

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III am Klinikum Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

**Bedeutung der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit in der Pathogenese der,
Philadelphiatranslokation Bcr-Abl positiven, chronischen myeloischen
Leukämie**

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

Andreas Konieczny

aus
Berlin

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. M. Hallek

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. R. Rupp

Priv. doz. Dr. R. Huss

Dekan:

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

Tag der mündlichen Prüfung:

04.12.2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §2 Abs. 2 bzw. 4 und §4 Abs. 1 bzw. 2 der Promotionsordnung vom 25. Januar 2002 von Prof. Dr. med. Michael Hallek betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 15.10.2003

Andreas Konieczny

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis September 2003 am Institut für Hämatologie/Hämatologikum der GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München unter Anleitung von Prof. Dr. med. Michael Hallek angefertigt.

Mein ganz besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Hallek an der GSF und im Genzentrum. Zahlreiche fruchtbare Diskussionen zur Signaltransduktion haben mein Verständnis für molekulare Zusammenhänge, über die Lektüre hinaus, erweitert. Besonderen Dank möchte ich hier Frau Karin Forster, Herrn Dr. Markus Warmuth und Herrn Dr. Michael Schäffer aussprechen, die stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten. Frau Simone Reis danke ich sehr herzlich für die technische Unterstützung. Die gesamte Atmosphäre im Labor darf als freundschaftlich bezeichnet werden, was zum Gelingen der Arbeit ebenso beigetragen hat, wie die guten strukturellen Voraussetzungen an der GSF, wofür ich mich bedanken möchte. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Hallek selbst bedanken, der mir die Möglichkeit gab dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen. Danken möchte ich für die Unterstützung in fachlichen Fragen, ebenso wie für die persönliche Betreuung während der Entstehung dieser Arbeit. Ich möchte nicht unerwähnt lassen, dass mir, wie auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, ein Engagement über das übliche hinaus zuteil geworden ist. Dafür danke ich, in gleichen Maßen, wie für das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit.

Ich danke meiner Familie, meinen Freunden und Wegbegleitern für die Freundschaft und Unterstützung außerhalb des Labors.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir durch großzügige Entscheidungsfreiheit einen Weg aufgezeigt haben.

*Ku Mai! Ku mai! Ka nalu nui mai Kahiki mai,
Alo po i pu! Ku mai ka pohuehue,
Hu! Kai ko' o Loa.*

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Die chronisch myeloische Leukämie.....	3
2.1	Ätiologie.....	3
2.2	Pathogenese	3
2.3	Die klinische Symptomatik	5
2.4	Diagnose	5
2.5	Prognose	7
2.6	Therapie	9
2.6.1	Chemotherapie	9
2.6.1.1	Interferon α	10
2.6.1.2	Imatinib (STI 571, Glivec [®]).....	11
2.6.2	Die autologe Stammzelltransplantation.....	11
2.6.3	Die allogene Knochenmarktransplantation	12
3	Die molekulare Pathogenese der CML.....	13
3.1	Das Philadelphia-Chromosom	13
3.2	Das Fusionsprotein Bcr-Abl.....	13
3.3	Das bcr-Gen.....	15
3.4	Das c-abl Protoonkogen	16
3.5	Der transformierende Einfluss des Bcr-Abl Proteins auf die Hämatopoese	18
3.5.1	Änderungen in der Apoptose und der Proliferation	18
3.5.2	Die Adhäsion im Knochenmark.....	19
3.6	Der Übergang von der Chronischen Phase zur Blastenkrise.....	20
3.7	Relevante Signalwege in der Hämatopoese und in der CML.....	21
3.7.1	Der Ras-Signalweg.....	21
3.7.2	Der MAP-Kinase-Signalweg	23
3.7.3	Der PI3-Kinase-Signalweg	23
3.7.4	Crkl.....	24
3.7.5	Src	25
3.7.6	JAK/STAT	26
3.7.7	Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS).....	27
3.8	Steuerung der Hämatopoese durch Wachstumsfaktoren	30
3.8.1	Interleukin 3 und Interleukin 3-Rezeptor in der CML	30
3.8.2	Der Stammzellfaktor und die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit	32
3.8.2.1	Der Stammzellfaktor.....	32
3.8.2.2	Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit.....	33

3.8.2.3	Die molekulare Struktur von c-Kit	34
3.9	Der selektive Tyrosinkinase Inhibitor STI571	38
3.10	Vergleiche der Kinasedomänen von c-Kit und Bcr-Abl.....	39
4	Ziele der Arbeit.....	41
5	Material und Methoden.....	42
5.1	Zelllinien.....	42
5.2	Bakterienstämme	42
5.3	Plasmide, Primer, cDNAs.....	43
5.3.1	Plasmide.....	43
5.3.2	Primer	43
5.3.3	cDNAs	44
5.4	Zellkulturmaterialien.....	44
5.4.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	44
5.4.2	Medien, Puffer und Sonstige Substanzen	45
5.5	Labormaterial	45
5.5.1	Geräte und Verbrauchsmaterial	45
5.5.2	Chemikalien und Antikörper	46
5.5.2.1	Chemikalien	46
5.5.2.2	Antikörper	46
5.6	Arbeiten mit Bakterien	48
5.6.1	Kultivierung von Bakterien	48
5.6.2	Plattenkultur.....	48
5.6.2.1	Flüssigkultur zur DNA Amplifikation.....	48
5.6.2.2	Cryo-Kulturen von Bakterien.....	48
5.6.3	Herstellung von kompetenten Bakterien	49
5.6.4	Transformation von Bakterien	50
5.7	Präparation und Analyse von DNA	50
5.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	50
5.7.2	Auftrennung und Aufreinigung von DNA.....	51
5.7.2.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	51
5.7.2.2	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	51
5.7.3	Enzymatische Reaktionen an DNA.....	52
5.7.3.1	Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen.....	52
5.7.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten	52
5.7.4	DNA-Sequenzierung	52
5.7.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	52
5.7.6	RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion).....	53
5.8	Zellkultur.....	54
5.8.1	Kultivierung der Zellen	54
5.8.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	56
5.8.3	Herstellung transient exprimierender Zelllinien	57

5.8.3.1	Transient exprimierende Cos-7 Zellen	57
5.8.3.2	Transient exprimierende SF-9 Zellen	58
5.8.4	Hungern der Zellen.....	59
5.8.5	Lyse von Zellen.....	59
5.8.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	60
5.8.7	SDS-PAGE und Westernblot.....	61
5.8.7.1	Herstellen der Polyacrylamidgele	61
5.8.7.2	Laden und Starten des Gels.....	63
5.8.7.3	Marker zur Größenstandard Bestimmung.....	63
5.8.8	Westernblot.....	64
5.8.8.1	Der Transfer	64
5.8.8.2	Blocken der Membran	64
5.8.8.3	Antikörper-Inkubation	65
5.8.9	Detektion der Proteine.....	65
5.8.10	Immunpräzipitation	66
5.8.10.1	Vorgehen.....	66
5.8.10.2	Inkubation der Antikörper und Beads	67
5.8.10.3	Durchführung der Peptidkontrollen.....	67
5.8.10.4	Waschen der Immunpräzipitate.....	68
5.8.10.5	Trennung der Antigen-Antikörper-Protein A Komplexe.....	68
6	<i>Ergebnisse</i>	69
6.1	Initiale Experimente zur Kopräzipitation von Bcr-Abl und c-Kit.....	69
6.2	Einfluss von Bcr-Abl Punktmutationen auf die Kopräzipitation mit c-Kit.....	73
6.3	Optimierung der Expression von c-Kit-Mutationen im SF-9-Zellsystem.....	81
6.4	Verwendung von c-Kit Trunkationen zur Lokalisation einer Bindungsstelle.....	88
7	<i>Diskussion</i>	92
7.1	Kritische Erwägungen der Methoden und Ergebnisse	92
7.1.1	Die Expression von Proteinen unterschiedlicher Größe.....	92
7.1.2	Die Aussagekraft von Immunpräzipitationen.....	93
7.2	Darstellung der wichtigsten Erkenntnisse im Kontext der Literatur	95
7.3	Ausblick.....	98
8	<i>Zusammenfassung</i>	100
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	101
10	<i>Verzeichnis der Abkürzungen</i>	124
10.1	Tabellen der Buchstabencodes und Abkürzungen für Aminosäuren.....	126
11	<i>Lebenslauf</i>	127

1 Einführung

Die chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine Krebserkrankung, welche die ungehemmte Zellteilung von Stammzellen des Blutes als Ursache hat. Jährlich erkranken etwa 1,3-2/100000 Einwohner der westlichen Welt. Der Häufigkeitsgipfel liegt im Median bei 50 Jahren mit einer Bevorzugung des männlichen Geschlechts.

Die Erkrankung verläuft in mehreren Stadien. Zunächst beginnt eine mehrere Jahre andauernde chronische Phase mit langsamer Expansion von betroffenen Stammzellen im Knochenmark. Im Laufe der Zeit nehmen unspezifische Symptome wie Infektanfälligkeit, Abgeschlagenheit, Blässe, Appetitlosigkeit, leicht erhöhte Temperatur, Gewichtsabnahme und Druckgefühl im linken Oberbauch durch eine Milzvergrößerung zu. Verschiedene therapeutische Ansätze versuchen dieses Stadium möglichst lange aufrecht zu erhalten. Erschöpfen sich diese Möglichkeiten, so tritt die Erkrankung nach einer Akzeleration in eine akute Phase über, die Bastenkrise. Wenige Möglichkeiten bleiben hier um die Erkrankung einzudämmen. Als bisher einzige Möglichkeit einer Heilung bleibt die Knochenmarktransplantation, die auf Grund besserer Langzeitergebnisse auch schon zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung durchgeführt wird.

Das heutige Verständnis der CML ist recht weit fortgeschritten. Es ist eine der ersten Erkrankungen, bei denen eine definitive Ursache auf molekularer Ebene im Inneren einer Zelle nachgewiesen werden konnte. Nowell und Hungerford beschrieben schon 1960 ein kleines Chromosom 22, das bei der granulozytären Leukämie zu beobachten war [Nowell, 1960]. Es sollte später, der Stadt der Entdeckung zufolge, als Philadelphia-Chromosom bezeichnet werden.

Mit molekularbiologischen Mitteln konnte eine Translokation nachgewiesen werden, bei der sich ein Teil des langen Arms des Chromosom 22 mit dem langen Arm des Chromosom 9 reziprok austauscht, $9q+ 22q- t(9;22)(q34;q11)$ [Rowley, 1973a]. Das initiale Ereignis der Entartung bei der CML war gefunden. Auf dem Chromosom 22 wird das Enzym c-Abl kodiert, welches im Stoffwechsel eine untergeordnete Rolle spielt. Es wurde von seiner ursprünglichen kontrollierten Position unter eine neue Kontrolle des Genlocus bcr (Breakpoint Cluster Region) auf dem Chromosom 9 gestellt.

Das aus der Fusion beider Loci neu entstandene Enzym Bcr-Abl besitzt eine hyperaktive Tyrosinkinase. Auf diese Weise wird die Signalweiterleitung innerhalb der blutbildenden Zellen wesentlich beeinflusst. Vor allem die Zellen der weißen Blutzellreihe mit myeloischer

Differenzierung sind betroffen. Die veränderte Signalregulation durch das Enzym Bcr-Abl führt zur ungehemmten Zellteilung.

Neueste Ergebnisse mit dem Wirkstoff STI-571 (Imatinib), der zielgerecht an der Ursache der Erkrankung angreift, an der Kinase Bcr-Abl selbst, gibt große Hoffnung auf eine zusätzliche Möglichkeit zur Heilung in näherer Zukunft. Große multizentrische Studien zeigen eine sehr große Selektivität für Krebszellen mit hohen Ansprechraten. Weniger Nebenwirkungen und eine effektivere Therapie geben auch der Grundlagenforschung auf vielen Gebieten weiteren Aufschwung, um kausale Therapien in Zukunft möglich zu machen. Dennoch sind auch nach den ausgezeichneten Ansprechraten, Rezidive und Resistenzen auf den Wirkstoff beobachtet worden. Weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Signaltransduktion der CML sollen die genauen Sachverhalte der Erkrankung detaillierter beleuchten und zu einem umfassenderen Verständnis der Abläufe in einer Tumorzelle führen.

Die vorliegende Arbeit soll genau diesem Umstand Rechnung tragen und insbesondere die Interaktion von Bcr-Abl und einer weiteren Tyrosinkinase c-Kit, welche als Rezeptor für einen Wachstumsfaktor dient, untersuchen. Es existieren Hinweise, dass c-Kit ein zusätzlicher Stimulus sein könnte, der das Fortschreiten der Erkrankung beeinflusst. Das genaue Verständnis dieser Interaktion könnte nach weiterführenden Experimenten zu klinisch relevanten Ergebnissen führen.

2 Die chronisch myeloische Leukämie

2.1 Ätiologie

Eine Ursache für die Erkrankung konnte bis heute nicht gefunden werden. Sie tritt bei etwa 1,3-2/100000 der Bevölkerung auf. Männer erkranken etwas häufiger [Boring *et al.*, 1993]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 50 Jahren. Bei Exposition gegenüber ionisierenden Strahlen konnte eine signifikante Erhöhung der Inzidenz nachgewiesen werden. Dies wurde anhand der Erkrankungshäufigkeit bei Patienten, welche an einem Morbus Bechterew leiden und mit Bestrahlungen therapiert wurden, oder Überlebenden nach den Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki festgestellt. Andere physikalische oder chemische Risikofaktoren konnten nicht identifiziert werden [Preston *et al.*, 1994; Toolis *et al.*, 1981]. Studien an eineiigen Zwillingen zeigten keinen Modus einer Krankheitsvererbung [Goh *et al.*, 1967]. Im Hinblick auf den triphasischen Verlauf der Erkrankung geht man in Anlehnung an die „Multiple Hit Theorie“ [Fialkow *et al.*, 1981] davon aus, dass zusätzlich zur Philadelphiatranslokation, noch weitere somatische Mutationen notwendig sind, um das Vollbild der CML zu erzeugen.

2.2 Pathogenese

In 95% aller Fälle von CML kann eine reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 nachgewiesen werden, der so genannten Philadelphia Translokation [Faderl *et al.*, 1999; Pasternak *et al.*, 1998]. Hierbei entstehen die zwei Chromosomen 9+ und 22-, wobei das zelluläre Onkogen c-abl des Chromosoms 9 mit der breakpoint-cluster Region (bcr) auf dem Chromosom 22 fusionierte [de Klein *et al.*, 1982]. Das resultierende Fusionsprotein wird Bcr-Abl genannt und trägt maßgeblich zu der Entstehung der CML bei [Warmuth *et al.*, 1999]. Das Protein Bcr-Abl hat eine extrem hohe Kinaseaktivität. Diese führt zu einer ungehemmten Phosphorylierung und damit Aktivierung von wesentlichen Signalmolekülen der Zellregulation innerhalb der betroffenen hämatopoetischen Stammzellen. Die wesentlichen Merkmale der leukämischen Zellen sind die Supprimierung der Apoptose und die verminderte Anheftung am Knochenmarkstroma, sowie eine gesteigerte Proliferation. Die unkontrollierte Proliferation der myeloischen Reihe der Blutbildung steht deutlich im Vordergrund. Sie kann in der Regel auf die Ausbreitung eines einzigen malignen Zellklons zurückgeführt werden [Nolte *et al.*, 1995]. Durch die zunehmende Expansion dieses malignen Klons wird im peripheren Blut eine Leukozytose

beobachtet. Ursache ist die Ausschwemmung von ausgereiften, funktionell nahezu unbeeinträchtigten Granulozyten. Diese Veränderung im Blutbild verläuft schleichend und spiegelt die Vorgänge im Knochenmark wieder. Die normalen myeloischen Zellen im Knochenmark werden durch myeloische klonale Zellen ersetzt, die nicht mehr einer regulierten Proliferation, Differenzierung und Apoptose unterliegen. Hier beginnt sich das Verhältnis zugunsten der leukämischen Zellen zu verschieben. Allerdings kommt es hier weder zu einer akzelerierten Proliferationsrate der malignen Zellen, noch findet eine autonomes Wachstum statt, sie bleiben weiter wachstumsfaktorabhängig. Ausgereifte maligne Zellen der chronischen Phase zeigen kaum funktionelle Unterschiede, wie beispielsweise in der Phagozytose von Bakterien, in Vergleich zu normalen, reifen Zellen.

Während der chronischen Phase verbleiben die malignen Zellen noch in hämatopoetischen Geweben. Treten extramedulläre Absiedelungen im weiteren Verlauf der Erkrankung auf, so kann das für einen Übergang in die akzelerierte Phase sprechen und ist prognostisch ungünstig.

Stadieneinteilung der CML

Chronische Phase

Keine wesentlichen Beschwerden, kein Kriterium für Akzeleration

Akzeleration

Sekundäre Therapieresistenz gegen Hydroxyurea und Busulfan

Leukozytenverdoppelungszeit <5 Tage

>10% Blasten im Blut oder Knochenmark

>20% Blasten oder Promyelozyten im Blut oder Knochenmark

>20% Basophile und Eosinophile im Blut

Anämie oder Thrombozytopenie trotz Therapie mit Hydroxyurea oder Busulfan

Persistierende Thrombozytose

Zusätzliche Chromosomenanomalien

Progrediente Splenomegalie

Auftreten einer Myelofibrose oder von Chloromen

Blastenkrise

>30% Blasten im Blut oder Knochenmark

KM – Knochenmark, IFN α - Interferon- α

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CML nach den Kriterien des „International Bone marrow Transplant Registry“ (IBMTR)

Die Erythropoese wird zunehmend supprimiert. Auch die Thrombopoese nimmt ab, es kommt zur Thrombozytopenie. Zu diesem Zeitpunkt weisen etwa 75% der Patienten weitere zytogenetische Auffälligkeiten auf. Eine Verdopplung des Ph1-Chromosoms, eine Trisomie 8 oder ein Isochromosom 17 wurden von Spiers [Salles *et al.*, 1997; Spiers and Baikie, 1968] beschrieben.

Nach einer variablen Zeitdauer kommt es bei vielen Patienten zur Blastenkrise, die einer akuten und leider häufig auch therapierefraktären Leukämie gleichkommt. Die malignen Zellen differenzieren nicht mehr aus, sondern verbleiben auf dem Reifungszustand eines Blasten oder Promyelozyten. Typologisch kann die Blastenkrise sowohl als lymphatische oder auch als myeloische Leukämie auftreten [Cervantes *et al.*, 1998; Jacobs and Greaves, 1984]. Etwa ein Viertel der Patienten entwickeln eine lymphatische Blastenkrise, die einen gewissen Überlebensvorteil beinhaltet [Janossy *et al.*, 1979]. Die myeloische Blastenkrise hat dagegen eine heterogene Morphologie mit erythroiden und megakaryozytären Varianten. Der Tod tritt unbehandelt innerhalb weniger Monate entweder durch Sekundärkomplikationen, wie Blutungen und Infektionen, oder durch einen terminalen Blastenschub ein [Alimena *et al.*, 1982].

2.3 Die klinische Symptomatik

Den drei Stadien der CML, chronische Phase, akzelerierte Phase und Blastenkrise, entsprechend können klinisch zunehmende Symptome beobachtet werden. Man beobachtet Abgeschlagenheit, Leistungsknick, subfebrile Temperaturen, Nachtschweiß und Gewichtverlust, wie bei den meisten malignen Erkrankungen. Eine Splenomegalie tritt in etwa 80% der Fälle auf. Die Symptome sind Völlegefühl und Druckgefühl im linken Oberbauch. In der Hälfte der Fälle wird die Erkrankung von einer Hepatomegalie begleitet, Knochenschmerzen treten dagegen nur gelegentlich auf. Sekundärkomplikationen, die auf eine Leukostase zurückzuführen sind, treten bei Leukozytenzahlen $>300.000/\text{mm}^3$ auf. Je nach betroffenem Organ kann es zu Dyspnoe, Zyanose, Benommenheit, Tinnitus und Priapismus kommen.

2.4 Diagnose

Im Rahmen von Routine Laboruntersuchungen wird die CML in zunehmender Weise in sehr frühen Stadien auch bei asymptomatischen Patienten diagnostiziert. Auffallend sind Leukozytosen, mit zum Teil extremen Werten von $600.000/\mu\text{l}$ und mehr. Im

Differentialblutbild kommt es zu Linksverschiebung, begleitender Eosinophilie oder Basophilie und Erniedrigung der alkalischen Leukozytenphosphatase [Mayani, 1996]. Zunächst kommt es zur Thrombozytose, später zur Thrombozytopenie und Anämie im weiteren Verlauf. Der Anteil der Blasten in liegt in der chronischen Phase in der Regel unter 10%. Mehr als 30% Blasten im Knochenmark oder im peripheren Blut weisen auf eine akzelerierte Phase hin. Nebenbefundlich kommt es zu einer Erhöhung der Harnsäure im Serum, was auf einen gesteigerten Zellumsatz hindeutet. Zur Erhärtung der Diagnose wird eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Hier findet man eine Hyperplasie der Myelopoese, oft auch der Megakaryopoese. Falls Pseudo-Gaucher-Zellen nachweisbar sind, so wird das als prognostisch günstiges Zeichen gewertet.

Differentialdiagnostisch muss immer an eine Osteomyelosklerose, eine leukämoide Reaktion im Rahmen einer Infektion oder auch an eine chronisch myelomonozytäre Leukämie bei myelodysplastischen Syndrom gedacht werden. Zur Diagnosesicherung wird heute der Nachweis des Ph1-Chromosoms in einer zytogenetischen Analyse oder die molekularbiologische Diagnose eines bcr-abl Fusionsgens mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH), Southernblot Analyse oder Polymerase Ketten-Reaktion (PCR/RT-PCR) gefordert.

Zu berücksichtigen ist hierbei, dass es auch eine Ph1-Chromosom negative CML gibt. Bei etwa 5-10% aller Patienten mit klinisch identischen Symptomen einer CML lässt sich zytogenetisch kein Ph1-Chromosom nachweisen [Costello *et al.*, 1997]. Bei der Mehrzahl dieser Patienten kann ein bcr-abl Rearrangement gefunden werden, der klinische und therapeutische Verlauf sind ebenfalls identisch mit der Ph1-Chromosom positiven CML [Aurich *et al.*, 1998]. Bei der Erstdiagnose wird daher häufig eine universelle Multiplex-PCR verwendet, die verschiedene Primerpaare verwendet, um die verschiedenen Transkriptarten bei den variablen Fusionen von bcr und abl zu erfassen [Hochhaus *et al.*, 2002].

Die Diagnostik in der akzelerierten Phase zeigt zusätzliche chromosomale Abberationen, wie die Verdopplung des Ph1-Chromosoms, der Trisomie 8 oder 19 und ein Isochromosom des langen Arms des Chromosom 17 bei etwa 10% der Patienten [Salles *et al.*, 1997].

Weitere differentialdiagnostische Kriterien sind die Bestimmung des ALP-Index (alkalische Leukozytenphosphatase), der bei der CML in der Regel erniedrigt, bei den anderen chronischen myeloproliferativen Erkrankungen dagegen normal oder erhöht ist. Bei der Ph-negativen CML ist die Abgrenzung zu anderen myeloproliferativen Erkrankungen oder der CMML (Chronisch Myelo-Monozytäre Leukämie) häufig schwierig und erfordert eine umfassende hämatologische, zytogenetische und molekulare Diagnostik.

In der Blastenkrise werden die charakteristischen Zeichen einer akuten Leukämie, entweder der lymphoiden oder der myeloischen Reihe, beobachtet. Die myeloische Differenzierung ist mit bis zu 75% häufiger zu finden als die lymphoide [Cervantes *et al.*, 1998]. Bei letzterer kann zusätzlich noch zwischen B- und T-Zell Reihe unterschieden werden [Jacobs and Greaves, 1984]. Lymphoblastische Transformationen scheinen einen Vorteil in der Ansprechrate bei der Therapie und beim Überleben zu haben [Janossy *et al.*, 1979].

2.5 Prognose

Die Überlebensrate von Patienten, die an einer CML erkrankt sind, hat sich in den letzten Jahren deutlich gebessert. Bessere Therapiemöglichkeiten tragen hier gemeinsam mit der früheren Diagnosestellung Rechnung für diesen erfreulichen Umstand. Dennoch überleben die Patienten durchschnittlich nur einen Zeitraum von 4-5 Jahren [Giralt *et al.*, 1995]. Sekundärkomplikationen, welche zum Tod führen, treten heute aufgrund der effektiven myelosuppressiven Therapie mittels Interferon- α kaum noch auf. Zusätzlich zögert sich der Übergang in die akzelerierte Phase weiter hinaus. Leider hat sich bei den Interventionsmöglichkeiten in der Blastenkrise noch nicht viel gebessert. Die Überlebenszeit in diesem Stadium bleibt äußerst kurz, außer in Fällen der aber auch nur selten erfolgreichen allogenen Knochenmarktransplantation.

Zahlreiche prognostische Modelle und Stagingsysteme wurden, zum Teil von der deutschen CML Studiengruppe [Hasford *et al.*, 1996], publiziert um ein individuelles Patientenrisiko für die Transformation in die Blastenkrise zu ermitteln [Braga *et al.*, 1996; Devergie *et al.*, 1997; Hasford *et al.*, 1998]. Damit kann man eine Einschätzung anhand von prognostisch unterschiedlichen Faktoren treffen (siehe Tabelle 2). Kantarjian et al [Kantarjian *et al.*, 1990] teilen Patienten in Gruppen mit niedrigem, mittlerem und hohem Risiko ein mit einem mittlerem Überleben von 5, 3,5 und 2,5 Jahren ein. Dennoch bleibt die Aussagekraft auf ein Individuum bezogen von beschränktem Wert.

Wegen der unbefriedigenden prognostischen Trennung der mit Interferon behandelten Patienten durch den bisher üblichen Sokal-Score wurde im Rahmen einer internationalen Kooperation ein verbesserter Score entwickelt, um diesem Umstand Rechnung zu tragen. Die Berechnung des Scores nach Hasford erfolgt auf der Grundlage der Variablen Alter, Milzgröße, Thrombozytenzahl, Prozentzahl der Blasten, Eosinophilie und Basophilie im peripheren Blut [Hasford *et al.*, 1998]. Die genannten Variablen werden nach einem bestimmten Schlüssel verrechnet, so dass letztlich eine Einteilung in drei Gruppen mit niedrigen, mittlerem oder hohem Risiko, unterteilt werden kann. Der exakte Modus der

Berechnung kann im Internet eingesehen werden (<http://www.pharmacoepi.de>). Ein Online-Tool zur Berechnung steht hier ebenfalls zur Verfügung. Als verlaufsabhängige Prognoseparameter sind das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission, das Ansprechen auf Interferon zu nennen. Patienten, die eine komplette oder partielle zytogenetische Remission erreichen, überleben in der Regel länger. Zudem scheint ein möglichst früher Therapiebeginn, sowie eine rasche Reduktion der Tumorlast auf ein Minimum von Vorteil zu sein. Eine Zusammenfassung der Prognoseparameter der unterschiedlichen Scores, unter Einbeziehung der klinischen Präsentation des Patienten, gibt die Tabelle 2 wieder.

Ungünstige Prognosefaktoren der CML

Klinisch

Höheres Patientenalter
Symptome bei Diagnosestellung
Signifikanter Gewichtsverlust
Hepatomegalie
Splénomegalie
Schwarze Hautfarbe

Laborchemisch

Anämie
Thrombozytose, Thrombozytopenie, Megakaryozytopenie
Erhöhung der Blasten oder Blasten+Promyelozyten im peripheren Blut oder KM
Erhöhung der basophilen Zellen im Blut oder KM
Kollagen- oder Retikulinfibrose Grad 3-4

Therapeutisch

Kurze Dauer der Remission
Höhere Dosis von Hydroxyurea zur Kontrolle der Erkrankung im ersten Jahr
Keine signifikante Suppression der Ph1 positiven Zellen nach Chemotherapie oder IFN α Behandlung
Schwache initiale Antwort auf IFN α

KM – Knochenmark, IFN α - Interferon- α

Tabelle 2: Ungünstige Prognose Faktoren der CML, nach Kantarjian HM, et al: Chronic myelogenous leukemia: a concise update. Blood 1993; 82:691

2.6 Therapie

Die therapeutischen Optionen haben im Verlauf der letzten Jahre eine erhebliche Erweiterung erfahren. Eine Heilung ist derzeit nur durch eine allogene Knochenmarktransplantation möglich, die beim jüngeren Patienten frühzeitig geplant werden sollte. HLA-Typisierung und Suche nach möglichen Familienspendern sollten unmittelbar nach Diagnosestellung erfolgen. Falls kein Familienspender gefunden wird, kann eine Fremdspendersuche über nationale oder internationale Register eingeleitet werden. Die Wahrscheinlichkeit einen HLA-kompatiblen Knochenmarkspender zu finden, beträgt etwa 50%.

Das initiale Ziel der Behandlung der CML ist eine Reduzierung der Symptome. Dies wird üblicherweise erreicht durch eine Verminderung der Leukozytenzahl mit Hilfe myelosuppressiven Wirkstoffen. Therapien, welche die Überlebenszeit verlängern basieren auf Hydroxyurea und Interferon- α . Bestrahlungen, welche vor der Einführung der Chemotherapie zur Therapie genutzt wurden, zeigten schon in frühen Studien im Vergleich mit nicht bestrahlten Patienten keinen signifikanten Überlebensvorteil [Minot, 1924]. Zurzeit wird die Bestrahlung nur noch zur Palliation eingesetzt, beispielsweise um die Symptome der extramedullären Blutbildung zu lindern oder bei Patienten, die kein Ansprechen auf Chemotherapie zeigen. Dazu gehört hauptsächlich die Milzbestrahlung bei Splenomegalie. Bei jungen Patienten im reproduktionsfähigen Alter sollten vor Therapieeinleitung Fragen der Fertilität diskutiert werden, welche durch die Behandlung wesentlich beeinträchtigt werden kann.

In Deutschland wird die Therapie der CML im Rahmen der CML Studiengruppe evaluiert und durch die fortschreitenden Protokolle CML I, II, III, IIIA und IV neu bestimmt. Untersucht werden verschiedene Chemotherapieprotokolle, welche auch die Behandlung mit STI 571 beinhalten, sowie der allogene Knochenmarktransplantation.

2.6.1 Chemotherapie

Zur Basis-Chemotherapie gehören die Substanzen Busulfan, Hydroxyurea und Interferon α . Hydroxyurea wird heute bevorzugt verwendet und gilt insbesondere bei der Therapieeinleitung wegen seines raschen Wirkungseintritts als Mittel der Wahl. Nur bei Versagen dieses Medikaments wird manchmal noch Busulfan eingesetzt, da ein deutlicher Überlebensvorteil mit Hydroxyurea als Therapeutikum gezeigt werden konnte [Hehlmann *et al.*, 1993]. Das Gesamtüberleben stieg im Durchschnitt von 45 auf 58 Monate. Beide Substanzen wirken myelosuppressiv und können zu hämatologischen Remissionen,

verringerten Symptomen und Rückgang der Splenomegalie führen. Verlängerte Remissionen mit Verlust des Ph1-Chromosoms konnten sowohl mit Busulfan [Finney *et al.*, 1972], als auch mit Hoch-Dosis Hydroxyurea Behandlung erzielt werden [Kolitz *et al.*, 1992].

2.6.1.1 Interferon α

Zu Beginn der 80er Jahre wurde die Substanz Interferon α (IFN α) für die Therapie der CML entdeckt. IFN α wirkt immunmodulatorisch, antiproliferativ und es steigert die Zelldifferenzierung [Talpaz *et al.*, 1986; Talpaz *et al.*, 1983]. Der genaue Mechanismus, durch den es zur Kontrolle der Leukozytenzahl und zu Reduktion der Ph1 positiven Stammzellen kommt, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung könnte die verminderte Anheftung der CML-Zellen an das Knochenmarkstroma sein [Eaves *et al.*, 1986; Gordon *et al.*, 1987]. IFN α Behandlung hat in Studien gezeigt, dass eine Adhäsion der Stammzellen an das Stroma wiederhergestellt wird [Bhatia *et al.*, 1996]. Eine Meta-Analyse der Chronic Myeloid Leukemia Trialists Collaborative Group anhand von sieben randomisierten Studien konnte eine signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate mit IFN α (57%) gegenüber Busulfan oder Hydroxyurea (42%) zeigen [1997]. Die meisten Studien stellten eine Korrelation zwischen Überleben und dem Grad an zytogenetischer Remission fest. Ein optimales Regime für die Verabreichung von IFN α zu etablieren ist momentan noch Gegenstand zahlreicher Bemühungen. Den viel versprechenden Ergebnissen der IFN α Behandlung steht gegenüber, dass 15-25% der Patienten eine Intoleranz gegenüber der Substanz aufweisen und ferner, dass auch nach langer Behandlungsdauer mit sehr sensitiven Methoden, wie der RQ-PCR, im Blut immer noch bcr-abl Transkripte nachgewiesen werden können. Dieser Umstand wird auch Minimal Residue Disease genannt und spricht für eine Persistenz der Erkrankung, bei der die Dauer der klinischen und zytogenetischen Remission nicht vorhergesagt werden kann. Andererseits kann IFN α bei 70-80% der CML-Patienten nicht nur stabile hämatologische Remissionen, sondern auch in einem kleinen Prozentsatz (5-10%) dauerhafte komplette zytogenetische Remissionen induzieren [1994; Hehlmann *et al.*, 1994].

Eine Kombination von IFN α mit Cytosin Arabinosid (ARA-C) scheint synergistische Effekte zu haben. Eine randomisierte klinische Studie konnte bei Patienten, welche mit beiden Substanzen behandelt wurden, eine signifikante Steigerung der hämatologischen Remissionsrate (67% vs. 54%), der zytogenetischen Remission (39% vs. 22%) und eine Verlängerung der 3-Jahres Überlebensrate (88% vs. 76%) aufzeigen [Guilhot *et al.*, 1997].

2.6.1.2 Imatinib (STI 571, Glivec®)

Besonderen Auftrieb hat die Entwicklung von neuen Medikamenten auf dem Gebiet der Small Molecule Drugs erhalten. Beeindruckende Ergebnisse mit dem Wirkstoff STI571 konnten dahingehend überzeugen, dass es gelingen kann mit der selektiven Inhibition der zentral wichtigen Kinase Bcr-Abl komplette klinische und sogar zytogenetische Remissionen zu erzielen [Ottmann *et al.*, 2002; Sawyers *et al.*, 2002]. Aufgrund der positiven Datenlage im Bezug auf das Ansprechen auf eine Therapie mit STI571 konnte eine äußerst schnelles Zulassungsverfahren bei der Food and Drug Administration der USA (FDA) erwirkt werden. Dennoch sind zurzeit noch keine etablierten Therapieschemata gefunden, so dass ein internationaler Konsens in der Handhabung von STI571 noch nicht etabliert ist. Es ist offen, ob mit einer Kombination von STI571 mit konventioneller Chemotherapie und der KMT tatsächlich eine Heilung erzielt werden kann. Eventuell können auch noch weitere Entwicklungen auf dem Feld der selektiven Inhibitoren dazu beitragen, zusätzliche Signalwege, welche die Leukämie ebenfalls unterhalten, auszuschalten und die Therapie zu verbessern. Die vorliegende Arbeit berücksichtigt diesen Aspekt im Hinblick auf die Kreuzreaktivität von STI571 mit der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit, welche hier besondere Aufmerksamkeit erfährt.

2.6.2 Die autologe Stammzelltransplantation

Studien mit Chemotherapie und autologer Stammzelltransplantation haben die grundsätzliche Durchführbarkeit und Induktion von zytogenetischen Remissionen bewiesen. Langzeitremissionen sind bisher leider nur von kurzer Dauer bei Patienten in chronischer Phase der CML. Ähnlich der Behandlungsstrategie der Akuten myeloischen Leukämie werden nach einer Induktionschemotherapie Philadelphia negative Stammzellen apharesiert. Mit verschiedenen Verfahren können die gewonnenen Stammzellen in einem Zwischenschritt weiter aufgereinigt werden. Nach einer Hochdosischemotherapie werden die Zellen dem Patienten rückgeführt [Carella *et al.*, 1996]. Zytogenetische Vollremissionen können damit erreicht werden, allerdings bleibt die Zeitspanne bis zum Wiederauftreten von Philadelphia positiven Zellen meist unter einem Jahr [McGlave *et al.*, 1994]. Hauptursache der geringen Erfolge, die bisher erzielt wurden, könnte in dem Fehlen des Graft-versus-Leukemia-Effektes sein, der bei der allogenen Knochenmarktransplantation beschrieben worden ist.

2.6.3 Die allogene Knochenmarktransplantation

Seit der ersten erfolgreichen allogenen Knochenmarktransplantation (KMT) im Jahre 1970 [Fefer *et al.*, 1979], hat sich diese Therapieform als einzige Chance auf Heilung durchgesetzt. Erkrankungsfreies Langzeitüberleben konnte in bis zu 70% der auf diese Weise behandelten Patienten gezeigt werden [Enright and McGlave, 1998; Thomas *et al.*, 1986], so dass die CML, vor Einführung der Behandlung mit Imatinib, die häufigste Erkrankung war, bei der die allogene KMT eingesetzt wurde. Heute wird am häufigsten bei akuter myeloischer Leukämie (AML) transplantiert. Es gibt allerdings eine Reihe von Faktoren, die das Ergebnis dieser Therapie beeinflussen, beziehungsweise für das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen mitverantwortlich sind. Das Alter des Patienten sollte in der Regel nicht über 55 Jahren liegen [Clift *et al.*, 1993]. Je fortgeschrittener das Stadium der Erkrankung, desto wahrscheinlicher ist das Wiederauftreten der Leukämie, dazu zählt eine ungünstige Prognose für die Transplantation in der Blastenkrise [Horowitz *et al.*, 1996]. Die Art der Vorbehandlung spielt je nach verwendeter Substanz eine wesentliche Rolle für die Überlebenszeit und das erkrankungsfreie Intervall. Busulfan mit folgender allogener KMT hat deutlich schlechtere Ergebnisse gezeigt als eine vorhergehende Behandlung mit Hydroxyurea. Die Daten für IFN α vorbehandelte Patienten sind bisher noch widersprüchlich [Giralt *et al.*, 1993]. Das Intervall von Diagnosestellung bis zur Transplantation ist ebenfalls von Bedeutung. Patienten die innerhalb eines Jahres transplantiert wurden, zeigten eine geringere transplantationsbedingte Mortalität und ein verlängertes leukämiefreies Überleben [Biggs *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1993]. Wesentlich für das Outcome nach Transplantation scheint der Graft versus Leukemia Effekt (GVL) zu sein. Patienten, welche eine T-Zell freie KMT erhielten, zeigten häufigere Rezidivraten als Patienten, die mit unbehandeltem Knochenmark transplantiert wurden. Ferner kann bei Auftreten eines Rezidivs eine Infusion mit Leukozyten des Spenders eine erneute Induktion bewirken [Kolb *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1994].

Vergleichende retrospektive Analysen zeigten einen deutlichen Langzeitvorteil bei der allogenen KMT mit Knochenmark von einem HLA-identischen Zwilling mit Zeitpunkt der Transplantation <1 Jahr nach Diagnosestellung.

Verbesserte Therapieprotokolle für die autologe KMT sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Vor allem Verfahren, welche das ex vivo Purgung beinhalten, könnten in Zukunft sehr viel versprechende Resultate aufweisen. Besonders ist hier das Purgung mit STI571 zu erwähnen. Daten liegen hierzu allerdings noch nicht vor. Aber auch mit nicht gepurgtem Knochenmark konnten signifikante Vorteile in der 5-Jahres-Überlebenszeit (56% vs. 28%) gegenüber konventioneller Chemotherapie gezeigt werden [Hoyle *et al.*, 1994].

