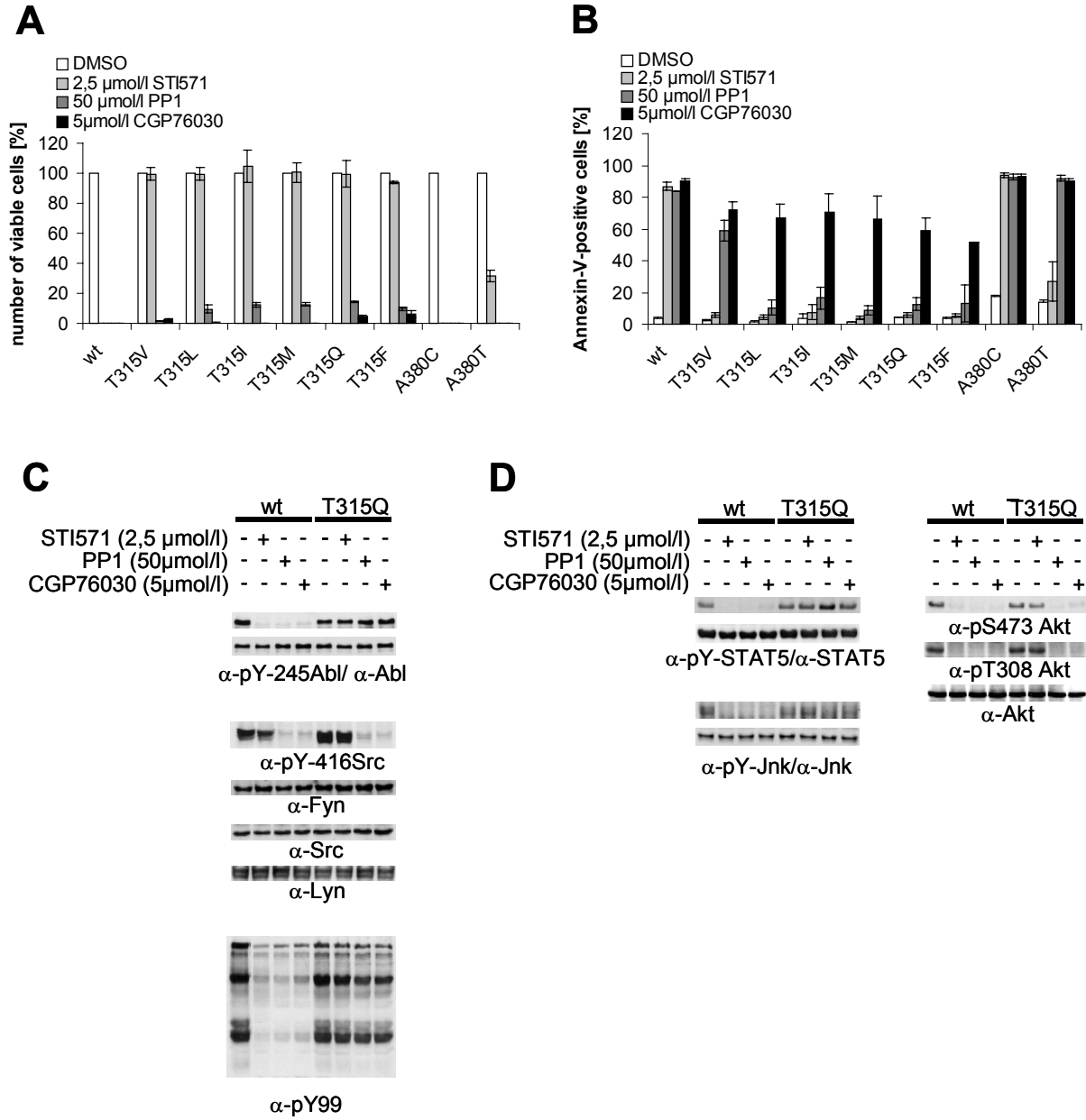


Fig.7 Warmuth, et al



The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription factor regulation
and neutrophilic differentiation are reverted by the Abl kinase
inhibitor STI571

Christine Schuster, Karin Forster, Henning Dierks, Annika Elsässer, Gerhard
Behre, Nicola Simon, Susanne Danhauser-Riedl, Michael Hallek and Markus
Warmuth

The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription factor regulation and neutrophilic differentiation are reverted by the Abl kinase inhibitor STI571

Running title: Bcr-Abl reversibly inhibits C/EBP upregulation

Scientific Section Heading: Neoplasia

Christine Schuster*, Karin Forster*†, Henning Dierks§, Annika Elsässer⁺, Gerhard Behre⁺, Nicola Simon*†, Susanne Danhauser-Riedl†, Michael Hallek*†§ and Markus Warmuth*†

** Klinische Kooperationsgruppe Gentherapie, GSF – National Research Institute for Environment and Health, Marchioninistrasse 25, 81377 Muenchen, Germany*

+ Klinische Kooperationsgruppe Leukämie, GSF – National Research Institute for Environment and Health, Marchioninistrasse 25, 81377 Muenchen, Germany

† Medizinische Klinik III, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Marchioninistrasse 15, 81377 Muenchen, Germany

§ Gene Center, Ludwig-Maximilians-Universitaet Muenchen, Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 Muenchen, Germany

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (M.H., grant Ha 1680/2-3 and 1680/2-4) and the Novartis Foundation for Therapeutic Research (M.H. and M.W.).

total text word count: 5246

abstract word count: 210

All correspondence should be addressed to:

Markus Warmuth
KKG Gentherapie
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Marchioninistrasse 25
D-81377 Muenchen
Phone: ++49 89 7099 414
Fax : +49 89 7099 400
Email: warmuth@gsf.de

ABSTRACT

The clinical progression of chronic myeloid leukemia (CML) from chronic phase to blast crisis is characterized by the increasing failure of myeloid precursors to differentiate into mature granulocytes. This study was undertaken to investigate the influence of Bcr-Abl and of the small molecule Abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induced neutrophilic differentiation. We show that differentiation of 32Dcl3 cells into mature granulocytes is accompanied by the increased expression of the antigens Mac-1 and Gr1, of the G-CSF receptor (G-CSF-R), of myeloid transcription factors (C/EBP α , C/EBP ϵ and PU.1), and of the cyclin dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. In 32Dcl3 cells transfected with the *bcr-abl* gene (32D_{Bcr-Abl}), G-CSF did not trigger granulocytic differentiation, nor the upregulation of C/EBP α , C/EBP ϵ and the G-CSF-R. This could be correlated to a defect in c-Myc downregulation. In contrast, the upregulation of PU.1 and p27^{Kip1} by G-CSF was not affected by Bcr-Abl. Importantly, incubation of 32D_{Bcr-Ablwt} cells with the kinase inhibitor STI571 prior to G-CSF stimulation completely neutralized the effects of Bcr-Abl on granulocytic differentiation, and on C/EBP α and C/EBP ϵ expression. Taken together, the results suggest that the Bcr-Abl kinase induces a reversible block of the granulocytic differentiation program in myeloid cells by disturbing regulation of hematopoietic transcription factors such as C/EBP α and C/EBP ϵ .

INTRODUCTION

Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal malignancy of a hematopoietic stem cell caused in most cases by a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 (Philadelphia translocation)¹, which results in the generation of a fusion protein, Bcr-Abl, with constitutive tyrosine kinase and transforming activity in hematopoietic cells.

3 – 5 years after its onset CML often progresses into a fatal blast crisis, characterized by a profound block in differentiation. It is unclear whether this differentiation block is caused by Bcr-Abl or by secondary mutations acquired during disease progression. Indeed, progression from chronic phase to blast crisis has been linked to multiple secondary cytogenetic or molecular alterations. These include trisomy 8, isochromosome i(17q), trisomy 19, and an extra Philadelphia chromosome². Amongst the molecular abnormalities found during blast crisis are alterations in p16^{INK4A}, p53, pRB, Ras or c-Myc². Moreover, fusion genes resulting from reciprocal translocations such as AML/EVI-1 or NUP98/HoxA9 have been reported to be associated with some cases of blast crisis^{2,3}.

Bcr-Abl is the molecular target for STI571, an ATP-competitive inhibitor of the Abl tyrosine kinase⁴. In several clinical trials, STI571 was shown to induce hematological and cytogenetic remissions in up to 98% of patients with chronic phase CML^{5,6}. Surprisingly, therapeutic effects were also seen in patients with myeloid blast crisis or Bcr-Abl-positive lymphoid disease suggesting that even at this late stage and despite the accumulation of numerous secondary and tertiary genetic alterations the disease was still dependent on Bcr-Abl⁷. However, in many

cases of late stage diseases relapses occurred⁷, and this could be correlated to the development of direct resistance of Bcr-Abl induced by gene amplifications or point mutations⁸.

