

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ)  
der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. Ulf R. Rapp

„Substratspezifität und Signaltransduktion  
zellulärer und onkogener Abl-Tyrosinkinasen“

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Jan Voss  
aus Köln

Würzburg, Juni 2004

Referent: Privatdozent Dr. Stephan Feller, Ph.D.

Korreferent: Professor Dr. Dr. Edgar Serfling

Dekan: Professor Dr. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2005

Der Promovend ist Arzt.

## Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	DIE CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE.....	1
1.2	DAS PHILADELPHIA-CHROMOSOM.....	2
1.3	DIE VIRALE ABL-KINASE .....	3
1.4	DIE C-ABL-KINASE .....	3
1.4.1	<i>Struktur des c-Abl-Proteins .....</i>	<i>3</i>
1.4.2	<i>Regulation der Kinase-Aktivität .....</i>	<i>4</i>
1.4.3	<i>Aktivierung von c-Abl im Zellzyklus und durch ionisierende Strahlung .....</i>	<i>6</i>
1.4.4	<i>Die Rolle der c-Abl-Kinase im Zytoplasma.....</i>	<i>6</i>
1.5	DIE ARG-KINASE .....	7
1.6	DAS BCR-GEN .....	8
1.7	DIE BCR-ABL-FUSIONSPROTEINE .....	9
1.7.1	<i>Signaltransduktion durch Bcr-Abl.....</i>	<i>10</i>
1.7.2	<i>Ras-abhängige Signaltransduktionswege.....</i>	<i>11</i>
1.7.3	<i>Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase Signaltransduktionsweg.....</i>	<i>13</i>
1.7.4	<i>Komplexbildung mit CRKL und p130Cas .....</i>	<i>14</i>
1.8	TEL-ABL UND TEL-ARG.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
2.1	VERWENDETE CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN .....	18
2.1.1	<i>Chemikalien und Reagenzien.....</i>	<i>18</i>
2.1.2	<i>Antikörper.....</i>	<i>19</i>
2.1.3	<i>Zelllinien.....</i>	<i>20</i>
2.1.4	<i>Peptide.....</i>	<i>20</i>
2.1.5	<i>Lösungen und Puffer.....</i>	<i>21</i>
2.1.6	<i>Verbrauchsmaterialien .....</i>	<i>25</i>
2.1.7	<i>Geräteverzeichnis .....</i>	<i>25</i>
2.2	ARBEITSMETHODEN .....	26
2.2.1	<i>Kultivieren von Zelllinien .....</i>	<i>26</i>
2.2.2	<i>Bakterienkulturen .....</i>	<i>28</i>

---

2.2.3	<i>Proteintechniken</i> .....	31
2.2.4	<i>DNA Methoden</i> .....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
3.1	VERÄNDERTE KATALYTISCHE SPEZIFITÄT DER LEUKÄMISCHEN ABL-KINASEN	40
3.1.1	<i>Expression der Kinasen</i> .....	40
3.1.2	<i>Auswahl der Antikörper für die Immunpräzipitation</i> .....	41
3.1.3	<i>Auswahl der Peptide</i> .....	43
3.1.4	<i>Katalytische Spezifität</i> .....	45
3.2	INHIBITORISCHE AKTIVITÄT VON SP13 .....	46
3.3	KOMPLEXE ZWISCHEN DEN CRK-ADAPTERPROTEINEN c-CrkII UND CRKL, TEL-ABL UND TYROSINPHOSPHORYLIERTEN PROTEINEN .....	47
3.3.1	<i>Koimmunpräzipitation von Tel-Abl und CRKL</i> .....	47
3.3.2	<i>c-CrkII- und CRKL-Phosphorylierung in Tel-Abl exprimierenden Zellen</i> ...	48
3.3.3	<i>Komplexierung von c-CrkII und CRKL mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen</i> .....	50
3.4	AKTIVIERTE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DURCH LEUKÄMISCHE ABL- KINASEN .....	50
3.4.1	<i>Aktivierung der GTPase Ras</i> .....	51
3.4.2	<i>Phosphorylierung der c-Raf-1-Kinase</i> .....	55
3.4.3	<i>Aktivierung der Kinase MAPK/Erk</i> .....	56
3.4.4	<i>Aktivierung der c-Akt/PKB-Kinase</i> .....	57
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>59</b>
4.1	VERÄNDERTE KATALYTISCHE SPEZIFITÄT DER LEUKÄMISCHEN ABL-KINASEN	59
4.2	TYROSIN-ZU-PHENYLALANIN-MUTANTE ALS PSEUDOSUBSTRAT (SP13) .....	63
4.3	TEL-ABL IN PROTEINKOMPLEXEN .....	64
4.4	AKTIVIERTE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DURCH LEUKÄMISCHE ABL- KINASEN .....	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>70</b>

<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>87</b>
7.1	VERZEICHNIS DER BENUTZTEN ABKÜRZUNGEN .....	87
7.2	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....	89

**DANKSAGUNGEN**

**LEBENS LAUF**



# **1 Einleitung**

## ***1.1 Die chronische myeloische Leukämie***

Die chronische myeloische Leukämie (CML) wurde vor über 150 Jahren unabhängig von Virchow in Deutschland und von Craigie und Bennet in Edinburgh beschrieben (1-3). CML ist eine klonale myeloproliferative Erkrankung, die von einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle ausgeht (4-6).

Die CML hat eine Inzidenz von ein bis zwei Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr und macht etwa 15 Prozent der Leukämien im Erwachsenenalter aus. Das mediane Erkrankungsalter variiert zwischen 45 und 55 Jahren, jedoch können alle Altersgruppen betroffen sein. Leitbefund der CML ist die Leukozytose mit z.T. extrem hohen Leukozytenzahlen, die zu dem von Virchow 1845 geprägten Namen "Weißes Blut" oder "Leukämie" geführt haben (3). Weitere Befunde und Symptome sind in Tabelle 1 dargestellt (7). Im Differentialblutbild ist die Linksverschiebung mit Auftreten von unreifen Vorstufen der Myelopoese (Metamyelozyten, Myelozyten, Promyelozyten und Myeloblasten) auffällig (8).

Leukozytose	98%	Thrombozytose	48%
M-bcr-Rearrangement	93%	Abdominalbeschwerden	30%
Philadelphia-Chromosom	90%	Myelofibrose	28%
ALP-Index erniedrigt	86%	Gewichtsverlust	21%
Splenomegalie	72%	Thrombzytopenie	9%
LDH erhöht	71%	Extramedulläre Infiltrate	7%
Anämie	62%	Fieber	6%
Leistungsabfall	61%		

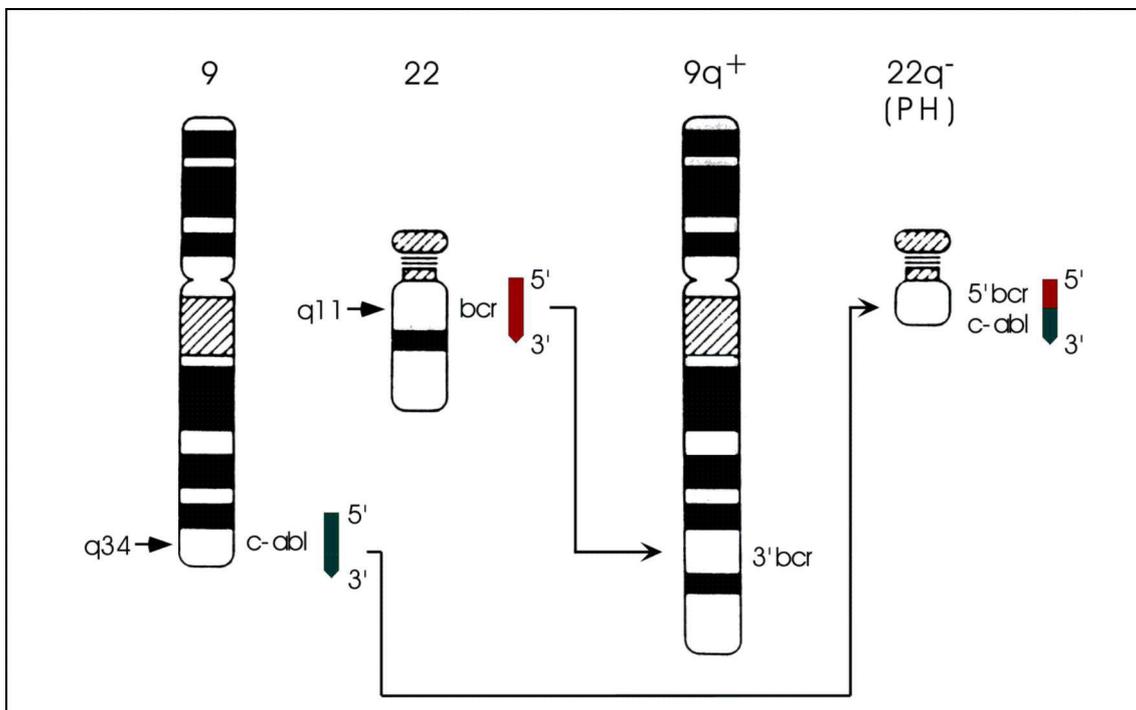
**Tabelle 1: Prozentuale Häufigkeit der Befunde bei Patienten mit CML (7)**

Im Mittel ca. drei bis fünf Jahren nach Beginn der Erkrankung entwickelt sich die CML von einer meist wenig problematischen chronischen Phase mit einem Blastenanteil von unter 10% der Leukozyten im peripheren Blut hin zu einer akut verlaufenden Blastenkrise. Der Blastenkrise geht bei vielen Patienten eine nicht ganz scharf abzugrenzende Akzelerationsphase voraus. Die Blastenkrise ist definiert durch einen über 30%igen Anteil der leukämischen Zellen im peripheren Blut, einen über 50%igen Anteil der leukämischen Zellen an den kernhaltigen Zellen im Knochenmark oder extramedulläre Infiltrate. Im Gegensatz zu den noch ausreifenden Zellen in der

chronischen Phase, reifen die Zellen in der Blastenkrise nicht mehr aus und ähneln Myeloblasten (ca. 60% der Patienten), Lymphoblasten (ca. 30%) oder Vorstufen anderer Reihen der Hämatopoese (8,9).

## 1.2 Das Philadelphia-Chromosom

Die CML war die erste neoplastische Erkrankung des Menschen, für die eine feste Assoziation mit einer bestimmten chromosomalen Abnormität beschrieben werden konnte. Während ihrer Arbeit in Philadelphia bemerkten Nowell und Hungerford 1960 in Metaphasen neoplastischer Zellen von CML Patienten ein abnormales verkürztes Chromosom 22, das als Philadelphia-Chromosom bekannt wurde (10). Janet Rowley konnte 1973 zeigen, daß das Philadelphia-Chromosom (Ph) ein verkürztes Chromosom 22 darstellt, das durch eine reziproke Translokation  $t(9;22)(q34;q11)$  zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 entsteht (Abbildung 1) (11). Dieses Chromosom kann in über 95% der CML-Patienten, in 15-30% der akuten lymphatischen Leukämien (ALL) bei Erwachsenen, in 5% der ALL bei Kindern sowie



**Abbildung 1: Das Philadelphia-Chromosom.** Nach reziproker Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 entsteht ein verkürztes Chromosom 22q<sup>-</sup> mit einem bcr-abl-Hybrid-Gen.

bei 2% bei Patienten mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie (AML) nachgewiesen werden (8). Auf molekularer Ebene findet die Translokation innerhalb des c-abl-Gens auf Chromosom 9q und des bcr-Gens auf Chromosom 22q statt. Dabei entsteht ein bcr-abl-Hybrid-Gen (9).

### ***1.3 Die virale Abl-Kinase***

Das c-abl-Gen auf Chromosom 9 stellt das humane Homolog von v-abl dar, ein Gen, das ursprünglich in einem murinen onkogenen Virus, dem Abelson Murine Leukaemia Virus (A-MuLV), gefunden wurde (12). Die Analyse der A-MuLV Virus-RNA ergab, daß das virale Genom aus einer Fusion der viralen gag-Sequenz und eines neuen Gens, das sich später als die 3'-Sequenz des murinen c-abl-Gens herausstellen sollte. Vergleiche der v-abl- und c-Abl-Sequenzen ergaben, daß im viralen abl-Onkogen die ersten beiden Exons des zellulären abl-Gens deletiert sind (13,14).

### ***1.4 Die c-Abl-Kinase***

#### **1.4.1 Struktur des c-Abl-Proteins**

Das 145 kDa große c-Abl-Protein ist eine Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase mit Homologie zu der Familie der Src-Tyrosinkinasen (15). In den meisten Geweben und Zelllinien findet sich das c-Abl-Protein überwiegend (ca. 80%) im Zellkern (16). Für primäre hämatopoetische Zellen und Neurone wurde jedoch eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation gezeigt (17,18). Das humane c-abl-Gen hat zwei alternative 5'-Exons mit getrennten Promotoren (Exon 1a und 1b in Abbildung 3). Die resultierenden Isoformen der humanen c-Abl-Kinase werden als Typ Ia und Ib, die homologen Formen der murinen c-Abl-Kinase als I und IV bezeichnet (19,20) (Abbildung 2). Der N-Terminus des Typ 1b / IV beinhaltet ein Myristylierungssignal und wird entsprechend posttranslational durch das Anfügen einer Myristylfettsäure verändert (21).

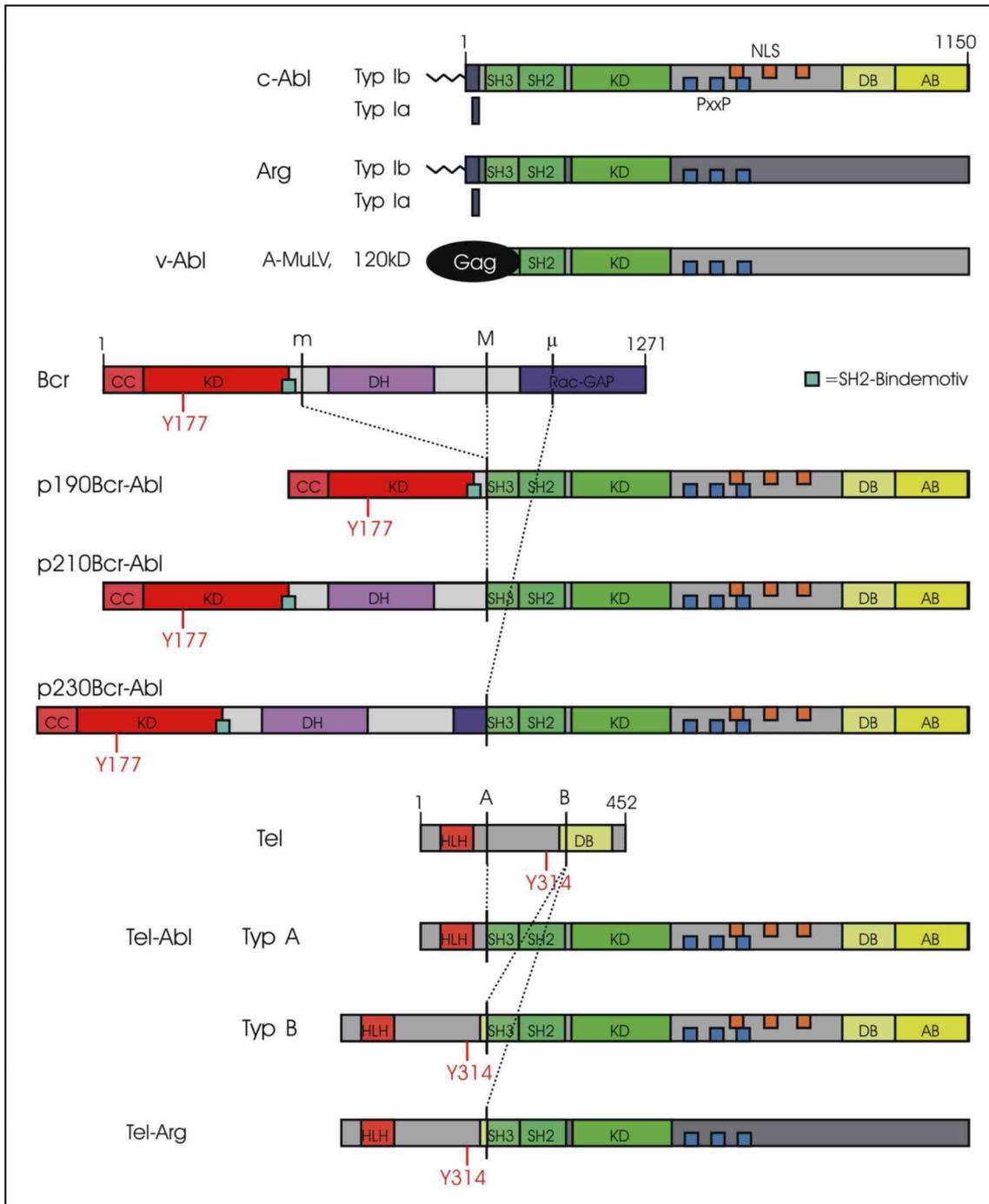
Zusätzlich zur Tyrosinkinasedomäne, die als Src-Homologiedomäne 1 (SH1) bezeichnet wird, beinhaltet das c-Abl-Protein die Src-Homologiedomänen 2 und 3 (SH2 bzw. SH3) (22-24). Diese Src-Homologiedomänen repräsentieren die Baueinheiten in Tyrosinkinasen und Adapterproteinen und vermitteln verschiedenste Aspekte zellulärer Signaltransduktion (25). Die ungefähr 100 Aminosäuren großen SH2-Domänen erkennen bestimmte Epitope, die normalerweise ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten

(25,26). Die Aminosäuresequenz, die dem Phosphotyrosin unmittelbar folgt, ist für die Spezifität verschiedener SH2-Domänen gegenüber den entsprechenden Bindungssequenzen verantwortlich (27). SH3-Domänen bestehen aus ca. 50 bis 60 Aminosäuren und vermitteln in der Regel Protein-Protein-Interaktionen, indem sie an bestimmte Prolin-reiche Sequenzen mit einem P-x-x-P Konsensusmotiv binden (25). Ihre Bindungsspezifität ist ebenfalls durch die an die Proline angrenzenden Aminosäuren bestimmt. An die SH3-Domäne der Abl-Kinase binden unter anderen die Proteine Abi1 (28), Abi2 (29), Aap1 (30), SHPTP1 (31), ATM (32,33), Pag/MSP23 (34) und RfxI (35) Die Bedeutungen dieser Interaktionen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

Abl unterscheidet sich von den Src-Familienmitgliedern durch eine 90 kDa große C-terminale Domäne. Sie enthält mehrere NLS ('nuclear localization signal') (36), ein NES ('nuclear-export signal') (37) und eine Bindungsstelle für DNA (38). Drei P-x-x-P-Motive, die Interaktionen mit SH3-Domänen der Adapterproteine Nck, Crk und Grb2 vermitteln (39,40), sowie Bindestellen für Aktin (41) befinden sich ebenfalls in der C-terminalen Domäne (Abbildung 2).

#### **1.4.2 Regulation der Kinase-Aktivität**

Die Aktivität der c-Abl-Kinase ist in Zellen streng reguliert und die Kinasedomäne meist inaktiv (42,43), so daß selbst überexprimiertes c-Abl-Protein Fibroblasten oder hämatopoetische Zellen nicht transformiert (16). Deletionen und Punktmutationen in der Abl-SH3-Domäne aktivieren die Kinase (44,45) und führen zu vermehrter Tyrosinphosphorylierung von c-Abl selbst sowie anderer Proteine und im experimentellen System auch zur Transformation von Zellen. Die Tatsache, daß bestimmte Mutationen in der Übergangsregion zwischen der c-Abl-SH2-Domäne und der Kinasedomäne die gleichen Effekte zeigen, weist auf einen die Kinaseaktivität inhibierenden Effekt einer SH3-vermittelten intramolekularen Proteinfaltung hin (46). In vitro zeigen Wildtyp c-Abl-Kinase und SH3-mutierte c-Abl-Kinase allerdings identische Kinaseaktivitäten (44,45). Unter den spezifischen Abl-SH3-Liganden finden sich sowohl inhibierende, (Aap1 (30) und das Streß-induzierte Pag/MSP23-Protein mit Antioxidanz-Eigenschaften (34)) als auch aktivierende Interaktionspartner wie das DNA-bindende RfxI-Protein (35).



**Abbildung 2: Normale und onkogene Proteine der Abl-Tyrosinkinasefamilie.** Myristilisierung durch Zickzack-Linie dargestellt. A-MuLV: Abelson murine leukemia virus. SH2 und SH3: Src Homologiedomänen 2 bzw. 3. KD: Kinasedomäne. PxxP: Prolin-reiche Motive, die als Bindestellen für SH3-Domänen dienen. NLS: 'nuclear localization signal'. DB und AB: DNA- bzw. Aktin-Bindungsstelle. CC: alpha-helikale 'Coiled-coil'-Struktur. Y177 und Y314: gesicherte bzw. mögliche Bindungsstelle für Grb2-SH2. DH: Dbl Homologiedomäne. HLH: 'Helix-Loop-Helix'-Domäne.

### **1.4.3 Aktivierung von c-Abl im Zellzyklus und durch ionisierende Strahlung**

In der G1-Phase des Zellzyklus bindet das Retinoblastoma-Protein (Rb) an die ATP-Bindungstasche der c-Abl-Kinase und inhibiert diese dadurch (47-49). Am Übergang von der G1-Phase zur S-Phase wird Rb durch Cyclin-D-Kinasen und Cdk4/6-Kinasen phosphoryliert, und die c-Abl-Kinase wird wieder frei und aktiv (49).

Die RNA-Polymerase II (RNAPII) ist verantwortlich für die Transkription Proteinkodierender Gene in eukaryotischen Zellen. Die große Untereinheit der RNAPII umfaßt die carboxy-terminale Domäne (CTD) mit 52 Wiederholungen eines Heptapeptides mit der Konsensussequenz Y-S-P-T-S-P-S (50). Die CTD bindet an eine ‚CTD-interacting domain‘ (CTD-ID) im C-Terminus der Abl-Kinase und im phosphorylierten Zustand an die Abl-SH2-Domäne. c-Abl kann nun in der S-Phase zu der Phosphorylierung die C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II beitragen und moduliert damit möglicherweise die Transkription von S-Phase-Genen (51,52).

Zusätzlich steigert ionisierende Strahlung die Phosphorylierung der CTD durch die c-Abl-Kinase um ein Vielfaches (32). Diese Steigerung ist abhängig von der Aktivierung des ‚Ataxia-Teleangiectasia-mutated‘ (atm) Genproduktes, einer nukleären Serinkinase, welche die Abl-SH3-Domäne bindet. Sie phosphoryliert und aktiviert die Abl-Kinase, wenn Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt werden (32,33). Auch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), das Produkt des ‚severe combined immunodeficiency‘ (scid) Gens, bindet konstitutiv an c-Abl und aktiviert c-Abl bei ionisierender Strahlung (53,54).

c-Abl interagiert außerdem mit verschiedensten anderen nukleären Proteinen die an der Regulation von Zellzyklus und Apoptose beteiligt sind, so daß angenommen werden kann, daß die nukleär lokalisierte c-Abl-Kinase eine sehr komplexe Rolle spielt (54-57).

### **1.4.4 Die Rolle der c-Abl-Kinase im Zytoplasma**

Im Vergleich zu den nukleären Funktionen ist nur wenig über die Funktionen von c-Abl im Zytoplasma bekannt. c-Abl kann sowohl filamentöses als auch monomeres Aktin binden (41), wobei die genaue Bedeutung dieser Interaktion unklar ist.

Unter bestimmten Bedingungen interagiert Paxillin, ein mit Zytoskelettstrukturen assoziiertes Protein, mit der c-Abl-Kinase und wird von ihr phosphoryliert (58).

Weitere zytoplasmatische Bindungspartner und Substrate der c-Abl-Kinase sind die Adapterproteine c-CrkII (39) und CRKL (59,60). c-CrkII und CRKL bestehen jeweils aus einer SH2- und zwei SH3-Domänen und werden durch Abl an Tyrosin 221 bzw. 207 phosphoryliert. Die intramolekulare Bindung der c-CrkII-SH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin-Epitop führt zu einer Inaktivierung des Proteins (39). Die Interaktion von c-CrkII mit den Aktin-Mikrofilamente beeinflussenden Signalmolekülen C3G und p130Cas suggeriert, daß die c-Abl-Kinase eine Rolle in der Zytoskelettsignaltransduktion spielt (61). p130Cas ist ein aus einer SH3-Domäne und mehreren putativen Crk-SH2-Bindemotiven bestehendes Multidocking-Protein (62), das in ‚focal adhesions‘ lokalisiert ist (63) und ein 'in vitro'-Substrat der c-Abl-Kinase darstellt (64).

Untersuchungen in der Fruchtfliege *Drosophila* und der Maus zeigen zusätzlich noch eine zytoplasmatische Rolle der Abl-Kinase in der PDGF- und NGF-Signaltransduktion (65-68), in der Axonogenese (69) und in der Osteoblastenreifung (70,71).

### ***1.5 Die Arg-Kinase***

Die Arg-Kinase, Produkt des auf Chromosom 1q24-25 lokalisierten abl-related-Gens (72), ist mit der c-Abl-Kinase in der Kinase- SH2- und SH3-Domäne zu 90-95% identisch (73) (Abbildung 2). Auch die Arg-Kinase wird in zwei Isoformen, Ia und der myristylierten Form Ib, exprimiert (73). Sie ist in allen Geweben vorhanden, scheint aber in neuronalen Geweben etwas höher exprimiert zu werden (74). Die Arg-Kinase ist im Gegensatz zur c-Abl-Kinase vor allem im Zytoplasma lokalisiert (75). Die C-terminale Domäne der Arg-Kinase weist nur ca. 30% Homologie zu c-Abl auf, so daß Unterschiede in den physiologischen Funktionen zu erwarten sind (73). Im C-Terminus der Arg-Kinase sind die CTD-ID (76), drei Prolin-reiche SH3-Bindestellen (77) und zu einem geringeren Grad die Bindestellen für Aktin konserviert (Abbildung 2). Wie c-Abl, kann auch die Arg-Kinase das Adapterprotein c-CrkII binden und an Tyrosin 221 phosphorylieren (77). Über die Funktion der Arg-Kinase ist kaum etwas bekannt. Bisher konnte gezeigt werden, daß der Expressionslevel der Arg-Kinase im Gegensatz zu dem der c-Abl-Kinase in Zellen der Promyelozytenleukämie HL-60 ansteigt, die sich unter Retinsäure oder Phorbolacetat myeloid differenzieren (78). Mäuse mit zerstörten arg-Genloci (arg-'Knockout'-Mäuse) haben kaum offensichtliche Störungen in der

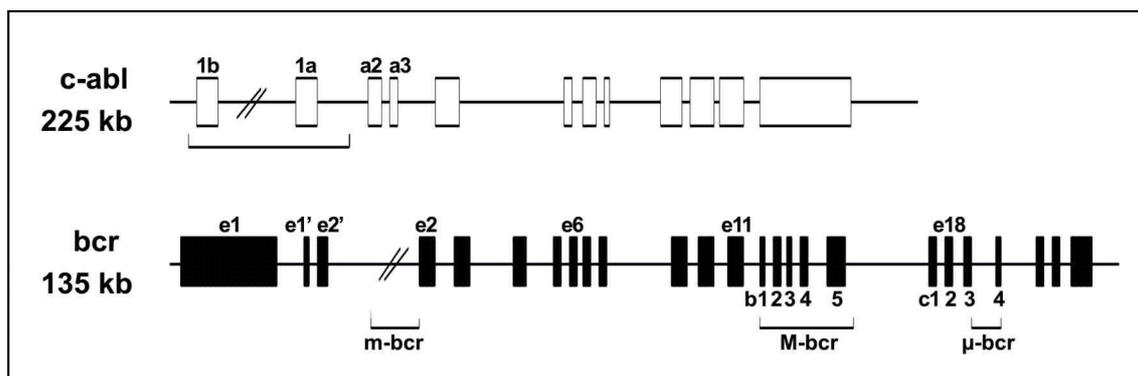
embryonalen Entwicklung, zeigen jedoch verschiedene Verhaltensstörungen (18). Die gleichzeitige Deletion von c-Abl- und arg-Genen in der Maus führt zu Defekten im Neuralrohrschluß und zum Tod in der frühen Embryogenese (18).

### **1.6 Das bcr-Gen**

Das bcr-Gen ('breakpoint cluster region') besitzt 23 Exons und kodiert eine Serin-Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 160 kDa (79). In normalen wie in leukämischen Zellen ist die Bcr-Kinase streng im Zytoplasma lokalisiert (17). Die ersten 63 Aminosäuren des Bcr-Proteins formen eine alpha-helikale 'Coiled-coil'-Struktur, die für die Bildung von Tetrameren und Heterooligomeren verantwortlich ist (80) (Abbildung 2). Die Kinasedomäne liegt ebenfalls noch im ersten Exon. Sie zeigt kaum Homologie zu anderen Serin-Threonin-Kinasen und ist in der Lage, Bcr selbst und 'in vitro' Casein und Histon H1 zu phosphorylieren (79). Ein Serin-reiches SH2-Bindemotiv überlappt mit der Kinasedomäne und kann, ohne an Tyrosin phosphoryliert zu sein, an die SH2-Domäne von Abl binden (81). Weiterhin findet sich im Exon 1 an Position 177 ein Tyrosin in einer Konsensussequenz (YVNV) für die Bindung des Adaptermoleküls Grb2 (82). An Tyrosin 177 phosphoryliertes Bcr bindet die SH2-Domäne von Grb2 und wird so mit dem Ras-Signaltransduktionsweg verbunden.

Auch das Gerüstprotein Bap-1 aus der Proteinfamilie der 14-3-3-Gerüstproteine, die Interaktionen zwischen verschiedensten Signaltransduktionsmolekülen vermitteln (83), bindet innerhalb des ersten Exons (84,85). Die mittlere Region des Bcr-Proteins beinhaltet eine Dbl-Homologie-Domäne (DH) (86). An den mit Ras verwandten GTPasen CDC42, RhoA, Rac1 und Rac2 verstärkt diese DH-Domäne den Austausch von GDP gegen GTP und führt dadurch zu einer Aktivierung von Signaltransduktionsmolekülen, die diesen GTPasen untergeordnet sind (87). C-terminal beinhaltet Bcr eine Domäne mit GTPase aktivierender Funktion für die GTPasen Rac (88) und CDC42 (87). GTPase aktivierende Proteine (GAP) führen zur Hydrolyse des an GTPasen der Ras-Familie gebundene GTP zu GDP und somit zur Inaktivierung der abhängigen Signaltransduktionswege (89).

Untersuchungen an bcr-'Knockout'-Mäusen lassen eine Rolle für Bcr in der Regulation der Rac-medierte Superoxidproduktion durch das NADPH-Oxidasesystem von Granulozyten vermuten (90).



**Abbildung 3: Exon-Struktur des c-abl-Gens und des bcr-Gens.** Die Stelle der Bruchpunkte (m, M und  $\mu$ ) ist auch in Abbildung 2 gekennzeichnet. Die obere Nummerierung der bcr-Exons (e1 bis e23) bezieht sich auf die Exonreihenfolge im normalen bcr-Gen. Zur Bezeichnung der Bruchpunkte bei bcr-abl Hybridgenen hat sich eine zweite Nomenklatur (b1 bis b5 für e12 bis e16 und c1 bis c4 für e17 bis e20) durchgesetzt.