3 Die molekulare Pathogenese der CML

3.1 Das Philadelphia-Chromosom

Die CML ist eine der ersten Erkrankungen, bei welcher eine konsistente Chromosomenaberration als Ursache festgestellt wurde [Rowley, 1990]. Nowell und Hungerford beschrieben 1960 [Nowell, 1960] ein kleines Chromosom 22, das bei der granulozytären Leukämie auftritt. Dem Ort der Entdeckung zufolge wurde es später als Philadelphia-Chromosom (Ph1) bezeichnet. Dreizehn Jahre später konnten Rowley und Mitarbeiter zeigen [Rowley, 1973b], dass es sich bei diesem Karyotyp um eine spezifisch balancierte, reziproke Translokation $t(9;22)(q34.1;q11.21)$ handelt. Wesentliche Vorarbeiten haben hierzu Caspersson und O'Riordan zwei Jahre zuvor geleistet [Caspersson *et al.*, 1970; O'Riordan *et al.*, 1971]. Diese Chromosomenaberration ist bei über 90% aller Patienten mit CML nachweisbar. Dabei kommt es zu einer Deletion des langen Armes von Chromosom 22 (22q-) mit einer folgenden Addition auf den langen Arm des Chromosoms 9 (9q+) [Bartram *et al.*, 1983; Heisterkamp *et al.*, 1983]. Die Translokation ist in allen Differenzierungsstufen sowohl der myeloischen Reihe, als auch der lymphatischen Reihe nachzuweisen. Sie scheint auch das initiale Ereignis bei der Entstehung der CML zu sein, da sie schon im frühen Stadium der chronischen Phase nachzuweisen ist und somit nicht erst durch später auftretende, zusätzliche Mutationen entsteht. Die betroffenen Gensequenzen auf den jeweiligen Chromosomen sind für das Chromosom 9 das c-abl Gen [Heisterkamp *et al.*, 1983] und für das Chromosom 22 das bcr-Gen [Groffen *et al.*, 1984]. Das Ergebnis der Translokation ist das bcr-abl Gen, welches nach Transkription und Translation für ein 210 Kilodalton (kDa) großes Fusionsprotein $p210^{bcr-abl}$ (im Folgenden als Bcr-Abl bezeichnet) kodiert. Nachdem das Philadelphia-Chromosom auch bei anderen Leukämien, als der CML auftritt, wurden Unterschiede in der Größe des Fusionsgens untersucht. Es sind verschiedene bcr-abl-Gen-Varianten analysiert worden, die sich in der Lokalisation des Bruchpunktes im originären bcr-Gen unterscheiden und so zu den beschriebenen Größenänderungen führen.

3.2 Das Fusionsprotein Bcr-Abl

Durch Analyse zusätzlicher Fälle von chronisch myeloischer und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wurde in der Folge deutlich, dass die Integrationsstelle des abl-Gens nicht nur im ersten Intron von bcr lag, sondern hauptsächlich zwischen Exon 10 und 13.

Liegt die Integrationsstelle im Intron 1, der „minor breakpoint region“ (m-bcr), so entsteht die kürzere Variante mit der resultierenden Fusion p190^{bcr-abl}. Sie lässt sich bei 50% der Erwachsenen und 80% der an ALL erkrankten Kinder nachweisen [Kurzrock *et al.*, 1987]. Bei der CML tritt p190^{bcr-abl} nur bei 20-30% der Patienten auf. Zugleich ist hierbei eine monozytäre Proliferation auffällig, ähnlich der chronisch myelomonozytären Leukämie (CMML). Eine Integration des abl-Gens in die Exons 10-13 des bcr-Gens, der „major breakpoint region“ (M-bcr), führt zur Ausprägung der CML mit dem typischen Transkript p210^{bcr-abl}. Die Lokalisation der Bruchstelle im abl-Gen liegt innerhalb des ersten Introns [Shtivelman *et al.*, 1985]. Selten tritt die Fusion zwischen dem bcr-Exon 19 und dem abl-Exon 2 auf, welche zu dem Fusionsgen p230^{bcr-abl} führen. Diese Variante ist assoziiert mit einer Neutrophilie und Thrombozytose, die aber nicht immer beobachtet wird [Mittre *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1997]. Bevor nun die Zusammenhänge zwischen morphologischem Korrelat und biologischer Funktion betrachtet werden, sollen im Folgenden zunächst die physiologischen Funktionen des bcr- und des abl-Gens diskutiert werden, da sich einige der Pathomechanismen der CML davon ableiten. Die Funktionen der Domänen von Bcr-Abl ergeben sich aus den gegebenen Eigenschaften der Fusionspartner Bcr und Abl. Die detaillierte Beschreibung erfolgt in den Kapiteln 3.3 und 3.4.

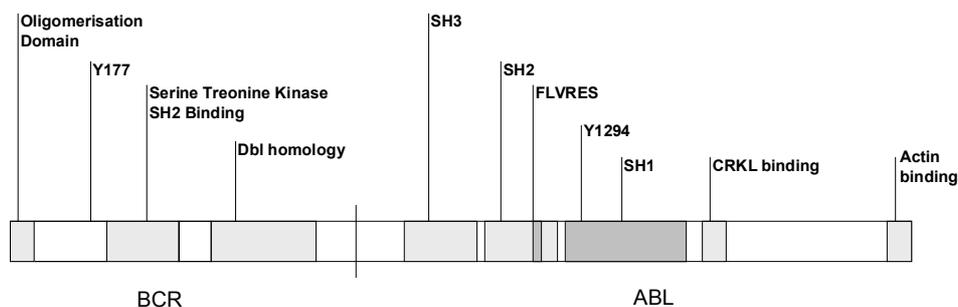


Abbildung 1: Domänen von Bcr-Abl

Schematische Darstellung des Fusionsproteins p210^{Bcr-Abl} (Bcr-Abl) mit den jeweiligen funktionellen Domänen für Proteinbindung und Aktivierung. Y177 und Y1294 kennzeichnen Punktmutanten an den Tyrosinresten der entsprechenden Aminosäureposition. Die Dbl-Homologiedomäne weist eine hohe Homologie zur Protein Dbl auf. SH2 und SH3 sind Src-homologie-Domänen, welchen eine spezifische Proteinbindung zu Eigen ist. Das FLVRES-Motiv ist ein Konsensusbereich für die Phosphotyrosin-Bindung. Die aktive Kinase ist mit der dunkel unterlegten SH1 Domäne gekennzeichnet. Im Anschluss folgen Binderegionen für die Proteine CRKL und Actin.

3.3 Das bcr-Gen

Das bcr-Gen umfasst 23 Exons und ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22q11.21 lokalisiert (OMIM Accession # *151410). Da bei chronisch myeloischer Leukämie zunächst nur eng umschriebene Bruchstellen auf dem Chromosom 22 gefunden wurden, wurde der Ort, in den das abl Onkogen integriert war, als „breakpoint cluster region (bcr)“ bezeichnet. Exons mit offenem Leserahmen ließen den Schluss zu, dass die bcr-Region Teil eines Gens ist [Groffen *et al.*, 1984]. Das gesamte Gen hat eine beachtliche Größe von 130 kb und beinhaltet 25 Exons [Heisterkamp *et al.*, 1985].

Das 160 kDa große Produkt des bcr-Gens, p160^{bcr} (Bcr), besteht aus mehreren funktionellen Domänen. So beinhalten die ersten 63 Aminosäuren (Aa) ein coiled-coil Motiv, welches für eine Homodimerisierung und Tetramerisierung von Bcr-Abl verantwortlich ist. Dies ist für die Autophosphorylierung von Bcr-Abl wesentlich. Die Aminosäureposition 177 trägt ein Tyrosin (Y177), welches durch seine Bindungsfähigkeit an SH2-Domänen identifiziert wurde [Muller *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1991; Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994]. Die Fähigkeit eines Tyrosinrests an eine SH2-Domäne zu binden entspricht den üblichen Eigenschaften im Kontext eines Signalmoleküls. Diese Region wird alternativ auch als A-Box/B-Box bezeichnet. Es wurde eine Vielzahl von SH2-Domänen enthaltenden Proteinen nachgewiesen, welche an Y177 binden. Eines der Wichtigsten ist das Adaptorprotein Grb2, welches mit hoher Affinität bindet und dem eine zentrale Bedeutung bei der Aktivierung des Ras-Signalweges zukommt [Pendergast *et al.*, 1993; Rodrigues and Park, 1994; Wang, 1993]. Ebenso kann auch c-Abl an dieses Motiv binden oder eine intramolekulare Interaktion des Abl-Teils von Bcr-Abl stattfinden [Muller *et al.*, 1991; Pendergast *et al.*, 1991b]. Allerdings konnte bei Mutanten mit deletierter SH2-Binderegion weder eine reduzierte Tyrosinkinaseaktivität, noch eine Verminderung der transformierenden Eigenschaften beobachtet werden [McWhirter and Wang, 1997].

Im Anschluss an die beschriebenen Domänen findet sich ein Bereich mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität und eine Dbl-homologie Domäne an [Eva and Aaronson, 1985; Maru and Witte, 1991]. Die Rolle der Serin/Threonin-Kinase in der Pathogenese der CML ist noch unklar. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass die Dbl-Homologie Einfluss auf Organisation des Zytoskeletts hat [Chuang *et al.*, 1995]. Dies wird durch die Guanin-Nukleotid-Austausch Aktivität der Dbl-Homologie vermittelt, welche wiederum Einfluss auf das Signalprotein Rho hat. Rho ist ein Protein der Familie der kleinen Ras-ähnlichen GTPasen und ist für die Integrität des Zytoskeletts mitverantwortlich [Hotchin and Hall, 1996].

Zusammenfassen ist jedoch in Knock-out Versuchstieren festgestellt worden, dass es keinen offensichtlichen Phänotyp der Tiere gibt und auch die Reproduktion, Entwicklung und Lebenserwartung unbeeinträchtigt sind.

3.4 Das c-abl Protoonkogen

Das abl-Gen besteht aus insgesamt 11 Exons. Als zelluläres Onkogen weist c-Abl eine Homologie zum viralen murinen Abelson-Leukämie-Onkogen auf. Dieses Retrovirus transformiert *in vitro* und *in vivo* hämatopoetische Zellen der Maus [Abelson and Rabstein, 1970].

Die Lokalisation von c-abl liegt auf dem Chromosom 9q34.1 (OMIM Accession # *189980). Es existieren zwei alternative Spleißvarianten, je nach Transkription der Exons 1a oder 1b, welche durch zwei unterschiedliche Promotoren P1 oder P2 in Gang gesetzt werden. Die zwei unterschiedlichen mRNAs sind 6 bzw. 7 kb groß und kodieren für zwei sehr ähnliche Proteine mit 1122 oder 1142 Aminosäuren Länge [Pendergast *et al.*, 1987]. Das humane c-Abl Protein an sich gehört zu der Familie der Protein-Tyrosinkinasen und hat ein Molekulargewicht von 145 kDa [Konopka and Witte, 1985].

Die Bruchstelle für die Fusion mit dem bcr-Gen kann zwischen dem weiter 5' gelegenen Exon 1b und Exon 2 liegen, welches weiter 3' gelegen ist. Die Exons 1a und 1b werden alternativ gespleißt, so dass nur eines von Beiden tatsächlich translatiert wird [Chisoe *et al.*, 1995].

Mitunter die wichtigste Eigenschaft des Abl-Proteins ist seine Kinaseaktivität (SH1-Domäne). Durch die Fusion an den Bcr-Teil kommt es zu unkontrollierter Phosphorylierung von tyrosinhaltigen Signalmolekülen, welche an Bcr-Abl binden. Die natürliche Kontrolle der Abl Kinase ist aufgehoben. Über diesen Mechanismus hat Bcr-Abl Einfluss auf Signalwege zur Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen.

Abl selbst beinhaltet jedoch noch weitere Domänen, welche zur Funktionalität sowohl im physiologischen, als auch im pathologischen Sinne notwendig sind. Nachdem die Kinasedomäne etwa in der Mitte des Abl-Proteins liegt, soll im Folgenden auf charakteristische Domänen, weiter N-terminal und C-terminal gelegen, eingegangen werden.

Der N-terminale Abschnitt ist nahe verwandt mit anderen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie beispielsweise den Src-Kinasen. Er besteht im Wesentlichen aus einer SH3-Domäne und einer SH2-Domäne. Die SH3-Domäne hat die übliche Funktion als Bindungspartner für prolinreiche Motive [Ren *et al.*, 1993]. Diese prolinreichen Sequenzen (PXXP) dienen in vielen Signalmolekülen als Bindemechanismus, auch in Abl selbst. Eine intramolekulare

Interaktion zwischen der SH3-Domäne und der Linker Region, die zwischen SH2- und der Kinasedomäne lokalisiert ist, bewirkt eine zumindest teilweise Regulierung der Kinaseaktivität in Abl [Barila and Superti-Furga, 1998]. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls bei den Src-Kinasen beschrieben [Moarefi *et al.*, 1997; Sicheri *et al.*, 1997]. Es wird kontrovers diskutiert ob für diesen negativ regulierenden Mechanismus möglicherweise ein zusätzliches, inhibierendes Protein notwendig ist [Pendergast *et al.*, 1991a; Walkenhorst *et al.*, 1996]. Grundsätzlich führt die Deletion oder Mutation der SH3-Domäne bei c-Abl zu einem onkogenen Phänotyp [Franz *et al.*, 1989; Jackson and Baltimore, 1989; Jackson *et al.*, 1993; Mayer and Baltimore, 1994].

Die folgende SH2-Domäne befähigt, ähnlich der SH3-Domäne, Abl zu einem Bindungspartner für viele Signalmoleküle. SH2-Domänen binden an phosphorylierte Tyrosinreste in einem spezifischen Aminosäure-Kontext [Songyang *et al.*, 1993]. Die biologische Funktion der SH2-Domäne liegt hauptsächlich in der Zuführung von relevanten Signalproteinen zu der Kinase [Mayer and Baltimore, 1994; Mayer *et al.*, 1995]. Mutationen der SH2-Domäne stören die Formation eines Komplexes zwischen Bcr-Abl und anderen Phosphoproteinen. Beispielsweise kann dadurch die transformierende Eigenschaft von Bcr-Abl in Fibroblasten aufgehoben werden [Mayer and Baltimore, 1994; Mayer *et al.*, 1992]. Obwohl in hämatopoetischen Zelllinien eine SH2 Mutation nicht ausreicht um die transformierenden Eigenschaften zu unterbinden [Ilaria and Van Etten, 1995], sind durch Kombination von verschiedenen funktionellen wirksamen Mutationen und Veränderungen im Konsensusbereich für die Phosphotyrosin-Bindung (FLVRES), Mechanismen von Bcr-Abl mit nachgeschalteten Signalkaskaden klar geworden. So ist die SH2-Domäne an der Induktion des Ras-Signalweges und der Wachstumsfaktorunabhängigkeit von zwei IL-3 abhängigen Zelllinien BaF3 und 32D, beteiligt [Cortez *et al.*, 1995; Goga *et al.*, 1995b]. Ebenfalls hat die SH2-Domäne eine Schlüsselstellung in der Signalweiterleitung über die PI3-Kinase und der Induktion von c-Myc [Afar *et al.*, 1994; Skorski *et al.*, 1997].

Im Anschluss an die SH2-Domäne findet sich die bereits angesprochene Linker-Region, deren Bedeutung noch nicht vollständig geklärt ist und weiter C-terminal gelegen schließt sich die Kinaseregion an.

Im C-terminalen Abschnitt befinden sich für die weiter downstream von Bcr-Abl gelegene Signaltransduktion ebenfalls eine Reihe funktionell bedeutsamer Abschnitte. Eine Region die für die Crk/Crk1-Bindung (siehe Kapitel 3.7.4) verantwortlich ist schließt sich der Kinase an [Heaney *et al.*, 1997; Senechal *et al.*, 1996]. Eine im Anschluss gelegene Kern-Lokalisierungs-Sequenz (NLS), die im Bcr-Abl Fusionsmolekül aufgehoben zu sein scheint

[Van Etten *et al.*, 1989], wird gefolgt von einer DNA-bindenden Region [Kipreos and Wang, 1992], einer p53 Binderegion [Goga *et al.*, 1995a] und einer Aktin-Binderegion [McWhirter and Wang, 1991; McWhirter and Wang, 1993; Van Etten *et al.*, 1989]. Die DNA- und die p53-Bindung scheinen weniger in der Pathogenese der CML eine Rolle zu spielen, als in der physiologischen Funktion von Abl [Goga *et al.*, 1995a; Kipreos and Wang, 1992]. Die Aktinbindung scheint verantwortlich zu sein für die von Adhäsion unabhängigen Wachstum von NIH3T3-Fibroblasten [McWhirter and Wang, 1993; Renshaw *et al.*, 1995].

3.5 Der transformierende Einfluss des Bcr-Abl Proteins auf die Hämatopoese

3.5.1 Änderungen in der Apoptose und der Proliferation

Die Entstehung einer erhöhten Zellmasse des erkrankten Gewebes kann im Grunde genommen auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen kann es durch eine verzögerte Apoptose zur Anhäufung der überalterten Zellen kommen. Im Gegensatz dazu kann es durch Alterationen im Zellzyklus zu einer überschießenden Proliferation der sich teilenden Zellen kommen. In der CML sind beide Mechanismen festgestellt worden. Zahlreiche Publikationen haben zeigen können, dass in Bcr-Abl exprimierenden Zelllinien eine gesteigerte Resistenz gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli besteht [Bedi *et al.*, 1994; Laneuville *et al.*, 1994; McGahon *et al.*, 1994]. Diese These wird gestützt durch Experimente mit temperatur-sensitiven Mutanten von Bcr-Abl in BaF3 Zellen. Hierbei wurde durch eine Temperaturerhöhung der Zellkultur ein spezieller Promotor für die Bcr-Abl Transkription und Translation in den Zellen angeregt. In den Zellkulturen, welche über zwei Wochen beobachtet wurden, konnte deutlich eine Überalterung, also Anti-Apoptose festgestellt werden [Kabarowski *et al.*, 1994]. Diese überwog im Vergleich zur Proliferation. Anti-Apoptose steht häufig mit Zellzyklus-Arrest in Zusammenhang. So wurde auch hier die Ursache in einem Block während der G2/M Transition festgestellt [Bedi *et al.*, 1994; Nishii *et al.*, 1996]. Ähnliche Ergebnisse brachten Versuche mit Anti-Sense-Oligonukleotiden in der primären CML Zelllinie K562 [Rowley *et al.*, 1996]. Die Zugabe der Anti-Sense Oligonukleotide verringerte die Bcr-Abl Expression und führte eine Reduktion der anti-apoptotischen Effekte herbei. Die Proliferationsrate der Zellen blieb dabei weitgehend unbeeinflusst.

Diese Beobachtung unterstützt die These, dass eine Aktivierung der Proliferation erst durch Sekundärmutationen entsteht, welche häufig in Krebszellen auftreten, insbesondere in überalterten Zellen. Getragen wird dieses Modell auch durch die Tatsache, dass es im Verlauf

der CML von einer chronischen Phase zu einer akzelerierten Phase mit überhand nehmender Zellproliferation kommt. Der Zeitpunkt dieses Geschehens könnte mit dem Auftreten einer entscheidenden Sekundärmutation zusammenhängen. Die Kontroverse wird dadurch unterhalten, dass es im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Promotorsystem, mit einem Dexamethason abhängigen Expressionssystem von Bcr-Abl, zur Aktivierung sowohl der Anti-Apoptose, als auch der Proliferation und Zellzyklusprogression kommt [Cortez *et al.*, 1997; Kabarowski *et al.*, 1994]. Zudem ist der zur Proliferation führende Ras-Signalweg in Bcr-Abl positiven Zellen ständig aktiviert [Puil *et al.*, 1994]. Andererseits ist auch wieder eine Verbindung von Ras mit Signalwegen zu Apoptose, die hierbei blockiert wird, gefunden worden [Cortez *et al.*, 1996; Sanchez-Garcia and Martin-Zanca, 1997].

Die meisten Ergebnisse der im Vorherigen genannten Publikationen sind unter der Verwendung von transfizierten Zelllinien entstanden, so dass die Reaktion auf apoptotische Stimuli bei primären CML Zellen gegensätzlich sein kann [Albrecht *et al.*, 1996; Amos *et al.*, 1995; Bedi *et al.*, 1994]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Unterschiede auf die Verwendung verschiedener Modellsysteme zurückzuführen sind.

3.5.2 Die Adhäsion im Knochenmark

Die Hämatopoese im Knochenmark ist nicht nur von einer eng regulierten Proliferation und Differenzierung abhängig. Eine wichtige Rolle spielen auch die Einflüsse, die durch die zahlreichen Interaktionen der Stammzellen mit dem Knochenmarkstroma entstehen. Es besteht ein sensibel eingestelltes Mikroenvironment aus Zell-Zell-Kontakten, Wachstumsfaktoren und Adhäsion der Stammzellen an der extrazellulären Matrix. Für die Adhäsion spielen Glykoproteine, wie Fibronectin und Hyaluronsäure eine ebenso wichtige Rolle, wie für die Produktion von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren [Clark *et al.*, 1992; Simmons *et al.*, 1997].

Für die CML ist festgestellt worden, dass Bcr-Abl nicht nur, wie oben bereits diskutiert, direkt in den Zellumsatz eingreift, sondern auch auf die Adhäsion der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark Einfluss nimmt [Verfaillie *et al.*, 1997]. Bcr-Abl positive Zellen zeigen eine herabgesetzte Fähigkeit an Stromazellen, Fibronectin, Kollagen und Laminin zu binden [Gordon *et al.*, 1989]. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass periphere Blutzellen von CML-Patienten im Stadium der Blastenkrise, die in Mäuse transplantiert werden, deutlich schlechter im Knochenmark anwachsen, als normale Knochenmarkzellen [Salgia *et al.*, 1997].

Zudem wurde gezeigt, dass Bcr-Abl mit einer Reihe von Proteinen des Zytoskeletts interagiert und diese phosphoryliert [Gotoh *et al.*, 1995; Salgia *et al.*, 1995a; Salgia *et al.*, 1996b]. Hier sind vor allem die Proteine Paxillin, Aktinin, Talin, Vinkulin und F-Aktin zu nennen. Dazu scheint Bcr-Abl von einer Kollokalisierung mit dem Zytoskelett abhängig zu sein, um seine transformierenden Eigenschaften wirksam werden zu lassen [McWhirter and Wang, 1993]. Von den genannten Proteinen assoziiert F-Aktin direkt mit Bcr-Abl. Gemeinsam mit den übrigen Proteinen steht F-Aktin mit dem Transmembran-Rezeptor $\beta 1$ -Integrin in Verbindung. Dies ist zusammen mit der Aktivierung der Signalmoleküle Rho und PI3-Kinase möglicherweise einer der wesentlichen Signalwege von Bcr-Abl, die Zelladhäsion betreffend. Eine der größten Gruppen der Transmembran-Rezeptoren, welche für die Zell-Zell Kontakte und Zell-Matrix Interaktion wesentlich sind die Integrine [Coulombel *et al.*, 1997]. Integrine bestehen jeweils aus einer α und einer β Untereinheit. Von den derzeit etwa 20 bekannten Integrin-Rezeptoren sind vor allem die $\beta 1$ -Integrine während der Hämatopoese als negative Regulatoren der Proliferation von Bedeutung [Hurley *et al.*, 1995; Hurley *et al.*, 1997]. In CML Zellen sind die $\beta 1$ -Integrin-Funktionen vermindert, was die Reduktion der Fähigkeit an Knochenmarkstroma zu binden erklären könnte [Bhatia and Verfaillie, 1998]. Integrine interagieren wiederum über ihre zytoplasmatische Domäne mit den oben genannten Proteinen des Zytoskeletts Paxillin, Aktinin, Talin, Vinkulin und F-Aktin. So ergibt sich ein gesamter Regelkreis der in der Pathologie der CML eine wichtige Rolle spielen könnte. Noch ist dieser Pathomechanismus nicht vollständig aufgeklärt. Unter anderem kommt es je nach verwendetem Modellsystem zu kontroversen Ergebnissen. So ist bei bcr-abl transfizierten 32D Zellen, einer hämatopoetische Mauszelllinie, im Vergleich mit nativen 32D Zellen eine gesteigerte Adhäsion zu Fibronektin festgestellt worden [Gordon *et al.*, 1987; Verfaillie *et al.*, 1992].

3.6 Der Übergang von der Chronischen Phase zur Blastenkrise

Wie in vielen anderen Tumoren konnte auch in der CML gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 eine Rolle bei der Induktion der Blastenkrise spielt [Ahuja *et al.*, 1989]. Zwar scheint dies während der Progression nur für eine Untergruppe von 30% der Patienten zu gelten, aber die Schlüssigkeit konnte in Mausexperimenten nachgewiesen werden. So konnte in Mäusen, denen Bcr-Abl positive und p53 negative Knochenmarkzellen gegeben wurden, ein aggressiverer Phänotyp ähnlich der Blastenkrise beobachtet werden [Skorski *et al.*, 1996]. Dennoch ist aus der Tatsache, dass es nur für eine Untergruppe im Menschen

zutritt, zu vermuten, dass noch andere Sekundärmutationen eine Rolle spielen. Tatsächlich sind beim Übergang zur Blastenkrise auch eine Reihe von zusätzlichen Chromosomenabberationen gefunden worden, wie der Trisomie 8 oder 19 und ein Isochromosom 17. Genauso könnte die zunehmende Expression von Bcr-Abl, teils durch die Duplikation des Philadelphia-Chromosoms hervorgerufen, einen relevanten Faktor darstellen [Gaiger *et al.*, 1995].

Tatsächlich ist noch kein konkreter Auslöser für die plötzlicher Akzeleration der Erkrankung gefunden worden. Es summieren sich kleine Hinweise, wie die homozygote Deletion des Tumorsuppressors p16, oder eine beschriebene Hypermethylierung der DNA. Allerdings können die Ergebnisse noch nicht in Einklang gebracht werden, um ein schlüssiges Gesamtbild abzugeben.

3.7 Relevante Signalwege in der Hämatopoese und in der CML

Im Folgenden sollen ausgewählte Signalkaskaden betrachtet werden, die zur Entstehung oder zum Fortbestehen der CML beitragen. Für die Meisten davon ist ein Zusammenhang mit Bcr-Abl aufgedeckt worden und ebenso sind sie an der Signalweiterleitung von Rezeptoren der Zellmembran in das Innere der Zelle mitbeteiligt. Hierauf soll im Kapitel 3.8. näher eingegangen werden.

3.7.1 Der Ras-Signalweg

Das kleine GTP-bindende Protein p21-Ras spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation und Apoptose [Barbacid, 1987]. Es steht über die SH2/SH3 Adapter-Proteine Grb2, Shc und Sos direkt mit verschiedenen Zytokin- und Wachstumsfaktorrezeptoren in Verbindung und wird auf diesem Weg über extrazelluläre Stimuli aktiviert [Medema and Bos, 1993; Satoh *et al.*, 1992; Schlessinger, 1993]. Der Ras-Signalweg ist heute einer der am besten untersuchten und spielt in vielen Tumorerkrankungen so wie auch der CML eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Ras von Bcr-Abl über die Moleküle Grb2 [Pendergast *et al.*, 1993], Crkl [Senechal *et al.*, 1996] und Shc [Matsuguchi *et al.*, 1994] aktiviert werden kann. Während die genannten Moleküle auch direkt an Bcr-Abl binden, dient das Molekül Sos wiederum als Mediator zwischen Grb2 und Ras [Cortez *et al.*, 1996; Gishizky *et al.*, 1995; Goga *et al.*, 1995b; Sawyers *et al.*, 1995]. In Bcr-Abl positiven Zellen kann auch eine konstitutive Ras-Aktivierung beobachtet werden [Puil *et al.*, 1994]. Die Relevanz des Ras-Signalweges wurde durch dominant negative Formen von Ras untersucht

[Cortez *et al.*, 1996; Sawyers *et al.*, 1995]. Dabei wurde eine Unterbrechung der Transformation und der Anti-Apoptose gezeigt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch Expression mutierter Formen von Grb2 oder Raf beobachtet [Gishizky *et al.*, 1995; Skorski *et al.*, 1995b]. Die These eines direkten Zusammenhangs dieser Ergebnisse mit dem Bcr-Abl Protein wurde durch Mutation bestimmter Aminosäurepositionen in Bcr-Abl weiter untermauert. So konnte für die Positionen Y177, R1053 oder Y1294 in p210^{bcr-abl} gezeigt werden, dass eine völlige oder teilweise Unterbindung der Transformation auftrat. Dieser Effekt hing direkt mit einer Unfähigkeit der Ras-Aktivierung zusammen [Cortez *et al.*, 1995; Goga *et al.*, 1995b]. Wie schon angedeutet kommt zu den Ras-Effekten neben der Bedeutung für die Transformation, noch die Relevanz für die Anti-Apoptose hinzu. So konnte in weiteren Versuchen mit dominant negativen Ras-Mutanten [Cortez *et al.*, 1996] in K562 Zellen die Induzierung von Apoptose nachgewiesen werden [Sakai *et al.*, 1994]. Ein möglicher Mechanismus hierfür ist eine Induktion der Bcl-2 Expression, die abhängig von Ras in BaF3 Zellen gezeigt werden konnte [Sanchez-Garcia and Grutz, 1995; Sanchez-Garcia and Martin-Zanca, 1997]. Bcl-2 gehört zu einer Familie von Proteinen, die in direktem Zusammenhang mit pro- und anti-apoptotischen Signalen an der Mitochondrienmembran stehen. Die Tatsache, dass der Ras-Signalweg durch mehrere Ausgangspunkte aktiviert werden kann, deutet schon auf die bestehende Redundanz hin. Einige der Ras aktivierenden Signalwege stehen auch untereinander in Verbindung und aktivieren sich gegenseitig. Es liegt die Vermutung nahe, dass Ras in der Pathogenese der CML eine große Bedeutung zukommt, jedoch bleibt offen ob es einen exakten Mechanismus gibt, der Ras in der Philadelphia Chromosom positiven CML aktiviert. Hinzu kommt, dass die Wege weiter downstream von Ras zwar gut Verstanden sind, jedoch auch hier gegenseitige Aktivierungen und unterschiedlich gewichtete Ergebnisse in den Untersuchungen für Uneinigkeit sorgen.

Raf ist eine Serin/Threonin-Kinase und kann mit aktiviertem, das bedeutet Tyrosin-phosphoryliertem Ras einen Komplex bilden, aus dem Raf seinerseits aktiviert hervor geht [Jelinek *et al.*, 1996; Marais *et al.*, 1995; Vojtek *et al.*, 1993; Warne *et al.*, 1993]. Auf diese Weise wird ein ursprünglich von einem membranständigen Rezeptor stammendes Signal weiter in Richtung Zellkern übermittelt. Raf wird der Gruppe der MAPKKK zugerechnet und schlägt hiermit die Brücke zum MAP-Kinase-Signalweg [Daum *et al.*, 1994]. Als wichtigste Signalwege sind hier der MAP-Kinase-Weg und der PI3-Kinase-Weg zu nennen.

3.7.2 Der MAP-Kinase-Signalweg

Der MAP-Kinase-Signalweg schließt sich an die Aktivierung von Ras an. Dieser Signalmechanismus ist in eukaryontischen Zellen stark konserviert. Ziel ist es, ein Signal weiter zum Zellkern zu übermitteln und hier Transkriptionsfaktoren oder andere Effektormoleküle zu aktivieren. Auf dem Weg dahin werden drei Proteinkinasen in Serie geschaltet, eine MAP-Kinase (MAPK), eine MAPKK und eine MAPKKK. Als letztes Glied in dieser Kette transloziert die aktivierte MAPK in den Zellkern. Insgesamt sind, mit dem ERK-, dem SAPK/JNK- und dem p38-Signalweg, drei gut charakterisierte MAPK Wege bekannt [Marais *et al.*, 1995; Woodgett *et al.*, 1996]. In der CML haben sie jeweils keine fest definierte Rolle. Die ERK Aktivierung in Bcr-Abl positiven Zellen wird kontrovers diskutiert. Es konnte eine sofortige Aktivierung nach Beginn der Bcr-Abl Expression gezeigt werden [Cortez *et al.*, 1997], wogegen in einem anderen Modellsystem dies erst nach einer Akkumulation von sekundären Gendefekten aufgetreten ist [Kabarowski *et al.*, 1994]. Dagegen konnte für den SAPK/JNK-Weg, in Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen, recht eindeutig eine direkte Aktivierung nach Bcr-Abl Expression gezeigt werden. In dominant negativen Mutanten von c-Jun, eines durch SAPK/JNK aktivierten Transkriptionsfaktors, konnte die Relevanz dieses Signalwegs für das leukämische Zellwachstum nachgewiesen werden [Raitano *et al.*, 1995]. Zusätzlich führt eine Überexpression von JIP-1, eines inhibitorischen Proteins für JNK, zu demselben Ergebnis [Dickens *et al.*, 1997].

Zusammenfassend kann dem MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle in der Signalvermittlung vom Zytoplasma, über die Kernmembran hin zu Transkriptionsfaktoren des Zellzyklus und der Apoptose, zugesprochen werden.

3.7.3 Der PI3-Kinase-Signalweg

Der PI3-Kinase (PI3K) Signalweg ist, wie auch der Ras/MAPK-Weg, von großer Bedeutung für die Regulation von Proliferation, Apoptose und Organisation des Zytoskeletts [Carpenter and Cantley, 1996]. Die PI3K ist ein heterodimeres Protein das aus den zwei Untereinheiten p85 und p110 besteht. Die beiden Untereinheiten unterscheiden sich in der regulatorischen Funktion des p85 Proteins und in der katalytischen Funktion von p110. Als katalytische Komponente phosphoryliert p110 verschiedene Phosphatidylinositole und hat eine Bindedomäne für p85 und auch für Ras [Vanhaesebroeck *et al.*, 1996]. Physiologischer Weise wird p85 von einer großen Zahl an Signalmolekülen aktiviert. Dazu gehören Wachstumsfaktorrezeptoren [Hu *et al.*, 1992; McGlade *et al.*, 1992], Onkogene [Liu *et al.*,

1993] und unter anderem die Adaptorproteine Cbl und Grb2 [Meisner *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995]. Durch Kristallstrukturanalysen wurden einige Domänen in p85 entdeckt, die typische Bindemechanismen ausnutzen und es dem Molekül somit erlauben an diese Vielzahl von Proteinen zu binden. Dazu gehören sowohl eine SH2-Domäne, die es p85 ermöglicht an phosphorylierte Tyrosinreste zu binden, als auch diverse prolinreiche Motive, welche anderen SH3-Domänen enthaltenden Proteinen die Assoziation möglich machen [Pleiman *et al.*, 1994; Shoelson *et al.*, 1993]. Allerdings haben verschiedene Mutationen in Abl, die das Ziel hatten eine Assoziation mit p85 aufzuheben, kein solches Ergebnis hervorgebracht [Jain *et al.*, 1996; Skorski *et al.*, 1997; Songyang *et al.*, 1993]. Dies legt den Verdacht nahe, dass auch hier redundante Mechanismen vorliegen.

Der Zusammenhang zwischen Bcr-Abl in der CML und dem PI3K-Signalweg kann heute als gesichert betrachtet werden. Eine erhöhte Anzahl von PI3K-Produkten wurden in Bcr-Abl exprimierenden Fibroblasten, als auch in hämatopoetischen Zellen gefunden [Skorski *et al.*, 1995a; Varticovski *et al.*, 1991]. Zudem ist nachgewiesen worden, dass p85 mit Bcr-Abl direkt komplexieren und auf diese Weise phosphoryliert werden kann [Gotoh *et al.*, 1994; Varticovski *et al.*, 1991]. Zusammen mit SHP2 und Grb2 formt p85 einen großen Komplex mit Bcr-Abl [Tauchi *et al.*, 1994]. Allerdings ist hierbei nicht geklärt ob auf diese Weise unterschiedliche PI3K Signale weitergeleitet werden. Dies gilt insbesondere durch den Umstand, dass drei zusätzliche Moleküle, Shc, Cbl und Crkl in Anwesenheit von Bcr-Abl direkt mit PI3K komplexieren [Harrison-Findik *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 1997; Sattler *et al.*, 1996]. Ungeachtet dieser Komplexität konnten die Serin/Threonin-Kinase Akt und die p70 S6 Kinase als wichtigste downstream Signale identifiziert werden [Vanhaesebroeck *et al.*, 1996].

3.7.4 Crkl

Wie schon in den vorherigen Abschnitten über Signalwege angedeutet wurde, gibt es ein komplexes Netzwerk an Interaktionen zwischen den einzelnen Signalmolekülen. Einige unterliegen einer hierarchischen Ordnung, andere wiederum vermitteln zwischen großen Kaskaden. Unter diesen vermittelnden Molekülen finden sich häufig kleine, mit mehreren Bindungseigenschaften versehene Adaptorproteine. Eines davon ist Crkl. Es ist ein 39 kDa großes Protein mit SH2- und SH3-Domänen. Für die Pathogenese der CML ist die Assoziation von Crkl mit Bcr-Abl von Bedeutung. Es wurde die Bildung eines stabilen Komplexes der prolinreichen Region im C-terminalen Teil von Abl und der SH3-Domäne von Crkl nachgewiesen [ten Hoeve *et al.*, 1994b]. Ferner ist die Bindung der p85 Einheit der PI3K und Crkl wichtig um Bcr-Abl mit weiteren downstream Signalwegen zu Verknüpfen [Nichols

et al., 1994; Oda *et al.*, 1994; ten Hoeve *et al.*, 1994a]. Insbesondere für die Aktivierung von Zellproliferation und Transformation scheint die Fähigkeit verschiedene Multiproteinkomplexe auszubilden von grundlegender Bedeutung zu sein. In Ph-positiven Zellen wurden Komplexe zwischen Crkl und Sos [ten Hoeve *et al.*, 1994b], Paxillin [Salgia *et al.*, 1995b], Cas [Salgia *et al.*, 1996a] und Cbl [de Jong *et al.*, 1995] gefunden, um nur einige Beispielhaft aufzuführen. Tatsächlich scheint Crkl für die Bcr-Abl vermittelte Signaltransduktion eine wesentliche Rolle zu spielen. So wird in allen in vitro und in vivo Modellsystemen Crkl in phosphoryliertem Zustand vorgefunden, im Gegensatz zu untransformierten Zellen. [Nichols *et al.*, 1994; Odai *et al.*, 1995; ten Hoeve *et al.*, 1994a].

Die Komplexbildung zwischen Crkl und den genannten Bindungspartnern ist in untransformierten Zellen nicht vorhanden. Beispielsweise wird die Bindung zwischen Crkl und Cbl hier nicht beobachtet. Cbl scheint daher eine Verbindung zwischen Bcr-Abl und dem PI3K-Weg herzustellen wenn die Zellen entartet sind [Sattler *et al.*, 1996]. Cbl interagiert mit Bcr-Abl selbst über die Abl SH2-Domäne und mit der p85 Untereinheit von PI3K [Bhat *et al.*, 1997; Meisner *et al.*, 1995]. Vermutlich wird Cbl hierbei durch Bcr-Abl an Tyrosinresten phosphoryliert und kann anschließend den Komplex mit Crkl ausbilden. Interessanter Weise ist Cbl an der Signaltransduktion von einer Zahl von Wachstumsfaktorrezeptoren der Zelloberfläche beteiligt. Dazu gehören IL-2-R, IL-3-R, GM-CSF-R, Epo-R und auch c-Kit [Barber *et al.*, 1997; Gesbert *et al.*, 1998; Odai *et al.*, 1995; Wisniewski *et al.*, 1996]. Ebenso scheint Cbl auch eine Brücke zum Ras-Signalweg zu schlagen. Die Interaktion kommt über Grb2 zustande, welches Bindungspartner von Cbl und Ras ist [Gesbert *et al.*, 1998; Meisner *et al.*, 1995].

3.7.5 Src

Die Src-Kinasen sind eine Familie von neun Proteinen. Sie sind an vielen Regulationsprozessen der Zellfunktionen beteiligt. Adhäsion, Zellbeweglichkeit, Zellzyklus und Differenzierung sind nur einige Beispiele. Für die Pathogenese der CML sind zwei Familienmitglieder wesentlich, p53/56^{lyn} (Lyn) und p59^{hck} (Hck). Experimente mit Bcr-Abl transformierten hämatopoetischen Zellen haben ein gesteigertes Aktivitätsniveau von Lyn und Hck gezeigt. Zudem bilden Lyn und Hck einen Komplex mit Bcr-Abl in diesen Modellsystemen [Danhauser-Riedl *et al.*, 1996]. Weitergehende Untersuchungen dieser Interaktion brachten das Ergebnis, dass die Affinität von Bcr-Abl für Hck durch die Autophosphorylierung, was dem Aktivitätszustand entspricht, negativ reguliert wird. Die Assoziation selbst wird durch mehrere unterschiedliche Domänen herbeigeführt, sowohl in

Hck als auch in Bcr-Abl [Stanglmaier *et al.*, 2003]. Hck bindet nicht nur Bcr-Abl. Zusätzlich zu seiner eigenen Kinaseaktivität, assoziiert es auch mit dem Protein Grb2, welches wiederum in die Aktivierung des Ras-Signalweges involviert ist [Warmuth *et al.*, 1997]. Aber auch Rezeptoren sind an der Signalweiterleitung über Src-Kinasen beteiligt. Für Lyn wurde gezeigt, dass es in SCF abhängigen Zelllinien besonders hoch exprimiert wird [Linnekin *et al.*, 1997]. In der Arbeitsgruppe um Diana Linnekin wurden einige Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht. Es konnte die Assoziation von Lyn mit c-Kit nachgewiesen werden, ebenso wie sich Hinweise auf die Beeinflussung der Proliferation ergaben. Die Spezifität dieser Ergebnisse konnte besonders gut durch die Inhibierung der Src-Kinasen mit dem spezifischen Inhibitor PP1 untersucht werden. Auch Fyn als weiteres Src Familienmitglied konnten an c-Kit binden. Src-Kinasen können auch an den IL-3 Rezeptor Binden. Die beta-Kette des IL-3R ist der Bindungspartner. Zudem konnte eine Aktivierung von Fyn, Hck und Lyn nach Stimulierung mit IL-3 beobachtet werden [Burton *et al.*, 1997]. Des Weiteren konnten auch eine Aktivierung der STAT-Proteine nach Transformation von hämatopoetischen Zellen mit v-src gezeigt werden [Yu *et al.*, 1995]. Da komplexe Mechanismen der Signalregulation nie einer scharfen Trennung unterliegen, können die beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten eine Rolle bei der CML spielen. Einige Interessante Ansätze werden von Reddy *et al.* zusammengefasst [Reddy *et al.*, 2000].