Hematopoietic cell differentiation is regulated by a complex network of growth and differentiation factors^{9,10}. G-CSF and its receptor (G-CSF-R) are of pivotal importance for the differentiation of myeloid precursors into mature granulocytes. Mice carrying homozygous deletions of the G-CSF or the G-CSF-R genes show reduced levels of morphologically mature neutrophils (about 20% of normal mice)^{11,12}. Amongst the signaling molecules mediating maturation and differentiation of hematopoietic cells induced by G-CSF and other growth factors are transcription factors such as C/EBP α and ϵ , two members of the family of CCAAT/enhancer-binding proteins^{9,10}. C/EBP α -knockout mice display a complete differentiation arrest at the myeloid progenitor level with no mature neutrophils in the peripheral blood¹³. The induced overexpression of C/EBP α in a myeloid cell line was able to induce neutrophilic differentiation without need for any other signal¹⁴. C/EBP ϵ knockout mice show impaired granulopoiesis with major functional and morphological defects of the remaining mature granulocytes. These defects include hyposegmentation of nuclei and a reduced respiratory burst¹⁵. Both C/EBP α and ϵ are targets of the activated G-CSF receptor^{16,17}. The mechanisms leading to C/EBP transcription factor activation, however, are not fully understood.

Bcr-Abl was recently shown to block G-CSF induced granulocytic differentiation in a murine hematopoietic progenitor cell line, 32Dcl3¹⁸. We made use of this model (i) to elucidate the effects of Bcr-Abl on the G-CSF-R dependent granulocytic differentiation program and (ii) to investigate the reversibility of these

effects by STI571. We show that blockage of differentiation induced by Bcr-Abl is accompanied by a deficient upregulation of C/EBP α and ϵ , but not PU.1. Dysregulation of C/EBP transcription factors correlated c-Myc misregulation. All effects on differentiation and C/EBP regulation could be reversed by the addition of the Abl kinase inhibitor STI571. Taken together, the results suggest that the block of granulocytic differentiation may occur as a direct interference of the kinase activity of Bcr-Abl with C/EBP transcription factor regulation.

Methods

Antibodies. Rabbit polyclonal antibodies (abs) to PU.1 (T-21), C/EBP α (14AA), C/EBP ϵ (C-22), c-Jun (H-79), c-Myc (N-262) and G-CSF-R (M-20) as well as the mouse monoclonal antibodies to p21Waf1/Cip1 (F-5), p27Kip1 (F-8) and phosphotyrosine (PY99) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The monoclonal antibodies to Abl (Ab3) and β -tubulin were purchased from Oncogene Sciences (Uniondale, NJ) and Roche Molecular Biochemical, (Mannheim, Germany).

Cell lines and cell culture. L-GM and 32Dcl3 cells were kindly provided by S. Nagata (Osaka, Japan) and U. Just (Muenchen, Germany). L-GM cells, NFS-60 cells, 32Dcl3 cells as well as 32D cells expressing Bcr-Abl and mutants thereof were grown in Iscove's modified dulbeccos media (IMDM) supplemented with 10% FBS (Sigma, Deisenhofen, Germany) and 10% WEHI3B conditioned Media. Jurkat cells were grown in RPMI supplemented with 10% FBS. All media was purchased from Gibco Life Sciences Technologies (Karlsruhe, Germany). For induction of neutrophilic differentiation cells were counted, washed twice with PBS (Gibco) and seeded at a density of 2×10^5 cells/ml into media containing 10% FBS and 10 ng/ml human recombinant (rh) G-CSF (Amgen, Muenchen, Germany). Fresh media was added at day 2 and 4 to keep cells at a density of around 4×10^5 cells/ml throughout culture. For some experiments STI571 was added to the cells at a concentration of 1 μ mol/l. Morphologic differentiation was assessed by May-Gruenwald/Giemsa staining of cells that had been cytopspined onto glass slides before. For proliferation assays, cells were washed extensively with cold PBS and seeded into media containing 10% FBS and either 10% of WEHI3B-conditioned

media or 10 ng/mL human recombinant G-CSF (Amgen). Cell density at day 0 was 3×10^4 cells/ml. STI571 was added at a concentration of 1 μ mol/l where indicated. The number of viable cells was determined daily by trypan blue exclusion.

Plasmids and generation of stably expressing cell lines. Generation of the kinase inactive mutant of Bcr-Abl was described previously¹⁹. Generation of the STI571 resistant mutant Bcr-AblT315I will be described elsewhere. Wt and mutant cDNAs were cloned into pLXSN or pMSCV. Stably expressing cell lines were generated by electroporation. Cells were selected in the presence of 1mg/ml neomycin (G418). Subclones were generated by limited dilution starting at day 4 after transfection. Two independent clones of each cell type were used for further experiments. Both clones had the same phenotype and gave rise to comparable results. Importantly, cells were grown in the presence of IL-3 during selection and prior to G-CSF induced differentiation to avoid secondary alterations due to selection for growth factor independence. New frozen stocks of cells were used every 2 weeks. Generation of retroviral stocks using pMSCV vectors, infection of 32Dcl3 cells and generation of Bcr-Abl expressing mass populations will be described elsewhere (Warmuth et al; 2002; submitted).

Cell lysis. For lysis, 32D cells were harvested at the indicated time points after G-CSF stimulation and washed twice in cold PBS. For experiments evaluating the activity profile of STI571 cells were incubated with either inhibitor or DMSO at a density of 5×10^6 cells/ml for 1,5 - 2h. 10^7 cells were lysed in 100 μ l of lysis buffer containing 1% NP-40, 20 mM Tris (pH 8,0), 50mM NaCl, and 10mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonylfluorid, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 2 mM sodium orthovanadate. After resuspension in lysis buffer cells were incubated

for 25min on ice. Insoluble material was removed by centrifugation at 15 000g. Lysates were checked for protein concentrations using BioRad protein assay.

Gel electrophoresis and immunoblotting. Gel electrophoresis and immunoblotting were performed as described previously¹⁹.

Flow cytometry. For flow cytometry, cells were washed twice and resuspended in 100 μ l PBS containing 2% FBS. Cells were stained with FITC-conjugated α -Mac-1 (Pharmingen, Heidelberg, Germany) or α -Gr-1 (Caltag, Burlingame, CA) abs for 30 minutes at room temperature. FACS-analysis was done using a Coulter EPICS XL 4-color cytometer.

For detection of G-CSF-R surface expression, the Fluorokine™ human G-CSF phycoerythrin conjugate kit from R&D Systems (Minneapolis, MN) was used according to the guidelines of the manufacturer. In brief, cells were collected, washed twice and resuspended in PBS to a final concentration of 4 – 5 x 10⁶ cells/ml. 10 μ l of PE-labeled G-CSF was added to 25 μ l of washed cell suspension in a 12 x 75 borosilicate tube. As a control, an identical sample of cells was stained with 10 μ l PE-conjugated streptavidin. Cells were incubated for 1h at 4°C. Thereafter, cells were washed twice with 2 ml of 1x RDF1 buffer and resuspended in 200 μ l of RDF1 buffer for flow cytometric analysis. To control for specificity of the staining reaction an aliquot of washed cells was preincubated with a 25-fold molar excess of unconjugated rhG-CSF for 30 min at room temperature prior to addition of 10 μ l PE-labeled G-CSF.

Detection of apoptosis by flow cytometry. 1 x 10⁵ cells per ml were incubated with STI571 at a concentration of 1 μ mol/l. Apoptosis was assessed by measuring

the binding of FITC-conjugated Annexin V to membranes of apoptosing cells. At the indicated time points aliquots of cells were taken and washed once in PBS. Thereafter, cells were resuspended in 195 μ l of Annexin V binding buffer and 5 μ l of Annexin V-FITC (Bender MedSystems Diagnostics, Vienna, Austria) were added. After incubation at room temperature for 10 - 20 min cells were washed once and resuspended in 190 μ l of Annexin V binding buffer. 10 μ l of a 20 μ g/ml propidium iodide stock solution were added and the ratio of Annexin V-positive to negative cells was determined by FACS-analysis using a Coulter EPICS XL 4-color cytometer.

Indirect immunofluorescence. Cells were placed on poly-L-lysine covered microscope slides for 1 h in a humidified chamber at 37°C. Then non-adherent cells were washed off with Hank's buffered saline solution, and adherent cells were fixed and immobilized with freshly prepared 2% (w/v) paraformaldehyde in PBS for 1h at 4°C. Subsequently, cells were permeabilized for 15 min with 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS, blocked with 2% (w/v) glycine in PBS and incubated with a G-CSF-R antibody in PBS for 2 h at room temperature. Slides were washed with PBS and incubated with FITC-labeled secondary antibody. After the final wash with PBS, slides were mounted on a 9:1 mixture of glycerol and 100 mM Tris/HCl, pH 9.0, containing n-propyl-gallate at 20 mg/ml as anti-fading reagent. Then samples were examined on a confocal laser scanning apparatus (Leica TCS-NT system, Leica) attached to a Leica DM IRB inverted microscope with a PLAPO 63x1.32 oil immersion objective.