### 1.7 Die Bcr-Abl-Fusionsproteine

Die Translokation der Chromosomen 9 und 22 kann an verschiedenen Bruchpunkten stattfinden. Alle Bruchpunkte treten innerhalb von Introns auf und das Splicen der Transkripte führt stets zu ‚in frame‘-Leserastern. Bis auf einige Ausnahmen (Tabelle 2) findet die Fusion zwischen Exon e1, b2 oder b3 im bcr-Gen und Exon a2 im c-abl-Gen statt und führt zu dem 190 kDa schweren Fusionsprotein p190Bcr-Abl mit dem bcr-Exon e1 und den abl-Exons 2-11 (e1a2) oder dem 210 kDa schweren Fusionsproteinen p210Bcr-Abl mit den bcr-Exons e1 bis b2 bzw. b3 und den abl-Exons 2-11 (b2a2 und b3a2) (Abbildung 2 und Abbildung 3) (91). Bei fast allen chronischen myeloischen Leukämien findet sich das p210Bcr-Abl-Fusionsprotein. In 50% der Erwachsenen und in 80% der Kinder mit Ph-positiver ALL sowie in seltenen Fällen von CML kann ein p190Bcr-Abl-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Daneben sind einige wenige Fälle einer neutrophilen Variante der CML (CNL) mit Thrombozytose, die einen Bruchpunkt zwischen den bcr-Exons c3 und c4 und ein 230 kDa schweres Bcr-Abl-Fusionsprotein aufweiswn, bekannt geworden (92,93) (Abbildung 2).

Im Gegensatz zu der in hohem Maße regulierten Lokalisation und Kinaseaktivität von c-Abl, ist das Bcr-Abl-Fusionsprotein eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die sich ausschließlich im Zytoplasma befindet (17). Über die im Bcr-Teil der Fusionsproteine enthaltene Coiled-coil-Struktur kommt es zu einer Oligomerisierung von mehreren

Bcr-Abl-Proteinen (80). Dies ermöglicht eine gegenseitige (Trans-)Phosphorylierung der Kinasedomänen in einer sogenannten Aktivierungsschleife ('activation loop'). Dieser auch als Autophosphorylierung bezeichneter Vorgang führt zu der Aktivierung der Fusionskinase (80,107,108). Darüber hinaus beeinflusst der Bcr-Teil der Kinase möglicherweise die negativ regulierenden Funktion der Abl-SH3-Domäne (siehe 1.4.4) (46,109).

<b>Fusions-Kinase</b>	<b>Bruchpunkte</b>	<b>Phänotyp der Leukämie (91)</b>
<b>p190Bcr-Abl</b>	<b>e1/a2</b>	<b>ALL (94), CML(95), CMML, AML M4-M5</b>
<p190Bcr-Abl	e1/a3	cALL, Pre-Pre-B ALL(96)
>p190Bcr-Abl	e6/a2	CML
p203Bcr-Abl	b2/a3	Pre-B-ALL, CML(96)
p203 Bcr-Abl	b3/a3,	ALL(96), CML(96,97)
<b>p210Bcr-Abl</b>	<b>b2/a2, b3/a2</b>	<b>CML, ALL</b>
p230Bcr-Abl	c3/a2	N-CML(92) ,CML(93,98)
Tel-Abl Typ A	t4/a2	cALL (99)
Tel-Abl Typ B	t5/a2	AML (100), CML (101-103)
Tel-Arg		AML-M3 (104), AML-M4Eo (105)

**Tabelle 2: Bruchpunkte verschiedener Fusionskinasen der humanen Abl-Familie und deren klinischer Phänotyp** (aus (106)). Die Bruchpunkte werden nach dem letzten in dem Hybridgen enthaltenen Exons des bcr- bzw. tel-Gens und dem ersten enthaltenen Exon des abl-Gens beschrieben.

### **1.7.1 Signaltransduktion durch Bcr-Abl**

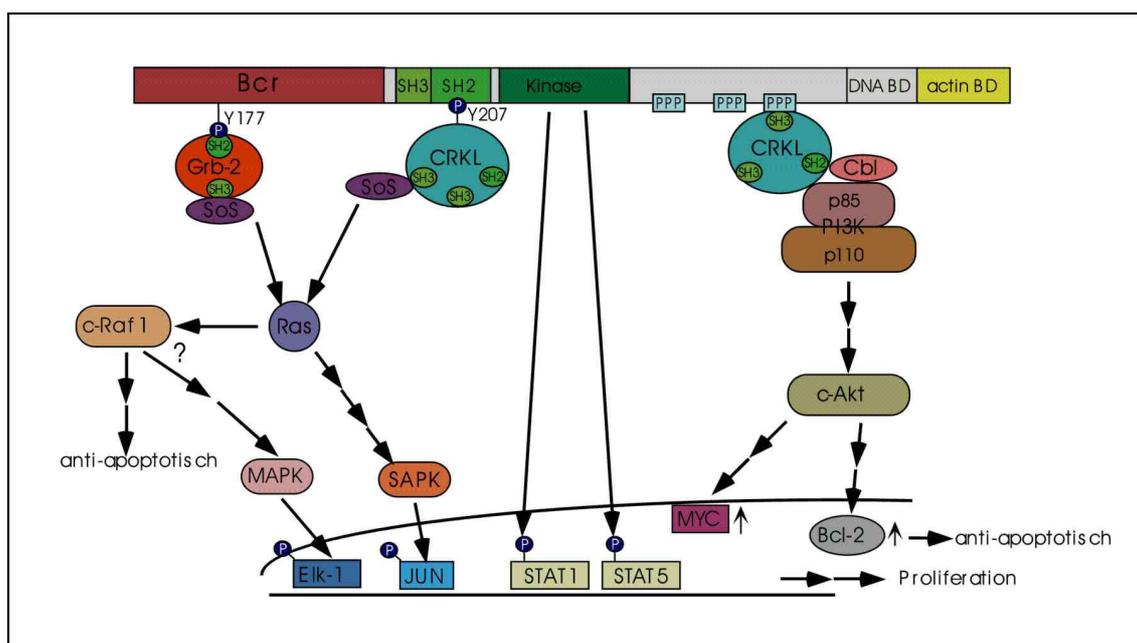
Die hoch aktive Bcr-Abl-Fusionskinase mit ihren verschiedenen Protein-Protein-Interaktionsdomänen beeinflusst viele intrazelluläre Signaltransduktionswege. Dies hat mehrere Änderungen der biologischen Verhalten der Zellen zur Folge, deren Gesamtheit den leukämischen Phänotyp ausmachen. So zählen zu der durch Bcr-Abl verursachten neoplastischen Transformation die Wachstumsfaktoren-unabhängige Proliferation, die Inhibition des programmierten Zelltodes (Apoptose), das veränderte Differenzierungsverhalten und die Störung des Adhäsion, die sich durch Ausschüttung unreifer Vorstufen in das periphere Blut bemerkbar macht (4,110,111).

In zahlreichen Publikationen werden die Aktivierung von Signaltransduktionsproteinen durch Bcr-Abl in Maus- und Zellmodellen untersucht. Die Expression von Bcr-Abl

führt zu der Aktivierung prominenter Proteine wie p21Ras (112), c-Raf-1 (113,114), MAPK/Erk (115-117), c-Myc (118,119), Stat (120-122), NFκB (123,124), c-Jun-Kinase und c-Jun (125,126), Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K) (127,128) und c-Akt/PKB (129), etc. Für die Transformation durch Bcr-Abl als notwendig erwiesen sich davon Ras (130), c-Raf1 (114), c-Myc (119), (PI3K) (128,129,131), c-Akt/PKB (129), c-Jun (126) und c-Jun-Kinase (132).

Bcr-Abl induziert die Mitogenese in Modellen für Fibroblasten- und hämatopoetische Zelltransformation, schützt Zellen vor Apoptose, die durch Stimuli wie Zytokin-Entzug, DNA-Schädigung und Fas-Aktivierung induziert wird (133-139).

Neben den zwei zentralen Signaltransduktionswegen der Ras-Kaskade und der PI3K-Kaskade wird im folgenden auch auf Proteine eingegangen, die in Komplexen mit Bcr-Abl in der Zelle vorliegen.



**Abbildung 4: Beispiele für Bcr-Abl abhängige Signalproteine.** Erklärungen und Abkürzungen siehe Text.

### 1.7.2 Ras-abhängige Signaltransduktionswege

Das Ras-Protein spielt eine wesentliche Rolle in der Übertragung von mitogenen Signalen von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) (140,141). RTKs werden durch Binden von Liganden, Dimerisierung und (Auto-)Phosphorylierung aktiviert und rekrutieren

dann Adaptermoleküle wie Grb2. Durch die Bindung an Grb2 wird nun Sos, ein GEF (s.u.), an die Plasmamembran rekrutiert. Hier aktiviert es Ras (142).

Ras gehört zu einer Familie kleiner GTPasen mit einem Molekulargewicht von 21 kDa (p21GTPasen). In GTP-gebundenem Zustand aktivieren sie die ihnen untergeordneten Signaltransduktionswege. Die Aktivität von Ras wird durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) und Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) reguliert. GAPs stimulieren die langsame intrinsische Rate der GTP-Hydrolyse von Ras, senken also das Verhältnis von GTP-beladenem Ras zu GDP-beladenem Ras und sind somit negative Regulatoren der Ras-Signale. GEFs steigern den Austausch des an Ras gebundenen GDP durch GTP, was zu einer Anhäufung der aktiven, GTP-gebundenen Form von Ras führt. GEFs funktionieren somit als Aktivatoren der Ras-abhängigen Signalwege (143).

Ähnlich wie die RTKs kann auch Bcr-Abl durch Binden von Grb2 zu einer Ras-Aktivierung führen (112) (Abbildung 4). Grb2 bindet mittels seiner SH2-Domäne an die phosphorylierte Autophosphorylierungsstelle Y177 im Bcr-Teil der Bcr-Abl-Fusionskinase. Die Grb2-SH3-Domäne erkennt eine Prolin-reiche Sequenz im GEF-Protein Sos-Protein, das seinerseits in der Lage ist, Ras zu aktivieren (144,145). Mutation des Y177 zu Phenylalanin verhindert die Bindung von Grb2. Obwohl Bcr-Abl mit einer solchen Mutante nicht mehr in der Lage ist, Fibroblasten zu transformieren, ist die Transformation von primären Knochenmarkszellen und die *in vivo*-Tumorinduktion noch möglich. Neben der direkten Bindung von Grb2 an Y177 kann Sos auch via Grb2 über das Shc-Adapterprotein mit Bcr-Abl einen Komplex bilden, Ras aktivieren und zur Transformation von hämatopoetischen Zellen führen. (145-147) (Abbildung 4).

RTK induzierte Ras-Aktivität verursacht die Aktivierung von Mitogen-aktivierte-Proteinkinase- (MAPK) Signaltransduktionswegen. Drei MAPK-Kaskaden wurden detailliert beschrieben: die extrazellulär regulierte Kinase (Erk), die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK, syn. c-Jun-N-terminus-Kinase, JNK) und der p38 Kinase-Signaltransduktionsweg. Aktives GTP-gebundenes Ras bindet und aktiviert die Serin-Threonin-Kinasen Raf. Raf phosphoryliert und aktiviert nun MEK (MAPK/Erk-Kinase), eine ‚dual specificity kinase‘, die ihrerseits die Serin-Threonin-Kinase Erk an Threonin und Tyrosin phosphoryliert. Der SAPK-Signalweg ist mit der Serin-Threonin-Kinase MEKK, der ‚dual specificity kinase‘ SEK1 (JNK-Kinase, JNKK) und der Serin-

Threonin-Kinase SAPK/JNK analog strukturiert. Endpunkt der beiden Signalwege ist die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Zellkern wie beispielsweise von c-Jun durch JNK und von Elk-1 durch MAPK/Erk (148-150).

Es wurde gezeigt, daß auch durch Bcr-Abl der Transkriptionsfaktor c-Jun mittels des SAPK-Signalweges aktiviert wird (125,126). Auch der Erk-Signalweg wird durch Bcr-Abl aktiviert (113-117) (Abbildung 4).

### **1.7.3 Der Phosphatidylinositol 3'-Kinase Signaltransduktionsweg**

Membranlipide haben nicht nur eine Aufgabe in der Membranstruktur, sondern sind auch an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. So stellen die Phosphatidylinositol-Lipide Substrate der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K) dar, die die Hydroxylgruppe an Position 3 des Inositolrings phosphorylieren und dadurch verschiedene Signale induzieren (151,152). PI3K besteht aus einer regulierenden 85 kDa großen Untereinheit (p85) und einer katalytischen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 110 kDa (p110). p85 beinhaltet SH2- und SH3-Domänen und ermöglicht die Interaktion von p110 mit Tyrosinkinase-enthaltenden Komplexen, die zur Aktivierung der PI3K führen. Bcr-Abl bindet über das Shc-Adapterprotein (153) oder das Protoonkogen c-Cbl und die Crk-Adapterproteine c-CrkII und CRKL (154) an die p85 Untereinheit der PI3K und aktiviert diese (127,128) (Abbildung 4). Durch PI3K phosphorylierte Lipide können die PDK1-Kinase aktivieren, die ihrerseits die Serin-Threonin-Kinase c-Akt/PKB (Proteinkinase B) an Threonin 308 phosphoryliert. Diese Threoninphosphorylierung zusammen mit einer Phosphorylierung an Serin 473 führt zu der vollständigen Aktivierung der c-Akt-Kinase (152). Die Aktivierung von PI3K und c-Akt/PKB hat sich für die Bcr-Abl induzierte Leukämogenese als notwendig herausgestellt (129) (Abbildung 4). Ein möglicher PI3K und c-Akt/PKB abhängiger antiapoptotischer Signalweg reguliert das Signalprotein Bad (155,156), das in Bcr-Abl exprimierenden Zellen konstitutiv phosphoryliert ist (157). Unphosphoryliertes Bad bindet die antiapoptotischen Proteine Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2, inhibiert damit ihre Zellüberleben-unterstützende Funktion und wirkt somit als Stimulus der Apoptose. Die c-Akt/PKB vermittelte Phosphorylierung von Bad (158,159) inhibiert die Bindung an Bcl-X<sub>L</sub> und BCL-2, die dadurch wieder ihre antiapoptotische Funktion ausüben können.

#### **1.7.4 Komplexbildung mit CRKL und p130Cas**

Unter den Proteinen, die konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert in Bcr-Abl-transformierten Zellen nachzuweisen sind, wurden das Adapterprotein CRKL (60,160-162), das 'multi-docking'-Protein p130Cas (163), die Ubiquitinligase c-Cbl (164), das Zytoskelett-assoziierte Paxillin (165) und verschiedene Stat-Transkriptionsfaktoren (120-122) identifiziert.

Das zytoplasmatische Adapterprotein CRKL gehört zu der Familie der Crk-Adapterproteine (61), wird wie c-CrkII in den meisten Zelltypen exprimiert (166) und besteht aus zwei SH3-Domänen und einer SH2-Domäne (59). CRKL bindet mit seiner N-terminalen SH3-Domäne (167) an Bcr-Abl (60) und wird von Bcr-Abl an Tyrosin 207 phosphoryliert (168).

p130Cas ('Crk associated substrate') und c-Cbl gehören zu einer Gruppe von großen 'multisite docking'-Proteinen. p130Cas besteht aus einer SH3-Domäne, die die 'focal adhesion'-Kinase (FAK), C3G und CMS (169-171) bindet, und einer Substratdomäne mit 15 'Y-x-x-P'-Motiven, die in phosphoryliertem Zustand mögliche Bindestellen für die Crk- und CRKL-SH2-Domänen darstellen (62,172). Bcr-Abl phosphoryliert p130Cas und ermöglicht so eine Komplexbildung zwischen Bcr-Abl, CRKL und p130Cas (64,163). In nichttransformierten Zellen scheint p130Cas an der Integrinrezeptor-abhängigen Signaltransduktion beteiligt zu sein (173). Auch das Adhäsionsprotein Paxillin enthält, ähnlich wie p130Cas, zwei CRKL-SH2-bindende 'Y-x-x-P'-Motive (165) und wird von Bcr-Abl dort phosphoryliert (165). Es findet sich zusammen mit CRKL, Bcr-Abl und p130Cas in Komplexen mit FAK (163,174). Mittels dieser Interaktionen greift Bcr-Abl möglicherweise in die Zytoskelettsignalwege und das Adhäsionsverhalten der CML-Zellen ein (175,176).

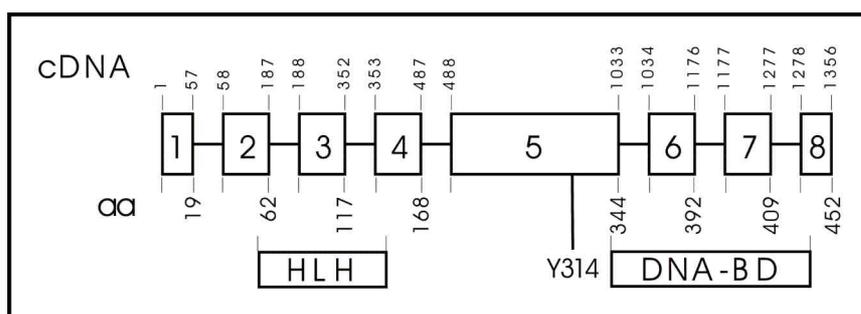
#### **1.8 *Tel-Abl und Tel-Arg***

In wenigen Fällen von Leukämien wurden reziproke Translokationen mit Fusionsgenen festgestellt, die einerseits aus dem c-abl-Gen oder dem arg-Gen und andererseits aus dem tel-Gen bestehen (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Das tel-Gen (von 'transcription, ets, leukaemia'), auch als ETV6 bezeichnet, ist auf Chromosom 12p13 lokalisiert und kodiert in 8 Exons für einen transkriptionalen Repressor der ets-Genfamilie (177-179) (Abbildung 5). Das Tel-Protein findet man im

Zellkern vieler Zelltypen (180,181). Tel hat C-terminal eine DNA-Bindedomäne und N-terminal eine 'Helix-Loop-Helix' (HLH)-Domäne, die beide auch in anderen ets-Familienproteinen konserviert sind (Abbildung 2 und Abbildung 5). Mittels der DNA-Bindedomäne interagiert Tel mit bestimmten für Ets-Transkriptionsfaktoren typischen GGAA-enhaltenden DNA-Sequenzen ('Ets-binding Site', EBS), und reprimiert so die Transkription von abhängigen Promotoren (180,182,183).

Die HLH-Domäne vermittelt Homodimerisierung sowie die Heterodimerisierung mit dem Ets-Transkriptionsfaktor Fli-1 (184) und mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym 9 (UBC9) (185). Fli-1 transaktiviert Megakaryozyten-spezifische Promotoren. Dieser Effekt wird durch Tel inhibiert (184,186). Die Interaktion zwischen Tel und UBC9, das an Zellzyklusregulation und DNA-Reperatur beteiligt zu sein scheint (187,188), führt zu einer Verminderung der Transkriptionsrepression durch Tel (185).



**Abbildung 5: Exon-Struktur des tel-Gens** (177,178) Es sind die korrespondierenden Nucleotidnummern in der cDNA-Sequenz und die Aminosäurenummern im Protein sowie die Bezeichnung der Exons (t1-t8) angegeben. HLH: 'Helix-Loop-Helix'-Domäne. DNA-BD: DNA-Bindedomäne. Y314: mögliche Bindungsstelle für Grb2-SH2.

Tel-defiziente Mäuse sterben an Tag 10 bis 11 der Embryogenese und weisen eine defekte Dottersack-Angiogenese und Apoptose von mesenchymalen und neuronalen Zellen auf (181). Tel scheint für die Hämatopoese im Knochenmark, nicht aber in der Leber oder anderen Blutbildungsstätten notwendig zu sein. (189).

Tel hat darüber hinaus möglicherweise einen Tumorsuppressoren-ähnlichen Effekt. So zeigen viele akute lymphatische Leukämien im Kindesalter (190-192) und invasive Mammakarzinome (193) einen heterozygoten oder homozygoten Verlust des tel-Gens. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß Tel die Transkription der Matrixmetalloproteinase Stromelysin-1 (MMP-3) unterdrückt und unter anderem damit

Wachstum und Invasion von Ras-transformierten Zellen 'in vitro' und 'in vivo' hemmt (183).

Translokationen in vielen verschiedenen Leukämien und einigen Sarkomen resultieren in der Fusion von tel mit Genen, die meist für andere Transkriptionsfaktoren oder Tyrosinkinase kodieren (siehe Tabelle 3).

beteiligtes Gen	normale Funktion	Translokation	Erkrankung und Referenz	
c-Abl	Tyrosinkinase	t(9;12) (q34;p13)	Typ A	cALL (99)
			Typ B	AML (100) CML (101,102)
arg	Tyrosinkinase	t(1;12)(q25;p13)		AML-M3 (104) AML-M4Eo (105)
AML1 = CBF $\alpha$	Transkriptionsfaktor	t(12;21)(p13;q22)	pre-B-ALL (194,195)	
ARNT	'AhR nuclear translocator'	t(1;12)(q21;p13)	AML-M2 (196)	
ACS2	'long fatty acyl CoA synthetase 2'	t(5;12)(q31;p13)	RAEB, AML, AEL (197)	
BTL	Protein mit dbl-Homologie	t(4;12)(q11-q12;p13)	AML-M0 (198)	
CDX2	Transkriptionsfaktor	t(12;13)(p13;q12)	AML (199)	
JAK2	Tyrosinkinase	t(9;12)(p24;p13)	ALL, CML (200,201)	
MDS1/EVI1	Transkriptionsfaktor	t(3;12)(q26;p13)	MDS (202)	
MN1	Transkriptionsregulator	t(12;22)(p13;q11)	AML, MDS (203)	
TRKC = NTRK3	Neurotrophin-3 – Rezeptortyrosinkinase	t(12;15) (p13;q25)	T/T(F)	Fibrosarkom (204) mesoblastisches Nephrom (205,206)
			T/T(L)	AML (207)
PDGFR $\beta$	Rezeptortyrosinkinase	t(5;12)(q33;p13)	CMML (177)	
STL		t(6;12)(q23;p13)	B-ALL (208)	

**Tabelle 3: Translokationen unter Beteiligung des tel-Gens**

Tel-Abl vom Typ A besteht aus den Exons 1-4 des tel-Gens und aus den Exons 2-11 des c-abl-Gens und wurde bei einem ALL Patienten festgestellt (99) (Abbildung 2, Abbildung 5, Tabelle 2 und Tabelle 3). Bei einem Fall einer AML (100) und zwei Fällen einer CML (101,102) konnte das um das tel-Exon 5 längere Fusionsgen Tel-Abl Typ B nachgewiesen werden (Abbildung 2, Abbildung 5 und Tabelle 2). Auch das arg-Gen wurde in einer Translokation mit dem tel-Gen in zwei verschiedenen akuten myeloischen Leukämien gefunden (104,105) (Tabelle 2).

Das Tel-Abl-Fusionsgen produziert eine aktive Tyrosinkinase mit Autophosphorylierungsaktivität (99,209), die konstitutiv phosphoryliert ist und im Zytoplasma lokalisiert ist (100,209). Wahrscheinlich bewirkt die HLH-Domäne im Tel-Teil des Fusionsproteins, analog zum Bcr-Teil im Bcr-Abl-Fusionsprotein, eine Homooligomerisierung, die zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase führt (100,209). Tel-Abl scheint eine ähnliche aber nicht identische Gruppe von Proteinen wie Bcr-Abl zu phosphorylieren (210) und ebenso wie Bcr-Abl die Expression des Transkriptionsfaktors c-Myc zu induzieren (209). Tel-Abl führt darüber hinaus zu Wachstumsfaktor-unabhängigem Wachstum von hämatopoetischen Zelllinien (100,209,210) und transformiert Fibroblasten und primäre Knochenmarkzellen (100). c-Abl und v-Abl bilden zusammen mit Homologen der c-Abl-Kinase anderer Spezies, dem humanen Arg-Protein und verschiedenen pathologischen Fusionsproteinen (Bcr-Abl, Tel-Abl, Tel-Arg) die Proteinfamilie der Abl-Tyrosinkinasen (Abbildung 2).

## **2 Material und Methoden**

### ***2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien***

Der Reinheitsgrad aller verwendeten Chemikalien war 'pro analysi', oder höher

#### **2.1.1 Chemikalien und Reagenzien**

<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma	L-Glutamin (Gln)	Gibco BRL
<sup>32</sup> P-γ-ATP (3 Ci/μmol)	Amersham	Glutathion, reduziert	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad	Glutathion-Sepharose	Amersham
Amphotericin B	Gibco BRL	Glycerol	Roth
Ampicillin	Sigma	Glycin	Roth
Antipain	Serva	Hefe-Extrakt	Gibco BRL
Aprotinin	Roth	HEPES	Roth
Bacto-Agar	Difco	IPTG	Sigma
Brilliant-Blau G	Bio-Rad	Kälberserum (CS)	PAA
Brilliant-Blau R	Bio-Rad	Lot Nr. A04224-02	
Bromphenolblau	Roth	Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Butanol	Roth	Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth	Leupeptin	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Biomol	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
DMEM-Zellkulturmedium	Gibco BRL	β-Mercaptoethanol	Roth
ECL-Reagenz	Amersham	Methanol	Roth
Essigsäure	Roth	Milchpulver, fettfrei	Roth
Ethanol	Roth	Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Ethylenglycolbis(aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Roth	Natriumdesoxycholat	Sigma
Ficoll	Pharmacia	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Fötales Kälberserum (FCS) Lot Nr. 40F5664K	Gibco BRL	Natriumethyldiamintetraacetat (Na <sub>2</sub> EDTA)	Roth
Gelatine	Bio-Rad	Natriumfluorid	Sigma

Natriumhydrogen- phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth	Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Natriumhydroxid	Merck	Roti-Blue	Roth
Natriummolybdat	Sigma	Rotiphorese	Roth
Natriumorthovanadat	Roth	(30% Acrylamid/ 0.8% Bisacrylamid)	
Natriumpyrophosphat	Aldrich	RPMI1640 Zellkultur- medium	Gibco BRL
Natriumthiosulfat	Roth	Salzsäure (HCl)	Roth
Nonidet P40	Sigma	TEMED	Roth
Pepstatin A	Boehringer	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris (Base))	Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL	Tris-Hydrochlorid	Roth
Phenylmethylsulfonfluorid (PMSF)	Sigma	(Tris-HCl)	
Phosphorsäure	Sigma	Triton X-100	Roth
Propanol	Roth	Trypsin	Gibco BRL
Protein-A Sepharose	Amersham	Trypton / Pepton	Gibco BRL
Protein-G Sepharose	Amersham	Tween-20	Roth
High- & Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers	Amersham	Xylencyanol	Roth

### 2.1.2 Antikörper

Antikörper                      Antigen                      Referenz / Herkunft

monoklonale Antikörper (i.d.R. murin):

anti-Abl 8E9	c-Abl	J. Wang / UC San Diego
anti-Abl AB-3	c-Abl	Oncogene Science / Calbiochem
anti-Bcr AB-2	Bcr	Oncogene Science / Calbiochem
anti-Crk	c-CrkII	Transduction Lab (C12620)
anti-Gag	v-Gag	(211)
anti-Myc 9E10	Myc	NeoMarkers, Fremont, CA
anti-Ras	pan-Ras	Transduction Lab (R02120)
PY-20	Phosphotyrosin	Transduction Lab (P11120)
PY-99	Phosphotyrosin	Santa Cruz (sc-7020)

polyklonale Antikörper (i.d.R. Kaninchenserum):

anti-Akt/PKB	c-Akt/PKB	New England Biolabs
anti-Arg	Arg	T.Shishido und H. Hanafusa OBI, Osaka, Japan
anti-CRKL	CRKL	Santa Cruz (C-20, sc-319)
anti-Erk1	Erk1	Santa Cruz (C-16, sc-93)
anti-Phospho-Akt	Akt , p-Ser473	New England Biolabs
anti-Phospho-Erk	Erk 1, p-Thr202/p-Tyr204	New England Biolabs
anti-Tel	Tel, N-Terminus	(180)

"sekundäre" Antikörper:

Peroxidase-konjugierte F(ab)<sub>2</sub> murines Immunglobulin Jackson ImmunoResearch

Peroxidase-konjugierte F(ab)<sub>2</sub> Kaninchen Immunglobulin Jackson ImmunoResearch

### 2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Quelle	Zusammensetzung des Kulturmediums
NIH-3T3 (wt)	(76)	DMEM, Gln, PS, AM, 10% FCS
3T3 Abl <sup>-/-</sup> = AKO		
3T3 p210Bcr-Abl		
3T3 p160 v-Abl = AB160	(212)	DMEM, Gln, PS, AM, 10% FCS
Rat2	J.H.	DMEM, Gln, PS, AM, 10% FCS
Rat2 Tel-Abl (Typ A)		DMEM, Gln, PS, AM, 10% FCS, G418 (200µg/ml)
K562	ATCC	RPMI1640, Gln, PS, 5% CS, 5% FCS
SD-1(213)	B.	Iscove's Medium, PS, 15% FCS
Ba/F3 (1) und (2)	(209,214)	RPMI1640, Gln, PS, 5% CS, 5% FCS, 15% WCM
Ba/F3 Tel-Abl (Typ A)	(209)	RPMI1640, Gln, PS, 5% CS, 5% FCS
Ba/F3 Bcr-Abl	(214)	

**Tabelle 4: Zelllinien dieser Arbeit.** AM: Amphotericin B, 0,25 µg/ml; ATCC: American Type Culture Collection; B.: Dr.Borkhard, Universität Gießen, Kinderklinik; Gln: L-Glutamin, 2 mM; J.H.: Dr. Jürgen Hannemann, Institute of Cancer Research, Chester Beatty Laboratories, London; PS: Pencillin/Streptomycin, 10 U/ml; WCM: WEHI3 konditioniertes Medium (enthält Interleukin-3), weitere Abkürzungen siehe 2.1.1.

### 2.1.4 Peptide

Die Peptide (Tabelle 6) wurden durch Herrn Dr. rer. nat. Christian Kardinal am Niedersächsischen Institut für Peptidforschung (IPF) in Hannover hergestellt. Die

Synthese erfolgte nach der Fmoc/t-butyl-basierten Festphase-Methode. Nach Filtration wurden die Peptide durch Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie und Kapillarelektrophorese auf Integrität und Reinheit geprüft.