3.7.6 JAK/STAT

Der JAK/STAT-Signalweg wird physiologischer Weise durch viele verschiedene Zytokine beziehungsweise deren Rezeptoren aktiviert. Die STAT-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription) sind eine homogene Gruppe von Proteinen, die an unterschiedliche Rezeptoren binden und somit auch unterschiedliche Signale weiterleiten. Gemeinsam ist ihnen die Fähigkeit zu eigen, im Zellkern Transkription zu initiieren und selbst als Homo- oder Heterodimere spezifische DNA-Sequenzen zu binden [Taniguchi, 1995]. Dieser Signalweg beeindruckt durch schnelle Umsetzung eines Signals von der Zelloberfläche zum Zellkern hin. Denn in der Regel sind keine weiteren Signalproteine dazwischen geschaltet. STAT-Proteine besitzen allerdings keine eigene Kinase und auch die Zytokinrezeptoren, welche nicht zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören, benötigen daher zusätzliche Kinasen um untergeordnete Signalproteine zu phosphorylieren. Im Falle der STAT-Familie sind die JAK-Proteine, verschiedene Subtypen der Janus-Kinase, die relevanten Partner, um einen großen Komplex zwischen JAK/STAT und dem intrazellulären Teil des Rezeptors auszubilden. Die Rolle des JAK/STAT-Signalweges in der CML ist noch

nicht vollständig verstanden. Da Bcr-Abl konstitutiv Janus-Kinasen aktiviert und die Phosphorylierung von STAT1 und STAT5 bewirkt, erscheint es wahrscheinlich, dass auf diesem Weg das Wachstumsfaktor unabhängige Zellwachstum unterhalten wird [Carlesso *et al.*, 1996; Ilaria and Van Etten, 1996; Shuai *et al.*, 1996]. Auf weitere Einzelheiten zu Aktivierung und Signalweiterleitung wird im Kapitel 3.8.1 im spezifischen Zusammenhang mit dem Interleukin-3 Rezeptor Stellung genommen.

3.7.7 Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS)

Im vorhergehenden Kapitel wurde über den JAK/STAT-Pathway berichtet. So wie die übrigen beschriebenen Signalwege dient auch dieser der Aktivierung von Proliferation oder Differenzierung. Im Zusammenhang mit der Erforschung maligner Erkrankungen, bei denen hauptsächlich unkontrollierte, überschießende Proliferation im Zentrum des Interesses steht, werden negativ regulierende Mechanismen ebenfalls als wesentlich für eine geordnete Aktivierung angesehen. So bedarf gerade der schnell reagierende JAK/STAT-Signalweg einer ebenso schnellen Gegenregulation. Von Naka *et al.* wurde 1997 ein wesentlicher Gegenspieler der STAT-Proteine entdeckt [Naka *et al.*, 1997]. Als STAT-induced STAT Inhibitor (SSI) wurde das neu entdeckte Protein getauft. Neben dem Namen SOCS kam noch eine Vielzahl von Synonymen hinzu, welche in Tabelle 3, zur besseren Übersicht aufgeführt sind.

Aktivierung durch	SOCS Synonyme			Bindet an
STAT5 (IL-3R,Bcr-Abl)	CIS		CIS 1	
STAT3 (IL-3R)	SOCS1	SS1	JAB	c-Kit JAK-1/2/3, TYK2, Tec, FGF
	SOCS2	SS2	CIS 2	
STAT3 (IL-3R)	SOCS3	SS3	CIS 3	JAK-2, Pyk2, FGF, Lck
	SOCS4			
	SOCS5		CIS 6	
	SOCS6		CIS 4	
	SOCS7	NAP4	CIS 5	

Tabelle 3: Überblick der SOCS Synonyme und deren Einbindung in Regulationsmechanismen (relevante Auswahl).

IL-3R – Interleukin-3-Rezeptor, STAT – Signal Transducers And Activators of Transcription, SSI – STAT induced STAT Inhibitor, CIS – Cytokine Inducible SH2-containing protein, c-Kit – Stammzellfaktorrezeptor, FGF – Fibroblast Growth Factor Rezeptor, NAP4 – seltenes Synonym für SOCS7, Pyk2 und Lck und TYK2 und Tec sind weitere intrazelluläre Proteine mit Kinase Eigenschaft, Bcr-Abl – Protein der Philadelphia-Translokation.

Die wesentliche Funktion der SOCS-Proteine besteht darin, nach erfolgter Aktivierung durch STAT, die STAT-Binderegion des involvierten Zytokinrezeptors oder der JAK zu besetzen und damit zu inaktivieren. Die Signalweiterleitung des aktivierten Rezeptors wird für den JAK/STAT-Pathway zum Erliegen gebracht [Naka *et al.*, 1999]. Es sind insgesamt acht SOCS-Proteine bekannt, die sich alle in ihrem strukturellen Aufbau ähneln.

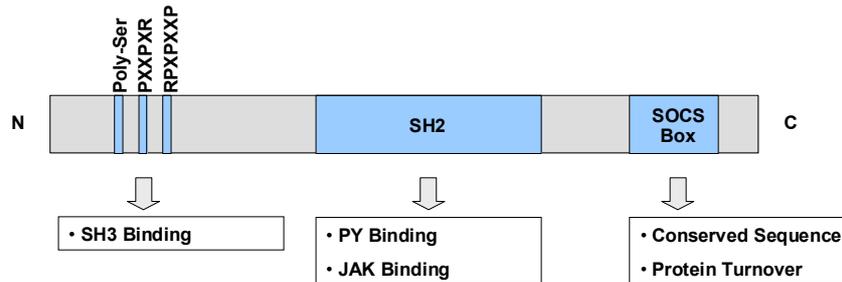


Abbildung 2: Domänen der SOCS-Proteine

Als wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Familienmitgliedern ist der N-terminale Teil des Proteins zu nennen. Neben Poly-Serinen kommen in diesem Bereich auch PXXP-Motive für eine mögliche Bindung an SH3-Domänen zu liegen. Dieser N-terminale Anteil divergiert stark in seiner Größe, wogegen die folgenden Domänen weitgehend Größenkonstant sind. Dennoch können die N-terminalen Domänen zwischen SOCS1 und SOCS3 durch gezielte Mutagenese ausgetauscht werden, ohne dass eine Einschränkung in der Funktionalität aufgefallen wäre [Nicholson *et al.*, 1999]. Der Übergangsbereich zu der folgenden SH2-Domäne wurde als wichtig für die Effektivität der Signalinhibierung definiert. Die SH2-Domäne selbst ist ebenfalls essentiell für die Aktivität von SOCS (bisher für SOCS1/ 3 gezeigt) [Hilton *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 1995]. Für die SH2-Domäne von SOCS1 wurde gezeigt, dass diese allein als Trunktionsmutante in der Lage ist die Tyrosinkinase-Region von Janus-Kinasen zu binden [Yoshimura *et al.*, 1995]. Ein Zusammenspiel zwischen dem N-terminalen Anteil und der SH2-Domäne scheint für Funktionalität von SOCS wesentlich zu sein, anders als bei dem Carboxyterminus von SOCS. Dieser beinhaltet ein, in der SOCS-Proteinfamilie und auch anderen Signalproteinen, konserviertes Motiv, die SOCS-Box. Dieser Bereich ist nicht für die Funktion wesentlich. Da strukturelle Homologie mit Elongin A besteht und dieses in Beziehung zur proteosomalen Degradation steht, wird postuliert, dass die SOCS-Box in die Expressionskontrolle von SOCS involviert ist. Allerdings fehlen für diese These noch ausreichende Daten um sie zu belegen.

Um die generelle Funktion von SOCS besser einordnen zu können wurden von Metcalf et al. dominant negative Mäuse für SOCS1 hergestellt [Metcalf *et al.*, 1999]. Die Zahl an Neugeborenen war im Vergleich zu derer von Wildtyp-Mäusen gleich. Die Entwicklung war bis etwa Tag 9 nach Geburt unauffällig. Allerdings kam es dann zu einem deutlichen Abfall des Körpergewichtes um etwa 40% im Vergleich. Die Tiere starben am Tag 21-22. Die pathologische Untersuchung zeigte eine deutliche fettige Degeneration der Leber mit Nekrosenbildung, die für das frühe Versterben der Tiere verantwortlich gemacht werden kann. Zudem kam es zu einer Organinfiltration durch Makrophagen und Granulozyten in Lunge, Pankreas, Herz und der Haut. Ferner wurde eine ausgeprägte Depletion von B- und T-Lymphozyten beobachtet. Für die myeloische Zellreihe ist noch nicht abschließend geklärt, inwiefern die granulozytäre Infiltration auch mit der Granulozytenzahl im peripheren Blut in Zusammenhang zu bringen ist [Starr *et al.*, 1998]. Möglicherweise sind die beobachteten morphologischen Korrelate in den Mäusen Ausdruck von einer Überstimulation durch exogene Reize. Gerade dies könnte sich auch durch die Beteiligung des JAK/STAT-Pathways, und damit auch SOCS, bei der Induktion von Apoptose durch Tumor Nekrose Factor α (TNF- α) miterklären lassen [Morita *et al.*, 2000]. Weitere Zellkulturexperimente haben eine vollständige Unterbindung der STAT3 Signaltransduktion am IL-11 Rezeptor nachgewiesen, nachdem SOCS3 überexprimiert worden ist. Dies konnte auch als Kreuzmechanismus zur Signalmodulation zwischen IL-3R und IL-11R nachgewiesen werden. Magrangeas et al. zeigten einen Abbruch der IL-11 Signalweiterleitung nachdem mit IL-3 stimuliert wurde und SOCS3 exprimiert wurde [Magrangeas *et al.*, 2001]. Des Weiteren konnte durch die Gruppe um Graeve et al. gezeigt werden, dass SOCS3 auch durch nicht membranständige Proteine induziert werden kann [Bode *et al.*, 1999; Terstegen *et al.*, 2000]. Es wurde berichtet, dass SOCS3 durch den MAP-Kinase-Signalweg induziert werden konnte und es dadurch zu einer Negativregulation der Signaltransduktion von IL-6 und seinem Rezeptor kam. Die Aktivierung von IL-3R bewirkt zudem eine Induktion von CIS, einem weiteren Protein der SOCS-Familie. Ein Zusammenhang von CIS und der Gegenregulation von STAT5 ist bereits 1995 beschrieben worden [Yoshimura *et al.*, 1995]. Weitere Arbeiten zeigten auch eine STAT5 Regulierung durch SOCS3 [Cohney *et al.*, 1999]. Da STAT5 in der Pathogenese der CML durch die Bcr-Abl getriggerte Aktivierung eine besondere Rolle zukommt, wird hierauf im Folgenden noch detaillierter eingegangen werden.

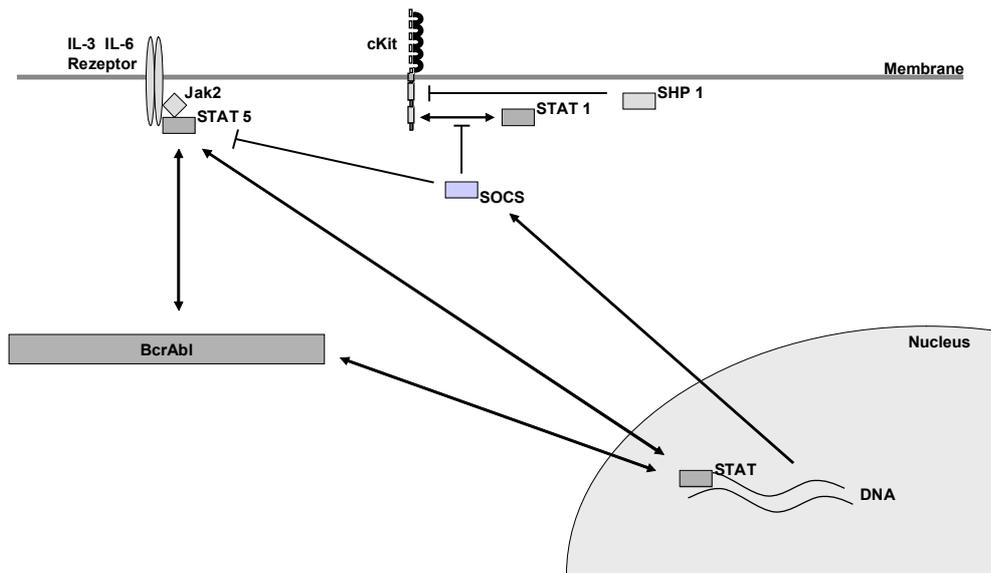


Abbildung 3: Relevante Signalwege - Übersicht

3.8 Steuerung der Hämatopoese durch Wachstumsfaktoren

Die bisher beschriebenen Signalwege zeigen Auszüge aus einem komplexen Netzwerk der Signalverarbeitung innerhalb einer Zelle auf. Als wesentliche Zielpunkte der Zellregulation sind hier die Proliferation, Apoptose und Differenzierung zu nennen. Wichtig ist hierbei das Zusammenspiel der einzelnen Zelle im Gesamtorganismus um spezifische Funktionen zu erfüllen. So unterliegen gerade Gewebe mit hohem Zellumsatz, wie es auch beim blutbildenden System der Fall ist, einer äußerst feinen Regulierung durch die Umgebung der Zelle. Im Knochenmark befindliche Stromazellen, welche für möglichst optimale Rahmenbedingungen der blutbildenden Zellen sorgen, tauschen mit diesen ständig Signale in Form von Wachstumsfaktoren oder Modulatoren in Form von Zytokinen aus. Für die Hämatopoese und insbesondere im Zusammenhang zur CML sind die Beeinflussungen des Interleukin 3 und des Stammzellfaktors zu nennen.

3.8.1 Interleukin 3 und Interleukin 3-Rezeptor in der CML

Interleukin 3 (IL-3) ist ein 20-26 kDa schweres Produkt von CD4⁺ T-Zellen, Knochenmarkstroma und auch den B-Zellen selbst. Es wird auch multi-lineage-colony stimulating factor genannt, also ein Wachstumsfaktor für verschiedene hämatopoetische Zelllinien. Dabei wirkt es hier hauptsächlich als proliferativer Reiz auf unreife

Vorläuferzellen im Knochenmark [Ihle *et al.*, 1983]. Im murinen Zellsystem wird IL-3 benutzt um Proliferation von Stammzellen, unreifen myeloischen Zellen, als auch T- und Prä-B-Lymphozyten zu induzieren.

Der IL-3 Rezeptor (IL-3R) setzt sich aus einer α und einer β Untereinheit zusammen. Die α -Kette wiegt etwa 60-70 kDa, die β -Kette 130-140 kDa [Miyajima *et al.*, 1992]. Der IL-3R gehört damit in die Familie der gp140 Rezeptoren, welche nach der Beschaffenheit der β -Kette zugeordnet werden. Ebenfalls zu dieser Familie gehören der IL-5 und der GM-CSF Rezeptor, welche auch zusammen auf dem Chromosom 5 in der Region 5q als Gen kodiert sind [Blalock *et al.*, 1999]. Die drei genannten Rezeptoren unterscheiden sich in der Eigenschaft der α -Kette unterschiedliche Liganden zu binden. Dagegen haben sie die für Zytokinrezeptoren typischen extrazellulären Motive gemeinsam, welche Cystein- und Tryptophan-Reste enthalten. Dieser konservierte Bereich ist etwa 210 Aminosäuren lang und dient der Rezeptor-Dimerisierung. Weiter C-Terminal gelegen findet sich ein ebenfalls konserviertes WSXWS Motiv, das der Liganden-Bindedomäne zugeordnet werden konnte [Barry *et al.*, 1997; Miyajima *et al.*, 1992]. Die der Rezeptoraktivierung folgende Signaltransduktion in das Zytosol der Zelle erfolgt über die gemeinsame β -Kette gp140. Diese gemeinsame β -Kette wird auch β_c -Kette (common) genannt, da sie in anderen Rezeptoren ebenfalls in der exakt gleichen Struktur vorkommt. Einzig für den IL-3R gibt es ein zusätzliche β^{IL-3} -Kette, die nur im IL-3R vorkommt [Nicola *et al.*, 1996]. Experimente in Knockout Mäusen für die β_c -Kette zeigten ein normales Ansprechen auf IL-3 und normale Zahlen an Stammzellen, so dass die Funktion der IL-3 Signaltransduktion scheinbar vollwertig durch die β^{IL-3} -Kette ersetzt werden kann. Allerdings wurde eine verminderte Zahl an Eosinophilen beobachtet, sowie ein herabgesetztes Ansprechen auf GM-CSF und IL-15 [Nishinakamura *et al.*, 1995; Robb *et al.*, 1995]. Im Falle von Double-Knockouts für IL-3 und die β_c -Kette, kam es zu einem Phänotyp, wie bei alleinigen β_c -Ketten Knockouts. Die Funktion von IL-3 kann möglicherweise auch durch andere Wachstumsfaktoren kompensiert werden. Die Aktivierung des IL-3R geschieht durch die Bindung an den Liganden IL-3. Bevor dies geschieht sind die zwei Ketten des Rezeptors nicht aneinander gebunden. Erst durch den Liganden kommt es zu Formation eines heterodimeren Komplexes der α - und der β -Kette [Orban *et al.*, 1999]. Anders als bei Wachstumsfaktor-Rezeptoren, besitzen die Interleukin-Rezeptoren keine eigene Tyrosinkinaseaktivität, obwohl auch hier die Tyrosinphosphorylierung als wesentliches Element der Signaltransduktion nachgewiesen wurde. Der aktivierte IL-3R beginnt seine zytoplasmatische Signalweiterleitung durch Rekrutierung der Kinase JAK2 und Serin/Tyrosin Phosphorylierung der β_c -Kette [Quelle *et*

al., 1994; Stomski *et al.*, 1999]. Nach erfolgter Rezeptoraktivierung werden verschiedene Signalwege angestoßen, wovon einige im Folgenden erläutert werden.

3.8.2 Der Stammzellfaktor und die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit

Die Entdeckung des Stammzellfaktors (SCF) und c-Kit hat seinen Ausgang 1979 in den Untersuchung zu den auftretenden Mutationen des Steel (Sl) und White spotting (W) Locus in Mäusen, von Silvers *et al.*, genommen [Poole and Silvers, 1979]. Diese Mäuse unterschieden sich nicht nur durch einen weißen Fleck auf dem Bauch, der dem Genlocus auch zu seinem Namen verholfen hat, es wurden auch Defekte in der Keimzellentwicklung und der Hämatopoese beobachtet. Bis die ersten Beobachtungen des c-Kit Proteins gemacht wurden dauerte es allerdings noch bis 1985 mit Hilfe eines neuen Antikörpers YB5.B8, ein neues Oberflächenmolekül auf menschlichen Zellen einer akuten nicht lymphoblastischen Leukämie entdeckt wurde [Gadd and Ashman, 1985]. Dieses neu entdeckte, 145 kDa große Protein wurde zudem auf normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen, als auch auf Mastzellen entdeckt [Cambareri *et al.*, 1988]. Nach der Kartierung des c-kit Gens auf dem W Locus, konnte dies dem neuen Protein zugeordnet werden [Lerner *et al.*, 1991]. Zur gleichen Zeit konnte von Besmer *et al.* [Besmer *et al.*, 1986] das virale v-kit als Protoonkogen identifiziert werden, welches für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodierte [Yarden *et al.*, 1987]. Nach der erfolgreichen Identifizierung von c-Kit wurde die Suche nach dem natürlichen Liganden aufgenommen.

3.8.2.1 Der Stammzellfaktor

Etwa zeitgleich fanden drei verschiedene Arbeitsgruppen den Stammzellfaktor und so kam es auch zu den vielen Synonymen, wie Mast cell growth factor (MGF), Steel factor (SLF), Kit ligand oder eben dem heute gebräuchlichsten Stammzellfaktor (SCF) [Huang *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990].

Der humane SCF ist auf dem Chromosom 12q22-24 kodiert und hat eine Größe von ca. 50 kb, bestehend aus acht Exons [Huang *et al.*, 1990]. Durch alternatives Splicing im Exon 6 kommt es zu zwei verschiedenen Isoformen des SCF. Der wesentliche Unterschied der resultierenden 248 Aminosäuren und der 220 Aminosäuren langen Variante, ist das Fehlen einer proteolytischen Schnittstelle bei der kurzen Variante. Dadurch wird wiederum ein Abschneiden der Transmembrandomäne in diesem Bereich verhindert. Durch das Fehlen der Transmembrandomäne wird der SCF nicht mehr an der Zelloberfläche gebunden und kann als

freies Protein wirken. Seine Wirkung entfaltet es zusammen mit dem Rezeptor c-Kit in Keimzellen, Melanozyten und der Hämatopoese [Linnekin, 1999; Smith *et al.*, 2001]. Der SCF bindet an die extrazelluläre Domäne des c-Kit Rezeptors als Homodimer. Dies ist wesentlich, um auch eine Dimerisierung des Rezeptors zu bewirken und ihn zu aktivieren [Arakawa *et al.*, 1991]. Dieser These wird entgegengehalten, dass die größte Menge an SCF im Serum als Monomer vorliegt und es möglicherweise auch als Monomer c-Kit aktiviert. Dies könnte eine Konformationsänderung von c-Kit bewirken, wodurch die notwendige Dimerisierung stattfindet [Blechman *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1997]. Gebildet wird der SCF durch Knochenmark-Stromazellen [Aye *et al.*, 1992], Fibroblasten [Anderson *et al.*, 1990; Flanagan and Leder, 1990], Endothelzellen und einigen anderen Zelltypen.

Die Stimulierung von hämatopoetischen Stammzellen durch SCF bewirkt in Einklang mit verschiedenen anderen Wachstumsfaktorrezeptoren eine starke Proliferation, Anti-Apoptose, Regulation der Mastzellendifferenzierung und Modulation der Zelladhäsion [Ashman, 1999; Lyman and Jacobsen, 1998]. Der klinische Nutzen von SCF ist bisher nur in wenigen Einsatzgebieten überprüft worden. Vor allem die Beteiligung an der Mastzellfunktion lässt mögliche Histamin vermittelte Nebenwirkungen erwarten. Außerdem kann die Stimulierung von malignen Zellen erfolgen. Daher wurde SCF nur bei Erkrankungen mit CD117-negativen Zellen eingesetzt, sowie der Stammzellmobilisierung oder der aplastischen Anämie. Die Vorteile der SCF Applikation müssen bisher noch in kontrollierten klinischen Studien überprüft werden.

3.8.2.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit

Es sind insgesamt etwa 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen bekannt, welche sich in 20 Gruppen einteilen lassen. c-Kit gehört zu einer Familie nahe verwandter Proteine, zu denen auch die Rezeptoren für PDGFR- α , PDGFR- β , CSF-1R und Flk2/Flt3 [Blume-Jensen and Hunter, 2001; Yarden *et al.*, 1987] gehören. Die Gemeinsamkeit besteht in der Fähigkeit wachstumsregulierende Signale über die Zellmembran hinweg zu transduzieren, als auch der grobe strukturelle Aufbau, auf den im Folgenden eingegangen wird. Bestandteile sind eine extrazelluläre Bindedomäne für den stimulierenden Faktor, im Falle von c-Kit ist dies SCF, so wie ein einzelnes membranübergreifendes Segment, welches an den intrazellulären Anteil koppelt. c-Kit gehört somit zur Gruppe 3 der Rezeptor-Tyrosinkinasen der Einteilung nach Yarden und Ullrich [Yarden and Ullrich, 1988].

Es gibt mehrere Gebiete, bei denen c-Kit und dessen Mutationen eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören die Gamentogenese und Spermatogenese beim Seminom und Dysgerminom,

bei der funktionsloses c-Kit, so genannte "loss-of-function" Punktmutanten beschrieben wurden [Ashman, 1999; Besmer, 1991]. Bei der systemischen Mastozytose und beim gastrointestinalen Stromazelltumor (GIST) wurden aktivierende Veränderungen von c-Kit beschrieben, auch als "gain-of-function" Punktmutanten bezeichnet. Zusammenhänge sind auch für das kleinzellige Bronchialkarzinom [Krystal *et al.*, 1998] und Leukämien aufgezeigt worden. Etwa 4% aller kernhaltigen Zellen im menschlichen Knochenmark exprimieren c-Kit [Ashman *et al.*, 1991; Papayannopoulou *et al.*, 1991]. Insbesondere auf CD34 positiven Vorläuferzellen, welche auch benutzt werden um Hämatopoese in Langzeit-Zellkulturen zu initiieren, wird der Rezeptor häufig nachgewiesen. Dies ist eine der wichtigsten Eigenschaften, die dazu geführt haben die Wichtigkeit von c-Kit im Zusammenhang mit der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu erfassen. Pluripotente, c-Kit positive Stammzellen sind, im Gegensatz zu den meisten c-Kit negativen Stammzellen, dazu in der Lage Langzeit Kulturen *in vitro* und bei Knochenmarktransplantationen in Mäusen, die Ausreifung aller Hämatopoetischen Zelllinien zu initiieren [de Jong *et al.*, 1996; Osawa *et al.*, 1996; Wineman *et al.*, 1993]. Die Effekte von SCF und die Folgen der Aktivierung und Signalweiterleitung von c-Kit wurden bereits im Kapitel 3.8.2.1 diskutiert.

In der Nomenklatur der Cluster of Differentiation ist c-Kit als CD 117 katalogisiert. In diesem Zusammenhang wurde c-Kit 1985 als Oberflächenmarker durch den monoklonalen Antikörper YB5.B8, bei der Untersuchung von AML-Zellen (Akute Myeloische Leukämie) entdeckt, noch bevor man v-kit oder c-kit als Gen kannte [Gadd and Ashman, 1985]. Die höchsten Expressionsraten wurden bei den AML Subtypen M1 oder M2 gefunden, ebenso wie bei der CML in chronischer Phase als auch der Blastenkrise [Buhring *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 1996; Goselink *et al.*, 1992; Muroi *et al.*, 1995]. Hohe Expression von c-Kit waren in diesen Fällen häufig mit einer Koexpression von CD 34 verbunden. Man findet c-Kit nicht in lymphatischen Varianten der akuten Leukämien [Bene *et al.*, 1998; Kees and Ashman, 1995; Reuss-Borst *et al.*, 1994], wogegen in der normalen Lymphopoese in frühen Stadien der B- und T-Zell Reifung CD 117 exprimiert wird. Bei Zellen der Erythroleukämie, Megakaryozyten und auch auf Mastzellen wird c-Kit häufig auf der Oberfläche nachgewiesen [Andre *et al.*, 1989; Hjertson *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1996].

3.8.2.3 Die molekulare Struktur von c-Kit

Es hat eine Größe von 145 kDa, das entspricht 2928 bp DNA-Länge oder 976 Aminosäuren. Das Gen ist auf dem Chromosom 4 des Menschen und dem Chromosom 5 der Maus

lokalisiert [Yarden *et al.*, 1987]. Das c-kit Gen hat strukturelle Homologien zu v-kit, dem Onkogen des Hardy-Zuckerman IV feline sarcoma virus [Besmer *et al.*, 1986]. Es besteht eine hohe spezieübergreifende Homologie des Rezeptors, allerdings kann muriner SCF den humanen Rezeptor nicht aktivieren.

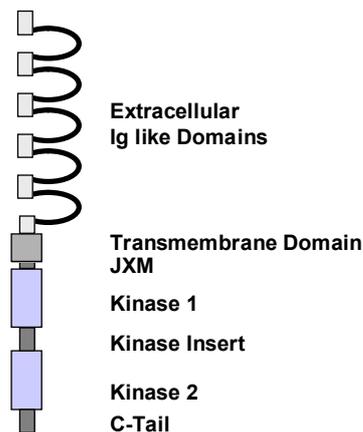


Abbildung 4: Die Domänen von c-Kit

Die extrazellulären Immunglobulin ähnlichen Domänen sind für die Bindung des SCF verantwortlich. Die Transmembrandomäne kommt direkt in der Zellmembran zu liegen. Die folgenden Domänen befinden sich intrazellulär und werden auch als Trunktationsmutanten für Bindungsstudien in dieser Arbeit verwendet. Für viele, an c-Kit bindende, Signalproteine ist die Juxtamembrandomäne (JXM), das Kinase Insert und der C-terminale Teil (C-Tail) von Bedeutung. Die eigentliche Übermittlung des Phosphats als Aktivierungsschritt wird durch die zwei Kinase Regionen bewerkstelligt.

c-Kit besteht aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Anteil. Der extrazelluläre Anteil beinhaltet fünf immunglobulin-ähnliche Domänen, wovon die äußeren Drei für die Bindung mit dem natürlichen Stimulus SCF verantwortlich sind [Papayannopoulou *et al.*, 1991]. Dieser Bereich ist unterschiedlich stark glykosyliert, was unter anderem ein ungleichmäßiges Molekulargewicht in Gelelektrophoresen bedingt. Typischerweise kann hier eine Doppelbande bei 145 und 125 kDa beobachtet werden. Experimentelle Einschränkungen durch diesen Umstand konnten nicht beobachtet werden. Die folgende vierte Domäne ist in die Rezeptordimerisierung involviert. Der Fünften ist derzeit keine bestimmte Funktion zu eigen. Der Rezeptor ist durch eine einzige, 23 Aminosäuren lange Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Sie verfügt über einen Anteil von hydrophoben Aminosäuren, welche in dieser Konstellation die Verankerung in der Membran bewirken. Diese Gegebenheit kann auch bei anderen in der Zellmembran verankerten Proteinen bzw.

Rezeptor-Tyrosinkinase beobachtet werden. Dabei scheint lediglich das Vorhandensein von hydrophoben Aminosäuren relevant zu sein, eine Homologie von bestimmten Sequenzen in dieser Region konnte nicht festgestellt werden [Yarden and Ullrich, 1988]. Wesentlich für die Signaltransduktion ist der intrazelluläre Anteil des Rezeptors, der auch die Tyrosinkinase enthält. In der Reihenfolge von der Zellmembran in Richtung Zellinnerem, folgt eine Juxtamembrandomäne, welche eine hohe Zahl an Signalmolekülen bindet. Lyn [Linnekin *et al.*, 1997], Lck [Krystal *et al.*, 1998], Fyn [Timokhina *et al.*, 1998], Grb2 [Thommes *et al.*, 1999], und Cbl bindet an Grb2 aber nicht an Kit selbst [Wisniewski *et al.*, 1996]. Es formt einen Komplex zwischen Crkl und der p85 Untereinheit von PI3K [Sattler *et al.*, 1997]. Als negativ Regulator bindet auch SHP1 an diese Stelle [Kozlowski *et al.*, 1998]. Es folgt nun die Tyrosinkinase, die von einem Kinaseinsert unterbrochen ist, also zweigeteilt ist. Der membranähere Teil wird im Folgenden auch als Kinase I bezeichnet. Die Kinase selbst weist eine hohe Homologie zur Abl-Kinase. Tatsächlich wirkt auch der, als selektiver Abl Tyrosinkinase Inhibitor konstruierte Wirkstoff STI-571, inhibierend auf die Kinase von c-Kit [Joensuu *et al.*, 2001]. Diese Gegebenheit wird beispielsweise bei der Therapie des Gastrointestinalen Stromazelltumors (GIST) ausgenutzt. Auf dieses Beispiel wird im Kapitel 2.6.1.2 näher eingegangen. Das Kinase Insert dient der weiteren spezifischen Bindung an Signalmoleküle. Zu nennen sind hier p85 Untereinheit der PI3-Kinase, die an Tyr 721 von c-Kit bindet [Lev *et al.*, 1992; Serve *et al.*, 1994]. In diesem Fall bewirkt die Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin an dieser Stelle nicht nur eine aufgehobene Phosphorylierung, sondern unterbindet auch die Bindung der zwei Proteine. In Mastzellen bewirkte dies eine verminderte Adhäsion und Actinproduktion nach SCF Stimulierung [Serve *et al.*, 1995; Vosseller *et al.*, 1997]. Nachdem zweiten Teil der Kinase folgt der C-terminale Anteil, der wiederum eine hohe Zahl an Bindungspartner vorweisen kann. Adaptorproteine Grb2+Grb7 binden an Tyr 936 [Thommes *et al.*, 1999] sind hier zu nennen.

Da in dieser Arbeit die Interaktion von c-Kit und Bcr-Abl, aber auch die Regulierung von c-Kit durch STAT-Proteine untersucht wird, sei auf die Assoziation mit STAT1 hingewiesen [Deberry *et al.*, 1997]. Das JAK/STAT-Signaling spielt bei c-Kit eine wichtige Rolle, um eine schnelle Signalweiterleitung zum Zellkern mit nachfolgender Proliferation zu bewirken. Insbesondere JAK2 ist hier mit involviert. Es bindet an c-Kit, obwohl c-Kit selbst eine Tyrosinkinase Aktivität besitzt [Weiler *et al.*, 1996]. Wie schon weiter oben beschrieben wurde ist STAT5A+STAT5b in die Bcr-Abl vermittelte Signaltransduktion mit eingeschaltet. STAT5 bindet ebenfalls an c-Kit [Brizzi *et al.*, 1999]. Ob diese Redundanz gemeinsame additive Effekte bewirkt oder nur Ausdruck ähnlicher Zielproteine ist, bleibt bisher ungeklärt.

Ebenso wie Mechanismen der Stimulation, so sind auch negativ regulierende Mechanismen beschrieben worden. Für c-Kit gelten Faktoren, wie sie für Rezeptoren schon häufig beschrieben worden sind. Eine durch SCF eingeleitete Dimerisierung des Rezeptors [Lemmon *et al.*, 1997] bewirkt einerseits eine Aktivierung, als auch eine nachfolgende Endozytose des Ligand-Rezeptor Komplexes in Klathrin ausgekleideten Vesikeln. Nach endosomaler Abspaltung des Liganden, kann der Rezeptor entweder zur Zelloberfläche zurücktransportiert werden, so genanntes Rezeptorrecycling, oder weiter zu einem Lysosom geleitet werden. Hier würde dann eine endgültige proteolytische Degradation erfolgen. Eine Reduzierung der Rezeptoranzahl an der Zelloberfläche wäre die Folge. Yee *et al.* [Yee *et al.*, 1994] konnten des Weiteren eine Abhängigkeit der Ubiquitin vermittelten Degradation von der Aktivität der Kinase von c-Kit feststellen. Bei c-Kit Mutanten mit inaktiver Kinase war dieser Abbaumechanismus nicht von Bedeutung, im Gegensatz zu der Proteolyse durch Protein Kinase C, welche von der Kinaseaktivität von c-Kit unabhängig fungiert. Insgesamt scheint, dass die Zelle vielfältige Möglichkeiten hat, um auf eine Aktivierung von c-Kit zu reagieren und an das Gesamtniveau der Zellaktivität anzupassen.

Vermutlich ist es nicht ausreichend, um eine konstitutive Aktivierung, wie beispielsweise beim GIST beschrieben, adäquat auszugleichen. So ist es vorstellbar, dass auch eine übermäßige endogene Aktivierung, also nicht durch den Liganden SCF vermittelt, sondern durch andere intrazelluläre Kinasen, nicht ausreichend negativreguliert werden kann. Zudem gibt es Untersuchungen, dass SHP1, eine Protein-Tyrosin-Phosphatase mit einer SH2-Domäne, mit an der negativen Regulierung beteiligt ist. An murinem c-Kit wurde bei phosphoryliertem Tyr 569 eine Assoziation mit SHP1 nachgewiesen [Kozlowski *et al.*, 1998; Yi and Ihle, 1993]. Die biologische Relevanz wurde in Mäusen mit funktionell inaktivem SHP1 nachgewiesen. Die Stammzellen dieser Tiere zeichneten sich durch Hyperproliferation aus [Shultz *et al.*, 1993]. Ebenso konnte bei BaF3 Zellen mit einer transfizierten Mutante Y569F, welche das für die Assoziation von SHP1 und c-Kit notwendige Tyrosin gegen Phenylalanin austauscht, eine Stimulierung mit SCF eine deutliche Steigerung der Proliferation hervorrufen [Kozlowski *et al.*, 1998]. Aus welchem Grund all diese Möglichkeiten, welche im biologischen Nachweis durchaus Effektivität beweisen, nicht ausreichen, um eine übermäßige Stimulierung zu unterbinden, ist nicht geklärt. Es ist denkbar, dass die Aktivierung von c-Kit vom übrigen Signalnetzwerk der Zelle als physiologische Aktivierung gewertet wird. Andererseits ist auch eine Aktivierung von Signalwegen weiter downstream von c-Kit in Zusammenspiel mit anderen Mechanismen der Stimulierung zu

bedenken. Also vermutlich mehrere kleine Ursachen, die zusammen eine große Wirkung erreichen.

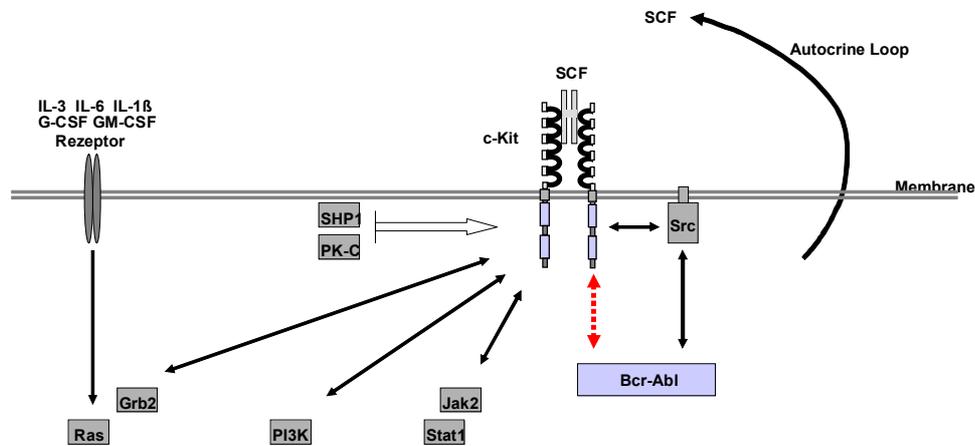


Abbildung 5: Relevante Signalwege für c-Kit

Auswahl an Signalwegen zur Proliferation und Apoptose. Über SHP1 und PK-C sind negativ regulierende Mechanismen skizziert.