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real time PCR. For isolation of total RNA and subsequent synthesis of cDNA the RNeasy Mini kit and the Omniscript

Reverse Transcriptase protocol (Qiagen, Hilden, Germany) were used according to the guidelines of the manufacturer. Real time PCR for G-CSF-R, C/EBP α , PU.1 and glucose-6 phosphate dehydrngene (G6PD) was performed using light cycler technology (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Primers for C/EBP α were designed as published previously²⁰: sense 5'-CCAGCAAGCTGAGGAGCGGCG-3'; antisense: 5'-AACAGCTGAGCCGTGAACTG-3'; For amplification of PU.1 a commercially available light cycler primer set was used (Search LC, Heidelberg, Germany). Primers for G-CSF-R and were as follows: G-CSF-R sense 5'-GCTTGAGCCAACTCCATAGC-3', G-CSF-R antisense 5'-AAATGCAGGGAAGGACACAG-3'; G6PD sense 5'-CCGGATCGACCACTACCTGGGCAAG-3' G6PD antisense 5'-GTTCCCCACGTACTGGCCCAGGACCA-3'G6PD. All primer sets gave rise to specific DNA fragments of expected sizes. For real time PCR, 2 μ l master mix (Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 2 μ l cDNA, 4mM MgCl₂, 7.5 μ M primer and water to a final concentration of 20 μ l were used. For calculation of fold induction or for comparison of DNA levels in different cell types DNA amounts were normalized to G6PD mRNA expression. For semi-quantitative assessment of mRNA expression real-time PCR reactions were stopped after indicated numeber of cycles and aliquots of the reactions were loaded onto agarose gels. Again, G6PD mRNA expression was used as a control.

RESULTS

The differentiation block of freshly established 32DBcr-Ablwt cells is not due to a loss of G-CSF-R expression, but depends on Bcr-Abl kinase activity.

In order to investigate whether Bcr-Abl interferes with differentiation induced by G-CSF in the presence of G-CSF-R expression, stable transfectants of 32Dcl3 cells were established expressing either Bcr-Abl_{wt} (32D_{Bcr-Ablwt}) or a kinase-inactive mutant of Bcr-Abl (32D_{Bcr-AblK1172R}) (Fig. 1A). In brief, 32Dcl3 cells were transfected by electroporation as described under materials and methods. 48h after transfection neomycin was added to the media for selection. 4 days after transfection cells were plated into 96 well plates by limited dilution in order to establish individual single cell clones. 3 weeks after transfection several subclones were tested for Bcr-Abl expression. Two subclones of each cell type expressing comparable amounts of Bcr-Abl_{wt} or Bcr-Abl_{K1172R} were identified (Fig.1A) and aliquots of such cells were cryopreserved to be used for further experiments. Freshly thawed and expanded aliquots were used for each individual experiment. Importantly, 32D_{Bcr-Ablwt} cells had been grown in IL-3 containing media continuously during the selection process and prior to analysis of G-CSF-induced differentiation.

It was shown previously that prolonged culture of Bcr-Abl-transformed 32Dcl3 cells might lead to loss of G-CSF receptor expression²¹. However, western blot analysis and light cycler real time PCR showed that both clones of 32D_{Bcr-Ablwt} cells used for further experiments expressed comparable levels of G-CSF-R protein and mRNA (Fig. 2A and 2B). In western blot analysis, three major G-CSF-R species of 85 – 90, 105 – 110 and 130 – 135 kDa, possibly representing different

glycosylation states, were seen (see arrows). Moreover, both 32Dcl3 cells and 32D_{Bcr-Ablwt} cells expressed G-CSF-R at comparable levels at the cell surface, as revealed by confocal microscopy (Fig. 2C; upper panels) and FACS analysis (Fig. 2C; lower panels). No G-CSF-R expression was seen in L-GM cells used as a negative control. FACS controls were performed for every freshly thawed aliquot of 32D_{Bcr-Ablwt} cells prior to induction of G-CSF induced differentiation to confirm appropriate G-CSF-R expression.

Despite appropriate G-CSF-R expression, 32D_{Bcr-Ablwt} cells but not 32D_{Bcr-AblK1172R} cells were defective in G-CSF induced differentiation as assessed by monitoring morphological differentiation (Fig. 1B) as well as upregulation of myeloid cell surface markers such as Mac-1 or Gr-1 (Fig. 1C and data not shown).

STI571 restores G-CSF induced granulocytic differentiation and C/EBP transcription factor regulation in 32D_{Bcr-Ablwt} cells

The above results suggested that Abl kinase activity was essential for the inhibition of granulocytic differentiation. To further address this issue, we investigated the influence of the Abl kinase inhibitor STI571 on the differentiation of 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells in response to G-CSF. 32D_{Bcr-Ablwt} cells were cultured in the absence of IL-3. These cell clones were readily IL-3 independent for growth and survival on IL-3 withdrawal without any further selection. Incubation of 32D_{Bcr-Ablwt} cells with 1 $\mu\text{mol/l}$ STI571 in the absence of growth factors rapidly decreased cell growth and survival (Fig. 3A). Incubation of cells with IL-3 completely rescued 32D_{Bcr-Ablwt} cells from STI571-induced apoptosis (Fig. 3A) and G-CSF decreased the number of apoptotic 32D_{Bcr-Ablwt} cells upon STI571 treatment from 94,5% to 27,5%, as assessed by annexin V staining after 24h (Fig. 3A). Moreover,

proliferation of STI571-treated 32D_{Bcr-Ablwt} cells in response to IL-3 or G-CSF was similar to the cell growth seen in parental 32Dcl3 cells (Fig. 3B). These results demonstrated that 32D_{Bcr-Ablwt} cells expressed functional IL-3 and – above all - G-CSF receptors on their surface and re-gained growth factor responsiveness after inhibition of Bcr-Abl by STI571.

To next investigate whether the block of granulocytic differentiation observed in 32D_{Bcr-Ablwt} cells could be reversed by STI571, cells were treated with STI571 and G-CSF over a period of 14 days. In the presence of STI571, 32D_{Bcr-Ablwt} cells differentiated into morphologically mature neutrophilic granulocytes within 8 – 11 days (Fig. 4A). Morphological differentiation was accompanied by upregulation of myeloid specific surface markers Mac-1 and Gr-1 (Fig. 4B). These data prove that the block of granulocytic differentiation in 32D_{Bcr-Ablwt} cells depended on Bcr-Abl kinase activity and could be reversed by the addition of the Abl kinase inhibitor STI571.

Bcr-Abl reversibly blocks G-CSF induced upregulation of C/EBP α and ϵ but not PU.1

Hematopoietic differentiation is regulated by a network of transcription factors including C/EBP α , C/EBP ϵ and PU.1^{9,10}. In order to investigate whether Bcr-Abl influences the induction of expression of these transcription factors after G-CSF stimulation, parental 32Dcl3 cells and 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in the presence of G-CSF for 3 days. Moreover, an aliquot of 32D_{Bcr-Ablwt} cells was cultured in the presence of G-CSF *and* 1 μ mol/l STI571. Cells grown in the presence of IL-3 were used as a control (Fig. 5, left panel, lane 1). Western blot and real-time PCR analysis revealed that in parental 32Dcl3 cells G-CSF stimulated the expression of

these transcription factors in a coordinated manner (Figure 5 and 6). While considerable amounts of PU.1 were found expressed, only low levels of C/EBP α and no C/EBP ϵ expression were seen in 32Dcl3 cells grown with IL-3 (Fig. 5, left panel, lane 1). G-CSF induced a several fold increase of C/EBP α and a moderate upregulation of PU.1 protein and mRNA expression (Fig. 5, left panel, lanes 1 – 4 and Fig. 6A and B). Moreover, G-CSF stimulated the expression of C/EBP ϵ protein. On day 2, only a faint signal of the 14-kDa C/EBP ϵ isoform missing the transactivation domain was detected (Fig. 5, left panel, lane 3). On day 3, three different isoforms of C/EBP ϵ were seen (Fig. 5, left panel, lane 4).

Analysis of 32D_{Bcr-Ablwt} cells revealed that base line expression of C/EBP α at protein and mRNA level was equivalent to parental 32Dcl3 cells. Upregulation of C/EBP α and C/EBP ϵ was completely disrupted (Fig. 5, left panel, lanes 5 – 8) but could be restored by addition of STI571 (Fig. 5, right panel, lanes 5 – 8). Lack of upregulation of C/EBP α protein expression was due to inhibition of transcriptional activation of the C/EBP α gene (Fig. 6A; left panel), whereas considerable induction of C/EBP α mRNA was seen in parental 32DC13 cells as well as in 32D_{Bcr-Ablwt} cells treated with STI571. In marked contrast to C/EBP α and C/EBP ϵ , expression of PU.1 was increased by G-CSF in 32D_{Bcr-Ablwt} cells in a manner similar to 32Dcl3 cells and correlated to preserved upregulation of PU.1 mRNA (Fig. 5, left panel, and Fig. 6B). Taken together, these results suggest that Bcr-Abl directly interferes with parts of the granulocytic differentiation program by inhibiting upregulation of C/EBP α and C/EBP ϵ . Moreover, the induction of PU.1 by G-CSF demonstrates that the G-CSF-R molecules expressed on 32D_{Bcr-Ablwt} cells remain functional. With regard to the disturbance of transcription factor

regulation, the effects of Bcr-Abl were essentially similar to the effects of IL-3 (data not shown), which was shown to inhibit G-CSF induced differentiation in 32Dcl3 cells earlier²².