### **2.1.5 Lösungen und Puffer**

Prozentuale Angaben von Feststoffen sind Gewichtsprozent, prozentuale Angaben von Lösungen werden als Volumenprozent angegeben. Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

#### **2.1.5.1 Bradford-Reagenz**

Brilliant Blau G	123 mg/l
Ethanol	6%
Phosphorsäure	12,5%

#### **2.1.5.2 Coomassie-Blau Gel-Entfärbelösung**

Methanol	20%
Essigsäure	7%

#### **2.1.5.3 Coomassie-Blau Gel-Färbelösung**

Brilliant Blau R	1 g/l
Methanol	20%
Essigsäure	7%

#### **2.1.5.4 DNA-Ladepuffer / Stoppuffer (6-fach)**

Ficoll	15%	Essigsäure	20 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	100 mM	Bromphenolblau	0,05%
Tris (Base)	40 mM	Xylencyanol	0,05%

#### **2.1.5.5 Dialysepuffer für aufgereinigte Fusionsproteine**

Tris-HCl pH 7.5	5 mM
NaCl	50 mM

**2.1.5.6 Elutionspuffer**

Glutathion (reduziert) 100 mM

Tween-20 0,1%

mit 1 M Tris-HCl pH 8,8 einstellen auf pH 7,0

**2.1.5.7 GTB-Waschpuffer**

Tris-HCl pH 7,5 50 mM

Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM

Tween-20 0.1%

**2.1.5.8 Immunpräzipitationspuffer**

Tris-HCl pH 7.5 20 mM

NaCl 100 mM

Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM

Glycerol 5%

**2.1.5.9 Kinasepuffer**

Tris-HCl pH7,5 50 mM

Tween-20 0,1%

NaCl 100 mM

MnCl<sub>2</sub> 5 mM

Natriummolybdat 10 µM

β-Mercaptoethanol 0,1%

**2.1.5.10 LB-Medium und LB-Agar**

Trypton 1%

pH auf 7,0 einstellen; für LB-Agar

Hefeextrakt 0,5%

wurde dem Medium 1.5% Agar

NaCl 1%

zugesezt; sofort autoklavieren.

**2.1.5.11 Lysepuffer für E.coli Bakterien (TPE)**

NaCl 137 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM

KCl 2,7 mM

Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM

Triton X-100 1%

**2.1.5.12 MLB ('Magnesium-containing cell lysis buffer')**

HEPES pH 7,5 25 mM

Glycerol 10%

NaCl 150 mM

Nonidet P-40 1%

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

Natriumdesoxycholat 0,25%

Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM

**2.1.5.13 PBS**

NaCl	137 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,3 mM
KCl	2,7 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

**2.1.5.14 Polyacrylamid-Gele**

	Trenngel			Trenngel	Sammelgel
	Proteine			Peptide	
	6%	10%	12%	20%	5%
Acrylamid(30%)/ Bisacrylamid (0,8%)	10 ml	16,7 ml	20 ml	26,7 ml	1,67 ml
Tris-HCl pH 8,8, 1M	18,8 ml				
Tris-HCl pH9,3, 2M				7,5 ml	
Tris-HCl pH 6,8, 1M					1,27 ml
SDS, 10%	0,5 ml			0,4 ml	0,1 ml
Glycerol, 80%				0,5 ml	
Glycerol, 50%					0,9 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 50 ml			ad 40 ml	ad 10 ml
Polymeri- sation	APS, 10%	0,4 ml		0,3 ml	0,1 ml
	TEMED	30 µl		25 µl	10 µl

**2.1.5.15 Protease- und Phosphataseinhibitoren**

<u>Proteaseinhibitoren</u>		<u>Phosphataseinhibitoren</u>	
Antipain	5 µg/ml	Natriummolybdat	1 mM
Aprotinin	10 µg/ml	Natriumorthovanadat	1 mM
Leupeptin	0,5 µg/ml	Natriumpyrophosphat	10 mM
Pepstatin A	0,7 µg/ml	Natriumfluorid	25 mM
PMSF (in DMSO)	200 µg/ml		

**2.1.5.16 RIPA100-Puffer ('Radioimmunoprecipitation Assay Buffer')**

Tris-HCl pH7,5	20 mM	Triton X-100	1%
NaCl	100 mM	Natriumdesoxycholat	0,5%
Glycerol	5%	SDS	0,1%
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM		

**2.1.5.17 SDS-PAGE (Lämmli) Ladepuffer (2 bis 4-fach)**

Tris-HCl pH 6,8	70 mM	SDS	3%
β-Mercaptoethanol	5%	Bromphenol-Blau	0,05%
Glycerol	40%		

**2.1.5.18 SDS-PAGE Laufpuffer (10-fach)**

Tris (Base)	25 mM
Glycin	19,2 mM
SDS	1%

**2.1.5.19 Semi-Dry Blot-Puffer (SDBB)**

Tris (Base)	47,9 mM
Glycin	38,6 mM
SDS	0,37 %

**2.1.5.20 TAE-Puffer**

Tris (Base)	40 mM
Essigsäure	20 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

**2.1.5.21 TBS**

Tris-HCl pH7,5	20 mM
NaCl	100 mM

**2.1.5.22 TBS-T**

Tris-HCl pH7,5	20 mM
NaCl	100 mM
Tween-20	0,1%

**2.1.5.23 TE-Puffer**

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM

**2.1.5.24 TX100-Puffer (für Zellyse)**

Tris-HCl pH7,5	20 mM	Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM
NaCl	100 mM	Triton X-100	1%
Glycerol	5%		

**2.1.6 Verbrauchsmaterialien**

Bakterienplatten	Sarstedt
Dialysemembran (Poren 10-15 kDa)	Fisher Scientific
Filterpapier 3MM (zum Blotten)	Whatman
Küvetten (für Proteinmessung)	Sarstedt
Poly-Prep-Säulen 0,8 cm / 4 cm	Bio-Rad
Polypropylen-Gefäße	Sarstedt
PVDF-Membran	Amersham
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Quiagen
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Sarstedt
Röntgenfilme, Hyperfilm <sup>™</sup>	Amersham
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen	Sarstedt

**2.1.7 Geräteverzeichnis**

Bakterien-Brutschrank	Heraeus
Bakterien-Schüttler	Innova 4330 New Brunswick Scientific
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus
Folienschweißgerät	Severin FS3601
Heizblock	Liebisch, Typ 2099-DA
Küvetten (für DNA - Messung)	Perkin Elmer
Magnetrührer	Heidolph MR1000
Mikroskop	Leitz
Nutator (Taumler)	Clay Adams Brand Model 421106
Phosphor Imager	Fujix BAS-2000 III, Fuji

Phosphor Imager Bildplatte	BAS-MP 2040P, Fuji
Proteingelelektrophoresekammer	Eigenbau des Instituts
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Agfa
Rundschüttler	Heidolph, Unimax 2010
Semi-Dry Blot System	Bio-Rad Trans-Blot S
Sonifizier-Gerät	Bandelin, SONOPULS GM 70
Spannungsquelle	Bio-Rad Power Pac 200
Spektralphotometer	Hitachi U-2000
Sterilbank für Zellkultur	Antair BSK
Vakuumpumpe	KNF Neuberger 022 AN.18
Vortex Genie-2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL 1083
Zentrifugen	Beckman L8-70 Ultrazentrifuge mit Rotor SW 55 Ti Beckman J-6B Eppendorf Centrifuge 5417R Hereaus Megafuge 1.0 R Sorval RC 5B plus

## ***2.2 Arbeitsmethoden***

### **2.2.1 Kultivieren von Zelllinien**

Alle Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Wasserdampf-gesättigter Luft kultiviert. Die verschiedenen Zelllinien wurden in den im Abschnitt 2.1.3 angegebenen Medien mit den entsprechenden Zusätzen kultiviert. Alle Lösungen und Medien, die direkt auf die kultivierten Zellen gegeben wurden, wurden autoklaviert, sterilfiltriert oder steril bezogen. Vor Benutzung wurden die verwendeten Medien und Puffer in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Alle Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Seren wurden vor der Benutzung für 30 min auf 56°C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren.

### **2.2.1.1 Passagierung**

Adhärenz wachsende Zellen wurden bei Konfluenz mit sterilem PBS gewaschen und mit Trypsin je nach Zelllinie 5 bis 15 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Untergrund gelöst hatten. Die Trypsinaktivität wurde durch die sofortige Zugabe von 10 bis 15-fachen Volumen an DMEM gestoppt, wonach die Zellen vorsichtig resuspendiert und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Schalen ausgesät wurden.

Die als Suspensionskulturen wachsenden Zellen wurden mindestens alle zwei Tage durch Zugabe frischen Mediums versorgt. Hatten die Zellen Saturierungsdichte erreicht, wurden sie im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen für Suspensionskulturen gesplittet und mit neuem Medium versorgt.

### **2.2.1.2 Zellzahlbestimmung**

Einige Mikroliter der Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und ausgezählt. Der Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat  $\times 10.000$  entspricht der Zellzahl/ml in der Suspension.

### **2.2.1.3 Langzeitlagerung**

Adhärenz wachsende Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in DMEM aufgenommen. Dann wurden sie ebenso wie in Suspensionskultur wachsende Zellen 10 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium (FCS mit 5% DMSO) in Portionen von 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und nach 12 bis 24 h sie in flüssigen Stickstoff ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im  $37^{\circ}\text{C}$  - Wasserbad erwärmt und in warmes Kulturmedium überführt. Gegebenenfalls erfolgte nach Auftauen von Suspensionskulturzellen bzw. nach Anwachsen von adhärenz Zellen sofort ein Medienwechsel, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

### **2.2.1.4 Herstellung von Zellysaten**

Alle verwendeten Geräte, Lösungen und Gefäße wurden auf  $4^{\circ}\text{C}$  bzw. auf Eis vorgekühlt, um eine Degradation der Proteine durch Proteaseaktivitäten zu minimieren. Adhärenz wachsende Zellen wurden vor dem Abernten dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Kulturschale schräg auf Eis gestellt. Reste des PBS, die sich unten

in der Schale sammeln wurden abpipettiert. Pro 15 cm - Schale wurden nun 300  $\mu$ l Lysepuffer der jeweiligen Stringenz (meist RIPA100- oder TX100-Puffer) mit den in 2.1.5.15 beschriebenen Protease- und Phosphataseinhibitoren auf der Platte verteilt. Die Zellen wurden dann mit einem Plastikschaber von der Zellkulturschale geschabt und in ein auf Eis vorgekühltes Reaktionsgefäß pipettiert.

Die Suspension wurde für eine Stunde auf einem Nutator bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes Gefäß überführt, portioniert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lysate wurden dann bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

In Suspension wachsende Zellen wurden vor der Lyse bei 4°C, 200 g für 10 min herunterzentrifugiert und anschließend in PBS gewaschen. Die gewaschenen Zellen sind in Lysepuffer resuspendiert worden. Anschließend wurde wie für adhärenente Zellen beschrieben weiter verfahren.

### **2.2.2 Bakterienkulturen**

Plasmid - transformierte Bakterien wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 37°C selektioniert. Für Übernachtskulturen wurde eine Kolonie mit einer sterilen Impföse in LB-Medium mit Ampicillin überführt und bei 37°C in einem Schüttler angezogen. Die Kultur wurden dann benutzt, um Glycerolstocks anzulegen, oder für die Präparation von Plasmid-DNA oder die Aufreinigung von GST-Fusionsproteine weiter amplifiziert.

Als Maß für die Bakterienzahl in einer Bakterienkultur wurde die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen Bakterien-freies LB-Medium als Leerwert bestimmt.

#### **2.2.2.1 Anlegen von Glycerolstocks**

Für die Lagerung wurden die Bakterien in glycerolhaltiges Medium überführt. Dafür wurden 500  $\mu$ l einer Bakterienkultur mit einer  $OD_{600}$  von ungefähr 0,8 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 500  $\mu$ l 80%igem Glycerol versetzt und gut vermischt. Das Gefäß mit diesem Glycerolstock wurde bei -80°C eingefroren. Zum Animpfen einer Übernachtskultur wurde der Glycerolstock von außen nur an der Oberfläche soweit angetaut, daß mit einer Impföse etwas der Kultur aufgenommen und in LB-

Medium überführt werden konnte. Der Glycerolstock wurde dann sofort wieder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien**

Die Bakterien wurden in 100 ml LB-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einem Bakterienschüttler inkubiert, bis die Kultur eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 erreicht hatte. Die Bakterien wurden dann für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  - Lösung vorsichtig resuspendiert und die Bakterien wurden für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in 2 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  - Lösung aufgenommen. Die Bakterien wurden dann 24 bis 48 Stunden auf Eis gelagert und anschließend sofort verwendet oder eingefroren. Für das Einfrieren wurde die portionierte Bakteriensuspension mit 35  $\mu\text{l}$  DMSO pro Milliliter versetzt, vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, und die kompetenten Bakterien wurden daraufhin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.2.3 Transformation kompetenter Bakterien**

Die kompetenten Bakterien des gewünschten Bakterienstammes wurden auf Eis aufgetaut und Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße vorgekühlt. 30  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 1  $\mu\text{l}$  aufgereinigter Plasmid-DNA (pGEX-Vektoren mit Ampicillin-Resistenzgen, Pharmacia) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 45 bis 90 Sekunden, der zu einer Aufnahme der Plasmid-DNA durch die Bakterien führen sollte. Danach wurden die Bakterien 2 min auf Eis gehalten und anschließend sofort mit 250  $\mu\text{l}$  auf Raumtemperatur vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch Ausplattieren von 100  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension auf Ampicillin-haltigen SOB-Agarplatten.

Je eine Übernachtskultur wurde mit Bakterien aus zehn der entstandenen Kolonien angeimpft und die Expression des GST-Konstrukts in einem kleinen Aufreinigungsansatz überprüft.

#### **2.2.2.4 Aufzucht von Bakterien auf Agarplatten**

Eine autoklavierte LB-Agarlösung wurde in einem Mikrowellengerät erhitzt, bis der Agar flüssig war. Die Lösung wurde auf 45°C abgekühlt, bevor 50 µg/ml Ampicillin zugefügt wurden. Der Agar wurde dann in Bakterienplatten gegossen, so daß der Boden der Platten vollständig bedeckt war (ca. 30 ml / Platte). Nach Erstarren des Agars können die Agarplatten bei 4°C im Kühlschrank kopfüber gelagert werden.

Das Aufbringen der Bakterien auf die Platten erfolgte mit Hilfe einer sterilen Impfföse aus einer festen Bakterienkultur (Glycerolstock) oder durch Ausstreichen mit einem Drygalski-Spatel aus einer flüssigen Kultur, um einzelne Kolonien auf der Platte zu erhalten. Die Platten wurden kopfüber in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten gegebenenfalls mit Parafilm abgedichtet und im Kühlschrank gelagert, um die Bakterien an einem weiteren Wachstum zu hindern.

#### **2.2.2.5 Aufreinigung von Gluthation-S-Transferase-Fusionsproteinen aus Escherichia coli**

Für die Aufreinigung der Gluthation-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine wurden Bakterien mit Plasmiden, die ein für ein GST-Konstrukt kodierendes Gen besitzen (pGEX-Vektoren), aus einem Glycerolstock in 20 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt und bei 37°C und 220 UpM in einem Schüttler über Nacht inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde dann in einen Erlenmeyerkolben mit 600 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium überimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.8 bei 37°C und 220 UpM in einem Schüttler belassen. Die für die Expression von GST - Proteinen verwendeten pGEX-Vektoren besitzen einen LacZ-Promoter, der durch Lactose oder das Lactose-Analogon IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid) induziert wird. Bei Erreichen der gewünschten Dichte wurde mit 0,1 mM IPTG induziert, und die Bakterien wurden für weitere zwei Stunden bei 25°C und 220 UpM belassen. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert und für 20 min auf Eis gekühlt. Alle nachfolgend verwendeten Puffer waren eisgekühlt und die Aufreinigung fand nach der Beschallung der Probe auf Eis im Kühlraum statt. Das Pellet wurde in mit Protease-Inhibitoren (siehe 2.1.5.15) versetztem Bakterien-Lysepuffer resuspendiert und dreimal eine Minute sonifiziert, um die

Bakterien völlig aufzubrechen und die DNA durch den Ultraschall zu zerstören. Da sich die Suspension während der Beschallung erhitzt, wurde sie zwischen den Sonifizierungsschritten für einige Minuten auf Eis gehalten, um Degradation der Proteine zu vermeiden. Zellfragmente wurden bei 15000 g und 4°C herunterzentrifugiert, und der Überstand mit den löslichen GST-Fusionsproteinen über Nacht mit Glutathion-Sepharose (1 ml Sepharose bindet ca. 10 mg GST-Protein) bei 4°C auf dem Nutator inkubiert. Die Suspension mit den an der Sepharose immobilisierten Fusionsproteinen wurde dann auf eine Poly-Prep-Säule (Bio-Rad) pipettiert. Nach Durchlaufen der Suspension wurde die Sepharose mit 20 ml Bakterien-Lysepuffer, anschließend mit 40 ml GTB-Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Bakterienproteine zu entfernen. Die GST-Fusionsproteine wurden in zwei Schritten mit Elutionspuffer (insgesamt ca. 1,5 ml Puffer pro Milliliter Sepharose) von der Glutathion-Sepharose eluiert und in drei Schritten gegen je einen Liter 10 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert. Die Konzentration der so gereinigten Fusionsproteine wurde nach Bradford (2.2.3.1) bestimmt und die Integrität der Proteine durch eine 12% SDS-PAGE und Coomassie-Färbung verifiziert.

### **2.2.3 Proteintechniken**

#### **2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die spektrophotometrische Bestimmung der Konzentration von GST-Fusionsproteinen und des Gesamtproteingehalts von Zellysaten wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (215). Die Methode beruht auf einer Verschiebung der Absorption von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung von Brilliant Blau G an Proteine in saurer Lösung.

10 µl des Zellysats oder der Lösung aufgereinigter Fusionsproteine wurden mit Wasser 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl abgenommen und auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 950 µl des Bradford-Reagenz zugegeben, die Lösung gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert mit 50 µl Wasser und 950 µl Bradford-Reagenz gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über eine Standard-Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) im Konzentrationsbereich von 2 bis 12 µg/ml. Lag der gemessene Wert außerhalb der Eichreihe, wurde die Verdünnung der Probe angepaßt und die Messung wiederholt.

### 2.2.3.2 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation zellulärer Proteine wurden in einem 0,5 ml Ansatzvolumen 0,5 bis 5 µg des spezifischen Antikörpers mit 20 µl Sepharose und 0,5 bis 5 mg des Zellysats in Immunpräzipitationspuffer eingesetzt. Für monoklonale Antikörper (i.d.R. murinen Ursprungs) wurde Protein-G Sepharose, für polyklonale Antikörper (i.d.R. Kaninchenserum) Protein-A Sepharose eingesetzt. Die Stringenz der Lyse- und Waschbedingungen wurde so gewählt, daß die zu präzipitierenden Komplexe bei gleichzeitig geringem Hintergrund erhalten blieben (RIPA100 > MLB > TX100 > IP-Puffer). Gegebenenfalls wurden durch Vorklärung der Zellysate mit Protein-G Sepharose bzw. Protein-A Sepharose für eine Stunde die unspezifischen Signale durch Bindung an Sepharose oder das Reaktionsgefäß reduziert. Die Immunpräzipitation erfolgte für mindestens 2 h bei 4 °C auf dem Nutator. Anschließend wurden die Präzipitate dreimal mit Detergenz-haltigem Waschpuffer gewaschen und zur Kinasierung von Peptiden und Proteinen verwandt oder für eine Western-Blot-Analyse direkt mit Lämmli-Ladepuffer versetzt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

### 2.2.3.3 Immunkomplex-Kinase Assay

Da Kinasen die  $\gamma$ -Phosphatgruppen von ATP auf ein Substrat übertragen, ist es möglich, ihre Aktivität 'in vitro' durch Zugabe von  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP mit einem geeigneten Substrat zu messen. Dazu wurden die Kinasen wie oben beschrieben immunpräzipitiert, gewaschen und mit 1 µCi  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP (3000 Ci/mmol), 500 nM unmarkiertem ATP und 10 µg Substratpeptid in 30 µl Kinase-Puffer in einem Heizblock bei 30 °C für 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von Lämmli-Ladepuffer gestoppt und die Proben 2 min aufgekocht. Zum Auftrennen der Peptide und zum Trennen der Peptide vom unverbrauchten radioaktivem ATP wurde ein spezielles Polyacrylamidgel für Peptide eingesetzt (siehe 2.1.5.14). Zur Orientierung wurde ein Molekulargewichtsstandard für niedriggewichtige Moleküle mit aufgetragen. Diese Peptidgele können nicht mit Coomassie-Blau Lösung gefärbt werden. Die phosphorylierten Peptide wurden mit Hilfe des Phosphoimagersystems sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele für 20 min auf zuvor gelöschte Phosphoimagerbildplatten gelegt, welche dann mit einem Lesegerät gelesen wurden.

Anschließend erfolgte eine digitale Quantifizierung der Aktivität in den einzelnen Proben mit Hilfe des „TINA“-Programmes der Firma ‚Raytest‘ (Version 2.08d).

#### **2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Vertikale Polyacrylamid-Gele wurden zwischen zwei Glasplatten mit einem Zwischenraum von 1,5 mm polymerisiert. In den Zwischenraum wurde zunächst das Trenngel (siehe 2.1.5.14) gegossen, dessen Acrylamidgehalt sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine richtet. Durch eine Schicht Butanol auf der Trenngellösung während der Polymerisation wurde eine glatte Oberfläche erreicht. Nach frühestens 30 min wurde das Butanol mit Wasser abgewaschen und das Sammelgel (siehe 2.1.5.14) eingegossen. Während der Polymerisation formte ein Kamm Taschen im Sammelgel für die spätere Probenaufnahme. Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer montiert, deren oberes und unteres Reservoir mit Laufpuffer (siehe 2.1.5.18) gefüllt wurde. Die Proben wurden in Lämmli-Ladepuffer für 5 min aufgeköcht und nach Abkühlung in die Taschen pipettiert. Für die ungefähre Bestimmung der Größen der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard auf jedem Gel mitlaufen gelassen, der farbmarkierte Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthält (‘Low-Range’ (2,5 bis 45 kDa, LMW) und ‘High-Range’ (14,3 bis 220 kDa, HMW) ‘Rainbow Molecular Weight Markers’). Nun wurde eine Spannung angelegt (z.B. 50 V), so daß die SDS-beladenen Proteine in Richtung des positiven Pols durch das Gel liefen, bis die Lauffront bzw. die farbmarkierten Proteingrößenmarker die gewünschte Position erreicht hatten. Das Polyacrylamidgel wurde aus der Elektrophoresekammer entfernt und die obere Glasplatte vorsichtig abgehoben. Das Sammelgel sowie überflüssige Gelteile wurden abgetrennt.

#### **2.2.3.5 Färben von Gelen**

Das Gel wurde in Coomassie-Blau Gel-Färbelösung für mindestens zwei Stunden auf einem Rundschüttler gefärbt und dann in Entfärbelösung überführt. Unter gelegentlichem Austauschen der Entfärbelösung wurde auf dem Schüttler entfärbt, bis der Hintergrund wieder klar war. Danach wurde das Gel fotografiert oder auf einem Geltdrockner getrocknet.

### 2.2.3.6 Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Membran

Der Transfer erfolgte mit einem ‚Semi-Dry-Blot‘ System der Firma Bio-Rad. Eine PVDF-Membran der Größe des Gels wurde mit Methanol benetzbar gemacht und anschließend ebenso wie zwei Stapel mit je sechs Lagen Filterpapier der selben Größe in SDBB (siehe 2.1.5.19) äquilibriert. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde der Blot von unten nach oben in folgender Reihenfolge luftblasenfrei aufgebaut:

Anode | 6 Lagen Filterpapier | Membran | Gel | 6 Lagen Filterpapier | Kathode

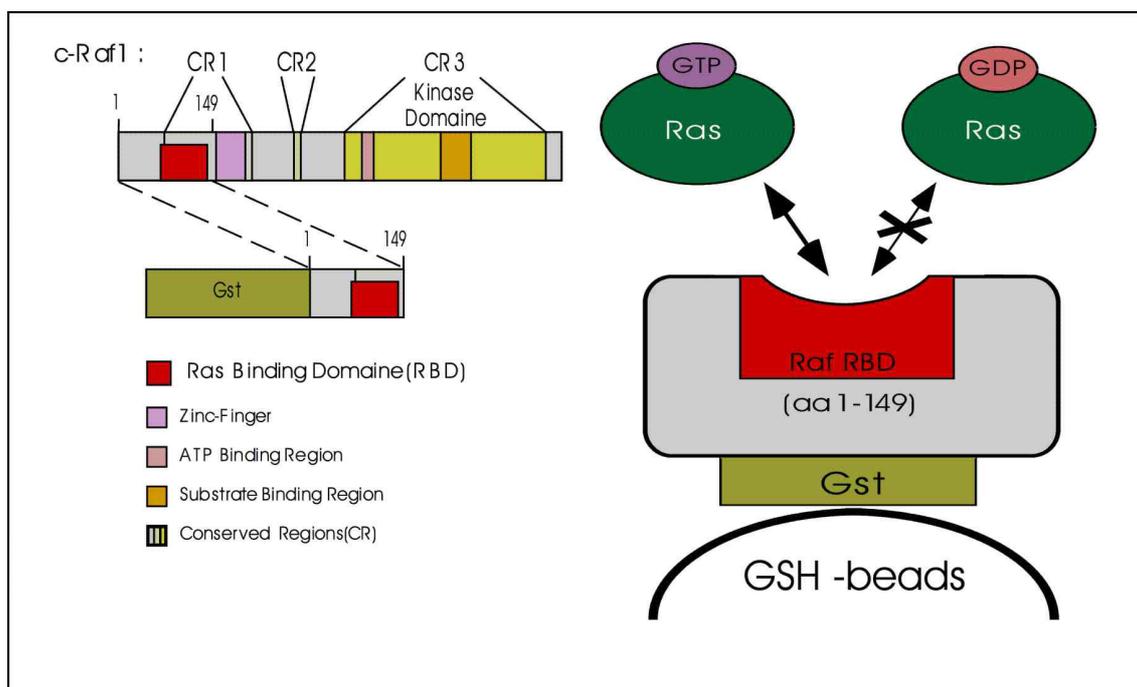
Der Transfer erfolgte bei 15-23 Volt für eine Stunde, bei einer Stromstärke von weniger als 3 mA/cm<sup>2</sup>.

### 2.2.3.7 Detektion von Proteinen durch Antikörper (Western-Blot)

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurde die Membran nach dem Transfer der Proteine zunächst in Blockpuffer mit Milchproteinen (5% fettfreies Milchpulver (w/v) in TBS-T) für mindestens eine Stunde inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Bei geplanter Detektion mit anti-Phosphotyrosin- oder anti-Phosphoserin-Antikörpern wurde TBS-T mit 1% Immunglobulin-freiem BSA als Blockpuffer verwendet, da Milchpulver viele Phosphoproteine enthält. Der Blot wurde dann für 1 bis 12 Stunden mit dem spezifischen Antikörper je nach zu detektierendem Protein in Konzentrationen von 1:100 bis 1:1000 in Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T für je 10 min gewaschen und in TBS-T mit dem sekundären Antikörper in der Konzentration 1:10000 für 45 min inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal je 10 min mit Waschpuffer und mit Filterpapier abgetupft. Die Membran wurde dann für eine Minute in einem 1:1 Gemisch der beiden ECL-Lösungen inkubiert und anschließend mit Filterpapier gründlich getrocknet. In der Dunkelkammer wurde ein Film aufgelegt, um die Lumineszenz und dadurch indirekt das Protein zu detektieren. Das Nachweissystem (‚Enhanced Chemiluminescence‘ (ECL)) basiert auf Oxidation von in der ECL-Lösung enthaltenem Luminol. Diese Oxidation wird durch Peroxidase katalysiert, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Dabei wird Lichtenergie freigesetzt, die eine lokale Schwärzung des Filmes hervorruft.

### 2.2.3.8 Affinitätspräzipitation der aktivierten GTPase Ras

Die Bestimmung des Aktivitätszustandes der GTPase Ras erfolgte durch einen nichtradioaktiven Präzipitationsassay mit Hilfe eines aktivierungsspezifischen GST-Fusionsproteins (216). Aktives Ras liegt in einem Komplex mit GTP vor. Dieser Komplex bindet spezifisch an die ‚Ras-Binding-Domain‘ (RBD) der c-Raf-1-Kinase, die inaktives, d.h. mit GDP komplexiertes Ras mit einer sehr viel geringeren Affinität bindet (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Ras GTP-Beladungsassay.** Die Ras-Binding-Domäne innerhalb der Aminosäuren 1 bis 149 der c-Raf1-Kinase (RBD, Aminosäuren 1 bis 149) bindet GTP-beladene Ras, wohingegen GDP-beladene Ras nicht gebunden wird. RBD wird als Fusionsprotein mit Gluthation-S-Transferase (GST) exprimiert, welches das Fusionsprotein an Gluthation-Sepharose (GSH-beads) binden kann. Weitere Domänen des c-Raf-1-Proteins sind farblich kodiert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in MLB lysiert. Dieser Lysepuffer enthält Magnesiumionen, die als Kofaktor den Komplex von GTP und Ras-Protein stabilisieren. Natriumfluorid darf dem MLB-Puffer nicht zugesetzt werden, da es mit den Magnesiumionen unlösliches Magnesiumfluorid bildet und ausfällt. Nach Extraktion für 15 min bei 4 °C auf dem Nutator und nachfolgender Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C, 20 min) wurde der Überstand abgenommen und der Proteingehalt nach Bradford (siehe 2.2.3.1) bestimmt. Die Lysate wurden am gleichen Tag

weiterverarbeitet. War dies nicht möglich, wurden die Rohlysate mit dem relativ instabilem GTP-GTPase-Komplex in flüssigem Stickstoff eingefroren und für wenige Tage bei -80 °C gelagert.

Das GST-c-Raf-1 RBD (1-149) (216) Fusionsprotein wurde in Bakterien wie unter 2.2.2.5 beschrieben exprimiert. Die Bakterien wurden in TPE mit 1 mM DTT und 10% Glycerol lysiert, der 10000 g Überstand wurde aliquotiert und nach Schockgefrieren bei -80 °C gelagert. Der Gehalt an Fusionsprotein wurde anhand eines Aliquots durch Affinitätsaufreinigung, Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Gelfärbung bestimmt. 20-30 µg GST-c-Raf-1 RBD wurden am Tag des Assays frisch aus bakteriellem Rohlysat an 20 µl Glutathion-Sepharose immobilisiert (2-5 Stunden, 4 °C, Nutator). Nach dreimaligem Waschen mit MLB wurden ca. 500 µg des Zellysats dazugegeben und ggf. mit MLB auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Die Affinitätspräzipitation erfolgte für eine Stunde bei 4 °C auf dem Nutator. Anschließend wurde dreimal mit MLB gewaschen und die präzipitierten Proteine durch 12% SDS-PAGE (Trennstrecke ca. 6 cm) aufgetrennt.

## **2.2.4 DNA Methoden**

### **2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen**

200 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin wurden aus dem Glycerolstock oder von einer Agarplatte mit Bakterien, die das gewünschte Plasmid tragen, angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 220 UpM wachsen gelassen. Für die Isolation der Plasmid-DNA mit Hilfe eines QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kits wurden die Bakterien zunächst bei 3000g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml kaltem Resuspensionspuffer (Puffer P1, siehe Herstellerangaben), der RNAase enthält und für den Verdau der Bakterien-RNA sorgt, aufgenommen. Die Suspension wurde mit 10 ml Lysepuffer (Puffer P2) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dabei mehrfach vorsichtig gemischt. Anschließend wurde kalter Neutralisationspuffer (Puffer P3) zupipettiert.. Bei diesen Schritten werden sowohl bakterielle Proteine sowie chromosomale DNA präzipitiert. Nach 15 min wurde die Probe dann bei 20000 g und 4°C zweimal abzentrifugiert und der Überstand auf eine equilibrierte QIAGEN<sup>®</sup>-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Die Säule wurde nach

dem QIAGEN<sup>®</sup>-Protokoll gewaschen, um RNA-Fragmente, Proteine und andere Verunreinigungen zu entfernen, und die Plasmid-DNA wurde anschließend eluiert.