3.9 Der selektive Tyrosinkinase Inhibitor STI571

Druker et al. konnte 1996 in Zusammenarbeit mit der Fa. Novartis eine neue chemische Substanz zur Behandlung der CML beschreiben [Druker *et al.*, 1996]. Imatinib (STI571 oder Glivec[®]) konnte ein sehr hohes Ansprechen bei der Therapie von CML Patienten zeigen (vgl. Kapitel 2.6.1.2). Die Wirkungsweise dieser Substanz beruht auf der selektiven Inhibition der ATP-Bindungsstelle der Kinaseregion von Bcr-Abl [Buchdunger *et al.*, 1996]. Damit wurde eine kausale Therapieform der CML möglich. Die Philadelphiachromosom positiven Zellen wurden nach Behandlung mit Imatinib apoptotisch [Druker *et al.*, 1996]. Wenig später wurde bekannt, dass die Hemmung des katalytischen Zentrums auch die Kinase von c-Kit betraf. Im Kapitel 3.10 kann der Vergleich der beiden Kinaseregionen eingesehen werden. Ursache hierfür ist die hohe Homologie der Kinaseregionen beider Proteine. Da die ATP-Bindungstasche in allen Kinase konserviert ist um die Phosphorylierung zu ermöglichen, ist die selektive Bindung nur durch Oberflächenmerkmale um die Bindungstasche herum möglich. Die Ähnlichkeit wurde für Bcr-Abl, c-Kit und PDGF nachgewiesen [Buchdunger *et al.*, 2000]. Obwohl die Kinaseregion von c-Kit durch das Kinaseinsert aufgespalten ist, kann Imatinib die Bindungstasche effektiv blockieren. Inwiefern sich die Inhibierung von c-Kit

durch Imatinib auf die beobachteten Therapieergebnisse der CML auswirkt ist Gegenstand der momentanen Forschung. Möglicherweise ist die Induktion der Remission auch auf die Kreuzreaktivität mit c-Kit zurückzuführen. Die Relevanz der Interaktion von c-Kit und Imatinib kann an der Therapieeffizienz der Behandlung des GIST Tumors beobachtet werden. Der Gastrointestinale Stromazelltumor (GIST) ist charakterisiert durch seine hohe Expressionsrate von CD 117, entsprechend der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit. Wie bereits erwähnt findet der, zunächst nur für die Therapie der CML zugelassene Wirkstoff STI-571, durch die Homologie von Bcr-Abl mit c-Kit in der Kinasedomäne, auch bei dieser Erkrankung Anwendung. GIST Tumoren sind Weichteiltumoren, die sich aus mesenchymalen Zellen des Verdauungstraktes ableiten. Es gibt eine maligne und eine benigne Form dieser Tumorentität. Insbesondere die maligne Form hat eine Expression von 95-100% des Rezeptors c-Kit [Lasota *et al.*, 1999]. Als eine der Ursachen für die maligne Entartung werden c-Kit Mutationen des extrazellulären und auch des intrazellulären Anteils diskutiert. Tatsächlich konnte für einige dieser Mutationen eine konstitutive Aktivierung durch dauerhafte Dimerisierung des Rezeptors nachgewiesen werden [Andersson *et al.*, 2002; Dagher *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 1999]. Ursächlich sind dafür aktivierende Mutationen am Exon 11, selten auch Exon 9 und 13. In einer Phase II Studie, welche das Ansprechen von GIST Tumoren auf STI-571 untersucht hat, konnte gezeigt werden, dass bei 38% aller in dieser Studie eingeschlossenen Patienten eine partielle Remission erreicht werden konnte. Dies ist ein signifikanter Fortschritt zu den vorher bestehenden Therapiemöglichkeiten, die sich meist auf chirurgische Resektion und einem schlechten Ansprechen auf klassische Chemotherapie-Substanzen beschränken musste. Interessanter Weise konnte auf diese Weise auch bei einer weiteren malignen Erkrankung, neben der CML, eine bedeutende Rolle für c-Kit bewiesen werden. Durch den Einsatz von STI571 (Glivec[®]) konnten bei dieser Erkrankung konstitutiv aktivierte Mutationen von c-Kit blockiert und die Krankheit effektiv zurückgedrängt werden [Dagher *et al.*, 2002].

3.10 Vergleiche der Kinasedomänen von c-Kit und Bcr-Abl

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits auf die Spezifität des Wirkstoffes STI571 eingegangen. Die Hemmung der Kinaseaktivität von Bcr-Abl ist wesentlich für das klinische Ansprechen der Patienten mit CML. Allerdings werden auch Effekte durch die Interaktion von STI571 mit c-Kit diskutiert. Die Wirksamkeit ist durch Studien beim GIST Tumor hinreichend belegt. Um die Ursache der Kreuzreaktivität von STI571 auf die Kinasedomänen von c-Kit und Bcr-Abl zu verdeutlichen wurde ein BLAST Search der beiden Kinasedomänen

gegeneinander durchgeführt (BLAST unter www.pubmed.com). Diese online verfügbare Funktion ermöglicht es Aminosäuresequenzen miteinander zu vergleichen und auch nach gemeinsamen Eigenschaften der Aminosäurepositionen aufzulisten. Verglichen wurde die Kinase von Bcr-Abl (obere Zeile) und die gesamte Kinase von c-Kit (untere Zeile), inklusive Kinase insert. Das Kinase insert fällt als fehlendes Element ab Position 101 in Bcr-Abl auf. Insgesamt wird die extrem hohe Homologie in der dargestellten Übersicht deutlich.

Identities = 97/306 (31%), Positives = 149/306 (47%), Gaps = 79/306 (25%)

```
Query: 24 SLTVAVKTLKEDT--MEVEEFLKEAAVMKEI-KHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYG 80
      ++TVAVK LK      E E + E V+ + H N+V LLG CT P +ITE+ YG
Sbjct: 617 AMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLVSYLGNHMNIIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYG 676
```

```
Query: 81 NLLDYLRE-----CNRQEVNAVLLY----- 101
      +LL++LR      C++QE +A LY
Sbjct: 677 DLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAAALYKNLLHSSKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKA 736
```

```
Query: 102 -----MATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAAR 126
      + Q++ M +L KN IHRDLAAR
Sbjct: 737 DKRRSVRIGSYIERDVTPTAIMEDDELALDLEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAAR 796
```

```
Query: 127 NCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDT-YTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAFG 185
      N L+ + K+ DFGL+R + D+ Y A+ P+KW APES+ ++ +SDVW++G
Sbjct: 797 NILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVKGNARLPVKWMAPEIFNCVYTFESDVWSYG 856
```

```
Query: 186 VLLWEIATYGMSPYPGIDL-SQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPDRPS 244
      +LWE+ + G SPYPG+ + S+ Y+++++ +RM PE P ++Y++M+ CW +P RP+
Sbjct: 857 IFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPT 916
```

```
Query: 245 FAEIHQ 250
      F +I Q
Sbjct: 917 FKQIVQ 922
```

Da STI571 bekannter weise die ATP-Binderegion bindet ist es verblüffend, dass überhaupt eine solche Spezifität gegenüber wenigen Kinasen erreicht werden konnte. Wesentlich für diese Tatsache ist die Ausnutzung von Oberflächenmerkmalen am Rand der ATP-Bindungstasche, welche wiederum nicht mehr im konservierten Bereich der ATP-Binderegion selbst liegt. Diese Strukturen liegen außerhalb des dargestellten Bereiches im Vergleich der Kinasen.

4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Promotionsarbeit soll zum Verständnis erkrankungsrelevanter Schritte in der Pathogenese der chronisch myeloischen Leukämie (CML) beitragen. Nach bisherigem Kenntnisstand können Unterschiede im Verhalten der Leukämiezellen der frühen Erkrankungsphasen im Vergleich mit späteren Zeitpunkten der CML beobachtet werden. Zellen früher Reifestufen, wie die CD 34 positiven Stammzellen, sind sensibler auf Chemotherapeutika und weisen eine insgesamt geordnetere Signaltransduktion auf. Obwohl auch in diesen Zellen Bcr-Abl nachweisbar ist, scheinen Mechanismen der Gegenregulation noch effektiv eine völlig ungehemmte Proliferation zu unterbinden. Erst zu späteren Zeitpunkten, wie der Blastenkrise, können auch weitere Mutationen im Erbgut der Leukämiezellen nachgewiesen werden. Dieses Voranschreiten wird durch die „Multiple-Hit“ Theorie gestützt, welche mehrerer Schädigungen im Erbgut und damit im Signaltransduktionsablauf konstatiert [Fialkow *et al.*, 1981]. Interessant ist hierbei ob Bcr-Abl positive Zellen auch zusätzlich durch Wachstumsfaktoren in ihrer Proliferation unterstützt werden. Man könnte sich auf diese Weise ein langsames Fortschreiten der Erkrankung in der chronischen Phase erklären, bei dem sich die Leukämiezellen langsam ausbreiten, aber durch einen nur gering gesteigerten Proliferationsindex noch keine gravierende Leukozytose bedingen. Möglicherweise wird die Expansion der malignen Zellen durch bestimmte Wachstumsfaktoren, wie dem IL-3 oder dem SCF begünstigt. Denkbar ist hier einerseits eine normal ablaufende Stimulierung der Proliferation durch SCF/c-Kit, oder aber eine zusätzliche Aktivierung eines Signalweges durch intrazelluläre Mechanismen, welche durch Bcr-Abl ausgelöst werden. Durch Hallek *et al.* [Hallek *et al.*, 1996] konnten bereits erste Hinweise auf eine Interaktion von Bcr-Abl mit c-Kit gewonnen werden. Es sollte nun weiter betrachtet werden, ob tatsächlich eine Kopräzipitation zwischen Bcr-Abl und c-Kit nachgewiesen werden kann, die für eine Stimulierung ohne SCF verantwortlich ist. Deshalb wird zunächst nach einem optimalen Expressionssystem gesucht, welches ausreichend Protein produziert, um später eine Kopräzipitation zwischen Bcr-Abl und c-Kit nachzuweisen. Nach erfolgter Herstellung von Bcr-Abl und c-Kit sollten, mit der Technik der Immunpräzipitation, Bindungsstudien durchgeführt werden, um eine Interaktion näher zu charakterisieren. Nachdem eine Kopräzipitation an sich nicht für einen stimulierenden Reiz verantwortlich ist, sondern eine Phosphorylierung stattfinden muss, soll mithilfe der Detektion von aktivierten Phosphotyrosinresten eine Einschätzung der Relevanz der vorherigen Ergebnisse erfolgen.

5 Material und Methoden

5.1 Zelllinien

COS-7-Zellen (COS = CV1 Origin SV40):

Eine von der Affennierenzelllinie CV1 abgeleitete Zelllinie, die durch Transformation der Zellen mit einer replikationsdefekten Mutante des Affenvirus SV40 entstanden ist. COS-7-Zellen sind fibroblastenartige Zellen, die adhärent und einschichtig wachsen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

32Dp210-Zellen:

Eine stabil mit dem bcr-abl Gen Transfizierte Zelllinie, die in hohen Mengen das Protein p210^{Bcr-Abl} exprimiert. Diese Zelllinie entspricht denselben Kulturbedingungen wie die Stammlinie 32D. Lediglich eine Unabhängigkeit von dem Wachstumsfaktor IL-3 ist vorhanden. Demzufolge wird dem Kulturmedium kein IL-3 in Form von WEHI-3B Überstand zugesetzt.

SF 9-Zellen:

Eine Insektenzelllinie aus dem Ovar einer weiblichen Spodoptera frugiperda. Diese Zelllinie kann zur Replikation von Baculovirus Expressionsvektoren verwendet werden. Sie eignet sich ebenso zur liposomalen, transienten Transfektion. Die Zellen wachsen lose adhärent bei 28°C unter Raumluft (American Type Culture Collection - ATCC).

WEHI-3B:

Diese Zelllinie entstand aus eine murinen myelomonozytären Leukämie. Es sind makrophagen-ähnliche Zellen, die von einer BALB/c-Maus stammen. Die Zellen produzieren Interleukin-3. WEHI-3B-Zellen wachsen adhärent und zum Teil in Suspension (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig).

5.2 Bakterienstämme

XL-1 Blue, Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac (F' proAB lacqZΔM15 Tn10 Tetr), (Stratagene, Heidelberg)

5.3 Plasmide, Primer, cDNAs

5.3.1 Plasmide

pcDNA3:

5,4 kb großer Vektor für stabile und transiente Überexpression von Proteinen in eukaryontischen Zellen. Die Expression steht dabei unter der Kontrolle des Promotors des humanen Cytomegalie-Virus (CMV). Darüber hinaus enthält der Vektor die Polyadenylierungssequenz des bovinen Wachstumshormons, den Replikationsursprung des SV40-Virus, ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des SV40-Promotors, ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien und den ColE1-Replikations-ursprung zur hochgradigen Vermehrung des Vektors in Bakterien (Invitrogen[®], Leek, NL).

pIZ V5/HIS:

2,9 kb großer Vektor der unter dem OpIE2 Promoter hohe Mengen an Zielprotein exprimiert. Ein Zeocin Resistenzgen wird für die Selektionierung von stabilen Zelllinien verwendet. Das C-terminal vorhandene Peptid beinhaltet das V5 Epitop und ein 6x His Tag zur Detektion. In dem Vektor der für Proteinexpression in dieser Arbeit verwendet wurde, ist dieses C-terminale Ende entfernt worden. Es ergaben sich keine Veränderungen im Expressionsverhalten. Interferenzen durch die Proteinmarkierungen wurden somit ausgeschlossen (Invitrogen Corporation[®], Carlsbad, CA).

5.3.2 Primer

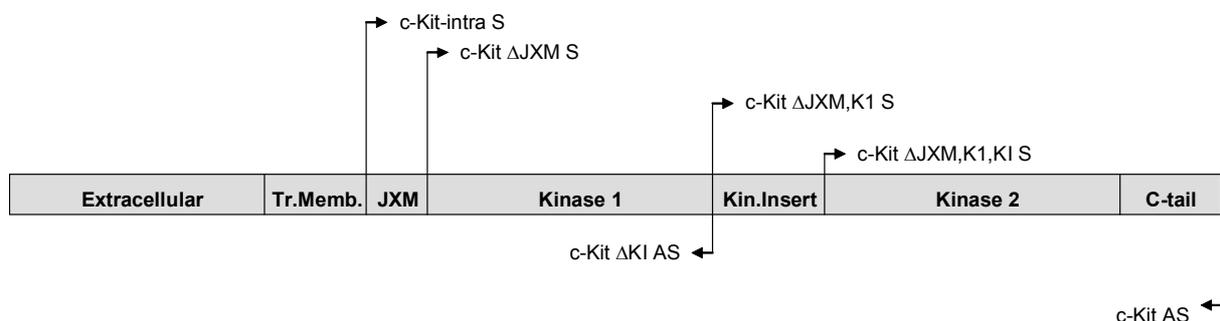


Abbildung 6: Positionen der Primer zur Herstellung der c-Kit Mutanten

Die jeweiligen Sense-Primer sind im oberen Teil aufgetragen und mit „S“ (Sense) markiert.

Die Antisense-Primer sind unterhalb und mit „AS“ (Anti-Sense) bezeichnet.

Die Primer wurden entsprechend den Aminosäurepositionen der Domänen am Anfang und Ende entworfen. Siehe Abbildung 23 zur Übersicht der exakten Positionen. Die 5' Primer wurde jeweils mit einer Kozak-Sequenz begonnen. Die 3' Primer entsprachen lediglich den entsprechenden Basenpositionen. Eine Kurzübersicht ist in Abbildung 6 dargestellt.

Die Bcr-Abl Mutanten existierten bereits nach Herstellung von Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe und mussten nicht neu generiert werden.

5.3.3 cDNAs

c-Kit:

Die DNA wurde freundlicherweise durch Herrn Dr. A. Ullrich, Max-Plank-Institut Martinsried, zur Verfügung gestellt. Das Gen konnte durch Ausnutzung von vorhandenen Schnittstellen im originären Plasmid in den pcDNA3 Vektor überführt werden. Das originäre Konstrukt entspricht exakt dem publiziertem Gen (Genebank Accession # X06182) [Yarden *et al.*, 1987].

Bcr-Abl:

Das Bcr-Abl Gen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe selbst kloniert und entspricht nach durchgeführter Sequenzierung exakt der Publizierten Sequenz für p210^{Bcr-Abl}. Das Gen befand sich im pcDNA3 Plasmid und konnte sofort verwendet werden (Genebank Accession # X02596) [Heisterkamp *et al.*, 1985].

5.4 Zellkulturmaterialien

5.4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Einfriergerät (Cryoson, Schöllkrippen)

Einfrierröhrchen (Nunc, Roskilde DK)

Flüssigstickstofftank (Cryoson, Schöllkrippen)

Inkubator (WTB, Tuttlingen)

Mikroskope (Zeiss, Oberkochen)

Pipetten, Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

Sterilbänke (BDK, Sonnenbühl)

Sterilfilter (Gelman Sciences, Ann Arbor USA)

Zählkammern (Brand, Wertheim)

5.4.2 Medien, Puffer und Sonstige Substanzen

2-Mercaptoethanol (Sigma, St.Louis USA)

BSA (Sigma, St.Louis USA)

DMEM Medium (PAN, Aidenbach)

Dimethylsulfoxid (Sigma, St. Louis USA)

FKS (Gibco, Eggenstein)

Flüssigstickstoff (Linde, München)

PBS (PAN, Aidenbach)

RPMI 1640 Medium (PAN, Aidenbach)

TC 100 Medium (Gibco, Eggenstein)

Trypanblau 0.5% (Serva, Heidelberg)

5.5 Labormaterial

5.5.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau)

Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen)

Beschichtetes Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

Blotting Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

ECL-Filme (Amersham, Braunschweig)

Entwickler (Agfa-Gevaert, Leverkusen)

Geldokumentationsanlage (LFT, Wasserburg)

Gelelektrophorese-Systeme (Bio-Rad, München und OWL, Portsmouth, USA)

Geltransferkammer (Bio-Rad, München)

Heizblock (Techne, Cambridge GB)

Parafilm M[®] (American National Can, Greenwich USA)

PCR Maschine (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

pH-Meter (WTW, Weilheim)

Photometer (Pharmacia, Freiburg)

Pipetten (Gilson, Langenfeld)

Pipettenspitzen, (Sarstedt, Nümbrecht)

Power-Supplies (Bio-Rad, München)

Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

Reinstwasseranlage (USF, Ransbach Baumbach)

Schüttler (Bühler, Tübingen)

Überkopffrotoren (Labinco, Breda, Niederlande)

Vortex (Heidolph, Kelheim)

Waage (Sartorius, Göttingen)

Wasserbad (Köttermann, Hänigsen)

Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg) und (Sigma, Osterode)

5.5.2 Chemikalien und Antikörper

5.5.2.1 Chemikalien

A-Beads (Pharmacia, Freiburg)

Detektions-System ECL[®] (Amersham, Braunschweig)

DNA Längenstandards (Boehringer, Mannheim)

DNA Präparationskits (Qiagen, Hilden)

DNA Isolationskits (Bio101, Vista, USA)

DOTAP (Boehringer, Mannheim)

Ni-NTA-Beads (Qiagen, Hilden)

Proteinmarker (Amersham, Braunschweig)

APS, Glycin, SDS, TEMED und Tris (Bio-Rad, München)

Acrylamid (Serva, Heidelberg)

Agarose (Serva, Heidelberg)

PCR-Primer (Metabion, Martinsried)

Restriktionsenzyme (Boehringer, Mannheim und NEB, Schwalbach)

Alle anderen Chemikalien (Sigma, St.Louis USA)

5.5.2.2 Antikörper

Sekundärantikörper:

Antikörper welche den Speziesspezifischen Fc-Teil des Primärantikörpers binden und mit einer Merrettich-Peroxidase (HRP) ausgestattet sind um die Chemolumineszenz zur Detektion zu ermöglichen. α -Maus-HRP, α -Kaninchen-HRP (Amersham, Braunschweig)

α -c-Kit (C-19):

Monoklonaler Maus-Antikörper der Klasse IgG; der Antikörper erkennt die C-terminale Domäne des c-Kit-Proteins (Santa Cruz Biotechnology[®], Heidelberg)

α -c-Abl (Ab-3):

Monoklonaler Maus-Antikörper der Klasse IgG; der Antikörper erkennt die C-terminale Domäne des c-Abl-Proteins (Calbiochem[®], Bad Soden)

 α -c-Abl (K-12):

Polyklonaler Kaninchen-Antikörper der Klasse IgG; der Antikörper erkennt die Aminosäuren 502 - 512 im Bereich der Kinasedomäne des humanen c-Abl-Proteins (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, USA).

 α -Bcr (7C6):

Monoklonaler Maus-Antikörper der Klasse IgG; der Antikörper erkennt die Aminosäuren 686-698 im Mittelteil des Bcr-Proteins. Es ist kein Kontrollpeptid verfügbar. (Santa Cruz Biotechnology[®], Heidelberg)

 α -Phosphotyrosin (PY20):

Monoklonaler Maus-Antikörper der Klasse IgG; der Antikörper erkennt spezifisch Phosphotyrosin-enthaltende Proteine (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, USA).

Kontrollpeptide:

Kontrollpeptid für den c-Abl (K-12)-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, USA)

Kontrollpeptid für den c-Kit (C-19)-Antikörper, sc-168 P, (Santa Cruz Biotechnology[®], Santa Cruz, USA)

5.6 Arbeiten mit Bakterien

5.6.1 Kultivierung von Bakterien

LB/Amp-Medium:

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
NaOH	1 mM

Je nach Resistenzgen zusätzlich:

Ampicillin	50 µg/µl
Tetrazyklin	12,5 µg/ml

Für Platten zusätzlich:

Agar	1,5 %
------	-------

5.6.2 Plattenkultur

Zur Herstellung der Platten wurde das autoklavierte Medium nach dem Abkühlen auf 55°C in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten bei 4 °C invertiert gelagert.

Für die Anlegung von Plattenkulturen wurden die Bakterien aus einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatel auf sterile LB/Amp-Agarplatten (XL-1-blue) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

5.6.2.1 Flüssigkultur zur DNA Amplifikation

Mittels einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien (XL-1-blue) von Plattenkulturen oder aus Cryo-Kulturen gepickt, in LB/Amp-Medium überimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann die Plasmid-DNA isoliert.

5.6.2.2 Cryo-Kulturen von Bakterien

Zum Anlegen von Dauerkulturen von XL-1 Blue wurde eine Übernachtskultur abzentrifugiert und in LB-Amp Medium aufgenommen, das zusätzlich 20 % DMSO enthielt. Diese Suspension wurde in 2 ml Röhrchen abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

5.6.3 Herstellung von kompetenten Bakterien

MgCl₂-Platten:

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
MgCl ₂	10 mM
Agar	1,5 %

TfbII Puffer:

NaMOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
KCl	10 mM
Glycerin	15 %

TfbI Puffer:

KOAc	30 mM
MnCl ₂	50 mM
CaCl ₂	100 mM
Glycerin	15 %

TYM-Medium:

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM

In den meisten Fällen wurden die kompetenten Zellen fertig gekauft. Um XL-1 blue Bakterien kompetent zu machen, wurden die Bakterien zunächst auf MgCl₂-LB Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten Einzelkolonie wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD 600 von 0.7 bis 0.8 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zelleniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden vorsichtig in je 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde der Niederschlag in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen, zügig zu 200 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 0.7 und 2.0·10⁸ Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

5.6.4 Transformation von Bakterien

SOC-Medium:

Trypton	10 g	1 M MgCl ₂	5 ml
Hefeextrakt	2,5 g	1 M MgSO ₄	5 ml
NaCl	0,25 g	2 M Glucose	5 ml
H ₂ O dd.	485 ml		
→ Autoklavieren		→ Sterilfiltrieren	

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter E. coli XL-1 Blue Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA sowie 1 µl 2-Mercapto-ethanol wurden zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Dann wurden die Bakterien sofort wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400 µl warmem SOC-Medium wurde für 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.7 Präparation und Analyse von DNA

5.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterien über Anionenaustauschersäulen isoliert. Es wurden Präparationen im "Mini"- und "Maxi"- Maßstab mit den Präparationskits und nach den Standardprotokollen von Qiagen durchgeführt. Für die Präparation im "Mini"-Maßstab wurden 3 ml, für die im "Maxi"-Maßstab 100 ml einer Übernachtskultur verwendet.

5.7.2 Auftrennung und Aufreinigung von DNA

5.7.2.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

50 x TAE-Puffer:		Auftragspuffer :	
Tris	242 g	Tris/HCl pH 8	10mM
Eisessig	57,1 ml	EDTA pH 8	50 mM
EDTA	37,2 g	Glyzerin	50 %
NaOH	ad. pH 8	Bromphenolblau	0,01 %
H ₂ O	ad. 1000 ml		

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration mit 1x TAE Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit 0.5 g/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einem entsprechenden Kamm bestückt und nach dem Erstarren in die entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0.2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer mit 50 bis 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch die UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Parallel aufgetragene Größenmarker erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

5.7.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von DNA (Entfernung von Enzymen und Umpufferung) wurden Spin-Kits (DNA Isolierung) verwendet. Die mit dem Skalpell ausgeschnittenen Gelstücke wurden hierzu mit 400 µl Glasmilch-Puffer gemischt und bei 50 °C geschmolzen. Dann wurde die Suspension durch eine Reinigungssäule zentrifugiert. Die glasmilchgebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und abschließend mit 50 µl ultrafiltriertem Wasser eluiert.

5.7.3 Enzymatische Reaktionen an DNA

5.7.3.1 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Überprüfung auf erfolgreiche Klonierung eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0.5 und 8 µg DNA mit 1 bis 30 U Enzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwei Stunden bei vorgegebener Temperatur in 10 bis 100 µl Gesamtvolumen. Die Reaktionsbedingungen wie erforderlicher Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

5.7.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurde etwa 100 ng eines aufgeschnittenen Vektors mit der dreifachen Menge des Insertfragmentes ligiert. Die Ligation wurde gewöhnlich mit 10 U Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl im Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes direkt in kompetente Bakterien transformiert.

5.7.4 DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden von den Firmen MediGenomix (Martinsried) und Toplab (Martinsried) nach dem Kettenabbruch- und Fluoreszenzdetektionsverfahren durchgeführt.

5.7.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard PCR-Ansatz:

Template-DNA (1:100)	1 µl
Primer A (100 pmol)	0,5 µl
Primer B (100 pmol)	0,5 µl
dNTPs (2mM)	4 µl
10x Thermopol-Puffer	5 µl
Vent-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O dd.	38,5 µl

Die Mutanten des c-Kit Rezeptors wurden mittels eines Standard PCR-Protokolls hergestellt. Es wurden BamHI (5') und EcoRI (3') Schnittstellen sowie eine Kozak-Sequenz (5') eingefügt. Dieses Konstrukt wurde anschließend in die jeweils verwendeten Expressionsvektoren durch Restriktionsverdau und Ligation an den eingefügten Schnittstellen inseriert. Es wurden Trunktations- und Deletionsmutationen hergestellt. Für die Herstellung von Deletionsmutationen wurden Primer eingesetzt, die partiell jeweils zur gegenüberliegenden Seite der Deletionsstelle komplementär waren. Zur Generierung von Trunktationsmutationen wurden Primer verwendet, die an die geplante Abbruchstelle banden und die außerdem die gewünschte Klonierungsschnittstelle enthielten. Als Polymerase zur Amplifikation wurde Vent-Polymerase von Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Die als Template in die PCR-Reaktionen eingesetzten DNAs, sowie neu klonierte Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft. Der Aufbau der Primer kann im Kapitel 5.3.2 eingesehen werden.

5.7.6 RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)

Mit der RT-PCR soll aus einzelsträngiger RNA eine doppelsträngige DNA produziert werden. Verwendet wird dazu eine Reverse Transkriptase die freie Oligonukleotide (dNTPs) als Komplementärstrang zu der einzelsträngigen RNA ergänzt. Als Standardprimer wird ein Anti-Poly-A Primer (Oligo dT) verwendet. Die RNA wird zu je 1 µg in 3 µl RT Puffer verdünnt. Ein Reaktionsansatz (Mastermix) wird vorbereitet bevor die RNA als letztes zugegeben wird. Der gesamte Ansatz wird 90 min bei 37°C belassen und kann anschließend eingefroren werden.

RT-PCR-Ansatz:

Template-RNA (1µg)	3 µl
Oligo dT	2 µl
dNTPs (5mM)	2 µl
10x RT-Puffer	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNAsin	1 µl
H ₂ O dd.	9 µl

5.8 Zellkultur

5.8.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden grundsätzlich ohne Antibiotika gehalten. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass latente Kontaminationen sofort erkannt werden können. Da viele Zelllinien bekannt dafür sind, in der Kultur weiter zu mutieren, wurden regelmäßig Zellen von frischen Passagen eingefroren und etwa alle 10-12 Wochen neue Zellen aufgetaut.

32Dp210-Zellen

Kulturmedium:

RPMI 1640 / L-Glutamin / NaHCO₃ 2,0 g/l

Das Medium wurde mit einem Zusatz von 10% FKS verwendet. Bei untransfizierten, nativen 32D-Zellen wurde dem Medium zusätzlich 10% Interleukin-3-haltiger Überstand der WEHI-3B-Zellen zugesetzt.

Inaktivierung von FKS:

Zur Inaktivierung wurde das FKS 1 h bei 56°C inkubiert.

Die 32Dp210-Zellen wurden in 175 cm²-Kulturflaschen mit 40 ml RPMI/10% FKS/10% bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2 -3 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium 1:10 – 1:50 verdünnt. Dazu wurden die Zellen die sich zum großen Teil in Suspension befinden, in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:50 abgenommen und in neuen Kulturflaschen ausgesät. Es wurde soviel Medium zugegeben bis das Endvolumen wiederum 40 ml betrug.

COS-7-Zellen (COS = CV1 Origin SV40)

Kulturmedium:

Dulbecco's MEM:

D-Glucose 1,0 g/l oder

D-Glucose 4,5 g/l

NaHCO₃ 3,7 g/l

N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin 1,0289 g/l

Das Medium wurde mit einem Zusatz von 10% FKS verwendet.

Inaktivierung von FKS:

Zur Inaktivierung wurde das FKS 1 h bei 56°C inkubiert.

Die COS-7-Zellen wurden in 175 cm²-Kulturflaschen mit 40 ml Dulbecco's MEM/10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium 1:3 - 1:10 verdünnt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Nach 5 Min. Einwirkzeit, in der die Proteinverbindungen der Zellen zum Flaschenboden durch das zugegebene Trypsin gelöst wurden, wurden die Zellen mit einem Zellschaber möglichst vollständig vom Boden abgelöst und mit 5 ml Medium in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Medium auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen bei 1500 rpm und 4°C für 8 Min. abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und entsprechend auf eine oder mehrere Kulturflaschen verteilt. Es wurden pro Kulturflasche 40 ml Medium zugegeben.

WEHI-3B

Kulturmedium:

RPMI 1640 / L-Glutamin / NaHCO₃ 2,0 g/l

Das Medium wurde mit einem Zusatz von 10% FKS verwendet.

Inaktivierung von FKS:

Zur Inaktivierung wurde das FKS 1 h bei 56°C inkubiert.

Die WEHI-3B-Zellen wurden in 175 cm²-Kulturflaschen mit 40 ml RPMI 1640Medium/ 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium 1:3 - 1:10 verdünnt. Dazu wurde das Medium abgenommen und 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Der Überstand von 40 ml, der Interleukin 3 enthält, wurde in Zentrifugenröhrchen zu 50 ml abgefüllt und bis zu weiteren Verwendung auf -20 Grad Celsius tiefgefroren.

Nach 5 Min. Einwirkzeit, in der die Proteinverbindungen der Zellen zum Flaschenboden durch das zugegebene Trypsin gelöst wurden, wurden die Zellen mit einem Zellschaber möglichst vollständig vom Boden abgelöst und mit 5 ml Medium in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Medium auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen bei 1500 rpm und 4°C für 8 Min. abzentrifugiert. Anschließend

wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert und entsprechend auf eine oder mehrere Kulturflaschen verteilt. Es wurden pro Kulturflasche 40 ml Medium zugegeben.

SF-9 Zellen

Kulturmedium:

Grace's Insect Medium mit L-glutamine

Calciumchlorid 500 mg/L

Kaliumchlorid 2800 mg/L

Lactalbumin 3330 mg/L

Hefeextrakt 10% 3330 mg/L

Das Medium wurde mit einem Zusatz von 10% FKS verwendet.

Inaktivierung von FKS:

Zur Inaktivierung wurde das FKS 1 h bei 56°C inkubiert.

Die SF-9-Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen mit 15 ml Grace's Insect Medium/10% FKS bei 27°C unter Raumluft kultiviert. Alle 2 - 3 Tage wurden die Zellen mit frischem Medium 1:3 verdünnt. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen, 12 ml frisches Medium hinzugefügt und die Zellen manuell in der Kulturflasche abgeschlagen. Die Zellen waren nun vollständig vom Boden abgelöst und wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde mit Medium auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen bei 1500 rpm und 4°C für 8 Min. abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 12 ml Medium resuspendiert und entsprechend auf 3 Kulturflaschen verteilt. Es wurde pro Kulturflasche auf insgesamt 15 ml Medium aufgefüllt.

5.8.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Um exakte Zellmengen in Experimente einzusetzen wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Ansonsten wurde die Zahl und die Vitalität der Zellen durch Betrachtung im Lichtmikroskop abgeschätzt. Zur Bestimmung mittels Trypanblau-Färbung wurden 200 µl aus der Zellkultur in eine 96-Loch-Platte überführt. Daraus wurden dann 50 µl entnommen und mit 50 µl 0,5 % Trypanblau-Lösung gut gemischt. Von dieser Mischung wurden etwa 20 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Aus der Zahl der

ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor lässt sich die Zellzahl berechnen. Die Vitalitätsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der toten bzw. lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl.

5.8.3 Herstellung transient exprimierender Zelllinien

5.8.3.1 Transient exprimierende Cos-7 Zellen

Die adhärent wachsenden Cos-7 Zellen wurden mittels Lipofektion transfiziert. Als Lipofektionsreagenz wurde DOTAP oder Effectene[®] (Qiagen) verwendet. Dabei wird der zu transfizierende Expressionsvektor mit lipophilen Molekülen verpackt, dass er die Zellmembran durchdringen kann. Die transfizierte DNA wird dann episomal exprimiert, integriert nicht ins Genom. Üblicherweise wurden die Expressionsvektoren für Bcr-Abl und verschiedene c-Kit Mutanten cotransfiziert.

Zur Herstellung der Cos-7 Transfektanten wurde ein in unserem Labor etabliertes Vorgehen gewählt (Warmuth M. et al., 1997) Die Ansätze A (Expressionsvektor und Puffer) und B (DOTAP und Puffer) wurden getrennt in sterilen 2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt, dann vereinigt und nach kurzem Schwenken 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 50 ml Röhren mit 30 ml Transfektionsmedium befüllt und das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen. Nach Ablauf der 15 min Präinkubation wurde der DNA/DOTAP-Mix mit dem Transfektionsmedium vermischt und in die Zellkulturflaschen überführt. Die Inkubation erfolgte über 18 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂.

DNA-Ansätze und Transfektionsmedium:

Einfachansatz:

A: 50 µg DNA ad. 500 µl TP

B: DOTAP 300 µl + 600 µl TP

Doppelansatz:

A: 25 µg c-Kit DNA + 25 µg Bcr-Abl DNA ad. 750µl TP

B: 450µl DOTAP + 900 µl TP

Transfektionspuffer (TP):

HEPES 20 mM

Transfektionsmedium:

DMEM 1,0 g/l Glucose

FCS 0,5 %

Pen/Strep 50 U/ml

Nach Etablierung der Transfektion mit Effectene wurde diese Methode bevorzugt benutzt, da die Expressionsraten deutlich höher lagen verglichen mit der DOPTAP transfizierter Zellen. Um mit Effectene zu transfizieren wurden die Cos-7 Zellen bis zu einer Dichte von etwa 50% in T75 Zellkulturflaschen mit Vollmedium gehalten. Das Medium wurde abgesaugt und 5 ml Transfektionsmedium (wie oben beschrieben) in die Zellkulturflasche eingefüllt. Es wurden nun 50 ml Falcon-Behälter mit ebenfalls 5 ml Transfektionsmedium beschickt, je einer pro Transfektion. In vorbereiteten sterilen Eppendorfgefäßen wurden EC Transfektionspuffer 150 µl mit 1 µg DNA gemischt. Dazu wurden 8 µl Enhancer gegeben und kurz mittels Vortex gemischt. Nach 2-5 min Ruhe wurde 10 µl Effectene hinzugegeben und 10 sek mittels Vortex gemischt. Nach weiteren 5-10 min Ruhe wurde der gesamte Inhalt mit den 5 ml Transfektionsmedium im Falcon-Gefäß vermischt und in die Zellkulturflasche verbracht. Nach 24 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen mit frischem Transfektionsmedium ausgesät. Nach weiteren 24 Std wurden die Zellen geerntet und in 250 µl Lysispuffer (siehe unten) lysiert.

5.8.3.2 Transient exprimierende SF-9 Zellen

Die SF-9 Zellkulturen wurden mit Effectene[®] (Qiagen) und dem dazugehörigen Transfektionskit transient transfiziert. Bei Doppeltransfektionen wurde die DNA Menge zu entsprechenden Teilen aufgeteilt. Bei den c-Kit / Bcr-Abl Kotransfektionen wurde jeweils 1 µg DNA verwendet.

Transfektionsansatz:

DNA	2 µg
EC Puffer	300 µl
Enhancer	16 µl → Vortex 1 s und 2-5 min stehen lassen
Effectene	20 µl → Vortex 10 s und 5-10 min stehen lassen

Die SF-9 Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen gehalten bis sie eine Konfluenz von 80% erreicht hatten. Das Kulturmedium wurde vollständig abgesaugt. Der Transfektionsansatz mit 3 ml Grace's Medium vermischt und auf die Zellen gegeben. Es wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, weitere 12 ml Medium hinzu gegeben und der gesamte Ansatz für 24 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das, den Transfektionsansatz enthaltende, Medium durch 10ml frisches Medium ersetzt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Schließlich wurden die Zellen abgeschlagen und zentrifugiert. Es erfolgten 2 weitere Waschstschritte mit PBS bevor die Zellen lysiert wurden. Die Lyse erfolgte in etwa 300 µl Volumen des Lysis-Puffers.

5.8.4 Hungern der Zellen

Üblicherweise wurden konfluent bewachsene 175 cm² Kulturflaschen von Cos-7 oder 32D Kulturen verwendet. Die Zellen wurden gegebenenfalls mittels Trypsin abgelöst und 5 min bei 200 g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 35 ml Hungermedium resuspendiert und in eine neue 175 cm² Kulturflasche gegeben. Die Inkubation mit dem Hungermedium betrug 18 h und erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Vor dem Hungern wurde durch Kontrolle mit dem Mikroskop sichergestellt, dass die Vitalität der Zellen bei etwa 90 % lag. Die Hungermedien enthielt zusätzlich zu dem entsprechenden Kulturmedium nur 0,5 % FCS. Dadurch sollte erreicht werden, dass der „Background“ an phosphorylierten Proteinen gesenkt wird.

5.8.5 Lyse von Zellen

Die Zusammensetzung des Lysispuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung und sollten je nach Fragestellung immer optimiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysispuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. NP40 ist ein etwas stärkeres Detergens, kann aber in geringeren Konzentrationen

verwendet werden und macht auch Membranproteine gut löslich. Die Funktionen der anderen Komponenten sind: Glycerin → Gefrierschutz, EDTA → Komplexierung von Mg^{2+} und Mn^{2+} und damit Inhibierung von Kinasen, NaCl → Osmolarität, Tris-Cl → pH-Puffer Natriumfluorid → Serin- und Threonin-Phosphataseninhibitor, und Phenylphosphat → Phosphataseninhibitor. Zusätzlich wurden dem Lysispuffer folgende Inhibitoren zugefügt: PMSF, Leupeptin, Aprotinin (Proteaseinhibitoren), sowie Na-Orthovanadat (Tyrosinphosphataseinhibitor). Abschließend ist zu sagen, dass alle Zellysate auf Eis gehalten werden müssen, um Proteine und Proteinkomplexe zu schützen (Proteolyse, Dissoziation).

Verwendete Lysispuffer und Reagenzien

Lysispuffer:		Zusätzlich pro Milliliter Lysispuffer:	
NP 40	0,5 %	PMSF	10 μ l
EDTA	1 mM	NaVO ₄	10 μ l
Tris-Cl pH 7,4	50 mM	Aprotinin	5 μ l
Natriumfluorid	1 mM	Leupeptin	2 μ l
NaCl	150 mM		
Glycerin	15 %		

Zur Durchführung der Zellyse wurde die zum Zellpellet gegebene Menge des eisgekühlten Lysispuffers genau so bemessen, dass jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen in 10 μ l Puffer lysiert wurden. Das erste Durchmischen erfolgte durch zweimaliges auf- und abpipettieren mit einer blauen Pipettenspitze, danach wurden die Proben 25 min bei 4 °C rotiert. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm von unlöslichen Anteilen wie größeren Membranteilen und nukleären Bestandteilen getrennt. In dem klaren Lysat sollten sich jetzt nur noch die zytosolischen und membranären Zellproteine befinden. Im Allgemeinen wurde für Experimente frisches Lysat hergestellt. Bei einigen Experimenten wurde das Lysat bei -80 °C eingefroren und später verwendet.

5.8.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Lysate wurde ein Proteinassay nach Bradford durchgeführt. Dazu wurde eine Standardkurve nach dem Protokoll von Bio-Rad erstellt und

Verdünnungen der Lysate mit dem Farbreagenz vermischt. Der Proteingehalt wurde dann nach photometrischer Messung der Blaufärbung bei 595 nm bestimmt. Für Westernblots wurden pro Ansatz 100 µg, für Immunpräzipitationen 800 µg Gesamtprotein verwendet.