Bcr-Abl reversibly blocks c-Myc downregulation upon G-CSF stimulation.

C/EBP transcription factors and c-Myc are inversely regulated during differentiation of myeloid cells^{17,23}. In order to investigate the influence of Bcr-Abl on c-Myc regulation by G-CSF, 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells treated with G-CSF for 1 - 3 days were analyzed for c-Myc expression. In 32Dcl3 cells G-CSF lead to a decrease of c-Myc expression over a three days period (Fig. 5, left panel, lanes 1 – 4). Interestingly, the time kinetics of c-Myc down regulation correlated with the upregulation of C/EBP α and C/EBP ϵ (Fig. 5, left panel). In contrast, c-Myc expression was only minimally reduced in 32D_{Bcr-Ablwt} cells (Fig. 5, left panel, lanes 5 – 8). Appropriate c-Myc regulation could be restored by culturing cells in the presence of 1 μ mol/l STI571 (Fig. 5, right panel, lanes 5 – 8). Kinetics of C/EBP α and C/EBP ϵ upregulation and c-Myc downregulation of STI571 treated 32D_{Bcr-Ablwt} cells were similar to those of 32Dcl3 cells, suggesting that the effects of Bcr-Abl on the regulation of these transcription factors were reversed by STI571 immediately.

Bcr-Abl inhibits upregulation of G-CSF receptor expression upon G-CSF stimulation.

Rapid upregulation of the G-CSF-R is part of the differentiation program induced by G-CSF²⁴ and G-CSF-R mRNA expression is regulated by both PU.1 and C/EBP α sites in the G-CSF-R promotor²⁵. Western blot analysis showed, that baseline expression of the G-CSF receptor was low but equivalent in both 32Dcl3 and

32D_{Bcr-Ablwt} cells (Fig.2A and Fig. 5, left panel, compare lanes 1 and 5). Importantly, the obvious differences between the expression levels of G-CSF-R of unstimulated cells seen in Fig. 2A and 5 were due to different exposure times of blots. These were necessary as a consequence of the massive upregulation of G-CSF-R protein expression by G-CSF stimulation, but do not reflect a loss of basal level expression of G-CSF-R in 32D and 32D_{Bcr-Ablwt} cells used for Fig. 5 when compared to Fig2. As expected, G-CSF rapidly induced G-CSF-R protein expression in 32Dcl3 cells within 24h (Fig. 5, left panel, lanes 2 - 4), which was accompanied by induction of G-CSF-R mRNA expression as assessed by real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR (Fig. 6A, right panel). In marked contrast, G-CSF-R upregulation was completely disrupted in 32D_{Bcr-Ablwt} cells (Fig. 5, left panel, lanes 5 – 8). Block of upregulation of G-CSF-R expression correlated to a block in upregulation of G-CSF-R mRNA (Fig. 6). Upregulation of both G-CSF-R protein and mRNA could be restored by growing cells in the presence of 1 μ mol/l STI571. Identical results were obtained for both clones used in this study. Taken together, these results demonstrate that Bcr-Abl reversibly blocks G-CSF induced upregulation of G-CSF receptor expression at the transcriptional level, although basal level of G-CSF-R expression were not affected by Bcr-Abl.

Bcr-Abl disturbs the regulation of cyclin dependent kinase inhibitors p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}

Coordinated cell cycle arrest is part of the differentiation program in different cell types. Therefore, we wished to investigate the influence of Bcr-Abl on the expression of cyclin dependent kinase inhibitors (CDKI) such as p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}. Both p27^{Kip1} and p21^{Waf1/Cip1} were expressed in 32Dcl3 cells, at least at low levels (Fig. 7A; left panel, lane 1), but only p27^{Kip1} was upregulated transiently

upon stimulation with G-CSF (Fig. 7A; left panel, lanes 1-4). In 32D_{Bcr-Ablwt} cells, baseline expression of p27^{Kip1} was slightly decreased as compared to 32Dcl3 cells (Fig. 7A; left panel, compare lanes 1 and 5), but p27^{Kip1} was still upregulated by G-CSF, albeit less than in 32Dcl3 cells (Fig. 7A; left panel, lanes 5-8). Surprisingly, baseline expression of p21^{Waf1/Cip1} was markedly increased in 32D_{Bcr-Ablwt} cells when compared to 32Dcl3 cells (Fig. 7A; left panel, lanes 5-8). Since p21^{Waf1/Cip1} is known to be an inhibitor of cell cycle progression we investigated by immunofluorescence microscopy if cell cycle progression in the presence of high levels of p21^{Waf1/Cip1} could be explained by altered subcellular localization. Surprisingly, no significant influence of Bcr-Abl on subcellular distribution of p21^{Waf1/Cip1} was seen (Fig. 7B). As observed for transcription factor regulation, addition of STI571 to 32D_{Bcr-Ablwt} cells also restored the appropriate regulation of expression of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1} (Fig. 7A; right panel). p27^{Kip1} was found transiently upregulated in STI571-treated cells as well as in untreated cells in response to G-CSF (Fig. 7A; right panel). p27^{Kip1} expression levels at day 3 after G-CSF stimulation seemed somewhat higher after STI571 treatment when compared to untreated 32D_{Bcr-Ablwt} cells and were approximately equivalent to the levels found in 32Dcl3 cells after G-CSF stimulation. Also, p21^{Waf1/Cip1} expression was downregulated over a three days period of STI571 treatment to levels found in parental 32Dcl3 cells (Fig. 7A; right panel, lane 8).

Restoration of G-CSF induced granulocytic differentiation by STI571 is blocked by expression of an inhibitor resistant mutant

In order to investigate if restoration of G-CSF induced differentiation by STI571 in 32D cells expressing Bcr-Abl was due to the inhibition of Bcr-Abl or rather represented inhibition of other relevant targets, mixed cell populations of 32Dcl3

cells were established by retroviral infection expressing either Bcr-Ablwt or a STI571 resistant mutant of Bcr-Abl, Bcr-AblT315I. This mutation has been isolated from patients with clinical STI571 resistance and has been shown to abolish STI571 binding to the ATP binding site of Abl⁸. Accordingly, tyrosine phosphorylation of cellular substrates could not be reversed by STI571 in cells expressing mutant T315I (Fig. 8A). 10 days after retroviral transduction, both cell populations expressed comparable amounts of G-CSF-R and C/EBP α as assessed by western blot analyses and real time PCR (data not shown). Yet, both Bcr-Ablwt and the STI571 resistant mutant Bcr-AblT315I blocked granulocytic differentiation induced by G-CSF as assessed by monitoring morphological differentiation (Fig. 8B) and expression of granulocytic surface markers (data not shown). However, in contrast to 32D_{Bcr-Ablwt} cells, a reversal of the block of differentiation by STI571 was not seen in cells expressing Bcr-AblT315I, proving that granulocytic differentiation of Bcr-Abl-positive 32D cells in the presence of STI571 was dependent on inhibition of Bcr-Abl but not any other target. In proof of this we could show that STI571 did not reverse the block of differentiation induced by IL-3 (data not shown).

DISCUSSION

Although previous reports had suggested that in certain cell types and experimental systems Bcr-Abl would rather induce but inhibit myeloid differentiation^{26,27}, we and others could show that in 32Dcl3 cells Bcr-Abl blocks G-CSF induced neutrophilic differentiation in a kinase-dependent manner¹⁸. Perrotti et al. recently reported that Bcr-Abl blocks G-CSF induced differentiation of 32D cells by downregulating basal level expression of C/EBP α through repression of translation of the C/EBP α mRNA after prolonged time of cells in culture²¹. Loss of C/EBP α expression was associated with decreased G-CSF-R expression²¹. Using freshly establish Bcr-Abl-positive cell clones, we could show that Bcr-Abl blocks G-CSF induced granulocytic differentiation of 32D cells even prior to the loss of basal levels of C/EBP α and G-CSF-R expression, i.e. in the presence of normal and functional levels of C/EBP α and G-CSF-R protein and mRNA expression. Consequently, inhibition of C/EBP α expression at the translational level is a possible but not the only mechanism responsible for blockage of G-CSF driven granulocytic differentiation in Bcr-Abl expressing 32DC13 cells. It should be mentioned that Perrotti et al. described downregulation of C/EBP α and G-CSF-R expression to develop 15 – 25 days after retroviral infection of parental 32DC13 cells. In our study, C/EBP α and G-CSF-R expression was preserved up to 28 days in cell clones established by electroporation and limited dilution. This obvious discrepancy might be explained by the different transfection and selection methods used, possibly resulting in different onsets and levels of Bcr-Abl protein expression in transfected cells.