Aus dem Eluat wurde die DNA mit 10,5 ml Isopropanol auf Eis für 30 min gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde bei 15000 g für 30 min abzentrifugiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wurde dann vorsichtig in 500 µl TE - Puffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

#### **2.2.4.2 Alkali-Mini-Präparation**

Die Methode zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterien im kleinen Maßstab basiert auf dem QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Prep Kit und eignet sich gut zur Prüfung mehrerer Kolonien nach einer Transformation.

1,5 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur wurden bei 15.000 g für eine Minute abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl des P1-Puffers des Kits (Resuspensionspuffer mit RNAase) resuspendiert und mit 200 µl des P2-Puffers (Lysepuffer des Kits) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl P3-Puffers (Neutralisationspuffer des Kits) und fünf-minütigem Abkühlen auf Eis wurde für 4 min bei Raumtemperatur mit 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 900µl -20°C kaltem Ethanol 10 min bei -70°C inkubiert und erneut für 8 min bei 4°C mit 15.000 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, 300 µl Ethanol 70% -20°C wurden der Probe hinzugefügt, und bei 4°C 2 min mit 15.000 g zentrifugiert. Das Ethanol wurde sorgfältig abpipettiert und das Pellet bei 37°C getrocknet. Das nun weiß bis farblos erscheinende Pellet wurde in 30 µl TE - Puffer aufgenommen.

#### **2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA**

Die Konzentration wurde nach entsprechender Verdünnung (i.d.R. 1:100) der Probe durch Bestimmung der Absorption der Lösung bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) ermittelt. Eine weitere Messung wurde bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) vorgenommen. Der Quotient  $OD_{260} / OD_{280}$  erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einem Quotienten von 1,8 gilt die DNA als rein. Liegt der Wert über 1,8 liegen Verunreinigungen durch RNA, bei Werten unter 1,8 Verunreinigungen durch Proteine vor. Die DNA-Konzentration (K) berechnet sich nach:  $K (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$ .

#### **2.2.4.4 Restriktionsanalyse und präparativer Verdau von DNA**

Zu analytischen oder präparativen Zwecken kann ein Plasmid durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen charakterisiert bzw. verändert werden.

Für die enzymatischen Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden die von den Herstellern der einzelnen Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen einschließlich der speziellen Restriktionspuffer angewendet. Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1,0 µg DNA (Plasmid-DNA oder DNA-Fragment) in einem 10-20 µl Ansatz gespalten. Das Ansatzvolumen eines präparativen Verdaues ist von der Konzentration der zu spaltenden DNA abhängig. Zur Spaltung der Plasmid-DNA wurden für 1 µg Plasmid die 1 bis 4-fache Menge an Enzymeinheiten ('Units') eingesetzt. Die Zugabe des Enzyms sollte 10% des gesamten Volumens nicht überschreiten, da das in dem Aufbewahrungspuffer des Enzyms enthaltene Glycerol die Enzymaktivität inhibiert oder eine unspezifische Aktivität (die sogenannte Sternaktivität) verursachen kann. Der Reaktionsansatz wurde 1 bis 4 Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 6-fach Stoppuffer wurde das Spaltergebnis durch Auftragen der Probe auf ein Agarosegel und anschließende Elektrophorese kontrolliert.

Bei gleichzeitiger Spaltungen durch mehrere Enzyme war zu beachten, daß die Enzyme im gleichen Puffer unter einheitlichen Bedingungen aktiv sein müssen und daß der Abstand zwischen den verschiedenen Spaltstellen eine gleichzeitige Spaltung zuläßt. Waren die benötigten Salzkonzentrationen in den Puffern für die verschiedene Enzyme unterschiedlich, so wurde zuerst im Niedrigsalzpuffer gespalten. Anschließend wurde die Salzkonzentration erhöht und die nächste Spaltung durchgeführt

#### **2.2.4.5 Agarosegelelektrophorese**

50 ml TAE-Laufpuffer mit 0,8% Agarose wurden in einem Mikrowellenherd gekocht, mit 2 µl Ethidiumbromid gemischt und in eine Gelkammer gegossen. Um die Geltaschen zu formen, wurde ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit  $\frac{1}{5}$  Vol. des 6-fach Stoppuffers versetzt und aufgetragen. Für die Erkennung der Größe eines Fragmentes wurde ein Größenstandard parallel mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V und 30 bis 60 mA durchgeführt. Je

nach Größe der Fragmente wurden die DNA-Banden nach 1 bis 3-stündiger Elektrophorese im UV-Licht betrachtet und fotografiert. Für die präparative Gewinnung der DNA-Fragmente wurden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit entsprechend der Gebrauchsanweisung aufgereinigt

#### **2.2.4.6 Auffüllen 5'-überstehender Enden**

Durch Spaltungen mit Restriktionsenzymen entstehen oft überstehende Enden, die nicht miteinander kompatibel sind. Die Ligation kann dann nur erfolgen, wenn diese zu glatten Enden modifiziert worden sind.

Das aus der Polymerase I durch Subtilisin-Behandlung gewonnene Klenow-Enzymfragment besitzt 3'→5'-Exonuklease- und 5'→3'-Polymerase-Aktivität (5'→3'-Exonukleaseaktivität fehlt) und füllt mit dNTP's die komplementären Basen des 5'-überstehenden DNA-Stranges auf.

Der Ansatz von 30 µl enthielt 25 µl DNA (ca. 1-2 µg), alle dNTP's in einer Endkonzentration von 100 µM, 3 µl des 10 x Klenow-Puffer und 1 µl des Klenow-Enzyms (5 Units/µl). Die Reaktion erfolgte über 15 min bei Raumtemperatur und wurde durch eine 5-minütige Inaktivierung des Enzyms bei 75°C beendet.

#### **2.2.4.7 Ligase-Reaktion**

Bei der Ligation verknüpft die T4-DNA-Ligase DNA-Fragmente mit kompatiblen, überstehenden oder auch glatten Enden. Dabei kommt es zu einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-P-Enden der DNA.

Für die Ligation glatter Enden wurden in einem 20 µl Ansatz 14 µl des DNA-Fragments (0,3 bis 0,4 µg), 2 µl des 10 x Ligase-Puffer und 1 µl (10 Weiss-Units) T4-DNA-Ligase eingesetzt. Inkubiert wurde über Nacht bei 16°C.

### **3 Ergebnisse**

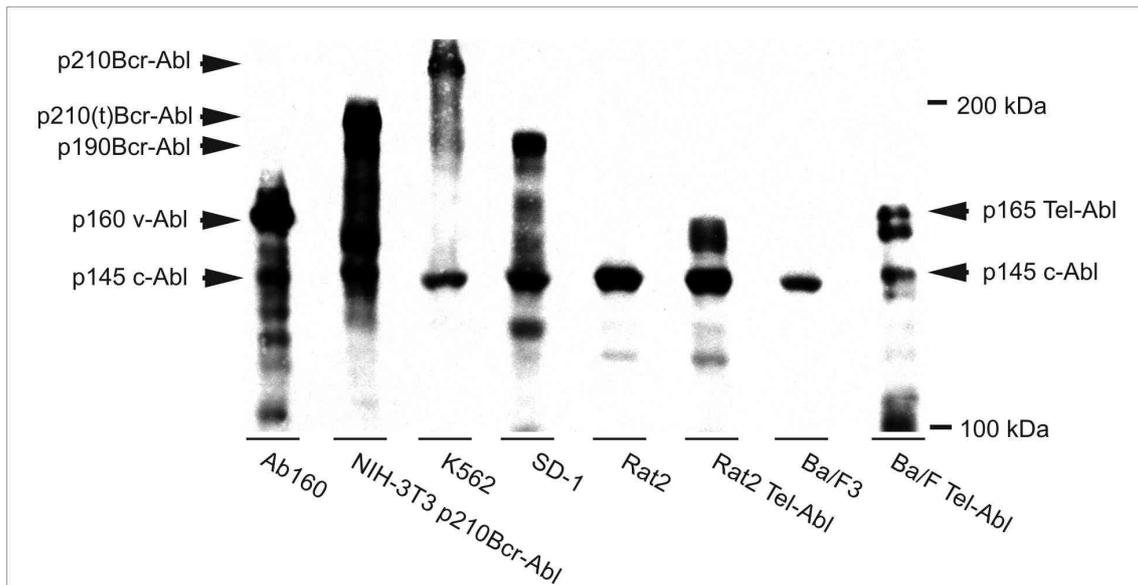
Das Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es, Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen normalen und leukämischen Abl-Kinasen in Bezug auf ihre katalytischen Eigenschaften und die von ihnen intrazellulär aktivierten Signalwege zu finden.

#### ***3.1 Veränderte katalytische Spezifität der leukämischen Abl-Kinasen***

Erst die in den vergangenen Jahren erfolgte Identifizierung von Substratproteinen der Abl-Kinasen (siehe 1.4.4 und 1.7.4) machte eine detaillierte Analyse der katalytischen Aktivitäten der verschiedenen Kinasen möglich. Synthetische Peptide, die den Phosphorylierungsepitopen dieser Substratproteine entsprechen, sollten als Substrate in vergleichenden Kinaseassays mit verschiedenen Abl-Kinasen dienen. Die normalen und leukämischen Abl-Kinasen sollten mit möglichst spezifischen Antikörpern bzw. Antisera aus entsprechenden Zellsätzen immunpräzipitiert werden. Dann sollte die Inkorporation von radioaktivem ATP in diese Peptide durch die verschiedenen Kinasen nach einer Gelelektrophorese mit Hilfe des Phosphoimagersystems quantifiziert und verglichen werden.

##### **3.1.1 Expression der Kinasen**

Die verschiedenen Abl-Kinase-exprimierenden Zelllinien (Tabelle 4) wurden unter den beschriebenen Bedingungen (siehe 2.2.1) kultiviert. Um sicherzustellen, daß sich die Zellen bei Ernte in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wurde darauf geachtet, daß die adhärennten Zellen nicht konfluent wurden und die Suspensionskulturzellen nicht ihre Sättigungsdichte erreichten. RIPA-Lysate wurden wie unter 6.1.4 beschrieben hergestellt und ihre Proteinkonzentration spektrometrisch nach Bradford bestimmt. Nach Auftrennung mittels einer 6% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese), konnten die verschiedenen Abl-Kinasen durch einen Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Abl-Protein (8E9) dargestellt werden (Abbildung 7). Der anti-Abl Antikörper 8E9 ist gegen ein Epitop in der Tyrosinkinasedomäne gerichtet und reagiert mit allen Abl-Proteinen einschließlich der Bcr-Abl und Tel-Abl-Fusionsproteine.

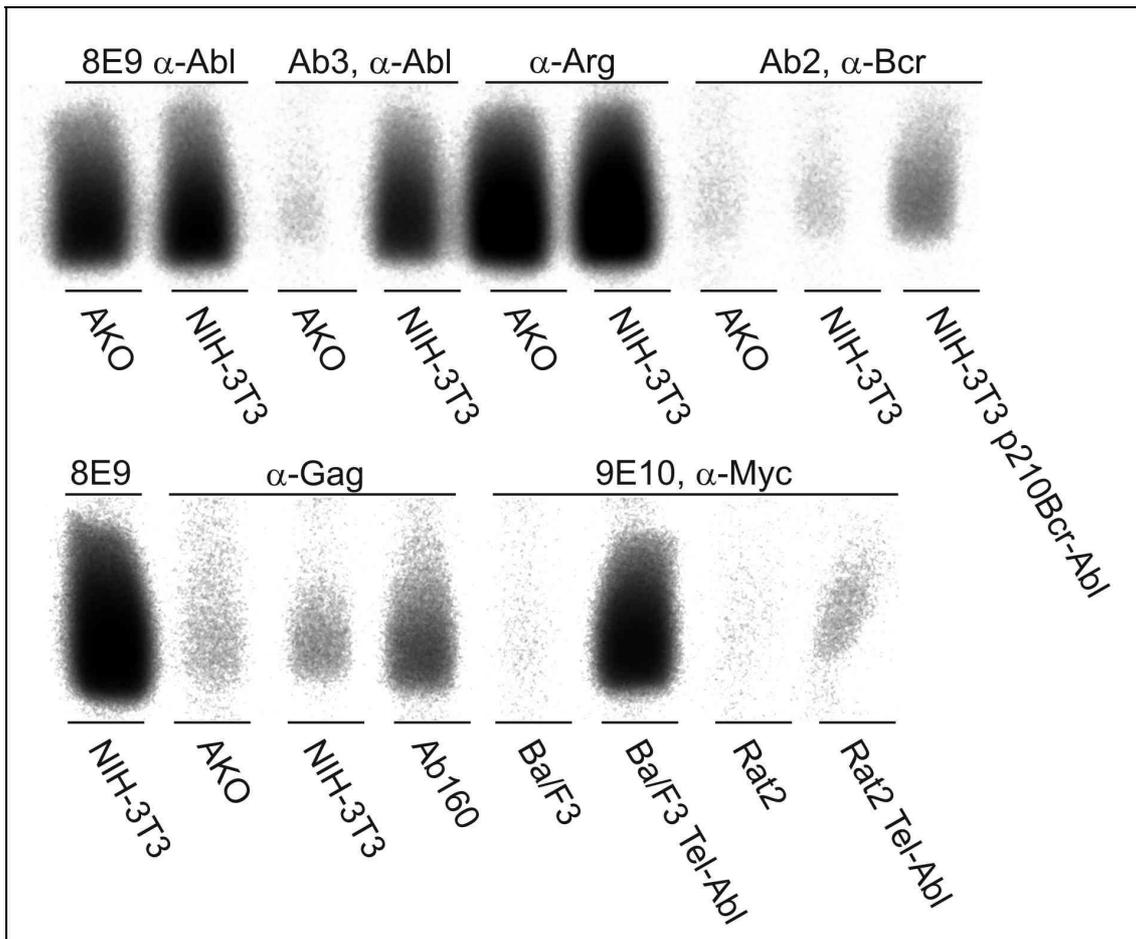


**Abbildung 7: Anti-Abl Western-Blot von RIPA-Lysaten verschiedener Zelllinien.** RIPA-Lysate wurden durch eine 6% SDS-PAGE aufgetrennt und Abl-Proteine mittels eines Western-Blot mit dem anti-Abl Antikörper 8E9 dargestellt.

In allen getesteten Zelllinien wurde c-Abl nachgewiesen. Das Fusionsprotein Tel-Abl ergab zusätzliche Signale in den Gelbahnen mit den Zelllysaten der Tel-Abl exprimierenden Rat2-Tel-Abl und BaF3-Tel-Abl Zellen. Sowohl die leukämischen K562 Zellen als auch die stabil transfizierten NIH-3T3 Bcr-Abl Fibroblasten exprimierten das 210 kDa Bcr-Abl-Fusionsprotein, das jedoch in der fibroblastischen Zellumgebung scheinbar proteolytisch verkürzt ist (p210(t) steht für 'truncated' = verkürzt). In den leukämischen SD-1 Zellen und den retroviral infizierten v-Abl exprimierenden AB160 Fibroblasten wurden entsprechend die kürzeren Fusionsproteine p190Bcr-Abl bzw. das virale p160 Gag-Abl detektiert.

### **3.1.2 Auswahl der Antikörper für die Immunpräzipitation**

Um die Selektivität verschiedener Antikörper für Abl, Arg, Bcr, Gag (als Teil des v-Abl Onkogens) und das Myc-Tag des Tel-Abl - Konstrukts auszutesten, wurden Kinaseassays durchgeführt (Abbildung 8). Als Substrat wurde das Abl 'substrate library consensus peptide' (Substratpeptid (SP) 1, siehe 3.1.3) verwendet. RIPA-Lysate der verschiedenen Zelllinien wurden durch die angegebenen immobilisierten Antikörper präzipitiert. Die Kinasereaktion wurde wie unter 2.2.3.3 beschrieben mit 10µg SP1 als Substrat durchgeführt. Die Proben wurden in einem Peptidgel aufgetrennt und mittels des Phosphoimager-Systems ausgewertet.



**Abbildung 8: Spezifität verschiedener Antikörper im Kinaseassay.** Mit den angegebenen immobilisierten Antikörpern wurden aus Lysaten der aufgeführten Zelllinien die verschiedenen Abl-Kinasen präzipitiert (anti-Gag für v-Abl und 9E10 für Myc-markiertes Tel-Abl). Das Ausmaß der Phosphorylierung des Substratpeptids SP1 mit  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP wurde mittels des Phosphoimager-Systems quantifiziert.

Die Tatsache, daß der anti-Abl Antikörper 8E9, der ein Epitop in der Kinasedomäne erkennt, relativ große Mengen aktiver Tyrosinkinase aus Lysaten der Abl defizienten (AKO) Zellen präzipitiert, zeigt, daß dieser Antikörper nicht für c-Abl spezifisch ist, sondern daß mit dem 8E9 Antikörper wahrscheinlich die Arg-Kinase ebenfalls präzipitiert wurde. Ein anderer gegen das Abl-Protein gerichteter Antikörper AB-3 präzipitierte nur minimale Kinaseaktivität aus den AKO Zellen und war daher für die folgenden Versuche, die die Substratspezifität untersuchen sollten, besser geeignet. Der anti-Bcr Antikörper AB-2, mit Hilfe dessen das Fusionsprotein Bcr-Abl präzipitiert wurde, erkennt auch endogene Bcr-Serinkinaseaktivität. Diese beeinträchtigt jedoch die geplanten Kinaseassays nicht, da die benutzten Substratpeptide, bis auf SP3 (siehe

3.1.3), weder Serin noch Threonin enthalten. Der anti-Gag Antikörper band verhältnismäßig viel unspezifische Kinaseaktivität. Der anti-Myc 9E10 Antikörper gegen das Myc-Tag der Tel-Abl Form zeigte eine ausreichend spezifische Präzipitation von Kinaseaktivität, was sich auch für das später erhaltene polyklonale anti-Tel Serum als zutreffend herausstellte (ohne Abbildung). Polyklonale Seren gegen Abl und Bcr wurden ebenfalls getestet, brachten aber für die Kinaseassays, im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern, keine Vorteile (ohne Abbildung).

Für die im Folgenden unter 3.1.4 geschilderten detaillierte Untersuchung der Substratspezifität wurden vier Zelllinien und jeweils ein geeigneter Antikörper ausgewählt (Tabelle 5).

Kinase	Zelllinie	Antikörper
c-Abl	NIH-3T3	Anti-Abl (AB-3)
Arg	AKO	anti-Arg Serum
p210Bcr-Abl	NIH-3T3 p210Bcr-Abl	anti-Bcr (AB-2)
Tel-Abl	Ba/F3 Tel-Abl	anti-Myc (9E10)

**Tabelle 5: Ausgewählte Zelllinien und Antikörper zur Immunpräzipitation der vier zu untersuchenden Kinasen.**

### 3.1.3 Auswahl der Peptide

SP1	Abl substr. libr. cons. wt	A-A-V-I- <b>Y</b> -A-A-P-F-A-K-K-K
SP2	c-Crk 210-231	P-Q-P-L-G-P-P-E-P-G-P- <b>Y</b> -A-Q-P-S-V-N-T-P-L-P-A-K-K-K
SP3	c-Crk 217-225	E-P-G-P- <b>Y</b> -A-Q-P-S-A-K-K-K
SP4	c-Crk 217-225 (S>A) mut.	E-P-G-P- <b>Y</b> -A-Q-P- <u>A</u> -A-K-K-K
SP5	CRKL 203-211	P-A-H-A- <b>Y</b> -A-Q-P-Q-A-K-K-K
SP6	P130Cas cons.1	A-Q-D-V- <b>Y</b> -D-V-P-P-A-K-K-K
SP7	RNA Pol.II-CTD consensus	T-S-P-S- <b>Y</b> -S-P-T-S-A-K-K-K
SP8	Abl substr. libr. cons. (P>A) mut.	A-A-V-I- <b>Y</b> -A-A- <u>A</u> -F-A-K-K-K
SP9	Abl substr. libr. cons. (P>H) mut.	A-A-V-I- <b>Y</b> -A-A- <u>H</u> -F-A-K-K-K
SP10	v-Src substr. libr. cons. wt	E-E-E-I- <b>Y</b> -G-E-F-D-A-K-K-K
SP11	v-Src substr. libr. cons. (F>P) mut.	E-E-E-I- <b>Y</b> -G-E- <u>P</u> -D-A-K-K-K
SP12	Bcr 173-182	E-K-P-F- <b>Y</b> -V-N-V-E-F-K-K-K
SP13	Abl substr. libr. cons. (Y>F) mut.	A-A-V-I- <b>F</b> -A-A-P-F-A-K-K-K

**Tabelle 6: Synthetische Substratpeptide zur Analyse der Substratspezifität der Abl-Kinasen.** Abkürzungen siehe Text.

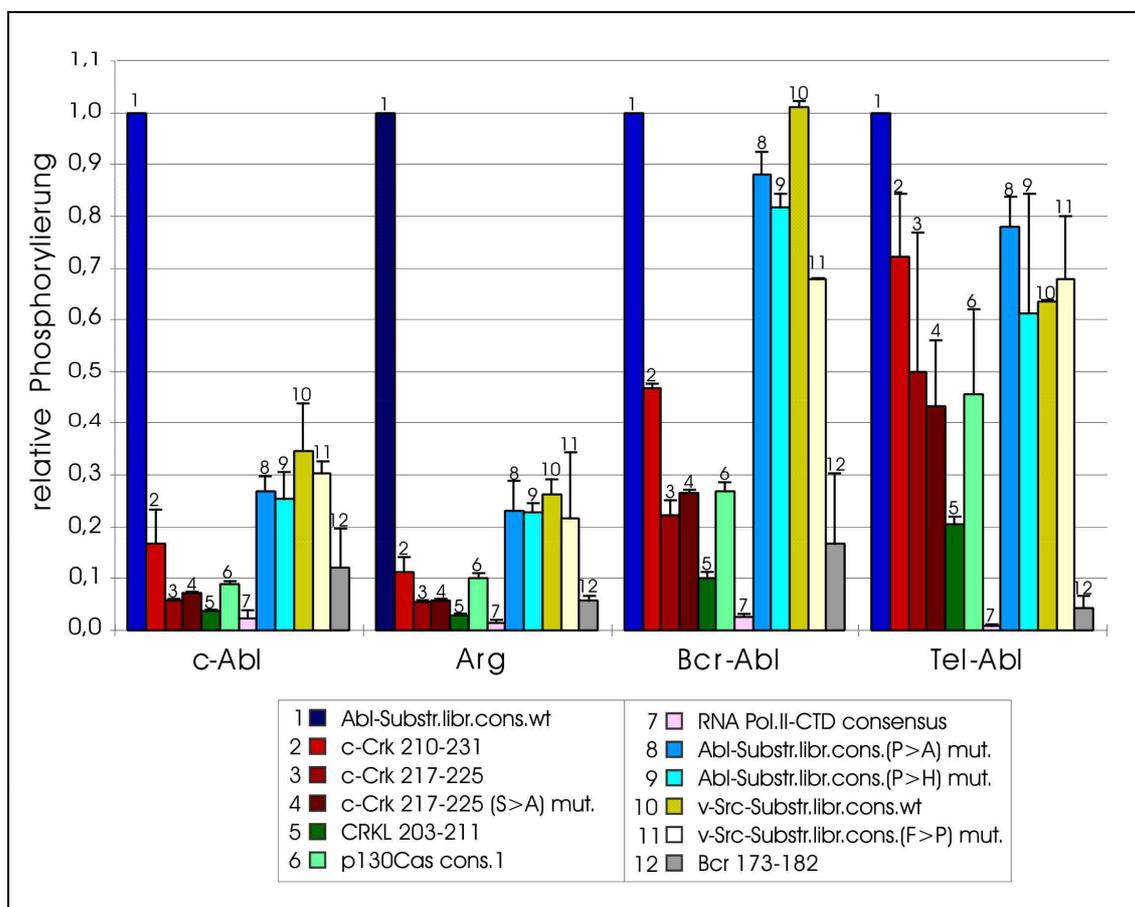
Die synthetischen Peptide, die als Substrate in den Kinaseassays für die folgenden Untersuchungen der Substratspezifität der Abl-Kinasen verwendet wurden, sind in

Tabelle 6 als Substratpeptid 1 bis 13 (SP1 bis SP13) mit den entsprechenden Sequenzen aufgelistet. An alle Substratpeptide wurden C-terminal drei Lysine synthetisiert, um das Laufverhalten in SDS-Gelen zu verbessern. Darüber hinaus ermöglichen die drei Lysine eine, in diesen Experimenten nicht genutzte, Bindung der Peptide an negativ geladene Membranen (z.B. Phosphozellulose).

SP1 entspricht dem Substratpeptid mit dem Konsensusmotiv, das von Songyang et al. (217) als optimiertes Peptidsubstrat für die c-Abl-Kinase beschrieben wurde. SP2 und SP3 entsprechen der Region im c-CrkII-Protein um Tyrosin 221, das durch c-Abl phosphoryliert wird (siehe 1.4.4). SP2, das mehr Aminosäuren des c-CrkII-Proteins enthält als SP3, sollte Hinweise ergeben, in welchem Ausmaß die dem Tyrosin weiter vorangehenden und nachfolgenden Aminosäuren Einfluß auf die Substraterkennung haben. Als Kontrolle wurde in SP4 die Aminosäure Serin durch ein Alanin ersetzt, um die Serin-Hydroxylgruppe zu entfernen, die als Phosphatakzeptor für eventuell kopräzipitierende Serinkinasen dienen könnte. SP5 und SP6 sind von den Abl-Phosphorylierungsstellen des CRKL- (168) bzw. p130Cas-Proteins (64) abgeleitet und enthalten in Position +3 nach dem Tyrosin das für Abl-Substratproteine typische Prolin (217). SP7 entspricht dem Konsensusmotiv der repetitiven Sequenz der C-terminalen Domäne (CTD) der eukaryotischen RNA-Polymerase Typ II (218). SP8 und SP9 sind Mutanten von SP1. Bei ihnen wurde die Aminosäure Prolin in Position +3 nach dem Tyrosin durch Alanin bzw. Histidin ausgetauscht. Sie wurden in der Absicht, die Bedeutung des Prolins in dieser Position für die Affinität zu den Abl-Kinasedomänen genauer zu klären, in diese Untersuchung eingeschlossen. Die Aminosäuresequenz von SP10 wurde von Songyang et al. analog der Sequenz von SP1 mittels eines 'Peptide library screen' als bestes Bindungsmotif für die v-Src-Kinase beschrieben (217). Zur Untersuchung der Rolle eines Prolins der Position +3 wurde in SP11 das Phenylalanin in SP10 zu Prolin mutiert. SP12 repräsentiert das bekannte (Auto-)Phosphorylierungsepitop um Tyrosin 177 des Bcr-Proteins und des Bcr-Abl-Fusionsproteins. SP13 ist eine Mutation des SP1, enthält ein Phenylalanin anstelle des Tyrosins und war ein Versuch, ein inhibitorisches Pseudosubstrat zu generieren (siehe 3.2).

### 3.1.4 Katalytische Spezifität

Mit Immunpräzipitaten der vier verschiedenen Kinasen wurden Kinaseassays wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Peptide SP1 bis SP12 wurden als Substrate getestet und die absolute Menge inkorporierter Radioaktivität wurde für jedes Peptid quantifiziert. Die Phosphorylierung der Peptide durch eine einzelne Kinase wurde in Relation zu der Phosphorylierung des Substratpeptids SP1 durch diese Kinase gesetzt. Somit ergab die relative Phosphorylierung von SP1 für alle Kinasen einen Wert von 1 (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Vergleich der Substratspezifität der Abl-Kinasen mittels Substratpeptiden.** Substratpeptide wurden der Phosphorylierung durch die normalen Abl-Kinasen c-Abl und Arg (präzipitiert aus NIH-3T3 Zelle mit anti-Abl, Ab-3, und aus 3T3 Abl<sup>-/-</sup> mit anti-Arg Serum) und durch die leukämischen Kinasen Bcr-Abl und Tel-Abl (mit anti-Bcr und anti-Myc präzipitiert aus NIH-3T3 p210Bcr-Abl bzw. aus Ba/F3 Tel-Abl Zellen) unterworfen. Die absolute Menge der inkorporierten Radioaktivität wurde mit dem Phosphoimager-System bestimmt und jeweils durch den Absolutwert für die Phosphorylierung von SP1 (Relativwert 1) dividiert. In dem Säulendiagramm sind die Mittelwerte von drei Experimenten mit Standardabweichung dargestellt.

SP1 stellte für die physiologischen Kinasen c-Abl und Arg das bei weitem am besten phosphorylierte Substratpeptid dar (Abbildung 9). Das um einige Aminosäuren längere c-CrkII-Peptid SP2 wurde von allen Kinasen etwas stärker phosphoryliert als das kürzere SP3. Die Tatsache, daß das Serin-freie SP4 nicht signifikant weniger phosphoryliert wurde als SP3, weist darauf hin, daß offensichtlich keine Serinkinase koimmunpräzipitierte, die wesentlich zu der Phosphorylierung von SP3 und damit auch von SP2 beiträgt. Das auf dem CRKL-Protein basierende SP5 wurde deutlich weniger durch alle vier getesteten Kinasen phosphoryliert als die c-CrkII-Peptide SP2 bis SP4. Dagegen wies das Konsensusmotif der Phosphorylierungsstellen des p130Cas-Proteins (SP6) eine ähnliche Phosphorylierung wie SP2 bis SP4 auf. Das Konsensusmotif der CTD der RNA-Polymerase II in SP7 war das schlechteste Substrat unter allen getesteten Peptiden. Die Mutation des Prolins in SP1 zu Alanin oder Histidin (SP8 und SP9) reduzierte die Phosphorylierung dieser Peptide durch c-Abl und Arg deutlich. In Kontrast dazu steht, daß die leukämischen Abl-Kinasen Bcr-Abl und Tel-Abl SP8 und SP9 nicht weniger als SP1 phosphorylierten. Im Vergleich zu dem für alle Kinasen besten Substratpeptid SP1 wurden die v-Src-spezifischen Peptide SP10 und SP11, von Bcr-Abl und Tel-Abl sehr viel effizienter phosphoryliert als von c-Abl und Arg. Der Ersatz des Phenylalanins in Position +3 im SP10 durch ein Prolin in SP11 führte nicht zu einer Steigerung der Phosphorylierung durch die untersuchten Kinasen. Das Autophosphorylierungsepitop in Bcr-Abl stellte sich in Form eines Peptids (SP12) als ein sehr schlechtes Substrat heraus.

### ***3.2 Inhibitorische Aktivität von SP13***

SP1 wurde als optimale Bindesequenz für die Kinasedomäne von Abl bestimmt (217) und war im Vergleich mit anderen Substratpeptiden ein sehr gutes Substrat (Abbildung 9).