5.8.7 SDS-PAGE und Westernblot

Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht, über Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einer konstanten Rate (1 SDS/2 Aminosäuren) so an Proteine, dass die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird.

Zusätzlich wurde die Technik der *disc*-Elektrophorese (*discontinuous* pH) angewandt. Hierbei wird mit zwei unterschiedlichen Gelen, bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgt ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hat zur Folge, dass die Banden schärfer begrenzt sind und besser aufgetrennt werden.

5.8.7.1 Herstellen der Polyacrylamidgele

Zwei Glasplatten (für 8 x 10 cm große Gele) wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Die Reagenzien wurden in der oben angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagrecht gehaltenen Glasplatten laufen gelassen. Der Zwischenraum wurde bis etwa 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf dieselbe Weise mit etwas Wasser überschichtet und für mindestens eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Wasserschicht über dem auspolymerisiertem Trenngel wurde abgegossen. Nach zweimaligen ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt.

Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (40 %)

Trenngel 7 %:

APS 10 %:

Acrylamid/Bis. (40 %)	875 μ l
4xTris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
dd H ₂ O	2,7 ml
TEMED	17 μ l
APS 10%	7 μ l

10%-ige Lösung von APS in
dd H₂O, die aliquotiert und bei
-20 °C gelagert wird

Trenngel 10 %:

4x Tris-Cl/SDS pH 8,8:

Acrylamid/Bis.(40 %)	1,25 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
dd H ₂ O	2,5 ml
TEMED	17 μ l
APS 10%	7 μ l

dd H₂O 300 ml

Tris 91 g

SDS 2 g

mit HCl pH 8,8 einstellen

dd H₂O ad. 500 ml→ mit 0,45 μ m Filter filtrieren

Sammelgel:

Acrylamid/Bis. (40 %)	150 μ l
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	0,4 ml
dd H ₂ O	1 ml
TEMED	2 μ l
APS 10%	8,5 μ l

4x Tris-CL/SDS pH 6,8:

dd H₂O 40 ml

Tris 6,05 g

SDS 0,4 g

mit HCl pH 6,8 einstellen

dd H₂O ad. 100 ml→ mit 0,45 μ m Filter filtrieren

Dann wurde ein vorher mit 70 % Ethanol gereinigter Kamm (10 Zähne) so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophorese-Kammer befestigt.

5.8.7.2 Laden und Starten des Gels

2x Probenpuffer:

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5 ml
SDS 10%	20 ml
β-ME	2 ml
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	1 mg
dd H ₂ O	45,5 ml

5x Elektrophorese-Puffer:

Tris	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dd H ₂ O	ad. 1000 ml

5.8.7.3 Marker zur Größenstandard Bestimmung

Rainbow-Marker (Mix aus angefärbten, rekombinanten Proteinen):

250 kDa	blau
160 kDa	rot
105 kDa	grün
75 kDa	gelb
50 kDa	violett
35 kDa	blau
30 kDa	orange
25 kDa	grün
15 kDa	blau
10 kDa	rot

Die Lysate oder IPs wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5 min auf 100 °C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit 5 µl Proteinmarker beladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei 4 °C im Kühlraum statt. Der Gellauf erfolgte bei 100-125 V.

5.8.8 Westernblot

5.8.8.1 Der Transfer

Transferpuffer:

Tris	24,22 g
Glycin	115,3 g
Methanol	1600 ml
dd H ₂ O	ad. 8000 ml

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese zur weiteren Handhabung auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in dd H₂O geschwenkt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman 3 MM-Papierstücke der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Wenn die blaue Farbmarker-Bande am unteren Rand der Glasplatte angelangt war, wurde der Gellauf beendet und das Sammelgel abgeschnitten. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei (ausrollen mit Pipette) aufeinander gelegt: Schwamm, Whatman, Gel, Nitrocellulose, Whatman, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4 °C (Kühlraum) und 100 V für etwa eine Stunde.

5.8.8.2 Blocken der Membran

10x TBST:

1 M Tris-Cl pH 8	100 ml
5 M NaCl	300 ml
Tween 20	5 ml
dd H ₂ O	ad. 1000ml

Blocking-Solutions für ECL:

MP	1 g
1x TBST	ad. 40 ml
oder	
BSA	1 g
1x TBST	ad. 40 ml

Da Antikörper auch unspezifisch an verschiedene Materialien binden können, ist es notwendig, alle Stellen der Membran, an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem „inerten“ Protein zu blockieren. Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 2 h in einer Plastikschaale mit Blocking-Solution geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1x TBST gespült und einmal für 5 min in 1x TBST geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution wegzuwaschen. Wenn eine Inkubation mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt werden sollte, wurde die Membran an den entsprechenden Stellen mit einem Skalpell geschnitten.

5.8.8.3 Antikörper-Inkubation

Die meisten der verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:3000 Verdünnungen jeweils in Blocking-Solution eingesetzt.

Die Membran wurde in ein Falconröhrchen eingerollt, so dass die Proteinseite nach innen zeigte. Die Inkubation erfolgte in dem Röhrchen mit 3 ml der Antikörperlösung für 1-2 Stunden auf einem Taumelrolleninkubator. Dann wurde die Membran zunächst viermal mit TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper ebenfalls in dem Röhrchen für 30 min inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem viermaligem Waschen.

5.8.9 Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dabei wird durch die an die sekundären Antikörper gebundene Peroxidase die Oxidation eines Diacylhydrazids katalysiert. Bei dieser Reaktion entstehen Stickstoff und Licht, das Schwärzungen auf einem aufgelegten Film erzeugt.

Die ECL-Lösungen wurden 1:1 gemischt (2 + 2 ml für eine etwa 8 x 10 cm große Membran). Die Membran wurde mit einem Papiertuch gut getrocknet und in einer Plastikschaale mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf ein mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt. Das Ganze wurde mit einer Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für 2-60 Sekunden mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Folienstift übertragen.

Strippen der ECL-Blots

Stripping-Solution:

Tris-Cl pH 6,7	3,78 g
SDS	10 g
β -ME	3,5 ml
dd H ₂ O	ad. 500 ml

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die Membran mehrfach (bis zu dreimal) einer Immundetektion zu unterziehen. Bei dem so genannten „Strippen“ werden zunächst sowohl die sekundären, als auch die primären Antikörper von der Membran entfernt. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich.

Die Membran wurde im Wasserbad bei 50 °C für 30 min in Stripping-Solution geschüttelt, dann mit 1x TBS einmal gespült und zweimal für 10 min gewaschen. Schließlich wurde erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert wie oben angegeben.

5.8.10 Immunpräzipitation

5.8.10.1 Vorgehen

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist es möglich, einzelne Proteine oder Proteinkomplexe aus Zelllysaten zu isolieren. Hierzu wird ein Antikörper gegen c-Kit oder Bcr-Abl verwendet um das jeweilige Protein aus dem Zelllysat zu isolieren. Dieser Antikörper bindet seinerseits an kleine Sepharose-Beads. Damit wird nicht nur das direkt gebundene Protein sondern auch alle daran gebundenen weiteren Proteine aus dem Zelllysat herausgeholt. Der entscheidende Punkt hierbei ist, dass man Antikörper verwendet, die an polymere Trägersubstanzen (Beads) wie Sepharose oder Agarose gekoppelt werden und dadurch abzentrifugierbar werden. Die Kopplung kann entweder kovalent, über Anti-Immunglobulin-Serum, oder über Protein A erfolgen. Das Protein A ist bakteriellen Ursprungs und hat die Eigenschaft, Immunglobuline über deren Fc-Teil zu binden. Wenn der Antigen-Antikörper Komplex an die Beads gebunden hat, werden diese gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Immunpräzipitate werden dann zur weiteren Analyse einer SDS-PAGE unterzogen.

IP-Waschpuffer NP 40:

NP 40	0,1-0,3 %	Zusätzlich Proteaseinhibitoren:	
EDTA	1 mM		
Tris-Cl pH 7,4	50 mM	Na-Orthovanadat	1 %
Natriumfluorid	1 mM	PMSF	1 %
NaCl	150 mM	Leupeptin	0,5 %
Glycerin	15 %	Aprotinin	0,2 %

Durch das Preclearing der Lysate werden falsche Ergebnisse aufgrund von unspezifischen Bindungen an die Beads minimiert. Zunächst wurden die Beads zweimal mit IP-Waschpuffer gewaschen, wobei immer kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert wurde. Jede IP wurde mit 100 µl dieser Beads versetzt und 2 h auf der Drehscheibe bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Beads wie vorher abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.8.10.2 Inkubation der Antikörper und Beads

Zu den Überständen wurden die Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein gegeben. Es wurden 75 µl Lysat und 25 µl Antikörper gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 300 µl mit IP-Puffer aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Rotor. Pro Ansatz wurden dann 100 µl Beads zugegeben, die vorher wie oben gewaschen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 2 h auf dem Rotor.

5.8.10.3 Durchführung der Peptidkontrollen

Die Antikörper wurden für zwei Stunden mit einem den Antikörper blockierenden Peptid bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Immunpräzipitationen wie beschrieben angesetzt wurden. Zu oben beschriebenem Ansatz wurden 125 µl Blocking-Peptid zugegeben, das Gesamtvolumen blieb bei 300µl mit entsprechend weniger IP-Puffer.

5.8.10.4 Waschen der Immunpräzipitate

Um die IPs von unspezifisch gebundenen Proteinen zu reinigen, wurden diese viermal mit je 500 μ l IP-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Beads für jeweils etwa 40 Sekunden mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

5.8.10.5 Trennung der Antigen-Antikörper-Protein A Komplexe

Nach dem quantitativen Abnehmen des letzten Überstands wurden die Beads mit 30 μ l Waschpuffer überschichtet. Nach der Zugabe von 10 μ l 4x Probenpuffer zu den Präzipitaten wurden die Ansätze gut gevortext und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Die Durchführung der SDS-PAGE und des Westernblots erfolgte anschließend wie oben beschrieben.

6 Ergebnisse

6.1 Initiale Experimente zur Kopräzipitation von Bcr-Abl und c-Kit

Die Aufgabe bestand zunächst im Nachweis einer Interaktion zwischen Bcr-Abl und dem Rezeptor c-Kit. Wie bereits angesprochen, sollte mit der Beantwortung dieser Fragestellung geklärt werden, ob eine Beeinflussung des Zellwachstums durch eine Stimulierung durch den Rezeptor c-Kit erfolgt. Da diese Stimulierung grundsätzlich durch den Stammzellofaktor, den natürlichen Liganden für c-Kit, aber auch unphysiologisch durch eine intrazelluläre Interaktion mit der Tyrosinkinase Bcr-Abl erfolgen kann, sollte zunächst die Assoziation der beiden Proteine, später auch die gegenseitige Phosphorylierung geprüft werden. Die Möglichkeit der gegenseitigen Bindung eines Proteins an das andere ließ sich durch eine Immunpräzipitation nachweisen. Eine detaillierte Beschreibung einer Immunpräzipitation und des Western-Blots kann dem Kapitel 5.8.10 im Abschnitt Methoden entnommen werden. Initial wurde als Quelle für Bcr-Abl die stabil transfizierte hämatopoetische Mäusezelllinie 32Dp210 verwendet. Diese Zelllinie ist ein Standard-Zellkulturmodell für Untersuchungen der CML. Sie eignete sich wegen der hohen Expressionsraten von Bcr-Abl besonders für die Bereitstellung dieses Proteins zur Immunpräzipitation. Für die Bereitstellung von c-Kit wurde die leicht zu transfizierende Zelllinie Cos-7 verwendet. Hier konnte, mit verhältnismäßig geringem Aufwand, durch Lipofektion eine transiente Transfektion mit dem c-Kit Gen erfolgen, welches einem starken Promotor auf dem Transfektionsplasmid nachgeschaltet war. Cos-7 Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie adhärent wachsen und durch gezieltes Aufteilen in ausreichend große Zellkulturflaschen einen ähnlichen Zellzustand der Proliferation erreichen. Dieser Umstand, zusammen mit dem Vorhandensein geeigneter Transfektionsverfahren, machte diese Zelllinie besonders geeignet für die Produktion von c-Kit. Die Optimierung der liposomalen Transfektionsmethode wurde für c-Kit und Bcr-Abl separat vorgenommen. Die jeweilige DNA wurde in Mengen von 1-5 µg in den Transfektionsansatz eingebracht. Bei der Optimierung der c-Kit Transfektion wurde auch die intrazelluläre Trunkation „c-Kit intra“ verwendet, welches für spätere Experimente benötigt wurde. Die Zunahme der Expression von c-Kit intra, entsprechend der DNA Menge, kann in Abbildung 7 betrachtet werden. Der Transfektionsansatz unter Verwendung von Bcr-Abl dagegen, schien schon ab 1 µg DNA gesättigt zu sein. Die Abbildung 8 zeigt eine weitgehend gleichmäßige Expression von Bcr-Abl. Für die einleitenden Experimente wurden 32Dp210 Zellen als Quelle für Bcr-Abl verwendet, da diese Zellen eine sehr hohe und konstante Bcr-Abl Expression zu eigen haben.



Abbildung 8: Optimierung der Bcr-Abl Transfektion von Cos-7 Zellen

Abbildung 7: Optimierung der c-Kit Transfektion von Cos-7 Zellen

Es wurde die Effizienz der Transfektion von Cos-7 Zellen unter Verwendung von 1 µg, 2 µg oder 5 µg DNA untersucht. Die Expression von c-Kit intra oder c-Kit Wildtyp wurde zur Beurteilung herangezogen. Die Verwendung von 2 µg war für die folgenden Experimente ausreichend.

Es wurde die Effizienz der Transfektion von Cos-7 Zellen unter Verwendung von 1 µg, 2 µg oder 5 µg DNA untersucht. Die Expression von Bcr-Abl wurde zur Beurteilung herangezogen. Die Verwendung von 2 µg war für die folgenden Experimente ausreichend. Die Bandenstärke erschien in allen Spuren etwa gleich stark, was auf eine Sättigung bei liposomalen Transfektion hinwies.

Die Abbildung 9 zeigt die erste Immunpräzipitation, die mit c-Kit und Bcr-Abl durchgeführt wurde. Der primäre Antikörper war gegen c-Kit gerichtet und wurde in der Kontrolle mit einem Blocking-Peptid in seiner Bindungsfähigkeit stark herabgesetzt. Erkennbar ist die deutliche Kopräzipitation von Bcr-Abl und endogenem Abl, der 32Dp210-Zellen, an das artifiziell eingebrachte c-Kit. Im Anschluss an die Immunpräzipitation wurde eine Gelelektrophorese der Proteine durchgeführt um eine Auftrennung nach Molekulargewicht zu erreichen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein und Sekundärantikörpern, welche mit Meerrettichperoxidase beschickt waren um eine Detektion mit Chemolumineszenz (ECL) zu ermöglichen. In diesem Experiment wurde der Westernblot mit einem Anti-Abl Antikörper detektiert. Gut zu erkennen ist die Spezifität der Assoziation durch die fast vollständige Aufhebung der Bindung bei Zugabe des Blockierungs-Peptides. Dieses erste Experiment sollte durch weitere Immunpräzipitationen ergänzt werden, um eine höhere Sicherheit bezüglich der Spezifität der Interaktion zu erreichen. Des Weiteren sollten neue Erkenntnisse bezüglich des Bindemechanismus gewonnen werden.

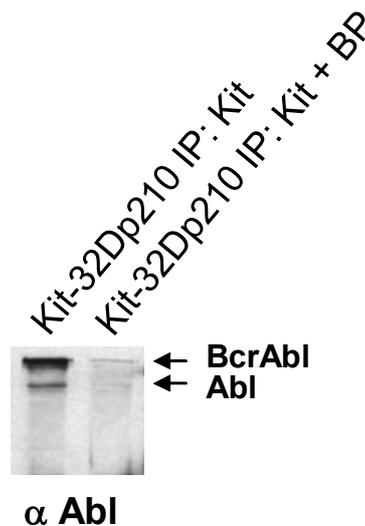


Abbildung 9: Immunpräzipitation c-Kit (Cos)/32Dp210 IP Anti-c-Kit +/- Blocking Peptid (BP), Blot Anti-Abl

Initiales Experiment zur Überprüfung einer möglichen Bindung zwischen Bcr-Abl und c-Kit. Mischung von Lysaten aus Cos- und 32Dp210-Zellen. c-Kit Expression erfolgte durch transiente Transfektion in Cos-Zellen. Die Bcr-Abl Expression erfolgte stabil in 32Dp210-Zellen. Die Immunpräzipitation wurde gegen c-Kit durchgeführt, der Immunblot gegen Abl. Somit gelang der Nachweis einer Kopräzipitation von Bcr-Abl und c-Kit. Eine Kontrolle der Spezifität erfolgte unter Hinzunahme eines Blockingpeptides (BP) gegen den primären c-Kit-Antikörper.

Da ein selektives Blocking-Peptid für den Bcr-Antikörper nicht kommerziell verfügbar war, sollte analog zu dem oben beschriebenen Experiment ausschließlich der Bcr-Antikörper verwendet werden. Um die Nebeneffekte in der Proteinbindung möglichst auszuschließen wurde eine Kontrolle mit Cos-Zelllysat ohne vorherige c-Kit Transfektion in der Immunpräzipitation benutzt. Wie zu erwarten konnte c-Kit nicht als entsprechende Bande des passenden Molekulargewichtes in der Abbildung 10 detektiert werden. Dieses Experiment diente der Überprüfung der Spezifität des eingesetzten Bcr-Antikörpers in der Immunpräzipitation. Es ergibt sich eine höhere Sicherheit im Ausschluss von unspezifischen Bindungen, beispielsweise an die Sepharose-Beads oder anderer kreuzreagierender Proteine. Zu bemerken ist, dass für diese und die folgenden Experimente der Antikörper gegen Bcr für die Immunpräzipitation von entscheidendem Vorteil gegenüber dem Abl-Antikörper war. Der Abl-Antikörper zeigte eine hohe Kreuzreaktivität mit c-Kit. Als Gegenprobe für das Experiment wurde die Membran des Westernblots gestripped. Auf der Membran desselben Experiments konnten somit die entsprechenden Bindungspartner mit einer neuen Antikörper-

Markierung nachgewiesen werden. Die auf der Membran befindlichen Proteine wurden bei diesem Stripping-Verfahren nicht beeinflusst, lediglich eine Abnahme der Proteinmenge war zu verzeichnen, was sich durch Auswaschen in der Stripping-Lösung erklären lässt. Diese Gegebenheit begrenzte diesen Vorgang auf etwa zwei unterschiedliche Antikörpermarkierungen. In Abbildung 11 ist das Vorhandensein der Bcr-Abl Bande zu sehen, welche auch im Kontrollexperiment, durch die Immunpräzipitation (im Folgenden auch als IP bezeichnet) mit Anti-Bcr korrekt zur Darstellung kam. Hingewiesen sei hier auf das Fehlen der Abl-Bande, welche selbstverständlich in der Anti-Bcr IP nicht gebunden wurde. Im Vergleich hierzu kann noch einmal auf die Abbildung 9 verwiesen werden, die eine Kopräzipitation auch vom endogenen c-Abl der 32Dp210 Zellen mit c-Kit nachweist.

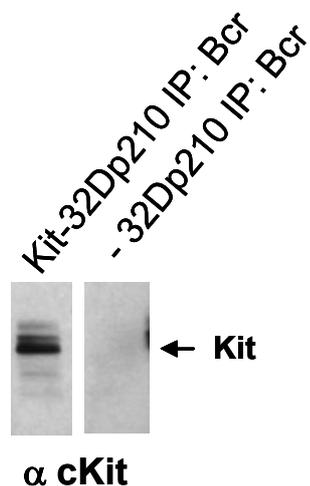


Abbildung 10: Immunpräzipitation +/- c-Kit (Cos)/32Dp210 IP Bcr, Blot Anti-c-Kit

Kontrollexperiment zur Spezifität der Antikörper in der Immunpräzipitation. Zusammen mit Abbildung 11 konnte eine spezifische Kopräzipitation des Bcr-Antikörpers gegen Bcr-Abl gezeigt werden. c-Kit wurde als Präzipitationspartner von Bcr-Abl in der Immunpräzipitation nachgewiesen (linke Spur). Die Negativ-Kontrolle in der rechten Spur zeigte erwartungsgemäß kein c-Kit, da es im experimentellen Ansatz nicht vorhanden war.

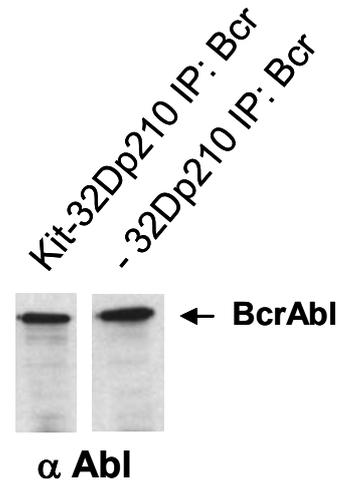


Abbildung 11: Immunpräzipitation +/- c-Kit (Cos)/32Dp210 IP Bcr, Blot Anti-Abl

Kontrolle der Bcr-Abl Expression in transfizierten und untransfizierten 32Dp210 Zellen. Durchführung desselben Experiments wie in Abbildung 10. Der Unterschied ist der Primärantikörper gegen Bcr. Die Detektion auf dem Western-Blot erfolgte weiterhin mit dem Abl-Antikörper. Nachweis von Bcr-Abl in beiden Experimenten.

6.2 Einfluss von Bcr-Abl Punktmutationen auf die Kopräzipitation mit c-Kit

Für die in Abbildung 9 dargestellte Immunpräzipitation wurden die Lysate von c-Kit exprimierenden Cos-Zellen und Bcr-Abl exprimierenden 32Dp210-Zellen gemischt. Um von dieser sehr artifiziellen Methode, der Mischung der Lysate zweier unterschiedlicher Zellsysteme, einen Schritt weiter in Richtung physiologischer Interaktion zu gehen, wurde Bcr-Abl in den folgenden Experimenten transient in Cos-Zellen zusammen mit c-Kit koexprimiert. Für diese Methode der Doppeltransfektion wurden zunächst die entsprechende DNA von c-Kit und Bcr-Abl in, zur liposomalen Transfektion geeignete pCDNA3-Plasmide, hinein kloniert. Diese Klonierung konnte sehr gezielt durch das Ausnutzen von vorhandenen enzymatischen Schnittstellen erfolgen. Unterschiedliche Schnittstellen an dem jeweiligen N- oder C-Terminus ermöglichten ein reibungsfreies Einfügen der Template-DNA in den aufgespaltenen Vektor in regelrechter Leserichtung. Kontrollen wurden durch enzymatischen Verdau der DNA und Auftrennung in DNA-Gelelektrophorese durchgeführt und verifizierten die erfolgreiche Klonierung. Die Zellkulturexperimente wurden jeweils mit einem einzigen Klon durchgeführt.

Um die Assoziation von c-Kit und Bcr-Abl in einem einzelnen System noch weiter eingrenzen, bzw. charakterisieren zu können, wurden Punktmutanten an den funktionell relevanten Aminosäurepositionen Bcr-Abl 177, Bcr-Abl 1053 und Bcr-Abl 7069 mit untersucht. Zur besseren Übersicht sind die Punktmutationen Schematisch in Abbildung 12 dargestellt.



Abbildung 12: Schema der Bcr-Abl Punktmutanten

Die Positionen der Bcr-Abl Mutationen entsprechen funktionell relevanten Domänen, die durch die Veränderungen inaktiviert wurden. Die Mutante Y177 veränderte das an dieser Aminosäureposition liegende Tyrosin zu Phenylalanin und unterbricht die Bindung an das Adaptormolekül Grb2. Eine Phosphorylierung von c-Kit über den Zwischenschritt der Grb2 Aktivierung konnte somit ausgeschlossen werden. Bcr-Abl Y177 phosphorylierte c-Kit in unveränderter Weise. Die Punktmutante 1053 war innerhalb der SH2-Domäne des Abl Teils lokalisiert. Diese Domäne ist bekannter Maßen in die Bindung mit Cbl direkt involviert.

Indirekt ergab sich daraus eine Relevanz für die Formierung eines Komplexes zwischen Src, CRKL, PI3-Kinase und Bcr-Abl. Sämtliche dieser Signalmoleküle sind auch in die Funktion von c-Kit verwickelt und binden direkt daran. Auch hier konnten die genannten Moleküle nicht für eine Phosphorylierung von c-Kit verantwortlich gemacht werden.

Die in Abbildung 13 zu sehenden Banden zeigen das Vorhandensein von Bcr-Abl, als auch endogenem c-Abl in den Cos-Zelllysaten im Westernblot. Die Anfärbung erfolgte mit dem Abl-Antikörper. Es verwundert nicht, dass c-Abl auch in diesen eukaryontischen Zellen ubiquitär nachzuweisen war, da Abl bekannter Weise viele Funktionen in der Zellregulation hat und in nahezu allen eukaryontischen Zellen gefunden wird. Gut zur Darstellung kam die Effektivität der Kotransfektion von Bcr-Abl und seinen Punktmutationen, zusammen mit dem Wildtyp c-Kit. Der Nachweis, und die relativ homogene Expression von c-Kit ist der Abbildung 14 zu entnehmen. Da hier die Detektion von Wildtyp c-Kit zum ersten Mal erfolgte, seien einige Worte zum Bandenmuster verloren. Es ist bekannt, dass der am intrazellulären C-Terminus bindende c-Kit-Antikörper, ein etwas breiteres Bandenmuster detektiert. Auch für andere c-Kit-Antikörper ist dies bekannt. Ursache ist der extrazelluläre Anteil des c-Kit Rezeptors, welcher unterschiedlich starke Glykosylierung aufweist, die für diese deutlichen Schwankungen im Molekulargewicht verantwortlich sind. Die, unterhalb der deutlich angefärbten Banden, sichtbaren Proteinmuster ist typisch für einen Westernblot eines nicht weiter verarbeiteten Rohlysats von Zellkulturen. Nach Immunpräzipitationen kann sich dieses Muster ändern oder diese falsch detektierten Banden fallen sogar ganz weg. Erklärt werden kann dieser Effekt durch die Tatsache, dass die Proteine des Zelllysats nach gelelektrophoretischer Auftrennung in denaturierter Form vorlagen, so dass durch Änderungen der Proteinstruktur, falsch erkannten Binderegionen anderer Proteine detektiert werden konnten. Zum Vergleich können die Western-Blots mit aufgetragenen Rohlysaten, mit dem Bandenmuster der Immunpräzipitationen verglichen werden.

Mit den eben gezeigten Rohlysaten wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Einmal mit Primär-Antikörper gegen Bcr und dann gegen c-Kit. Es wurde für jede Immunpräzipitation jeweils ein Westernblot erstellt, der insgesamt dreimal mit Detektionsantikörpern inkubiert wurde. Zwischen den Detektionen erfolgte ein Waschschriff in der Strippinglösung.

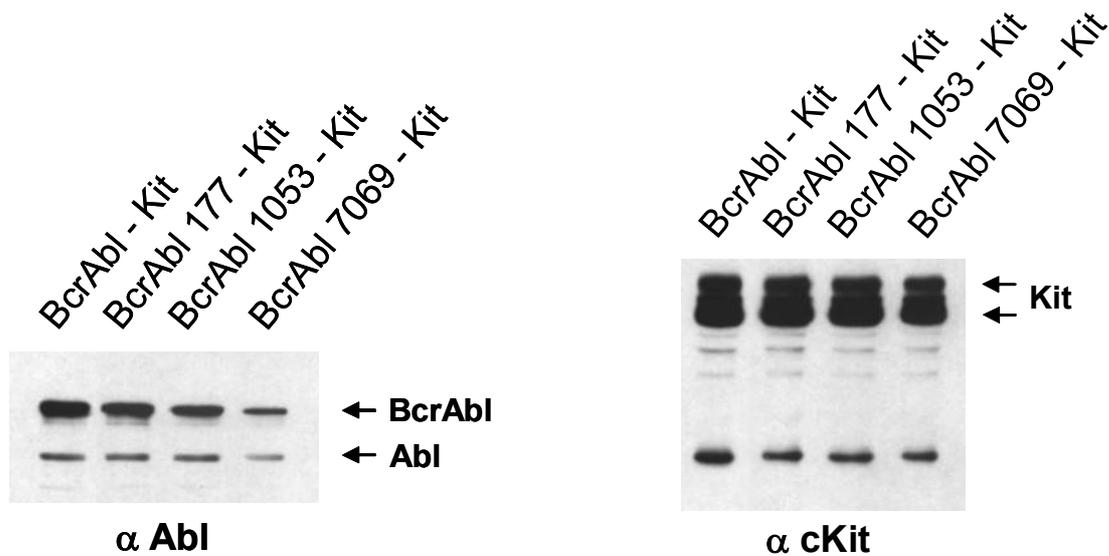


Abbildung 13: Rohlysate Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, Blot Anti-Abl

Nachweis der gelungenen Kotransfektion von Bcr-Abl und c-Kit in Cos-Zellen. Hier die Detektion von Bcr-Abl und auch der Abl-Bande im Rohlysat.

Abbildung 14: Rohlysate Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, Blot Anti-c-Kit

Nachweis der gelungenen Kotransfektion von Bcr-Abl und c-Kit in Cos-7 Zellen. Hier die Detektion von Wildtyp c-Kit mit dem typischen Bandenmuster.

Die folgenden drei Darstellungen, Abbildung 16 bis Abbildung 18, demonstrieren das Vorhandensein von c-Kit nach der Immunpräzipitation gegen Bcr. Eine Kontrolle mit Rohlysat ist in der rechten Spur zu sehen. Dieses Experiment ließ den Schluss zu, dass die Kopräzipitation von c-Kit an Bcr-Abl in dem, durch Kotransfektion gewonnenen Zelllysat nachzuweisen war und nicht durch eine der drei Mutationen Bcr-Abl 177, 1053 oder 7069 aufgehoben werden konnte. In allen Spuren der Gelelektrophorese ist c-Kit als Kopräzipitationspartner nachgewiesen worden. Dies sollte als erster Hinweis dienen, ob funktionell verändertes Bcr-Abl für eine Bindung notwendig ist, oder ob möglicherweise allein strukturelle Gegebenheiten für eine Bindung verantwortlich sind. Zu den Punktmutanten ist anzumerken, dass die jeweils zu mutierende Position im Vergleich zur ursprünglich vorhandenen Aminosäure durch die am nächsten verwandte Aminosäure ausgetauscht wurde. Es ist daher nicht von einer Konformationsänderung oder anderen strukturellen Veränderungen auszugehen. In der Abbildung 17 ist als Kontrolle die Präzipitation von Bcr-Abl zu sehen. Unterschiede in der Intensität der Bandenstärke sind auf geringe Abweichungen der Proteinkonzentration im Lysat oder des Immunpräzipitationsansatzes zurückzuführen. Wie erwartet fällt auch hier in der rechten

Kontrollbande das Vorhandensein von Abl auf, welches im Rohlysate vorhanden war, aber in der Immunpräzipitation nicht vom Bcr-Antikörper erkannt wurde. Da die Punktmutationen von Bcr-Abl zu keiner Alteration der Kopräzipitation von Bcr-Abl führten, aber eine funktionelle Charakterisierung zum Verständnis wesentlich beitragen sollte, wurde zusätzlich ein Phosphotyrosin-Blot angefertigt, um den Phosphorylierungsgrad von c-Kit und Bcr-Abl zu untersuchen. Da dieselbe Membran verwendet wurde, zeigte sich auch hier, durch unterschiedliche Mengen an präzipitiertem Protein bedingt, in der linken Spur eine geringe Anfärbung von Bcr-Abl beim Wildtyp. Die Mutanten dagegen waren gleichermaßen aktiviert, bis auf die kinaseinaktive Mutante Bcr-Abl 7069. Als wichtigste Aussage kann diesem Experiment entnommen werden, dass Bcr-Abl im Rohlysate phosphoryliert ist, c-Kit dagegen nicht. Ganz anders stellt sich dies in den ersten drei Spuren dar.

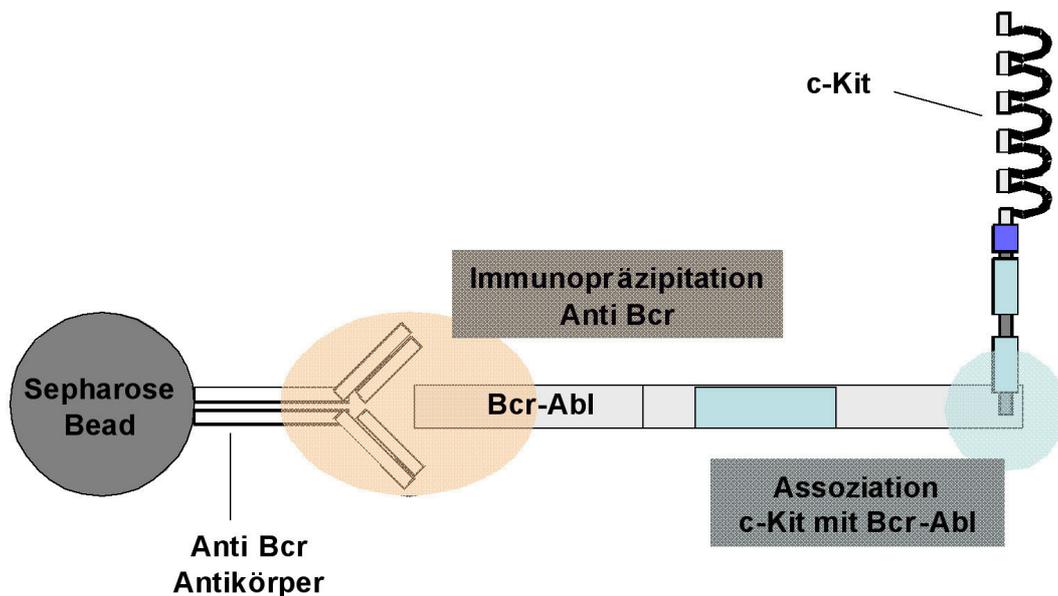


Abbildung 15: Schema der Immunpräzipitation Anti Bcr und Assoziation mit c-Kit

Es wird das Prinzip der IP gegen Bcr-Abl demonstriert. Ein primärer Antikörper bindet den Bcr-Anteil und bleibt an Sepharose-Beads hängen, von denen später die präzipitierten Proteine herausgelöst werden. c-Kit ist mit Bcr-Abl assoziiert und wird später auch in den Western-Blots detektiert.

Hier konnte die c-Kit Bande im Anti-Phosphotyrosin Blot nachgewiesen werden. In der ersten Spur, wie bereits angesprochen, technisch bedingt schwächer. Der Primäre Antikörper der Immunpräzipitation war gegen Bcr gerichtet, so dass als Aussage postuliert werden kann, dass c-Kit nach der Kopräzipitation mit Bcr-Abl in phosphoryliertem Zustand vorliegt.

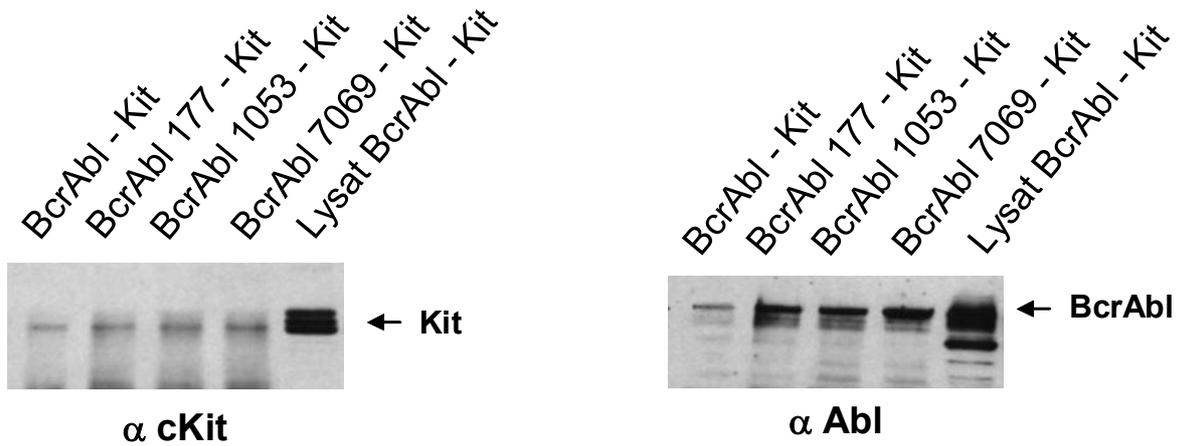


Abbildung 16: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-Bcr, Blot Anti-c-Kit

Nachweis der Assoziation von c-Kit mit Wildtyp Bcr-Abl und den Punktmutationen Bcr-Abl 177, 1053 und 7069. Keine dieser Mutationen führte zur Aufhebung der Kopräzipitation.

Abbildung 17: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-Bcr, Blot Anti-Abl

Nachweis von Expression und Präzipitation von Bcr-Abl in der Kopräzipitation. Kontrolle. Die unterschiedliche Bandenintensität konnte mit technisch bedingten Schwankungen der Proteinkonzentration im Zelllysate in Verbindung gebracht werden.

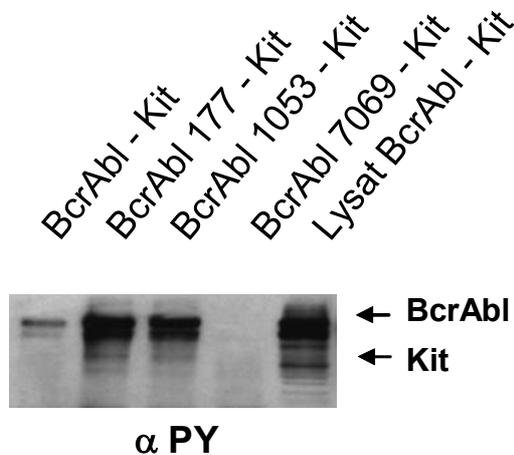


Abbildung 18: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-Bcr, Blot Anti-Phosphotyrosin

Eine der wichtigsten Aussagen konnte in diesem Experiment beobachtet werden. Die c-Kit Bande, welche in den ersten drei Spuren zu sehen ist, aber nicht in den beiden rechten Spuren, ist phosphoryliert. Nach der Immunpräzipitation gegen Bcr. Die ließ den Schluss zu, dass die Kopräzipitation von Bcr-Abl und c-Kit mit einer Phosphorylierung vergesellschaftet ist. Im Vergleich konnte die Bande im Rohlysate (rechte Spur), nicht detektiert werden, ebenso nicht in dem Experiment mit Kinase inaktivem Bcr-Abl (Bcr-Abl 7069). Die c-Kit Bande war in der linken Spur der eingescannten Abbildung schwer auszumachen, im original aber deutlich vorhanden. Die schwache Darstellung der Bande ist technisch Bedingt (vgl. Abbildung 17).

Im direkten Vergleich mit Abbildung 22 zeigte sich dort keine Phosphorylierung, da vermutlich der überwiegende Teil von c-Kit in nicht assoziierter Form mit Bcr-Abl vorlag. Die verhältnismäßig schwache Bandendarstellung in Abbildung 20 erhärtete diesen Verdacht. Es bleibt darauf hinzuweisen, dass die Bcr-Abl 7069 Mutante eine inaktive Kinase enthielt und somit, völlig den Erwartungen entsprechend, in den Phosphotyrosin-Blots der Abbildung 18 und Abbildung 22, keine phosphorylierten Tyrosinreste von Bcr-Abl und c-Kit detektiert wurden. Dies war ebenfalls ein Hinweis darauf, dass c-Kit nicht durch andere Kinasen intrazellulär phosphoryliert wurde, zumindest in diesem experimentellen Aufbau. Wie schon angedeutet, zeigte sich in dem gegenteilig aufgebauten Experiment der Abbildung 21, mit Immunpräzipitation gegen c-Kit, eine kräftige Bandendarstellung von c-Kit in allen Spuren, einschließlich der Punktmutanten von Bcr-Abl. Die Abbildung 20 ließ auch den Schluss zu, dass sämtliche verwendeten Punktmutanten in Bcr-Abl die Fähigkeit zur Kopräzipitation mit c-Kit nicht verloren hatten. Zusammenfassend konnte aus diesen sechs Abbildungen dieses Experiments geschlossen werden, dass alle verwendeten Bcr-Abl Punktmutanten mit c-Kit Assoziieren konnten und umgekehrt. Die Phosphorylierung von c-Kit im Rohlysat war nicht vorhanden, wogegen die ersten drei Spuren in Abbildung 18 belegten, dass nach der Immunpräzipitation c-Kit in phosphoryliertem Zustand vorlag. In der zweiten Spur von Rechts mit Verwendung der Bcr-Abl 7069 Mutante dagegen war c-Kit nicht im Phosphotyrosin-Blot, aber im c-Kit Blot nachweisbar. Dies belegte die Assoziation der Bcr-Abl 7069 Mutante mit c-Kit, allerdings unterblieb die Phosphorylierung.