Despite preserved basal level expression of C/EBP α and G-CSF-R, our data provide evidence that Bcr-Abl specifically interferes with signalling pathways regulating the upregulation of expression of hematopoietic transcription factors upon G-CSF stimulation. Dysregulation of such transcription factors, above all C/EBP α , has been implicated in the development of acute myeloid leukemias^{28,29}. Although comparable levels of expression of G-CSF-R, C/EBP α and PU.1 were found in parental 32D and 32D_{Bcr-Ablwt} cells, upregulation of expression of G-CSF-R, C/EBP α and C/EBP ϵ early after G-CSF stimulation was disrupted at the transcriptional level. Interestingly, normal regulation of PU.1 was observed in 32D_{Bcr-Ablwt} cells, which is in agreement to recently published data demonstrating that G-CSF regulates PU.1 even in the absence of C/EBP transcription factor expression³⁰. Interestingly, perturbation of transcription factor regulation by Bcr-Abl closely resembled the effects seen for IL-3 induced inhibition of G-CSF driven differentiation.

Our data imply that disturbed regulation of c-Myc expression might be involved in blocking C/EBP transcription factor upregulation. It was shown only recently that c-Myc expression is negatively regulated by C/EBP α and that down regulation of c-Myc is a prerequisite for myeloid progenitors to terminally differentiate²³. Consequently, overexpression of c-Myc inhibits C/EBP dependent transcription and myeloid differentiation^{17,31}. Our results demonstrate that Bcr-Abl, similar to IL-3, inhibits the down modulation of c-Myc expression of cells cultured in G-CSF containing media and this might explain the defect of upregulation of C/EBP transcription factors. Interestingly, this defect was overcome by the addition of STI571.

However, disruption of c-Myc regulation might not be the only mechanism by which Bcr-Abl interferes with differentiation. In our study, STI571 restored upregulation of G-CSF-R expression in Bcr-Abl positive 32Dcl3 cells within 24 hours, clearly preceding restoration of C/EBP transcription factor upregulation and downregulation of c-Myc. Although it is possible that upregulation of G-CSF receptor expression in this system does not depend on C/EBP α at all³², this observation might point to a possible involvement of posttranslational modifications, such as protein phosphorylation, in regulating C/EBP α function, a mechanism which has been shown to regulate the function of C/EBP α in adipocytes³³. Inhibition of C/EBP α function by Bcr-Abl mediated phosphorylation could explain, why overexpression of C/EBP α is sufficient to induces differentiation of 32Dcl3 cells in the presence of IL-3 but not if Bcr-Abl is expressed¹⁴. In this light, Bcr-Abl could inhibit the initial upregulation of G-CSF-R expression by disrupting functional C/EBP α activation, and this again would block upregulation of other genes including C/EBP ϵ and C/EBP α itself.

If Bcr-Abl directly interferes with myeloid transcription factor regulation and differentiation, why do leukemic cells from CML patients in chronic phase show only discrete abnormalities of myeloid differentiation? One possible explanation is that secondary genetic alterations might be necessary to confer a full differentiation block to Bcr-Abl expressing leukemic cells. 32Dcl3 cells already harbor such mutations and these cells have a profound proliferative defect as they are growing continuously in culture with just the addition of IL-3 as a single growth factor. Although it is not clear whether 32D cells bear similar secondary genetic

alterations such as found in late stage CML, this system might reflect blast crisis rather than chronic phase disease.

Moreover, G-CSF is just one out of several factors inducing myeloid and above all neutrophilic differentiation. G-CSF^{-/-} as well as G-CSF-R^{-/-} mice do still produce mature granulocytes, although to a lesser degree^{11,12}. Blockage of C/EBP α and C/EBP ϵ upregulation by Bcr-Abl might be specific for G-CSF signalling. Other cytokines, like IL-6 or GM-CSF might provide rescue pathways in vivo. In this context, a defect in G-CSF signaling induced by Bcr-Abl might lead to only subtle alterations in terminal differentiation.

Still, Dysregulation of transcription factors such as C/EBP ϵ by Bcr-Abl might explain parts of the leukemic phenotype of CML. C/EBP ϵ ^{-/-} mice, for example, have many features, which are reminiscent of chronic phase CML. Bone marrow cellularity of C/EBP ϵ ^{-/-} is increased when compared to wild-type mice³⁴. The fraction of actively proliferating cells in the bone marrow is significantly increased, and these mice display an expansion of the number of CFU-GM in the marrow³⁴. Usually, these mice die from a myeloproliferative syndrome after 4 – 5 months¹⁵. With regard to this it is noteworthy that many recent data suggest a role of C/EBP transcription factors in direct regulation of cell cycle progression by inhibiting cyclin dependent kinases³⁵⁻³⁷. These observations corroborate the potential importance of C/EBP transcription factor deregulation in Bcr-Abl induced chronic myeloid leukemia. As they could be potential target for a therapeutic intervention, above all in CML blast crisis patients who have developed a direct STI571 resistance, future investigations should focus on the precise mechanisms

leading to disturbed regulation of G-CSF-R, C/EBP α and C/EBP ϵ in Bcr-Abl-positive cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Reis for technical assistance, C. Kurzeder for advice with FACS analysis, E. Buchdunger (Novartis, Basel, Switzerland) for providing STI571, S. Nagata and U. Just for kindly providing reagents and cell lines.

REFERENCES

1. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290 - 293
2. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:164-172
3. Yamamoto K, Nakamura Y, Saito K, Furusawa S. Expression of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in the blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia with t(7;11)(p15;p15). *Br J Haematol*. 2000;109:423-426.
4. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996;2:561 - 566
5. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.
6. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346:645-652
7. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL

- tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001;344:1038-1042.
8. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293:876-880.
 9. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood.* 1997;90:489-519.
 10. Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA, Touw IP, Friedman AD. Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia.* 2000;14:973-990.
 11. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 1994;84:1737-1746.
 12. Liu F, Wu HY, Wesselschmidt R, Kornaga T, Link DC. Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity.* 1996;5:491-501.
 13. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:569-574.
 14. Wang X, Scott E, Sawyers CL, Friedman AD. C/EBPalpha bypasses granulocyte colony-stimulating factor signals to rapidly induce PU.1 gene

- expression, stimulate granulocytic differentiation, and limit proliferation in 32D cl3 myeloblasts. *Blood*. 1999;94:560-571.
15. Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein epsilon-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:13187-13192.
 16. Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*. 1992;80:1725-1735.
 17. Nakajima H, Ihle JN. Granulocyte colony-stimulating factor regulates myeloid differentiation through CCAAT/enhancer-binding protein epsilon. *Blood*. 2001;98:897-905.
 18. Perrotti D, Bonatti S, Trotta R, Martinez R, Skorski T, Salomoni P, Grassilli E, Lozzo RV, Cooper DR, Calabretta B. TLS/FUS, a pro-oncogene involved in multiple chromosomal translocations, is a novel regulator of BCR/ABL-mediated leukemogenesis. *Embo J*. 1998;17:4442-4455.
 19. Warmuth M, Bergmann M, Prieß A, Häuslmann K, Emmerich B, Hallek M. The Src family kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent mechanism and phosphorylates the Grb2-binding site of Bcr. *J Biol Chem*. 1997;272:33260 - 33270
 20. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y, Hirai H. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*. 2001;98:3283-3289

21. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, Iervolino A, Condorelli F, Gambacorti-Passerini C, Caligiuri MA, Calabretta B. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet.* 2002;30:48-58
22. Valtieri M, Tweardy DJ, Caracciolo D, Johnson K, Mavilio F, Altmann S, Santoli D, Rovera G. Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol.* 1987;138:3829-3835
23. Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, Sasaki K, Felsher DW, Golub TR, Tenen DG. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3789-3806.
24. Steinman RA, Tweardy DJ. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mRNA upregulation is an immediate early marker of myeloid differentiation and exhibits dysfunctional regulation in leukemic cells. *Blood.* 1994;83:119-127
25. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood.* 1996;88:1234-1247.
26. Cambier N, Zhang Y, Vairo G, Kosmopoulos K, Metcalf D, Nicola NA, Elefanti AG. Expression of BCR - ABL in M1 myeloid leukemia cells induces differentiation without arresting proliferation. *Oncogene.* 1999;18:343-352.
27. Era T, Witte ON. Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1737-1742.

28. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, Schoch C, Haferlach T, Behre G, Hiddemann W, Zhang DE, Tenen DG. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med.* 2001;7:444-451.
29. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet.* 2001;27:263-270.
30. Wang QF, Friedman AD. CCAAT/enhancer-binding proteins are required for granulopoiesis independent of their induction of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 2002;99:2776-2785
31. Mink S, Mutschler B, Weiskirchen R, Bister K, Klempnauer KH. A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:6635-6640.
32. Collins SJ, Ulmer J, Purton LE, Darlington G. Multipotent hematopoietic cell lines derived from C/EBPalpha(-/-) knockout mice display granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, granulocyte-colony-stimulating factor, and retinoic acid-induced granulocytic differentiation. *Blood.* 2001;98:2382-2388
33. Ross SE, Erickson RL, Hemati N, MacDougald OA. Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol.* 1999;19:8433-8441
34. Verbeek W, Wachter M, Lekstrom-Himes J, Koeffler HP. C/EBPepsilon -/- mice: increased rate of myeloid proliferation and apoptosis. *Leukemia.* 2001;15:103-111.

35. Harris TE, Albrecht JH, Nakanishi M, Darlington GJ. CCAAT/enhancer-binding protein- α cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem.* 2001;276:29200-29209
36. Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell.* 2001;8:817-828
37. Wang H, Goode T, Iakova P, Albrecht JH, Timchenko NA. C/EBP α triggers proteasome-dependent degradation of cdk4 during growth arrest. *Embo J.* 2002;21:930-941

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Bcr-Abl inhibits G-CSF induced granulocytic differentiation in 32Dcl3 cells by a kinase dependent mechanism. (A) Abl (upper panel) and Phosphotyrosine (lower panel) immunoblots of lysates from either 32Dcl3, 32D_{Bcr-Ablwt} or 32D_{Bcr-AblK1172R} cells. (B) Morphological differentiation of 32Dcl3, 32D_{Bcr-Ablwt} or 32D_{Bcr-AblK1172R} cells eight days after stimulation with G-CSF. Cells grown in the presence of IL-3 are shown as a control. (C) Expression of Gr1 on 32Dcl3, 32D_{Bcr-Ablwt} or 32D_{Bcr-AblK1172R} cells upon G-CSF stimulation. Gr1 expression on cells grown in the presence of IL-3 is shown as a control.

Fig. 2 Expression of Bcr-Abl does not diminish G-CSF receptor expression in 32D_{Bcr-Ablwt} cells. (A), (B) and (C) 32Dcl3 or 32D_{Bcr-Ablwt} cells grown in the presence of IL-3 were subjected to western blot (A), real-time PCR (B), confocal microscopy (C, upper panel) or FACS analysis (C, lower panel) as described in materials and methods. The myeloid, G-CSF-R deficient cell line L-GM was used as a negative control where indicated. Equal expression of G-CSF-R in the presence or absence of Bcr-Abl expression was seen in two independent subclones of 32D_{Bcr-Ablwt}.

Fig. 3 STI571 restores responsiveness of 32D_{Bcr-Ablwt} cells to IL-3 and G-CSF stimulation. (A) 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in the presence or absence of IL-3, G-CSF and STI571 as indicated. The amount of apoptosis in the individual cultures after 48h was determined using FACS-

analysis. Both IL-3 and G-CSF lead to a rescue of apoptosis induced by 1 $\mu\text{mol/l}$ STI571 in 32D_{Bcr-Ablwt} cells in the absence of cytokines, suggesting that 32D_{Bcr-Ablwt} cells express functional IL-3 and G-CSF receptors. (B) Proliferation of 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells grown in the presence or absence of IL-3, G-CSF and STI571 as indicated. Cell counts were determined by trypan blue exclusion. STI571 restored the responsiveness of 32D_{Bcr-Ablwt} cells to both IL-3 and G-CSF. Cell counts of 32D_{Bcr-Ablwt} cells grown in the presence of 1 $\mu\text{mol/l}$ STI571 and G-CSF were slightly retarded when compared to the proliferation of 32Dcl3 cells grown in the presence of G-CSF.

Fig. 4 STI571 restores G-CSF induced granulocytic differentiation of 32D_{Bcr-Ablwt} cells. (A) 32Dcl3 cells and two individual clones of 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in media containing G-CSF. STI571 was added at a concentration of 1 $\mu\text{mol/l}$ if indicated. Morphological differentiation of cytopinned cells was determined at day 8 and 11. Cells grown in the presence of IL-3 are shown as a control (B) Expression of Gr1 and Mac1 on 32Dcl3 cells and 32D_{Bcr-Ablwt} cells upon G-CSF stimulation. Addition of 1 $\mu\text{mol/l}$ STI571 to the media sufficiently restored upregulation of both myeloid surface markers.

Fig. 5 Bcr-Abl disturbs G-CSF induced regulation of C/EBP α , C/EBP ϵ , c-Myc, but not PU.1. (left panel) 32Dcl3 cells and a representative clone of 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in the presence of rhG-CSF. Lysates of the individual cell types were obtained at day 0 (cells prior to G-CSF stimulation grown in IL-3) to 3 and subjected to western blot analysis using rabbit

polyclonal antibodies to C/EBP α , C/EBP ϵ , PU.1, G-CSF-R and c-Myc. (right panel) In addition, aliquots of 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in the presence of rhG-CSF and 1 μ mol/l STI571. Lysates were obtained at day 0 (cells prior to G-CSF stimulation) to 3, subjected to western blot analysis using rabbit polyclonal antibodies to C/EBP α , C/EBP ϵ , G-CSF-R and c-Myc, and compared to lysates of G-CSF treated 32D_{Bcr-Ablwt} cells grown in the absence of STI571. Importantly, lysates of left and right panels are matched, i.e. are from the same subclone and experiments done at the same time.

Fig. 6 Bcr-Abl reversibly blocks induction of C/EBP α and G-CSF-R mRNA expression.

(A) and (B) Expression of C/EBP α , G-CSF-R and PU.1 mRNA in 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells prior to and at day 3 post G-CSF stimulation as assessed by real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR. Real-time PCR (upper panel) was performed as described under materials and methods. mRNA expression of C/EBP α , G-CSF-R and PU.1 mRNA was normalized to levels of G6PD mRNA. Induction of mRNA expression is shown as fold induction relative to instimulated 32Dcl3 cells. Data from one out of 2 independent experiments are shown. For semi-quantitative RT-PCR (lower panel), real-time PCR reactions were stopped at appropriate time points (C/EBP α : 24cycles; G-CSF-R: 26cycles; PU.1: 24cycles; G6PD: 24 cycles). Aliquots were loaded onto agarose gels for further analyses. G6PD is shown as a control).

Fig. 7 Bcr-Abl disturbs regulation of the cyclin dependent kinase inhibitors p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}. (A) 32Dcl3 cells and cells of a representative clone of 32D_{Bcr-Ablwt} were stimulated with rhG-CSF (left panel). Lysis of the individual cell types was performed at day 0 (cells prior to G-CSF stimulation) to 3. In addition, aliquots of 32D_{Bcr-Ablwt} cells were grown in the presence of rhG-CSF and 1 $\mu\text{mol/l}$ STI571. Lysate of such cells were compared to lysates of G-CSF treated 32D_{Bcr-Ablwt} cells grown in the absence of STI571 (right panel). Western blot analysis of the different lysates was performed using antibodies to p27^{Kip1} (upper panel) and p21^{Waf1/Cip1} (mid panel). Equal protein loading onto individual lanes was controlled by blotting the stripped membrane with anti- β -tubuline ab (lower panel). (B) Confocal immunofluorescence microscopy of 32Dcl3 and 32D_{Bcr-Ablwt} cells for p21^{Waf1/Cip1}. Representative pictures for each cell type are shown.

Fig. 8 STI571 fails to restore G-CSF induced granulocytic differentiation in 32D_{Bcr-Abl} cells expressing an STI571 resistant mutant. (A) 32D_{Bcr-Ablwt} and 32D_{Bcr-AblT315I} cells established by retroviral infection were either left untreated or incubated with 1 or 10 $\mu\text{mol/l}$ STI571 for 2h prior to lysis. Western blot analysis was performed using antibodies to phosphotyrosines and Abl. (B) 32Dcl3, 32D_{Bcr-Ablwt} and 32D_{Bcr-AblT315I} cells were grown in media containing G-CSF. STI571 was added at a concentration of 1 $\mu\text{mol/l}$ if indicated. Morphological differentiation of cyto-spinned cells was determined at day 10. Cells grown in the presence of IL-3 are shown as a control.