Der einfach durchzuführende Austausch des Tyrosins in SP1 gegen die Aminosäure Phenylalanin ergab SP13, das möglicherweise die Aktivität der Abl-Kinasen blockieren könnte, indem es von der katalytische Domäne der Kinasen gebunden aber nicht phosphoryliert werden kann. Die Inhibition der katalytischen Aktivität durch SP13 sollte in Kinaseassays untersucht werden, in denen neben SP1 als Substrat gleichzeitig SP13 anwesend ist und als Inhibitor auf die immunpräzipitierten Kinasen einwirkt.

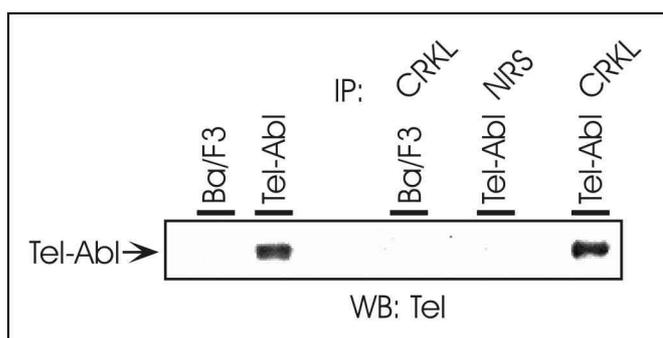
Die Phosphorylierung von SP1 durch die verschiedenen Kinasen wurde jedoch in Anwesenheit von SP13 nicht signifikant reduziert. Somit konnte für SP13 kein inhibitorisches Potential nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

### 3.3 Komplexe zwischen den Crk-Adapterproteinen *c-CrkII* und *CRKL*, *Tel-Abl* und Tyrosinphosphorylierten Proteinen

#### 3.3.1 Koimmunpräzipitation von Tel-Abl und CRKL

Das CRKL-Adapterprotein bildet sowohl mit dem Bcr-Abl-Fusionsprotein als auch mit der c-Abl-Kinase stabile Komplexe (60). Ähnliche Komplexe mit der Tel-Abl-Kinase sollten mittels Koimmunpräzipitation gesucht werden.

Es stellte sich im Verlauf der Versuche bald heraus, daß zur Reduzierung des Hintergrunds und der unspezifischen Bindung von Tel-Abl an Sepharose und Antikörper die TX100 - Lysate der Ba/F3 Tel-Abl Zellen sowie der entsprechenden Ba/F3 Parentalzellen zunächst mit Protein-A-Sepharose und danach mit immobilisierten Immunglobulinen aus normalem Kaninchenserum vorinkubiert werden mußten. Dann folgte die Inkubation mit immobilisiertem anti-CRKL Antikörper oder mit einer entsprechenden Menge Immunglobuline nichtimmunisierter Kaninchen. Waschen mit Lysepuffer mit 0,5% Deoxycholate erwies sich als genügend stringent, um unerwünschten Hintergrund von den Präzipitaten zu entfernen.

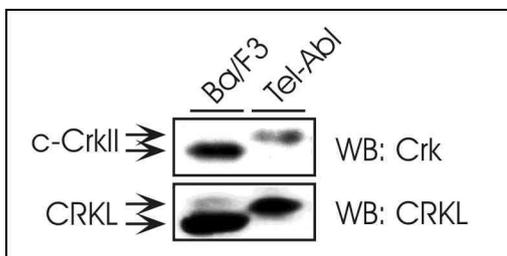


**Abbildung 10: Koimmunpräzipitation von Tel-Abl und CRKL.** Vorinkubierte TX100 – Lysate von Tel-Abl exprimierenden Ba/F3 Zellen (*Tel-Abl*) oder Parentalzellen (*Ba/F3*) wurden mit CRKL-spezifischem Antiserum (*CRKL*) oder Kaninchenkontrollserum (*NRS*) präzipitiert. Die Präzipitate sowie RIPA-Lysate wurden nach Auftrennung durch ein 6% SDS-Gel in einem anti-Tel Western-Blot analysiert.

Abbildung 10 zeigt die Auftrennung der präzipitierten Proteine durch ein 6% SDS-Gel. Die Visualisierung des Tel-Abl Proteins erfolgte mittels eines Immunoblots mit anti-Tel Antikörper. Die beiden ersten Bahnen mit totalem Zelllysate zeigen die Expression der Tel-Abl-Fusionskinase in Ba/F3 Tel-Abl Zellen, nicht aber in Ba/F3 Parentalzellen. Tel-Abl konnte im anti-CRKL immunpräzipitierten Komplex aus Lysat von Ba/F3 Zellen nachgewiesen werden. Als Kontrollen wurden Immunpräzipitationen mit anti-CRKL Antikörper aus Lysat von Ba/F3 Parentalzellen und mit Kaninchenkontrollserum (NRS, 'normal rabbit serum') aus Lysat von Ba/F3 Tel-Abl Zellen durchgeführt. In keiner der beiden Kontrollen fand sich Tel-Abl im präzipitierten Komplex.

### 3.3.2 c-CrkII- und CRKL-Phosphorylierung in Tel-Abl exprimierenden Zellen

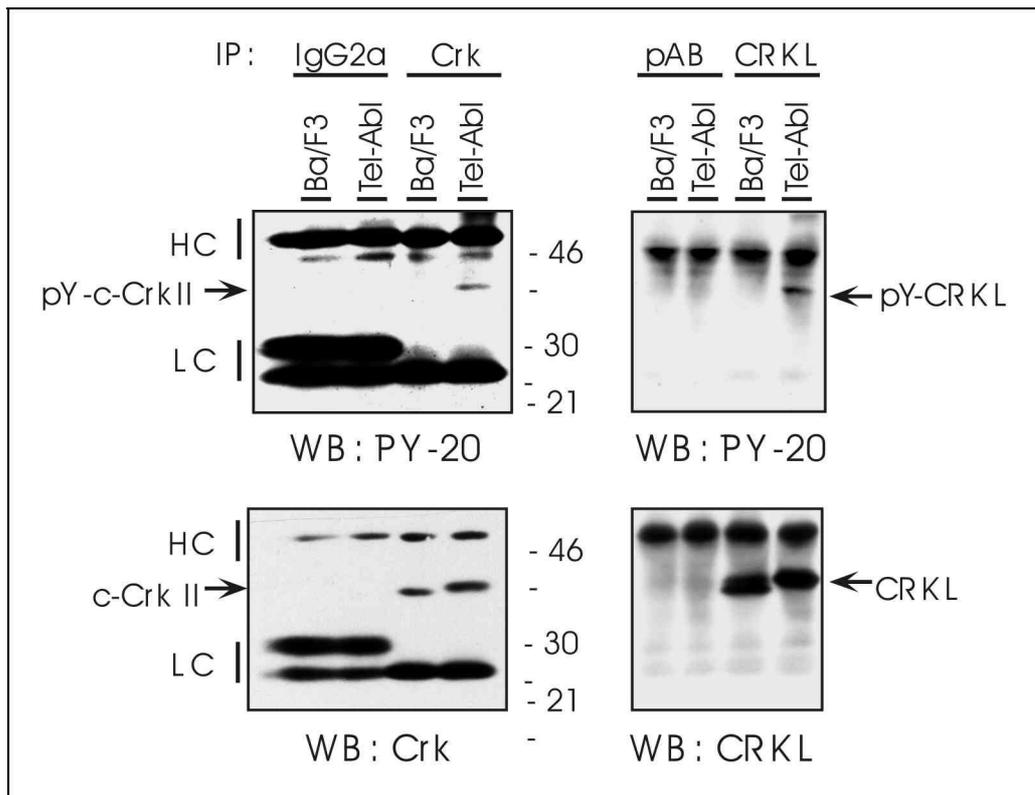
CRKL wird von Bcr-Abl und c-Abl stark phosphoryliert (60). Diese Tatsache zusammen mit der unter 3.3.1 gezeigten Interaktion von CRKL und Tel-Abl gaben den Anlaß, nach einer Phosphorylierung der Crk-Adapterproteine durch Tel-Abl zu suchen. Zunächst wurden RIPA-Lysate von Ba/F3 Parentalzellen und Ba/F3 Tel-Abl Zellen nach Auftrennung mittels eines 10% SDS-Gels ein durch einen Western-Blot mit anti-Crk und anti-CRKL Antikörpern analysiert (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Migrationsverhalten von Crk-Adaptoren.** Crk und CRKL Adapterproteine in RIPA-Lysaten von Ba/F3 Tel-Abl Zellen (*Tel-Abl*) oder Parentalzellen (*Ba/F3*) wurden mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blots mit Crk-Antikörper oder CRKL-Antiserum visualisiert. Crk und CRKL in den Tel-Abl exprimierenden Zellen zeigen ein langsames Laufverhalten.

Sowohl das c-CrkII-Protein als auch das CRKL-Protein zeigten in Tel-Abl exprimierenden Zellen eine deutlich verlangsamte Migration im Polyacrylamidgel. Dies spiegelt gewöhnlich einen hyperphosphorylierten Zustand der Proteine wider.

Durch die Analyse von immunpräzipitierten c-CrkII- und CRKL-Proteinen mittels eines Immunoblots mit Phosphotyrosin-spezifischem Antikörper (PY-20) sollte gezeigt werden, daß es sich um eine Tyrosinphosphorylierung handelt. Dazu wurde RIPA-Lysat



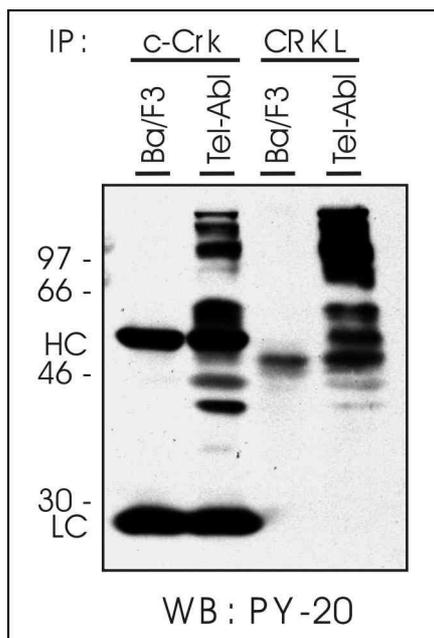
**Abbildung 12: Tyrsoinphosphorylierung von c-CrkII und CRKL in Tel-Abl exprimierenden Zellen.** c-CrkII und CRKL wurden aus Lysaten von Ba/F3 und Ba/F3 Tel-Abl Zellen präzipitiert, durch 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-Phosphotyrosin-Immunoblot (PY-20, oben) untersucht. Die gleichen Blots wurden dann mit Crk-Antikörper oder CRKL-Antiserum inkubiert. Die durch die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline verursachten Banden sind mit HC und LC markiert.

von Ba/F3 Parentalzellen und Ba/F3 Tel-Abl Zellen mit anti-Crk oder anti-CRKL Antikörper immunpräzipitiert, mit TX100-Puffer gewaschen und mit einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrollen wurden unspezifische Antikörper der gleichen Spezies und des gleichen Isotyps benutzt (IgG2a der Maus bzw. polyklonaler Antikörper (pc) vom Kaninchen). Nach Übertragung der Proteine auf eine Membran wurde der Blot zunächst mit anti-Phosphotyrosin Antikörper PY-20 entwickelt. Nach der Entfernung des PY-20 Antikörpers wurde dieselbe Membran mit anti-Crk bzw. anti-CRKL Antikörper erneut analysiert (Abbildung 12). Die anti-Crk und anti-CRKL Blots zeigten die spezifische Präzipitation der entsprechenden Proteine in beiden Zelllinien mit der schon in Abbildung 11 gezeigten Migrationsretardierung bei Expression von Tel-Abl. Nur die Banden der c-CrkII- und CRKL-Proteine aus den Tel-Abl exprimierenden Zellen wurde auch durch den Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper

erkannt. In den Kontrollen mit unspezifischem Antikörper wurde kein c-CrkII oder CRKL präzipitiert. Die Bindung der Sekundärantikörper an die schweren (HC) und leichten Ketten (LC) der Antikörper für die Immunpräzipitation ergab zusätzliche Banden (HC bzw. LC).

### **3.3.3 Komplexierung von c-CrkII und CRKL mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen**

Crk- und CRKL-Präzipitate von Tel-Abl exprimierenden Zellen sollten durch einen anti-Phosphotyrosin Immunoblot, der präzipitierte Proteine eines Molekulargewichtes bis 200 kDa nach Auftrennung durch ein SDS-Gel mit einer längeren Laufstrecke darstellt, weitergehend analysiert werden. Es wurden Tyrosin-phosphorylierte Proteine eines Molekulargewichtes von 50 bis 150 kDa detektiert, die in den Parentalzellen nicht zu sehen waren (Abbildung 13).

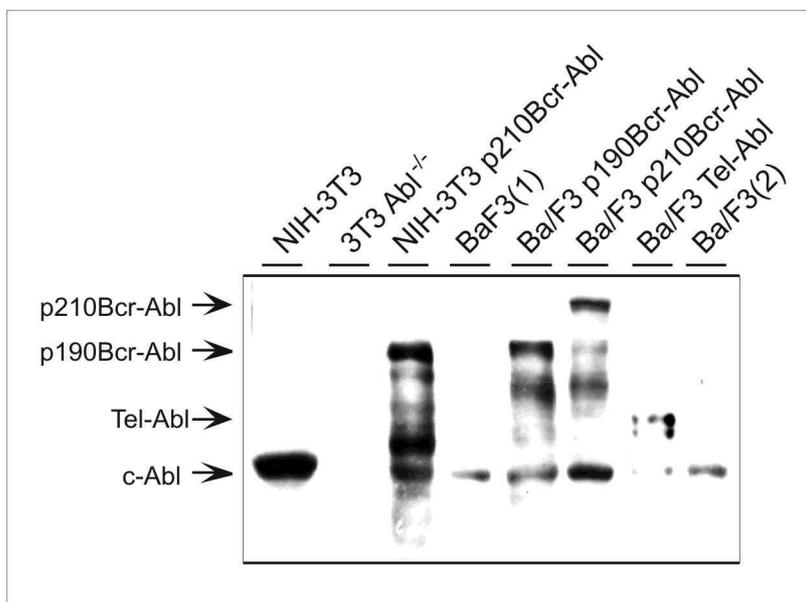


**Abbildung 13: Immunoblotanalyse von Crk-Adapterpräzipitaten.**

### ***3.4 Aktivierte Signaltransduktionswege durch leukämische Abl-Kinasen***

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionswege durch Tel-Abl beeinflusst werden und inwiefern Unterschiede zu den durch p190Bcr-Abl und p210Bcr-Abl induzierten Effekten bestehen.

Für diese Untersuchungen wurden neben den schon im Absatz 3.3 benutzten Ba/F3 Tel-Abl Zellen auch p190 und p210Bcr-Abl Ba/F3 Zellen sowie als Negativkontrollen die entsprechenden Parentalzelllinien herangezogen (siehe 2.1.3). Da die parentalen Ba/F3 Klone der Bcr-Abl und Tel-Abl Zellen aus verschiedenen Laboren stammen, wurden die basale sowie die Interleukin-3-induzierte Ras-Aktivität beider Klone (Ba/F3(1) und Ba/F3(2)) als Kontrollen eingeschlossen. Die Expression von c-Abl, p190 und p210Bcr-Abl sowie Tel-Abl in den verschiedenen Ba/F3 Linien wurde mittels eines Western-Blots mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Abl-Protein (8E9) verglichen (Abbildung 14). Es zeigte sich, dass vergleichbare Mengen an Kinasen exprimiert werden.



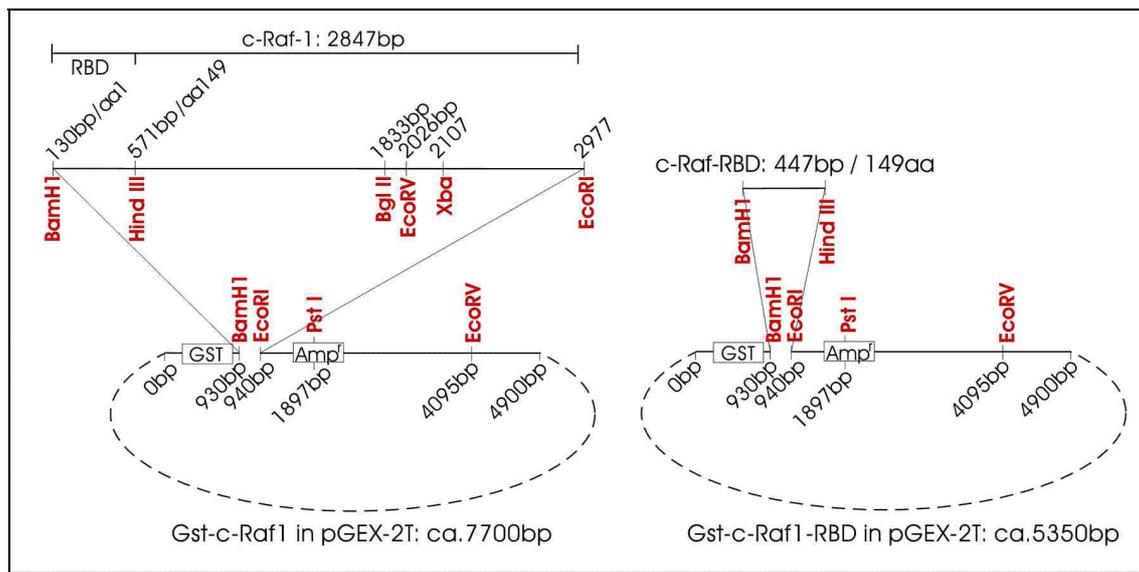
**Abbildung 14: Expression der Abl-Kinasen in Ba/F3 Linien.** RIPA-Lysate der verschiedenen Onkogen-exprimierenden Ba/F3 Linien und der entsprechenden Parentallinien (*Ba/F3(1)* und *Ba/F3(2)*) als auch der Fibroblasten NIH-3T3, 3T3 Abl<sup>-/-</sup> und NIH-3T3 p210Bcr-Abl wurden nach 6% SDE-PAGE in einem Western-Blot mit anti-Abl (8E9) Antikörper analysiert.

### 3.4.1 Aktivierung der GTPase Ras

Mit Hilfe eines nichtradioaktiven Präzipitationsassays zur Bestimmung der GTPase-Aktivitäten (216) (siehe 2.2.3.8) sollte untersucht werden, ob die Expression von Tel-Abl in Ba/F3 Zellen in Abwesenheit von Serum im Kulturmedium zu einer konstitutiven Aktivierung von Ras führt. Zum Vergleich sollten p190Bcr-Abl und

p210Bcr-Abl exprimierende Ba/F3 Zellen mit in dieses Experiment eingeschlossen werden.

Ein bakterieller Vektor, der nur die 'Ras-Binding-Domain' (RBD) der c-Raf-1-Kinase als Gst-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, war zunächst nicht verfügbar. Daher sollte ein solcher aus im Haus verfügbare c-Raf-1-DNA (Abbildung 15) hergestellt werden.

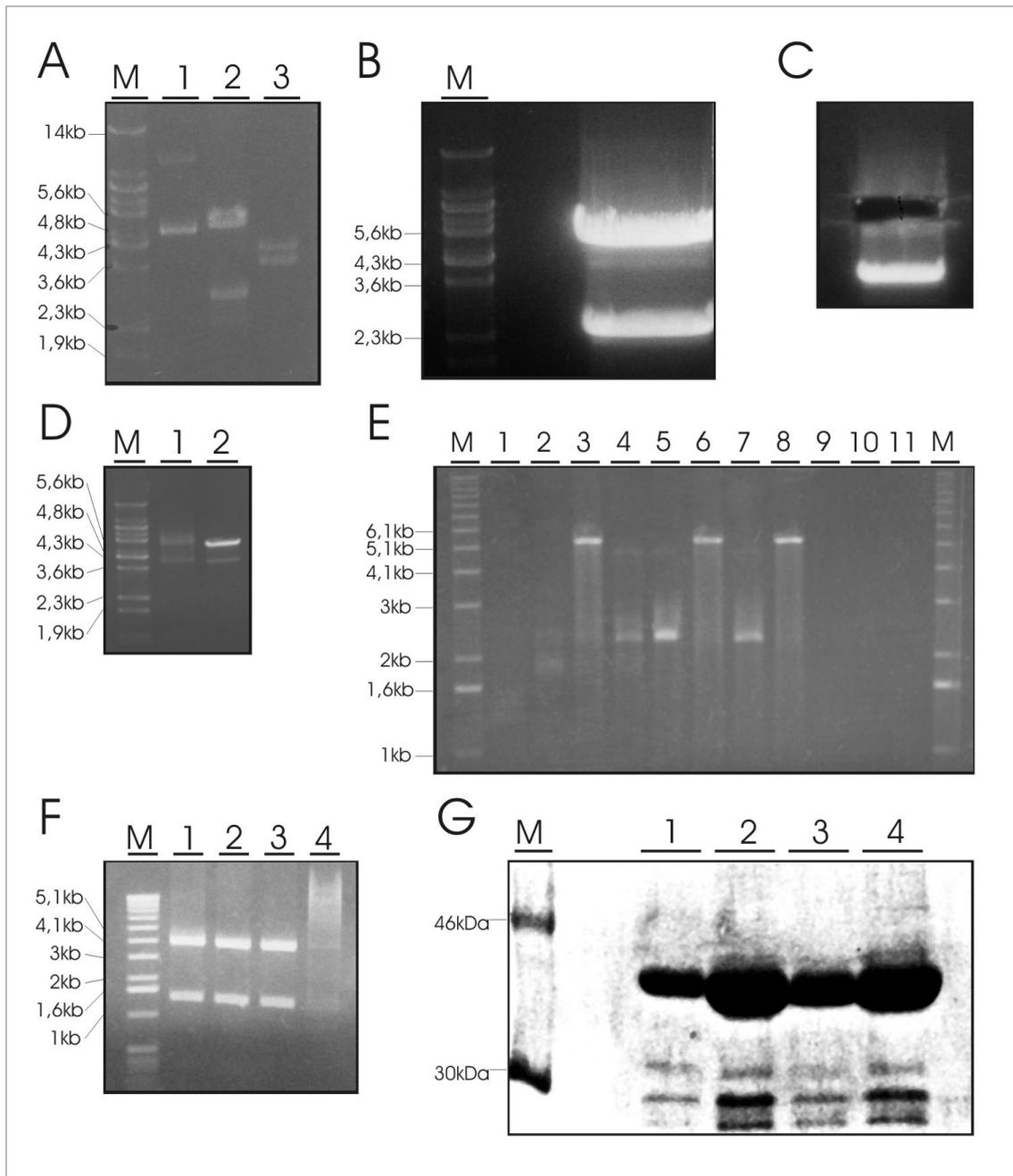


**Abbildung 15: Karte des GST-c-Raf1-Expressionsvektors.** Links: Ausgangsvektor, rechts: Zielvektor. Die Positionen der Schnittstellen die Restriktionsenzyme BamHI, BglIII, HindIII, EcoRI und Xba in der c-Raf-1 DNA und , BamHI, EcoRI, EcoRV und Pst im pGEX-2T GST-Expressionsvektor für sind angegeben. RBD: Ras-Bindedomäne. GST: Gluthation-S-Transferase. Amp<sup>r</sup>: Ampicillin-Resistenzgen.

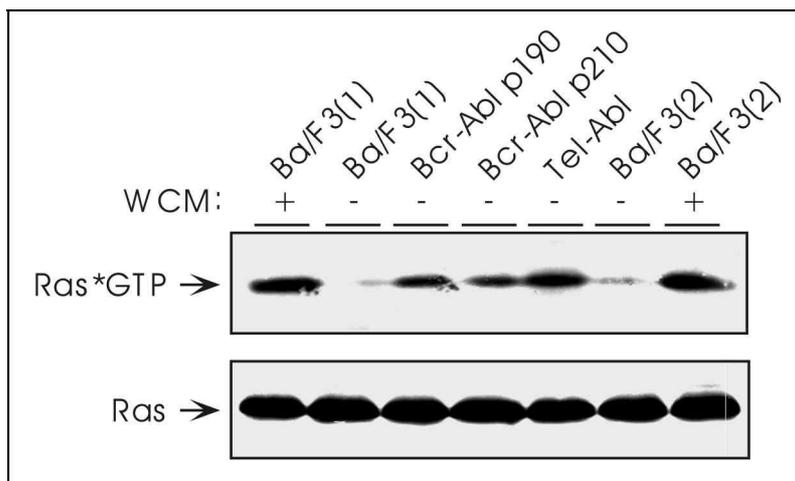
Abbildung 16.A zeigt einen Kontrollverdau des Ausgangsvektors. Der native Ausgangsvektor (Bahn 1) stellte sich in dem Agarose-Gel neben seiner wirklichen Länge von ca. 7,7 kb aufgrund einer anderen Konfiguration zusätzlich noch als eine kleinere Bande dar. Die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI (Bahn 2) schnitten das Gen für die c-Raf-1-Kinase mit einer Länge von ca. 2,8 kb aus dem Vektor heraus, der dann noch eine Länge von ca. 4,9 kb aufwies. Durch das Restriktionsenzym EcoRV (Bahn 2) wurde der Ausgangsvektor an zwei Stellen in ca. 3,6 kb und 4,1 kb Fragmente geschnitten. Dieser Restriktionsverdau bestätigte somit das erwartete Restriktionsmuster des Ausgangsvektors. Der präparativen Verdau (Abbildung 16 B und C), der aus dem Ausgangsvektor das c-raf-1-Gen bis auf die Ras-Binde-Domäne herausschneiden sollte, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII durchgeführt. Es stellten sich Banden von ca. 2,4 kb und 5,3 kb dar. Die obere Bande wurde aus dem Gel

herausgeschnitten (Abbildung 16.C) und die DNA aus dem Gel mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit extrahiert. Danach wurden die durch den Restriktionsverdau entstandenen 5'-überstehenden Enden aufgefüllt und nach einem Aufreinigungsschritt mit dem PCR-Purification Kit von QIAGEN® wurden die nun glatten DNA-Enden in einer Ligase-Reaktion miteinander verbunden, so daß wieder ein geschlossener Vektor vorlag. In Abbildung 16.D, die in Bahn 2 die DNA vor der Auffüllung der 5'-überstehenden Enden und in Bahn 1 die DNA nach dem Aufreinigungsschritt zeigt, ist jeweils neben der ca. 5,3 kb langen erwarteten DNA noch ein kleineres unerwartetes Fragment von ca. 4 kb zu erkennen. Nach der T4-Ligase Reaktion wurde die DNA in kompetente E.coli Bakterien der Stämme DH5 $\alpha$  und BL21 transformiert. Von 8 Klonen des DH5 $\alpha$  Stammes und 3 Klonen des BL21 Stammes wurden Plasmide präpariert und mit einem BamH1-Restriktionsverdau, der den erwarteten Zielvektor an genau einer Position schneiden sollte, analysiert (Abbildung 16.E). Die Klone 3, 6 und 8 enthielten ein Plasmid der gewünschten Größe von ca. 5,3 kb. Ein weiterer Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen BamH1 und PstI ergab mit zwei Fragmente der Größen von 1,4 und 3,9 kb ebenfalls das für den gesuchten Zielvektor erwartete Ergebnis (Abbildung 16.F). Aus Bakterien der Klone 3 (Bahn 1 und 2) und 6 (Bahn 3 und 4) wurde das Gst-c-Raf-1-RBD-Fusionsprotein aufgereinigt, jeweils 1 und 5  $\mu$ l auf ein 12% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mit in Coomassie-Blau gefärbt (Abbildung 16.G). In beiden Klonen wurde ein Protein der entsprechenden Größe exprimiert.

Vor der Analyse der Ras-Aktivität wurden Ba/F3 Parentalzellen und Abl-Fusionsprotein exprimierende Ba/F3 Zellen dreimal in serumfreiem Medium gewaschen und für 24 h in serumfreiem Medium gehalten, um die basale Ras-Aktivität in Gegenwart von je 5% CS und FSC zu verringern. Die Parentalzellklone Ba/F3(1) und Ba/F3(2) wurden dann für 10 min mit Interleukin-3-haltigem WEHI-konditioniertem Medium (WCM) stimuliert (219). Diese Stimulation sollte sowohl als Positivkontrolle für den Affinitätspräzipitationsassay dienen als auch den Nachweis erbringen, daß die Parentalzellen durch den 24-stündigen Serumentzug nicht soviel Schaden nehmen, daß sie nicht mehr mit Interleukin-3 stimulierbar sind. Die GTP-Beladung des Ras-Proteins wurde dann, wie unter 2.2.3.8 beschrieben, bestimmt (Abbildung 17), wobei diese Analyse mit dem Gst-RBD-Expressionsvektor durchgeführt wurde, der mittlerweile von dem erstbeschreibenden Labor zur Verfügung gestellt wurde (216).



**Abbildung 16: Klonierungsschritte des Gst-c-Raf-1-RBD-Expressionsvektors.** **A** Kontrollverdau des Ausgangsvektors: (1) nativ, (2) EcoRI und BamHI, (3) EcoRV. **B+C** Präparativer Verdau mit EcoRI und HindII vor und nach Herausschneiden der 5,3kb Bande. **D** Vektor vor (2) und nach (2) Auffüllen der 5'-überstehenden Enden. **E** BamHI Restriktionsverdau der Plasmidpräparation aus 11 E.coli-Klonen nach Transformation des mittels T4-Ligase geschlossenen Vektors. **F** Restriktionsverdau mit BamHI und PstI der Klone 3, 6 und 8. **G** Coomassie-Blau-gefärbtes 12% SDS-PAGE-Gel der aus Klon 3 (Bahn 1 und 2) und Klon 6 (Bahn 3 und 4) aufgereinigten Gst-C-Raf-1-RBD-Fusionsproteine. M: Marker (DNA-Längenstandart bzw. Molekulargewichtsstandard)

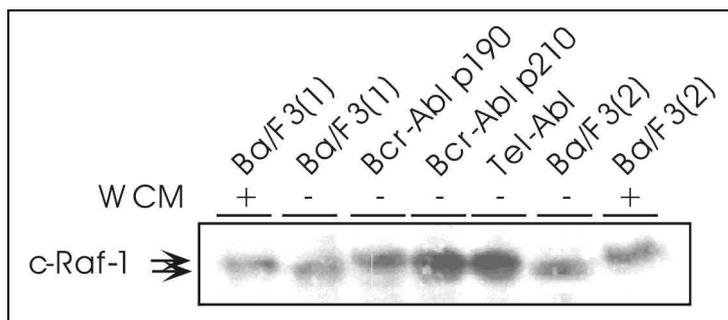


**Abbildung 17: Konstitutive Ras-Aktivierung in Tel-Abl exprimierenden Zellen.** Abl-Onkogen exprimierende Ba/F3 Zellen und die entsprechenden Parentalzellen (*Ba/F3(1)* und *Ba/F3(2)*) wurden für 24h in serumfreiem Medium gehalten und wie markiert 10min mit IL-3 haltigem WEHI-3-konditioniertem Medium (WCM) stimuliert. Mittels des Ras-GTP-Beladungssassay (siehe 2.2.3.8) wurde die basale und WCM-induzierte Ras-Aktivierung bestimmt (oben). Gleiche Ras-Gesamtkonzentration wird i anti-Ras Westren-Blot derselben Lysate gezeigt (unten).