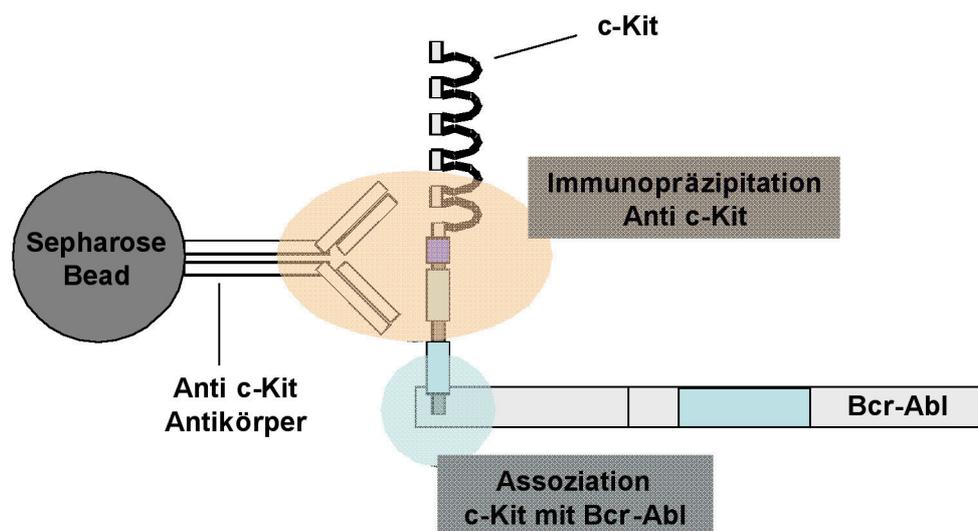


Abbildung 19: Schema der Immunpräzipitation gegen c-Kit mit Assoziation von Bcr-Abl

Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Experiments der folgenden drei Abbildungen. Immunpräzipitation von c-Kit mit daran gebundenem Bcr-Abl.

Es konnte vermutet werden, dass Bcr-Abl Wildtyp und die Mutanten 177 und 1053 durch eine Kopräzipitation mit c-Kit eine Phosphorylierung bedingten. Die Abbildung 19 zeigt den schematischen Versuchsaufbau des nächsten Experiments. Die folgenden Abbildungen demonstrieren die Immunpräzipitationen gegen c-Kit und das daran gebundene Bcr-Abl. Wie schon im vorhergehenden Experiment war der Nachweis des vermutlichen Bindungspartners in der Kopräzipitation, als nicht direkt gebundenes Protein, ein starker Hinweis auf eine direkte Assoziation. Um weitere Sicherheit in der Spezifität der untersuchten Bindung zu erreichen, bot es sich bei verfügbaren Antikörpern an, jeweils den einen (z.B. Bcr-Abl) Bindungspartner direkt zu binden. Im zweiten Experiment wurde das entsprechend andere Protein (z.B. c-Kit) direkt gebunden. Bei Immunpräzipitationen besteht grundsätzlich eine Unsicherheit, ob postulierte Bindungen direkt oder indirekt über andere Moleküle stattfinden. Auch die nicht selektive Bindung von Antikörpern kann die Ergebnisse beeinflussen. Je deutlicher eine Kopräzipitation nachzuweisen ist, besonders wenn unterschiedliche Primär-Antikörper gewählt werden, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Existenz der Bindung. Aus diesem Grund sei nun das Experiment mit dem Primär-Antikörper gegen c-Kit gezeigt. Wie bereits erklärt deutet die Darstellung von Bcr-Abl nach einer IP gegen c-Kit auf eine Bindung dieser beiden Proteine hin.

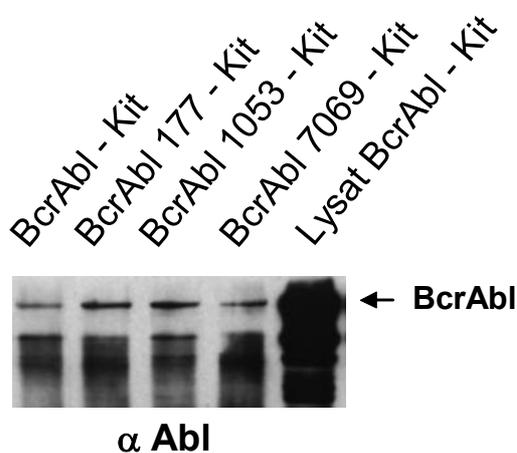


Abbildung 20: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-c-Kit, Blot Anti-Abl

In dieser IP wurde zunächst c-Kit gebunden. Die Detektion von Bcr-Abl Wildtyp und den Punktmutanten zeigte die Kopräzipitation der beiden Proteine.

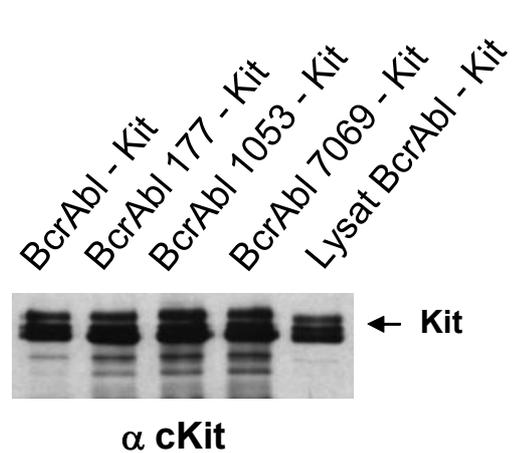


Abbildung 21: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-c-Kit, Blot Anti-c-Kit

Kontrollexperiment zum Nachweis der c-Kit Expression und dem Vorhandensein nach der Immunpräzipitation.

Diese Assoziation ist der Abbildung 20 zu entnehmen. Dieses Experiment gab Hinweise auf die Bindung sowohl von Wildtyp Bcr-Abl, als auch von den drei Punktmutanten. Als Kontrolle dient die Abbildung 21 welche c-Kit in allen Spuren des Western-Blots nachweist. Auch hier ist derselbe Western-Blot insgesamt dreimal verwendet worden. Zwischen den unterschiedlichen Detektions-Antikörpern für den Blot wurde jeweils ein Stripping-Verfahren angewendet, um die vorhergehenden Antikörper von der Membran zu lösen. Die Abbildung 22 zeigt noch einmal das Fehlen der Bande der Bcr-Abl 7069 Mutante. Ohne funktionierende Kinase konnte Bcr-Abl keine Autophosphorylierung durchführen und wurde auch nicht durch andere Kinasen phosphoryliert. Dies entsprach den typischerweise mit dieser Mutante gewonnenen Daten [Warmuth *et al.*, 1999]. Zusammen mit der Abbildung 18 konnte dies auf einen kausalen Zusammenhang für den dephosphorylierten Zustand von c-Kit, nach Kopräzipitation mit der Bcr-Abl 7069 Mutante, hinweisen. Im Umkehrschluss konnte die Phosphorylierung von c-Kit durch Bcr-Abl vermutet werden.

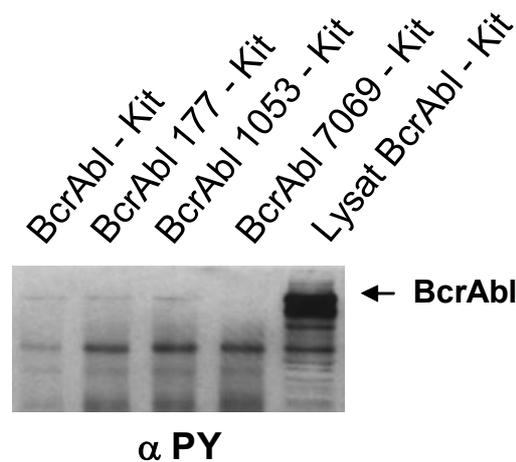


Abbildung 22: Immunpräzipitation Cos Kit/Bcr-Abl Mutanten, IP Anti-c-Kit, Blot Anti-Phosphotyrosin

Die Spur ganz rechts (Rohlysat) zeigte keine c-Kit Bande. Dies deutete darauf hin, dass c-Kit selbst bei Koexpression mit Bcr-Abl im Rohlysat nicht phosphoryliert war. Im Gegensatz zu Abbildung 18 war hier auch nach der IP keine Phosphorylierung zu erkennen. Dies konnte mit der Bindung des Primär-Antikörpers an c-Kit zu erklärt werden. Es wurde sehr wahrscheinlich c-Kit kopräzipitiert, ohne dass es mit Bcr-Abl assoziiert war. Andersherum in Abbildung 18 wurde nur die c-Kit Bande nach der Kopräzipitation mit Bcr-Abl dargestellt.

6.3 Optimierung der Expression von c-Kit-Mutationen im SF-9-Zellsystem

Nachdem die Interaktion von c-Kit und Bcr-Abl demonstriert worden ist, sowie Punktmutationen an Bcr-Abl keinen wesentlichen Einfluss auf die Assoziation gezeigt haben, sollte anschließend versucht werden eine mögliche Bindungsstelle von c-Kit näher einzugrenzen. Dies sollte mit einzelnen Fragmenten von c-Kit geschehen. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors ist lediglich für das Empfangen des Signals über Kopplung an den Stammzellsfaktor von Bedeutung. An der direkten Interaktion mit anderen intrazellulären Proteinen ist er nicht beteiligt. Daher wurde die Charakterisierung der Bindung mit Bcr-Abl nur mit intrazellulären Mutanten der einzelnen Domänen durchgeführt. Die Abbildung 23 listet die verwendeten Domänen von c-Kit, zusammen mit den wichtigsten Eigenschaften, wie das Molekulargewicht, und der Aminosäureanzahl, auf.

c-Kit Volllänge - 2928bp 976 AA 145kDa

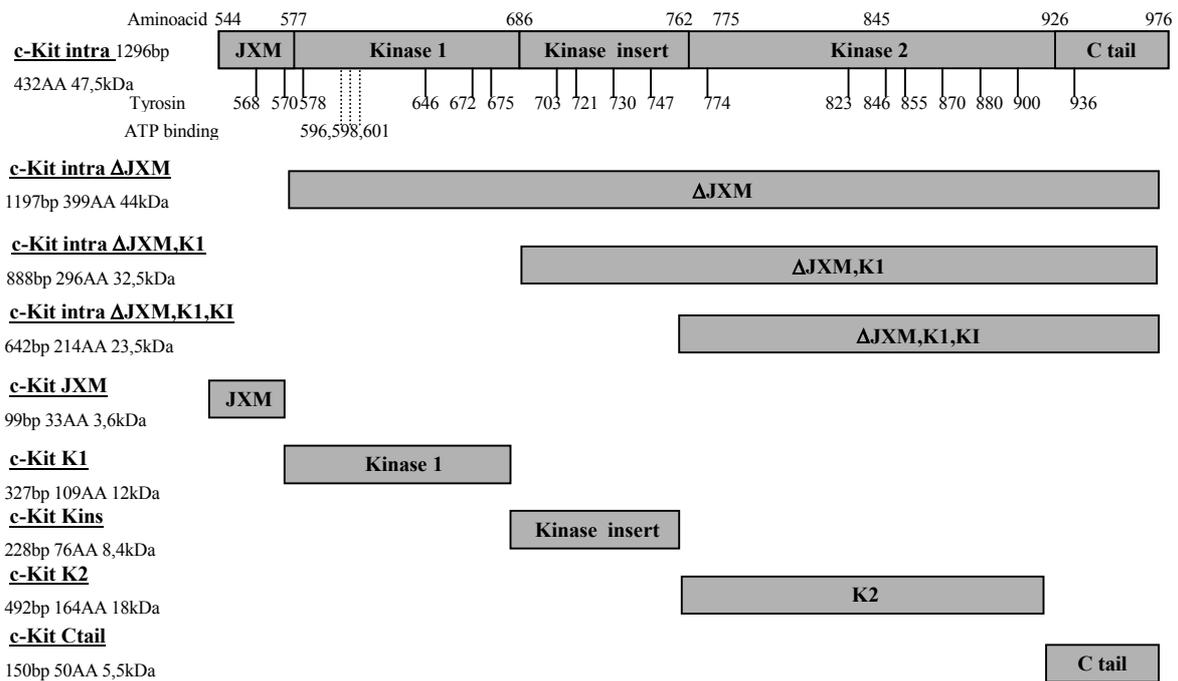


Abbildung 23: c-Kit Mutanten – Übersicht

Für die folgenden Experimente wurden Fragmente verwendet, welche den einzelnen Domänen von c-Kit entsprachen. Kristallstrukturanalysen mit verwandten Rezeptoren belegen, dass Trunkationen an der Transmembrandomäne die Struktur i.d.R. nicht ändern. Des Weiteren wurden immer kürzere Trunkationsmutanten (Δ JXM; Δ JXM,K1; Δ JXM,K1,K1) und auch einzelne Fragmente (JXM; Kinase 1; Kinase insert; Kinase 2; C tail) verwendet. Es sind die zugehörigen Molekulargewichte und Tyrosinreste aufgetragen.

Es ist davon auszugehen, dass die dreidimensionale Struktur bei Verwendung von dem gesamten intrazellulären Teil nicht verändert wurde. Kristallstrukturen von anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen wurden oft zunächst in Bruchstücken gelöst, bevor die Struktur des kompletten Rezeptors gewonnen werden konnte. Vergleiche zeigen, dass die Trunkation an der Transmembrandomäne keinen Einfluss auf die Struktur hat. Daher konnte die Mutante c-Kit intra, welche direkt an der Transmembrandomäne trunkiert wurde, als eine Mutante mit Wildtyp-Eigenschaften angesehen werden. Der Vorteil bei der Verwendung der reinen intrazellulären Domäne lag in der einfacheren Handhabung bei der Klonierung in den Expressionsvektor, sowie einer besseren Expression und Bandenschärfe. Zudem entfiel die Unsicherheit bei der Beurteilung der Banden auf dem Western-Blot, da eine, das Molekulargewicht beeinflussende Glykosylierung ausschließlich am Immunglobulin-ähnlichen Teil des extrazellulären Anteils stattfindet. Einzelne, schmale Banden sind eine wichtige Eigenschaft bei der Beurteilung des Proteinmusters eines Western-Blots, siehe Abbildung 26. Es wurde die Expression in Cos-Zellen, mit dem schon zuvor verwendeten Vektor pCDNA3, überprüft. Sehr gut zu erkennen war der bereits angesprochene Unterschied im Expressionsmuster. Der c-Kit Wildtyp, in der ersten Spur, zeigt das bisher schon gesehene breite Bandenmuster, wogegen die c-Kit Mutanten klare, einzelne Bande produzierten. Die Proteinmengen des Rohlysats, welches auf das Trenngel verbracht wurde, waren in allen Spuren gleich. Leider nahm die Expression der c-Kit Fragmente sehr stark ab, so dass sie auch durch Ausgleich der verwendeten Lysatmengen nicht mehr austariert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursache ist einerseits die Ineffektivität des Expressionssystems, z.B. die Promotor/Template Interaktion, um die gewünschten Fragmentgrößen zu produzieren. Andererseits kann auch das Zellsystem, welches aus Affennierenzellen gewonnen wurde, als Säugetier-System, durch Sekundärmodifikationen des produzierten Proteins, zu ungewünschten Resultaten führen. Es kann nicht erwartet werden, dass fehlende N-terminale Sequenzen in Trunkationsmutanten, ohne Folge in der Proteinexpression bleiben [Kozak, 1994]. Die Effektivität muss für jedes Protein neu validiert werden. Um möglichst beide Ursachen auszuschließen, wurde ein anderes Expressionssystem mit Insektenzellen verwendet. Die ausgewählte Zelllinie SF-9 zeichnete sich durch einfache Zellkulturbedingungen aus und die Möglichkeit über Virusvektoren stabil, oder auch mittels Lipofektion transient transfiziert zu werden. Letztere Möglichkeit zeigte sich als sehr effektiv und einfach in der Handhabung. Da die Detektion mit dem c-Kit-Antikörper sehr gut funktioniert hatte, sollten zunächst nur die Trunkationsmutanten verwendet werden. Bei diesen Mutanten war der C-Terminus noch vollständig erhalten.

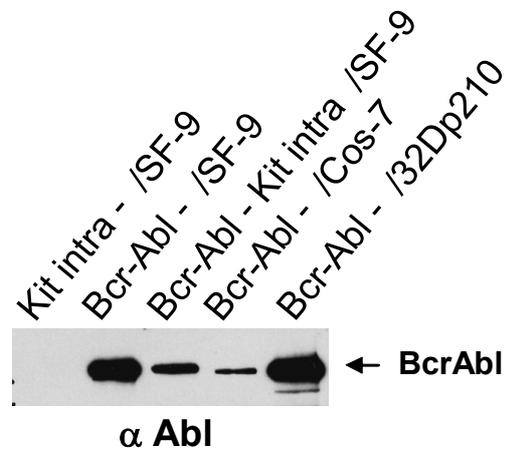


Abbildung 24: Optimierung der Bcr-Abl Transfektion von SF-9 Zellen

Es wurde das intrazelluläre c-Kit-Fragment und Wildtyp Bcr-Abl verwendet. Zunächst wurde nur einzeln transfiziert, dann in der dritten Spur auch kotransfiziert. Die Effizienz wurde mit der Expression von Bcr-Abl in 32Dp210 Zellen und der Transfektion in Cos Zellen verglichen. Die Expression in SF-9 Zellen ist deutlich höher, als in Cos-7 Zellen.

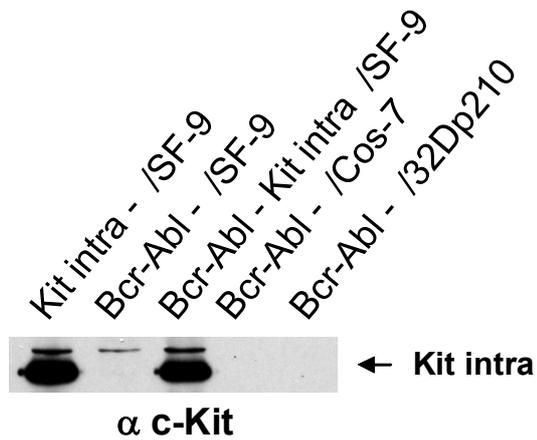


Abbildung 25: Optimierung der c-Kit Transfektion von SF-9 Zellen

Derselbe Western-Blot wie in Abbildung 24 mit Antikörper-Markierung gegen c-Kit. Die Einzel- und Kotransfektionen zeigten keinen Unterschied in der Expressionsstärke. Die Banden entsprachen dem intrazellulären c-Kit-Fragment.

Der Antikörper band die letzten 19 Aminosäuren des C-Terminus. Daher war es möglich, einen Vektor für die Transfektion zu verwenden, welcher keinerlei zusätzliche Proteinsequenzen für die Detektion (z.B. GST-Tag, His-Tag) exprimiert.

Die Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen die erfolgreiche Expression im SF-9 Zellsystem nach liposomaler Transfektion. Untersucht wurden Einzel-, sowie Doppeltransfektionen von c-Kit und Bcr-Abl. Wichtig war auch der Nachweis einer Expression der intrazellulären c-Kit-Mutante. Bei dieser Mutante fehlten bereits 5' gelegene DNA-Sequenzen, die gelegentlich die Expression negativ beeinflussen können. Es wurden bei dieser Mutante keine Einschränkungen bei der Expression festgestellt. Im Folgenden sollten noch kürzere Fragmente von c-Kit erstellt und exprimiert werden.

In der Abbildung 27 ist die gelungene Transfektion und Expression von intrazellulärem c-Kit (Kit intra) zu sehen. Auch die Kotransfektion mit Bcr-Abl lies sich problemlos durchführen, wodurch ausreichende Konzentrationen der Proteine, die im Lysat zur Verfügung standen, erreicht wurden. Die Kontrolle der Bcr-Abl Expression ist in Abbildung 28 zu sehen. Hier wurde noch einmal die Effektivität der Transfektion dem Cos-System gegenüber gestellt (vierte Spur). Bei alleiniger Transfektion von Bcr-Abl kam die gewonnene Proteinmenge sogar fast an die Menge der stabil transfizierten 32Dp210 Mäusezelllinie heran (fünfte Spur). 32Dp210 Zellen wurden schon im ursprünglichen Versuch zur Bindung von c-Kit und Bcr-Abl verwendet (siehe Abbildung 9).

Ein großer Vorteil von SF-9 Zellen ist nicht nur die Expression der Proteine, sondern sie führen auch die Sekundärmodifikationen, beispielsweise die Proteinfaltung und Phosphorylierung, wie in Säugetierzellen aus. In Abbildung 29 wurde der Zustand der Phosphorylierung überprüft. Intrazelluläres c-Kit (Kit intra) wurde im Phosphotyrosin-Blot des Rohlysats nicht detektiert. Dagegen kam die Bcr-Abl Bande in der zweiten bis fünften Spur gut zur Darstellung. Die erste Spur enthielt kein Bcr-Abl, es wurde nicht transfiziert. Damit war die Grundvoraussetzungen gegeben, um weitere Untersuchungen im SF-9 Zellsystem durchführen zu können. Anschließend wurden die Immunpräzipitationen mit den Proteinlysaten der SF-9 Zellen durchgeführt. In der Abbildung 30 und Abbildung 31 konnten, analog der Experimente im Cos-7 Zellsystem, Hinweise auf die gegenseitige Interaktion von Bcr-Abl und c-Kit aufgezeigt werden. Die schematischen Darstellungen aus Abbildung 15 und Abbildung 19 können zum besseren Verständnis noch einmal betrachtet werden. Wichtig ist jeweils der Nachweis des assoziierten Proteins, welches nicht direkt vom Primärantikörper erkannt wird. Beispielsweise die Detektion von c-Kit (Kit intra) in der zweiten Spur der Abbildung 30.

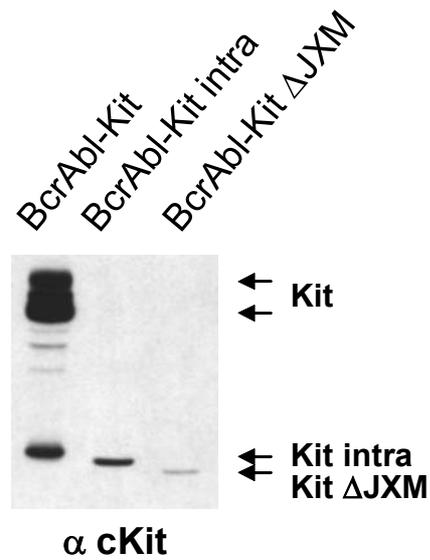


Abbildung 26: Lysate Bcr-Abl/Kit Mutanten, Blot Anti-c-Kit

Expression von c-Kit Trunktionsmutanten in Cos-Zellen. Die Expression war im Westernblot der Lysate gut nachvollziehbar. Allerdings nahm die Quantität des produzierten Proteins, auch nach Ausgleichen von DNA- und Proteinkonzentration deutlich ab. Daher wurde ein anderes Expressionssystem angestrebt. Hier sind Lysate aus SF-9 Zellen dargestellt.



Abbildung 27: Lysate SF-9, c-Kit intra/Bcr-Abl, Blot Anti-c-Kit

Expression von intrazellulärem c-Kit (Kit intra) und Kotransfektion mit Bcr-Abl in SF-9 Insektenzellen. Da die unterschiedlichen Glykosylierungen des extrazellulären Rezeptoranteils wegfielen, kam die Bande hier auf gleicher Höhe zur Darstellung.

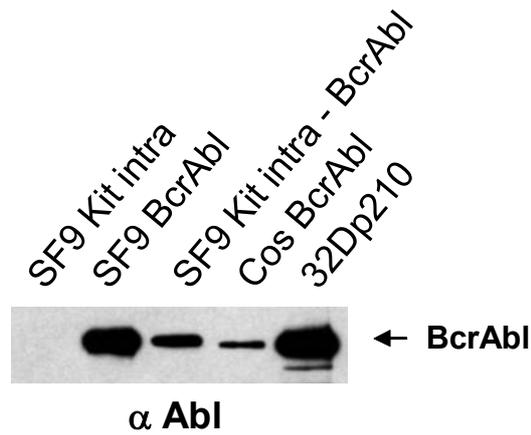


Abbildung 28: Lysate SF-9, c-Kit intra/Bcr-Abl, Blot Anti-Abl

Expression von Bcr-Abl in SF-9 Zellen. Wichtig war der Vergleich der Effektivität der Kotransfektion von Bcr-Abl mit c-Kit und der Vergleich mit den anderen Zellsystemen Cos-7 und 32Dp210. Die Expressionsrate in SF-9 Zellen war mit den stabil transfizierten 32Dp210 Zellen durchaus vergleichbar.

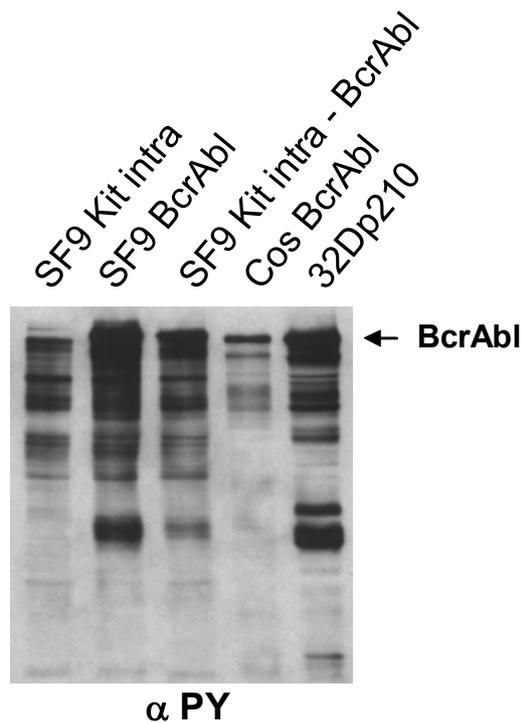


Abbildung 29: Lysate SF-9, Bcr-Abl/c-Kit intra, Blot Anti-Phosphotyrosin

Bcr-Abl wurde an seiner erwarteten Position in phosphoryliertem Zustand detektiert. In der ersten Spur wurde kein Bcr-Abl in die Zellen eingebracht, so dass es nicht zur Darstellung kam. Intrazelluläres c-Kit (Kit intra) lag im Rohlysate im nicht phosphorylierten Zustand vor, wie auch in den Cos-7 Zellen des Säugetierorganismus. Die unterschiedlichen Bandenstärken von Bcr-Abl entsprachen der Proteinmenge (vergl. Abbildung 28) und nicht dem Phosphorylierungsgrad.

Hier wurde mit Hilfe des Primärantikörpers zunächst Bcr-Abl gebunden. Die Darstellung von c-Kit zeigt somit die Kopräzipitation der beiden Proteine. Als Kontrolle dazu wurde das Experiment in Abbildung 31 geplant. Auch hier lagen die kopräzipitierten Proteine, entsprechend ihres Molekulargewichtes, auf der erwarteten Höhe im Trenngel. Tatsächlich konnte auch die Phosphorylierung von nicht membrangebundenem, intrazellulärem c-Kit ausschließlich nach der Immunpräzipitation nachvollzogen werden. Die Abbildung 32 belegte dies. Ausschließlich in den ersten beiden Spuren kam das intrazelluläre c-Kit, welches mit 47,5 kDa knapp unterhalb der Immunglobulin-Bande lag, in phosphoryliertem Zustand zur Darstellung. In den mit aufgetragenen Rohlysaten, der zwei rechten Spuren, wurde kein c-Kit (Kit intra) detektiert. Die stärkere Expression, im Vergleich mit den Cos-Zell Experimenten, konnte als Ursache vermutet werden, so dass hier auch nach IP gegen c-Kit der phosphorylierte Zustand nachgewiesen wurde.

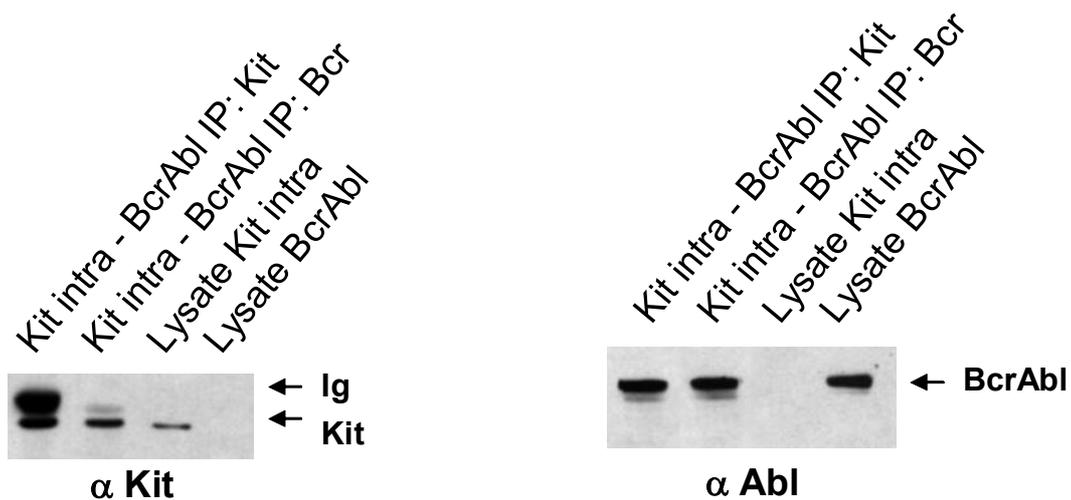


Abbildung 30: Immunpräzipitation SF-9, Bcr-Abl/c-Kit intra, Blot Anti-c-Kit

Die Bande von intrazellulärem c-Kit (Kit intra) kam, dem Molekulargewicht entsprechend, korrekt zur Darstellung. Das Molekulargewicht betrug 47,5 kDa, damit lag es knapp unter der Immunglobulin-Bande. In der zweiten Spur, nach der IP gegen Bcr-Abl wies die Detektion von intrazellulärem c-Kit auf eine Kopräzipitation mit Bcr-Abl hin.

Abbildung 31: Immunpräzipitation SF-9, Bcr-Abl/c-Kit intra, Blot Anti-Abl

Nach Stripping des in Abbildung 30 verwendeten Western-Blots wurde Bcr-Abl nach der IP gegen c-Kit in der ersten Spur nachgewiesen. Dies kontrollierte die Spezifität der Kopräzipitation. Bcr-Abl wurde in der erwarteten Höhe im Gel detektiert.

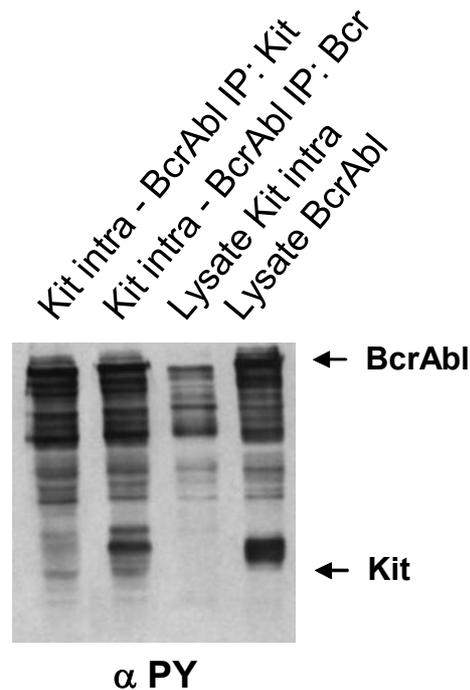


Abbildung 32: Immunpräzipitation SF-9, Bcr-Abl/c-Kit intra, Blot Anti-Phosphotyrosin

Es konnte die Phosphorylierung von intrazellulären c-Kit, welches nicht mehr membrangebunden war, nachvollzogen werden. Ausschließlich in den ersten beiden Spuren, welche die IP gegen c-Kit oder Bcr-Abl zeigten, konnte phosphoryliertes c-Kit nachgewiesen werden. Die Rohlysate beinhalteten zwar c-Kit (siehe Abbildung 30), jedoch in nicht phosphorylierten Form.

6.4 Verwendung von c-Kit Trunkationen zur Lokalisation einer Bindungsstelle

Das intrazelluläre c-Kit konnte mit Bcr-Abl kopräzipitiert werden. Im Folgenden sollte eine nähere Charakterisierung der Bindungsstelle erfolgen, welche relevant für diese Assoziation war. Die Frage nach einer genauen Lokalisation der Bindungsstelle ergab sich durch den Nachweis von c-Kit-Mutationen, welche bei unterschiedlichen Erkrankungen entdeckt wurden. Beispielsweise gibt es konstitutiv aktive Mutanten beim GIST-Tumor [Andersson *et al.*, 2002], aber auch bei der Mastozytose und der CML sind Mutationen von c-Kit nachgewiesen worden. Falls eine Domäne in c-Kit für den Bindungsmechanismus verantwortlich gemacht werden könnte und Mutationen von c-Kit bei CML Patienten in Einklang gebracht werden könnten, so würde dies möglicherweise ein neuer Ansatz zum Verständnis des Pathomechanismus sein. Bindungsstudien, welche zwischen c-Kit und anderen Signalmolekülen durchgeführt wurden, beispielsweise Hck, PI-3 Kinase und einigen mehr, konnten bestimmte Regionen für die Assoziation nachweisen [Lev *et al.*, 1992;

Thommes *et al.*, 1999]. Die Juxtamembrandomäne (JXM), das Kinaseinsert (KI) und auch der C-Terminus waren hier essentiell. Weniger relevant waren die zwei Kinase Regionen, welche für die Funktion des Phosphataustausches von Bedeutung waren. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kinase Region für die Phosphorylierung der bindenden Proteine verantwortlich ist, die drei genannten Domänen dagegen die Assoziation überhaupt erst bedingen. Von anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass einzelne Fragmente von c-Kit zur Lokalisation von Bindungsstellen der Bindungspartner verwendet werden können [Linnekin *et al.*, 1997]. Daher sollte die weitere Eingrenzung mit den Trunktionsmutanten geschehen. Wie auch der Abbildung 23 zu entnehmen ist, wurden die Trunkationen von N-terminal eingebracht, so dass immer kürzere c-Kit Mutanten entstanden. Dabei blieben stets die Kinase 2 Region und der C-Terminus erhalten, um die Detektion mit dem verwendeten Antikörper C19 zu gewährleisten. In Abbildung 33 werden die drei verschiedenen Trunkationen nach einer Immunpräzipitation, gegen c-Kit oder Bcr-Abl, gezeigt. Im Vergleich zu den vorherigen Experimenten, welche auch das vollständige intrazelluläre c-Kit enthalten haben, wurden bei diesen Trunktionsmutanten jeweils die zu untersuchende Domänen entfernt. Wie zu erkennen ist, war in allen Immunpräzipitationen, allerdings in unterschiedlicher Intensität, eine Kopräzipitation nachweisbar. Die jeweilig nach IP gegen c-Kit aufgetragenen Spuren deuteten auf eine Bindung von Bcr-Abl an c-Kit hin. Dies ließ den Schluss zu, dass die Bindungsstelle entweder in der Kinase 2 Region oder im C-Terminus lag.

Die Abbildung 34 zeigt dasselbe Experiment mit einem Western-Blot gegen c-Kit. Leider ist hier nur für die Mutanten Δ JXM und Δ JXM,K1 der Nachweis in den Immunpräzipitationen gegen c-Kit gelungen. Die Kreuzprobe in der IP gegen Bcr-Abl war technisch nicht durchführbar. Wie auch schon in der Abbildung 26 zur Darstellung kam, war die Expression von c-Kit Fragmenten ebenfalls technisch nicht ohne weiteres durchzuführen. Die Inkonsistenz in den Immunpräzipitationen konnte zum Teil mit dem Größenunterschied und der unterschiedlichen Expression der beiden Bindungspartner erklärt werden. Insbesondere die immer kleiner werdenden c-Kit-Trunkationen mit Molekulargewichten von 23,5 - 40 kDa, dazu noch von N-terminaler Seite trunkiert, stellten einen großen Gegensatz zum 210 kDa schweren Bcr-Abl dar. So war es zu erklären, dass die Immunpräzipitation einer erfolgten Bindung, mit Primärantikörper gegen c-Kit, detektiert werden konnte, andersherum aber nicht. Es wurden ebenfalls neue Mutanten hergestellt, welche zusätzlich eine Kozak-Sequenz gewahrt haben, um Sequenzen am 5' Ende für eine optimale Transkription zu gewährleisten [Kozak, 1994]. Es wurden keine Unterschiede im Expressionsverhalten festgestellt.

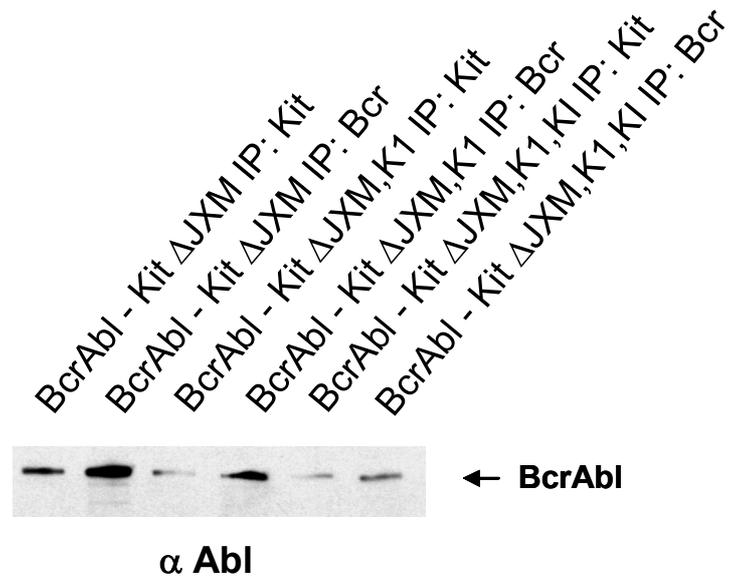


Abbildung 33: Immunpräzipitation SF-9 Bcr-Abl/c-Kit Mutanten, Blot Anti-Abl

Es wurden Immunpräzipitationen gegen c-Kit und Bcr-Abl durchgeführt. In diesem Experiment konnte eine Kopräzipitation der immer kürzer werdenden c-Kit-Fragmente mit Bcr-Abl bestätigt werden. Eine Bindungsstelle konnte demzufolge in der Kinase 2 Region oder am C-Terminus vermutet werden. In den Spuren der IP gegen c-Kit zeigten sich Hinweise auf eine Bindung an Bcr-Abl, welches hier detektiert war. Die Unterschiede der Bandenstärke konnten mit Konzentrationsschwankungen des Exprimierten Proteins in Einklang gebracht werden und waren nicht Ausdruck einer Intensität der Assoziation. Insbesondere die kürzeren c-Kit-Fragmente Δ JXM,K1 und Δ JXM,K1,KI waren hiervon betroffen.

Dennoch sind die Ergebnisse nicht grundsätzlich in Frage zu stellen, da eine Bindungsstelle am C-terminalen Ende von c-Kit sehr wahrscheinlich ist. Allein die Größe von Bcr-Abl würde eine Bindung an der Juxtamembrandomäne von c-Kit, welche beim präsentierten Rezeptor direkt unterhalb der Zellmembran liegt, deutlich erschweren. Um dennoch eine präzise Einordnung der Assoziation zu ermöglichen, wurden die in Abbildung 23 gezeigten c-Kit Mutanten der Einzeldomänen in einen Vektor kloniert, welcher die Expression in einem Bakteriensystem ermöglichte. Dieses Expressionssystem trägt den kommerziellen Namen TKX-1 und ist von der Firma Stratagene erhältlich. Die Vorteile waren die Kopplung an ein GST-Tag, die hohe Expressionseffizienz und die Möglichkeit über eine induzierbare Kinase eine Phosphorylierung des Proteins vorzunehmen. Dies erlaubte den direkten Vergleich von phosphoryliertem Protein und unphosphoryliertem Status während der Studien zur Assoziation mit Bcr-Abl. Leider war schon in den ersten Experimenten ersichtlich, dass das GST-Tag unter den gegebenen Versuchsbedingungen unspezifisch an Bcr-Abl gebunden

hatte. Andere Tags standen für dieses Expressionssystem, welches sehr spezielle Vektoren benötigt, nicht kommerziell zur Verfügung. Nach Rücksprache mit der Entwicklungsabteilung bei Stratagene, waren Versuche mit anderen Tags in demselben Vektor bei Stratagene erfolglos geblieben. Eine weitere Optimierung dieses Versuchsaufbaus wurde eingestellt. Da die durch diesen Versuchsaufbau gewonnenen Daten keine neuen Erkenntnisse erbrachten, wurde auf eine Abbildung verzichtet.