Figure 1 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

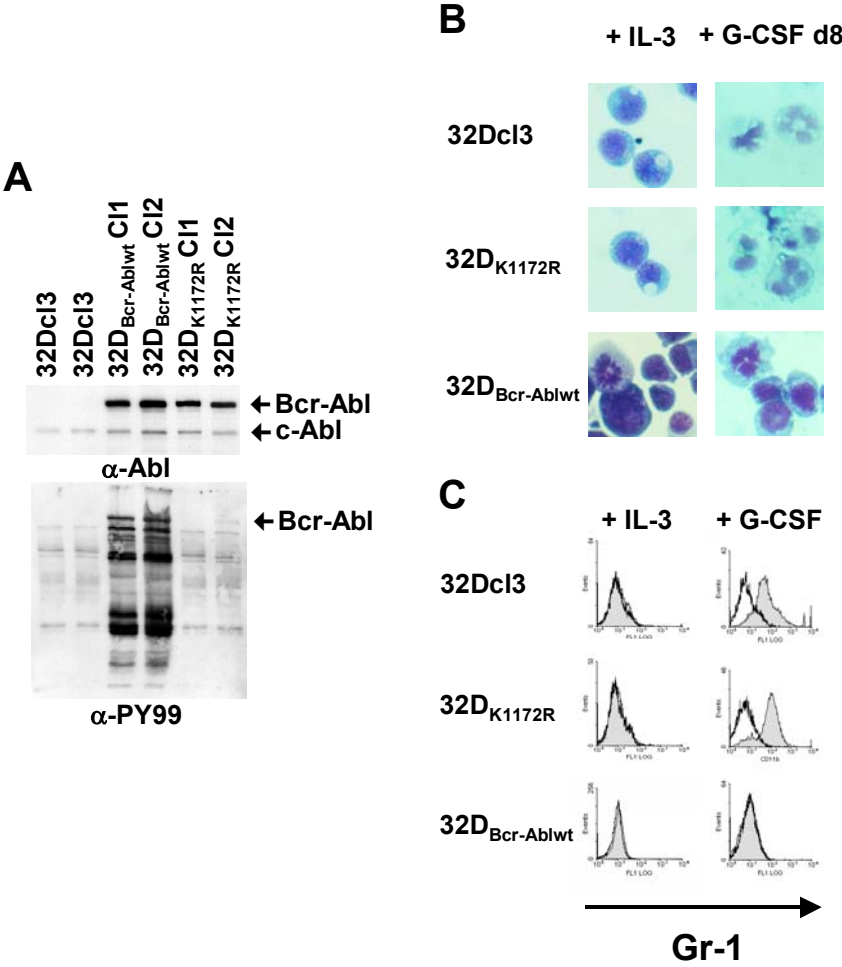


Figure 2 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

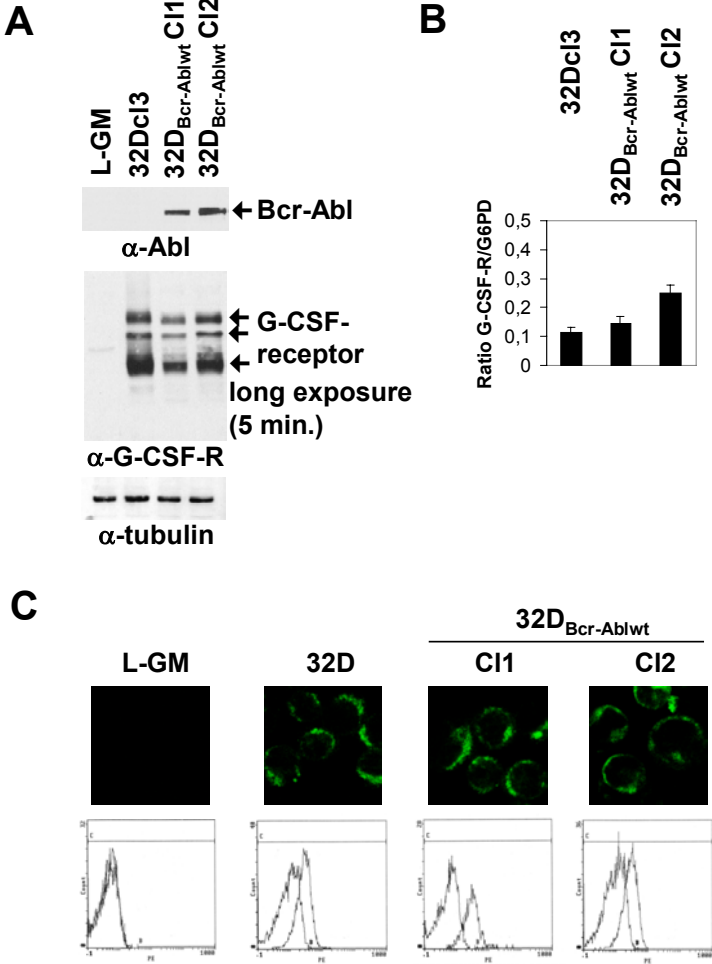


Figure 3 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

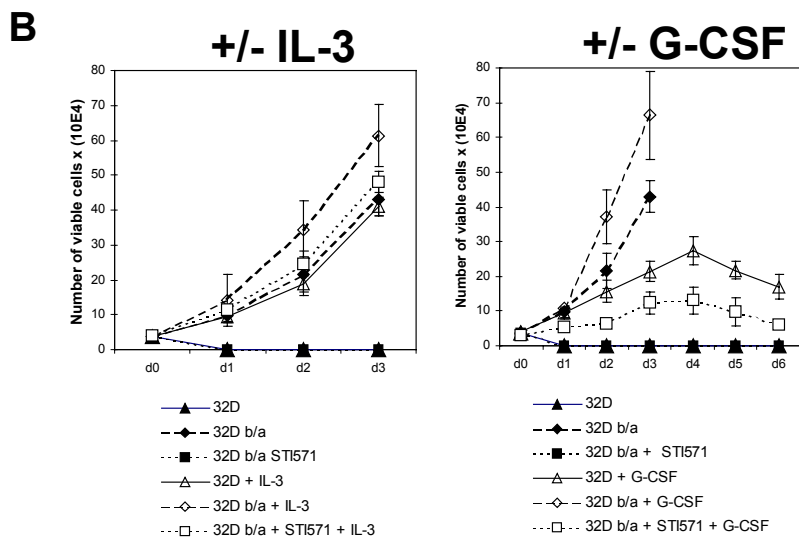
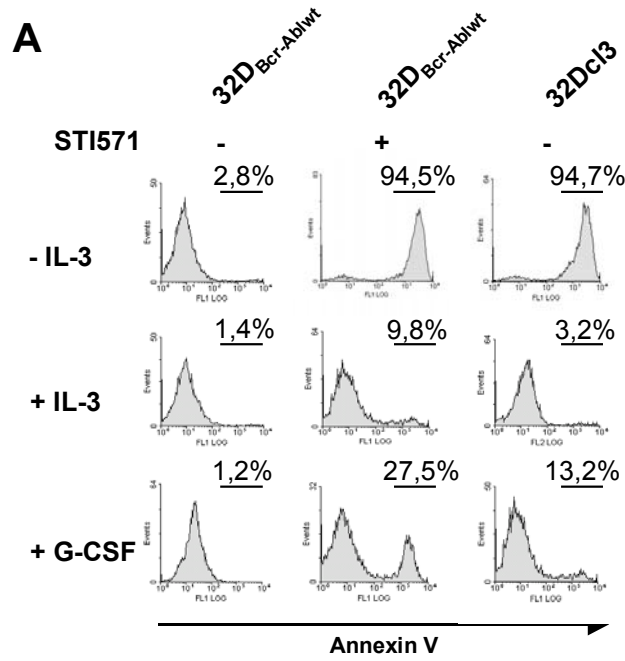


Figure 4 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

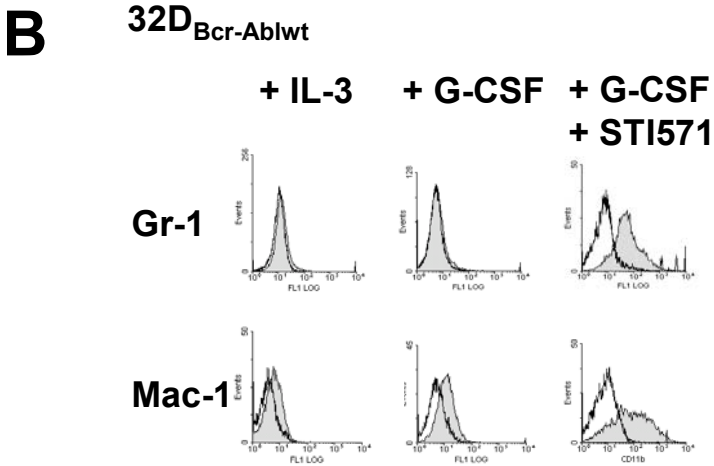
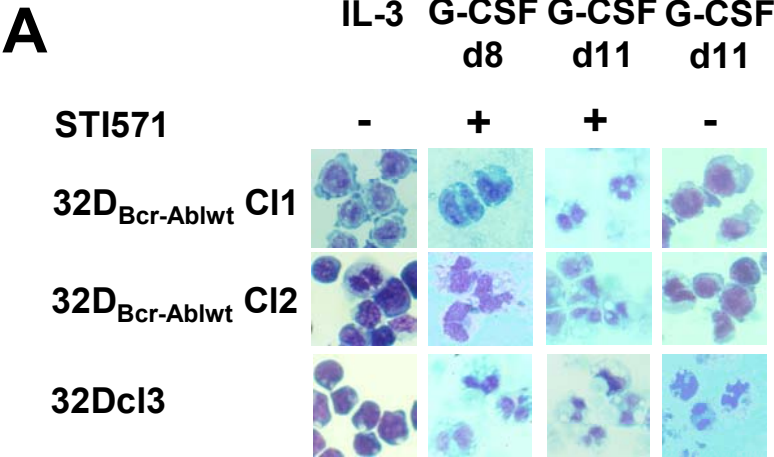