Die Expression von leukämischen Abl-Proteinen führte in allen drei Fällen zu einer permanenten Anhebung der GTP-Beladung von Ras. Die gehungerten Ba/F3 Parentalzellen zeigten kaum Ras-Aktivität, reagierten aber auf Interleukin-3-Stimulation noch mit Ras-Aktivierung. Weiterhin zeigt Abbildung 17 (unterer Teil der Abbildung) mit einem anti-Ras Immunoblot der gleichen Lysate, die auch für die Affiniätspräzipitation von aktiviertem Ras im oberen Teil eingesetzt wurden, daß in allen Stimulationen bzw. Zelllinien gleiche Mengen des Ras-Proteins vorhanden waren.

### 3.4.2 Phosphorylierung der c-Raf-1-Kinase

Als direkte Zielproteine der Ras-GTPase gelten die Raf-Kinasen (siehe 1.7.2). Das Verhalten der c-Raf-1-Kinase sollte in den Onkogen-exprimierenden Ba/F3 Zellen mit einem anti-c-Raf-1-Immunoblot untersucht werden. Die verschiedenen Ba/F3 Zellen wurden gewaschen, 18h in Kulturmedium mit 0,5% Kälberserum gehungert und nach 10-minütiger Stimulation der Parentalzellen mit WCM in RIPA-Puffer mit Phosphatase-Inhibitoren lysiert. Diese Lysate wurden nach Auftrennung mittels einer 10% SDS-PAGE durch einen Western-Blot mit anti-c-Raf-1-Antikörper analysiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Migrationsretardierung von c-Raf-1 bei Expression von leukämischen Abl-Kinasen.** Die gehungerten Ba/f3 Zellen wurden nach oder ohne Stimulation mit mit IL-3 haltigem WEHI-3-konditioniertem Medium (WCM) mit Phosphataseinhibitoren lysiert. Die RIPA Lysate wurden mit einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und durch c-Raf-1-Immunoblot analysiert.

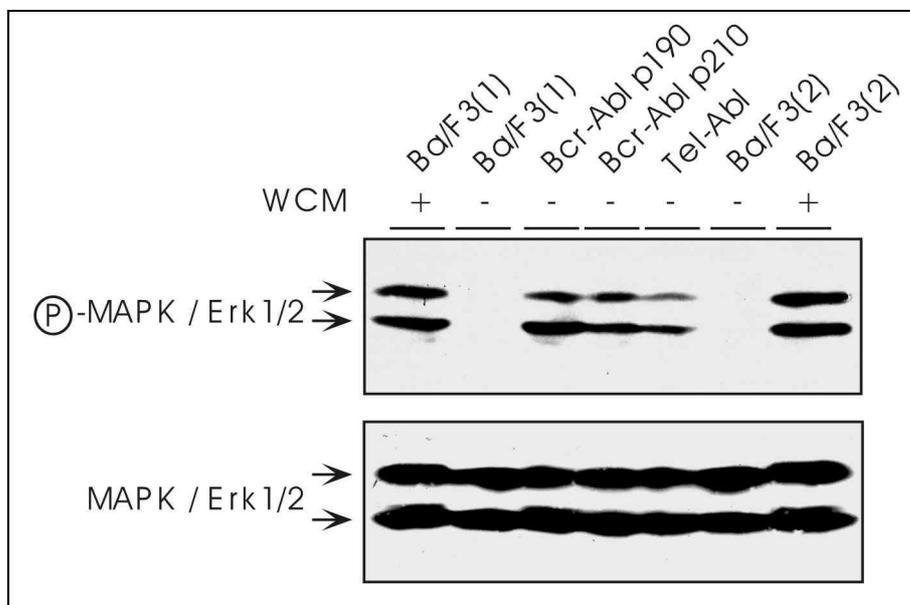
Die c-Raf-1-Kinase zeigte in den Tel-Abl oder Bcr-Abl exprimierenden Ba/F3 Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Parentalzellen ein etwas verlangsamtes Laufverhalten. Dies kann in der Regel als ein Zeichen für eine Phosphorylierung der Kinase gesehen werden. Gleiches konnte für die stimulierten Ba/F3(2) Parentalzellen und in geringerem Ausmaß auch für die stimulierten Ba/F3(1) Parentalzellen beobachtet werden.

### 3.4.3 Aktivierung der Kinase MAPK/Erk

Für viele verschiedene Zelllinien wurde gezeigt, daß die Aktivierung von Ras eine Aktivierung der mitogenen Raf-MEK-MAPK/Erk-Kaskade bewirkt (siehe 1.7.2). Die Aktivierung von MAPK/Erk sollte auch für die Tel-Abl induzierte Ras-Aktivierung in Ba/F3 Zellen gezeigt werden. Aktivierte MAPK/Erk ist an Threonin 202 und Tyrosin 204 phosphoryliert. Dies wird durch den anti-Phospho-MAPK/Erk-Antikörper spezifisch erkannt. Wie schon in Abschnitt 3.4.1 sollten Tel-Abl Ba/F3 Zellen mit p190 und p210Bcr-Abl exprimierenden Zellen und den entsprechenden Parentalzelllinien verglichen werden. Dazu wurden die Zellen zweimal gewaschen und für 18 Stunden in Kulturmedium gehalten, das nur 0,5% Kälberserum enthielt, um die basale MAPK/Erk-Aktivität zu reduzieren. Parentalzellen wurden für 10 min mit WCM stimuliert, und RIPA-Lysate mit Phosphatase-Inhibitoren hergestellt.

Der Gesamtgehalt an MAPK/Erk wurde nach einer 10% SDS-PAGE mit einem anti-Erk Western-Blot dargestellt (Abbildung 19, unterer Teil) und war in allen Proben ungefähr gleich hoch. Der Immunoblot mit anti-Phospho-MAPK/Erk-Antikörper zeigte eine

Aktivierung von MAPK/Erk in den Zellen, die Tel-Abl und Bcr-Abl exprimieren (Abbildung 19, oberer Teil). Die gehungerten Parentalzellen wiesen kaum aktive MAPK/Erk auf, jedoch konnte die Stimulation mit Interleukin-3 eine deutliche Aktivierung der Kinase hervorrufen.

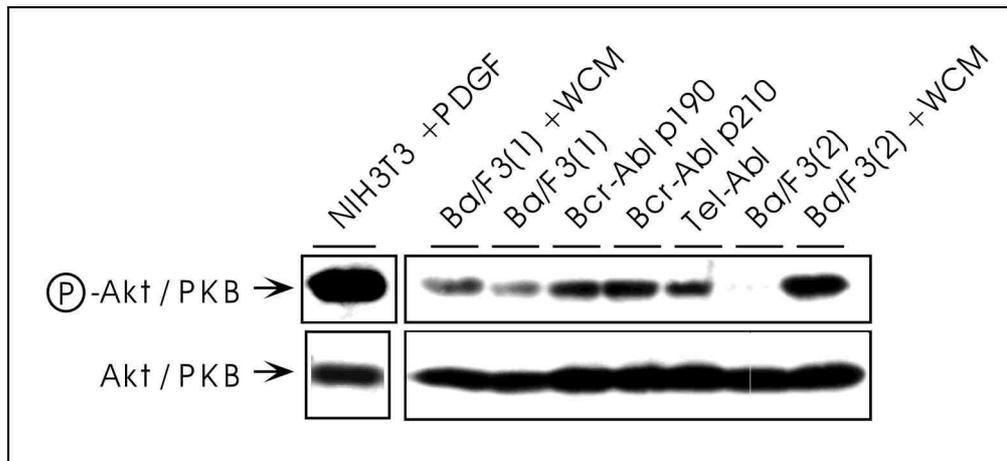


**Abbildung 19: Konstitutive MAPK/Erk-Aktivierung.** Nach Serumdeprivation und eventueller IL-3- Stimulation (WCM +) wurden aus Abl-Onkogen exprimierende Ba/F3 Zellen und Parentalzellen (*Ba/F3(1)* und *Ba/F3(2)*) RIPA-Lysate mit Phosphataseninhibitoren hergestellt und mit einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die MAPK/Erk-Aktivität wurde mittels eines aktivierungsspezifischen anti-Phospho-MAPK/Erk Antikörper (oben) und die Gesamtmengen an MAPK/Erk Kinase mit einem anti-MAPK/Erk Antikörper (unten) bestimmt.

#### 3.4.4 Aktivierung der c-Akt/PKB-Kinase

Onkogene Tyrosinkinasen wie Bcr-Abl führen oft zu einer Aktivierung der anti-apoptotischen c-Akt/PKB Kinasen.

Deshalb sollte die Aktivierung der c-Akt/PKB-Kinase durch die Tel-Abl-Expression in Ba/F3 Zellen sollte untersucht werden. Dazu wurden wiederum Lysate von Ba/F3-Parentalzellen und p190Bcr-Abl, p210Bcr-Abl oder Tel-Abl exprimierende Ba/F3 Zellen mittel eines Immunoblots mit einem Antikörpers, der spezifisch an die an Serin 473 phosphorylierte und damit aktive c-Akt-Kinase bindet, analysiert. Zusätzlich wurde als positive Kontrolle ein vom Antikörperhersteller zur Verfügung gestelltes Lysat von PDGF-stimulierten NIH-3T3 Fibroblasten mit untersucht. Ba/F3 Zellen wurden vor der Herstellung von Lysaten wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben gehungert und stimuliert.



**Abbildung 20: Aktivierung von c-Akt/PKB durch Abl-Onkogene.** Serumdeprivierte Ba/F3 Zellen mit oder ohne WCM-Stimulation oder mit Expression von Abl-Fusionskinasen wurden in RIPA mit Phosphataseinhibitoren lysiert. Nach 10% SDS-PAGE erfolgte ein Western-Blot mit einem aktivierungsspezifischen anti-phospho-Akt/PKB Antikörper (oben) und einem anti-Akt/PKB Antikörper (unten). Vor Hersteller der Antikörper stammt das Lysat der PDGF-stimulierten NIH-3T3

Nach Auftrennung in einem 10% SDS-Gel wurde in allen 5 analysierten Zelllinien durch anti-Akt Western-Blot eine ähnliche Gesamtmenge der c-Akt-Kinase nachgewiesen (Abbildung 20, unten). Die Kontrolle mit Lysat von PDGF-stimulierten Fibroblasten ergab bei einer deutlichen Expression von c-Akt (Abbildung 20, unten) ein sehr starkes Signal mit dem aktivierungsspezifischen anti-c-Akt-Antikörper (Abbildung 20, oben). Auch in den drei Zelllinien, die die Abl-Onkogene Bcr-Abl (p190 und p210) und Tel-Abl exprimieren, konnte eine Aktivierung der c-Akt-Kinase nachgewiesen werden. Ebenso deutlich war die Aktivierung in den in den mit Interleukin-3 stimulierten Parentalzellen Ba/F3(1) und Ba/F3(2) zu sehen. Die unstimulierten Parentalzellen zeigten beide deutlich weniger Aktivierung der c-Akt-Kinase als die übrigen analysierten Zelllinien, wobei dieser Unterschied bei den Ba/F3(2)-Zellen deutlicher zu beobachten war (Abbildung 20, oben).

## **4 Diskussion**

In dieser Arbeit wurden die leukämischen Abl-Fusionskinasen Bcr-Abl und Tel-Abl untereinander und mit den normalen Kinasen c-Abl und Arg verglichen. Ein erster Schwerpunkt lag dabei auf Ähnlichkeiten und Unterschieden der Substratspezifität der Kinasen gegenüber synthetischen Peptiden. Darüber hinaus wurden die durch die vor wenigen Jahren entdeckte Tel-Abl-Kinase verursachten Signaltransduktionsereignisse in der hämatopoetischen Zelllinie Ba/F3 untersucht und mit Bcr-Abl exprimierenden Zellen sowie in den Parentalzellen ohne Abl-Fusionskinasen verglichen.

### ***4.1 Veränderte katalytische Spezifität der leukämischen Abl-Kinasen***

Die Frage, ob sich die leukämischen von den physiologischen Abl-Kinasen lediglich durch die konstitutiv erhöhte Tyrosinkinaseaktivität unterscheiden oder ob sie darüber hinaus auch Unterschiede in ihrer Substratspezifität aufweisen, ist noch nicht vollständig geklärt. Dabei sind mehrere Ursachen für eine unterschiedliche Phosphorylierung von Substraten durch die normalen und die onkogenen Abl-Kinasen denkbar: Allein aufgrund der veränderten subzellulären Lokalisation der verschiedenen Abl-Kinasen (17) sind jeweils nur bestimmte Substratproteine verfügbar. Weiterhin ist es gut vorstellbar, daß die in den Fusionskinasen, im Gegensatz zu c-Abl und Arg, zusätzlich vorhanden Proteininteraktionsdomänen der Bcr- und Tel-Anteile (siehe 1.7 und 1.8) andere bzw. zusätzliche Substrate an die Kinase rekrutieren, als dies bei c-Abl oder Arg der Fall wäre. Schließlich könnte intramolekular der Bcr- bzw.- Tel-Anteil eine Konformationsänderung induzieren, die in der katalytischen Domäne der Fusionskinase die Substratbindungstasche betrifft und zu einer veränderten Substratspezifität führt. Mit der Beschreibung einer Reihe von Proteinkinaseinhibitoren, sogenannten Tyrphostinen, die zwischen normalen und transformierenden Abl-Kinasen differenzieren können, gaben 1992 Anafi et al. einen ersten Hinweis darauf, daß sich die Abl-Onkogenprodukte von ihren zellulären Homologen durch eine veränderte Substratspezifität aufgrund von Konformationsänderungen der Kinasedomäne unterscheiden (220).

Eine detailliertere Untersuchung der katalytischen Eigenschaften normaler und leukämischer Abl-Kinasen wurde erst einige Jahre später durch die Identifizierung von Substraten der Abl-Kinasen möglich. So wurden als erste zelluläre Substrate der Abl-Kinasen c-CrkII (39), CRKL (60), die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (218) und der Bcr-Teil der Fusionskinasen (221,222) beschrieben.

Da alle Abl-Familienmitglieder mehrere Proteininteraktionsdomänen enthalten, interagieren Substratproteine zusätzlich mit Epitopen der Abl-Proteine außerhalb der katalytischen Bindungstasche. Unterschiede könnten somit nicht klar der Substratspezifität zugeordnet werden. In den Experimenten der hier beschriebenen Arbeit wurden als Substrate daher kurze synthetische Peptide verwendet, die den Phosphorylierungsepitopen bekannter Substratproteine entsprechen. Von diesen Peptiden ist nicht zu erwarten, daß sie außerhalb der katalytischen Domäne mit anderen Epitopen der Abl-Proteine interagieren.

In der Absicht, spezifische Peptidsubstrate für Proteinkinasen zu finden, synthetisierten Songyang et al. (217) eine Zufallsbibliothek von Peptiden mit einer gemeinsamen 'M-A-x-x-x-x-Y-x-x-x-x-A-K-K-' Sequenz (wobei für 'x' jede Aminosäure außer Cystein, Tryptophan, Tyrosin, Serin und Threonin möglich war). Diese Peptidbibliothek unterzogen sie einer Phosphorylierung durch Tyrosinkinase. Die phosphorylierten Peptide wurden von den nichtphosphorylierten Proteinen getrennt und als Gesamtheit sequenziert. Als bevorzugte Aminosäuresequenz ergab sich für die c-Abl-Kinasedomäne A-E-V-I-Y-A-A-P-F und für die virale Src-Kinase E-E-E-I/V-Y-G/E-E-F-D/E. Aufgrund der umrissenen Methodik spiegeln diese Sequenzen wieder, welche Aminosäure an der jeweiligen Position in dem Anteil der phosphorylierten Peptiden am häufigsten vorkam.

Es konnte also gezeigt werden, daß die c-Abl-Kinase eine hohe Präferenz für die Aminosäure Prolin in Position +3 hat. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, daß in vielen natürlichen Proteinsubstraten der Abl-Kinase ein Prolin an dritter Stelle nach dem Tyrosin zu finden ist, wie z.B. in den Proteinen c-CrkII, CRKL, p130Cas und Paxillin.

Die von Songyang et al. (217) beschriebene Sequenz (SP1, Tabelle 6) stellte sich auch in den hier zusammengefaßten Experimenten als ein hervorragendes Substrat für die verschiedenen Abl-Kinasen heraus (3.1.4 und Abbildung 9). Insbesondere bei einem

Vergleich von SP1 mit den Phosphorylierungsepitopen natürlicher Proteinsubstraten (SP2 bis SP7, SP12) wird dies deutlich.

In Übereinstimmung mit der oben genannten Rolle der Position +3 wurde diese Sequenz nach Mutation des Prolins zu Alanin oder Histidin (SP8 und SP9) von c-Abl und Arg deutlich weniger phosphoryliert (Abbildung 9).

Darüber hinaus zeigten die in 3.1 beschriebenen Untersuchungen allerdings, daß ein Prolin in Position +3 nach einem Tyrosin nicht unabhängig von den übrigen Aminosäuren eines Substratepitops zu einer gesteigerten Phosphorylierung desselben führt. So bewirkte der Ersatz des Phenylalanins in Position +3 in der Sequenz von SP10 durch ein Prolin (SP11) keine Steigerung der Phosphorylierungsraten durch die untersuchten Kinasen (Abbildung 9). In Einklang hiermit fanden Wu et al. 2002 aus einer Peptidbibliothek unter den 12 durch c-Abl am stärksten phosphorylierten Peptiden nur zwei Peptide mit einem Prolin in Position +3 (223). Hierzu wurde eine Peptidbibliothek an Polysterolkügelchen synthetisiert, wobei jedes Kügelchen Peptide der selben Sequenz trugen ('one-bead one-peptide'-Bibliothek), und diese dann durch c-Abl mit radioaktivmarkiertem ATP phosphoryliert. Die Peptidsequenzen radioaktivmarkierter Kügelchen wurden sodann einzeln sequenziert (223). Im Unterschied zu Songyang et al. (217) werden so nicht die von c-Abl an einzelnen Positionen in Substrateptiden bevorzugten Aminosäuren bestimmt sondern die Peptidsequenzen, die durch c-Abl am stärksten phosphoryliert werden.

Im Gegensatz zu c-Abl und Arg, die, wie oben geschildert, SP8 und SP9 mit einem Alanin oder Histidin in Position +3 deutlich weniger phosphorylierten als SP1, traf dies nicht für die beiden leukämischen Abl-Kinasen Bcr-Abl und Tel-Abl zu, die SP8 und SP9 in nahezu gleichem Umfang wie SP1 phosphorylierten. Auch SP10 und SP11 wurden in Relation zu SP1 von Bcr-Abl und Tel-Abl sehr viel effizienter phosphoryliert als von c-Abl und Arg (Abbildung 9). Diese Beobachtungen stellen einen ersten Unterschied in der Präferenz für Peptidsubstrate zwischen normalen und onkogenen Formen der Familie der Abl-Kinasen dar. Sie sind in Einklang mit zeitgleich gewonnenen Erkenntnissen der Arbeitsgruppe von K. S. Lam (224): Basierend auf der bereits oben beschriebenen 'one-bead one-compound'-Kombinationspeptid-Bibliothek-Methode

beschrieben sie ebenfalls Peptide, die durch Bcr-Abl deutlich stärker phosphoryliert wurden als durch c-Abl.

Diese Daten geben erste Hinweise darauf, daß die onkogenen Formen der Familie der Abl-Kinasen eine veränderte Substratspezifität besitzen, indem sie einen sehr viel größeren Umfang an Substraten phosphorylieren können als die normalen Formen. Selbstverständlich ist die Situation in intakten Zellen stark durch weitere Faktoren beeinflusst, wie die subzelluläre Kompartimentierung und Interaktionen zwischen anderen Proteindomänen als die Kinasedomäne und das Substratepitop.

Dadurch, daß Peptide verwandt wurden, die nur das Substratepitop selbst enthalten, wurde ausschließlich die Spezifität der katalytischen Domäne ohne den Einfluß anderer Protein-Protein-Interaktionen betrachtet. Dies könnte auch erklären, warum die Autophosphorylierungsstelle Y177 in Bcr-Abl in Form eines isolierten Substratpeptids nur in einem relativ geringen Ausmaß phosphoryliert wurde. Da in diesem Fall in der Zelle Kinase und Substrat im gleichen Protein vorliegen, wäre die faktische Konzentration des Substrates für die Kinase ohne sterische Behinderung „unendlich“ hoch. Ähnliches gilt für SP2 bis SP6, deren Sequenzen im Kontext des gesamten Proteins gut phosphoryliert werden(39,60,64,163): Bcr-Abl bindet die Substratproteine direkt über die N-terminale SH3-Domäne in c-CrkII und in CRKL, oder im Fall von p130Cas mittelbar über die Interaktion mit den Adakterproteinen.

Auch Amoui und Miller konnten zeigen, daß für das Gesamtausmaß der Phosphorylierung von Proteinsubstraten durch c-Abl sowohl die Erkennung der das Tyrosin umgebenden Aminosäuren durch die katalytische Domäne der Abl-Kinase als auch die Interaktion zwischen anderen Bindedomänen entscheidend ist (225). Die Autoren arbeiteten mit einer Mutation in der Kinasedomäne von c-Abl (Y569W), welche eine Veränderung der Substratspezifität von Prolin in Position +3 hin zu Alanin in Position +3 der Substrates bewirkt, und einer Deletion der carboxyterminalen Region der Kinase, in der u.a. die Prolin-reichen SH3-Bindedomäne für die SH3-Domäne des Crk-Adapterprotein enthalten ist. Beide Alterationen der Kinase minderten unabhängig voneinander die Phosphorylierung von Crk durch die Kinase, beide Mutationen zusammen hatten einen additiven Effekt auf die Minderung der Crk-Phosphorylierung (225).

Darüber hinaus kommen die Autoren zu dem Schluß, daß Prolin an Position +3 nur in einem Teil der physiologischen Abl-Substrate essentiell für die Erkennung bzw. Phosphorylierung ist, da in Ihren Experimenten durch das Einbringen in Zellen von Wildtyp c-Abl und der oben beschriebenen Mutante ein im Wesentlichen identisches Phosphorylierungsmuster zellulärer Proteine hervorgerufen wurde (225).

#### ***4.2 Eine Tyrosin-zu-Phenylalanin-Peptid-Mutante als potentielles Pseudosubstrat (SP13)***

Bereits 1976 konnten B.E. Kemp et al. zeigen, daß der Ersatz des phosphorylierbaren Serins in einem Peptidsubstrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA, eine Serinkinase) durch die strukturähnliche Aminosäure Alanin einen kompetitiven Inhibitor gegen Peptid- und Proteinsubstrate hervorbringt (226). Daß eine ähnliche Vorgehensweise auch für Tyrosinproteinkinasen möglich ist, zeigten C. Wang et al. am Beispiel der v-Fps-Kinase (227). Durch Austausch des Tyrosins, das als Phosphatakteptor in Substraten für Tyrosinproteinkinasen dient, gegen die Aminosäure Phenylalanin, die eine ähnliche räumliche Ausdehnung wie Tyrosin besitzt aber nicht phosphoryliert werden kann, verwandelten die Autoren Peptidsubstrate der v-Fps-Kinase in Inhibitoren der katalytischen Aktivität dieser Kinase. Ebenso konnten Boerner et al. zeigen, daß ein durch den oben geschilderten Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin verändertes Peptidsubstrat der c-Src-Tyrosinkinase als ein kompetitiver Inhibitor für die selben Kinase funktioniert (228).

Analog dazu hätte auch SP13 sich als ein Inhibitor des Abl-Tyrosinkinasen herausstellen können. Basierend auf SP1, das als optimale Bindesequenz für die Kinasedomäne von Abl beschrieben wurde (217) und von allen getesteten Abl-Kinasen gut phosphoryliert wurde (Abbildung 9), sollte SP13, das sich nur durch den Tyrosin-gegen-Phenylalanin-Tausch von SP1 unterscheidet, ähnlich gut in die Substratbindetasche der Abl-Kinasedomäne binden und als Pseudosubstrat diese so für andere Substrate blockieren.

Dieser Versuch, ein inhibitorisches Pseudosubstrat für Abl-Kinasen zu generieren, stellte sich allerdings als nicht erfolgreich heraus (siehe 3.2).

Auch Cole et al. konnten durch einen einfachen Tyrosin-gegen-Phenylalanin-Austausch in Substratpeptiden für die C-terminale-Src-Kinase (Csk) keine ausreichend potente

kompetitive Inhibitoren identifizieren (229). Ein Grund für die Diskrepanz zwischen der hohen Phosphorylierungsrate eines Peptidsubstrats auf der einen Seite und der mangelnden inhibitorischen Aktivität der Tyrosin-zu-Phenylalanin-Mutante könnte darin liegen, daß die Hydroxylgruppe der Aminosäure Tyrosin mittels einer Hydrogenbindung maßgeblich zu der Enzymaffinität beiträgt. Eine weitere Erklärung geben Adams et al., die 1992 beschrieben, daß der mit der PKA-katalysierten Phosphorylierung eines Peptidsubstrats assoziierte  $K_m$ -Wert die Affinität dieses Peptidsubstrats zur katalytischen Region des Enzyms ( $K_d$ ) grob überschätzt (d.h.  $K_m \ll K_d$ ) (230). Tatsächlich gestalten sich Bemühungen, Inhibitoren z.B. für die Tyrosinkinase c-Src unter Einsatz von nichtphosphorylierbaren Tyrosinanaloga anstelle von Phenylalanin, als weitaus erfolgreicher (231,232).

### ***4.3 Tel-Abl in Proteinkomplexen***

Da sogar p190 Bcr-Abl und p210Bcr-Abl sich in den Effekten unterscheiden, die sie auf bestimmte Signaltransduktionswege haben (122), ist es nicht offensichtlich, welche Signaltransduktionswege durch Tel-Abl beeinflusst werden. Dieses wurde in dieser Arbeit untersucht und unter 3.3 und 3.4 dargestellt.

Das CRKL-Adapterprotein bildet sowohl mit dem Bcr-Abl-Fusionsprotein als auch mit der c-Abl-Kinase stabile Komplexe (60). In Koimmunpräzipitationsexperimenten wurden ähnliche Komplexe zwischen CRKL und Tel-Abl gefunden (3.3.1). Diese Interaktion machte es wahrscheinlich, daß CRKL und möglicherweise auch c-CrkII ähnlich wie durch Bcr-Abl (60) auch durch die aktive Tel-Abl-Kinase phosphoryliert werden. Tatsächlich werden CRKL und c-CrkII in Tel-Abl exprimierenden Ba/F3 Zellen an Tyrosin phosphoryliert (siehe 3.3.2). Anbetracht der Tatsache, daß die von Crk-Proteinen abgeleiteten Peptide durch Bcr-Abl und Tel-Abl ähnlich phosphoryliert werden (Abbildung 9), suggerieren diese Ergebnisse stark, daß Tel-Abl direkt Crk-Adapterproteine phosphorylieren kann. Weitergehende Analysen von Crk- und CRKL-Präzipitaten aus Tel-Abl-exprimierenden Zellen zeigten, daß eine beträchtliche Zahl an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen koimmunpräzipitiert werden (Abbildung 13). Die SH2-Domäne von Crk und CRKL binden selektiv bestimmte Tyrosin-phosphorylierte Sequenzen (27). Wie in dieser Arbeit (siehe Abbildung 9) gezeigt werden konnte, werden diese Sequenzen auch als Substratmotive durch die Tel-Abl-Kinase erkannt.

Daher ist es wahrscheinlich, daß die Gegenwart von Tel-Abl zu einer konstitutiven Aktivierung von Crk/CRKL-abhängigen Signaltransduktionswegen führt.

#### **4.4 Aktivierte Signaltransduktionswege durch leukämische Abl-Kinasen**

Gelfanov et al. (233) konnten zeigen, daß IL-3-Unabhängigkeit, die ein Charakteristikum von Bcr-Abl transformierten Zellen darstellt, in der myeloischen Zelllinie H7 alternativ durch gemeinsames Einbringen aktiver Formen der Raf-Kinase und der Akt-Kinase hervorgerufen werden kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wiesen nach, daß die beiden wesentlichen Signaltransduktionswege Ras-Erk und PI3K-Akt/PKB nicht nur in Bcr-Abl sondern auch in Tel-Abl exprimierenden Zellen konstitutiv aktiviert sind.

Mittels eines Präzipitationsassays für GTP-beladenes Ras (216) konnte hier gezeigt werden, daß die Expression der leukämischen Abl-Proteinen p190Bcr-Abl, p210Bcr-Abl und Tel-Abl in Ba/F3 Zellen zu einer permanenten Erhöhung von GTP-beladenem Ras führt. Während die Ras-Aktivierung durch Tel-Abl bisher nicht bekannt war, wurde die durch Bcr-Abl-Expression induzierbare Ras-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen schon von anderen Autoren berichtet (116,144,145,234).

Die für die Ras-Aktivierung zentrale Rolle der Grb2-Bindungsstelle mit Tyrosin an Position 177 im Bcr-Teil von Bcr-Abl (144) wurde (1.7.2) anfangs ausführlich beschrieben.

Tel-Abl Typ B (siehe Tabelle 2 und Abbildung 2) weist im Exon 5 ein Grb2 Bindemotiv (Y314-M-N-H ) auf, über welches Grb2 gebunden und die Ras-Erk-Kaskade aktiviert werden könnte., Dagegen ist im Typ A Tel-Abl, welches in den Experimenten dieser Arbeit verwandt wurde, keine Grb2-Bindungsstelle vorhanden. Die Adapter Crk und CRKL binden jedoch an GTPase-Regulatoren wie SoS und C3G (235,236) und könnten so Einfluß auf die Aktivität von GTPasen wie Ras und Rap1 nehmen.

Eine Mutation der Grb2 Bindungsstelle in p210Bcr-Abl des Tyrosins 177 zu Phenylalanin (Y177F) reduziert die Fokusbildung durch Bcr-Abl in Fibroblasten (144), wobei Y177F Bcr-Abl immer noch in der Lage ist, Ras zu aktivieren und hämatopoetische Zelllinien zytokinunabhängig zu machen (146,147). Y177F Bcr-Abl

induziert jedoch im Mausmodell eher eine Leukämie, die einer ALL entspricht, während Wildtyp p210Bcr-Abl in dem selben Mausmodell einen CML-ähnlichen Phänotyp hervorruft (237). Entsprechend könnte spekuliert werden, ob das Vorhandensein des putativen Grb2-Bindemotivs in Typ B Tel-Abl erklärt, warum bei CML-Patienten mit einem Tel-Abl-Fusionsprotein bisher nur der Typ B und nie Typ A der Fusionskinase aufgetreten ist.

Es ist bekannt, daß Ras die mitogene Raf-MEK-MAPK/Erk-Kaskade in vielen verschiedenen Zelltypen aktivierend beeinflusst (148-150).

Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit in den Abl-Onkogen exprimierenden Zellen eine Aktivierung der Erk-Kinase nachgewiesen werden.