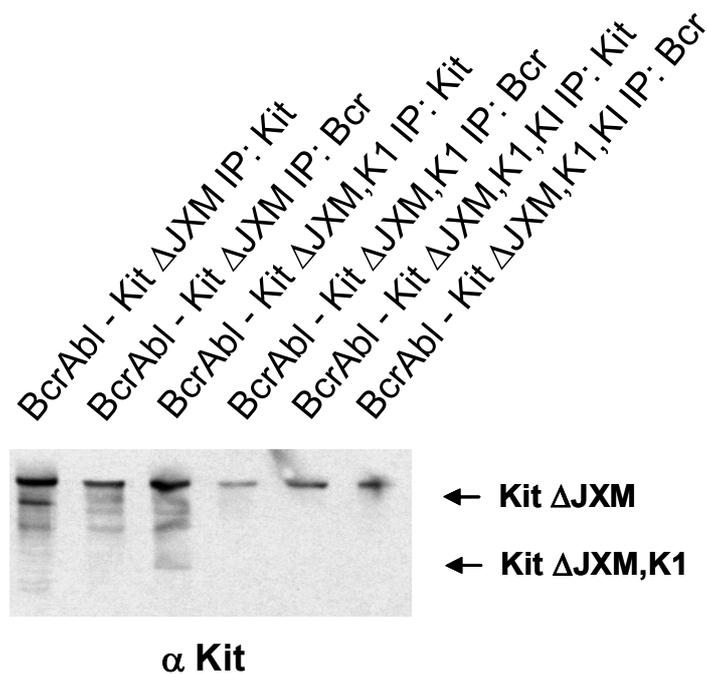


Abbildung 34: Immunpräzipitation SF-9 Bcr-Abl/c-Kit Mutanten, Blot Anti-c-Kit

Im Kontrollexperiment zur vorherigen Abbildung war die Assoziation nicht nachweisbar. Lediglich nach IP gegen c-Kit konnten die Trunkationen Δ JXM und Δ JXM,K1 detektiert werden. Dies bewies das Vorhandensein der Proteine nach der IP. Bei den noch kürzeren Fragmenten blieb die Detektion aus. Wie auch im Vorversuch mit Cos-Zellen (Abbildung 26) war die immer weiter abnehmende Menge des exprimierten Proteins als Ursache auszumachen.

Es konnte nach dieser Vielzahl an verschiedenen Versuchen, in unterschiedlichen Expressionssystemen, eine molekulare Assoziation von Bcr-Abl und c-Kit an dessen C-Terminus vermutet werden. Eine funktionelle Einschränkung von Bcr-Abl, durch Einbringung von Punktmutanten, wirkte sich auf diese Bindung nicht aus. Weitere, detailliertere Untersuchungen mit c-Kit Fragmenten waren nicht abschließend möglich.

7 Diskussion

7.1 Kritische Erwägungen der Methoden und Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beleuchtet die Assoziation und gegenseitige Phosphorylierung von Bcr-Abl und c-Kit im Kontext der CML. Es sollen einige grundsätzliche Anmerkungen zu den Ergebnissen von Expression, Immunpräzipitationen und Westernblots folgen.

7.1.1 Die Expression von Proteinen unterschiedlicher Größe

Um die Funktion der zellulären Proteine besser untersuchen zu können, ist das Einbringen von c-DNA in die Zellen, sei es als Wildtyp DNA oder als mutierte cDNA in Form von Plasmiden, Voraussetzung, um zu analysieren, welchen Effekt die dadurch überexprimierten Proteine in der Signaltransduktion hervorrufen. Als Zellsystem für die Untersuchung der Interaktion von Bcr-Abl und c-Kit diente die fibroblasten-ähnliche Zelllinie Cos-7. Diese Zelllinie wurde aus Affenierenepithelzellen gewonnen, die mit einer replikationsdefekten Variante des SV40-Virus transformiert wurden. Das Virus ist zwar nicht mehr in der Lage, seine eigene DNA zu replizieren, jedoch wird in den transformierten Zellen das SV40-T-Antigen exprimiert, das normalerweise die Replikation der viruseigenen DNA, ausgehend vom SV40-Replikationsursprung, aktiviert. Plasmide, die einen SV40-Replikationsursprung enthalten, werden in diesen transformierten Zellen episomal repliziert und die Proteine, für die die Plasmide kodieren, können auf diese Weise hocheffizient exprimiert werden. Für die Transfektion der Cos Zellen wurde das Plasmid pCDNA3 verwendet, welches diese Eigenschaften besitzt. Um die Plasmide in die Zellen zu transferieren, wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Vorteil dieser Methode ist die leichte Durchführbarkeit, da die plasmidische DNA über einfache physikalische Mechanismen an die Liposomen gebunden und so transmembranär in die Zellen transportiert werden kann. Für diese Art der Transfektion eignen sich besonders adhärent wachsende Zelllinien, wie die Cos-7 Zelllinie, da die liposomale Suspension gleichmäßig auf das Zellmonolayer ausgebracht werden kann und dadurch etwa 80 - 90% der Zellen transient transfiziert werden können. Nachteil der Methode ist die Unsicherheit bezüglich der Expressionseffizienz der zu exprimierenden Proteine. Zwar kann man die Menge an plasmidischer DNA abhängig von der jeweiligen Plasmidgröße optimieren, jedoch sind verschiedene Störfaktoren wie der Reinheitsgrad der DNA, der vorher bestimmt werden muss, oder die Wachstumsphase der Zellen, die transfiziert werden, für die Transfektionseffizienz bedeutsam. Trotz optimaler Vorbereitung einer Transfektion kann das

Ergebnis erst im abschließenden Westernblot an der Expressionsstärke der Proteine beurteilt werden. Dennoch ist die Expressionseffizienz in den verschiedenen Experimenten unterschiedlich und somit zum Teil auch die Aussagekraft der betroffenen Experimente geschmälert. In dieser Arbeit wurde versucht an den verschiedenen Schritten von der Herstellung der DNA bis zum Detektieren des Westernblots die Effizienz der Methoden zu verbessern. Letztlich wurden unterschiedliche Expressionssysteme etabliert und verwendet um die Bindungsstudien mit höherer Proteinreinheit durchzuführen. Grundsätzlich konnte durch die Expression in SF-9 Zellen eine deutlich bessere Expressionsstärke erzielt werden, dennoch blieb die gewünschte Menge an Protein der kleineren c-Kit Mutanten aus. Versuche mit gewahrter Kozak-Sequenz, welche für eine optimale Expression beschrieben wurde, erbrachten keinen signifikanten Vorteil [Kozak, 1994]. Es scheinen essentielle N-terminale Sequenzen vorzuliegen, welche sich bei Trunkationen von dieser Richtung negativ auf die Ablesebedingungen auswirken. Somit sind die Experimente mit c-Kit Mutanten auch nach Expression in SF-9 Zellen im Grenzbereich der Nachweisbarkeit in den Immunpräzipitationen geblieben. Eine Expression in einem bakteriellen System sollte die Menge an exprimierten Protein zusätzlich erhöhen. Leider störte das im Plasmid verwendete GST-Tag die Assoziation mit Bcr-Abl erheblich. Die Expression war gelungen, auch die nachfolgende Phosphorylierung mit einer Tyrosinkinase in den Bakterien konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Unerwartet konnten diese Proteine mit GST-Tag nicht verwendet werden, da eine unspezifische Bindung mit Bcr-Abl erfolgte. Modifizierungen an der Tag-Sequenz des Plasmids erschienen nach Rücksprache mit dem Hersteller aussichtslos. Die Firma Stratagene hatte mehrere erfolglose Bemühungen unternommen andere Tag-Sequenzen zu implementieren. Die Versuche mit c-Kit Mutanten wurden hier nach zahlreichen Experimenten eingestellt.

7.1.2 Die Aussagekraft von Immunpräzipitationen

Ein einzelnes Experiment, welches mittels einer Immunpräzipitation eine molekulare Assoziation nachweist, kann lediglich als Hinweis auf eine Bindung verstanden werden. Eine Vielzahl an Fehlerquellen relativiert die Aussagekraft eines Experiments. Daher sollten Immunpräzipitationen möglichst durch Kontrollexperimente ergänzt werden, um eine höhere Sicherheit bezüglich der Spezifität zu erhalten. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Immunpräzipitation in einer Pufferlösung erfolgt und nicht im natürlichen Zytosol. Bei Durchsicht der gängigen Literatur, insbesondere dem Material und Methoden Teil veröffentlichter Arbeiten, können große Unterschiede bei den verwendeten Pufferlösungen

festgestellt werden. Häufig wird ein modifizierter Standardpuffer verwendet, an dem Änderungen der Salzkonzentrationen vorgenommen werden. Die zu untersuchenden Proteine können ihre Struktur mehr oder weniger stark ändern, indem eine höhere Salzkonzentration im Puffer verwendet wird. Je nach Experiment und Zielprotein werden die Versuchsbedingungen optimiert. In wie weit die Ergebnisse noch einer physiologischen Interaktion entsprechen ist Gegenstand vielfacher Diskussionen. Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden allesamt mit einem Standardpuffer durchgeführt, welcher den natürlichen Gegebenheiten in der Zelle entspricht.

Selbstverständlich kann bei Immunpräzipitationen nicht völlig ausgeschlossen werden, dass nicht kleine Adaptorproteine, welche beide Proteine binden, oder unspezifische Bindung an die Sepharose-Beads für die Assoziation verantwortlich sind. Dies ist aber eine grundsätzliche Überlegung bei Immunpräzipitationen. Es bestand bei den hier durchgeführten Experimenten kein Hinweis auf eine solche Gegebenheit. Die mögliche Involvierung von einigen Adaptormolekülen wurde durch die Verwendung von Bcr-Abl Punktmutanten weitgehend ausgeschlossen, welche relevante Bindungsstellen aufgehoben haben. Dennoch sind einige bereits aufgezählte Proteine in der Lage sowohl c-Kit als auch Bcr-Abl zu binden. Inwiefern die Möglichkeit einer gleichzeitigen Bindung besteht, ist nicht bekannt. Die Tatsache, dass c-Kit und auch die intrazelluläre Mutante, nach einer Kopräzipitation in phosphorylierter Form vorlag, deutet sehr stark auf eine Interaktion mit Bcr-Abl hin. Es scheint besonders die Nähe der beiden Proteine wesentlich für den Phosphataustausch zu sein, da c-Kit im Rohlysat, demnach einer vermutlich größeren Entfernung zu Bcr-Abl, in nicht phosphoryliertem Zustand vorlag. Erst nach erfolgter Immunpräzipitation schien eine kritische Nähe erreicht worden zu sein um die Assoziation und den Phosphataustausch zu unterstützen.

Die Vorliegenden Ergebnisse der Immunpräzipitationen wurden in unterschiedlichen Zellsystemen zur Produktion der Proteine, sowie durch Kotransfektionen bestätigt. Die Tatsache, dass Schwankungen in der Bandenstärke zu verzeichnen waren, spiegelt die Tatsache wieder, dass diese Experimente im Grenzbereich der Durchführbarkeit erfolgt sind. Kleine Fragmente lassen sich häufig nicht ohne Einbußen bei der Expression herstellen. Wie schon bei der Darstellung der Ergebnisse selbst angesprochen wurde, ist die Assoziation von c-Kit und Bcr-Abl, im Vergleich mit der Kopräzipitation anderer Moleküle, eher als niedrig einzuschätzen. Ergebnisse von Bindungsstudien zwischen Hck und Bcr-Abl, mit sehr ähnlichem experimentellen Aufbau, wurden zum Vergleich herangezogen.

Nicht nur die Proteinexpression kann für die unterschiedliche Bandenstärke im Westernblot verantwortlich sein. Nach erfolgter Lyse der exprimierenden Zellen, muss die

Proteinkonzentration des Lysats auf eine gleiche Höhe gebracht werden, um gleiche Mengen Protein in die folgenden Immunpräzipitationen einzubringen. Der photometrische Nachweis der Proteinkonzentration konnte einfach bewerkstelligt werden. Ein entsprechender Ausgleich durch Verdünnung der Lysate war gut möglich. Die in die IPs einzubringenden Volumina waren ähnlich hoch und mit dem Gesamtvolumen des Ansatzes problemlos vereinbar. Jedoch kann die Durchführung der Immunpräzipitation, vor allem die Zugabe der Sepharose-Beads für Schwankungen der nachzuweisenden Proteinmenge verantwortlich sein. Die Proteine werden an einen Antikörper gebunden, der seinerseits an die Sepharose-Beads bindet (vgl. Abbildung 15). Die nicht gebundenen Anteile werden in vier Waschschrritten herausgelöst. Dies erfolgt im Überkopfschüttler im Kühlraum. In regelmäßigen Abständen wird das Eppendorfgefäß mit dem darin befindlichen Ansatz abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgesaugt. Dabei können Sepharose-Beads und Teile der Proteine, welche an die Beads gebunden sind, mit aspiriert werden. Entsprechend weniger Proteinmenge ist abschließend im Ansatz des Experiments vorhanden und wird auf das Trenngel für den späteren Westernblot aufgetragen. Auf diese beschriebenen Schwankungen wurde bei der Beschreibung der entsprechenden Abbildungen hingewiesen, so dass im Kontext des jeweiligen Experiments, trotz der kleinen Unterschiede in der Bandenstärke des Westernblots, die Gesamtaussage nachvollzogen werden kann.

7.2 Darstellung der wichtigsten Erkenntnisse im Kontext der Literatur

Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob eine nachgewiesene Bindung nicht nur möglich, sondern tatsächlich auch relevant für den physiologischen oder pathologischen Ablauf der Signaltransduktion ist. Die Frage, ob c-Kit als Tyrosinkinase-Rezeptor von einer weiteren Tyrosinkinase Bcr-Abl von intrazellulär stimuliert wird, ist ein wesentlicher Diskussionspunkt. Grundsätzlich weisen die Beobachtungen von CML Zellen daraufhin, dass c-Kit zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung der CML eine Rolle in der klonalen Expansion und auch der Eosinophilie spielen könnte. Ob tatsächlich der Stimulus durch SCF oder von intrazellulärer Seite durch Bcr-Abl vermittelt wird bleibt weiter unklar. Grundsätzlich ist die Interaktion von c-Kit mit anderen Kinasen nichts ungewöhnliches, beispielsweise sind die Src-Kinasen auch im physiologischen Zusammenhang Bindungspartner [Linnekin *et al.*, 1997]. Dass tatsächlich eine Signaltransduktion zwischen c-Kit und Bcr-Abl stattfindet, wird durch die hier gezeigten Experimente postuliert, welche den Phosphorylierungszustand von c-Kit vor und nach der Immunpräzipitation überprüfen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bindung selbst keine sehr hohe Affinität zu

haben scheint. Vergleiche mit Bindungsstudien zwischen c-Kit und der Src-Kinase Hck haben eine deutlichere Nachweisbarkeit der Assoziation gezeigt (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist die wesentlich Aussage von der Fähigkeit des gegenseitigen Phosphataustausches abhängig. Deutliche Hinweise darauf konnten in mehreren gezeigten Experimenten aufgezeigt werden.

Durch die Beantwortung der Frage ob eine Interaktion zwischen Bcr-Abl und c-Kit besteht, kann eine weitere Frage sein ob additive Effekte unterschiedlicher Wachstumsfaktoren zusammen mit Bcr-Abl vorhanden sind. Besonders IL-3 und SCF sind an der Pathogenese der CML beteiligt. Zudem wurde auch eine mögliche gegenseitige Inhibierung von Wachstumsfaktoren beschrieben [Magrangeas *et al.*, 2001], so dass auch die Überprüfung negativ beeinflussender Faktoren von Bedeutung ist. Da Bcr-Abl positive Zellen, welche zugleich CD34 positiv sind, eine sehr hohe Proliferation nach Stimulierung mit IL-3 oder SCF zeigen [Moore *et al.*, 1998], weiter differenzierte Zellen aber Wachstumsfaktor unabhängig werden [Kabarowski *et al.*, 1994], besteht die Möglichkeit, dass einige Faktoren früher als andere funktionslos werden. Die weitere Charakterisierung der Funktion von Wachstumsfaktoren stellt einen wesentlichen Schritt im Verständnis der gegenseitigen Interaktion im pathogenetischen Ablauf der Erkrankung dar. Sollten Wachstumsfaktorrezeptoren nur in Bcr-Abl positiven Zellen von intrazellulär stimuliert werden, könnte es bedeuten, dass eine Gabe von SCF zu einer stärkeren Proliferation von gesunden Zellen führt. Die klonale Ausbreitung von malignen Zellen könnte damit etwas gebremst werden. Maligne Zellen würden dagegen wenig beeinflussbar sein. Gegen diese Theorie spricht, dass besonders bei CD34 positiven Zellen c-Kit als wesentlicher Wachstumsfaktor für das Überleben und auch für proliferative Effekte verantwortlich gemacht werden konnte [Moore *et al.*, 1998]. Vor allem der Vergleich zwischen gesunden und CML Zellen konnte diese Unterschiede deutlich machen. Ausschließlich die Bcr-Abl positiven Patientenzellen waren in der Lage, unter alleiniger Zugabe von SCF, in dem Kulturmedium zu proliferieren. Bcr-Abl negative Zellen konnten lediglich in Kultur aus einem Mix mit vier verschiedenen Wachstumsfaktoren, IL-6, IL-3, G-CSF und SCF wachsen. Eine andere Arbeitsgruppe, Dorsey *et al.*, konnte IL-3 als Faktor identifizieren, welcher Bcr-Abl positive Zellen vor Apoptose durch STI-571 schützt [Dorsey *et al.*, 2002]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Signaltransduktion von c-Kit und IL-3R in der Entwicklung der CML eine wichtige Rolle spielt. Die Tatsache, dass besonders CD34 positive, unreife Stammzellen mit der Fähigkeit zu proliferieren und zu differenzieren, reagibel sind, deutet möglicherweise auf eine sensible Phase der betroffenen Zellen in der Entwicklung der CML hin. Versuche in der hämatopoetischen Zellreihe FDCP-Mix, welche mit einer

Temperatursensitive Mutante von Bcr-Abl transfiziert wurde, beweist eine erhöhte Sukzeptibilität für SCF, nur wenn Bcr-Abl aktiv ist [Pierce *et al.*, 2002]. Einen weiteren Hinweis liefert die Arbeit von Inokuchi *et al.*, welche aktivierende Mutationen von c-Kit in Patientenproben beschreibt [Inokuchi *et al.*, 2002]. Zwei verschiedene Mutationen der Juxtamembrandomäne führen zu einer verstärkten Aktivierung des c-Kit Rezeptors durch SCF und einer höheren Gesamtphosphorylierung in der Zelle. Dieser Mechanismus würde weiter dafür sprechen, dass die Stimulation mit SCF einen begünstigenden Effekt auf die Bcr-Abl positiven Zellen hat. Je weiter die Erkrankung voranschreitet, umso mehr CML Zellen befinden sich im Knochenmark des Patienten. Die Erkrankung breitet sich in der chronischen Phase schleichend aus. Vermutlich wird eine weitere Mutation im Erbgut der Zellen notwendig sein um den Übergang in die Akzelerierte Phase zu bewirken [Fialkow *et al.*, 1981]. Dieses Zweitereignis könnte auch dafür verantwortlich sein, dass die CML Zellen in zunehmender Weise Wachstumsfaktor unabhängig werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass weiter ausgereifte Zellen, welche CD34 negativ geworden sind, die Stimulation des Stammzellfaktors grundsätzlich nicht mehr benötigen, da weitere Zellteilungen nicht mehr vorgesehen sind. Weitere Untersuchungen in den unterschiedlichen Phasen der CML, welche das Verhalten von Patienten-Zellen, Philadelphia positiv versus negativ untersuchen, sind notwendig um diese Theorien zu erhärten. Besonders die Abhängigkeit von SCF, beziehungsweise additive Effekte mehrerer Wachstumsfaktoren könnten diese Zusammenhänge näher beleuchten. Scheinbar bewirkt eine Stimulierung mit SCF einen proliferativen Effekt, obwohl Bcr-Abl vorhanden ist und c-Kit binden und aktivieren kann [Moore *et al.*, 1998]. Ob dieser Umstand von weiteren Signalmolekülen abhängig ist bleibt weiterhin ungeklärt. In diesem Zusammenhang müsste weiter definiert werden, inwieweit c-Kit auf den Patientenzellen exprimiert wird und ob der Rezeptor in phosphoryliertem, also aktiviertem Zustand vorliegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten sehr stark darauf hin, dass Bcr-Abl in der Lage den c-Kit Rezeptor zu binden und auch zu phosphorylieren. Diese Gegebenheit könnte erklären, warum CML Zellen ab einen bestimmten Zeitpunkt wachstumsfaktorunabhängig sind. Da Bcr-Abl die Rezeptoren selbst stimuliert, ist es vorstellbar, dass auch andere Rezeptoren von der intrazellulären Seite stimuliert werden. Wie schon angedeutet weisen diese Abläufe darauf hin, dass sich die Relevanz der Stimuli durch Wachstumsfaktoren im Verlauf der Erkrankung ändert. Sowohl für IL-3, als auch für den SCF, aber auch weitere, hier nicht näher diskutierte Faktoren, ist dies eine mögliche Erklärung.

7.3 Ausblick

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit den verwendeten c-Kit Trunkationen deutet auf eine Bindungsstelle am C-Terminus oder der Kinase 2 Region von c-Kit hin. Bcr konnte in der IP gegen c-Kit auch bei der Mutante c-Kit Δ JXM,K1,KI nachgewiesen werden, allerdings nicht im Kontrollexperiment mit IP gegen Bcr. Weitere Klärung könnte möglicherweise durch die Verwendung von c-Kit Punktmutanten erfolgen. Nach dem heutigen Wissensstand erscheint es wahrscheinlich, dass die Assoziation von c-Kit mit anderen Signalproteinen über tyrosinhaltige Bindemotive erfolgt. Mutationen an entsprechenden intrazellulären Tyrosin-Positionen könnten die Effizienz der Expression verbessern und somit die Assoziation mit Bcr-Abl näher beleuchten. Besonders die Aminosäurepositionen 936 im C-Terminus erscheint hier sehr interessant, da dies den vorliegenden Daten zufolge die wahrscheinlichste Lokalisation der Bindung ist. Ergebnisse aus diesen weiterführenden Experimenten könnten zusätzliche Informationen bezüglich der Spezifität von neuen Wirkstoffen liefern. Eine Blockierung der Signaltransduktion von c-Kit könnte, wie schon beschrieben wurde, mehreren Erkrankungen zugute kommen.

Zusätzlichen Informationsgewinn darf sich erhofft werden aus Daten zur funktionellen Interaktion von c-Kit. So kann beispielsweise die Möglichkeit der intrazellulären Inhibition von c-Kit durch eine Stimulierung der Zellen mit IL-3 diskutiert werden. Dies könnte eine Hochregulierung von CIS bewirken [Yoshimura *et al.*, 1995]. Der IL-3R ist ebenso wie c-Kit in die Aktivierung JAK/STAT-Kaskade involviert. Diese Aktivierung benötigt wiederum eine spezifische Inhibition, welche durch die SOCS-Proteine erfolgt. Da Bcr-Abl selbst, ebenso wie der IL-3 Rezeptor, die JAK/STAT-Kaskade aktiviert, könnte dieser Mechanismus zum Erliegen gebracht worden sein. Insbesondere für STAT5 ist eine konstitutive Aktivierung durch Bcr-Abl in Bcr-Abl positiven Zellen nachgewiesen [Kindler *et al.*, 2003]. In Zellen aus SOCS1 Knockout-Mäusen besteht eine erhöhte Transformationsrate, welches mit der STAT-Aktivierung in Zusammenhang stehen könnte. Umgekehrte bewirkt die Überexpression von SOCS1 eine Unterbindung der SCF vermittelten Proliferation und Reduzierung der Metastasierung Bcr-Abl transformierter Zellen [Rottapel *et al.*, 2002]. In dieser Arbeit wurde zudem die Interaktion von SOCS1 und v-Src ausgeschlossen. Src-Familien-Mitglieder Hck und Lyn sind Bindungspartner von c-Kit [Linnekin *et al.*, 1997]. Donato *et al.* konnte zeigen, dass Lyn und Hck in STI 571 resistenten Zellen eine zunehmende Aktivität besitzen [Donato *et al.*, 2003]. Es kann diskutiert werden, ob möglicherweise c-Kit für diese Aktivierung mitverantwortlich ist, oder es einen weiter Zentral sitzenden Mechanismus gibt, welcher die Bcr-Abl positiven Zellen zur Überexpression von weiteren Kinasen treibt.

Die Fähigkeit, inhibierende Signale durch die SOCS-Familie, von einem aktivierten Rezeptor auf einen anderen zu übertragen, ermöglicht einen weiteren Interpretationsansatz um die verschiedenartige Abhängigkeit der CML Zellen von Wachstumsfaktoren zu erklären. Magrangeas et al. hat die gegenseitige Inhibition von IL-3 und IL-11 durch SOCS3 beschrieben [Magrangeas *et al.*, 2001]. Auch andere Arbeitsgruppen haben schon früher die gegenseitige Inhibierung von Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung von hämatopoetischen Zellen festgestellt. CIS und SOCS3 konnten bisher dafür verantwortlich gemacht werden [Bode *et al.*, 1999]. Nachdem sowohl c-Kit als auch IL-3R dieselben JAK/STAT-Kaskaden verwenden, welche grundlegende Voraussetzung für die Inhibition durch SOCS sind, liegt es nahe, einen negativ Crosstalk zu vermuten [Ashman, 1999; Magrangeas *et al.*, 2001]. Die Möglichkeiten der Realtime-PCR könnte hier gute Voraussetzungen liefern die Reaktionen der SOCS-Proteine auf die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren zu untersuchen. Diese Untersuchungen würden die gewonnen Daten der Bindungsstudie in funktionellen Zusammenhang, inwiefern Bcr-Abl die Regulation von Wachstumsfaktoren verändert und ob eine direkte Assoziation mit c-Kit notwendig ist um dies zu bewirken. Zudem müssten Proliferations-Assays mit IL-3 und SCF Stimulierung durchgeführt werden, um hier weitere Klarheit zu erreichen. Ein experimenteller Aufbau, der die Zeitliche Einordnung der Proliferation, als auch der SOCS-Expression nach Stimulierung erlaubt, wäre von großem Interesse. Da 32D Zellen kein endogene c-Kit exprimieren, sollte auf ein anderes Zellsystem ausgewichen werden. Besonders eignen könnten sich FDCP-mix Zellen, welche c-Kit exprimieren und auch die Fähigkeit zur Differenzierung nicht verloren haben. Das bedeutet ebenfalls, dass diese Zellen als Modell für ein früheres Erkrankungsstadium dienen könnten, welches besonders sensibel auf SCF Stimulierung reagiert. Eine Temperatursensitive Mutante zur gesteuerten Bcr-Abl Expression in diesem System steigert die Zahl der möglichen Experimente zusätzlich [Pierce *et al.*, 2002].

Um dem Kritikpunkt der *in vitro* Ergebnisse gerecht zu werden sollte dringend Charakterisierungen von Patientenzellen in verschiedenen Stadien der Erkrankung durchgeführt werden um weitere Rückschlüsse auf den tatsächlichen Ablauf der Erkrankung zu liefern. Insbesondere die Untersuchung der Reaktion hinsichtlich der Proliferation und Differenzierung nach Stimulierung mit Wachstumsfaktoren, bei gleichzeitiger Kontrolle der Expression der genannten Signalproteine, würde sehr viele Erkenntnisse liefern. Die Möglichkeiten der genomischen Charakterisierung von Patientenproben könnte ergänzende Informationen liefern, ob bestimmte Abberationen für die Auslösung der Blastenkrise verantwortlich sind.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die durchgeführten Experimente zur Charakterisierung der molekularen Assoziation der Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit mit dem Onkoprotein Bcr-Abl. Es wird in der zeitlichen Abfolge der chronisch myeloischen Leukämie (CML) besonders für die chronische Phase eine Beteiligung des Stammzellfaktors (SCF), dem natürlichen Liganden von c-Kit, an der Proliferation des malignen Zellklons vermutet. Ob hierbei eine Stimulierung durch SCF wesentlich ist, oder ob der Rezeptor von intrazellulärer Seite durch Bcr-Abl stimuliert wird ist eine wichtige Frage für das Verständnis der Progression der CML. Um diese Frage zu beantworten, wurden Expressionssysteme in Säugetierzellen und Insektenzellen optimiert, um eine hohe Produktion von c-Kit zu gewährleisten. Es wurde eine Koexpression von c-Kit und Bcr-Abl hergestellt um gute Bedingungen in den nachfolgenden Immunpräzipitationen (IP) zu schaffen. In diesen Studien konnte eine Kopräzipitation von c-Kit und Bcr-Abl erstmals nachgewiesen werden. Die Bindungspartner waren jeweils im Western-Blot der IP nachweisbar, sowohl nach Präzipitation von Bcr-Abl, als auch von c-Kit. Im Western-Blots konnte der Status der Tyrosinphosphorylierung von c-Kit detektiert werden. Eindeutige Hinweise auf die Aktivierung von c-Kit durch Bcr-Abl konnten durch diese Experimente zum ersten Mal nachgewiesen werden. Punktmutationen an funktionell relevanten Positionen in Bcr-Abl änderten nichts an der gezeigten Interaktion, bis auf eine Kinase-inaktive Mutante, die keine Phosphorylierung von c-Kit mehr bewirkte. Um eine Bindungsstelle in c-Kit zu charakterisieren, wurden dann Trunktationsmutanten von c-Kit hergestellt. Dabei wurde der extrazelluläre Rezeptoranteil entfernt und immer kürzere Mutanten, durch Entfernung einzelner struktureller Domänen von N-terminal, hergestellt. Diese wurden in IPs mit Bcr-Abl eingesetzt. Es konnte für sämtliche Mutanten eine Kopräzipitation gezeigt werden, so dass eine Assoziationsstelle von c-Kit nicht klar ermittelt werden konnte.

9 Literaturverzeichnis

(1994). Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 330, 820-825.

(1997). Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* 89, 1616-1620.

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

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

Ahuja, H., Bar-Eli, M., Advani, S. H., Benchimol, S., and Cline, M. J. (1989). Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6783-6787.

Albrecht, T., Schwab, R., Henkes, M., Peschel, C., Huber, C., and Aulitzky, W. E. (1996). Primary proliferating immature myeloid cells from CML patients are not resistant to induction of apoptosis by DNA damage and growth factor withdrawal. *Br J Haematol* 95, 501-507.

Alimena, G., Dallapiccola, B., Gastaldi, R., Mandelli, F., Brandt, L., Mitelman, F., and Nilsson, P. G. (1982). Chromosomal, morphological and clinical correlations in blastic crisis of chronic myeloid leukaemia: a study of 69 cases. *Scand J Haematol* 28, 103-117.

Amos, T. A., Lewis, J. L., Grand, F. H., Gooding, R. P., Goldman, J. M., and Gordon, M. Y. (1995). Apoptosis in chronic myeloid leukaemia: normal responses by progenitor cells to growth factor deprivation, X-irradiation and glucocorticoids. *Br J Haematol* 91, 387-393.

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., and et al. (1990). Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 63, 235-243.

Andersson, J., Sjogren, H., Meis-Kindblom, J. M., Stenman, G., Aman, P., and Kindblom, L. G. (2002). The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am J Pathol* 160, 15-22.

Andre, C., d'Auriol, L., Lacombe, C., Gisselbrecht, S., and Galibert, F. (1989). c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene* 4, 1047-1049.

Arakawa, T., Yphantis, D. A., Lary, J. W., Narhi, L. O., Lu, H. S., Prestrelski, S. J., Clogston, C. L., Zsebo, K. M., Mendiaz, E. A., Wypych, J., and et al. (1991). Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. *J Biol Chem* 266, 18942-18948.

Ashman, L. K. (1999). The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1037-1051.

Ashman, L. K., Cambareri, A. C., To, L. B., Levinsky, R. J., and Juttner, C. A. (1991). Expression of the YB5.B8 antigen (c-kit proto-oncogene product) in normal human bone marrow. *Blood* 78, 30-37.

Aurich, J., Duchayne, E., Huguet-Rigal, F., Bauduer, F., Navarro, M., Perel, Y., Pris, J., Caballin, M. R., and Dastugue, N. (1998). Clinical, morphological, cytogenetic and molecular aspects of a series of Ph-negative chronic myeloid leukemias. *Hematol Cell Ther* 40, 149-158.

Aye, M. T., Hashemi, S., Leclair, B., Zeibdawi, A., Trudel, E., Halpenny, M., Fuller, V., and Cheng, G. (1992). Expression of stem cell factor and c-kit mRNA in cultured endothelial cells, monocytes and cloned human bone marrow stromal cells (CFU-RF). *Exp Hematol* 20, 523-527.

Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.

Barber, D. L., Mason, J. M., Fukazawa, T., Reedquist, K. A., Druker, B. J., Band, H., and D'Andrea, A. D. (1997). Erythropoietin and interleukin-3 activate tyrosine phosphorylation of CBL and association with CRK adaptor proteins. *Blood* 89, 3166-3174.

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

Barry, S. C., Korpelainen, E., Sun, Q., Stomski, F. C., Moretti, P. A., Wakao, H., D'Andrea, R. J., Vadas, M. A., Lopez, A. F., and Goodall, G. J. (1997). Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function. *Blood* 89, 842-852.

Bartram, C. R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., Geurts van Kessel, A., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson-Smith, M. A., Davies, T., Stone, M., and et al. (1983). Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 277-280.

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

Bene, M. C., Bernier, M., Casasnovas, R. O., Castoldi, G., Knapp, W., Lanza, F., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., Sperling, C., and van't Veer, M. B. (1998). The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 92, 596-599.

Besmer, P. (1991). The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic growth and differentiation factor. *Curr Opin Cell Biol* 3, 939-946.

Besmer, P., Murphy, J. E., George, P. C., Qiu, F. H., Bergold, P. J., Lederman, L., Snyder, H. W., Jr., Brodeur, D., Zuckerman, E. E., and Hardy, W. D. (1986). A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase gene family. *Nature* 320, 415-421.

- Bhat, A., Kolibaba, K., Oda, T., Ohno-Jones, S., Heaney, C., and Druker, B. J. (1997). Interactions of CBL with BCR-ABL and CRKL in BCR-ABL-transformed myeloid cells. *J Biol Chem* 272, 16170-16175.
- Bhatia, R., McCarthy, J. B., and Verfaillie, C. M. (1996). Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 87, 3883-3891.
- Bhatia, R., and Verfaillie, C. M. (1998). The effect of interferon-alpha on beta-1 integrin mediated adhesion and growth regulation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 28, 241-254.
- Biggs, J. C., Szer, J., Crilley, P., Atkinson, K., Downs, K., Dodds, A., Concannon, A. J., Avalos, B., Tutschka, P., Kapoor, N., and et al. (1992). Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2. *Blood* 80, 1352-1357.
- Blalock, W. L., Weinstein-Oppenheimer, C., Chang, F., Hoyle, P. E., Wang, X. Y., Algate, P. A., Franklin, R. A., Oberhaus, S. M., Steelman, L. S., and McCubrey, J. A. (1999). Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* 13, 1109-1166.
- Blechman, J. M., Lev, S., Barg, J., Eisenstein, M., Vaks, B., Vogel, Z., Givol, D., and Yarden, Y. (1995). The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction. *Cell* 80, 103-113.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Haussinger, D., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1999). LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett* 463, 365-370.
- Boring, C. C., Squires, T. S., and Tong, T. (1993). Cancer statistics, 1993. *CA Cancer J Clin* 43, 7-26.
- Braga, G. W., Chauffaille, M. L., Moncau, J. E., Souto, E. X., Silva, M. R., and Kerbauy, J. (1996). Chronic myeloid leukemia (CML): prognostic factors and survival analysis. *Rev Paul Med* 114, 1083-1090.
- Brizzi, M. F., Dentelli, P., Rosso, A., Yarden, Y., and Pegoraro, L. (1999). STAT protein recruitment and activation in c-Kit deletion mutants. *J Biol Chem* 274, 16965-16972.
- Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., and 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.
- Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Muller, M., Druker, B. J., and Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56, 100-104.

- Buhring, H. J., Ullrich, A., Schaudt, K., Muller, C. A., and Busch, F. W. (1991). The product of the proto-oncogene c-kit (P145c-kit) is a human bone marrow surface antigen of hemopoietic precursor cells which is expressed on a subset of acute non-lymphoblastic leukemic cells. *Leukemia* 5, 854-860.
- Burton, E. A., Hunter, S., Wu, S. C., and Anderson, S. M. (1997). Binding of src-like kinases to the beta-subunit of the interleukin-3 receptor. *J Biol Chem* 272, 16189-16195.
- Cambareri, A. C., Ashman, L. K., Cole, S. R., and Lyons, A. B. (1988). A monoclonal antibody to a human mast cell/myeloid leukaemia-specific antigen binds to normal haemopoietic progenitor cells and inhibits colony formation in vitro. *Leuk Res* 12, 929-939.
- Carella, A. M., Chimirri, F., Podesta, M., Pitto, A., Piaggio, G., Dejana, A., Lerma, E., Pollicardo, N., Vassallo, F., Soracco, M., Benvenuto, F., Valbonesi, M., Carlier, P., Vimercati, R., Prencipe, E., Gatti, A. M., Ferrara, R. A., Incagliato, M., Florio, G., and Frassoni, F. (1996). High-dose chemo-radiotherapy followed by autologous Philadelphia chromosome-negative blood progenitor cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 17, 201-205.
- Carlesso, N., Frank, D. A., and Griffin, J. D. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 183, 811-820.
- Carpenter, C. L., and Cantley, L. C. (1996). Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153-158.
- Caspersson, T., Gahrton, G., Lindsten, J., and Zech, L. (1970). Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exp Cell Res* 63, 238-240.
- Cervantes, F., Villamor, N., Esteve, J., Montoto, S., Rives, S., Rozman, C., and Montserrat, E. (1998). 'Lymphoid' blast crisis of chronic myeloid leukaemia is associated with distinct clinicohaematological features. *Br J Haematol* 100, 123-128.
- Chissoe, S. L., Bodenteich, A., Wang, Y. F., Wang, Y. P., Burian, D., Clifton, S. W., Crabtree, J., Freeman, A., Iyer, K., Jian, L., and et al. (1995). Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27, 67-82.
- Chuang, T. H., Xu, X., Kaartinen, V., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Bokoch, G. M. (1995). Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10282-10286.
- Clark, B. R., Gallagher, J. T., and Dexter, T. M. (1992). Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 5, 619-652.
- Clift, R. A., Appelbaum, F. R., and Thomas, E. D. (1993). Treatment of chronic myeloid leukemia by marrow transplantation. *Blood* 82, 1954-1956.

Cohney, S. J., Sanden, D., Cacalano, N. A., Yoshimura, A., Mui, A., Migone, T. S., and Johnston, J. A. (1999). SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol Cell Biol* *19*, 4980-4988.

Cole, S. R., Aylett, G. W., Harvey, N. L., Cambareri, A. C., and Ashman, L. K. (1996). Increased expression of c-Kit or its ligand Steel Factor is not a common feature of adult acute myeloid leukaemia. *Leukemia* *10*, 288-296.

Cortez, D., Kadlec, L., and 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., and 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., and Pendergast, A. M. (1996). The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* *13*, 2589-2594.

Costello, R., Sainy, D., Lafage-Pochitaloff, M., and Gabert, J. (1997). Clinical and biological aspects of Philadelphia-negative/BCR-negative chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* *25*, 225-232.

Coulombel, L., Auffray, I., Gaugler, M. H., and Roseblatt, M. (1997). Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol* *97*, 13-21.

Dagher, R., Cohen, M., Williams, G., Rothmann, M., Gobburu, J., Robbie, G., Rahman, A., Chen, G., Staten, A., Griebel, D., and Pazdur, R. (2002). Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* *8*, 3034-3038.

Danhauser-Riedl, S., Warmuth, M., Druker, B. J., Emmerich, B., and Hallek, M. (1996). Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. *Cancer Res* *56*, 3589-3596.

Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., and Rapp, U. R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* *19*, 474-480.

de Jong, M. O., Rozemuller, H., Kieboom, D., Visser, J. W., Wognum, A. W., and Wagemaker, G. (1996). Purification of repopulating hemopoietic cells based on binding of biotinylated Kit ligand. *Leukemia* *10*, 1813-1822.

de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1995). Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia. *J Biol Chem* *270*, 21468-21471.

de Klein, A., van Kessel, A. G., Grosveld, G., Bartram, C. R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N. K., Heisterkamp, N., Groffen, J., and Stephenson, J. R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* *300*, 765-767.

- Deberry, C., Mou, S., and Linnekin, D. (1997). Stat1 associates with c-kit and is activated in response to stem cell factor. *Biochem J* 327 (Pt 1), 73-80.
- Devergie, A., Apperley, J. F., Labopin, M., Madrigal, A., Jacobsen, N., Carreras, E., Prentice, H. G., Jouet, J. P., Kolb, H. J., Hersteinstein, B., Bacigalupo, A., Evensen, S. A., Ljungman, P., de Witte, T., Reiffers, J., Nagler, A., Clark, R. E., Goldman, J. M., and Gratwohl, A. (1997). European results of matched unrelated donor bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Impact of HLA class II matching. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20, 11-19.
- Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., and Davis, R. J. (1997). A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-696.
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., and Talpaz, M. (2003). BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101, 690-698.
- Dorsey, J. F., Cunnick, J. M., Lanehart, R., Huang, M., Kraker, A. J., Bhalla, K. N., Jove, R., and Wu, J. (2002). Interleukin-3 protects Bcr-Abl-transformed hematopoietic progenitor cells from apoptosis induced by Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* 16, 1589-1595.
- Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and 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.
- Eaves, A. C., Cashman, J. D., Gaboury, L. A., Kalousek, D. K., and Eaves, C. J. (1986). Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5306-5310.
- Enright, H., and McGlave, P. (1998). Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Curr Opin Oncol* 10, 100-107.
- Eva, A., and Aaronson, S. A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* 316, 273-275.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., and Kantarjian, H. M. (1999). Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 131, 207-219.
- Fefer, A., Cheever, M. A., Thomas, E. D., Boyd, C., Ramberg, R., Glucksberg, H., Buckner, C. D., and Storb, R. (1979). Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *N Engl J Med* 300, 333-337.
- Fialkow, P. J., Martin, P. J., Najfeld, V., Penfold, G. K., Jacobson, R. J., and Hansen, J. A. (1981). Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 58, 158-163.

- Finney, R., McDonald, G. A., Baikie, A. G., and Douglas, A. S. (1972). Chronic granulocytic leukaemia with Ph 1 negative cells in bone marrow and a ten year remission after busulphan hypoplasia. *Br J Haematol* 23, 283-288.
- Flanagan, J. G., and Leder, P. (1990). The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. *Cell* 63, 185-194.
- Franz, W. M., Berger, P., and Wang, J. Y. (1989). Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *Embo J* 8, 137-147.
- Gadd, S. J., and Ashman, L. K. (1985). A murine monoclonal antibody specific for a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human myeloid leukaemias. *Leuk Res* 9, 1329-1336.
- Gaiger, A., Henn, T., Horth, E., Geissler, K., Mitterbauer, G., Maier-Dobersberger, T., Greinix, H., Mannhalter, C., Haas, O. A., Lechner, K., and et al. (1995). Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood* 86, 2371-2378.
- Gesbert, F., Garbay, C., and Bertoglio, J. (1998). Interleukin-2 stimulation induces tyrosine phosphorylation of p120-Cbl and CrkL and formation of multimolecular signaling complexes in T lymphocytes and natural killer cells. *J Biol Chem* 273, 3986-3993.
- Giralt, S., Kantarjian, H., and Talpaz, M. (1995). The natural history of chronic myelogenous leukemia in the interferon era. *Semin Hematol* 32, 152-158.
- Giralt, S. A., Kantarjian, H. M., Talpaz, M., Rios, M. B., Del Giglio, A., Andersson, B. S., Przepiorka, D., Deisseroth, A. B., and Champlin, R. E. (1993). Effect of prior interferon alfa therapy on the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 11, 1055-1061.
- Gishizky, M. L., Cortez, D., and Pendergast, A. M. (1995). Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10889-10893.
- Goga, A., Liu, X., Hambuch, T. M., Senechal, K., Major, E., Berk, A. J., Witte, O. N., and Sawyers, C. L. (1995a). p53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene* 11, 791-799.
- Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E., Saffran, D. C., and Witte, O. N. (1995b). Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82, 981-988.
- Goh, K. O., Swisher, S. N., and Herman, E. C., Jr. (1967). Chronic myelocytic leukemia and identical twins. Additional evidence of the Philadelphia chromosome as postzygotic abnormality. *Arch Intern Med* 120, 214-219.
- Goldman, J. M., Szydlo, R., Horowitz, M. M., Gale, R. P., Ash, R. C., Atkinson, K., Dicke, K. A., Gluckman, E., Herzig, R. H., Marmont, A., and et al. (1993). Choice of pretransplant treatment and timing of transplants for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 82, 2235-2238.

Gordon, M. Y., Dowding, C. R., Riley, G. P., Goldman, J. M., and Greaves, M. F. (1987). Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 328, 342-344.

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

Goselink, H. M., Williams, D. E., Fibbe, W. E., Wessels, H. W., Beverstock, G. C., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (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., Tauchi, T., Boswell, H. S., Broxmeyer, H. E., and Toyama, K. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp Hematol* 23, 1153-1159.

Gotoh, A., Miyazawa, K., Ohyashiki, K., and Toyama, K. (1994). Potential molecules implicated in downstream signaling pathways of p185BCR-ABL in Ph⁺ ALL involve GTPase-activating protein, phospholipase C-gamma 1, and phosphatidylinositol 3'-kinase. *Leukemia* 8, 115-120.

Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36, 93-99.

Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J. L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., Abgrall, J. F., and Tanzer, J. (1997). Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N Engl J Med* 337, 223-229.

Hallek, M., Danhauser-Riedl, S., Herbst, R., Warmuth, M., Winkler, A., Kolb, H. J., Druker, B., Griffin, J. D., Emmerich, B., and Ullrich, A. (1996). Interaction of the receptor tyrosine kinase p145c-kit with the p210bcr/abl kinase in myeloid cells. *Br J Haematol* 94, 5-16.

Harrison-Findik, D., Susa, M., and Varticovski, L. (1995). Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene* 10, 1385-1391.

Hasford, J., Ansari, H., Pffirmann, M., and Hehlmann, R. (1996). Analysis and validation of prognostic factors for CML. German CML Study Group. *Bone Marrow Transplant* 17 Suppl 3, S49-54.

Hasford, J., Pffirmann, M., Hehlmann, R., Allan, N. C., Baccarani, M., Kluin-Nelemans, J. C., Alimena, G., Steegmann, J. L., and Ansari, H. (1998). A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 90, 850-858.

Heaney, C., Kolibaba, K., Bhat, A., Oda, T., Ohno, S., Fanning, S., and Druker, B. J. (1997). Direct binding of CRKL to BCR-ABL is not required for BCR-ABL transformation. *Blood* 89, 297-306.

- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., Queisser, W., Loffler, H., Heinze, B., Georgii, A., and et al. (1993). Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 82, 398-407.
- Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., Queisser, W., Loffler, H., Hochhaus, A., Heinze, B., and et al. (1994). Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84, 4064-4077.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., and Grosveld, G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 315, 758-761.
- Heisterkamp, N., Stephenson, J. R., Groffen, J., Hansen, P. F., de Klein, A., Bartram, C. R., and Grosveld, G. (1983). Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306, 239-242.
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., and Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 114-119.
- Hjertson, M., Sundstrom, C., Lyman, S. D., Nilsson, K., and Nilsson, G. (1996). Stem cell factor, but not flt3 ligand, induces differentiation and activation of human mast cells. *Exp Hematol* 24, 748-754.
- Hochhaus, A., Berger, U., Reiter, A., and Hehlmann, R. (2002). [Current pharmacotherapy of chronic myeloid leukemia]. *Internist (Berl)* 43, 270-283.
- Horowitz, M. M., Rowlings, P. A., and 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, S5-6.
- Hotchin, N. A., and Hall, A. (1996). Regulation of the actin cytoskeleton, integrins and cell growth by the Rho family of small GTPases. *Cancer Surv* 27, 311-322.
- Hoyle, C., Gray, R., and Goldman, J. (1994). Autografting for patients with CML in chronic phase: an update. Hammersmith BMT Team LRF Centre for Adult Leukaemia. *Br J Haematol* 86, 76-81.
- Hsu, Y. R., Wu, G. M., Mendiaz, E. A., Syed, R., Wypych, J., Toso, R., Mann, M. B., Boone, T. C., Narhi, L. O., Lu, H. S., and Langley, K. E. (1997). The majority of stem cell factor exists as monomer under physiological conditions. Implications for dimerization mediating biological activity. *J Biol Chem* 272, 6406-6415.
- Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Lammers, R., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992). Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 12, 981-990.
- Hu, Z. B., Ma, W., Uphoff, C. C., Quentmeier, H., and Drexler, H. G. (1994). c-kit expression in human megakaryoblastic leukemia cell lines. *Blood* 83, 2133-2144.

Huang, E., Nocka, K., Beier, D. R., Chu, T. Y., Buck, J., Lahm, H. W., Wellner, D., Leder, P., and 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.

Hurley, R. W., McCarthy, J. B., and Verfaillie, C. M. (1995). Direct adhesion to bone marrow stroma via fibronectin receptors inhibits hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest* 96, 511-519.

Hurley, R. W., McCarthy, J. B., Wayner, E. A., and Verfaillie, C. M. (1997). Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation. *Exp Hematol* 25, 321-328.

Ihle, J. N., Keller, J., Oroszlan, S., Henderson, L. E., Copeland, T. D., Fitch, F., Prystowsky, M. B., Goldwasser, E., Schrader, J. W., Palaszynski, E., Dy, M., and Lebel, B. (1983). Biologic properties of homogeneous interleukin 3. I. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, p cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J Immunol* 131, 282-287.

Ilaria, R. L., Jr., and 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., Jr., and 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.

Inokuchi, K., Yamaguchi, H., Tarusawa, M., Futaki, M., Hanawa, H., Tanosaki, S., and Dan, K. (2002). Abnormality of c-kit oncoprotein in certain patients with chronic myelogenous leukemia--potential clinical significance. *Leukemia* 16, 170-177.

Jackson, P., and Baltimore, D. (1989). N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *Embo J* 8, 449-456.

Jackson, P. K., Paskind, M., and Baltimore, D. (1993). Mutation of a phenylalanine conserved in SH3-containing tyrosine kinases activates the transforming ability of c-Abl. *Oncogene* 8, 1943-1956.

Jacobs, P., and Greaves, M. (1984). Ph1-positive T lymphoblastic transformation. *Leuk Res* 8, 737-739.

Jain, S. K., Langdon, W. Y., and Varticovski, L. (1997). Tyrosine phosphorylation of p120cbl in BCR/abl transformed hematopoietic cells mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 14, 2217-2228.

Jain, S. K., Susa, M., Keeler, M. L., Carlesso, N., Druker, B., and Varticovski, L. (1996). PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85 SH2 domains with p210 BCR/abl. *Blood* 88, 1542-1550.

Janossy, G., Woodruff, R. K., Pippard, M. J., Prentice, G., Hoffbrand, A. V., Paxton, A., Lister, T. A., Bunch, C., and Greaves, M. F. (1979). Relation of "lymphoid" phenotype and

response to chemotherapy incorporating vincristine-prednisolone in the acute phase of Ph1 positive leukemia. *Cancer* 43, 426-434.

Jelinek, T., Dent, P., Sturgill, T. W., and Weber, M. J. (1996). Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 16, 1027-1034.

Joensuu, H., Roberts, P. J., Sarlomo-Rikala, M., Andersson, L. C., Tervahartiala, P., Tuveson, D., Silberman, S., Capdeville, R., Dimitrijevic, S., Druker, B., and Demetri, G. D. (2001). Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344, 1052-1056.

Kabarowski, J. H., Allen, P. B., and 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., Keating, M. J., Smith, T. L., Talpaz, M., and McCredie, K. B. (1990). Proposal for a simple synthesis prognostic staging system in chronic myelogenous leukemia. *Am J Med* 88, 1-8.

Kees, U. R., and Ashman, L. K. (1995). Synergistic action of interleukin-2 and Steel factor (SLF) on a human T lymphoblastoid cell line. *Leukemia* 9, 1046-1050.

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Stevens, T., Carius, B., Gschaidmeier, H., Huber, C., and Fischer, T. (2003). In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia* 17, 999-1009.

Kipreos, E. T., and Wang, J. Y. (1992). Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 256, 382-385.

Kolb, H. J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., and Wilmanns, W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76, 2462-2465.

Kolitz, J. E., Kempin, S. J., Schluger, A., Wong, G. Y., Berman, E., Jhanwar, S., Arlin, Z. A., Gee, T., and Clarkson, B. D. (1992). A phase II pilot trial of high-dose hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 19, 27-33.

Konopka, J. B., and Witte, O. N. (1985). Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol* 5, 3116-3123.

Kozak, M. (1994). Features in the 5' non-coding sequences of rabbit alpha and beta-globin mRNAs that affect translational efficiency. *J Mol Biol* 235, 95-110.

Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D. M., Rottapel, R., and Siminovitch, K. A. (1998). SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol* 18, 2089-2099.

Krystal, G. W., DeBerry, C. S., Linnekin, D., and Litz, J. (1998). Lck associates with and is activated by Kit in a small cell lung cancer cell line: inhibition of SCF-mediated growth by the Src family kinase inhibitor PP1. *Cancer Res* 58, 4660-4666.

- Kurzrock, R., Shtalrid, M., Gutterman, J. U., Koller, C. A., Walters, R., Trujillo, J. M., and Talpaz, M. (1987). Molecular analysis of chromosome 22 breakpoints in adult Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* *67*, 55-59.
- Laneuville, P., Timm, M., and Hudson, A. T. (1994). bcr/abl expression in 32D cl3(G) cells inhibits apoptosis induced by protein tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* *54*, 1360-1366.
- Lasota, J., Jasinski, M., Sarlomo-Rikala, M., and Miettinen, M. (1999). Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* *154*, 53-60.
- Lemmon, M. A., Pinchasi, D., Zhou, M., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor. *J Biol Chem* *272*, 6311-6317.
- Lerner, N. B., Nocka, K. H., Cole, S. R., Qiu, F. H., Strife, A., Ashman, L. K., and Besmer, P. (1991). Monoclonal antibody YB5.B8 identifies the human c-kit protein product. *Blood* *77*, 1876-1883.
- Lev, S., Givol, D., and Yarden, Y. (1992). Interkinase domain of kit contains the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 678-682.
- Linnekin, D. (1999). Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol* *31*, 1053-1074.
- Linnekin, D., DeBerry, C. S., and Mou, S. (1997). Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem* *272*, 27450-27455.
- Liu, X., Marengere, L. E., Koch, C. A., and Pawson, T. (1993). The v-Src SH3 domain binds phosphatidylinositol 3'-kinase. *Mol Cell Biol* *13*, 5225-5232.
- Lux, M. L., Rubin, B. P., Biase, T. L., Chen, C. J., Maclure, T., Demetri, G., Xiao, S., Singer, S., Fletcher, C. D., and Fletcher, J. A. (2000). KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* *156*, 791-795.
- Lyman, S. D., and Jacobsen, S. E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* *91*, 1101-1134.
- Magrangeas, F., Boisteau, O., Denis, S., Jacques, Y., and Minvielle, S. (2001). Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J* *353*, 223-230.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *Embo J* *14*, 3136-3145.
- Martin, F. H., Suggs, S. V., Langley, K. E., Lu, H. S., Ting, J., Okino, K. H., Morris, C. F., McNiece, I. K., Jacobsen, F. W., Mendiaz, E. A., and et al. (1990). Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell* *63*, 203-211.

- Maru, Y., and Witte, O. N. (1991). The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67, 459-468.
- Matsuguchi, T., Salgia, R., Hallek, M., Eder, M., Druker, B., Ernst, T. J., and Griffin, J. D. (1994). Shc 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* 269, 5016-5021.
- Mayani, H. (1996). Composition and function of the hemopoietic microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1041-1047.
- Mayer, B. J., and 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., Hirai, H., and Sakai, R. (1995). Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* 5, 296-305.
- Mayer, B. J., Jackson, P. K., Van Etten, R. A., and 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.
- McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R., and Cotter, T. G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179-1187.
- McGlade, C. J., Ellis, C., Reedijk, M., Anderson, D., Mbamalu, G., Reith, A. D., Panayotou, G., End, P., Bernstein, A., Kazlauskas, A., and et al. (1992). SH2 domains of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase regulate binding to growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 12, 991-997.
- McGlave, P. B., De Fabritiis, P., Deisseroth, A., Goldman, J., Barnett, M., Reiffers, J., Simonsson, B., Carella, A., and Aeppli, D. (1994). Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: results from eight transplant groups. *Lancet* 343, 1486-1488.
- McWhirter, J. R., and Wang, J. Y. (1991). Activation of tyrosinase 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., and Wang, J. Y. (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., and Wang, J. Y. (1997). Effect of Bcr sequences on the cellular function of the Bcr-Abl oncoprotein. *Oncogene* 15, 1625-1634.
- Medema, R. H., and Bos, J. L. (1993). The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 4, 615-661.
- Meisner, H., Conway, B. R., Hartley, D., and Czech, M. P. (1995). Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol Cell Biol* 15, 3571-3578.

Metcalf, D., Alexander, W. S., Elefanty, A. G., Nicola, N. A., Hilton, D. J., Starr, R., Mifsud, S., and Di Rago, L. (1999). Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1. *Leukemia* 13, 926-934.

Minot, G. (1924). Chronic myelogenous leukemia. *JAMA* 82, 1489.

Mittre, H., Leymarie, P., Macro, M., and Leporrier, M. (1997). A new case of chronic myeloid leukemia with c3/a2 BCR/ABL junction. Is it really a distinct disease? *Blood* 89, 4239-4241.

Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., and Arai, K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10, 295-331.

Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J., and Miller, W. T. (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.

Moore, S., Haylock, D. N., Levesque, J. P., McDiarmid, L. A., Samels, L. M., To, L. B., Simmons, P. J., and Hughes, T. P. (1998). Stem cell factor as a single agent induces selective proliferation of the Philadelphia chromosome positive fraction of chronic myeloid leukemia CD34(+) cells. *Blood* 92, 2461-2470.

Morita, S., Tsuchiya, S., Fujie, H., Itano, M., Ohashi, Y., Minegishi, M., Imaizumi, M., Endo, M., Takano, N., and Konno, T. (1996). Cell surface c-kit receptors in human leukemia cell lines and pediatric leukemia: selective preservation of c-kit expression on megakaryoblastic cell lines during adaptation to in vitro culture. *Leukemia* 10, 102-105.

Morita, Y., Naka, T., Kawazoe, Y., Fujimoto, M., Narazaki, M., Nakagawa, R., Fukuyama, H., Nagata, S., and Kishimoto, T. (2000). Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5405-5410.

Muller, A. J., Pendergast, A. M., Havlik, M. H., Puil, L., Pawson, T., and 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.

Muller, A. J., Young, J. C., Pendergast, A. M., Pondel, M., Landau, N. R., Littman, D. R., and Witte, O. N. (1991). BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 11, 1785-1792.

Muroi, K., Nakamura, M., Amemiya, Y., Suda, T., and Miura, Y. (1995). Expression of c-kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 16, 297-305.

Naka, T., Fujimoto, M., and Kishimoto, T. (1999). Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends Biochem Sci* 24, 394-398.

- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., and Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-929.
- Nichols, G. L., Raines, M. A., Vera, J. C., Lacomis, L., Tempst, P., and Golde, D. W. (1994). Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 84, 2912-2918.
- Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., and Nicola, N. A. (1999). Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J* 18, 375-385.
- Nicola, N. A., Robb, L., Metcalf, D., Cary, D., Drinkwater, C. C., and Begley, C. G. (1996). Functional inactivation in mice of the gene for the interleukin-3 (IL-3)-specific receptor beta-chain: implications for IL-3 function and the mechanism of receptor transmodulation in hematopoietic cells. *Blood* 87, 2665-2674.
- Nishii, K., Kabarowski, J. H., Gibbons, D. L., Griffiths, S. D., Titley, I., Wiedemann, L. M., and Greaves, M. F. (1996). ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 13, 2225-2234.
- Nishinakamura, R., Nakayama, N., Hirabayashi, Y., Inoue, T., Aud, D., McNeil, T., Azuma, S., Yoshida, S., Toyoda, Y., Arai, K., and et al. (1995). Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5 beta c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while beta IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity* 2, 211-222.
- Nolte, M., Werner, M., Ewig, M., von Wasielewski, R., Wilkens, L., and Georgii, A. (1995). Demonstration of the Philadelphia translocation by fluorescence in situ hybridization (FISH) in paraffin sections and identification of aberrant cells by a combined FISH/immunophenotyping approach. *Histopathology* 26, 433-437.
- Nowell, P. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1197.
- Oda, T., Heaney, C., Hagopian, J. R., Okuda, K., Griffin, J. D., and Druker, B. J. (1994). Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 269, 22925-22928.
- Odai, H., Sasaki, K., Iwamatsu, A., Hanazono, Y., Tanaka, T., Mitani, K., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1995). The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J Biol Chem* 270, 10800-10805.
- Orban, P. C., Levings, M. K., and Schrader, J. W. (1999). Heterodimerization of the alpha and beta chains of the interleukin-3 (IL-3) receptor is necessary and sufficient for IL-3-induced mitogenesis. *Blood* 94, 1614-1622.
- O'Riordan, M. L., Robinson, J. A., Buckton, K. E., and Evans, H. J. (1971). Distinguishing between the chromosomes involved in Down's syndrome (trisomy 21) and chronic myeloid leukaemia (Ph1) by fluorescence. *Nature* 230, 167-168.

- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242-245.
- Ottmann, O. G., Druker, B. J., Sawyers, C. L., Goldman, J. M., Reiffers, J., Silver, R. T., Tura, S., Fischer, T., Deininger, M. W., Schiffer, C. A., Baccarani, M., Gratwohl, A., Hochhaus, A., Hoelzer, D., Fernandes-Reese, S., Gathmann, I., Capdeville, R., and O'Brien, S. G. (2002). A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* 100, 1965-1971.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., and 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.
- Papayannopoulou, T., Brice, M., Broudy, V. C., and Zsebo, K. M. (1991). Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. *Blood* 78, 1403-1412.
- Pasternak, G., Hochhaus, A., Schultheis, B., and Hehlmann, R. (1998). Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol* 124, 643-660.
- Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Clark, R., McCormick, F., and Witte, O. N. (1991a). Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5927-5931.
- Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y., and 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., and et al. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.
- Pendergast, A. M., Traugh, J. A., and Witte, O. N. (1987). Normal cellular and transformation-associated abl proteins share common sites for protein kinase C phosphorylation. *Mol Cell Biol* 7, 4280-4289.
- Pierce, A., Spooncer, E., Ainsworth, S., and Whetton, A. D. (2002). BCR-ABL alters the proliferation and differentiation response of multipotent hematopoietic cells to stem cell factor. *Oncogene* 21, 3068-3075.
- Pleiman, C. M., Hertz, W. M., and Cambier, J. C. (1994). Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit. *Science* 263, 1609-1612.
- Poole, T. W., and Silvers, W. K. (1979). Capacity of adult steel (SI/SId) and dominant spotting (W/Wv) mouse skin to support melanogenesis. *Dev Biol* 72, 398-400.

Porter, D. L., Roth, M. S., McGarigle, C., Ferrara, J. L., and Antin, J. H. (1994). Induction of graft-versus-host disease as immunotherapy for relapsed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* *330*, 100-106.

Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui, T., and et al. (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* *137*, S68-97.

Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P. G., Arlinghaus, R., and Pawson, T. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *Embo J* *13*, 764-773.

Quelle, F. W., Sato, N., Witthuhn, B. A., Inhorn, R. C., Eder, M., Miyajima, A., Griffin, J. D., and Ihle, J. N. (1994). JAK2 associates with the beta c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. *Mol Cell Biol* *14*, 4335-4341.

Raitano, A. B., Halpern, J. R., Hambuch, T. M., and Sawyers, C. L. (1995). The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11746-11750.

Reddy, E. P., Korapati, A., Chaturvedi, P., and Rane, S. (2000). IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* *19*, 2532-2547.

Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* *259*, 1157-1161.

Renshaw, M. W., McWhirter, J. R., and Wang, J. Y. (1995). The human leukemia oncogene bcr-abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. *Mol Cell Biol* *15*, 1286-1293.

Reuss-Borst, M. A., Buhning, H. J., Schmidt, H., and Muller, C. A. (1994). AML: immunophenotypic heterogeneity and prognostic significance of c-kit expression. *Leukemia* *8*, 258-263.

Robb, L., Drinkwater, C. C., Metcalf, D., Li, R., Kontgen, F., Nicola, N. A., and Begley, C. G. (1995). Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9565-9569.

Rodrigues, G. A., and Park, M. (1994). Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr Opin Genet Dev* *4*, 15-24.

Rottapel, R., Ilangumaran, S., Neale, C., La Rose, J., Ho, J. M., Nguyen, M. H., Barber, D., Dubreuil, P., and de Sepulveda, P. (2002). The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene* *21*, 4351-4362.

Rowley, J. D. (1973a). Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. *N Engl J Med* *289*, 220-221.

- Rowley, J. D. (1973b). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* *243*, 290-293.
- Rowley, J. D. (1990). The Philadelphia chromosome translocation. A paradigm for understanding leukemia. *Cancer* *65*, 2178-2184.
- Rowley, P. T., Keng, P. C., and Kosciolk, B. A. (1996). The effect of bcr-abl antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res* *20*, 473-480.
- Sakai, N., Ogiso, Y., Fujita, H., Watari, H., Koike, T., and Kuzumaki, N. (1994). Induction of apoptosis by a dominant negative H-RAS mutant (116Y) in K562 cells. *Exp Cell Res* *215*, 131-136.
- Salgia, R., Li, J. L., Ewaniuk, D. S., Pear, W., Pisick, E., Burky, S. A., Ernst, T., Sattler, M., Chen, L. B., and Griffin, J. D. (1997). BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest* *100*, 46-57.
- Salgia, R., Li, J. L., Lo, S. H., Brunkhorst, B., Kansas, G. S., Sobhany, E. S., Sun, Y., Pisick, E., Hallek, M., Ernst, T., and et al. (1995a). Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem* *270*, 5039-5047.
- Salgia, R., Pisick, E., Sattler, M., Li, J. L., Uemura, N., Wong, W. K., Burky, S. A., Hirai, H., Chen, L. B., and Griffin, J. D. (1996a). p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem* *271*, 25198-25203.
- Salgia, R., Sattler, M., Pisick, E., Li, J. L., and Griffin, J. D. (1996b). p210BCR/ABL induces formation of complexes containing focal adhesion proteins and the protooncogene product p120c-Cbl. *Exp Hematol* *24*, 310-313.
- Salgia, R., Uemura, N., Okuda, K., Li, J. L., Pisick, E., Sattler, M., de Jong, R., Druker, B., Heisterkamp, N., Chen, L. B., and et al. (1995b). CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* *270*, 29145-29150.
- Salles, M. T., Cervantes, G., Guarner, J., Sobrevilla-Calvo, P., and Garcia-Carranca, A. (1997). Chronic myelocytic leukemia in accelerated phase with i(17) (q10) and loss of p53 gene. Case report. *Arch Med Res* *28*, 293-296.
- Sanchez-Garcia, I., and Grutz, G. (1995). Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5287-5291.
- Sanchez-Garcia, I., and 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., and Kaziro, Y. (1992). Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *J Biol Chem* *267*, 24149-24152.
- Sattler, M., Salgia, R., Okuda, K., Uemura, N., Durstin, M. A., Pisick, E., Xu, G., Li, J. L., Prasad, K. V., and Griffin, J. D. (1996). The proto-oncogene product p120CBL and the

adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12, 839-846.

Sattler, M., Salgia, R., Shrikhande, G., Verma, S., Pisick, E., Prasad, K. V., and Griffin, J. D. (1997). Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL). *J Biol Chem* 272, 10248-10253.

Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., and Druker, B. J. (2002). Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539.

Sawyers, C. L., McLaughlin, J., and 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.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18, 273-275.

Senechal, K., Halpern, J., and Sawyers, C. L. (1996). The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene. *J Biol Chem* 271, 23255-23261.

Serve, H., Hsu, Y. C., and Besmer, P. (1994). Tyrosine residue 719 of the c-kit receptor is essential for binding of the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for c-kit-associated PI 3-kinase activity in COS-1 cells. *J Biol Chem* 269, 6026-6030.

Serve, H., Yee, N. S., Stella, G., Sepp-Lorenzino, L., Tan, J. C., and Besmer, P. (1995). Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *Embo J* 14, 473-483.

Shoelson, S. E., Sivaraja, M., Williams, K. P., Hu, P., Schlessinger, J., and Weiss, M. A. (1993). Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *Embo J* 12, 795-802.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., and Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315, 550-554.

Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X., and Sawyers, C. L. (1996). Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13, 247-254.

Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Rajan, T. V., Yi, T., Ihle, J. N., Matthews, R. J., Thomas, M. L., and Beier, D. R. (1993). Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 73, 1445-1454.

- Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.
- Simmons, P. J., Levesque, J. P., and 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., Wasik, M. A., Tschlis, P. N., and Calabretta, B. (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., and 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., and 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., Perrotti, D., Martinez, R., Wasik, M. A., and Calabretta, B. (1996). Blastic transformation of p53-deficient bone marrow cells by p210bcr/abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13137-13142.
- Smith, M. A., Pallister, C. J., and Smith, J. G. (2001). Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. *Acta Haematol* 105, 143-150.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Spiers, A. S., and Baikie, A. G. (1968). Cytogenetic evolution and clonal proliferation in acute transformation of chronic granulocytic leukaemia. *Br J Cancer* 22, 192-204.
- Stanglmaier, M., Warmuth, M., Kleinlein, I., Reis, S., and Hallek, M. (2003). The interaction of the Bcr-Abl tyrosine kinase with the Src kinase Hck is mediated by multiple binding domains. *Leukemia* 17, 283-289.
- Starr, R., Metcalf, D., Elefanti, A. G., Brysha, M., Willson, T. A., Nicola, N. A., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (1998). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14395-14399.
- Stomski, F. C., Dottore, M., Winnall, W., Guthridge, M. A., Woodcock, J., Bagley, C. J., Thomas, D. T., Andrews, R. K., Berndt, M. C., and Lopez, A. F. (1999). Identification of a 14-3-3 binding sequence in the common beta chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors that is serine-phosphorylated by GM-CSF. *Blood* 94, 1933-1942.
- Talpaz, M., Kantarjian, H. M., McCredie, K., Trujillo, J. M., Keating, M. J., and Gutterman, J. U. (1986). Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 314, 1065-1069.

- Talpaz, M., McCredie, K. B., Mavligit, G. M., and Gutterman, J. U. (1983). Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 62, 689-692.
- Taniguchi, M., Nishida, T., Hirota, S., Isozaki, K., Ito, T., Nomura, T., Matsuda, H., and Kitamura, Y. (1999). Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 59, 4297-4300.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.
- Tauchi, T., Feng, G. S., Shen, R., Song, H. Y., Donner, D., Pawson, T., and Broxmeyer, H. E. (1994). SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210bcr-abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* 269, 15381-15387.
- ten Hoeve, J., Arlinghaus, R. B., Guo, J. Q., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1994a). Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood* 84, 1731-1736.
- ten Hoeve, J., Kaartinen, V., Fioretos, T., Haataja, L., Voncken, J. W., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1994b). Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adaptor protein. *Cancer Res* 54, 2563-2567.
- Terstegen, L., Gatsios, P., Bode, J. G., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (2000). The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130. *J Biol Chem* 275, 18810-18817.
- Thomas, E. D., Clift, R. A., Fefer, A., Appelbaum, F. R., Beatty, P., Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Cheever, M. A., Deeg, H. J., Doney, K., and et al. (1986). Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Intern Med* 104, 155-163.
- Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M., and Ronnstrand, L. (1999). Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J* 341 (Pt 1), 211-216.
- Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G., and Besmer, P. (1998). Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *Embo J* 17, 6250-6262.
- Toolis, F., Potter, B., Allan, N. C., and Langlands, A. O. (1981). Radiation-induced leukemias in ankylosing spondylitis. *Cancer* 48, 1582-1585.
- Van Etten, R. A., Jackson, P., and 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.
- Vanhaesebroeck, B., Stein, R. C., and Waterfield, M. D. (1996). The study of phosphoinositide 3-kinase function. *Cancer Surv* 27, 249-270.

- Varticovski, L., Daley, G. Q., Jackson, P., Baltimore, D., and Cantley, L. C. (1991). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* *11*, 1107-1113.
- Verfaillie, C. M., Hurley, R., Zhao, R. C., Prosper, F., Delforge, M., and 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.
- Verfaillie, C. M., McCarthy, J. B., and McGlave, P. B. (1992). Mechanisms underlying abnormal trafficking of malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia. Decreased adhesion to stroma and fibronectin but increased adhesion to the basement membrane components laminin and collagen type IV. *J Clin Invest* *90*, 1232-1241.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* *74*, 205-214.
- Vosseller, K., Stella, G., Yee, N. S., and Besmer, P. (1997). c-kit receptor signaling through its phosphatidylinositide-3'-kinase-binding site and protein kinase C: role in mast cell enhancement of degranulation, adhesion, and membrane ruffling. *Mol Biol Cell* *8*, 909-922.
- Walkenhorst, J., Goga, A., Witte, O. N., and Superti-Furga, G. (1996). Analysis of human c-Abl tyrosine kinase activity and regulation in *S. pombe*. *Oncogene* *12*, 1513-1520.
- Wang, J., Auger, K. R., Jarvis, L., Shi, Y., and Roberts, T. M. (1995). Direct association of Grb2 with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *270*, 12774-12780.
- Wang, J. Y. (1993). Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* *3*, 35-43.
- Warmuth, M., Bergmann, M., Priess, A., Hauslmann, 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. *J Biol Chem* *272*, 33260-33270.
- Warmuth, M., Danhauser-Riedl, S., and Hallek, M. (1999). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* *78*, 49-64.
- Warne, P. H., Viciano, P. R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* *364*, 352-355.
- Weiler, S. R., Mou, S., DeBerry, C. S., Keller, J. R., Ruscetti, F. W., Ferris, D. K., Longo, D. L., and Linnekin, D. (1996). JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood* *87*, 3688-3693.
- 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., and et al. (1990). Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. *Cell* *63*, 167-174.
- Wilson, G., Frost, L., Goodeve, A., Vandenberghe, E., Peake, I., and Reilly, J. (1997). BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. *Blood* *89*, 3064.

- Wineman, J. P., Nishikawa, S., and Muller-Sieburg, C. E. (1993). Maintenance of high levels of pluripotent hematopoietic stem cells in vitro: effect of stromal cells and c-kit. *Blood* 81, 365-372.
- Wisniewski, D., Strife, A., and Clarkson, B. (1996). c-kit ligand stimulates tyrosine phosphorylation of the c-Cbl protein in human hematopoietic cells. *Leukemia* 10, 1436-1442.
- Woodgett, J. R., Avruch, J., and Kyriakis, J. (1996). The stress activated protein kinase pathway. *Cancer Surv* 27, 127-138.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Chen, E., Schlessinger, J., Francke, U., and Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J* 6, 3341-3351.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 27, 3113-3119.
- Yee, N. S., Hsiao, C. W., Serve, H., Vosseller, K., and Besmer, P. (1994). Mechanism of down-regulation of c-kit receptor. Roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *J Biol Chem* 269, 31991-31998.
- Yi, T., and Ihle, J. N. (1993). Association of hematopoietic cell phosphatase with c-Kit after stimulation with c-Kit ligand. *Mol Cell Biol* 13, 3350-3358.
- Yoshimura, A., Ohkubo, T., Kiguchi, T., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Hara, T., and Miyajima, A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 14, 2816-2826.
- Yu, C. L., Meyer, D. J., Campbell, G. S., Lerner, A. C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. (1995). Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 269, 81-83.

10 Verzeichnis der Abkürzungen

32D	Hämatopoetische Zelllinie aus der Maus, IL-3 abhängig
Aa	Aminosäure
Abl	Abl-Kinase, welche physiologisch in vielen Säugetierzellen vorkommt
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
BaF3	Hämatopoetische Zelllinie, IL-3 abhängig
Bcl-2	In den Zellzyklus involviertes Signalprotein
Bcr	Breakpoint Cluster Region
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CIS	Protein aus der SOCS-Familie, vgl. Tabelle 3
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMML	Chronisch Myelomonozytäre Leukämie
Da	Dalton
DH5 α	Bakterienstamm aus E. coli
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid
ds	Doppelstrang
ECL	Lösung zur Detektion von Merrettichperoxidase markierten Antikörpern mittels Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	Foetales Kälberserum
FDA	Federal Drug Administration
FLVRES	Motiv für die Proteinbindung von SH2-Domänen
g	Gramm
gp140	Proteinkette eines Interleukinrezeptors
GVL	Graft Versus Leukemia
h	Stunde
Hck	Protein aus Src-Familie
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
IFN- α	Interferon alpha
IL-3	Interleukin 3
IL-3R	Interleukin 3 Rezeptor
JAK	Janus Kinase
K562	Bcr-Abl positive Zelllinie aus Patienten
kb	Kilobasen
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
Lyn	Protein aus der Src-Familie
min	Minute
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man, Datenbank (www.pubmed.com)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
Ph1	Philadelphia Chromosom

PI3-K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PXXP	Motiv zur Proteinbindung von SH2-Domänen
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion, nicht zu verwechseln mit Real-time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF-9	Insektenzellen zur Proteinexpression
SH	Src Homologie Domäne
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Std	Stunden
t	Zeit
TKX-1	Bakterienstamm zur Produktion phosphorylierten Proteins
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität

10.1 Tabellen der Buchstabencodes und Abkürzungen für Aminosäuren

	U	C	A	G	

	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G

	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G

	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G

	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

U = Uracil, C = Cytosine, A = Adenine, G = Guanine

1st nucleotide 2nd nucleotide 3rd nucleotide

3 Letter Code	1 Letter Code	Full name	mRNA nucleotide triplets
Ala	A	Alanine	GCA, GCC, GCG, GCU
Arg	R	Arginine	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
Asn	N	Asparagine	AAC, AAU
Asp	D	Aspartic acid	GAC, GAU
Cys	C	Cysteine	UGC, UGU
Glu	E	Glutamic acid	GAA, GAG
Gln	Q	Glutamine	CAA, CAG
Gly	G	Glycine	GGA, GGC, GGG, GGU
His	H	Histidine	CAC, CAU
Ile	I	Isoleucine	AUA, AUC, AUU
Leu	L	Leucine	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
Lys	K	Lysine	AAA, AAG
Met	M	Methionine	AUG
Phe	F	Phenylalanine	UUC, UUU
Pro	P	Proline	CCA, CCC, CCG, CCU
Ser	S	Serine	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
Thr	T	Threonine	ACA, ACC, ACG, ACU
Trp	W	Tryptophan	UGG
Tyr	Y	Tyrosine	UAC, UAU
Val	V	Valine	GUA, GUC, GUG, GUU
STOP			UAA, UAG, UGA

11 Lebenslauf

Curriculum Vitae

Andreas Konieczny

Badstrasse 16
81379 München

Telefon 089/72406896
Mobil 0163/7007609
barosmail@yahoo.com

Persönliche Angaben	
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Alter	30
Geburtsort	Berlin
Derzeitige Tätigkeit	Arzt im Praktikum, Abteilung für Hämatologie und Onkologie Universitätsklinikum Großhadern der LMU München
Schulbildung	
1979 - 1983	Albert-Schweitzer-Schule, Neu-Isenburg
1983 - 1985	Schule im Buchenbusch, Neu-Isenburg
1985 - 1987	Gymnasium Starnberg, Starnberg
1987 - 1993	Landschulheim Kempfenhausen, Kempfenhausen
1993	Abitur in den Fächern Biologie, Physik, Ethik, Deutsch
Studium	
1995	Studium der Medizin an der LMU München
1997	Physikum
1998	Erstes Staatsexamen
2001	Zweites Staatsexamen
2001 - 2002	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none"> - Neurologische Klinik Großhadern - 4. Med. Abteilung Städt. KH Harlaching - Terial an der University of California San Diego
2003	Drittes Staatsexamen und Zulassung als Arzt im Praktikum
Weiterbildung in Betriebswirtschaft	
Seit April 2003	Fernstudium am Betriebswirtschaftlichen Institut Dr. Braunschweig AG, Basel