Figure 5 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

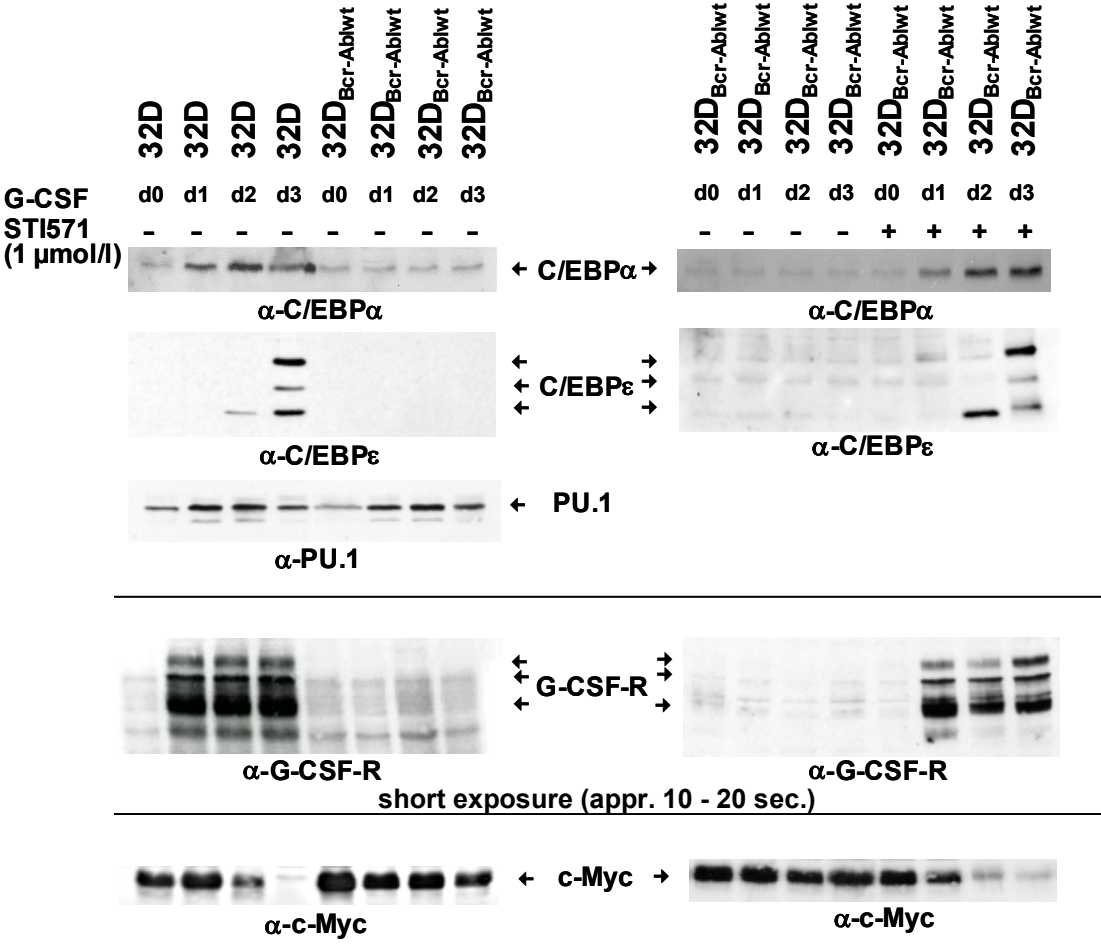


Figure 6 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

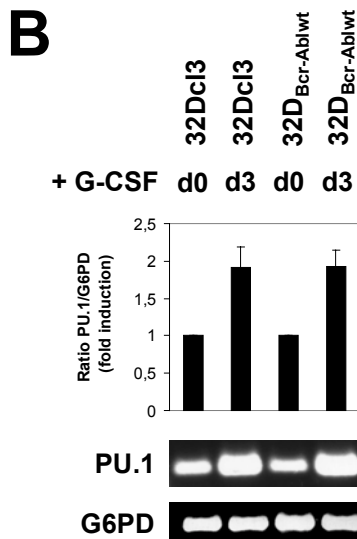
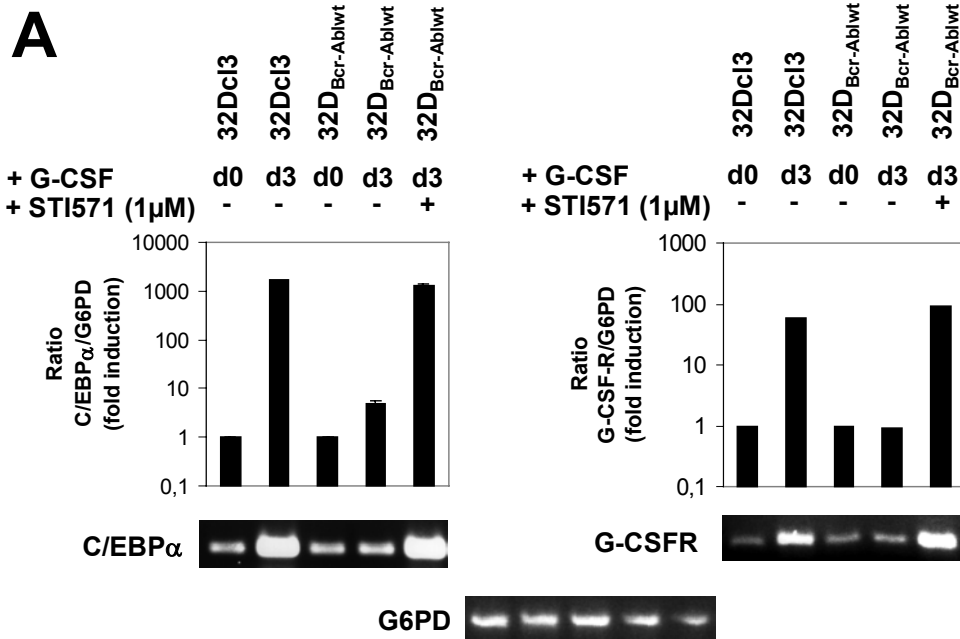


Figure 7 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

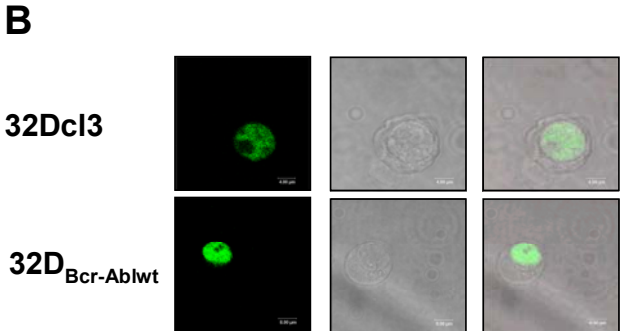
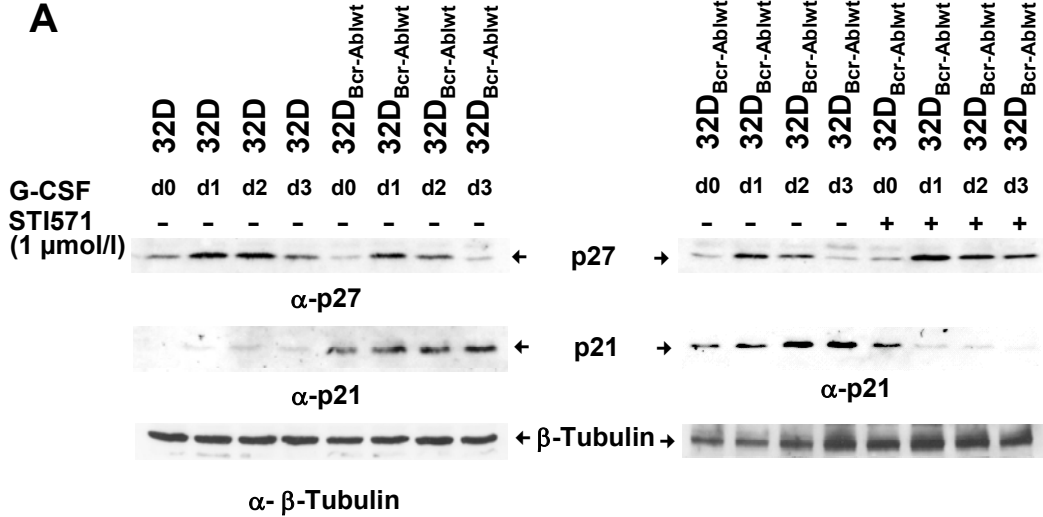


Figure 8 Warmuth 2002-01-0043.R2 revision 2