Eine Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase c-Raf-1, auf die die gezeigte Migrationsretardierung schließen lässt (3.4.2), kann abhängig von dem phosphorylierten Aminosäureepitop sowohl mit einer Aktivierung als auch mit einer Inaktivierung einhergehen. So ist für die Aktivierung eine Phosphorylierung an Serin 338 und Tyrosin 341 erforderlich, wohingegen die Phosphorylierung an Serin 43 zu einer Inhibition der Kinase führt (148). Die gezeigte Migrationsretardierung erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf die Art der Phosphorylierung.

Auch wenn c-Raf-1 durch GTP-beladenes Ras aktiviert werden kann und seinerseits in aktiviertem Zustand der Lage ist, Erk/MAPK mittels MEK zu aktivieren, ist die Phosphorylierung der c-Raf-1-Kinase im Kontext der Abl-Onkogen exprimierenden Ba/F3-Zellen nicht zwingend in direktem Zusammenhang mit der Erk-Aktivierung zu sehen. Vielmehr scheint in hämatopoetischen Zellen zumindest die durch den IL-3-Rezeptor induzierte Aktivierung von MEK und MAPK/Erk vornehmlich durch B-Raf zu erfolgen (148). So war auch die Bcr-Abl-induzierte Aktivierung von Erk nicht durch Hemmung der c-Raf-1-Kinase zu beeinflussen (238). Der in dieser Arbeit benutzte Raf-Antikörper ist aber für c-Raf-1 spezifisch.

Ein weiteres Signaltransduktionsprotein, welches durch die Expression von Bcr-Abl in seiner Aktivität beeinflusst wird und Komplexe mit CRKL, Crk und c-Cbl formen kann, ist die Akt/PKB-Kinase, welche via die PI3K aktiviert wird (129,154). Hier konnte gezeigt werden, daß Akt/PKB unter Serumdeprivation in Ba/F3-Zellen konstitutiv

aktiviert ist, wenn Tel-Abl oder Bcr-Abl exprimiert werden (3.4.4). Zur Aktivierung der PI3K durch Bcr-Abl ist eine intakte SH2- und Kinase-Domäne im Abl-Anteil des Fusionsproteins erforderlich (129). In Tel-Abl sind diese beiden Domänen unverändert vorhanden (Abbildung 2). Somit erscheint es durchaus plausibel, daß auch in Tel-Abl exprimierenden Zellen die PI3K aktiviert wird und es in der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade zu einer Aktivierung von c-Akt kommt. Insbesondere in Hinblick auf die bereits oben diskutierte Phosphorylierung der c-Raf-1-Kinase in Abl-Onkogen exprimierenden Zellen, ist bemerkenswert, daß in Bcr-Abl transformierten hämatopoetischen Zellen die anti-apoptotischen Effekte, die durch Aktivierung von c-Akt vermittelt werden, von der Aktivierung von mitochondrialem c-Raf-1 abhängig sind (156,157,238).

In Hinsicht auf wesentliche Signaltransduktionswege zeigen die hier dargestellten Ergebnisse daß deutliche Ähnlichkeiten zwischen den durch Bcr-Abl und Tel-Abl initiierten Signaltransduktionsereignissen bestehen. Ebenso findet sich die Assoziation von CRKL mit Tel-Abl und ihre Komplexbildung mit vielen wahrscheinlich SH2-Domäne-bindenden Proteinen in der Situation von Bcr-Abl transformierten Zellen wieder. Dies ist nicht unerwartet angesichts der strukturellen Ähnlichkeiten von Bcr-Abl und Tel-Abl und dem ähnlichen Muster von Phosphotyrosyl-haltigen Proteinen, welches in einer früheren Studie beschrieben wurde (210). In dieser initialen Charakterisierung fehlte jedoch eine detaillierte Analyse der katalytischen Eigenschaften von Tel-Abl, und die funktionellen Konsequenzen der Expression von Tel-Abl in hämatopoetischen Zellen blieben im Wesentlichen unklar.

Auch wenn in den letzten Jahren vermehrt Berichte über Patienten mit Tel-Abl-assoziierten Leukämien in der Literatur anzutreffen sind (103,239-241), wird es in nächster Zeit wahrscheinlich nicht möglich sein, Untersuchungen in ausreichendem Umfang an primären Leukozyten von Tel-Abl-positiven Leukämiefällen durchzuführen(242,243). Daher wird man bis auf weiteres auf Modellsysteme wie die murinen Ba/F3 Zellen oder Mausmodelle (237) angewiesen sein, um zumindest einige Hinweise auf die durch die leukämische Tel-Abl-Kinase induzierten Signalereignisse zu erhalten.

## **5 Zusammenfassung**

Deregulierte Überaktivierung von Tyrosinkinase der Abl-Familie spielen eine wesentliche Rolle in verschiedenen Leukämieformen beim Menschen. Neben der schon seit vielen Jahren für die CML als ursächlich anerkannten Fusionskinase p210Bcr-Abl sind weitere Fusionskinasen unter Beteiligung der Abl-Kinase in Formen der sowohl CML als auch der ALL und CMML beschrieben worden. Diese seltener auftretenden Abl-Fusionskinasen umfassen sowohl Bcr-Abl Proteine anderer Größe (p165Bcr-Abl, p190Bcr-Abl und p230Bcr-Abl) als auch die Tel-Abl Fusionskinasen, die anstelle von Teilen des Bcr-Proteins Teile des Tel-Proteins beinhalten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Kinasespezifität der onkongenen Fusionstyrosinkinase Bcr-Abl und Tel-Abl mit der der physiologischen Kinasen c-Abl und Arg verglichen. Mittels kurzer Peptide, deren Aminosäuresequenzen Phosphorylierungsepitopen in Substratproteinen der Kinasen der Abl-Familie entsprechen, konnte eine verminderte katalytische Spezifität der onkongenen Kinasen Bcr-Abl und Tel-Abl gezeigt werden.

Der zweiten Teil der hier dargestellten Ergebnisse fokussiert auf Signaltransduktionsereignisse, die in Tel-Abl exprimierenden Zellen auftreten, und vergleicht diese mit der für Bcr-Abl bekannten Signaltransduktion.

Ähnlich wie Bcr-Abl konnte auch Tel-Abl in Proteinkomplexen mit dem Adapterprotein CRKL, ein Protein, das in Bcr-Abl-transformierten Zellen konstitutiv Tyrosin-phosphoryliert ist, nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, daß in den Tel-Abl exprimierenden Zellen die Adapterproteine c-CrkII und CRKL phosphoryliert sind und mit vielen anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen Komplexe bilden. Schließlich wurden einige Signaltransduktionsschritte beschrieben, die sowohl in Zellen, die Tel-Abl exprimieren, als auch in Zellen mit Bcr-Abl-Expression aktiviert sind. Mittels eines Ras-GTP-spezifischen Präzipitationsassays konnte eine konstitutive Anhebung des GTP-beladenen Anteils des GTPase Ras in den Zellen mit Expression der leukämischen Abl-Formen gezeigt werden.

Sowohl die mitogene Kinase MAPK/Erk als auch die Kinase Akt/PKB, welche die Apoptose blockiert reguliert, werden ebenfalls durch Tel-Abl aktiviert.

Die Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit zeigen, daß die leukämischen Abl-Fusionsproteine eine katalytische Spezifität aufweisen, die sich von der der physiologischen Abl-Kinasen unterscheidet und daß Tel-Abl zumindest einige der Signaltransduktionswege zu aktivieren vermag, welche auch durch das onkogene Protein Bcr-Abl aktiviert werden.

## 6 Literatur

1. J.H.Bennet (1845): Case of a hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Surg J* 64, 413-423.
2. D.Craigie (1845): Case of a disease in the spleen, in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med Surg J* 64, 400-413.
3. R.Virchow (1845): Weißes Blut. *Froiep's Notizen a d Geb d Nat u Heilk* 36, 151-155.
4. S.Faderl, M.Talpaz, Z.Estrov, S.O'Brien, R.Kurzrock, and H.M.Kantarjian (1999): The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341, 164-72.
5. T.Era and O.N.Witte (2000): Regulated expression of P210 Bcr-Abl during embryonic stem cell differentiation stimulates multipotential progenitor expansion and myeloid cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1737-42.
6. X.Jiang, T.Fujisaki, F.Nicolini, M.Berger, T.Holyoake, W.Eisterer, C.Eaves, and A.Eaves (2000): Autonomous multi-lineage differentiation in vitro of primitive CD34+ cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 14, 1112-21.
7. R.Hehlmann and A.Hochhaus (1998): Diagnostik und Therapie der CML. *Onkologe* 4, 798-807.
8. C.L.Sawyers (1999): Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 340, 1330-40.
9. G.Q.Daley and Y.Ben-Neriah (1991): Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Adv Cancer Res* 57, 151-84.
10. P.C.Nowell and D.A.Hungerford (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1197-1200.
11. J.D.Rowley (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-3.
12. N.Heisterkamp, J.Groffen, J.R.Stephenson, N.K.Spurr, P.N.Goodfellow, E.Solomon, B.Carritt, and W.F.Bodmer (1982): Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* 299, 747-9.
13. S.P.Goff, E.Gilboa, O.N.Witte, and D.Baltimore (1980): Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell* 22, 777-85.
14. N.Rosenberg and O.N.Witte (1988): The viral and cellular forms of the Abelson (abl) oncogene. *Adv Virus Res* 35, 39-81.
15. J.Y.Wang, F.Ledley, S.Goff, R.Lee, Y.Groner, and D.Baltimore (1984): The mouse c-abl locus: molecular cloning and characterization. *Cell* 36, 349-56.
16. R.A.Van Etten, P.Jackson, and D.Baltimore (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, 669-78.
17. M.Wetzler, M.Talpaz, R.A.Van Etten, C.Hirsh-Ginsberg, M.Beran, and R.Kurzrock (1993): Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in

- normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest* 92, 1925-39.
18. A.J.Koleske, A.M.Gifford, M.L.Scott, M.Nee, R.T.Bronson, K.A.Miczek, and D.Baltimore (1998): Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* 21, 1259-72.
  19. E.Shtivelman, B.Lifshitz, R.P.Gale, B.A.Roe, and E.Canaani (1986): Alternative splicing of RNAs transcribed from the human abl gene and from the bcr-abl fused gene. *Cell* 47, 277-84.
  20. Y.Ben-Neriah, A.Bernards, M.Paskind, G.Q.Daley, and D.Baltimore (1986): Alternative 5' exons in c-abl mRNA. *Cell* 44, 577-86.
  21. P.Jackson and D.Baltimore (1989): N-terminal mutations activate the leukemogenic potential of the myristoylated form of c-abl. *EMBO J* 8, 449-56.
  22. I.Sadowski, J.C.Stone, and T.Pawson (1986): A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol Cell Biol* 6, 4396-4408.
  23. W.M.Franz, P.Berger, and J.Y.Wang (1989): Deletion of an N-terminal regulatory domain of the c-abl tyrosine kinase activates its oncogenic potential. *EMBO J* 8, 137-147.
  24. T.Pawson (1988): Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncogene* 3, 491-5.
  25. T.Pawson (1995): Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-80.
  26. B.J.Mayer, P.K.Jackson, and D.Baltimore (1991): The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 627-31.
  27. Z.Songyang, S.E.Shoelson, M.Chaudhuri, G.Gish, T.Pawson, W.G.Haser, F.King, T.Roberts, S.Ratnofsky, R.J.Lechleider, B.G.Neel, R.B.Birge, J.E.Fajardo, M.M.Chou, H.Hanafusa, B.Schaffhausen, and L.C.Chantley (1993): SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-78.
  28. Y.Shi, K.Alin, and S.P.Goff (1995): Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev* 9, 2583-97.
  29. Z.Dai and A.M.Pendergast (1995): Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev* 9, 2569-82.
  30. J.Zhu and S.K.Shore (1996): c-ABL tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* 16, 7054-62.
  31. S.Kharbanda, A.Bharti, D.Pei, J.Wang, P.Pandey, R.Ren, R.Weichselbaum, C.T.Walsh, and D.Kufe (1996): The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6898-901.
  32. R.Baskaran, L.D.Wood, L.L.Whitaker, C.E.Canman, S.E.Morgan, Y.Xu, C.Barlow, D.Baltimore, A.Wynshaw-Boris, M.B.Kastan, and J.Y.Wang (1997):

- Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* 387, 516-9.
33. T.Shafman, K.K.Khanna, P.Kedar, K.Spring, S.Kozlov, T.Yen, K.Hobson, M.Gatei, N.Zhang, D.Watters, M.Egerton, Y.Shiloh, S.Kharbanda, D.Kufe, and M.F.Lavin (1997): Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* 387, 520-3.
  34. S.T.Wen and R.A.Van Etten (1997): The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. *Genes Dev* 11, 2456-67.
  35. R.Agami and Y.Shaul (1998): The kinase activity of c-Abl but not v-Abl is potentiated by direct interaction with RFXI, a protein that binds the enhancers of several viruses and cell-cycle regulated genes. *Oncogene* 16, 1779-88.
  36. S.T.Wen, P.K.Jackson, and R.A.Van Etten (1996): The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J* 15, 1583-95.
  37. S.Taagepera, D.McDonald, J.E.Loeb, L.L.Whitaker, A.K.McElroy, J.Y.Wang, and T.J.Hope (1998): Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7457-62.
  38. E.T.Kipreos and J.Y.Wang (1992): Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 256, 382-5.
  39. S.M.Feller, B.Knudsen, and H.Hanafusa (1994): c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *EMBO J* 13, 2341-51.
  40. R.Ren, Z.S.Ye, and D.Baltimore (1994): Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev* 8, 783-95.
  41. R.A.Van Etten, P.K.Jackson, D.Baltimore, M.C.Sanders, P.T.Matsudaira, and P.A.Janmey (1994): The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol* 124, 325-40.
  42. A.M.Pendergast, A.J.Muller, M.H.Havlik, R.Clark, F.McCormick, and O.N.Witte (1991): Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5927-31.
  43. J.B.Konopka and O.N.Witte (1985): Detection of c-abl tyrosine kinase activity in vitro permits direct comparison of normal and altered abl gene products. *Mol Cell Biol* 5, 3116-23.
  44. B.J.Mayer and D.Baltimore (1994): Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 14, 2883-94.
  45. R.A.Van Etten, J.Debnath, H.Zhou, and J.M.Casasnovas (1995): Introduction of a loss-of-function point mutation from the SH3 region of the *Caenorhabditis elegans* sem-5 gene activates the transforming ability of c-abl in vivo and abolishes binding of proline-rich ligands in vitro. *Oncogene* 10, 1977-88.
  46. D.Barila and G.Superti-Furga (1998): An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nat Genet* 18, 280-2.
  47. J.Y.Wang (1993): Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 3, 35-43.

48. P.J.Welch and J.Y.Wang (1995): Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 15, 5542-51.
49. P.J.Welch and J.Y.Wang (1993): A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-90.
50. D.B.Bregman, R.G.Pestell, and V.J.Kidd (2000): Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Front Biosci* 5, 244-57.
51. J.Duyster, R.Baskaran, and J.Y.Wang (1995): Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl- mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl- terminal repeated domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1555-9.
52. R.Baskaran, G.G.Chiang, and J.Y.Wang (1996): Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C- terminal repeated domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 16, 3361-9.
53. S.Kharbanda, Z.M.Yuan, R.Weichselbaum, and D.Kufe (1997): Functional role for the c-Abl protein tyrosine kinase in the cellular response to genotoxic stress. *Biochim Biophys Acta* 1333, 1-7.
54. S.Kharbanda, Z.M.Yuan, R.Weichselbaum, and D.Kufe (1998): Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* 17, 3309-18.
55. R.A.Van Etten (1999): Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9, 179-86.
56. Y.Shaul (2000): c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 7, 10-6.
57. A.B.Raitano, Y.E.Whang, and C.L.Sawyers (1997): Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim Biophys Acta* 1333, 201-16.
58. J.M.Lewis and M.A.Schwartz (1998): Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c- Abl. *J Biol Chem* 273, 14225-30.
59. J.ten Hoeve, C.Morris, N.Heisterkamp, and J.Groffen (1993): Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crk-like gene. *Oncogene* 8, 2469-74.
60. J.ten Hoeve, V.Kaartinen, T.Fioretos, L.Haataja, J.W.Voncken, N.Heisterkamp, and J.Groffen (1994): Cellular interactions of CRKL, an SH2-SH3 adaptor protein. *Cancer Res* 54, 2563-7.
61. S.M.Feller, G.Posern, J.Voss, C.Kardinal, D.Sakkab, J.Zheng, and B.S.Knudsen (1998): Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *J Cell Physiol* 177, 535-52.
62. R.Sakai, A.Iwamatsu, N.Hirano, S.Ogawa, T.Tanaka, H.Mano, Y.Yazaki, and H.Hirai (1994): A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v- Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO J* 13, 3748-56.
63. L.A.Petch, S.M.Bockholt, A.Bouton, J.T.Parsons, and K.Burridge (1995): Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 src substrate. *J Cell Sci* 108, 1371-9.

64. B.J.Mayer, H.Hirai, and R.Sakai (1995): Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein- tyrosine kinases. *Curr Biol* 5, 296-305.
65. R.Plattner, L.Kadlec, K.A.DeMali, A.Kazlauskas, and A.M.Pendergast (1999): c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13, 2400-11.
66. Y.E.Whang, C.Tran, C.Henderson, R.G.Syljuasen, N.Rozengurt, W.H.McBride, and C.L.Sawyers (2000): c-Abl is required for development and optimal cell proliferation in the context of p53 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5486-91.
67. H.Yano, F.Cong, R.B.Birge, S.P.Goff, and M.V.Chao (2000): Association of the Abl tyrosine kinase with the Trk nerve growth factor receptor. *J Neurosci Res* 59, 356-64.
68. A.Koch, A.Mancini, M.Stefan, R.Niedenthal, H.Niemann, and T.Tamura (2000): Direct interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non- receptor tyrosine kinase, c-Abl, through the activation loop. *FEBS Lett* 469, 72-6.
69. L.M.Lanier and F.B.Gertler (2000): From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* 10, 80-7.
70. B.Li, S.Boast, K.de los Santos, I.Schieren, M.Quiroz, S.L.Teitelbaum, M.M.Tondravi, and S.P.Goff (2000): Mice deficient in Abl are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat Genet* 24, 304-8.
71. D.M.Juriloff and M.J.Harris (2000): Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet* 9, 993-1000.
72. G.D.Kruh, C.R.King, M.H.Kraus, N.C.Popescu, S.C.Amsbaugh, W.O.McBride, and S.A.Aaronson (1986): A novel human gene closely related to the abl proto-oncogene. *Science* 234, 1545-8.
73. G.D.Kruh, R.Perego, T.Miki, and S.A.Aaronson (1990): The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5802-6.
74. R.Perego, D.Ron, and G.D.Kruh (1991): Arg encodes a widely expressed 145 kDa protein-tyrosine kinase. *Oncogene* 6, 1899-902.
75. B.Wang and G.D.Kruh (1996): Subcellular localization of the Arg protein tyrosine kinase. *Oncogene* 13, 193-7.
76. R.Baskaran, G.G.Chiang, T.Mysliwicz, G.D.Kruh, and J.Y.Wang (1997): Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by the Abl-related gene product. *J Biol Chem* 272, 18905-9.
77. B.Wang, T.Mysliwicz, S.M.Feller, B.Knudsen, H.Hanafusa, and G.D.Kruh (1996): Proline-rich sequences mediate the interaction of the Arg protein tyrosine kinase with Crk. *Oncogene* 13, 1379-85.
78. R.A.Perego, C.Bianchi, B.Brande, M.Urbano, and U.Del Monte (1998): Increment of nonreceptor tyrosine kinase Arg RNA as evaluated by semiquantitative RT-PCR in granulocyte and macrophage-like differentiation of HL-60 cells. *Exp Cell Res* 245, 146-54.
79. Y.Maru and O.N.Witte (1991): The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 67, 459-68.

80. J.R.McWhirter, D.L.Galasso, and J.Y.Wang (1993): A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13, 7587-95.
81. A.M.Pendergast, A.J.Muller, M.H.Havlik, Y.Maru, and O.N.Witte (1991): 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, 161-71.
82. G.Ma, D.Lu, Y.Wu, J.Liu, and R.B.Arlinghaus (1997): Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* 14, 2367-72.
83. H.Fu, R.R.Subramanian, and S.C.Masters (2000): 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 617-47.
84. G.W.Reuther, H.Fu, L.D.Cripe, R.J.Collier, and A.M.Pendergast (1994): Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 266, 129-33.
85. S.Braselmann and F.McCormick (1995): Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *EMBO J* 14, 4839-48.
86. D.Ron, M.Zannini, M.Lewis, R.B.Wickner, L.T.Hunt, G.Graziani, S.R.Tronek, S.A.Aaronson, and A.Eva (1991): A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *New Biol* 3, 372-9.
87. T.H.Chuang, X.Xu, V.Kaartinen, N.Heisterkamp, J.Groffen, and G.M.Bokoch (1995): Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10282-6.
88. D.Diekman, S.Brill, M.D.Garrett, N.Totty, J.Hsuan, C.Monfries, C.Hall, L.Lim, and A.Hall (1991): Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351, 400-2.
89. I.G.Macara, K.M.Lounsbury, S.A.Richards, C.McKiernan, and D.Bar-Sagi (1996): The Ras superfamily of GTPases. *Faseb J* 10, 625-30.
90. J.W.Voncken, H.van Schaick, V.Kaartinen, K.Deemer, T.Coates, B.Landing, P.Pattengale, O.Dorseuil, G.M.Bokoch, J.Groffen, and et al. (1995): Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 80, 719-28.
91. G.Saglio, F.Pane, G.Martinelli, and A.Guerrasio (1999): BCR/ABL rearrangement and leukemia phenotype. *Leukemia* 13 *Suppl 1*, S96.
92. F.Pane, F.Frigeri, M.Sindona, L.Luciano, F.Ferrara, R.Cimino, G.Meloni, G.Saglio, F.Salvatore, and B.Rotoli (1996): Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410-4.
93. H.Wada, S.Mizutani, J.Nishimura, Y.Usuki, M.Kohsaki, M.Komai, H.Kaneko, S.Sakamoto, D.Delia, A.Kanamaru, and et al. (1995): Establishment and molecular characterization of a novel leukemic cell line with Philadelphia chromosome expressing p230 BCR/ABL fusion protein. *Cancer Res* 55, 3192-6.
94. L.C.Chan, K.K.Karhi, S.I.Rayter, N.Heisterkamp, S.Eridani, R.Powles, S.D.Lawler, J.Groffen, J.G.Foulkes, M.F.Greaves, and et al. (1987): A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 325, 635-7.

95. J.Q.Guo, C.F.Hirsch-Ginsberg, Y.M.Xian, S.A.Stass, R.E.Champlin, S.A.Giralt, K.B.McCredie, M.L.Campbell, and R.B.Arlinghaus (1993): Acute lymphoid leukemia molecular phenotype in a patient with benign- phase chronic myelogenous leukemia. *Hematol Pathol* 7, 91-106.
96. S.Iwata, S.Mizutani, S.Nakazawa, and J.Yata (1994): Heterogeneity of the breakpoint in the ABL gene in cases with BCR/ABL transcript lacking ABL exon a2. *Leukemia* 8, 1696-702.
97. M.Amabile, G.Martinelli, C.Terragna, V.Montefusco, A.Tabilio, and S.Tura (1999): An atypical (b3/a3) junction of the bcr/abl gene lacking abl exon a2 in a patient with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 84, 573-5.
98. G.Saglio, A.Guerrasio, C.Rosso, A.Zaccaria, A.Tassinari, A.Serra, G.Rege-Cambrin, U.Mazza, and F.Gavosto (1990): New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 76, 1819-24.
99. P.Papadopoulos, S.A.Ridge, C.A.Boucher, C.Stocking, and L.M.Wiedemann (1995): The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 55, 34-8.
100. T.R.Golub, A.Goga, G.F.Barker, D.E.Afar, J.McLaughlin, S.K.Bohlander, J.D.Rowley, O.N.Witte, and D.G.Gilliland (1996): Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 16, 4107-16.
101. T.R.Golub, T.McLean, K.Stegmaier, M.Carroll, M.Tomasson, and D.G.Gilliland (1996): The TEL gene and human leukemia. *Biochim Biophys Acta* 1288, 7-10.
102. P.Andreasson, B.Johansson, M.Carlsson, I.Jarlsfelt, T.Fioretos, F.Mitelman, and M.Hoglund (1997): BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes Chromosomes Cancer* 20, 299-304.
103. A.Barbouti, T.Ahlgren, B.Johansson, M.Hoglund, C.Lassen, I.Tureson, F.Mitelman, and T.Fioretos (2003): Clinical and genetic studies of ETV6/ABL1-positive chronic myeloid leukaemia in blast crisis treated with imatinib mesylate. *Br J Haematol* 122, 85-93.
104. Y.Iijima, T.Ito, T.Oikawa, M.Eguchi, M.Eguchi-Ishimae, N.Kamada, K.Kishi, S.Asano, Y.Sakaki, and Y.Sato (2000): A new ETV6/TEL partner gene, ARG (ABL-related gene or ABL2), identified in an AML-M3 cell line with a t(1;12)(q25;p13) translocation. *Blood* 95, 2126-31.
105. G.Cazzaniga, S.Tosi, A.Aloisi, G.Giudici, M.Daniotti, P.Pioltelli, L.Kearney, and A.Biondi (1999): The tyrosine kinase abl-related gene ARG is fused to ETV6 in an AML- M4Eo patient with a t(1;12)(q25;p13): molecular cloning of both reciprocal transcripts. *Blood* 94, 4370-3.
106. J.Voss, N.Heisterkamp, J.Groffen, and S.M.Feller (2001): Leukemic kinases of the Abl family - an update. *Signal Transduction* 1, 1-26.
107. A.M.Pendergast, M.L.Gishizky, M.H.Havlik, and O.N.Witte (1993): SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol* 13, 1728-36.

108. T.Schindler, W.Bornmann, P.Pellicena, W.T.Miller, B.Clarkson, and J.Kuriyan (2000): Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938-42.
109. A.J.Muller, J.C.Young, A.M.Pendergast, M.Pondel, N.R.Landau, D.R.Littman, and O.N.Witte (1991): BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 11, 1785-92.
110. R.Chopra, Q.Q.Pu, and A.G.Elefanty (1999): Biology of BCR-ABL. *Blood Rev* 13, 211-29.
111. A.Di Bacco, K.Keeshan, S.L.McKenna, and T.G.Cotter (2000): Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist* 5, 405-15.
112. R.A.Mandanias, D.S.Leibowitz, K.Gharehbaghi, T.Tauchi, G.S.Burgess, K.Miyazawa, H.N.Jayaram, and H.S.Boswell (1993): Role of p21 RAS in p210 bcr-abl transformation of murine myeloid cells. *Blood* 82, 1838-47.
113. K.Okuda, U.Matulonis, R.Salgia, Y.Kanakura, B.Druker, and J.D.Griffin (1994): Factor independence of human myeloid leukemia cell lines is associated with increased phosphorylation of the proto-oncogene Raf-1. *Exp Hematol* 22, 1111-7.
114. T.Skorski, M.Nieborowska-Skorska, C.Szczylik, P.Kanakaraj, D.Perrotti, G.Zon, A.Gewirtz, B.Perussia, and B.Calabretta (1995): C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis. *Cancer Res* 55, 2275-8.
115. U.Matulonis, R.Salgia, K.Okuda, B.Druker, and J.D.Griffin (1993): Interleukin-3 and p210 BCR/ABL activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line. *Exp Hematol* 21, 1460-6.
116. D.Cortez, G.Reuther, and A.M.Pendergast (1997): The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15, 2333-42.
117. S.Dan, M.Naito, and T.Tsuruo (1998): Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR - ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ* 5, 710-5.
118. C.L.Sawyers (1993): The role of myc in transformation by BCR-ABL. *Leuk Lymphoma* 11, 45-6.
119. C.L.Sawyers, W.Callahan, and O.N.Witte (1992): Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 70, 901-10.
120. K.Shuai, J.Halpern, J.ten Hoeve, X.Rao, and C.L.Sawyers (1996): Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 13, 247-54.
121. N.Carlesso, D.A.Frank, and J.D.Griffin (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, 811-20.

122. R.L. Ilaria, Jr. and R.A. Van Etten (1996): P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704-10.
123. M. Hamdane, M.H. David-Cordonnier, and J.C. D'Halluin (1997): Activation of p65 NF-kappaB protein by p210BCR-ABL in a myeloid cell line (P210BCR-ABL activates p65 NF-kappaB). *Oncogene* 15, 2267-75.
124. J.Y. Reuther, G.W. Reuther, D. Cortez, A.M. Pendergast, and A.S. Baldwin, Jr. (1998): A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 12, 968-81.
125. G.S. Burgess, E.A. Williamson, L.D. Cripe, S. Litz-Jackson, J.A. Bhatt, K. Stanley, M.J. Stewart, A.S. Kraft, H. Nakshatri, and H.S. Boswell (1998): Regulation of the c-jun gene in p210 BCR-ABL transformed cells corresponds with activity of JNK, the c-jun N-terminal kinase. *Blood* 92, 2450-60.
126. A.B. Raitano, J.R. Halpern, T.M. Hambuch, and C.L. Sawyers (1995): The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11746-50.
127. L. Varticovski, G.Q. Daley, P. Jackson, D. Baltimore, and L.C. Cantley (1991): Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol* 11, 1107-13.
128. T. Skorski, P. Kanakaraj, M. Nieborowska-Skorska, M.Z. Ratajczak, S.C. Wen, G. Zon, A.M. Gewirtz, B. Perussia, and B. Calabretta (1995): Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86, 726-36.
129. T. Skorski, A. Bellacosa, M. Nieborowska-Skorska, M. Majewski, R. Martinez, J.K. Choi, R. Trotta, P. Wlodarski, D. Perrotti, T.O. Chan, M.A. Wasik, P.N. Tsichlis, and B. Calabretta (1997): Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 16, 6151-61.
130. C.L. Sawyers, J. McLaughlin, and O.N. Witte (1995): Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181, 307-13.
131. B. Calabretta and T. Skorski (1996): BCR/ABL regulation of PI-3 kinase activity. *Leuk Lymphoma* 23, 473-6.
132. M. Dickens, J.S. Rogers, J. Cavanagh, A. Raitano, Z. Xia, J.R. Halpern, M.E. Greenberg, C.L. Sawyers, and R.J. Davis (1997): A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway. *Science* 277, 693-6.
133. A. Bedi, B.A. Zehnauer, J.P. Barber, S.J. Sharkis, and R.J. Jones (1994): Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83, 2038-44.
134. A. McGahon, R. Bissonnette, M. Schmitt, K.M. Cotter, D.R. Green, and T.G. Cotter (1994): BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83, 1179-87.
135. A. Bedi, J.P. Barber, G.C. Bedi, W.S. el-Deiry, D. Sidransky, M.S. Vala, A.J. Akhtar, J. Hilton, and R.J. Jones (1995): BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86, 1148-58.

136. A.J.McGahon, W.K.Nishioka, S.J.Martin, A.Mahboubi, T.G.Cotter, and D.R.Green (1995): Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem* 270, 22625-31.
137. K.Nishii, J.H.Kabarowski, D.L.Gibbons, S.D.Griffiths, I.Titley, L.M.Wiedemann, and M.F.Greaves (1996): ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 13, 2225-34.
138. I.K.Hariharan, J.M.Adams, and S.Cory (1988): bcr-abl oncogene renders myeloid cell line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. *Oncogene Res* 3, 387-99.
139. X.Jiang, A.Lopez, T.Holyoake, A.Eaves, and C.Eaves (1999): Autocrine production and action of IL-3 and granulocyte colony-stimulating factor in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12804-9.
140. L.Buday and J.Downward (1993): Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 13, 1903-10.
141. J.B.Gibbs, M.S.Marshall, E.M.Scolnick, R.A.Dixon, and U.S.Vogel (1990): Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein (GAP). *J Biol Chem* 265, 20437-42.
142. J.Schlessinger (1993): How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18, 273-5.
143. J.Downward (1992): Regulation of p21ras by GTPase activating proteins and guanine nucleotide exchange proteins. *Curr Opin Genet Dev* 2, 13-8.
144. A.M.Pendergast, L.A.Quilliam, L.D.Cripe, C.H.Bassing, Z.Dai, N.Li, A.Batzer, K.M.Rabun, C.J.Der, J.Schlessinger, and M.L.Gishizky (1993): BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-85.
145. L.Puil, J.Liu, G.Gish, G.Mbamalu, D.Bowtell, P.G.Pelicci, R.Arlinghaus, and T.Pawson (1994): Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13, 764-73.
146. D.Cortez, L.Kadlec, and A.M.Pendergast (1995): Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 15, 5531-41.
147. A.Goga, J.McLaughlin, D.E.Afar, D.C.Saffran, and O.N.Witte (1995): Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82, 981-8.
148. C.Hagemann and U.R.Rapp (1999): Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp Cell Res* 253, 34-46.
149. H.J.Schaeffer and M.J.Weber (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-44.
150. C.Widmann, S.Gibson, M.B.Jarpe, and G.L.Johnson (1999): Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-80.
151. M.Whitman, C.P.Downes, M.Keeler, T.Keller, and L.Cantley (1988): Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332, 644-6.

152. B.Vanhaesebroeck, S.J.Leevers, G.Panayotou, and M.D.Waterfield (1997): Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22, 267-72.
153. D.Harrison-Findik, M.Susa, and L.Varticovski (1995): Association of phosphatidylinositol 3-kinase with SHC in chronic myelogenous leukemia cells. *Oncogene* 10, 1385-91.
154. M.Sattler, R.Salgia, K.Okuda, N.Uemura, M.A.Durstin, E.Pisick, G.Xu, J.L.Li, K.V.Prasad, and J.D.Griffin (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, 839-46.
155. L.del Peso, M.Gonzalez-Garcia, C.Page, R.Herrera, and G.Nunez (1997): Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-9.
156. M.S.Neshat, A.B.Raitano, H.G.Wang, J.C.Reed, and C.L.Sawyers (2000): The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad- dependent and - independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3- kinase and Raf. *Mol Cell Biol* 20, 1179-86.
157. P.Salomoni, M.A.Wasik, R.F.Riedel, K.Reiss, J.K.Choi, T.Skorski, and B.Calabretta (1998): Expression of constitutively active raf-1 in the mitochondria restores antiapoptotic and leukemogenic potential of a transformation-deficient BCR/ABL mutant. *J Exp Med* 187, 1995-2007.
158. D.T.Chao and S.J.Korsmeyer (1998): BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
159. S.R.Datta, H.Dudek, X.Tao, S.Masters, H.Fu, Y.Gotoh, and M.E.Greenberg (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-41.
160. T.Oda, C.Heaney, J.R.Hagopian, K.Okuda, J.D.Griffin, and B.J.Druker (1994): Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 269, 22925-8.
161. G.L.Nichols, M.A.Raines, J.C.Vera, L.Lacomis, P.Tempst, and D.W.Golde (1994): Identification of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood* 84, 2912-8.
162. J.ten Hoeve, R.B.Arlinghaus, J.Q.Guo, N.Heisterkamp, and J.Groffen (1994): Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. *Blood* 84, 1731-6.
163. R.Salgia, E.Pisick, M.Sattler, J.L.Li, N.Uemura, W.K.Wong, S.A.Burky, H.Hirai, L.B.Chen, and J.D.Griffin (1996): p130CAS forms a signaling complex with the adapter protein CRKL in hematopoietic cells transformed by the BCR/ABL oncogene. *J Biol Chem* 271, 25198-203.
164. C.E.Andoniou, C.B.Thien, and W.Y.Langdon (1994): Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *EMBO J* 13, 4515-23.

165. R.Salgia, J.L.Li, S.H.Lo, B.Brunkhorst, G.S.Kansas, E.S.Sobhany, Y.Sun, E.Pisick, M.Hallek, T.Ernst, R.Tantravahi, L.B.Chen, and J.D.Griffin (1995): Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem* 270, 5039-47.
166. W.Oehrl, C.Kardinal, S.Ruf, K.Adermann, J.Groffen, G.S.Feng, J.Blenis, T.H.Tan, and S.M.Feller (1998): The germinal center kinase (GCK)-related protein kinases HPK1 and KHS are candidates for highly selective signal transducers of Crk family adapter proteins. *Oncogene* 17, 1893-901.
167. C.Heaney, K.Kolibaba, A.Bhat, T.Oda, S.Ohno, S.Fanning, and B.J.Druker (1997): Direct binding of CRKL to BCR-ABL is not required for BCR-ABL transformation. *Blood* 89, 297-306.
168. R.de Jong, J.ten Hoeve, N.Heisterkamp, and J.Groffen (1997): Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site. *Oncogene* 14, 507-13.
169. K.H.Kirsch, M.M.Georgescu, S.Ishimaru, and H.Hanafusa (1999): CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6211-6216.
170. K.H.Kirsch, M.M.Georgescu, and H.Hanafusa (1998): Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *J Biol Chem* 273, 25673-25679.
171. T.R.Polte and S.K.Hanks (1995): Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10678-82.
172. R.Sakai, A.Iwamatsu, N.Hirano, S.Ogawa, T.Tanaka, J.Nishida, Y.Yazaki, and H.Hirai (1994): Characterization, partial purification, and peptide sequencing of p130, the main phosphoprotein associated with v-Crk oncoprotein. *J Biol Chem* 269, 32740-6.
173. Y.Nojima, N.Morino, T.Mimura, K.Hamasaki, H.Furuya, R.Sakai, T.Sato, K.Tachibana, C.Morimoto, Y.Yazaki, and et al. (1995): Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J Biol Chem* 270, 15398-402.
174. R.Salgia, N.Uemura, K.Okuda, J.L.Li, E.Pisick, M.Sattler, R.de Jong, B.Druker, N.Heisterkamp, L.B.Chen, and et al. (1995): CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 270, 29145-50.
175. R.Salgia, J.L.Li, D.S.Ewaniuk, W.Pear, E.Pisick, S.A.Burky, T.Ernst, M.Sattler, L.B.Chen, and J.D.Griffin (1997): BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest* 100, 46-57.
176. E.Weisberg, M.Sattler, D.S.Ewaniuk, and R.Salgia (1997): Role of focal adhesion proteins in signal transduction and oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 8, 343-58.
177. T.R.Golub, G.F.Barker, M.Lovett, and D.G.Gilliland (1994): Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77, 307-16.
178. K.Stegmaier, S.Takeuchi, T.R.Golub, S.K.Bohlander, C.R.Bartram, and H.P.Koeffler (1996): Mutational analysis of the candidate tumor suppressor

- genes TEL and KIP1 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 56, 1413-7.
179. A.D.Sharrocks, A.L.Brown, Y.Ling, and P.R.Yates (1997): The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1371-87.
180. H.Poirel, C.Oury, C.Carron, E.Duprez, Y.Laabi, A.Tsapis, S.P.Romana, M.Mauchauffe, M.Le Coniat, R.Berger, J.Ghysdael, and O.A.Bernard (1997): The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 14, 349-57.
181. L.C.Wang, F.Kuo, Y.Fujiwara, D.G.Gilliland, T.R.Golub, and S.H.Orkin (1997): Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J* 16, 4374-83.
182. R.G.Lopez, C.Carron, C.Oury, P.Gardellin, O.Bernard, and J.Ghysdael (1999): TEL is a sequence-specific transcriptional repressor. *J Biol Chem* 274, 30132-8.
183. R.Fenrick, L.Wang, J.Nip, J.M.Amann, R.J.Rooney, J.Walker-Daniels, H.C.Crawford, D.L.Hulboy, M.S.Kinch, L.M.Matrisian, and S.W.Hiebert (2000): TEL, a Putative Tumor Suppressor, Modulates Cell Growth and Cell Morphology of Ras-Transformed Cells While Repressing the Transcription of stromelysin-1. *Mol Cell Biol* 20, 5828-5839.
184. B.A.Kwiatkowski, L.S.Bastian, T.R.Bauer, Jr., S.Tsai, A.G.Zielinska-Kwiatkowska, and D.D.Hickstein (1998): The ets family member Tel binds to the Fli-1 oncoprotein and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 273, 17525-30.
185. S.R.Chakrabarti, R.Sood, S.Ganguly, S.Bohlander, Z.Shen, and G.Nucifora (1999): Modulation of TEL transcription activity by interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme UBC9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7467-72.
186. B.A.Kwiatkowski, A.G.Zielinska-Kwiatkowska, T.R.Bauer, Jr., and D.D.Hickstein (2000): The ETS family member Tel antagonizes the Fli-1 phenotype in hematopoietic cells. *Blood Cells Mol Dis* 26, 84-90.
187. Y.Mao, M.Sun, S.D.Desai, and L.F.Liu (2000): SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4046-51.
188. W.Seufert, B.Futcher, and S.Jentsch (1995): Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373, 78-81.
189. L.C.Wang, W.Swat, Y.Fujiwara, L.Davidson, J.Visvader, F.Kuo, F.W.Alt, D.G.Gilliland, T.R.Golub, and S.H.Orkin (1998): The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12, 2392-402.
190. K.Stegmaier, S.Pendse, G.F.Barker, P.Bray-Ward, D.C.Ward, K.T.Montgomery, K.S.Krauter, C.Reynolds, J.Sklar, M.Donnely, and et al. (1995): Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 86, 38-44.
191. H.Cave, V.Cacheux, S.Raynaud, G.Brunie, M.Bakkus, P.Cochaux, C.Preudhomme, J.L.Lai, E.Vilmer, and B.Grandchamp (1997): ETV6 is the target of chromosome 12p deletions in t(12;21) childhood acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 11, 1459-64.

192. S.Takeuchi, T.Seriu, C.R.Bartram, T.R.Golub, A.Reiter, I.Miyoshi, D.G.Gilliland, and H.P.Koeffler (1997): TEL is one of the targets for deletion on 12p in many cases of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia 11*, 1220-3.
193. M.J.Edel (1999): Analysis of the TEL protein during tumour angiogenesis. *Anticancer Res 19*, 2945-51.
194. S.P.Romana, M.Mauchauffe, M.Le Coniat, I.Chumakov, D.Le Paslier, R.Berger, and O.A.Bernard (1995): The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood 85*, 3662-70.
195. T.R.Golub, G.F.Barker, S.K.Bohlander, S.W.Hiebert, D.C.Ward, P.Bray-Ward, E.Morgan, S.C.Raimondi, J.D.Rowley, and D.G.Gilliland (1995): Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A 92*, 4917-21.
196. F.Salomon-Nguyen, V.Della-Valle, M.Mauchauffe, M.Busson-Le Coniat, J.Ghysdael, R.Berger, and O.A.Bernard (2000): The t(1;12)(q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 6757-62.
197. F.Yagasaki, I.Jinnai, S.Yoshida, Y.Yokoyama, A.Matsuda, S.Kusumoto, H.Kobayashi, H.Terasaki, K.Ohyashiki, N.Asou, I.Murohashi, M.Bessho, and K.Hirashima (1999): Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). *Genes Chromosomes Cancer 26*, 192-202.
198. J.Cools, C.Bilhou-Nabera, I.Wlodarska, C.Cabrol, P.Talmant, P.Bernard, A.Hagemeijer, and P.Marynen (1999): Fusion of a novel gene, BTL, to ETV6 in acute myeloid leukemias with a t(4;12)(q11-q12;p13). *Blood 94*, 1820-4.
199. A.Chase, A.Reiter, L.Burci, G.Cazzaniga, A.Biondi, J.Pickard, I.A.Roberts, J.M.Goldman, and N.C.Cross (1999): Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood 93*, 1025-31.
200. V.Lacronique, A.Boureaux, V.D.Valle, H.Poirel, C.T.Quang, M.Mauchauffe, C.Berthou, M.Lessard, R.Berger, J.Ghysdael, and O.A.Bernard (1997): A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science 278*, 1309-12.
201. P.Peeters, S.D.Raynaud, J.Cools, I.Wlodarska, J.Grosgeorge, P.Philip, F.Monpoux, L.Van Rompaey, M.Baens, H.van den Berghe, and P.Marynen (1997): Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood 90*, 2535-40.
202. P.Peeters, I.Wlodarska, M.Baens, A.Criel, D.Selleslag, A.Hagemeijer, H.van den Berghe, and P.Marynen (1997): Fusion of ETV6 to MDS1/EVI1 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders. *Cancer Res 57*, 564-9.
203. A.Buijs, S.Sherr, S.van Baal, S.van Bezouw, D.van der Plas, A.Geurts van Kessel, P.Riegman, R.Lekanne Deprez, E.Zwarthoff, A.Hagemeijer, and et al. (1995): Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11. *Oncogene 10*, 1511-9.

204. S.R.Knezevich, D.E.McFadden, W.Tao, J.F.Lim, and P.H.Sorensen (1998): A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 18, 184-7.
205. S.R.Knezevich, M.J.Garnett, T.J.Pysher, J.B.Beckwith, P.E.Grundy, and P.H.Sorensen (1998): ETV6-NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res* 58, 5046-8.
206. B.P.Rubin, C.J.Chen, T.W.Morgan, S.Xiao, H.E.Grier, H.P.Kozakewich, A.R.Perez-Atayde, and J.A.Fletcher (1998): Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol* 153, 1451-8.
207. M.Eguchi, M.Eguchi-Ishimae, A.Tojo, K.Morishita, K.Suzuki, Y.Sato, S.Kudoh, K.Tanaka, M.Setoyama, F.Nagamura, S.Asano, and N.Kamada (1999): Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25). *Blood* 93, 1355-63.
208. Y.Suto, Y.Sato, S.D.Smith, J.D.Rowley, and S.K.Bohlander (1997): A t(6;12)(q23;p13) results in the fusion of ETV6 to a novel gene, STL, in a B-cell ALL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 254-68.
209. J.R.Hannemann, D.M.McManus, J.H.Kabarowski, and L.M.Wiedemann (1998): Haemopoietic transformation by the TEL/ABL oncogene. *Br J Haematol* 102, 475-85.
210. K.Okuda, T.R.Golub, D.G.Gilliland, and J.D.Griffin (1996): p210BCR/ABL, p190BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. *Oncogene* 13, 1147-52.
211. W.M.Potts, M.Olsen, D.Boettiger, and V.M.Vogt (1987): Epitope mapping of monoclonal antibodies to gag protein p19 of avian sarcoma and leukaemia viruses. *J Gen Virol* 68, 3177-82.
212. E.T.Kipreos, G.J.Lee, and J.Y.Wang (1987): Isolation of temperature-sensitive tyrosine kinase mutants of v-abl oncogene by screening with antibodies for phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1345-9.
213. S.Dhut, B.Gibbons, T.Chaplin, and B.D.Young (1991): Establishment of a lymphoblastoid cell line, SD-1, expressing the p190 bcr-abl chimaeric protein. *Leukemia* 5, 49-55.
214. M.Ahmed, I.Dusanter-Fourt, M.Bernard, P.Mayeux, R.G.Hawley, T.Bennardo, S.Novault, M.L.Bonnet, S.Gisselbrecht, B.Varet, and A.G.Turhan (1998): BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line. *Oncogene* 16, 489-96.
215. M.M.Bradford (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
216. S.J.Taylor and D.Shalloway (1996): Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* 6, 1621-7.

217. Z.Songyang, K.L.Carraway III, J.M.Eck, S.C.Harrison, R.A.Feldman, M.Mohammadi, J.Schlessinger, S.R.Hubbard, D.P.Smith, C.Eng, M.J.Lorenzo, B.A.J.Ponder, B.Mayer, and L.C.Cantley (1995): Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 373, 536-539.
218. R.Baskaran, M.E.Dahmus, and J.Y.Wang (1993): Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11167-71.
219. K.Terada, Y.Kaziro, and T.Satoh (1997): Ras-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in response to interleukin-3 stimulation in hematopoietic BaF3 cells. *J Biol Chem* 272, 4544-8.
220. M.Anafi, A.Gazit, C.Gilon, Y.Ben-Neriah, and A.Levitzki (1992): Selective interactions of transforming and normal abl proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrphostins. *J Biol Chem* 267, 4518-23.
221. J.Liu, M.Campbell, J.Q.Guo, D.Lu, Y.M.Xian, B.S.Andersson, and R.B.Arlinghaus (1993): BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates P160 BCR on tyrosine predominantly within the first BCR exon. *Oncogene* 8, 101-9.
222. D.Lu, J.Liu, M.Campbell, J.Q.Guo, N.Heisterkamp, J.Groffen, E.Canaani, and R.Arlinghaus (1993): Tyrosine phosphorylation of P160 BCR by P210 BCR-ABL. *Blood* 82, 1257-63.
223. J.J.Wu, D.E.Afar, H.Phan, O.N.Witte, and K.S.Lam (2002): Recognition of multiple substrate motifs by the c-ABL protein tyrosine kinase. *Comb Chem High Throughput Screen* 5, 83-91.
224. J.J.Wu, H.Phan, and K.S.Lam (1998): Comparison of the intrinsic kinase activity and substrate specificity of c-Abl and Bcr-Abl. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2279-84.
225. M.Amoui and W.T.Miller (2000): The substrate specificity of the catalytic domain of Abl plays an important role in directing phosphorylation of the adaptor protein Crk. *Cell Signal* 12, 637-643.
226. B.E.Kemp, E.Benjamini, and E.G.Krebs (1976): Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1038-42.
227. C.Wang, T.R.Lee, D.S.Lawrence, and J.A.Adams (1996): Rate-determining steps for tyrosine phosphorylation by the kinase domain of v-fps. *Biochemistry* 35, 1533-9.
228. R.J.Boerner, S.C.Barker, and W.B.Knight (1995): Kinetic mechanisms of the forward and reverse pp60c-src tyrosine kinase reactions. *Biochemistry* 34, 16419-23.
229. P.A.Cole, P.Burn, B.Takacs, and C.T.Walsh (1994): Evaluation of the catalytic mechanism of recombinant human Csk (C-terminal Src kinase) using nucleotide analogs and viscosity effects. *J Biol Chem* 269, 30880-7.
230. J.A.Adams and S.S.Taylor (1992): Energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments. *Biochemistry* 31, 8516-22.

231. Q.Lou, M.E.Leftwich, R.T.McKay, S.E.Salmon, L.Rychetsky, and K.S.Lam (1997): Potent pseudosubstrate-based peptide inhibitors for p60(c-src) protein tyrosine kinase. *Cancer Res* 57, 1877-81.
232. J.Niu and D.S.Lawrence (1997): Nonphosphorylatable tyrosine surrogates. Implications for protein kinase inhibitor design. *J Biol Chem* 272, 1493-9.
233. V.M.Gelfanov, G.S.Burgess, S.Litz-Jackson, A.J.King, M.S.Marshall, H.Nakshatri, and H.S.Boswell (2001): Transformation of interleukin-3-dependent cells without participation of Stat5/bcl-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor kappaB-mediated antiapoptosis involving c-IAP2. *Blood* 98, 2508-2517.
234. T.Tauchi, S.Okabe, K.Miyazawa, and K.Ohyashiki (1998): The tetramerization domain-independent Ras activation by BCR-ABL oncoprotein in hematopoietic cells. *Int J Oncol* 12, 1269-76.
235. S.M.Feller, B.Knudsen, and H.Hanafusa (1995): Cellular proteins binding to the first Src homology 3 (SH3) domain of the proto-oncogene product c-Crk indicate Crk-specific signaling pathways. *Oncogene* 10, 1465-73.
236. B.S.Knudsen, S.M.Feller, and H.Hanafusa (1994): Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk. *J Biol Chem* 269, 32781-7.
237. R.P.Million and R.A.Van Etten (2000): The Grb2 binding site is required for the induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice by the Bcr/Abl tyrosine kinase. *Blood* 96, 664-670.
238. M.Majewski, M.Nieborowska-Skorska, P.Salomoni, A.Slupianek, K.Reiss, R.Trotta, B.Calabretta, and T.Skorski (1999): Activation of mitochondrial Raf-1 is involved in the antiapoptotic effects of Akt. *Cancer Res* 59, 2815-2819.
239. F.Griesinger, A.Janke, M.Podleschny, and S.K.Bohlander (2002): Identification of an ETV6-ABL2 fusion transcript in combination with an ETV6 point mutation in a T-cell acute lymphoblastic leukaemia cell line. *Br J Haematol* 119, 454-458.
240. Y.K.Keung, M.Beatty, W.Steward, B.Jackle, and M.Pettnati (2002): Chronic myelocytic leukemia with eosinophilia, t(9;12)(q34;p13), and ETV6-ABL gene rearrangement: case report and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 138, 139-142.
241. H.Lin, J.Q.Guo, M.Andreeff, and R.B.Arlinghaus (2002): Detection of dual TEL-ABL transcripts and a Tel-Abl protein containing phosphotyrosine in a chronic myeloid leukemia patient. *Leukemia* 16, 294-297.
242. J.W.Janssen, S.A.Ridge, P.Papadopoulos, F.Cotter, W.D.Ludwig, C.Fonatsch, H.Rieder, W.Ostertag, C.R.Bartram, and L.M.Wiedemann (1995): The fusion of TEL and ABL in human acute lymphoblastic leukaemia is a rare event. *Br J Haematol* 90, 222-4.
243. T.Nilsson, P.Andreasson, M.Hoglund, T.Fioretos, R.Billstrom, S.Garwicz, F.Mitelman, and B.Johansson (1998): ETV6/ABL fusion is rare in Ph-negative chronic myeloid disorders. *Leukemia* 12, 1167-8.

## 7 Anhang

### 7.1 *Verzeichnis der benutzten Abkürzungen*

Aminosäuren wurden in dieser Arbeit mit Einzelbuchstabenabkürzungen nach internationaler Konvention bezeichnet. 'x' bezeichnet eine beliebige der 25 beim Menschen vorkommenden Aminosäuren.

AKO	Abl defiziente Zellen
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALP	alkalische Leukozytenphosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
A-MuLV	Abelson Murine Leukaemia Virus
Arg	abl-related-Gen
ATCC	American Type Culture Collection
atm	Ataxia-Teleangiectasia-mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Bcr	breakpoint cluster region
BSA	Rinderserumalbumin
CML	chronische myeloische Leukämie
CNL	neutrophile Variante der CML
CTD	carboxy-terminale Domäne
CRKL	Crk like protein
CS	Kälberserum
CTD-ID	CTD-interacting domain
DH	Dbl-Homologie-Domäne
DMEM	
DNA	Desoxy
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DTT	Dithiothreitol
EBS	ETS-binding Site
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethyl)-tetraessigsäure
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
FAK	'focal adhesion'-Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
Gln	L-Glutamin
GST	Gluthation-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HC	heavy chain
HLH	Helix-Loop-Helix
HMW	High-Range Rainbow Molecular Weight Markers
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun-N-terminus-Kinase
JNKK	JNK-Kinase
LC	light chain
LDH	Laktatdehydrogenase
LMW	Low-Range Rainbow Molecular Weight Markers
MAPK	Mitogen-aktivierten Proteinkinase
MEK	MAPK/Erk-Kinase
MLB	Magnesium-containing cell lysis buffer
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NES	nuclear-export signal
NGF	nerve growth factor
NLS	nuclear localization signal
NRS	normal rabbit serum, Kaninchenkontrollserum
OD	optische Dichte
p130Cas	Crk associated substrate
PBS	Phosphate buffered saline
pc	polyklonaler Antikörper

PDGF	Platelet derived growth factor
Ph	Philadelphia-Chromosom
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonfluorid
PKB	Proteinkinase B
Rb	Retinoblastoma-Protein
RBD	Ras-Binding-Domain
RIPA100-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
scid	severe combined immunodeficiency
SDBB	Semi-Dry Blot-Puffer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2, SH3	Src-Homologiedomänen 2 und 3
SP	Substratpeptid
UBC9	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 9
WB	Westernblot
WCM	WEHI3 konditioniertes Medium

## ***7.2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen***

Abbildung 1: Das Philadelphia-Chromosom.....	2
Abbildung 2: Normale und onkogene Proteine der Abl-Tyrosinkinasefamilie.....	5
Abbildung 3: Exon-Struktur des c-abl-Gens und des bcr-Gens .....	9
Abbildung 4: Beispiele für Bcr-Abl abhängige Signalproteine .....	11
Abbildung 5: Exon-Struktur des tel-Gens. ....	15
Abbildung 6: Ras GTP-Beladungssassay .....	35
Abbildung 7: Anti-Abl Western-Blot von RIPA-Lysaten verschiedener Zelllinien .....	41
Abbildung 8: Spezifität verschiedener Antikörper im Kinaseassay .....	42
Abbildung 9: Vergleich der Substratspezifität der Abl-Kinasen.....	45

Abbildung 10: Koimmunpräzipitation von Tel-Abl und CRKL .....	47
Abbildung 11: Migrationsverhalten von Crk-Adaptoren .....	48
Abbildung 12: Tyrosinphosphorylierung von c-CrkII und CRKL .....	49
Abbildung 13: Immunoblotanalyse von Crk-Adapterpräzipitaten .....	50
Abbildung 14: Expression der Abl-Kinasen in Ba/F3 Linien .....	51
Abbildung 15: Karte des GST-c-Raf1-Expressionsvektors .....	52
Abbildung 16: Klonierungsschritte des Gst-c-Raf-1-RBD-Expressionsvektors .....	54
Abbildung 17: Konstitutive Ras-Aktivierung in Tel-Abl exprimierenden Zellen .....	55
Abbildung 18: Migrationsretardierung von c-Raf-1 .....	56
Abbildung 19: Konstitutive MAPK/Erk-Aktivierung .....	57
Abbildung 20: Aktivierung von c-Akt/PKB durch Abl-Onkogene .....	58
Tabelle 1: Prozentuale Häufigkeit der Befunde bei Patienten mit CML .....	1
Tabelle 2: Bruchpunkte verschiedener Fusionskinasen der humanen Abl-Familie und deren klinischer Phänotyp .....	10
Tabelle 3: Translokationen unter Beteiligung des tel-Gens .....	16
Tabelle 4: Zelllinien dieser Arbeit .....	20
Tabelle 5: Ausgewählte Zelllinien und Antikörper zur Immunpräzipitation der vier zu untersuchenden Kinasen .....	43
Tabelle 6: Synthetische Substratpeptide zur Analyse der Substratspezifität der Abl- Kinasen .....	43

## **Danksagungen**

Herrn Professor Dr. Ulf R. Rapp, Direktor des Institutes für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der Universität Würzburg, möchte ich ganz herzlich für die Möglichkeit danken, daß ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl habe anfertigen dürfen. In seinem Institut hatte ich Gelegenheit, wissenschaftliche Zusammenarbeit auf hohem Niveau zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen innerhalb und außerhalb des Hauses kennen zu lernen.

Für die Bereitschaft, die Betreuung für diese Arbeit zu übernehmen, für die interessante Themenstellung und die ständige Offenheit für anregende Diskussionen bin ich Herrn Privatdozent Dr. Stephan Feller zu höchstem Dank verpflichtet. Er war stets nicht nur um die Fertigstellung des experimentellen Teils durch intensive direkte praktische Anleitung und die Anfertigung der Promotionsschrift bemüht, sondern gab immer wesentliche Unterstützung auch zum Verständnis übergeordneter wissenschaftlicher Aspekte.

Mein herzlicher Dank gilt auch den ehemaligen Mitgliedern des Labors für molekulare Onkologie von Herrn Privatdozent Dr. Feller am MSZ für das außerordentlich hohe Maß an Kollegialität und freundschaftlicher Zusammenarbeit. Hier sind insbesondere Frau Dr. Kerstin Müller und Frau Sandra Ruffing für die Einarbeitung in Zellkulturmethoden und Proteintechniken, Herr Dr. Christian Kardinal für die Synthese der Substratpeptide, Herr Dr. Guido Posern für die Zusammenarbeit bei der Etablierung des Ras-Assays und die vielen Stunden der fruchtbaren Diskussion über das Manuskript der gemeinsamen Veröffentlichung und Herr Diplombiologe Marc Levitzki für die für das Fertigstellen dieser Arbeit essentielle Unterstützung in der Handhabung der Bilddateiformate zu nennen. Ohne Frau Dr. Dima Sakkab und Herrn Dr. Wolf Öhrl wäre mir die Arbeit im Labor deutlich weniger leicht von der Hand gegangen.

Herrn Professor Dr. Edgar Serfling vom Pathologischen Institut danke ich herzlich für das Interesse, das er der Thematik dieser Arbeit entgegen gebracht hat, und für die spontane Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Nicht zuletzt möchte ich ganz besonders auch meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung danken.

Abschließend danke ich allen, die nicht namentlich erwähnt sind, aber zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Jan Voss
Geburtsdatum, Geburtsort	24. September 1973, Köln
Familienstand	ledig

### **Schulbildung**

1980-1984	Grundschule Troisdorf-Eschmar
1984-1993	Gymnasium zum Altenforst, Troisdorf
September-November 1990	Bracknell College, Bracknell (GB)
Juni 1993	Abitur

### **Studium der Medizin**

1993-2000	Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
September 1995	Physikum
März 1996	Universität Göttingen, Chirurgie
August 1996	Erstes Medizinisches Staatsexamen
Oktober 1996	United States Medical Licensing Examination Step 1
April 1997	Missionsärztliche Klinik Würzburg, Innere Medizin
August 1997	Kantonsspital Luzern, Augenheilkunde
September 1997	Pathologisches Institut der Universität Würzburg
März/April 1998	Universität Lyon, Gynäkologie / Geburtshilfe
März 1999	Zweites Medizinisches Staatsexamen
Juni – Juli 1999	LSU, New Orleans, Hämatologie, Notfallmedizin
August - September 1999	Medizinische Poliklinik, Universität Würzburg
Oktober 1999 - Januar 2000	Kantonsspital Luzern, Chirurgie
Februar - Juni 2000	Neurologische Klinik, Universität Würzburg
November 2000	Drittes Medizinisches Staatsexamen

### **Wissenschaftliche Tätigkeit**

Januar 1996 – Juni 2001

Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der

Universität Würzburg, Labor für molekulare Onkologie,

Leiter: Priv.-Doz. Dr. Stephan Feller

seit September 2002

Neurologische Universitätsklinik der Universität des Saarlandes, Abteilung für

Neuroimmunologie, Leiter Priv.-Doz. Dr. Stefan Jung

### **Ärztliche Tätigkeit**

Februar 2001 - Juli 2002

Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

seit September 2002

Neurologische Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes

### **Persönliche Interessen**

Musik (Klarinette, Saxophon)

Sport (Rudern, Abfahrtsski)

Homburg im Mai 2004